

00528  
54



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO NUTRIMENTAL DE ALGUNAS FLORES  
COMESTIBLES MEXICANAS.

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUÍMICO EN ALIMENTOS**  
P R E S E N T A :  
**SEMEI LOPEZ GARCIA**



MEXICO, D.F.

EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

2003



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. I. MARIA DE LOURDES FLORES TELLEZ  
**Secretario:** Prof. LETICIA GIL VIEYRA  
**1er. Suplente** Prof. ROSA MARÍA ARGOTE ESPINOSA  
**2do. Suplente** Prof. BERNARDO LUCAS FLORENTINO

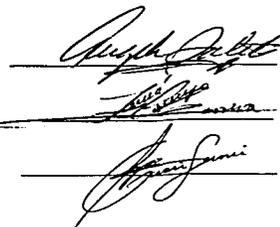
**Sitio donde se desarrollo el tema:**

**Laboratorio 111, Departamento de Farmacia Conjunto E  
Facultad de Química, U.N.A.M.**

**Asesor : M en C. Angela Sotelo López**

**Supervisor Técnico: M. en C. Lucía Cornejo Barrera**

**Sustentante : Semei López García**



The image shows three handwritten signatures, each written over a horizontal line. The top signature is the most legible and appears to be 'Angela Sotelo López'. The middle signature is less legible but appears to be 'Lucía Cornejo Barrera'. The bottom signature is also less legible but appears to be 'Semei López García'.

## DEDICATORIAS

- \* A mi padre Luis López Burgoa por inculcarme el hábito del estudio, por todas tus enseñanzas, el apoyo y el esfuerzo que has tenido para que mis hermanos y yo sigamos siempre adelante. Gracias por todo.
- \* A María de la Luz García Baena. A mi madre siempre van a ir las mejores palabras de la vida, gracias por todos los valores que aprendí de ti, por los buenos consejos que me has dado y porque juntos hemos alcanzado una de mis grandes metas. Te quiero mucho mamá.
- \* A mis hermanos Baruch, (por ser mi ejemplo a seguir), Job y Lina. Por su cariño que siempre he tenido y que al igual siempre tendrán de mi parte.
- \* A mis tíos Edmundo García Baena y Juan López Burgoa, que en todo momento me han ayudado.
- \* A mis mejores amigos que he tenido Alberto Mass ("Max") y Ernesto Álvarez ("Mara"). Gracias por todos los momentos invaluables que hemos vivido juntos.
- \* A Olivia. La alegría auténtica y vital es difícil de encontrar, sin embargo tú la irradias a plenitud. Gracias por hacer mi estancia en el Laboratorio 4-A muy agradable y gracias por todas las experiencias que hemos vivido juntos y que siempre quedarán en el corazón de los dos.

## AGRADECIMIENTOS

- \* Con todo mi cariño y admiración a la M. en C. Angela Sotelo, por todo su apoyo, su guía y su gran experiencia que enriquecieron este trabajo.
- \* Al M. en C. Francisco Alberto Basurto Peña y a la Bióloga Myrna Mendoza Cruz por proporcionar la mayoría de las flores comestibles que se utilizaron en este proyecto.
- \* A la M. en C. Lucía Cornejo Barrera por todo su apoyo durante mi carrera, por su amistad y por ser mi asesora en esta tesis.
- \* A Rosita Argote y Lety Gil, por todo su apoyo que me brindaron al llegar al Lab. 111, por su cariño y sencillez que tuvieron siempre conmigo.
- \* A Carlos de Jesús Romero e Iliana González por su valiosa participación en la determinación de aminoácidos.
- \* A Fernanda Cardoso y Sandra Vidal por todas las pláticas y momentos que juntos pasamos dentro y fuera del laboratorio.
- \* A la Sra. Vicky por su amistad y su compañía desde temprano.
- \* A todos mis compañeros del laboratorio 111, por sus aportaciones de todo tipo. (Gaby, Arge, Noriko, Héctor, Poncho, Fidel, Fer, Millet, Juan Manuel, Anita, Vanessa).

TEMA	Página
Introducción	5
Objetivos	
Objetivo General	6
Objetivos Especificos	6
Antecedentes	
1. Flores Comestibles	7
1.1 <i>Erythrina americana y caribaea</i>	7
1.2 <i>Arbutus xalapensis HBK</i>	8
1.3 <i>Euphorbia radicans benth</i>	9
1.4 <i>Yucca filifera chabaud</i>	9
1.5 <i>Agave salmiana</i>	10
1.6 <i>Aloe vera</i>	11
2. Tóxicos y factores antinutricionales	11
2.1 Hemaglutininas	12
2.2 Glucósidos cianogénicos	13
2.3 Inhibidores de tripsina	14
2.4 Saponinas	15
2.5 Alcaloides	17
3. Calidad de las proteínas	18
3.1 Proteínas y aminoácidos en la alimentación	18
3.2 Aminoácidos indispensables	18

---

3.3 Aminoácidos no indispensables.	19
3.4 Evaluación química de la calidad de la proteína	19
<b>Metodología</b>	
1. Diagrama general de la investigación	22
2. Recolección de las muestras	23
3. Acondicionamiento de las muestras	24
4. Materiales y Métodos	24
Determinación de:	
Humedad analítica	24
Cenizas	25
Grasa	25
Fibra cruda	26
Proteína cruda	28
5. Identificación y cuantificación de factores tóxicos y antinutricionales.	30
Hemaglutininas	30
Glucósidos cianogénicos	33
Inhibidores de tripsina	36
Alcaloides	40
Saponinas	40
6. Perfil de aminoácidos	43
7. Determinación de triptofano	49

---

<b>Resultados y Discusión</b>	
1. Parámetros bromatológicos	52
2. Factores tóxicos y antinutricionales	55
3. Contenido de aminoácidos y calificación química	57
<b>Conclusiones y Recomendaciones</b>	60
<b>Bibliografía</b>	61
<b>Anexos</b>	66

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Contenido de HCN en algunas plantas	14
2	Contenido de aminoácidos del patrón establecido por la FAO/OMS (1985) y de leche humana	20
3	Nombre científico y lugar de recolección de las 7 muestras estudiadas	23
4	Análisis proximal de las muestras estudiadas (secadas al sol)	53
5	Análisis proximal de las muestras (Base seca)	53
6	Análisis proximal en base seca, hecho a 3 especies de flores comestibles del estado de Veracruz y del estado de México.	54
7	Contenido de factores tóxicos y antinutricionales de las flores estudiadas	55
8	Contenido de aminoácidos de la flor de gasparito flor de maguey y flor de sábila	57
9	Contenido de aminoácidos indispensables y calificación química de la flor de gasparito	63
10	Contenido de aminoácidos indispensables y calificación química de la flor de maguey	58
10	Contenido de aminoácidos indispensables y calificación química de la flor de sábila	59

---

## INTRODUCCIÓN

Los seres humanos se caracterizan por poseer una dieta muy variada. El hombre ha aprendido a seleccionar los alimentos más adecuados a sus necesidades y además, inventar platillos agradables al paladar.

Existen diversos testimonios precortesianos que ilustran la rica y variada ingesta de flores e insectos entre los antiguos mexicanos desde hace miles de años. Aunque en diferentes épocas y en distintos grupos étnicos, los insectos y las flores comestibles han formado parte de los patrones alimenticios tradicionales.

En cuanto al empleo culinario de las flores, no sólo es una antigua costumbre mexicana, sino también de muchas otras culturas del mundo. La cocina China incluye el uso de crisantemos en sopas y dalias usadas regularmente secas. Los romanos añadieron a su cocina flores cultivadas como rosas y violetas. En Europa, los pétalos de rosa y menta fueron incluidos en platillos dulces. La cocina árabe utiliza la alcaparra, los pétalos de rosas, la flor de azahar. Con la flor del mastuerzo o la capuchina originaria de Perú, se elaboran ensaladas, acompañando carnes y en helados. Hoy en día las mexicanísimas flores nochebuena y cempaxuchitl se usan en sopas y ensaladas. La bugambilia y otras muchas flores se utilizan en una variedad de platillos y postres. <sup>(1)</sup>

Actualmente con el alto índice de población que existe en el país y la creciente demanda de alimentos, tanto para la población humana, como para los animales domésticos han estimulado la investigación para aprender más sobre la explotación de recursos naturales como son las plantas silvestres.

La mayor parte de la tradición culinaria mexicana ha persistido no obstante la serie de cambios históricos y ambientales ocurridos en diversas regiones del país. En estados de la república como Hidalgo, Chiapas y Puebla por lo menos, se incluye tradicionalmente en su dieta alguna o algunas de las flores silvestres como por ejemplo la flor de yuca o *izote*, la flor de magüey llamada *gualungo* o el colorín o pichoco entre otras.

Por todo lo anterior este trabajo pretende dar a conocer el valor nutrimental de estas flores comestibles y ampliar la información de algunas otras variedades que ya han sido estudiadas, y saber su aportación de nutrimentos en la alimentación de una población cada vez más creciente en todas las latitudes y en particular en el país.

## OBJETIVOS

### Objetivo General.

- Conocer el valor nutrimental de algunas flores comestibles mexicanas que son consumidas como alimento en diferentes regiones del país.

### Objetivos Específicos.

- Evaluar la composición de las flores comestibles en estudio por medio del análisis proximal en el cual se incluyen las determinaciones de Humedad, Cenizas, Proteína, Grasa cruda, Fibra cruda e Hidratos de carbono asimilables por diferencia.
- Determinar la presencia de sustancias tóxicas, así como factores antinutricionales de las flores estudiadas
- Determinar la composición de aminoácidos indispensables de la fracción proteínica de cuando menos tres de las flores estudiadas.

## ANTECEDENTES

### I. Flores Comestibles

En México existen costumbres muy arraigadas que han logrado sobrevivir a través del tiempo como por ejemplo, los indígenas comían principalmente: la flor de calabaza o *ayoxóchitl*, la flor de *izote* o yuca; la flor del maguey llamada *gualungo*; la flor de la biznaga que al fructificar es llamada *borrachita*; flor del nopal *nopalxochitl* o *pocha*; la flor del tule o espadaña, flor del frijol y la de colorín o *pihoco*; el *cacaوخochitl* o flor del cacao usada en la bebida llamada *pozonqui* o espuma de cacao y la orejuela o *ucinacaztli*. Muchas de ellas se siguen utilizando como alimento.

La llegada de los europeos influyó en el uso de otros géneros de flores como las rosas, la bugambilia, el crisantemo, el azahar, entre otras. <sup>(2)</sup>

Se han realizado algunos estudios de flores comestibles, sin embargo, muchas faltan por ser estudiadas y también otras variedades muestran diferencias en sus composiciones. A continuación se hará una descripción botánica, y algunos usos de las flores en estudio.

#### 1.1 *Erythrina americana*

#### FAMILIA: FABACEAE (LEGUMINOSAE)

**NOMBRE(S) COMUN(ES):** Zompante, Colorín, pito, patol, pihoco.

**DESCRIPCIÓN:** Árbol de hasta 10 m de alto; corteza rugosa, corchuda, de color amarillento a gris-amarillento, armada con espinas; hojas grandes, trifoliadas, con espinas, largamente pecioladas, alternas; folíolos 3, anchos y grandes, glabros o casi glabros, deltoide-ovados, el central más grande que los laterales, hasta 14 cm de longitud, 13 cm de ancho; flores en racimos piramidales, terminales, rojas, alargadas, zigomorfas, apretadamente dispuestas; el fruto es una vaina, muy contraída entre semilla y semilla, éstas de color rojo. Floración y fructificación de diciembre a abril o mayo. El género *Erythrina caribaea*, es muy parecido a la *Erythrina americana*, la única diferencia es el hábitat de cada una ya que el género *caribaea* es de zonas más bajas que el valle de México, además de ser un híbrido que no da fruto. <sup>(3)</sup>

#### USOS

**Agrícola:** usada como cerca viva y en algunas regiones se cultiva como planta de sombra en plantaciones de cacao y café.

**Comestible:** Las flores hervidas y guisadas son muy apreciadas como complemento alimenticio.

**Medicinal:** La semilla molida cura el dolor de muelas, presenta propiedades narcóticas, las hojas en infusión se utilizan para aliviar las molestias de la erisipela, actuando también como antipirético, como antivaricosa, como hipnótico y sedante. Análisis químicos de la *Erythrina* mostraron que de los 30 alcaloides obtenidos de la planta, los más activos son la alfa y beta eritroidina, compuestos que se absorben por vía oral. Estos productos han encontrado diversas aplicaciones clínicas, tanto en el control de las convulsiones tónico-crónicas como, principalmente, en la medicamentación preanestésica que permite relajar la pared muscular abdominal y facilitar el trabajo de cirugía

### 1.2 *Arbutus xalapensis* HBK

**FAMILIA:** ERICACEAE

**NOMBRE(S) COMUN(ES):** Flor de madroño, manzanita.

**DESCRIPCIÓN:** Árbol perennifolio, de 5 a 25m de alto; corteza rojiza, lustrosa y exfoliante en láminas, a veces dejando el tronco desnudo; ramillas jóvenes tomentosas con pequeños pelos glandulares; peciolo de 2 a 3 cm de largo, pubescentes a glabrescentes; hojas elípticas, ovaladas, oblongas a lanceoladas; serradas, ocasionalmente enteras, de 5 a 14 cm de largo; de 3 a 6 cm de ancho, ápice redondeado, agudo o acuminado, base obtusa a cordada, raramente oblicua; haz hirsuto, con pubescencia blanquecina en la nervadura central, a veces glabro, con frecuencia rojizo; envés aterciopelado-pubescente o esparcidamente hirsuto; panículas de 5 a 10 cm de largo, de muchas flores, raquis y ramillas densamente tomentosas, a veces con pequeños y escasos pelos glandulares; pedicelos de 6 a 9 mm de largo, de 2.2 a 3.2 mm de ancho, ciliadas; bracteolas en la base del pedicelo, de 1.5 a 3.2 mm de largo, lanceoladas a elípticas, opuestas, ciliadas; lóbulos del cáliz libres, ovado-deltoides, de 2 a 3 mm de largo; de 1.7 a 2 mm de ancho, agudos a acuminados, rojizos, amarillentos o verdosos, escasamente ciliados; corola urceolada, blanco-amarillenta, de 8 a 10 mm de largo, de 5 a 8 mm de ancho, glabra por fuera, pubescente a pilosa por dentro; estambres 10, filamentos de 2.5 a 3 mm de largo, ensanchados de la base, densamente pubescente; anteras pardo-amarillentas, de 1.3 a 1.7 mm de largo, de 0.7 a 0.9 mm de ancho, glabras; ovario papiloso, densamente tomentoso a glabro; estilo columnar, glabro, de 2.5 a 4.5 mm de largo, estigma capitado; fruto papiloso de color anaranjado a pardo-rojizo, de 4 a 10 mm de diámetro; semillas pardo amarillentas, de 1.5 a 3 mm de largo, fusiformes, reticuladas. Especie de comportamiento bimodal, con dos máximos de caída de hoja al año; el mayor de agosto a octubre y otro más pequeño de diciembre a enero. El primer pico de caída coincide con la época de lluvias. Floración y fructificación en marzo y abril.

**USOS:**

**Artesanal:** Su principal producto es la madera, muy apreciada para la fabricación de artesanías.

**Forrajera:** También se utiliza como alimento de aves en cautiverio.

**Medicinal:** La infusión que se obtiene del cocimiento de la flor se emplea en medicina casera como astringente en casos de diarrea <sup>(6-11)</sup>

**1.3 *Euphorbia radians benth***

**FAMILIA: EUPHORBIACEAE**

**NOMBRE(S) COMUN(ES):** Flor de cuaresma , colecitas

**DESCRIPCIÓN :** Planta herbácea de 10-15 cm. Con jugo lechoso, raíz profunda y tuberosa; hojas lineares, apéndices de las glándulas blancos o con tinte rosado, fruto con cápsula triangular. Floración entre marzo y abril.

**USOS:**

**Forradera:** Algunas especies de la familia EUPHORBIACEAE, se usan como alimento par el ganado cerril.

**Medicinal:** La planta hervida se utiliza para hacer buches para el mal de boca. Se toma para afecciones del hígado y se aplica en lavados en heridas. <sup>(12-13)</sup>

**Ornamental :** En algunos lugares se cultiva como planta de sombra y ornato en parques y jardines por la belleza de sus flores blancas y por lo atractivo de sus frutos.

**1.4 *Yucca filifera chabaud***

**FAMILIA: LILIACEAE**

**NOMBRE(S) COMUN(ES):** Palmita, Palma, izote

**DESCRIPCIÓN:** Planta arborescente, solitaria o creciendo en grupos; tallos de 1 a 4.5 m de largo, semejando troncos erectos con 1 a 5 ramas cortas o raramente sin ramas, cabezuela de hojas grandes, simétrica; hojas de 3 a 9.5 dm de largo, de 4 a 25 mm de ancho, lineares, planoconvexas o plano-quilladas, estriadas, rigidamente divergentes, flexibles, verde pálidas, márgenes de las hojas blancos o verde blanquecinos, que pronto se vuelven finamente filiferos; escape de 2 a 3 m de largo, robusto, principalmente de 25 a 65 mm de diámetro, raramente de 12 cm de diámetro, excediendo notablemente el follaje; panícula de 5 a 35 dm de largo, de 3 a 6 dm de diámetro, con 20 a 45 ramillas, elipsoidal o mucho más amplia hacia el centro; flores numerosas, campanuladas o un poco globosas, blancas o de color crema, raramente verdosas o teñidas de rosado; segmentos del perianto estrecha o ampliamente-elípticos u ovados, agudos; sépalos de 32 a 57 mm de largo, de 15 a 27 mm de ancho; pétalos de 35 a 57 mm de largo, de 2 a 3.5 cm de ancho; filamentos de 1.6-3 cm de largo, delgados; pistilo de 22 a 32 mm de largo; ovario de 6 a 10 mm de diámetro, delgado, blanco o verde pálido, cilíndrico-oblongo, mucronado, comúnmente simétrico, raramente constreñido; semillas de 14 mm en su diámetro mayor, finas, de color negro opaco, con un ala marginal amplia. La Floración aparece después de abril, pero únicamente entre marzo y abril se recolectan los botones.

**USOS :**

Especie importante en el pastoreo cerril. Algunas otras especies de esta familia como la *Yucca periculosa* hacker, *Yucca baccata* torr. Tienen botones florales que son bastante agradables al paladar y también son nutritivos. Los ápices tiernos de los tallos son asados y son comestibles. (14-17)

*1.5 Agave salmiana*

FAMILIA: AMARILIDACEAS

**NOMBRE(S) COMUN(ES):** Maguey

**DESCRIPCIÓN:** Plantas de tamaño medio a grande, con gruesos tallos cortos, surculosas, formando rosetas masivas, de 1.5-2 m de alto y frecuentemente el doble de ancho, hojas de 1-2 m de largo, 20-35 cm de ancho; muy gruesas en la base, verdes a glauco-grisáceas, el ápice acuminado algo sigmoidal curvo (hacia afuera); margen repando, algunas veces mamilado; dientes grandes cerca de la mitad de la lámina, de 5-10 mm de largo, de 3-5 cm apartados unos de otros; espina terminal robusta, subulada, de 5-10 cm de largo, largamente decurrente; inflorescencia robusta, de 7-8 m de alto, el pedúnculo cubierto con bráctea imbricadas carnosas; panícula amplia, con 15-20 umbelas grandes; flores de 8-11 cm de largo, gruesas-carnosas, amarillas; ovario verde, de 5-6 cm de largo; tubo funeliforme, de 21-24 mm de profundidad, 20 mm de ancho; lóbulos desiguales, rizados hacia el interior en la antesis, los externos de 21-25 mm de largo, los internos de 2-3 mm, con una quilla carnosas; fruto de 5.5-7 cm de largo, cerca de 2 cm de diámetro; semillas de 8 a 9 mm de largo, de 6 a 7 mm de diámetro, lacrimiformes, negras. La floración es una sola vez en la vida después de 7 años de vida de un agave y la recolección de los botones es entre los meses de marzo y abril.

**USOS:**

**Bebidas alcohólicas:** Se cultiva para obtener aguamiel (Jal.).

**Comestible:** De la planta de maguey, muchos campesinos elaboran "quiote" asado que al chuparse proporciona un dulce y refrescante jugo. La flor de maguey es cocida y capeada con huevo. (9-19)

1. 6. *Aloe vera*

FAMILIA: LILIACEAE

**NOMBRE(S) COMUN(ES):** Sábila

**DESCRIPCIÓN :** Acaulescente o con tallos de 30-50 cm de largo y de 4-8 cm de diámetro, prolíferos desde la base, frecuentemente formando largas colonias; hojas en rosetas densas, extendidas o ascendentes, muy carnosas y turgentes con un jugo coloreado acuoso amargo, un tanto glaucas, a veces moteadas cuando son jóvenes, casi planas por encima, convexas por debajo, largo-atenuadas, hasta de 40-50 cm de largo y 6-8 cm de ancho en la base, los márgenes con dientes blanquecinos deltoides de 2-3 mm de largo y de 1-1.5 cm de separación; inflorescencia glabra, simple o poco ramificada, el pedúnculo hasta de 60-90 cm de alto, con unas pocas brácteas ovadas y escariosas; racimo hasta de 50 cm de largo, con muchas flores, las flores amarillas, péndulas; brácteas florales ovadas, agudas, de 10-12 mm de largo, reflexas; pedicelosa. 5 cm de largo, articulados en el ápice, con las brácteas persistentes después de que caen las flores; perianto 2.5-3.3 cm de largo, subtrigono, cilíndrico, los segmentos connados casi hasta la mitad, subagudos en el ápice. 3-estriados, verdosos en los márgenes y en el ápice; estambres apenas exsertos; ovario sésil; fruto espumoso; semillas negras. La floración se da en la época de lluvias, entre los meses de abril a junio.

**USOS:**

**Comestible :** Por lo general la penca de la sábila se usa en trozos, picado o en polvo, se puede preparar retirando previamente la piel y las capas pegadas a ella, que le dan un gusto amargo. Las flores aportan un sabor muy refrescante a las ensaladas, en los tomates rellenos, en las tortillas, acompañando a la carne de cerdo, con el pescado, la temera, en las papas rellenas y con el pollo.

Sirve para preparar licores y vinos curativos y se puede añadir en algunas bebidas combinadas.

**Medicinal:** Contiene un látex usado como purgante, la penca en fresco o asada o el jugo se aplican localmente en las inflamaciones producidas por gophes <sup>(10-20)</sup>

## 2. TÓXICOS Y FACTORES ANTINUTRIMENTALES

Un factor directamente relacionado con los alimentos y la alimentación, lo constituye la tasa de crecimiento de la población. En el ámbito mundial, los recursos alimenticios son escasos, a pesar del notorio aumento en la disponibilidad de ellos; es debido a que el incremento no ha ido aparejado a la tasa de crecimiento. <sup>(20)</sup> La anterior situación se magnifica en países en vías de desarrollo de América Latina, África y el medio Oriente; además, esta escasez se acentúa en las poblaciones de menores recursos

económicos. Varios expertos consideran que se tendría que cuadruplicar la producción de alimentos que proporcionen proteína de origen animal, lo que en países pobres es irrealizable, por lo que proponen como una situación más viable, aumentar la producción de alimentos de origen vegetal con un buen contenido de proteína. Liener y otros investigadores, consideran que una solución a corto plazo, consiste en incrementar la producción de oleaginosas, leguminosas y algunas flores silvestres. <sup>(21)</sup>

En países en vías de desarrollo como México, debido a la gran biodiversidad de especies vegetales, el planteamiento anterior es factible: Sin embargo es necesario conocer qué agentes tóxicos o antinutricionales pueden estar presentes, y de esta manera poderlas proponer en primera instancia en alimentación animal y posteriormente como posible complemento en alimentación humana. <sup>(22)</sup>

Entre los principales tóxicos y factores antinutricionales asociados a estas plantas y a muchas leguminosas, se encuentran: hemaglutininas, glucósidos cianogénicos, promotores de flatulencia, inhibidores de tripsina, fitohemoaglutininas, saponinas, alcaloides, en casos más particulares puede presentarse divicina e isouramilo (favismo), mimosina, canavanina etc. <sup>(23)</sup>

## 2.1 Hemaglutininas

Las hemaglutininas se les conoce por su propiedad de aglutinar los eritrocitos de la sangre humana o de otros animales. La primera descripción de una fitohemaglutinina fue realizada por Stillmark en 1839 utilizando semillas de ricino, observando que algunas proteínas de esta semilla eran capaces de aglutinar la sangre. Posteriormente se detectó que esta actividad podría ser inactivada térmicamente. Estas proteínas tienen especificidad por hidratos de carbono complejos, como los que forman parte de la estructura de las membranas celulares. <sup>(24)</sup>

Las fitohemaglutininas son proteínas más específicamente glico-proteínas que tiene la capacidad de aglutinar los eritrocitos en una forma similar a los anticuerpos, e incluso manifiestan una marcada especificidad, además de una alta sensibilidad hacia ciertos glóbulos rojos. Precisamente debido a la especificidad de ciertas hemaglutininas hacia determinados eritrocitos, Boyd y Shapleigh las denominaron con el término de "lectinas" (del latín legere = elegir), el cual es usado por algunos autores como sinónimo de este tipo de compuestos. <sup>(25)</sup>

Las hemaglutininas han sido encontradas en una amplia variedad de plantas y en diferentes partes de ella. La primera que se reconoció con las características antes descritas, fue la ricina de la semilla de ricino (*Ricinus communis*) la cual adicionalmente es de las proteínas más tóxicas, con un DL<sub>50</sub> de 0.5 mg/Kg en ratón por vía intraperitoneal; no obstante desde el punto de vista alimenticio, el grupo de lectinas de mayor

interés se encuentra en las semillas de leguminosas, y actualmente el de muchas especies de flores silvestres, y quienes iniciaron su estudio fueron Landesteiner y Raubitshek en 1908. (26,27)

Un método para poder detectar la presencia de este tipo de sustancias, es aprovechar la capacidad de aglutinar los eritrocitos de cierta especie de animales, ya que el anterior fenómeno se puede presentar en altas diluciones con este tipo de glicoproteínas. Precisamente el método de microtitulación es el más usado y el tratamiento con tripsina o pronasa de los glóbulos rojos, mejora la sensibilidad del ensayo. (28)

La destoxificación de los alimentos que contienen hemaglutininas es por medio de tratamiento térmico, ya que son de origen proteínico, la mayoría de ellas son mucho más sensibles que los inhibidores de tripsina. Se manifiesta que con los métodos tradicionales de cocimiento casero, se puede obtener una adecuada inactivación de estas proteínas tóxicas; Sin embargo hay que resaltar que cuando no se inactivan adecuadamente las lectinas, el efecto puede ser muy drástico; incluso en experimentación animal se puede presentar la muerte de los animales. Las lectinas se pueden considerar como auténticas enterotoxinas, a diferencia de los inhibidores de tripsina, los cuales se pueden clasificar como agentes antinutricionales. (29)

## 2.2 Glucósidos Cianogénicos

El cianuro (CN<sup>-</sup>) en cantidad de trazas, está ampliamente distribuido en las plantas, en donde se encuentra principalmente en forma de glucósido, los glucosidos cianogénicos son compuestos que producen ácido cianhídrico (HCN) por tratamiento de un ácido o con enzimas hidrolíticas apropiadas, además es la forma en que el cianuro se encuentra distribuido en el reino vegetal. Estos glucósidos pueden contener en su molécula un monosacárido generalmente glucosa o disacáridos como gentobiosa.

En la naturaleza se estima que hay más de 100 especies que contienen glucósidos cianogénicos y no exclusivamente asociados a leguminosas, sino también se presenta en algunas plantas comestibles para humanos o ganado. El material biológico al ser macerado o dañado puede liberar cianuro por acción enzimática, generalmente siendo la responsable la  $\beta$ -glucosidasa. (30)

Tabla 1. CONTENIDO DE HCN DE ALGUNAS PLANTAS

VEGETAL	HCN (mg 100g)
Frijol ( <i>Phaseolus lunatus</i> )	14,4 - 167,0
Sorgo (oscuro)	250,0
Yuca ( <i>Monihot utilissima</i> )	113,0
Linaza	53,0
Chicharo ( <i>Pisum sativum</i> )	2,3

El glucósido no es tóxico por sí mismo, pero el HCN generado por la hidrólisis enzimática, actúa a nivel de citocromo oxidasa; es decir que es un potente inhibidor de la cadena respiratoria. La  $DL_{50}$  del HCN, administrado oralmente es 0,5 - 3.5 mg / kg. Causa problemas de anoxia histotóxica. Por lo tanto sería suficiente, según el cuadro anterior ingerir 100g de una semilla cruda para tener consecuencias fatales especialmente para niños y ancianos. <sup>(30)</sup> Otras semillas de frutas que contienen CN son: almendras, semillas de: duraznos, cerezas, ciruelas, manzanas, etc. Diferentes plantas también poseen glucósidos cianogénicos como bambú, sorgo, soya, yuca, etc. La manera de expresar la concentración de estos factores tóxicos en las plantas que los contienen, es a través del HCN liberado de ellos, donde es de suma importancia la acción de la  $\beta$ -glucosidasa. <sup>(31)</sup>

Se han desarrollado métodos donde se tiene que adicionar la enzima que hidroliza a este tipo de glucósido, no obstante que la misma planta tenga su propia enzima, esto con el fin de realizar una adecuada calificación de estos tóxicos. <sup>(32,33)</sup> Sin embargo, la actividad y sensibilidad de la respectiva enzima es muy variable.

### 2.3 Inhibidores de tripsina

Los inhibidores de proteasas son muy frecuentes en la alimentación humana, los cuales inhiben los sistemas enzimáticos de sus depredadores (microorganismos o insectos), o tienen una función reguladora, interviniendo en el proceso de autorregulación proteolítica o de almacenamiento en el organismo que los

contiene. La primera sustancia estudiada de este tipo, fue un inhibidor de tripsina aislado del páncreas de un ternero, que protege a dicho órgano de sus propias enzimas proteolíticas.

Gran parte de los alimentos de origen vegetal, presentan inhibidores de proteasas ; sin embargo, es de destacar la amplia presencia de los inhibidores de tripsina en alimentos de origen vegetal, en donde la mayor proporción se manifiesta en la semilla . Cabe mencionar que los inhibidores de proteasas más estudiados son los que actúan sobre la tripsina, ya que es una enzima digestiva de gran importancia en la digestión de los monogástricos como el hombre. Estas proteínas han sido aisladas de diferentes plantas o animales, entre las más importantes están las de soya, papa y del ovomucoide de los huevos de aves. <sup>(34)</sup>

Los Inhibidores de proteasa son proteínas que tienen la propiedad de inhibir las enzimas respectivas *in vitro* , generalmente en una relación 1:1 molar, por lo cual esta propiedad se aprovecha para poder identificarlos una vez que son extraídos del material biológico. Al respecto cabe mencionar que para el caso de la identificación de los inhibidores de tripsina, la enzima que más se ha utilizado corresponde a la extraída del páncreas de bovino y porcino. Kakade y colaboradores , son los investigadores que más han trabajado al respecto, quienes incluso han propuesto una metodología estandarizada, usando un sustrato sintético para que los datos obtenidos en diferentes laboratorios puedan ser equiparables. <sup>(35)</sup>

La importancia de conocer este tipo de factores antinutricionales, ha hecho que se busque su presencia en otros alimentos como por ejemplo el amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) donde se encontró que el inhibidor es relativamente termoestable, ya que retuvo 20% de su poder inhibitorio, después de calentarlo durante 7 horas a 100°C. <sup>(36)</sup> Otro ejemplo de inhibidores de tripsina termoestables, serían algunas especies del género *Erythrina*, donde se reporta hasta un 80% de actividad antitripsica, después de un tratamiento térmico. <sup>(37)</sup>

#### 2.4 Saponinas

Son glucósidos en los cuales una cadena de azúcares esta unida a una aglicona o saponina puede ser un alcohol o fenol, de estructuras complejas de tipo esteroidal o triterpenoide.

Las saponinas se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal (en hojas, tallos y flores) y hasta la fecha se les han identificado al menos en 400 especies perteneciendo a más de 80 familias diferentes.

Entre las plantas más comunes que contienen saponinas se incluyen espinacas, betabel, espárragos, soya, alfalfa, agaves, etc.

Las propiedades que caracterizan a estos compuestos son: sabor amargo, forman espuma en soluciones acuosas, hemolizan eritrocitos, son muy tóxicos para los peces y anfibios y forman compuestos con el colesterol y otros hidroxiesteroides.

Como algunas saponinas inhiben el crecimiento de ciertos microorganismos y protozoarios patógenos se piensa que constituyen uno de los mecanismos de defensa de las plantas. Es posible que las saponinas sean material de reserva. Esto explicaría su presencia en las partes reproductoras de algunas plantas como el árbol Joshua, Yuca brevifolia (semillas) y otra especie de Yuca y Agave. Se conocen saponinas esteroidales, localizadas en las monocotiledóneas (liláceas, amarilidáceas y dioscoreáceas) y otras tantas saponinas triterpenoides, aisladas principalmente en dicotiledóneas.

Varias propiedades antinutricionales y fisiológicas se han atribuido a las saponinas como: Inhibir el crecimiento de pollos, deprimen la producción de huevo, causan flatulencia en rumiantes. <sup>(38)</sup>

En la actualidad se ha realizado un notable incremento en el conocimiento de este tipo de compuestos, porque aparte de que manifiestan ciertas propiedades tóxicas, también se les ha asignado cualidades tecnológicas y medicinales. <sup>(39)</sup> La actividad hemolítica es contrarrestada por el plasma sanguíneo o bien por el colesterol, dejando en duda si son realmente tóxicos *in vivo*, ya que hay varias evidencias de que al ser ingeridas por vía oral no presentan problemas, dejando su poder hemolítico a estudios *in vitro*. <sup>(40)</sup>

Hasta el momento esta en discusión e incluso hay contradicciones al respecto, lo que si ha sido demostrado es que la presencia de estos glucósidos en las plantas que los contienen, le confieren de cierta protección hacia el ataque de microorganismos e incluso de insectos. <sup>(41)</sup> Algunos extractos de saponinas como zarzaparrilla o Quillaga saponaria, son permitidos como aditivos para alimentos en: Australia, Gran Bretaña y Estados Unidos. Sin embargo en otros países esta prohibido. La dosis letal varía de 2500-3000 mg / Kg. <sup>(39)</sup> La toxicidad normalmente crea lesiones gastrointestinales y si pasan a la corriente sanguínea pueden hemolizar las células de los glóbulos rojos, pueden producir fallas en la respiración, convulsiones y coma. Se han estudiado los efectos que las saponinas tienen sobre los niveles de colesterol en sangre. Algunos estudios demuestran que las saponinas forman un complejo insoluble con el colesterol que en el intestino previene su absorción y por lo tanto disminuye los niveles de colesterol en plasma. Esto es contradictorio ya que la disminución de colesterol se ha probado con saponinas que no forman complejos con esteroides. La mejor explicación es que una dieta con saponinas induce la adsorción de los ácidos biliares sobre la fibra de la dieta, por eso es la disminución de colesterol con muchos alimentos de origen vegetal. <sup>(42)</sup>

Referente al proceso de eliminación de estos compuestos, hasta el momento no hay mucho al respecto ya que el efecto tóxico de estas sustancias todavía está en discusión. No obstante, de acuerdo a su naturaleza glucosídica, el método de eliminación sería por extracción con disolventes polares. <sup>(39)</sup>

## 2.5 Alcaloides

La palabra alcaloide se deriva del término "alcali" usado originalmente para describir un grupo de bases de origen vegetal. Los alcaloides constituyen un grupo de compuestos de estructura compleja con un átomo de nitrógeno involucrado en un heterociclo, este nitrógeno actúa como base y resultan de interés porque se ha encontrado que presenta actividad farmacológica, fisiológica y psicológica significativa en humanos y animales.

Se encuentran distribuidos en diversas familias de plantas y en varias partes de ellas como las semillas, raíces, hojas frutos y corteza, en forma de sales de ácidos orgánicos, combinados con azúcares (ramnosa, galactosa y glucosa) o en forma de ésteres de ácidos. Es común observar que la composición de los alcaloides puede variar con las condiciones ambientales como son, el nivel de nutrimentos en la tierra, el tipo de tierra, pH, altitud, drenaje y luz. <sup>(43)</sup>

Los alcaloides tiene pesos moleculares que varían entre 100 y 8900 g / mol; son sólidos cristalizables, raramente coloreados. Son muy poco solubles en agua, solubles en disolventes orgánicos apolares o poco polares y en alcoholes. La nomenclatura de los alcaloides no es muy exacta, pero los que tienen un anillo heterocíclico son frecuentemente llamados *alcaloides verdaderas* y los que no tienen esos anillos se llaman *protoalcaloides*. Sus precursores son casi siempre aminoácidos; otras unidades multicarbonadas pueden ser incorporadas en la estructura final de algunos alcaloides. Los alcaloides, con o sin anillos, heterocíclicos que no son derivados de aminoácidos son llamados *pseudoalcaloides*. <sup>(44)</sup>

La función de los Alcaloides en plantas es aún materia de controversia, sin embargo entre las funciones que se han sugerido están:

- ▷ Son productos nitrogenados de excreción de plantas.
- ▷ Actúan como reserva de nitrógeno, pero hay poca evidencia de que sean utilizadas en condiciones de deficiencia de éste.
- ▷ Actúan como reguladores del crecimiento en particular como inhibidores de la germinación.
- ▷ Actúan como sustancias protectoras, evitando ataques de animales o insectos.
- ▷ Ayudan a mantener un balance iónico en virtud de su poder quelante. <sup>(44, 45)</sup>

Una de las plantas estudiadas recientemente en el laboratorio debido a su alto contenido de proteínas y grasa en las semillas ha sido la especie *Erythrina americana*, en la cual se encuentran alcaloides

como típicos ya que en muchas especies estudiadas por varios investigadores se demostró la presencia de crisodina, erisovina,  $\alpha$ -eritroidina y  $\beta$ -eritroidina; siendo la  $\beta$ -eritroidina la más abundante, empleada como relajante muscular., sin embargo la importancia de conocer la presencia de estos alcaloides radica en que se ha descrito que tienen actividad curariforme, además de ser anticonvulsivos, agentes hipotensivos e hipotónicos y anestésicos. (46, 47)

### 3. CALIDAD DE LAS PROTEÍNAS.

#### 3.1 Proteínas y aminoácidos en la alimentación.

Las proteínas ingeridas en la dieta, al ser degradadas por enzimas de los jugos digestivos, permiten que los aminoácidos liberados sean absorbidos por el organismo, donde serán distribuidos por el sistema circulatorio en los distintos tejidos para reconstruir el patrón específico correspondiente a corazón, pulmones, piel, músculo, etc. Es por eso que los organismos pueden utilizar proteínas de fuentes muy distintas.

La forma particular en que los 20 aminoácidos se combinan en las proteínas determina sus características bioquímicas, pero el valor nutritivo de las proteínas depende del tipo y proporción de aminoácidos que contenga: es más alto cuando hay abundancia de aminoácidos indispensables y mayor proximidad con los requerimientos específicos de una especie dada.

Los aminoácidos no se almacenan en forma comparable a los hidratos de carbono o a la grasa, por lo que es necesario que se suministren todos los aminoácidos indispensables juntos en la dieta para lograr la óptima utilización de los 20 aminoácidos en los procesos fisiológicos, de no ser así, su rápido catabolismo provocaría un desbalance en el contenido de nitrógeno del organismo.

La función primaria de las proteínas de la dieta es suministrar los aminoácidos para que el organismo lleve acabo los procesos de mantenimiento, crecimiento, gestación y lactancia. Si no existe aporte suficiente de aminoácidos, de acuerdo a lo que cada organismo requiere, no se llevan acabo los procesos mencionados, pues no habría material para ello. Además, si los aminoácidos que están presentes no se utilizan, son eliminados, por no haber variedad y cantidad suficiente del resto. (48, 49)

### 3.2 Aminoácidos Indispensables.

Los aminoácidos indispensables son aquellos que el organismo no sintetiza a la velocidad suficiente o que no sintetiza en lo absoluto (lisina, isoleucina, leucina, valina, metionina, fenilalanina, treonina y triptofano: los infantes requieren además, de arginina e histidina) para satisfacer las necesidades fisiológicas. Desde el punto de vista nutricional, se ha enfocado más en el requerimiento de aminoácidos indispensables y los niveles propuestos son aquellos considerados necesarios para mantener la salud y las necesidades fisiológicas de la mayor parte de individuos de un grupo de la población.

Las proteínas que contienen aminoácidos indispensables, en general, son consideradas como de alta calidad. Calidad es la utilidad de una proteína alimenticia para el crecimiento y mantenimiento de sus tejidos. <sup>(48,49)</sup>

### 3.3 Aminoácidos no indispensables.

Los aminoácidos no indispensables son aquellos que son sintetizados por el organismo, a partir de un esqueleto de carbono y grupos amino de otros aminoácidos o compuestos simples de nitrógeno, y que por lo tanto no necesitan estar presentes en la dieta (no son necesarios como componente en la dieta pero si lo son para el organismo, pues también de ellos depende el funcionamiento fisiológico). <sup>(48,49)</sup>

### 3.4 Evaluación química de la calidad de la proteína.

En términos químicos, la calidad de una proteína se evalúa midiendo el contenido de aminoácidos y comparándolo con una proteína de referencia. El resultado de la comparación, expresado como un porcentaje, permite conocer la abundancia de cada uno de los aminoácidos indispensables en la proteína.

Generalmente la proteína de huevo es tomada como referencia. Aunque la organización de las naciones unidas (ONU), a través del organismo responsable de la alimentación y agricultura (FAO), y la organización mundial de la salud (OMS/WHO - 1985), ha establecido un patrón con la cantidad de cada aminoácido indispensable, por cada 100g de proteína (16 g de N), necesaria para asegurar que los requerimientos de los seres humanos serán cubiertos (tabla 2). <sup>(60)</sup>

En años recientes, la OMS y la FAO han recomendado que para lactantes, se utilice como patrón leche humana (tabla 1), en la obtención de la calificación química de los alimentos destinados a este sector de la población. <sup>(61)</sup>

Tabla 2. Contenido de aminoácidos <sup>1</sup> del patrón establecido por la FAO/OMS <sup>(52)</sup> y de leche humana (g / 16 g N) <sup>(53)</sup>

AMINOÁCIDO	LECHE HUMANA <sup>2</sup>	LACTANTES	PRI-ESCOLARES <sup>3</sup>	ADULTOS	FAO/WHO 1973
Isoleucina	4.0	4.6	2.8	1.3	4.0
Leucina	8.5	9.3	6.6	1.9	7.0
Lisina	6.7	6.6	5.8	1.6	5.5
Azufrados <sup>4</sup>	2.9	4.2	2.5	1.7	3.5
Aromáticos <sup>5</sup>	6.6	7.2	6.3	1.9	6.0
Treonina	4.4	4.3	3.4	1.1	4.0
Triptofano	1.7	1.7	1.1	0.9	1.0
Valina	4.5	5.5	3.5	0.5	5.0
Histidina	2.5	2.6	1.9	*	*

<sup>1</sup> Expresado en g / 16 g de nitrógeno

<sup>2</sup> Comunidad económica europea

<sup>3</sup> Niños de 2-5 años

<sup>4</sup> Cisteína + Metionina

<sup>5</sup> Fenilalanina + Tirosina

\* Histidina no se considera indispensable para adultos

En cuanto a la calidad de una proteína, se comprende que la proteína de un alimento que contenga todos los aminoácidos indispensables tendrá más valor que otra que no contenga todos. Por otro lado, es importante conocer la cantidad de cada aminoácido, pues cuando el organismo fabrica sus propias proteínas sólo podrá fabricarlas mientras disponga simultáneamente de todos los aminoácidos necesarios, la fabricación cesará en cuanto se acaba aquel del que hay menos. Dicho aminoácido indispensable que se encuentra en menor concentración en un alimento, relacionado con un patrón de referencia se llama aminoácido limitante, esta relación se define como *calificación química* y está determinada por la siguiente expresión:

$$CQ = \frac{\text{mg de aminoácido en 1g de proteína de prueba}}{\text{mg de aminoácido en 1g de proteína de referencia}} \times 100$$

---

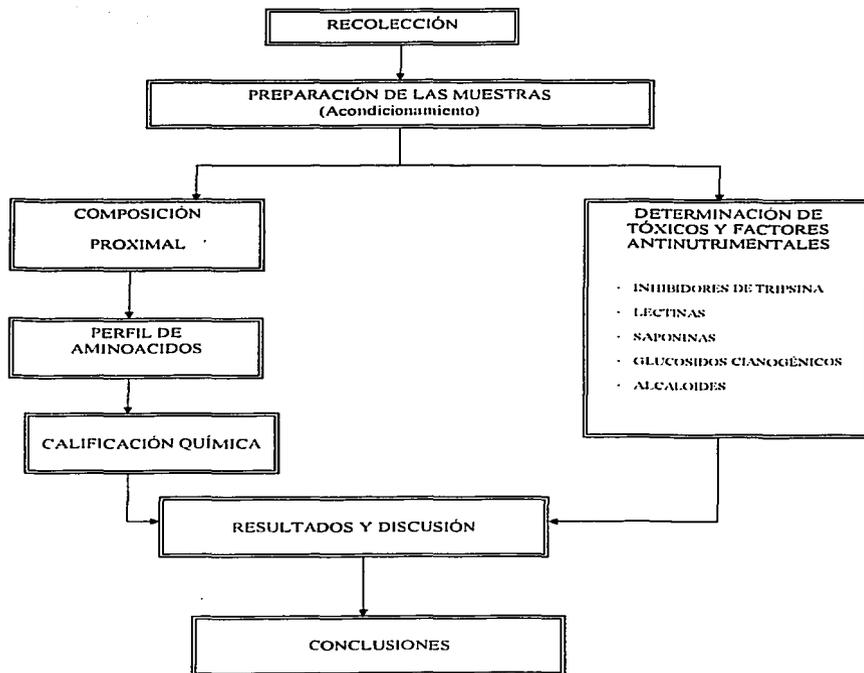
En general, se considera que las proteínas de origen animal son de calidad superior a las de origen vegetal. Las proteínas de . . . mejor calidad son aquellas con calificaciones químicas cercanas a 100 (la proteína de huevo tiene una calificación química de 100). Las proteínas de los cereales son deficientes en lisina principalmente, en tanto que las proteínas de las leguminosas lo son en los aminoácidos azufrados: cistina y metionina. <sup>(50)</sup>

Aunque el hecho de conocer la composición de aminoácidos da cierta idea de la calidad de la proteína de un alimento, deben considerarse otros factores, puesto que bajo ciertas circunstancias (presencia de factores antinutricionales y/o preparación del alimento), los aminoácidos no están disponibles para su absorción en el organismo.

La evaluación de la calidad de proteína se complementa con análisis en organismos a los que la proteína será dirigida y de la forma en que será consumida. Los ensayos biológicos empleados para determinar la calidad de una proteína están basados en el porcentaje del nitrógeno ingerido con la dieta que permanece en el cuerpo para síntesis de proteínas estructurales y funcionales o en la ganancia en peso como resultado de la calidad de la proteína ingerida. <sup>(49,50)</sup>

## METODOLOGÍA

### 1. Diagrama general de la Investigación



## 2. Recolección de las Muestras

Las primeras seis muestras de flores fueron colectadas por la Bióloga Myrna Mendoza Cruz y clasificadas por el M en C Francisco Alberto Basurto Peña perteneciente al jardín botánico de la UNAM.

La séptima muestra (colorín) fue colectada en los jardines de ciudad universitaria.

Tabla 3. Nombre científico y lugar de recolección de las 7 muestras.

NOMBRE COMUN	NOMBRE CIENTIFICO	LUGAR DE RECOLECCION
Flor de Maguey <sup>1</sup>	<i>Agave salmiana (Otto ex Salm-Dyck)</i>	Mercado de Tulancingo Hidalgo
Flor de Madroño	<i>Arbutus xalapensis HBK</i>	Mercado de Tulancingo Hidalgo
Flor de Palma	<i>Yucca filifera (chabaud)</i>	Mercado de Tulancingo La barranca Hidalgo
Flor de Cuaresma	<i>Euphorbia radians (benth)</i>	Mercado de Tulancingo Hidalgo
Flor de Sábila	<i>Aloe vera</i>	Mercado de Tulancingo Hidalgo
Flor de Gasparito	<i>Erythrina caribea (Krukoff &amp; Barneby)</i>	Mercado de Zacapoaxtla Traidra de Xilitla Puebla
Flor de Colorín	<i>Erythrina americana</i>	Cd. Universitaria Facultad de Química (UNAM) D.F.

1. También se estudiaron los estambres de la flor.

### 3. Acondicionamiento de las muestras

Las muestras fueron recibidas ya secas (secadas al sol) excepto la muestra de *Erythrina americana* recolectada en CU, las muestras secas se molieron en un molino Thomas-Wiley, con malla de 1 mm de diámetro, la muestra molida se guardo en recipientes bien cerrados.

### 4. Materiales y Métodos

Se realizó el análisis proximal de las muestras seguido por los métodos descritos por la AOAC 1995. <sup>(63)</sup>

#### Determinación de humedad analítica

##### *Fundamento*

Se basa en la pérdida de agua de la muestra por efecto de la temperatura. Es indispensable conocer la humedad de la muestra, para darle un valor real a la cantidad de los otros componentes. Por otro lado el dato de humedad esta relacionado con la edad y/o el estado de conservación de la muestra.

##### Material / Reactivos

- Estufa de vacío
- Balanza analítica
- Desecador
- Pesafiltros

##### Procedimiento.

Pesar de 2-3 g de muestra preparada en un pesafiltro con tapa, que ha sido previamente puesto a peso constante a  $130^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$ . Secar la muestra a la estufa a  $100^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$  con la tapa del pesafiltro a un lado las horas que sea necesario hasta que dos pesadas sucesivas no registren diferencia de 0.0001 g. Retirar de la estufa, tapar, dejar enfriar en desecador y pesar tan pronto como se equilibre con la temperatura ambiente.

##### Cálculos:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{A - B \times 100}{C}$$

A = Peso pesafiltro más muestra

B = Peso pesafiltro más muestra después de secar a la estufa

C = Peso de muestra en gramos

### Cenizas

#### *Fundamento.*

Las cenizas incluyen todos los compuestos inorgánicos fijos de la muestra, tanto los originales como los de contaminación. Al incinerarse una muestra se logra la destrucción de la materia orgánica, obteniéndolas así como residuos; los cuales se pueden cuantificar.

#### **Material / Reactivos**

- Muffa
- Balanza analítica
- Parrillas de incineración
- Crisoles de porcelana
- Desecador

#### **Procedimiento.**

Pesar aproximadamente 3 a 5 g de muestra en un crisol (la muestra no debe sobrepasar la ½ del crisol) previamente puesto a peso constante después de meterlo a la muffa a 550°C . Calcinar la muestra, para ello carbonizar primero con mechero hasta que no se desprendan humos y meter a la muffa cuidando que la temperatura no pase de 550°C para evitar que los cloruros se volatilicen. Se suspende el calentamiento cuando las cenizas estén blancas o grises, aproximadamente 3 a 4 h. (si se observan puntos negros, se humedecen con unas gotas de agua destilada , se secan en la estufa a 130°C y se vuelven a calcinar). Enfriar en desecador y pesar.

#### **Cálculos**

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(\text{peso crisol con cenizas} - \text{peso crisol vacío}) \times 100}{\text{peso de muestra en gramos}}$$

### Grasa cruda

#### *Fundamento*

Esta determinación se basa en la solubilidad de las grasas en compuestos no polares como el éter utilico, de petróleo, etc. , el cual se calienta hasta que se volatilice y al hacer contacto con la superficie fría (refrigerante) se condensa y pasa a través de la muestra arrastrando consigo las sustancias solubles.

#### **Material / Reactivos**

- Aparato de extracción Goldfish
- Cartuchos de celulosa
- Vasos de borde esmerilado
- Estufa de vacío
- Balanza analítica
- Desecador
- Éter de Petróleo

#### Procedimiento.

Poner un vaso Goldfish a peso constante a 100°C enfriar y pesar.

Pesar en un cartucho de celulosa 4-5 g de muestra, tapar con algodón y colocarlo en un sostenedor o recipiente con el fondo perforado. Por otro lado en el vaso ya pesado se ponen aproximadamente 50 ml de éter de petróleo y se coloca en el aparato de Goldfish mediante un anillo de fierro con empaque de hule. Se sube la parrilla dando medio giro para un lado y después para el otro. Calentar 4 horas y comprobar que la extracción haya sido completa (hasta que el solvente este libre de grasa). Al finalizar se cambia el sostenedor con el cartucho por otro recipiente cerrado sin perforación y se vuelve a calentar para recuperar el éter. Al evaporarse totalmente el éter del vaso, éste se quita del aparato y se mete 30 minutos a la estufa, se enfria en el desecador y se pesa.

#### Cálculos.

$$\% \text{ Grasa Cruda} = \frac{(\text{peso vaso con extracto} - \text{peso vaso vacío}) \times 100}{\text{peso de muestra en gramos}}$$

#### Fibra Cruda

#### *Fundamento*

La fibra cruda es la fracción orgánica de la muestra que resiste un tratamiento alternado de ácido sulfúrico y sosa hirvientes al 1.25%. El compuesto más abundante de este residuo es el hidrato de carbono celulosa y en menos cantidades hemicelulosa, ligninas y pentosanas

**Material / Reactivos**

- Vasos de Berzelius de 600 ml
- Aparato de digestión
- Estufa de vacío
- Mufla
- Crisoles de porcelana
- Filtro de lino
- Desecador
- Balanza analítica
- Solución de  $H_2SO_4$  al 1.25%
- Solución de NaOH al 1.25%
- Antiespumante
- Alcohol etílico

**Procedimiento.**

Pesar 4 g de muestra desengrasada y seca (se utiliza la muestra que quedó en el cartucho de la determinación de grasa cruda). Colocar la muestra en el vaso digestor, añadir 0.5g de silicato de aluminio, 200 ml de solución de ácido sulfúrico al 1.25% (0.255N) hirviendo y antiespumante.

Calentar de inmediato (debe empezar a hervir antes de 1 min.), hervir a reflujo durante 30 min. Rotando el vaso de vez en cuando para incorporar las partículas que se pegan en la pared del vaso. Filtrar en un embudo buchner, usando vacío y lavar con 4 porciones de 50 ml de agua. El residuo que quedó en el filtro se pasa por medio de una espátula al vaso digestor ya limpio y se repite la operación con 200 ml de NaOH al 1.25% (0.313N) hirviendo y antiespumante. Después de hervir a reflujo los 30 minutos, se filtra sobre el mismo embudo buchner, se lava con 25 ml de ácido sulfúrico al 1.25% y con tres porciones de 50 ml de agua caliente y finalmente con 25 ml de alcohol.

Pasar cuantitativamente el residuo a un vaso de precipitados lavando con agua y se filtra sobre un crisol gooch que lleva una delgada capa de asbesto y que ha sido calcinado durante 1h a 600°C. El crisol gooch con el residuo se lleva a la estufa a 130°C  $\pm$  2°C, enfriar y pesar. Llevar a la mufla y calcinar a 600°C durante 30 min., enfriar y pesar.

**Cálculos.**

$$\% \text{ Fibra} = \frac{A - B \times 100}{C}$$

A = Peso del gooch más fibra después de 2 h a 130°C

B = Peso del gooch con cenizas después de calcinar 30 min. A 550°C

C = Peso de la muestra original en gramos (corregir el peso de la muestra desengrasada de acuerdo al % de grasa cruda encontrado).

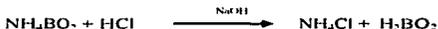
## Proteína Cruda

### Fundamento

A pesar de que el método Kjeldahl se ha automatizado el fundamento sigue siendo el mismo: se basa en la combustión en húmedo de la muestra por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado para reducir el nitrógeno orgánico de la muestra hasta amoníaco, el cual queda en la solución en forma de sulfato de amonio debido a que en la mezcla de reacción siempre hay un exceso ácido.



Se ha logrado reducir el tiempo de digestión mediante la adición de sulfato de sodio o de potasio, los cuales elevan la temperatura de digestión. La adición de peróxido acelera la digestión y reduce la formación de espuma. El amoníaco obtenido después de la digestión es liberado por destilación por la acción de un álcali y atrapado en ácido valorado para su posterior titulación ácido-base.



### Equipo.

- Digestor TECATOR, modelo ab-20/40.
- Equipo automático para determinación de proteína Auto Analyzer Kjeltec, modelo 1030.
- Tubos de digestión TECATOR de 75 ml.
- Balanza analítica.

### Reactivos.

- Peróxido de hidrógeno al 30%.
- Sulfato de potasio (R.A.).
- Solución de NaOH al 36%.
- Solución de HCl 0.01 N valorada.
- Mezcla digestiva (a).
- Solución de ácido bórico con indicadores (b).

(a) Disolver 3 g de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) en 20 ml de agua destilada, a continuación se agrega 50 ml de ácido ortofosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) y una vez que este bien disuelta la sal, se adiciona con mucho cuidado y resbalando por la pared del recipiente 430 ml de ácido sulfúrico concentrado.

- (b) Se pesan 5 g de ácido bórico y se coloca en un matraz aforado de 1 litro, se adiciona agua hasta disolverlo y a continuación se agregan 35 ml de indicador A (100 mg de fenolftaleína aforados a 100 ml con alcohol etílico absoluto) y 10 ml del indicador B (33 mg de verde de bromocresol + 66 mg de rojo de metilo aforados a 100 ml con alcohol etílico). Se ajusta el color a un tono café rojizo con ácido o alcali según se requiera y se afora a 1 litro con agua destilada.

#### Procedimiento.

##### \*Digestión de la muestra:

- 1) Pesar de 10-100 mg de la muestra (dependiendo del contenido de proteína esperado) y colocarlos en el tubo de digestión.
- 2) Adicionar aproximadamente 0.5 g de  $K_2SO_4$ .
- 3) Adicionar 3 ml de mezcla digestiva.
- 4) Colocar el tubo en el digestor por 15 minutos a una temperatura menor de  $370^{\circ}C$ .
- 5) Sacar el tubo del digestor y dejarlo enfriar.
- 6) Adicionar 1.5 ml de  $H_2O_2$  al 30% y nuevamente colocar el tubo en el digestor que se encuentre a  $370^{\circ}C$  hasta que la digestión termine ( cuando el tubo no muestre manchas ni puntos negros y además la mezcla de digestión sea incolora, traslúcida o verde-azuloso traslúcida).
- 7) Dejar enfriar el tubo antes de destilar.

##### \*Destilación y titulación:

Se lleva a cabo en el equipo Auto Analyzer Kjeltec, modelo 1030 de manera automática. La destilación se lleva a cabo por arrastre de vapor por acción de NaOH al 60%, se recibe el amoníaco liberado en ácido bórico y se titula con HCl 0.01 N valorada.

Se debe correr un blanco en donde se sustituye la muestra por el equivalente en peso de glucosa o sacarosa, trabajándose en la misma forma.

#### Cálculos.

Para obtener el contenido de nitrógeno de la muestra:

$$\%N_2 = (P-B) \cdot N \cdot mcq \cdot 100 / m$$

Donde:

P = ml de la titulación de la muestra.

B = ml de la titulación del blanco.

N = normalidad de la solución de HCl.

mcq = miliequivalentes de nitrógeno (0.014).

m = peso de la muestra (en gramos).

Para obtener el contenido de proteína de la muestra se relaciona el contenido de nitrógeno determinado que está presente en la proteína de la muestra por medio de un factor:

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ N}_2 \cdot F$$

F = factor de conversión (6.25).

#### Hidratos de carbono asimilables por diferencia

Son los hidratos de carbono no fibrosos como los almidones y los azúcares. Si se suman los porcentajes de humedad, cenizas, proteínas, grasa cruda y fibra cruda y el total se resta de 100, se puede suponer que esta diferencia son los hidratos de carbono asimilables.

### 5. Identificación y cuantificación de factores tóxicos y antinutricionales

#### • Hemaglutininas <sup>(54)</sup>

##### Fundamento.

La determinación 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 (de hamster) 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.

##### Equipo.

- Incubadora marca BLUE-M.
- Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER mod. 430
- Adaptador para celdas de 10 \* 75 mm. (acondicionado a una abertura de 1 cm<sup>2</sup>).
- Celdas para el espectrofotómetro.
- Microtiter Kit (Cook Eng.-Alexander Virginia USA).
- Centrifuga para tubos marca DINAC.
- Tubos de centrifuga graduados de 15 ml.
- Balanza analítica.
- Agitador magnético con tacómetro marca THERMOLINE.
- Fibra de vidrio.

##### Reactivos.

- Sangre de hamster desfibrinada y lavada.
- Solución salina al 1%.
- Solución salina al 0.9%.
- Pronasa de *S. griseus* (SIGMA P-5147).
- Solución anticoagulante (a).

-Solución de heparina al 0.2% en solución salina (b).

- (a) Cuando la sangre se va a trabajar inmediatamente se puede utilizar ya sea solución de heparina o citrato, las cuales se usan en la siguiente relación: 15-20 U.I de solución de heparina para 1 ml de sangre, o, 0.1 ml de solución de citrato para 1 ml de sangre. Sin embargo, si la sangre no se va a trabajar de inmediato y se desea conservar en refrigeración por unos días, lo más conveniente es utilizar como solución anticoagulante, la solución ELSEVER, en la siguiente proporción: 1 ml de solución ELSEVER por 1 ml 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 pronasa al 0.2% en solución salina.

#### Procedimiento.

##### \*Preparación del extracto:

- 1) Suspender 1 g de la muestra finamente molida (y desengrasada, si el contenido de grasa es mayor del 5 % ), en 10 ml de solución salina al 1 %.
- 2) Efectuar una extracción con agitación mecánica durante 2 horas a 300 rpm a la temperatura ambiente.
- 3) Centrifugar el extracto a 1400 rpm (40 U) durante 15 minutos para eliminar el residuo insoluble.
- 4) Filtrar el sobrenadante a través de la fibra de vidrio y lavar, si es necesario, con solución salina al 1 % , para llevar el extracto filtrado al volumen inicial.

##### \*Preparación de la sangre:

- 1) Sangrar al animal (en este caso al hamster se le realiza una toma de sangre por medio de un capilar que es introducido sobre la comisura interna del ojo, desplazando el globo ocular y los párpados para no lesionarlos, y colocar la sangre en un matraz pequeño que contenga solución anticoagulante.
- 2) Agitar suavemente para la completa homogeneización de la sangre con la solución anticoagulante (no interrumpir hasta el momento de diluirla).
- 3) Trasvasar la sangre con anticoagulante a tubos de centrifuga para lavarla 3 veces con solución salina al 0.9%. La relación sangre : solución salina es 1:5.
- 4) Centrifugar a 1500 rpm (50 U) durante 10 minutos.
- 5) Después del último lavado se mide en el tubo de centrifuga el paquete de eritrocitos y se diluyen al 4%, para lo cual se adicionan por cada ml de glóbulos rojos 24 ml de solución salina al 0.9%.

##### \*Sensibilización de los glóbulos rojos:

- 1) Por cada 10 ml de la suspensión de glóbulos rojos al 4% adicionar 1 ml de solución de pronasa al 0.2% (en solución salina).

- 2) Incubar por 1 hora a 37°C.
- 3) Centrifugar para eliminar la enzima sobrenadante dando 3 lavados con solución salina al 0.9%.
- 4) Después del último lavado resuspender el paquete de glóbulos rojos al 3%, para lo cual se adicionan 32 ml de solución salina al 0.9%, por cada ml de paquete de eritrocitos. Nota: cuando se observa que la sangre tiene algunos coágulos, aunque sean pequeños, es necesario filtrar esta suspensión a través de un pequeño trozo de gasa colocado dentro de un embudo de cuello corto.

\*Ajuste de la suspensión de glóbulos rojos:

- 1) Tomar 0.1 ml de la suspensión de glóbulos rojos ya sensibilizados, y adicionar 4.9 ml de solución salina al 0.9%.
- 2) Leer en el espectrofotómetro a 620 nm usando un adaptador de celdas que permita el paso de solo 1 cm<sup>2</sup> de luz. Usar como blanco solución salina al 0.9%. Nota: La lectura que se debe obtener será de 24-29% de transmitancia, en caso contrario se realiza la dilución necesaria para que la suspensión de glóbulos rojos quede dentro de dicho rango.

\*Microtitulación:

- 1) Colocar en cada pozo de una hilera de las placas tipo "V" del microtiter, 50 µl de solución salina al 0.9% con el pipeteador de gota evitando tocar las paredes del pozo.
- 2) Llenar el microdilutor, de 50 µl ( por contacto con la superficie, con el extracto problema.)

Realizar las diluciones sucesivas en la hilera escogida, introduciendo el microdilutor en el pozo y rotándolo sin excesiva presión. Es recomendable verificar que el volumen que este tomando el microdilutor sea el requerido, esto se realiza con solución salina al 9% en una placa de prueba. Cuando se trabaja un extracto de alto título, es conveniente realizar un mayor número de diluciones, para lo cual se pueden tomar hasta 3 hileras, realizando la serie de dilución en forma de culebra.

- 3) Con un pipetero de gota colocar en cada pozo 50 µl de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizada y ajustada.
- 4) Rotar la placa en forma circular.
- 5) Incubar la placa por 1 hora a 37°C.
- 6) Colocar la placa de plástico sobre el dispositivo de lectura y se observa a través del espejo el fondo de los pozos de cada hilera de prueba.

#### Cálculos.

Se reporta la máxima dilución que presente aglutinación.

• Glucósidos Cianogénicos (155)

**Fundamento.**

En el presente método se aprovecha la reacción sensible y específica de Guignard, la cual es ampliamente utilizada en pruebas cualitativas para la detección tanto de glucósidos cianogénicos como del propio HCN.

Para poder cuantificar el HCN total que potencialmente puede ser liberado se hace uso de una hidrólisis enzimática (por medio de una  $\beta$ -glucosidasa), del correspondiente glucósido cianogénico; y para poder cuantificar en forma precisa el HCN liberado, es conveniente trabajar algunos pasos de la determinación a temperaturas bajas. Dicho HCN liberado reacciona con el ácido picrico contenido en una tira de papel produciendo una coloración visible café-rojiza debido a la isopurpurina formada. Con este método se puede detectar hasta cantidades del orden de 5  $\mu\text{g}$  de HCN, equivalentes a 46  $\mu\text{g}$  de glucósidos cianogénicos (referido con linamarina).

**Equipo.**

- Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER mod. 430
- Celdas para el espectrofotómetro.
- Estufa con corriente forzada LAB-LINE, modelo Imperial III.
- Congelador comercial.
- Baño de agua con agitación marca LAB-LINE.
- Balanza analítica.
- Tubos de cultivo con tapón rosca PIREX #9825 y #9826.

**Reactivos.**

- Solución de HCl 0.5N.
- Solución buffer de fosfatos pH 7.0.
- Solución de KCN equivalente a 100  $\mu\text{g}$  HCN/ml (24.1 mg KCN/100 ml).
- Solución de picrato de sodio alcalinizada (a).
- Solución de  $\beta$ -glucosidasa con activador (b).
- Papel indicador de HCN (c).

- (a) Disolver en agua destilada 2.5 g de ácido picrico y a continuación 12.5 g de carbonato de sodio, aforar a un volumen de 500 ml con agua destilada.
- (b) Disolver 0.25 g de  $\beta$ -glucosidasa (250 mg) en solución buffer de fosfatos pH 7.0 teniendo la precaución de agitar suavemente (de lo contrario se formará una gran cantidad de espuma). Una vez disuelta la enzima, adicionar 1.7 g  $\text{NaNO}_3$  que actúa como activador de dicha enzima; todo lo anterior se lleva a un volumen de 250 ml con el mismo buffer y así tenemos una concentración de 1 mg de  $\beta$ -glucosidasa/ml y 0.08 M de  $\text{NaNO}_3$ .
- (c) El papel Whatman del #2 se empapa en una solución de picrato de sodio alcalinizada, se deja escurrir y se pone a secar en una estufa a temperatura de 55-60°C por 30 minutos. A continuación se cortan tiras de 2 X 10 cm.

**Procedimiento.****Determinación cualitativa:**

- 1) Colocar en un tubo de cultivo Pyrex de 20-500 mg de muestra, dependiendo de su contenido aproximado de glucósidos cianogénicos (cuando no se tiene la información se coloca la cantidad máxima de 500 mg).
- 2) Adicionar 5.0 ml de la solución de  $\beta$ -glucosidasa (fría).
- 3) Homogeneizar y colocar la tira de papel indicador humedecida (aproximadamente con 8 gotas de agua) en la boca del tubo y cerrar herméticamente con un tapón de rosca
- 4) Colocar en el baño maría a la temperatura de  $40 \pm 1^\circ\text{C}$  por 4 horas con el control de velocidad de agitación ajustado a 3.5.
- 5) Sacar los tubos y colocarlos en el congelador por 30 minutos.
- 6) Sacar el tubo y destapar para adicionarle 1 ml de HCl 0.5 N (frío). La tira de papel debe quedar adherida al tapón para evitar problemas de manipulación.
- 7) Volver a cerrar perfectamente.
- 8) Homogeneizar teniendo la precaución de que el líquido no toque el papel indicador.
- 9) Colocar en la estufa por 15 minutos a la temperatura de  $60^\circ\text{C}$ .
- 10) Sacar de la estufa y realizar visualmente la detección cualitativa, ya que aquellos tubos que no muestren por lo menos una ligera coloración café-rojiza en el papel indicador, se consideran negativos; en tanto que aquellos que sí muestran aunque sea una tenue coloración se consideran positivos y se procede a su detección cuantitativa.

**Determinación cuantitativa:**

- 11) Recuperar el papel indicador y colocar en un tubo de cultivo Pirex .
- 12) Adicionar 20 ml de agua destilada (medidos con bureta).
- 13) Tapar y agitar vigorosamente con el fin de extraer el pigmento de isopurpurina del papel indicador en el agua.
- 14) Después de extraer el pigmento (aproximadamente 2-5 minutos) recuperar el solvente (agua), eliminando los residuos del papel por una simple filtración con papel de filtración rápida. Cuando se requiera se puede hacer otra adición de agua (20 ml) para extraer completamente el pigmento (dilución).
- 15) Colocar la solución filtrada en la celda para su lectura en el espectrofotómetro a 520 nm, ajustando previamente a 100% de transmitancia con el blanco de la muestra.

## \*Curva patrón:

- 1) Tomar 0.0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 ml de la solución estándar de KCN cuya concentración es equivalente a 100 µg HCN / ml y colocarlos en tubos de cultivo Pyrex . Las concentraciones de HCN son: 0.0 (blanco), 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0 µg HCN, respectivamente. Entonces la curva estándar va de 5.0 a 60.0 µg HCN, ya que fue el rango óptimo encontrado donde se cumple la ley de Lambert-Beer.
- 2) Adicionar 500 mg de fécula de maíz comercial, llamada también matriz alimenticia, con el propósito de simular la interacción muestra-HCN liberado.
- 3) Adicionar 5.0 ml de solución buffer pH 7.0.
- 4) Homogeneizar y colocar la tira de papel indicador humedecida (aproximadamente con 8 gotas de agua) en la boca del tubo y cerrar herméticamente con un tapón de rosca
- 5) Colocar en un baño maría a la temperatura de  $40 \pm 1^\circ\text{C}$  por 4 horas con el control de velocidad de agitación ajustado a 3.5.
- 6) Sacar los tubos y colocar en el congelador por 30 minutos.
- 7) Sacar el tubo y destapar para adicionarle 1 ml de HCl 0.5 N (frio). La tira de papel debe quedar adherida al tapón para evitar problemas de manipulación.
- 8) Volver a cerrar perfectamente.
- 9) Homogeneizar teniendo la precaución de que el líquido no toque el papel indicador.
- 10) Colocar en la estufa por 15 minutos a la temperatura de  $60^\circ\text{C}$ .
- 11) Sacar de la estufa y recuperar el papel indicador y colocar en un tubo de cultivo Pyrex .
- 12) Adicionar 20 ml de agua destilada (medidos con bureta).
- 13) Tapar y agitar vigorosamente con el fin de extraer el pigmento de isopurpurina del papel indicador en el agua.
- 14) Después de extraer el pigmento (aproximadamente 2-5 minutos) recuperar el solvente (agua), eliminando los residuos del papel por una simple filtración con papel de filtración rápida. Cuando se requiera se puede hacer otra adición de agua (20 ml) para extraer completamente el pigmento (dilución).
- 15) Colocar la solución filtrada en la celda para su lectura en el espectrofotómetro a 520 nm, ajustando previamente a 100% de transmitancia con el blanco de la curva patrón (0.0 ml de la solución estándar de KCN).

**Cálculos.**

Trazar la curva patrón usando los valores de absorbancia en el eje de las ordenadas y las correspondientes concentraciones de HCN en  $\mu\text{g}$  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  $\mu\text{g}$ . Para obtener el contenido de HCN en la muestra:

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

$$X = \mu\text{g de HCN.}$$

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

M = mg de muestra.

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

$$x \text{ --- } 100 \text{ g muestra}$$

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

• **Inhibidores de Tripsina** <sup>(6a)</sup>

**Fundamento.**

La metodología se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso (solución de NaOH 0.01 N) de la muestra sobre una solución estándar de tripsina.

El extracto directo o diluido de la muestra se pone en contacto con una solución estandarizada de tripsina (40  $\mu\text{g}/10 \text{ ml}$ ) y después de un cierto tiempo se determina la actividad proteolítica remanente por medio de un sustrato sintético: N-Benzoil-DLarginina-p-nitroanilida. BAPNA, el cual al ser hidrolizado por la tripsina remanente producirá una coloración amarilla proveniente de uno de los dos compuestos de hidrólisis (p-nitroanilina) que se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm. Dicha coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de tripsina de la muestra.

**Equipo.**

- Potenciómetro CORNING, mod. 430.
- Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER mod. 430
- Celdas para el espectrofotómetro.
- Mezclador de tubos LAB-LINE, mod. Super-mixer.
- Parrilla con agitación magnética THERMOLINE, mod. SP-13025.
- Baño María GRANT, mod. SE 10
- Balanza analítica.

**Reactivos.**

-Solución de NaOH 0.01 N.

-HCl 0.001N.

-Ácido acético al 30%.

-Solución amortiguadora TRIS, pH 8.2 y 0.05 M (a).

-Solución de N-BenzoiL-DLarginina-p-nitroanilida (BAPNA, SIGMA No. B-4875) (b).

-Solución estándar de tripsina (SIGMA No. T-8253) (c).

- (a) Disolver 6.05 g de tris (hidroximetil-amino-metano) y 2.94 g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O en 900 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8.2 y se afora a un volumen de 1 litro.
- (b) Disolver 100 mg. de N-BenzoiL-DLarginina-p-nitroanilida-HCl (BAPNA) en 2.5 ml de dimetil-sulfóxido. Diluir a 250 ml con amortiguador TRIS previamente calentado a 37°C. Esta solución debe ser preparada el mismo día de su uso y mantenerse a 37°C.
- (c) Pesar con exactitud 4 mg. de tripsina bovina (SIGMA No. T-8253) y disolverla en 200 ml de HCl 0.001 N. Esta solución contiene 20 µg de tripsina / ml. Guardar en refrigeración, donde puede permanecer de 2-3 semanas sin pérdida apreciable de actividad.

**Procedimiento.****\*Preparación del extracto:**

- 1) Pesar 1 g de muestra finamente molida en un vaso de precipitados.
- 2) Adicionar 45 ml de NaOH 0.01N.
- 3) Ajustar el pH de esta suspensión a 9.6±0.2.
- 4) Aforar con NaOH 0.01N a 50 ml.
- 5) Transferir a un vaso con magneto para agitar la suspensión mecánicamente en la parrilla de agitación por 2 horas y media a 300 rpm.
- 6) Quitar el magneto y dejar media hora en reposo.
- 7) Obtener el sobrenadante por decantación. se elimina el residuo insoluble.
- 8) El sobrenadante debe ser diluido hasta el punto que 1 ml produzca una inhibición de 40-60%, este requisito es indispensable para reducir la desviación estándar relativa.

**\*Determinación de la actividad:**

Cuando se trabaja con el extracto directo, es común que se arrastren coloraciones indeseables que pueden interferir en la determinación, por lo que es conveniente tomar una alícuota más de cada uno de los volúmenes que a continuación se describen, las cuales servirán como sus respectivos blancos.

- 1) Tomar con pipeta volúmenes (por duplicado: alícuota y respectivo blanco) de 0.0, 0.6, 1.0, 1.4 y 1.8 ml de extracto de la muestra y colocarlas en tubos de ensaye.

- 2) Ajustar el volumen a 2.0 ml con agua destilada.
- 3) Introducir los tubos de ensayo a un baño maría a 37°C.
- 4) Adicionar 2.0 ml de solución estándar de tripsina (previamente preparada y mantenida a 37°C). A los blancos de las alícuotas adicionar además 1.0 ml de ácido acético al 30%. Mantener el contacto inhibidor-tripsina por 10 minutos (en el caso de los blancos de las alícuotas no es necesario llevar un control del tiempo).
- 5) Adicionar 5 ml de la solución de N-Benzoil-DL arginina-p-nitroanilida (a 37°C) a cada tubo. Mantener la mezcla de reacción por 10 minutos exactos (usar cronómetro).
- 6) Detener la reacción enzimática adicionando 1 ml de ácido acético al 30% y homogeneizar inmediatamente.
- 7) Dejar en reposo aproximadamente por 15 minutos y si la mezcla de reacción se enturbia o forma un precipitado, debido a la adición del ácido acético, filtrar el contenido a través de papel filtro Whatman #1. Hay que asegurarse de que el filtrado sea transparente.
- 8) Leer en el espectrofotómetro a 410 nm, ajustando el aparato a 100% de trasmiancia con su respectivo blanco para cada una de las alícuotas. El tubo con 0.0 ml de extracto de la muestra es la referencia sobre la cual se basan los cálculos ya que este tubo contiene 40µg de tripsina/10 ml.

#### Cálculos.

Una unidad de tripsina (U.T.) es arbitrariamente definida como un incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm por 10 ml de mezcla de reacción. Así la lectura de absorbancia (A) se puede pasar directamente a unidades de tripsina (U.T.):  $U.T. = A \cdot 100$ .

Debido a que se tienen una serie de alícuotas del extracto, se tendrán entonces una serie de valores de U.T. Estos valores de U.T. deben ser restados al valor de referencia: 0.0 ml de extracto, 40µg tripsina/10 ml para así obtener el valor de unidades de tripsina inhibida: U.T.I. Después calcular el valor de U.T.I. / ml de cada una de las alícuotas tomadas del extracto y calcular el promedio de U.T.I. / ml. La actividad de inhibidores de tripsina se expresa en términos de unidades de tripsina inhibida (U.T.I.), con respecto a 1 g de muestra:

$$B \cdot F \cdot (50/1000) = U.T.I. / \text{mg de muestra.}$$

Donde:

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

F = factor de dilución, cuando se trabaja el extracto directo F = 1.

$$F = A_1/a_1 \cdot A_2/a_2$$

Donde:

A<sub>1</sub> = Aforo

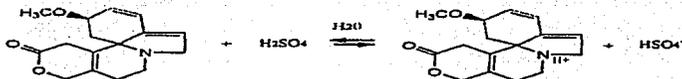
a<sub>1</sub> = alícuota

50 = volumen de extracto acuoso de la muestra que se preparará.

1000 = mg de muestra que se utilizan para preparar 50 ml de extracto

## Alcaloides (87,88)

### Reacción



### Fundamento

Este método se basa en la extracción de los alcaloides, aprovechando sus propiedades de partición en un sistema de disolventes y su posterior valoración por volumetría, empleando un ácido. Esto puede realizarse gracias a las propiedades básicas de los alcaloides.

Procedimiento (Ver diagrama de la extracción en los anexos)

- 1) Pesar 5gramos de muestra molida y tamizada (malla 0.5 mm)
- 2) Adicionar 50 ml de metanol previamente alcalinizado a pH 8-9, con hidróxido de amonio.
- 3) Agitar (300-500 rpm con agitador magnético en una parrilla de agitación) durante 8 horas, después de estas filtrar con ayuda de vacío usando papel Whatman No.541.
- 4) Al residuo adicionar nuevamente 50 ml de metanol alcalinizado y agitar 16 hrs más. El filtrado guardarlo en refrigeración.
- 5) Filtrar con ayuda de vacío (en el mismo embudo y con el mismo papel del día anterior), recibiendo el filtrado en el matraz que se guardó en refrigeración. Lavar el vaso y el residuo con 20 ml de metanol alcalinizado.
- 6) Evaporar el disolvente casi a sequedad, por medio de rotavapor ( $T=50^{\circ}\text{C}$ )
- 7) Disolver el extracto en 15 ml de éter y 5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1.00 N
- 8) Filtrar a través del papel Whatman No. 541, recibiendo en un embudo de separación. Extraer recuperando la fase-acuosa (inferior).
- 9) Extraer 3 veces la fase orgánica (superior) con 5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  cada vez. Reunir las fases acuosas con la anterior y verter en un embudo de separación.
- 10) Adicionar 25 ml de cloroformo y extraer, recuperando la fase acuosa (superior).

- 11) Extraer 3 veces la fase orgánica (inferior) con 5 ml de agua y 5 ml de ácido cada vez. Reunir las fases acuosas con la anterior y extraer 2 veces con 10 ml de cloroformo.
- 12) Recuperar la fase acuosa (superior) y filtrarla a través de papel Whatman No.2, enjuagando el papel y el embudo con 2 ml de agua.
- 13) Alcalinizar con  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado hasta un pH de 9 o mayor.
- 14) Extraer 3 veces con 35 ml de cloroformo cada vez, recuperando la fase orgánica (inferior).
- 15) Secar con sulfato de sodio anhidro y evaporar en rotavapor ( $T=40^\circ\text{C}$ ).
- 16) Redisolver el residuo con 3 ml de metanol (uno por uno), transvasando cuantitativamente a un matraz Erlenmeyer que contiene 7 ml de agua destilada.
- 17) Adicionar una gota de indicador rojo de metilo y titular con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  valorado (0.02 N).

**NOTA.** Esta es una determinación cuantitativa, así que se debe enjuagar el material empleado con los disolventes adecuados en cada paso.

#### Cálculos

Se reporta como  $\beta$ -critroidina:

$$\mu \text{ de } \beta\text{-critroidina}/100\text{g de muestra} = \frac{(\text{ml de } \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ gastados por la muestra} - \text{ml } \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ gastados por un blanco}) (\text{N } \text{H}_2\text{SO}_4) (0.273) (100)}{\text{g de muestra}}$$

Nota: El blanco se preparó con 7 ml agua destilada y 3 ml de metanol

#### Saponinas <sup>(59)</sup>

#### Fundamento

En éste método se utilizaron glóbulos rojos sensibilizados (de conejo) para llevar a cabo la determinación de saponinas en extractos de plantas mediante una técnica de diluciones seriadas en la cual se determina el punto final por una estimación visual por la hemólisis de los glóbulos rojos en estudio.

Se realizó una prueba de hemólisis con una solución estándar de saponinas al 1% en solución salina (0.9%) para observar la mínima cantidad que produce hemólisis.

#### Equipo.

- Incubadora marca BLUE-M.
- Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER mod. 430
- Adaptador para celdas de  $10 \times 75$  mm. (acondicionado a una abertura de  $1 \text{ cm}^2$ ).

- Adaptador para celdas de 10 \* 75 mm. (acondicionado a una abertura de 1 cm<sup>2</sup>).
- Celdas para el espectrofotómetro.
- Microtiter Kit (Cook Eng-Alexander Virginia USA).
- Centrífuga para tubos marca DINAC.
- Tubos de centrifuga graduados de 15 ml.
- Balanza analítica.
- Jeringa de 5 o 10 ml #22 con agua.
- Agitador magnético con tacómetro marca THERMOLINE.
- Fibra de vidrio.

#### Reactivos.

- Solución de metanol (R.A) y agua destilada al 85% (v/v)
- Solución de Cloruro de sodio (R.A) y agua 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 (%): el estándar de saponinas es una mezcla 1:1 de digitonina ( saponina de tipo esterooidal ) de la casa SIGMA y un extracto de quillaja (Saponina de tipo triterpenoide) de la casa DBH.

#### Procedimiento.

##### \*Preparación del extracto:

- 1) Suspender 1 g la muestra finamente molida (y desengrasada, si el contenido de grasa es mayor del 10%), en 10 ml de solución salina al 1%.
- 2) Efectuar una extracción con agitación mecánica durante 2 horas a 300 rpm a la temperatura ambiente.
- 3) Centrifugar el extracto a 1400 rpm (40 U) durante 15 minutos para eliminar el residuo insoluble.
- 4) Filtrar el sobrenadante a través de la fibra de vidrio y lavar, si es necesario, con solución salina al 1%, para llevar el extracto filtrado al volumen inicial.

##### \*Preparación de la sangre

- 1) Sangrar al animal (en este caso al conejo se le realiza una toma de sangre por medio de una jeringa de insulina de 1ml que es introducida en una vena de la oreja después de haber sido anestesiada) y colocar la sangre en un matraz pequeño que contenga solución anticoagulante.

- 2) Agitar suavemente para la completa homogeneización de la sangre con la solución anticoagulante (no interrumpir hasta el momento de diluirla).
- 3) Trasvasar la sangre con anticoagulante a tubos de centrifuga para lavarla 3 veces con solución salina al 0.9%. La relación sangre : solución salina es 1:5.
- 4) Centrifugar a 1500 rpm (50 U) durante 10 minutos.
- 5) Después del último lavado se mide en el tubo de centrifuga el paquete de eritrocitos y se diluyen al 4%, para lo cual se adicionan por cada ml de glóbulos rojos 24 ml de solución salina al 0.9%.

**\*Sensibilización de los glóbulos rojos:**

- 1) Por cada 10 ml de la suspensión de glóbulos rojos al 4% adicionar 1 ml de solución de proteasa al 0.2% (en solución salina).
- 2) Incubar por 1 hora a 37°C.
- 3) Centrifugar para eliminar la enzima sobrenadante dando 3 lavados con solución salina al 0.9%.
- 4) Después del último lavado resuspender el paquete de glóbulos rojos al 3%, para lo cual se adicionan 32 ml de solución salina al 0.9%, por cada ml de paquete de eritrocitos. Nota: cuando se observa que la sangre tiene algunos coágulos, aunque sean pequeños, es necesario filtrar esta suspensión a través de un pequeño trozo de gasa colocado dentro de un embudo de cuello corto.

**\*Ajuste de la suspensión de glóbulos rojos:**

- 1) Tomar 0.1 ml de la suspensión de glóbulos rojos ya sensibilizados, y adicionar 4.9 ml de solución salina al 0.9%.
- 2) Leer en el espectrofotómetro a 620 nm usando un adaptador de celdas que permita el paso de solo 1 cm<sup>2</sup> de luz. Usar como blanco solución salina al 0.9%. Nota: La lectura que se debe obtener será de 24-29% de trasmittancia, en caso contrario se realiza la dilución necesaria para que la suspensión de glóbulos rojos quede dentro de dicho rango.
- 3) **\*Microtitulación:**
- 4) Colocar en cada pozo de una hilera de las placas tipo "U" del microtiter, 50 µl de solución salina al 0.9% con el pipeteador de gota evitando tocar las paredes del pozo.
- 5) Llenar el microdilutor de 50 µl por contacto con la superficie del extracto problema.
- 6) Realizar las diluciones sucesivas en la hilera escogida, introduciendo el microdilutor en el pozo y rotándolo sin excesiva presión. Es recomendable checar que el volumen que este tomando el microdilutor sea el requerido, esto se realiza con solución salina al 9% en una placa de prueba.

- 7) Cuando se trabaja un extracto de alto título, es conveniente realizar un mayor número de diluciones, para lo cual se pueden tomar hasta 3 hileras, realizando la serie de dilución en forma de culebra.
- 8) Con un pipetero de gota colocar en cada pozo 50 µl de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizada y ajustada.
- 9) Rotar la placa en forma circular.
- 10) Incubar la placa por 1 hora a 37°C.
- 11) Colocar la placa de plástico sobre el dispositivo de lectura y se observa a través del espejo el fondo de los pozos de cada hilera de prueba.

#### Cálculos.

Se reporta la máxima dilución que presente hemólisis.

### 6. Perfil de aminoácidos <sup>(60-64)</sup>

#### *Fundamento:*

La cuantificación de aminoácidos se ha llevado a cabo tradicionalmente utilizando resinas de intercambio iónico, previa hidrólisis de la proteína. Los métodos basados en HPLC (high performance liquid chromatography) han permitido que éstos se impongan dada su mayor rapidez y sensibilidad. Debido a la polaridad de los aminoácidos y a la ausencia de un cromóforo en la mayoría de ellos, la formación de un derivado antes del análisis por HPLC en fase reversa es necesaria. Se ha reportado que en los derivados formados con 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil-carbamato son estables y permiten incrementar la precisión del análisis rutinario de aminoácidos por derivatización pre columna, dada la menor manipulación de la muestra durante la preparación de los derivados de los aminoácidos liberados después de haber hidrolizado la proteína. La cuantificación de aminoácidos en alimentos sigue a una etapa de hidrólisis, en la cuantificación por intercambio iónico, el alimento se hidroliza a 145°C durante 4 horas, sin que se reporten mermas significativas en los rendimientos de los aminoácidos. La hidrólisis ácida en fase de vapor (HCl 6N, 0.1% de fenol), es una adaptación que ha permitido incrementar el rendimiento del proceso de hidrólisis, pues las pérdidas por oxidación de aminoácidos se reducen gracias a la combinación de nitrógeno y vacío durante la preparación de la muestra a hidrolizar, el contacto de HCl gaseoso con la muestra y un control eficiente de temperatura y tiempo de hidrólisis (145°C por 4 horas). Entonces al combinar la derivatización con 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil-carbamato, la cuantificación por HPLC y la hidrólisis de material proteínico con HCl 6N, 0.1% de fenol, en la fase de

vapor, a 145°C por 4 horas, es posible llevar a cabo la cuantificación de aminoácidos con buena selectividad y precisión.

## Material y Reactivos

### Hidrólisis

- Estación de trabajo Pico Tag (Waters)
- Viales de reacción de la estación de trabajo Pico Tag
- Bombal de alto vacío RV8 (Edwards)
- Refrigerante tipo dedo frío
- Tubos de ensayo de 4 x 50 mm (Corning)
- Marcador de tinta permanente
- Micropipeta (y puntas) con capacidad de 200-1000 µL (Finnpipette)
- Vórtex (Lab-Line mod. 1290 super mixer)
- Agua destilada y desionizada (agua purificada de 18 Mohm de resistividad o agua destilada y desionizada pasada por un filtro de 0.22 µm).
- Hielo Seco
- Metanol (QP)
- Nitrógeno de alta pureza (99.997%) (Infra)
- HCl 6N, 0.1% de fenol

### Preparación de la Muestra

- Micropipeta (y puntas) con capacidad de 50 a 200 µL (Finnpipette)
- Pipeta Pasteur (3)
- Vórtex (Lab-line instruments, Mod. 1290)
- Matraz aforado de 1 ml (3)
- Jeringas de 10 mL (9)
- Aerodisco de Nylon, 0.22 µm de tamaño de poro y 13 mm de diámetro (Gelman)
- Tubos de ensayo de 10x 70 mm (Pyrex) (9)
- Norleucina 5 mM-HCl 10 mM (disolución de norleucina (c.b.p. 5 mM) en HCl 0.1M suficiente para obtener 10 mM al final)
- Acetonitrilo: Agua 20:80 (200 mL de acetonitrilo grado HPLC, más 800 mL de agua purificada)
- Acetonitrilo grado HPLC (JT-Baker)
- Agua destilada y desionizada (mismas condiciones que en hidrólisis)

### Derivatización

- Tubos de ensayo de 4 x 50 mm (Corning) (3)
- Parrilla de calentamiento (Stirrer/Hotplate Corning) con baño de agua a 55°C.
- Micropipeta (y puntas) con capacidad de 5 a 50 µL (Finnpipett)

- Micropipeta (y puntas) con capacidad de 50 a 200  $\mu\text{L}$  (Finnpipette)
- Micropipeta (y puntas) con capacidad de 100 a 1000  $\mu\text{L}$  (Finnpipette)
- Vórtex (Lab-line instruments mod. 1290)
- Parafilm.
- Estándar de aminoácidos H 2.5 mM excepto Cistina : 1.25 mM. Pierce (Ver anexo figura 3 ).
- Acetonitrilo (AccQ con diluent Fluór reagent, vial 2 B), 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AccQ con diluent Fluór reagent, vial 2 A) y buffer de boratos (AccQ fluór borate buffer, reactivo 1). (Waters AccQ fluór reagent kit)

#### **Análisis cromatográfico**

- Sistema de entrega de disolventes (2), (Waters mod.510)
- Inyector con loop de 20  $\mu\text{L}$  (Rheodyne)
- Jeringa para HPLC 25  $\mu\text{L}$  (Hamilton)
- Detector UV-vis waters 486 (Waters)
- Horno y unidad de control de temperatura modelo III (Waters)
- Controlador automático de gradiente modelo 680 (Waters)
- Adquisición e integración de datos Chromjet modelo 54076 (Waters)
- Sistema de filtración a vacío (2) (Millipore)
- Filtro de tamaño de poro 0.45  $\mu\text{m}$  tipo HA (Millipore)
- Filtro de tamaño de poro 0.22  $\mu\text{m}$  tipo GV (Millipore)
- Filtro pre columna en línea (Waters)
- AccQ-Tag Nova Pak C<sub>18</sub>, tamaño de partícula 4  $\mu\text{m}$ , de 3.9 mm x 150 mm (Waters)
- AccQ-Tag concentrado A (buffer acuoso de acetatos y fosfatos) (Waters)
- Acetonitrilo grado HPLC (J T Baker)
- Agua destilada y desionizada (mismas condiciones que en hidrólisis)

#### **Procedimiento.**

- **Preparación de la estación de trabajo.**

Se preparó la estación de trabajo Pico Tag (ver anexo figura 1): se depositó hielo seco en el recipiente del refrigerante tipo dedo frío y metanol suficiente para cubrir el hielo seco que se había depositado. Además se verificó que los controles de vacío y de nitrógeno se encontraran cerrados. Se encendió la bomba de vacío y después de 5 min. se verificó que la lectura del manómetro de la estación de trabajo fuera de 50-70 miliTorr.

- **Preparación de la muestra: Secado.**

Se pesaron, por triplicado, 15 mg de residuo seco y desengrasado (el cual había sido previamente molido en un molino Weber-Bros & White mod.553853 y pasado a través de una malla 0.5 mm) en el interior de un tubo de 4 x 50 mm, previamente marcado. Se agregó una gota de agua (aproximadamente 50 µL) y se agitó durante algunos segundos en el vórtex, con la finalidad de hidratar por completo la muestra y distribuirla en las paredes del tubo para mejorar su exposición a los vapores del HCl, los tres tubos se depositaron en el vial de reacción (ver anexo figura 2). Se colocó la tapa y se deslizó el botón rojo a la posición de abierto (los viales de reacción deben estar secos, para lo cual se introdujeron en la estación de trabajo vacíos y en la posición abierto, tras lo cual se abrió la válvula de vacío y se dejaron así hasta que alcanzaron una presión de 50-70 miliTorr). El vial se colocó en la estación de trabajo, se abrió la válvula de nitrógeno durante 10-15 segundos, la presión de salida de nitrógeno no debió exceder 0.3 Kg / cm<sup>2</sup>, después se abrió lentamente la válvula de vacío hasta alcanzar una presión de 1-2 Torr.

- **Preparación de las muestras: purga con nitrógeno**

Se agregaron 200 µL de HCl 6N con 0.1% de fenol en el fondo del vial de reacción, cuidando de no introducir ácido al interior de los tubos con muestra. Para purgar el vial de hidrólisis, se cerró el vial y se introdujo nuevamente en la estación de trabajo Pico Tag, se abrió lentamente hasta alcanzar 1-2 Torr de presión, y se mantuvo abierto hasta que empezó la ebullición del HCl; se cerró el vacío y se purgó el vial con nitrógeno durante 5 segundos; se cerró la llave de nitrógeno y se repitió este ciclo dos veces más. Al finalizar el tercer ciclo, se abrió el vacío del mismo modo y se mantuvo hasta que alcanzó una presión ligeramente menor a 1 Torr. Se cerró el vial deslizando el botón verde a la posición cerrado, se cerró el vacío y se sacó el vial de reacción de la estación de trabajo.

- **Hidrólisis en fase de vapor.**

Una vez finalizada la preparación, se introdujo el vial al horno de la estación de trabajo, previamente calentado a 145°C (colocando el botón oven en la posición de encendido y ajustando la temperatura con la perilla temp al mismo tiempo que se mantiene hacia arriba el botón set), durante 4 horas.

- **Eliminación del exceso de HCl**

Transcurrido el tiempo, se sacó el vial de horno, se dejó enfriar a temperatura ambiente y dentro de una campana de extracción, se deslizó el botón rojo a la posición abierto para dejar escapar el ácido y los vapores que se generaron durante el proceso; después se abrió el vial de reacción y se sacaron los tubos con los hidrolizados, se enjuagó el exterior de cada uno con agua y se depositaron en un vial de reacción seco. Después se procedió a eliminar el exceso de ácido del interior de cada uno de los tubos con ayuda de vacío; se tapó el vial asegurando que se encontrará en la posición abierto, se introdujo en la estación de trabajo Pico Tag y se abrió el vacío hasta que alcanzo 1-2 Torr, y se mantuvo abierto hasta que la lectura del manómetro de la estación de trabajo fue de 50-70 millitorr. Se cerró el vial, así como el vacío y se conservaron los hidrolizados en una atmósfera inerte por aproximadamente 12 horas.

- **Cuantificación de aminoácidos por HPLC de fase reversa.**

#### **PASO 1. Preparación de las muestras: re-hidratación del hidrolizado.**

A cada uno de los tubos con hidrolizado se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de norleucina 5 mM-HCl 10 mM, el primero como estándar interno y el HCl para rehidratar y extraer los aminoácidos del tubo de hidrólisis. Se agitó un minuto en vórtex y se dejó reposar un minuto para después agregar de 100 a 200  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo 20%. se agitó un minuto más en vórtex y se transfirió cuantitativamente a un matraz volumétrico de 1 ml con ayuda de una pipeta Pasteur, se lavó con acetonitrilo al 20% y se agitó hasta que la solución de lavado fuera incolora (volumen menor a 1 mL), se transfirió cuantitativamente el contenido de cada paso de lavado al matraz volumétrico de 1 mL y se llevó al aforo con agua purificada. (concentración final de norleucina 0.5 mM)

Se filtro la muestra a través de un acrodisco de Nylon de 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, conectado en la punta de una jeringa, desechándose las primeras 3-5 gotas y recuperando el resto, del cual fue tomada la alícuota para derivatizar los aminoácidos.

#### **PASO 2. Preparación del estándar de aminoácidos.**

En un tubo de ensayo de 4 x 50 mm, se depositaron 10  $\mu\text{L}$  del estándar de aminoácidos o de la muestra purificada y filtrada, evitando que la punta de la pipeta tocara las paredes del tubo; se agregaron 70  $\mu\text{L}$  del

buffer de boratos, se agitó el tubo en un vórtex por 10 segundos y finalmente se agregaron 20  $\mu\text{L}$  del reactivo de derivatización AQC (3 mg / 5 mL, de  $\text{CH}_3\text{CN}$ ) se agitó en el vórtex durante un minuto (tiempo durante el cual se llevó a cabo la reacción y se hidrolizó el exceso de AQC), se cubrió con parafilm la boca del tubo y se introdujo en el baño de agua a  $55^\circ\text{C}$  durante 10 minutos para completar la formación del monoderivado de tirosina. Se dejó enfriar.

Se repitió la misma operación con un estándar de aminoácidos 0.2 mM-N-Leu 0.5 mM.

#### • Análisis Cromatográfico

Finalmente se inyectaron 5  $\mu\text{L}$  de la muestra derivatizada en el cromatógrafo de líquidos con un tiempo de corrida de 50 minutos.

Gradiente de elución empleado para la determinación de aminoácidos.

Tiempo (min)	% Fase A	% Fase B	Flujo (ml/min)
Inicio	100	0	1
0.5	98	2	1
15	93	7	1
19	90	10	1
32	67	33	1
35	67	33	1
36	0	100	1
41	0	100	1
42	100	0	1
43	100	0	1.2
48	100	0	1.2
49	100	0	1
58	100	0	1

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

#### Cálculos.

Se calcula el contenido de cada uno de los 17 aminoácidos comparando la relación  $\text{Área}_{\text{aminoácido}} / \text{Área}_{\text{norleucina}}$  de la muestra contra la relación  $\text{Área}_{\text{aminoácido}} / \text{Área}_{\text{norleucina}}$  del estándar de aminoácidos, de acuerdo a la ecuación 1, para reportar el contenido en  $\text{g}_{\text{aminoácido}} / 16 \text{ g de N}$

Cálculo del contenido de aminoácidos en gramos / 16 g de N.

$$\text{Ecuación 1} = 1.6 \times [ (\text{A}_{\text{aa}} / \text{A}_{\text{N-leu}})_{\text{mtra}} \times (\text{A}_{\text{N-leu}} / \text{A}_{\text{aa}})_{\text{std}} \times \text{C}_{\text{std}} \times \text{a} \times \text{P.M.} ] / [ \text{mg}_{\text{mtra}} \times \% \text{N} ]$$

donde:

$A_{aa}$  = Área del aminoácido dado

$A_{n-leu}$  = Área de norleucina

$m_{tra}$  = en la muestra

$std$  = en el estándar

$C_{std}$  = Concentración del aminoácido dado en el estándar

$a$  = aforo del hidrolizado

P.M = peso molecular del aminoácido dado

$m_{g_{mtra}}$  = cantidad de muestra en miligramos

%N = porcentaje de Nitrógeno en la muestra seca y desengrasada.

## 7. Determinación de Triptofano <sup>(65)</sup>

### Fundamento.

Debido a la destrucción del triptofano por hidrólisis ácida, la hidrólisis enzimática se convierte en una alternativa viable para la determinación de este aminoácido indispensable. El método consiste en la hidrólisis enzimática dada por la pepsina durante 3 horas y posteriormente con pancreatina durante 24 horas, el hidrolizado al reaccionar con p-dimetilaminobenzaldehído (DMAB) y nitrito de sodio, reactivo para desarrollar color, da lugar a la formación de un compuesto colorimétrico el cual permite cuantificar espectrofotométricamente la cantidad de triptofano en una muestra a 590 nm de longitud de onda.

### Material y reactivos

- 1 matraz aforado de 50 mL (Kimax)
- Pipetas con capacidad de 10, 7.5, 0.5, 2 mL.
- Tubos de ensayo (Kimax)
- Espectrofotómetro (Sequoia -Turner mod. 340)
- Celdas de vidrio para el espectrofotómetro
- Campana de extracción
- Balanza analítica (Sartorius analytic)
- Vortex (lab-Line mod. 1290 super mixer)
- Potenciómetro (Corning Mod. 10)
- Buffer de fosfatos pH 8 (Solución A: Se pesaron 2.78 g de  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  y se aforaron a 100 mL. Solución B: Se pesaron 26.82 g de  $Na_2HPO_4 \cdot 7 H_2O$  y se aforaron a 500 mL. Se tomaron

- 5.3 mL de la solución A y 94.7 mL de la solución B y se llevaron a 200 mL con H<sub>2</sub>O destilada. Se ajustó a un valor pH de 8.0).
- Solución de pepsina 0.3 % (p/v) (se pesaron 300 mg de pepsina y se aforaron a 100 mL con solución de HCl 0.1 N).
- Solución de pancreatina 0.4 % (p/v) (se pesaron 400 mg de pancreatina y se aforaron a 100 mL con buffer de fosfatos).
- Solución de DMAB 0.5 % (p/v). Se pesaron 0.5 g de DMAB y se disolvieron y posteriormente aforaron hasta 100 mL con HCl concentrado.
- Solución de nitrito de sodio 0.2 % (p/v). Se pesaron 200 mg de nitrito de sodio y se aforaron a 100 mL con agua).
- Solución estándar de triptofano (0.05 mg / mL). Se pesaron 5 mg exactos de triptofano y se aforaron a 100 mL con agua destilada).

#### Procedimiento

- Preparación del Hidrolizado

Se pesó 1 g de residuo seco y molido y se colocó en un matraz aforado de 50 ml, posteriormente se agregaron 10 mL de la solución de pepsina, se mantuvo a temperatura ambiente durante 3 horas con agitación ocasional. Al término de este tiempo se añadieron 10 mL de la solución de pancreatina y se incubó por un periodo de 24 horas con agitación esporádica.

El hidrolizado se aforó a 50 ml con agua destilada y se filtró. Del filtrado se tomó una alícuota de 2 mL y se colocó dentro de un tubo de ensayo, a éste se le agregaron 7.5 mL de DMAB y se agitó dejando en reposo durante 15 minutos en la oscuridad, después de este tiempo se agregaron 0.5 mL de nitrito de sodio y se dejó en reposo por 15 minutos. Posteriormente se tomó la lectura de la absorbancia a 590 nm. Al mismo tiempo se realizó un blanco de la muestra en el cual se tomaron 2 mL del extracto pero se sustituyó la cantidad de DMAB por 7.5 mL de HCl concentrado.

*Nota:* se realizaron 3 hidrolizados y de cada uno se hizo un blanco y se tomaron 2 alícuotas de 2 mL para desarrollar color

- **Preparación de la curva Patrón**

Se tomaron 0.0.4,0.8,1.2,1.6, y 2mL de la solución estándar de triptofano y se depositaron en tubos de ensayo, cada tubo se llevó a un volumen final de 2 mL con agua destilada y se adicionaron 7.5 mL de DMAB se agitaron y se dejaron en la oscuridad por 15 minutos, posteriormente se agregaron 0.5 mL de nitrato de sodio, se agitaron y se dejaron en reposo por 15 minutos, al término de éste tiempo se tomo la lectura de la absorbancia a 590nm. Finalmente se construyó una curva patrón que relacionara los mg de triptofano con la absorbancia.

*Nota:* Cada punto de la curva se hizo por duplicado.

#### **Cálculos**

Al valor de absorbancia de la muestra se le restó el valor de absorbancia del blanco, y posteriormente se convirtió a g de triptofano con la curva patrón realizada.

$$\text{g trp} / 16\text{g N} = \text{g}_{\text{trp}} / 2\text{mL}_{\text{hidrolizada}} \times 50 \text{ mL}_{\text{blanco}} (1 / \text{g}_{\text{muestra}})(1 / \text{g}_{\text{proteina en el residuo}}) \times 100.$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Parámetros Bromatológicos

Los resultados del análisis proximal en base húmeda, se presentan en la tabla No. 4. se puede observar que el contenido de humedad que presentan todas las flores todavía es considerable, tomando en cuenta que para su estudio, cada una fue secada de manera natural (al sol), con la finalidad de perder la mayor cantidad de agua, sin embargo este valor de humedad, es importante, ya que al comparar los resultados con otros estudios realizados anteriormente o con alguna otra especie de alimento, debemos utilizar los valores del análisis proximal en base seca, como se presentan en la tabla No. 5.

De acuerdo a los resultados expresados en la tabla No. 5, la composición proximal de las flores estudiadas resalta que el contenido de fibra (F) y cenizas (C), presentan un valor semejante al de algunas verduras de consumo común como: espinacas *Spinacea oleracea* (20-30 % F ; 40-50 % C), acelgas *Beta vulgaris* (11-17 % F - 10 - 27 % C), berros *Nasturtium acuatatum Br.* (8-10 % F ; 11-17 % C), quelites *Amaranthus hybridus* (7-13 % F ; 10-12% C). También se encontró un contenido de proteína similar al de algunas leguminosas como son el frijol *Phaseolus vulgaris* (17-23%), garbanzos *Cicer arietinum* (17-21%) lentejas *Lens culinaris* (20-28%) y chicharos *Pisum sativum* (20-26%) a diferencia de la flor de madroño que presentó un valor menor (8.22%). Sin embargo hay que tomar en cuenta que con respecto a la proteína cruda este es un valor inicial, ya que se necesitan hacer pruebas posteriores para conocer su perfil de aminoácidos y así definir sus aminoácidos limitantes. El contenido de grasa, como extracto etéreo en todas las flores es bajo, únicamente los estambres de maguey presentaron la mayor cantidad de grasa (6.2%), esto considerando que este tipo de especies por lo general presentan bajo contenido de grasa.<sup>(49)</sup> Con respecto a los Hidratos de Carbono la flor de madroño y la flor de maguey presentaron los valores más altos (66% y 65% respectivamente) considerando que pueden ser una buena fuente de energía inmediata.<sup>(60)</sup>

Con respecto a estudios anteriores realizados en la Facultad de Química, podemos ver (comparando la tabla No. 5 y la tabla No. 6) que la mayoría de los resultados del análisis proximal, son semejantes a los que presentaron 3 flores de la misma especie: la flor de yuca (*yuca elepantipes*) flor de colorín (*Erythrina americana*), y la flor de maguey (*Agave salmiana*), recolectadas las dos primeras en el estado de Veracruz (Xalapa) y la flor de maguey recolectada en el estado de México; Con estos resultados se puede decir que la composición proximal no varía mucho a pesar de la diferencia de clima que existen en estos estados de la república.

**Tabla 4.** Análisis Proximal de las muestras estudiadas (SECADAS AL SOL) \*

Tipo De Muestra	% Humedad	% Cenizas	% Grasa Cruda	% Proteína Cruda	% Fibra Cruda	% Carbohidratos <sup>b</sup>
Estambres de maguey	12.95 ± 0.17	6.59 ± 0.06	5.43 ± 0.14	23.84 ± 0.66	9.38 ± 0.19	41.81
Flor de colorín	9.70 ± 0.21	8.65 ± 0.06	2.12 ± 0.04	23.68 ± 0.42	15.69 ± 0.11	40.16
Flor de enuresma	12.06 ± 0.11	8.29 ± 0.20	4.33 ± 0.15	22.09 ± 0.38	11.1 ± 0.20	42.13
Flor de gasparito	10.23 ± 0.17	9.77 ± 0.04	1.38 ± 0.05	24.63 ± 0.22	15.89 ± 0.20	38.10
Flor de madroño	13.62 ± 0.04	6.03 ± 0.09	3.40 ± 0.04	9.77 ± 0.18	8.93 ± 0.18	58.25
Flor de maguey	12.44 ± 0.03	5.16 ± 0.04	2.50 ± 0.05	11.77 ± 0.23	11.13 ± 0.23	57.0
Flor de sábila	12.79 ± 0.24	7.50 ± 0.01	3.74 ± 0.08	14.32 ± 0.19	12.10 ± 0.25	49.55
Flor de yuca	12.39 ± 0.11	8.47 ± 0.09	1.89 ± 0.05	22.67 ± 0.19	7.49 ± 0.22	47.09

a. Resultados expresados en g/100g de muestra ± desviación estándar determinaciones realizadas mínimo por triplicado (n =3) y en todos los casos se obtuvo un coeficiente de variación menor a 5%.

b. Se calcularon por Diferencia

**Tabla 5.** Análisis proximal de las muestras estudiadas (BASE SECA) \*

Tipo De Muestra	% Cenizas	% Grasa Cruda	% Proteína Cruda	% Fibra Cruda	% Carbohidratos <sup>b</sup>
Estambres de maguey	7.57 ± 0.06	6.23 ± 0.16	27.38 ± 0.76	10.77 ± 0.22	48.05
Flor de colorín	9.57 ± 0.06	2.34 ± 0.05	26.22 ± 0.46	17.37 ± 0.12	44.50
Flor de enuresma	9.42 ± 0.22	4.92 ± 0.17	25.11 ± 0.43	12.62 ± 0.23	47.93
Flor de gasparito	10.88 ± 0.04	1.53 ± 0.05	27.43 ± 0.25	17.70 ± 0.22	42.46
Flor de madroño	6.98 ± 0.10	3.96 ± 0.05	11.31 ± 0.21	10.42 ± 0.21	66.60
Flor de maguey	5.89 ± 0.03	2.85 ± 0.05	13.44 ± 0.06	12.71 ± 0.26	65.11
Flor de sábila	8.59 ± 0.01	4.28 ± 0.09	16.42 ± 0.22	13.87 ± 0.28	56.84
Flor de yuca	9.66 ± 0.10	2.15 ± 0.06	25.87 ± 0.22	8.55 ± 0.25	53.77

a. Resultados expresados en g/100g de muestra ± desviación estándar determinaciones realizadas mínimo por triplicado (n =3) y en todos los casos se obtuvo un coeficiente de variación menor a 5%.

b. Se calcularon por Diferencia

Tabla 6. Análisis proximal en base seca, hecho a 3 especies de flores comestibles del estado de Veracruz y del estado de México, obtenido en trabajos previos <sup>(47)</sup>

Tipo De Muestra	%Cenizas	%Gmsa Cruda	%Proteína Cruda	%Fibra Cruda	%Carbohidratos <sup>a</sup>
Flor de Colorín (Nalapa)	8.49	1.79	23.19	21.59	55.91
Flor de Yucá (Nalapa)	9.88	1.93	22.96	12.72	52.49
Flor de Maguey (Edo. De México)	7.04	3.05	14.16	13.85	61.87

a. Resultados expresados en g/100g de muestra  $\pm$  desviación estándar determinaciones realizadas mínimo por triplicado (n = 3) y en todos los casos se obtuvo un coeficiente de variación menor a 5%.

b. Se calcularon por diferencia

## 2. Factores Tóxicos y Antinutricionales.

En la tabla 7 se presentan los resultados del contenido de factores tóxicos y antinutricionales de las muestras estudiadas, en todos los casos se trabajó con la muestra seca sin desengrasar, ya que como se mencionó anteriormente, el bajo contenido de grasa que presentan las muestras, permitió realizar todas estas pruebas experimentales con las muestras secadas al sol.

Tabla 7 Contenido de Factores Tóxicos y Antinutricionales de las flores estudiadas <sup>a</sup>

Muestra	Inhibidores de Tripsina <sup>b</sup>	Leectinas <sup>c</sup>	Saponinas <sup>c</sup>	Alcaloides <sup>d</sup>	Glucósidos Cianogénicos
Expresado en	UTI/mg muestra <sup>b</sup>	Título de Aglutinación	Título de Hemólisis	g alcaloides/100g de muestra	Prueba Cualitativa
Estambres de maguey	24.06 ± 0.97	5	3	0.005 ± 0.001	0.0
Flor de colorín	4.88 ± 0.03	-	-	0.095 ± 0.003	0.0
Flor de cuaresma	1.56 ± 0.06	5	-	0.0	0.0
Flor de gasparito	6.32 ± 0.16	4	-	0.024 ± 0.003	0.0
Flor de madreño	1.60 ± 0.07	10	-	0.016 ± 0.002	0.0
Flor de maguey	1.11 ± 0.10	6	3	0.0	0.0
Flor de sábila	2.54 ± 0.11	8	-	0.0	0.0
Flor de yuca	3.57 ± 0.18	3	4	0.0	0.0

a. Se muestran resultados promedio ± desviación estándar con un coeficiente de variación menor a 10% y n =3.

b. UTI : Unidades de tripsina inhibida.

c. Título: Máxima dilución en la que se presentó aglutinación o hemólisis en el caso de saponinas

d. Se reporta como alcaloide principal β-eritroidina.

Como se puede observar en la tabla anterior, la prueba de glucósidos cianogénicos fue negativa para todas las flores en estudio. El contenido de inhibidores de tripsina es menor a 10 UTI/mg de muestra, excepto para la flor de magüey la cual presenta un valor de 24 UTI/mg muestra, siendo la única especie que puede presentar un efecto antinutricional de importancia en la actividad de proteasas.<sup>(67)</sup>

Con respecto a las lectinas, se considera que un título mayor a 10 representa riesgo<sup>(67)</sup>, en este caso la única que no presentó lectinas es la flor de colorín, y por el contrario la única que presenta un valor justo por debajo del límite antes mencionado es la flor de madroño, sin embargo hay que considerar que para su consumo, estas flores se cocinan previamente, por lo que se pueden inactivar las lectinas de esta flor con el calor durante la preparación.

La prueba de saponinas fue positiva para la flor de yuca y para los estambres y flor de magüey; esto corrobora algunos estudios anteriores, en los cuales se han encontrado algunas saponinas de tipo esterooidal, tanto en especies de tipo Agavaceas, así como en partes reproductoras de las plantas. El título que presentan es muy pequeño considerando que un título mayor a 10 representa un riesgo, por lo tanto no se consideran tóxicas.<sup>(67)</sup>

La prueba de alcaloides fue positiva para las 2 especies de *Erythrina*, la flor de madroño y los estambres de magüey. Tomando en cuenta que la dosis letal media DL<sub>50</sub> en el ejote de la especie *Erythrina Americana* es de 78000 mg / Kg de peso corporal con una concentración de alcaloides de 0.097 g alcaloides / 100 g de muestra, se puede considerar que las cuatro muestras que presentan prueba positiva de alcaloides, son prácticamente inocuas: Se tiene reportado que en el caso de las *Erythrina*s la semilla madura es la más tóxica, ya que se han encontrado valores hasta de 1.056 g alcaloides / 100 g muestra, con una DL<sub>50</sub> 12000 mg / Kg de peso corporal.<sup>(68)</sup>

### 3. Contenido de aminoácidos y calificación química:

Únicamente se analizaron 3 especies de flores para el perfil de aminoácidos y para realizar la calificación química, esta decisión fue de acuerdo a la disponibilidad y a la abundancia de estas especies.

Tabla 8. Contenido de Aminoácidos de la flor de gasparito, flor de maguey y flor de sábila

MUESTRA	AMINOÁCIDOS		
	g. / 16 g de N		
	FLOR DE GASPARTITO <sup>1</sup>	FLOR DE MAGUEY <sup>2</sup>	FLOR DE SÁBILA <sup>1</sup>
ASPARTICO	10.03	8.22	6.50
SERINA	0.57	2.31	10.59
GLUTAMICO	6.29	8.05	7.53
GLICINA	2.09	1.18	0.76
ARGININA	1.57	1.77	2.82
ALANINA	2.59	1.88	0.29
PROLINA	1.75	2.74	8.08
HISTIDINA	0.80	0.69	0.51
TREONINA	1.70	1.16	4.77
CISTINA	0.68	0.00	0.25
TIROSINA	2.17	1.01	0.81
VALINA	1.66	1.92	2.84
METIONINA	0.00	0.61	0.00
LISINA	2.05	1.46	4.06
ISOLEUCINA	1.38	2.87	3.85
LEUCINA	2.21	4.69	5.34
FENILALANINA	1.02	1.18	2.98
TRIPTOFANO <sup>2</sup>	1.08	0.37	0.44
Total de a.a. indispensables	16.07	15.28	25.34

1. Promedio de la determinación por triplicado.

2. Obtenido por método colorimétrico

Tabla 9. Contenido de aminoácidos indispensables y calificación química de la flor de Gasparito

MUESTRA	FLOR DE GASPARITO	Contenido de aminoácidos en el patrón (g/10g N) <sup>1</sup>	Calificación Química
Isoleucina	1.38	4.00	79.87
Leucina	2.21	7.04	72.82
Lisina	2.05	5.44	87.32
Azufrados <sup>3</sup>	0.68	4.72	33.17
Aromáticos <sup>4</sup>	3.19	6.08	>100
Treonina	1.70	4.00	98.36
Valina	1.66	4.96	77.81
Triptofano <sup>2</sup>	1.08	1.00	>100

1. Patrón establecido por la (FAO, 1973)<sup>(68)</sup>.

2. Se calculó de la siguiente manera :  $[(a.a.)_{muestra} / \text{total a.a. indispensables}_{muestra}] / (a.a.)_{patrón} / \text{total a.a. indispensables}_{patrón}] * 100$

3. Metionina + cistina

4. Tirosina + fenilalanina

Tabla 10 Contenido de aminoácidos indispensables y calificación química de la flor de Maguey

MUESTRA	FLOR DE MAGUEY	Contenido de aminoácidos en el patrón (g/10g N) <sup>1</sup>	Calificación Química
Isoleucina	2.88	4.00	>100
Leucina	4.69	7.04	>100
Lisina	1.46	5.44	63.93
Azufrados <sup>3</sup>	0.61	4.72	30.88
Aromáticos <sup>4</sup>	2.19	6.08	85.66
Treonina	1.16	4.00	69.24
Valina	1.92	4.96	92.11
Triptofano <sup>2</sup>	0.37	1.00	89.33

1. Patrón establecido por la (FAO, 1973)<sup>(68)</sup>.

2. Se calculó de la siguiente manera :  $[(a.a.)_{muestra} / \text{total a.a. indispensables}_{muestra}] / (a.a.)_{patrón} / \text{total a.a. indispensables}_{patrón}] * 100$

3. Metionina + cistina

4. Tirosina + fenilalanina

**Tabla 11.** Contenido de aminoácidos indispensables y calificación química de la flor de Sábila

MUESTRA	FLOR DE SÁBILA	Contenido de aminoácidos en el patrón (g. Log %)	Calificación Química <sup>1</sup>
Isoleucina	3.85	4.00	>100
Leucina	5.34	7.04	>100
Lisina	4.06	5.44	>100
Azufrados <sup>3</sup>	0.25	4.72	7.94
Aromáticos <sup>4</sup>	3.78	6.08	91.40
Treonina	4.77	4.00	>100
Valina	2.834	4.96	84.05
Triptofano <sup>2</sup>	0.44	1.00	64.96

1. Patrón establecido por la (FAO, 1973) <sup>(68)</sup>.

2. Se calculó de la siguiente manera:  $[(a.a. - \text{muestra}) / \text{total a.a. indispensables}_{\text{muestra}}] / [(a.a. - \text{patrón}) / \text{total a.a. indispensables}_{\text{patrón}}] * 100$

3. Metionina + cistina

4. Tirosina + fenilalanina

En la tabla No. 7 se muestran los aminoácidos de las tres muestras seleccionadas, y se observa que existe una deficiencia de la metionina para la flor de sábila y la flor de gasparito, y también no se encontró cistina en la flor de maguey, en cambio los valores más altos, fueron en la leucina, para la flor de sábila y la flor de maguey, y para la flor de gasparito los valores más altos fueron el triptofano y los aminoácidos aromáticos (tirosina y fenilalanina).

En los cuadros 8, 9 y 10 se muestran la calificación química de las 3 especies, en donde se observa que los aminoácidos limitantes son los aminoácidos azufrados (cistina y metionina), semejante al valor que tienen las leguminosas, ya que se sabe que también son deficientes en aminoácidos azufrados. Con respecto a esta deficiencia debemos de tomar en cuenta que una de las desventajas que presenta la cuantificación de aminoácidos por el método de HPLC en fase reversa es la degradación de los aminoácidos metionina y cistina, por lo que no podemos asegurar que las flores sean en realidad deficientes de en estos aminoácidos.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

---

**CONCLUSIONES**

- ▶ Se encontró un contenido de cenizas, grasa y fibra cruda semejante al de algunas verduras y en menor cantidad en la flor de madroño.
- ▶ El contenido de proteína cruda fue alrededor del 23% en todas las especies estudiadas a excepción de la flor de madroño.
- ▶ Se confirmó que los factores tóxicos y antinutrimientales son muy bajos, en todas las flores estudiadas.
- ▶ Los estambres de magüey fueron la única muestra que presenta mayor contenido de inhibidores de tripsina.
- ▶ Las 3 flores estudiadas mediante la calificación química, mostraron ser deficientes en aminoácidos azufrados.
- ▶ Con los resultados obtenidos en la determinación de aminoácidos podríamos suplementar la proteína de estas muestras con algunos cereales, con el fin de aumentar la calidad de estas proteínas.

**RECOMENDACIONES.**

- ▶ Profundizar un poco más en el estudio de la proteína verdadera, ya que se ha reportado en la literatura que el 50% de los valores de proteína cruda en algunas flores comestibles estudiadas, corresponden a compuestos nitrogenados no proteicos ( como algunos aminoácidos no proteínicos), los cuales elevan el valor de la proteína cruda.
- ▶ Es conveniente determinar la relación de la eficiencia proteínica (REP), para evaluar desde otro punto de vista el valor nutricional de las proteínas presentes sobre todo en las especies de flores con mayor contenido de proteína cruda.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Wilkinson, C. 1993. *Edible Flowers from garden to palate*. Fulcrum Publishing Golden, Colorado. USA.
2. Sahagún, F.B. 1988. *Historia General de las cosas de la Nueva España*. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes, Alianza editorial Mexicana. México.
3. Bernal, M. H. 1992. *Exploración etnobotánica de plantas medicinales en una comunidad azteca*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. México. 157 pp.
4. Martínez, M. M. G. 1987. *Contribución al conocimiento de la flora apícola en la región del Ejido Los Remedios, Mpio. Jiquilpan, Estado de Michoacán*. Tesis Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich. 59 pp.
5. Martínez, M. 1990. *Las plantas medicinales de México*. Ed. Botas. México, D. F. 656 pp
6. Santoyo, R. M. 1995. *Plantas medicinales de Jesús del Monte, Mpio. Morelia, Michoacán*. Tesis Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich. 105 pp.
7. Lozoya, X. 1999. *Xiuhpatli. Herba officinalis*. Secretaria de Salud. UNAM. México, D. F. 159 pp
8. Escobar, T. H. 1994. *El recurso forestal en la vivienda campesina del municipio de Santo Domingo Zanatepec. Oaxaca*. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. México. 189 pp.
9. Gispert, C. M. & H. Rodríguez G. 1999. *Aprovechamiento de los recursos fitogenéticos silvestres-alimentarios y medicinales- de los tephuanes de San Andrés Milpillan, municipio de Huajicori. Nayarit*. México 1(1): 9-20.
10. Sarmiento, F. M. (ed.) sin año. *Herbolaria mexicana*. Centro de México. Guías Prácticas México Desconocido No. 5. 72 pp
11. Niembro R. A. 1986. *Arboles y arbustos útiles de México*. Limusa. México, D. F. 206 pp.
12. Martínez M., 1987. *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. Ed fondo de cultura económica, 1ª ed. México D.F.
13. Aguilar, A. et al. 1994. *Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social*. Información etnobotánica. IMSS. México, D. F. 251 pp
14. Engelmann, G. 1873. *Notes on the genus Yucca*. Trans. Acad. Soc. St. Louis 3: 17-54.
15. Trelease, W. 1902. *The Yuccaceae*. Annual Rep. Missouri Bot. Gard. 13: 27-133.
16. Espejo, A. & A. R. López-Ferrari, 1992. *Las Monocotiledoneas Mexicanas, una Sinopsis Florística*. I. Parte 1. Agavaceae, Alismataceae, Alliaceae, Alstroemeriaceae y Amaryllidaceae. UAMIZ. México. 76 p.

17. Correll, S. D. & Marshall, C. J. 1970. Manual of the Vascular Plants of Texas. Published by Texas Research Foundation. Reener, Texas. 1879 pp.
18. Gentry, H. S. 1982. Agaves of continental North America. University of Arizona Press. Tucson. 670 pp. illus., maps.
19. Hernández, X. E., Vargas, N. A., Gómez, H. T., Montes, M. J. & F. Brauer G. 1983. Consideraciones etnobotánicas de los mercados en México. Rev. Geografía Agrícola 4: 13-28.
20. Bermejo, J Y León J.,(1992) Cultivos Marginados (otra perspectiva de 1942) FAO: Producción y protección vegetal #26. Roma (1992)
21. Liener, Irvin E. Toxic Constituents of plant Foodstuffs. Ed Academic Press, 2<sup>a</sup> cd., New York., (1980). pp 7-57, 73-98, 143-160.
22. Giral, F.,Sotelo, A., Lucas B. And de la Vega, A.(1978). Chemical composition and toxic factors content in fifteen leguminous seeds. Quart. J Crude Drugs Res. 16(3), pp.143-149
23. Stanislaus, J.,Smolenski, A., Kinghorns, D. y Baladrín, M (1981). Toxic constituents of legume forage plants. Economic Botanic. 35(3),pp 321-355
24. Barre, A., Van Damme, E., Peumans W. And Rougé P. (1996) Structure and molecular modeling of monocot mannose-binding lectins: Functional implications. In: COST 98-Effects of antinutrients on the nutritional value of legume diets. (Ed) ECSC-ECEAEC.Luxemburg. pp98-108
25. Lis, H. Sharon, N (1981). Lectins. In: The biochemistry of Plants. A comprehensive treatise Stumpf, P. and Conn, E. Academic Press, Inc vol 6 pp 371-443.
26. Etzler, M (1986). Distribution and function of plant lectins. In: The lectins: Properties, functions, and applications in biology and medicine. Liener, I., Sharon, N and Goldstein, I. (eds) Academic Press Inc. New York. pp 371-435.
27. Toms.G. (1971). Phytohaegglutinins. In: Chemotaxonomy of the leguminosae. Harborne, J. Boulter, D. and Turner, B. (Eds) Academic Press. New York. pp. 367-462
28. Lucas, B. and Sotelo, A. (1993). A useful modification of the hemagglutination method for the screening of lectins in legume seeds. In: Recent advances in research in antinutritional factors in legume seeds. Van Der Poel, A. Huisman, J. And Saini, H. (eds) Wageningen Pers. EAAP publication #70 . pp.71-74
29. Van Der Poel, T., Van Zuilchem D. And Van Ort, M (1990). Thermal inactivation of lectins and trypsin inhibitor activity during steam processing of dry beans (*Phaseolus Vulgaris*) and effects on protein quality. J. Sci food Agric. 53. pp 215-229.
30. Valle P. y Lucas, B. (2000) Toxicología de Alimentos. Ed. Centro Nacional De Salud Ambiental. México D.F. pp 68,69.
31. Exjolfson, R. (1970). Recent Advances in in chemistry of cyanogenic glucosides. Fortsch. Chem Organ. Naturist. 28, 74-108

32. Lucas, B. and Sotelo A. (1984) Simplified test for the quantitations of cyanogenic glucosides in wild and cultivated seeds. Nutr. Rep. Int 29(3) pp 711-719.
33. Yeoh, H and Tan, C. (1994). Determination of limarine in cassava using enzyme-sensitised microcentrifuge tubes. J. Sci. Food Agric. 66, pp 31-33.
34. Humphries, C. (1980) Trypsin inhibitors in leaf protein concentrates. J. Sci. Food Agric. 31:1225
35. Kakade, M., Rackis, J., Mc Ghee, J. and Puski, G. (1974). Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: A collaborative analysis of an improved procedure. Cereal Chem. 51. pp376-382.
36. Koeppe, S.J.; Rupnow, J.H., Walter, C.E. y Davis, A. (1985). Isolation and heat stability of inhibitors in amaranth (*Amaranthus hypochoerifolius*). J. Food Sci. 50(5):1519
37. Sotelo, A., Soto, M., Lucas, B., and Giral, F. (1993). Comparative studies of the alcaloidal composition of two mexican *Erythrina* species and nutritive value of the destoxified seeds. J. Agric. Fodd Chemistry. 41,2340-2343.
38. Muñoz M., (1979) Determinación de saponinas, taninos y acción antibiótica en algunas plantas silvestres. TESIS. Fac. de química. UNAM pp. 4-12
39. Birk, Y. And Peri, I (1980). Saponins. In: Toxic constituents of foodstuffs. Liener, I (Ed.) Academic Press, Inc. 2<sup>nd</sup> edition, N.Y. pp. 161-182.
40. Committee on Food Protection (1966). Toxicants naturally occurring in foods. National Academy of Science. Washington D.C.
41. Oleszek, W., Keith, R., Price, K., (1990). Colquhoun, I., Jurzysta, M., Ploszynsky, M., and Fenwick, R. Isolation and identification of alfalfa (*Medicago Sativa* L.) root saponins: their activity in relation to a fungal bioassay. J. agric. Food Chem. 38, 1810-1817.
42. Oakenfull, D (1981). Saponins In Food: A review. Food Chem. 6, 19-40.
43. García-Mateos R., Lucas B., Zendejas M., Soto-Hernández M., Sotelo A., 1996. Variation of the total Nitrogen, tein Nitrogen Content and Types of Alkaloids in different Stages of Development in *Erythrina Americana Seeds*, J. Agric Food Chem., 44 pp 2987-2991.
44. Goodwin & Mercer., 1983, Introduction to Plant Biochemistry. Pergamon Press, Oxford, 2<sup>a</sup> Edición, pp 480-481.
45. Ikan R., 1991. Natural Products. A Laboratory Guide, Academic Press, San Diego California, 2<sup>a</sup> Edición, pp. 226-227.
46. García-Mateos R., Lucas B., Zendejas M., Soto-Hernández M., Sotelo A., (1996). Variation of the total Nitrogen, Non-protein Nitrogen content and Types of Alkaloids in different stages of development in *Erythrina americana* Seeds, J. Agric. Food Chem., 44 : 2987-2991
47. Gil V. L., (1992). Valor nutritivo de algunas flores comestibles. TESIS. Fac. de Química UNAM. pp 16-17.

- 
48. Fisher, P., Bender, A. 2000. Valor nutritivo de los alimentos. Limusa-Noriega editores, 1<sup>o</sup> ed. México, pp69-74.
  49. Lloyd, L.E., McDonald, B.E., 1982. Fundamentos de nutrición. Acriba, 1<sup>o</sup> edición España, pp 103-112.
  50. Fox, B., Cameron, A., 1997. Ciencia de los Alimentos. Nutrición y Salud, Limuiega editores, 5<sup>o</sup> edición. México, pp179-199.
  51. Viadel, B. Alegria, A., 2000. Amino Acid Profile of Milk-Based Infant Formulas. Int. J. of Food Science and nutrition. 51: p.p 367-372.
  52. FAO/WHO/UNU, Expert consultation., 1985. Energy and Protein Requirements. FAO/WHO Nutrition meetings. report series 724; Food and Agriculture Organization / World Health Organization: Suiza.
  53. Official Methods of Analsis of the Association of oficial Analytical Chemists (1995). 15<sup>th</sup> edition, published by AOAC. Inc Helrich, (editor) Arlington
  54. Jaffü, W.G. Leney, A and Gonzales, D.I., (1974) Isolation and partial characterization of beans phytohemagglutinis. Phytochemistry 13, ,p.p 2685-2693
  55. Lucas B., Sotelo, A. (1984). A simplified test for the quantification of cyanogenic glucosides in wild and cultivated sedes. Nutr. Rep. Int 29: 711-719.
  56. Kakade, M.L. (1974). Determination of trypsin inhibitor activity of soy products cereal. Chemistry 51, 376-382
  57. Secretaría de salud. Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (2000) Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Tomo I. México 7<sup>o</sup> edición. . pp 184-185
  58. Brunton J. (1991). Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia, Acriba, España.
  59. Giron M. Ma. C. (1992). Determinación semicuantitativa de saponinas en muestras vegetales aprovechando su capacidad hemolítica. TESIS. Fac. de Química UNAM. pp 96-97.
  60. Alegria, A. Barberá, R., Lagarda, M., López J., (1998). Determinación de aminoácidos en fórmulas para lactantes por cromatografía de líquidos de lata resolución en fase reversa. Alimentaria., 295: 103-110.
-

- 
61. Cohen, S., Michaud D. (1993). Synthesis of a Fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via HPLC. *Anal Biochem.* 211:279-287, 1993.
  62. Díaz, J., Lliberia, J., Comellas, L., Broto, F. (1996). Amino acid and amino sugar determination by derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate followed by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 719: pp 171-179.
  63. Strydom, D. Cohen, S. (1994). Comparison of amino acid analyses by phenylisothiocyanate and 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate pre column derivatization. *Anal Biochem.* 222:19-28.
  64. Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A. Tarvin, T.L. (1984). Rapid analysis of amino acid using pre column derivatization. *J. Chromatogr.* 336: pp 93-104.
  65. Rama Roa, M., Tara, M., Chandra, K. (1974). Colorimetric estimation of tryptophan content of pulses. *Journal of Food Sc. Tech.*, Vol. II, pp. 213-216.
  66. Cravioto R, Massieu, G, Guzmán J y Calvo J y Colaboradores. (1998). Programa Multimedia (CD-ROM). Composición de alimentos mexicanos. Ciencia XI., Instituto Nacional de la Nutrición. México.
  67. Feeney, R. E. Means, G.E. and Bigler, J.C. (1969). Inhibition of human trypsin plasmin and trombin by naturally occurring inhibitors of proteolytic enzymes. *J. Biol. Chem* 244 p.p. 1957-1960
  68. Food Agricultural Organization / World Health Organization., (1973)., Energy and Protein Requirements, WHO, Technical Report series No. 522, Geneve.

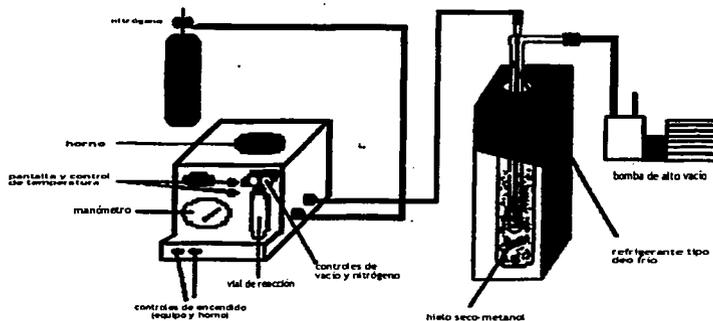


Figura 1. vial de reacción empleado para la preparación de muestras e hidrólisis en la determinación del perfil de aminoácidos.

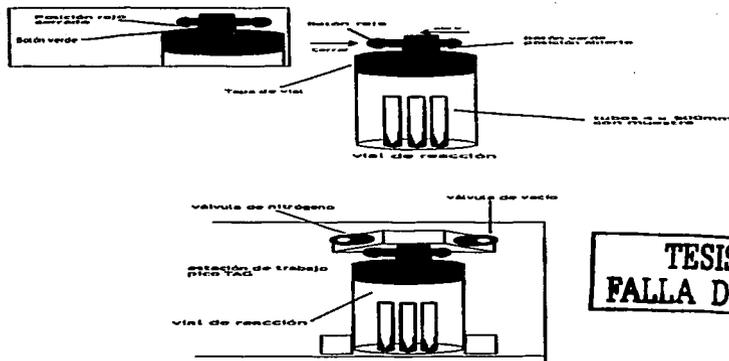


Figura 2. Estación de trabajo Pico-Tag, empleada en la determinación del perfil de aminoácidos

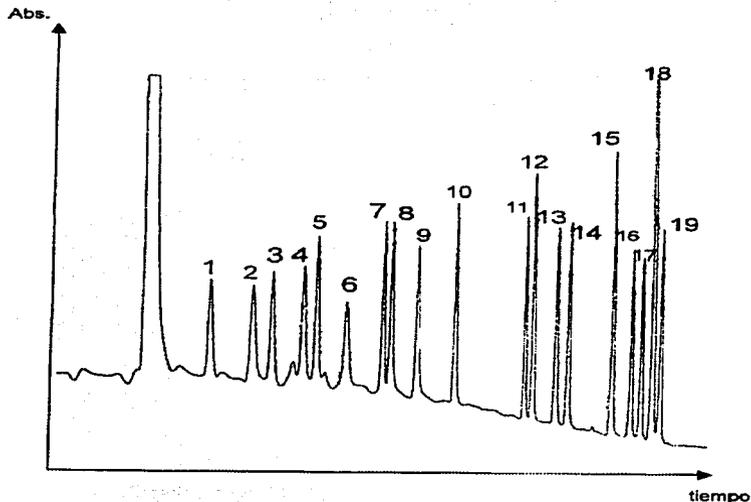
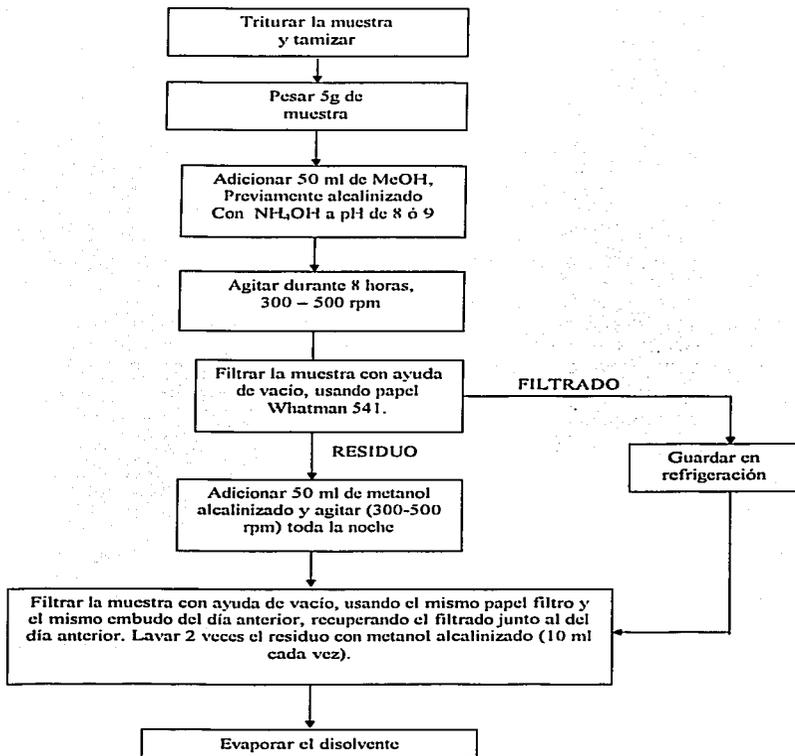


Figura 3. Cromatograma del estándar de aminoácidos para la obtención del perfil de aminoácidos en las muestras estudiadas (Flor de Maguey, Flor de Gasparito, Flor de Sábila).

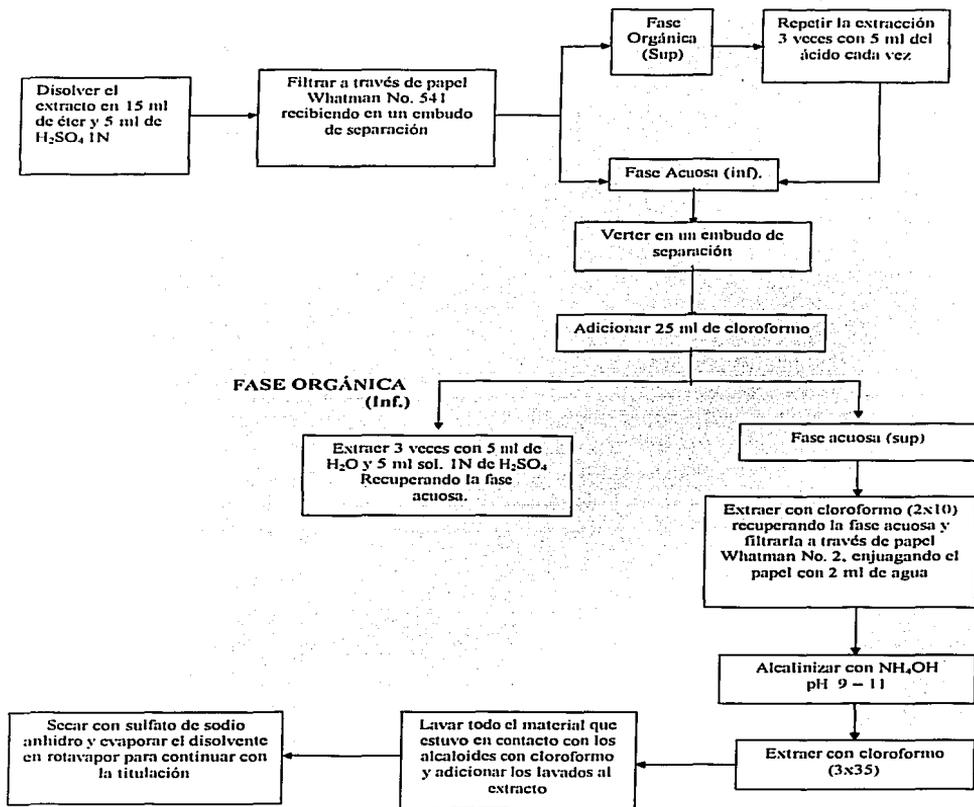
1 Aspártico, 2 Serina, 3 glutámico, 4 glicina, 5 histidina, 6 amoniaco, 7 arginina, 8 treonina, 9 alanina, 10 prolina, 11 cistina, 12 tirosina, 13 valina, 14 metionina, 15 lisina, 16 isoleucina, 17 leucina, 18 norleucina, 19 fenilalanina.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES POR TITULACIÓN  
FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS  
7ª EDICIÓN. 2000**



## PURIFICACIÓN



## TITULACIÓN

