

00528  
93

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas  
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso  
el contenido de mi trabajo de investigación.  
NOMBRE: Zárate Martínez  
Ana Lilia  
FECHA: 11 Agosto - 2003  
FIRMA: [Signature]



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO.**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**"CARACTERIZACIÓN BROMATOLÓGICA Y  
DETERMINACIÓN DE FACTORES TÓXICOS  
DE LA SEMILLA DE NAPAHITE (*Trichilia hirta*)"**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS.**

**P R E S E N T A  
ZÁRATE MARTÍNEZ ANA LILIA**



**MÉXICO, 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. Bernardo Lucas Florentino

**Vocal.**

Prof. Lucia Cornejo Barrera

**Secretario.**

Prof. Leticia Gil Vieyra

**1er suplente.**

Prof. Bertha Julieta Sandoval Guillen

**2do. Suplente.**

Prof. Inés Miranda Martínez

**Sitio donde se desarrolló el tema:**

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

Conjunto E. Laboratorio III.

Departamento de Farmacia.

Asesor



---

M. en C. Bernardo Lucas Florentino

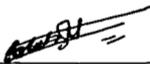
Asesor Técnico



---

Q.F.B. Leticia Gil Vieyra

Sustentante



---

Ana Lilia Zárate Martínez

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al M. en C. Bernardo Lucas Florentino, por brindarme la oportunidad y confianza, por su ejemplo de constante trabajo y dedicación.**

**A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme formar parte de esta gran comunidad y por darme la oportunidad de alcanzar mi sueño de ser una profesionista.**

**A Lety Gil y Rosita Argote por su cariño, orientación y apoyo incondicional en todo momento y por sus acertados comentarios en la realización de la tesis.**

**Nancy, Verónica, Carlitos, Helga, Iliana, Gaby, Argelia, Noriko, Fernanda, Larissa, Semei, Minerva, Vanesa y Dany, porque su cariño y amistad me ayudo en todo momento, ya que siempre encontraba el respaldo que necesitaba.**

**Ferjanith, Celia, Mileidy, Rutilia, Kanako, Lucila, su alegría, amistad y cariño son y serán parte importante de mi vida. Las quiero mucho.**

**A mi querida Elsa, que siempre estuvo de mi lado y a mi lado en todo momento, su apoyo, cariño y amistad son pieza fundamental en mi vida.**

**A Israel por ser un gran amigo y compañero.**

**A la señora Vicky, por todo su cariño y sus buenos consejos y por hacer placentera mi estancia en el laboratorio.**

**A todos aquellos que he conocido durante el transcurso de mi vida, profesores y amigos, los cuales fueron la piedra angular en mi formación como estudiante y persona.**

## **DEDICATORIA**

**A Dios por permitirme vivir y conocer lo maravilloso que es la vida y la amistad.**

**A mi Padre por el ejemplo de vida, fuerza y dedicación, por sus innumerables consejos para lograr mis metas, ya que mi realización es también la suya, tu cariño y amor siempre esta en mi corazón, gracias papaíto. Te quiero mucho.**

**A mi madre, no tengo palabras para darte las gracias por darme vida, ya que no sería quien soy si tú no fueras como eres, agradezco por tenerte, por el apoyo incondicional y los buenos consejos ya que me enseñaste que solo con trabajo y dedicación se alcanzan las metas deseadas. Te quiero con todo mi corazón.**

**☽ A mi querida abuelita Juanita, agradezco todo el cariño, ternura, paciencia, amor y dulzura, estas conmigo en todo momento y siempre te mantendrás en mi corazón. Todo lo que soy, es por ti mi amada abuelita.**

**A mi abuelito Antonio por ser un ejemplo de fuerza y dedicación, mis mejores recuerdos de la niñez te los debo a ti, te quiero mucho.**

**A mis abuelos, Emérita, y Andrés por sus buenos consejos y cariño, gracias por darme al padre más maravilloso de este mundo.**

**A mis familiares cercanos por su cariño y atención, en especial a mi Tía Melco y Tío Marcelino a quien agradezco el gran apoyo moral que siempre me han brindado.**

**A mi Raptor por permitirme ser parte de su vida, como es de la mía, gracias por ser mi compañera de juegos, cómplice en travesuras, te quiero mucho hermanita.**

**A mi querida ahijada Ericka, tu presencia es un aliciente en mi vida. Te quiero mi latosita.**

*La felicidad de hoy.....  
No es un grano para ser almacenado en una caja,  
no es vid a quedarse en una vasija,  
no puede conservarse para mañana,  
debe sembrarse y cosecharse el mismo día.*

# INDICE

Página

|  |    |
|--|----|
| I. Introducción  | 1  |
| II. Objetivos  |    |
| 2.1 Objetivo general   | 3  |
| 2.2 Objetivos particulares   | 3  |
| III. Antecedentes  |    |
| 3.1 Generalidades sobre el género <i>Trichilia</i>                                 | 4  |
| 3.2 Descripción botánica de <i>Trichilia litrea</i>                                | 5  |
| 3.2 Principales productos y utilización  | 5  |
| 3.3 Estudio bromatológico (análisis proximal)                                      | 6  |
| 3.4 Grasas y aceites   | 7  |
| 3.4.1 Importancia de las grasas y aceites  | 8  |
| 3.4.2 Ácidos grasos indispensables   | 8  |
| 3.4.3 Aspectos nutricionales de los aceites y grasas                               | 9  |
| 3.4.4 Factores físicos y químicos usados en la caracterización de grasas y aceites | 10 |
| 3.4.5 Refinación de aceites  | 12 |
| 3.4.6 Perfil de ácidos grasos  | 13 |
| 3.5 Extracción de limonoides   | 14 |
| 3.6 Factores tóxicos y antinutricionales   | 16 |
| IV. Metodología  |    |
| 4.1 Diagrama general de investigación  | 24 |
| 4.2 Obtención de material biológico  | 25 |
| 4.3 Limpieza y selección   | 25 |
| 4.4 Secado   | 25 |
| 4.5 Determinación de parámetros físicos  | 25 |
| 4.5.1 Peso hectolítrico  | 25 |
| 4.5.2 Determinación de peso y tamaño de la semilla                                 | 26 |
| 4.6 Molienda   | 26 |
| 4.7 Análisis proximal  | 26 |
| 4.7.1 Proteína verdadera   | 27 |
| 4.8 Desengrasado   | 28 |
| 4.9 Toxicología analítica  | 28 |
| 4.9.1 Taninos  | 29 |
| 4.9.2 Nitratos   | 30 |
| 4.9.3 Ácido fítico   | 32 |
| 4.9.4 Inhibidores de tripsina  | 34 |
| 4.9.5 Determinación de lectinas  | 37 |
| 4.9.6 Saponinas  | 39 |
| 4.9.7 Glucósidos cianogénicos  | 43 |
| 4.10 Alcaloides en harina desengrasada y aceite (determinación cualitativa)        | 46 |
| 4.11 Determinación de densidad calorífica  | 49 |
| 4.12 Refinación del aceite de Napahuite  | 51 |
| 4.12.1 Desgomado   | 51 |
| 4.12.2 Neutralización  | 52 |
| 4.12.3 Extracción de cera  | 53 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 4.12.4 | Blanqueo  | 54 |
| 4.13   | Factores físicos y químicos usados en la caracterización de grasas y aceite | 54 |
| 4.13.1 | Densidad  | 54 |
| 4.13.2 | Índice de yodo  | 55 |
| 4.13.3 | Índice de saponificación  | 57 |
| 4.13.4 | Índice de acidez  | 58 |
| 4.13.5 | Índice de refracción  | 59 |
| 4.13.6 | Punto de fusión   | 60 |
| 4.14   | Perfil de ácidos grasos (cromatografía de gases)                            | 61 |
| 4.15   | Extracción de limonoides  | 63 |
| V.     | Resultados y discusión  |    |
| 5.1    | Parámetros físicos en la semilla de Napahuite                               | 64 |
| 5.2    | Caracterización bromatológica de la harina integral y desengrasada          | 64 |
| 5.3    | Proteína verdadera y proteína cruda   | 65 |
| 5.4    | Toxicología de la harina desengrasada de Napahuite                          | 66 |
| 5.5    | Contenido de ceras  | 69 |
| 5.6    | Parámetros fisicoquímicos   | 69 |
| 5.7    | Valor energético de la semilla y aceite de napahuite                        | 71 |
| 5.8    | Perfil de ácidos grasos   | 72 |
| VI.    | Conclusiones  | 74 |
|        | Bibliografía  |    |
|        | ANEXO I   |    |

## I. INTRODUCCIÓN

Es de gran importancia tener conocimiento de la tierra y vida que hay en ella, ya que se encuentra controlada por factores como el suelo, el aire, los animales y las plantas, todo ello constituye nuestro medio ambiente, en el proceso de evolución se ha adquirido una gran variedad de aptitudes que capacitan al humano para modificar el medio ambiente y la alimentación, en forma limitada, y utilizarlo para satisfacer sus prioridades de subsistencia. El hombre primitivo satisfizo sus necesidades, a medida que los encontraba, alimentándose de animales y de frutos, semillas, raíces y otras partes comestibles de plantas que conseguía en los bosques y en las praderas, llevando así una existencia nómada en constante búsqueda de alimentos. Finalmente, descubrió que, al sembrar las semillas de plantas comestibles en tierra adecuada, podía producir suficiente alimento para su consumo, y tener alimento durante todo el año, con el transcurso del tiempo se dio cuenta que al aplicar determinadas técnicas obtenía subproductos para un futuro consumo.

Hoy en día hay especies silvestres que no han sido estudiadas y solo son conocidas en las regiones donde se producen, esto ha llamado la atención de muchos investigadores a buscar nuevas fuentes de alimentos que se han denominado "no convencionales", pero que de acuerdo con su composición podrían complementar una dieta deficiente en algunos nutrientes, y ayudar a sectores en donde existe desnutrición, además son especies de bajo costo. Se ha considerado a estas especies silvestres como una opción, ya que algunas son de alto nivel proteínico y otras tienen un alto nivel de grasas, de esta última su importancia radica en que proveen la mayor fuente de energía, suministran ácidos grasos indispensables, son acarreadores de vitaminas liposolubles y contribuyen al sabor y la saciedad de la comida. En estas especies silvestres es necesario determinar la presencia o cantidad de sustancias tóxicas para permitir en un futuro, su consumo.<sup>(1)</sup>

En este trabajo se caracterizó bromatológicamente y se determinaron los factores tóxicos en la harina integral y la harina desengrasada de la semilla de Napahuite (*Trichilia hirta*) y se caracterizó fisicoquímicamente el aceite crudo y refinado de esta semilla, se destaca que en la harina integral presenta un alto contenido de grasa (40.44%), fibra (25.37%) y tiene un % de proteína mayor al de algunos cereales (maíz, arroz, trigo y cebada). En cuanto a factores tóxicos y antinutricionales en harina desengrasada los valores obtenidos son no significativos a excepción de nitratos y fitatos.

En el aceite crudo y refinado los valores de los parámetros fisicoquímicos son parecidos a las grasas del grupo oleico-linoleico, con excepción de índice de acidez (25.3%) en donde el valor reportado debe ser de 0.5%, por esto se eliminaron compuestos terpénicos llamados "limonoides" que son los causantes de aumentar la acidez.

Del perfil de ácidos grasos se destaca el alto contenido de ácido oléico, linoleico y palmítico, en donde el linoleico es un ácido graso indispensable en la dieta.

Toda la información obtenida en este trabajo aportará la posibilidad de hacer una propuesta sustentable para una posible utilización en alimentación humana y/o animal.

## II. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Conocer la composición química, y la presencia de factores tóxicos y antinutricionales de la semilla de Napahuite (*Trichilia hirta*), con la finalidad de evaluar su potencial alimenticio en particular de la fracción grasa.

### 2.2 Objetivos particulares

- ❖ Determinar algunos parámetros físicos en la semilla de Napahuite.
- ❖ Realizar el análisis proximal de la semilla de Napahuite (integral y desengrasada).
- ❖ Cuantificar el contenido de factores tóxicos y antinutricionales en la harina desengrasada de la semilla de Napahuite.
- ❖ Determinar el contenido energético de la harina integral de la semilla de Napahuite.
- ❖ Determinar los parámetros fisicoquímicos más comunes en el aceite obtenido de la semilla de Napahuite.
- ❖ Obtener el aceite refinado de la semilla de Napahuite.
- ❖ Identificar los ácidos grasos presentes en el aceite crudo y refinado de la semilla de Napahuite.

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1 GENERALIDADES SOBRE EL GENERO *Trichilia*

El género *Trichilia*, perteneciente a la familia de las meliáceas, esta constituido por aproximadamente 70 especies, la mayoría de las cuales se distribuyen en América tropical, cerca de 14 especies en África y dos especies en la región Indo-Malaya. En el cuadro 1 se resumen las especies del género *Trichilia* registradas para el territorio mexicano en donde tres de estas especies, han sido investigadas como fuentes de limonoides, entre ellas: *T. hirta*, *T. havanensis*, *T. trifolia*, la mayoría de los trabajos químicos publicados a la fecha describen el aislamiento y la caracterización de los limonoides, cabe destacar que muchos de estos compuestos han demostrado propiedades insecticidas. <sup>(2)</sup>

CUADRO 1.

Distribución del género *Trichilia* en México. <sup>(2)</sup>

| ESPECIE                       | DISTRIBUCIÓN   |
|-------------------------------|--|
| <i>Trichilia americana</i>    | Desde Sonora hasta el Pacífico en las pendientes de Chiapas.                               |
| <i>Trichilia hirta</i>        | Desde Sonora a Tamaulipas, llegando a Chiapas y Yucatán.                                   |
| <i>Trichilia martiana</i>     | Costas del Pacífico, Caribe y Sureste de México.   |
| <i>Trichilia glabra</i>       | Bosque estacional siempre verde en la península de Yucatán y depresión central de Chiapas. |
| <i>Trichilia pallida</i>      | Tabasco, Chiapas y Veracruz  |
| <i>Trichilia trifolia</i>     | Caribe de México desde Tamaulipas al sur de la península de Yucatán.                       |
| <i>Trichilia havanensis</i>   | Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Guerrero, Veracruz y Estado de México.                           |
| <i>Trichilia erythrocarpa</i> | San Andrés Tuxtla, Veracruz.   |
| <i>Trichilia moschata</i>     | Veracruz, Tabasco, Campeche y Chiapas.   |
| <i>Trichilia minutiflora</i>  | Campeche y Yucatán.  |

Desde el punto de vista biológico, los terpenoides obtenidos a partir del género *Trichilia* han demostrado poseer una gran variedad de propiedades, mismas que podrían ser de utilidad para el desarrollo de nuevos agentes pesticidas y medicinales. <sup>(3)</sup>

Las semillas de meliáceas tienen su origen en los óvulos anátropos, campilótropos u ortótropos, se desarrollan en el interior de cápsulas, bayas o rara vez en nueces, en la madurez presentan las siguientes características estructurales: *Semillas* de tamaño variado, elipsoides, ovales, triangulares, cuadrangulares, oblongas, ovoides, globulosas o comprimidas, desnudas o ariladas, hilo amplio, generalmente en forma de huso, blanquecino: *arilo* cubriendo parcial o totalmente a la semilla, procedente del funículo,

calaza, café, carnoso de color amarillo, rojo, naranja, crema, castaño oscuro; *cubierta seminal* crustácea, coriácea membranosa o carnosa, lisa o rugosa de color rojo, castaño claro u oscuro, negra opaca o lustrosa, a veces expandida en un ala terminal o membranosa; *Endospermo* nuclear, abundante, escaso o ausente, uniforme blanquecino, con reservas de aceite; *embrión* recto, plano, espátulado o inverso central o transverso, con plúmula corta o diminuta, en ocasiones pilosa, provisto de dos cotiledones delgados y foliáceos o gruesos y carnosos, masivos, ovoides, alguna veces lobulados en la base, frecuentemente conatos, de color blanco, verde o rosado y la semilla de Napahuite posee estructuras internas que se llaman células secretoras ya que en su interior albergan células resiníferas. <sup>(4)</sup>

### 3.2 DESCRIPCIÓN BOTANICA *Trichilia hirta*.

El Napahuite (*Trichilia hirta*) es un arbusto que pertenece a la familia botánica de las Meliáceas y puede llegar hasta una altura de 15 metros, con hojas pinadas, compuestas de 7 a 23 hojuelas lanceoladas-ovaladas o elípticas de 5 a 8 cm, produciendo inflorescencias grandes con flores de aproximadamente 4 mm. de color verde-amarillento y el fruto es una cápsula globosa de 1 a 2 cm, con tres valvas y tres semillas oleaginosas redondas de aproximadamente 6 mm., presenta variaciones de color que va desde una tonalidad de anaranjado hasta café-rojizo. De acuerdo con el cuadro 1 se observa que está Meliáceae se encuentra distribuida desde Sonora a Tamaulipas, llegando a Chiapas y Yucatán, está representada por 51 géneros y cerca de 550 especies ampliamente distribuidas en regiones tropicales y subtropicales.<sup>(5,6)</sup>

### 3.3 PRINCIPALES PRODUCTOS Y UTILIZACIÓN

No tiene usos industriales. La madera se utiliza localmente como leña, en carpintería y construcciones rurales. Ocasionalmente se usa para fabricar carretas, cayucos y canoas. El arilo carnoso que rodea a la semilla contiene de un 60 a 70 % de aceite no secante que se emplea en algunos lugares para dar lustre al pelo, así como para destruir a los parásitos, por sus características este aceite se puede usar para fabricar jabones, se ha visto que la raíz posee propiedades purgantes violentas. Como beneficio a la naturaleza, la semilla de Napahuite proviene de un arbusto y la importancia radica en que tanto los árboles como los arbustos controlan la temperatura ambiental debido a que su follaje intercepta y absorbe la radiación solar abatiendo las temperaturas extremas de una localidad determinada. <sup>(5)</sup>

### 3.4 ESTUDIO BROMATOLÓGICO (ANÁLISIS PROXIMAL)

Es un sistema analítico que aporta información de la muestra de una manera rápida, este sistema se ha criticado mucho, pero hasta la fecha nadie ha desarrollado otro que sea tan práctico y aceptable. una de sus características es la de medir cantidades en lugar de calidad. Los puntos que se estudian son los siguientes:

#### **Humedad:**

El contenido de agua puede determinarse gravimétricamente pesando una muestra antes y después de secarla hasta peso constante en una estufa de vacío. Puede producirse una sobreestimación si durante la desecación se pierden compuestos volátiles tales como ácidos grasos de cadena corta.<sup>(7,10)</sup>

**Proteína cruda:** El contenido en proteína cruda de la muestra se determina midiendo su contenido en nitrógeno amfínico, sin embargo el nitrógeno determinado, no procede totalmente de las proteínas y aminoácidos, procede de muchas aminas, nitratos, y vitamina B que se encuentran en la muestra. El método empleado es el kjeldahl, que determina el nitrógeno total contenido en una matriz alimenticia, se basa en la combustión en húmedo de la muestra por calentamiento con  $H_2SO_4$  concentrado en presencia de catalizadores metálicos para reducir el nitrógeno orgánico de la muestra hasta nitrógeno inorgánico en forma de amoniaco, el cual queda en solución en forma de sulfato de amonio, el digerido, una vez alcalinizado, se destila directamente o por arrastre de vapor para desprender el amoniaco, el cual es atrapado en una solución de ácido bórico y posteriormente se titula.<sup>(10)</sup>

#### **Fibra cruda:**

La fibra cruda medida de esta manera se considera que es la proporción del alimento que no es digerida y absorbida que queda después de tratar la muestra desengrasada en las condiciones descritas a continuación; hidrólisis ácida con  $H_2SO_4$ , seguido de una hidrólisis alcalina, lavado con alcohol con una posterior incineración del material insoluble, de tal modo que por diferencia es posible obtener el contenido de hidratos de carbono que consiste en celulosa y cierta proporción de lignina y hemicelulosa.<sup>(10)</sup>

#### **Cenizas:**

La cantidad total de minerales de una muestra se determina reduciéndola a cenizas. La muestra desecada se calienta a baja temperatura para destruir la materia orgánica y enseguida se coloca en una mufla y se deja incinerar de 4 a 6 horas. El procedimiento de incineración constituye la primera fase de la determinación de la concentración de la mayoría de los minerales individuales de la muestra.<sup>(10)</sup>

### **Grasa cruda:**

Se considera que el extracto etéreo representa el contenido graso del producto, aunque en la práctica se ha visto que también se arrastran compuestos solubles en la grasa como las vitaminas A, D, K y E. En el método Soxhlet la muestra se introduce en un cartucho de celulosa y se extrae continuamente con éter de petróleo durante unas 14 horas, es un ingenioso sistema sifónico el cual vacía periódicamente el depósito y transfiere el extracto al matraz inferior, al término del periodo de extracción se evapora el éter del matraz dejando un residuo oleoso.<sup>(9)</sup>

### **Hidratos de carbono:**

El término carbohidratos, expresa una composición elemental de carbono, hidrógeno y oxígeno, además proveen la mayor parte de las calorías de la dieta de la población humana, en el análisis proximal los hidratos de carbono se designa al valor obtenido restando de 100 la suma de los porcentajes de agua, proteína cruda, grasa bruta y fibra, se reconoce este valor con el término de carbohidratos totales, pero en este último se incluye con frecuencia también la fibra bruta, es preciso indicar que cualquier error cometido en las determinaciones anteriores quedan reflejadas en la cifra final.

## **3.5 GRASAS Y ACEITES.**

Las grasas están compuestas de carbono, hidrógeno y oxígeno, con predominio del hidrógeno, desprendiendo mayor número de calorías en su combustión que los hidratos de carbono, que también están compuestos de carbono, hidrógeno y oxígeno. Las grasas y aceites están constituidos por prácticamente 100% de triacilglicéridos, los que a su vez son ésteres de ácidos grasos con glicerol.<sup>(8,9)</sup>

Las diferencias de estabilidad, el estado físico, el índice de yodo, la temperatura de solidificación, etc., de las grasas y aceites se deben fundamentalmente a la presencia y a la concentración de los ácidos grasos, estos se definen como ácidos monocarboxílicos de cadena alifática con número par de átomos de carbono, que podían ser saturados o insaturados, sin embargo a medida que las técnicas han mejorado, se han identificado muchos otros con estructuras diferentes. Los ácidos grasos que comúnmente se localizan en las grasas comestibles son: Láurico, Mirístico, Palmítico, Estearico, Palmítoleico, Oleico, Linoleico y linoléico.<sup>(11)</sup>

Los ácidos grasos se clasifican por su grado de insaturación en:

**Ácidos grasos saturados.** contienen enlaces carbono-carbono simples.

**Ácidos grasos insaturados.** Contiene uno o más enlaces dobles carbono-carbono, al presentar un solo enlace se le llama "monoinsaturado" y al presentar varios se le llama "polinsaturado".

**Ácidos grasos libres.** Son ácidos grasos no esterificados presentes en una grasa.

**Fosfátidos.** Son polialcoholes combinados con ácidos grasos, ácido fosfórico y un compuesto nitrogenado.

**Esteroles.** Son denominados alcoholes esteroideos, constituyen una familia de sustancias que contiene un núcleo común esteroideo y un alcohol, se denominan colectivamente "fitoesteroles".

**Tocoferoles o vitamina E.** Son componentes minoritarios importantes de la mayoría de las grasas de origen vegetal. Su utilidad radica en ser agentes anti-oxidantes que retardan el enranciamiento.

**Caretonoides y clorofilas.** Son sustancias coloreadas presentes naturalmente en grasas y aceites, su color varía de amarillo al rojo intenso. La clorofila es un pigmento verde de las plantas que desempeña un papel esencial en el proceso fotosintético.<sup>(8,12,22)</sup>

### 3.5.1 Importancia de las grasas y aceites.

Las grasas o aceites son compuestos orgánicos carentes de nitrógeno, que se forman en el metabolismo vegetal y animal y que poseen desde un punto de vista fisiológico un elevado valor calorífico. Son los nutrimentos con mayor poder energético (1g de grasa produce 9.3 Kcal o 38,9 KJ)<sup>(7,8)</sup>

Las grasas realizan varias funciones de importancia en el organismo, entre las que citamos las siguientes:

- Función energética. Produce 9 Kcal. por cada gramo, cantidad superior a la de hidratos de carbono (4 Kcal) y proteína (4 Kcal)
- Son vehículo para importantes vitaminas liposolubles (solubles en las grasas, tales como la A (antixerofálmica), D, K y E.
- Favorecen la absorción de calcio.

### 3.5.2 Ácidos grasos indispensables.

Para el crecimiento y el funcionamiento normal de todos los tejidos son indispensables los ácidos linoleico y linolénico, contienen enlaces dobles situados, respectivamente, a la distancia de seis átomos de carbono y tres átomos de carbono del grupo metilo. Los

animales, inclusive el hombre, no son capaces de introducir enlaces dobles originales y el grupo carboxílico; al mismo tiempo, la longitud de la cadena carbónica aumenta hacia el extremo carboxílico cuando se introducen más dobles enlaces. Este proceso metabólico produce derivados de cadena larga, de 20 ó 22 átomos de carbono, con 3, 4, 5 y 6 enlaces dobles. El resultado son dos familias de ácidos grasos indispensables requeridos para la formación de estructuras celulares y para la síntesis de prostaglandina. Los ácidos grasos con cadenas de 20 ó 22 átomos de carbono y dobles enlaces en 3, 4, 5 y 6 derivados de los ácidos linoleico y linolénico, se denominan ácidos grasos indispensables de cadena larga. (10,22)

En el cuadro 2 se muestran los ácidos grasos más comunes en semillas vegetales y su porcentaje de ácidos grasos que normalmente se encuentran:

**CUADRO 2**  
**Ácidos grasos más comunes en semillas vegetales. (10)**

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

En el cuadro 2 se observa la variedad de ácidos grasos en semillas, en donde el porcentaje varía considerablemente llegando a determinar que los ácidos grasos predominantes son el Palmitico, Oleico y Linoleico. El ácido oleico es el más ampliamente distribuido, y se encuentra en cantidades elevadas en las grasas animales y en los aceites de semillas (cuadro 2), siendo el ácido graso mayoritario de los triglicéridos del aceite de oliva. (11)

### 3.5.3 Aspectos nutrimentales de los aceites y grasas.

Por mucho tiempo, los aceites y las grasas han sido el tema central de los más diversos estudios y recomendaciones, en donde se señalan sus cualidades o bien se hace énfasis en sus efectos negativos; sin embargo, la tendencia actual es reconocer que estos ingredientes son indispensables en la nutrición, ya que son las principales fuentes de energía. Los aceites y las grasas son un componente principal y esencial en la dieta humana. En

situaciones de deficiencia calórica, las grasas y los hidratos de carbono evitan la movilización proteínica y mejoran la tasa de crecimiento. Algunos alimentos ricos en grasas son fuente de vitaminas liposolubles, y la ingestión de grasas mejoran la absorción de estas vitaminas independientemente de su origen. <sup>(8)</sup>

### **3.5.4 Factores físicos y químicos usados en la caracterización de grasa y aceites.**

#### **Densidad**

En términos absolutos, la densidad es definida como el peso de una sustancia por unidad de volumen; en los líquidos es expresada como  $g / cm^3$ . La densidad depende de la Temperatura y de la Presión, la Temperatura debe especificarse junto con la densidad y la Presión no es necesaria en los líquidos porque son incomprensibles, en grasas y aceites se emplea la densidad relativa, la cual es fácil de medir ya que se obtiene dividiendo el peso del aceite a investigar contenido en un picnómetro por el de la sustancia de referencia (generalmente agua). La densidad de los aceites se encuentra relacionada con su grado de instauración. <sup>(8,9)</sup>

#### **Índice de refracción**

Es una constante física para medir el fenómeno mediante el cual, cuando un rayo de luz monocromática pasa de una sustancia transparente a otra de diferente densidad, éste se desvía o refracta, excepto cuando penetra perpendicularmente a la superficie que separa ambas sustancias. En grasas y aceites son usados con frecuencia para dar idea sobre la identidad y pureza de las muestras, así como para seguir el curso de algunas reacciones. La relación entre el índice de refracción y la estructura y composición de los ácidos grasos y acilgliceroles puede resumirse en los siguientes puntos:

- ✓ El índice de grasas y ácidos grasos aumenta al crecer la cadena hidrocarbonada.
- ✓ El índice de refracción de grasas y ácidos grasos aumenta con el número de dobles enlaces en la molécula y al aumentar el grado de conjugación entre éstos.
- ✓ El índice de refracción de los acilgliceroles simples es más alto que el del ácido graso correspondiente.
- ✓ El índice de refracción de los monoacilgliceroles es considerablemente más alto que el de los correspondientes triglicéridos simples. <sup>(8,9,11)</sup>

### **Punto de fusión**

El punto de fusión es una propiedad física útil ya que da idea sobre la identidad del compuesto. Los puntos de fusión de los ácidos grasos son directamente proporcionales a la longitud de la cadena hidrocarbonada y disminuye al aumentar el grado de insaturación de los ácidos grasos.<sup>(8,9)</sup>

### **Índice de yodo**

Se define como la cantidad de yodo (en gramos) absorbidos por 100 gramos de grasa o aceite bajo condiciones estándar. El índice de yodo representa el grado de insaturación real sólo cuando los dobles enlaces no se hallan conjugados y la estructura de los ácidos grasos no impida la entrada del halógeno. En el cuadro 3 se indican los niveles de índices de yodo para diversos grupos de aceites y grasas, en donde algunos, tienen la propiedad de formar una película fuerte y sólida cuando se desecan al aire, estos se llaman aceites secantes utilizándose en la elaboración de pinturas y barnices; contienen un gran número de ácidos grasos no saturados, los no secantes no secan y no forman películas duras y las del tercer grupo de semisecantes que forman películas con gran lentitud.<sup>(8,9)</sup>

**CUADRO 3.**

**Clasificación de aceites de acuerdo al índice de yodo.<sup>(9)</sup>**

| Grupos                | Ejemplos                              | Índice de yodo |
|-----------------------|---------------------------------------|----------------|
| Ceras.                |                                       | Muy bajo       |
| Grasas animales.      | Mantequilla, manteca de cerdo.        | 30-70          |
| Aceites no secantes.  | Aceite de oliva y almendra.           | <90            |
| Aceites semisecantes. | Aceites de semilla de algodón y soya. | 90-130         |
| Aceites secantes.     | Aceites de linaza y girasol.          | 130-200        |

### **Índice de saponificación**

El índice de saponificación se define como el número de miligramos de hidróxido de potasio necesarios para neutralizar los ácidos grasos resultantes de hidrolizar 1 gramo de muestra. Los ésteres de los ácidos grasos de masa molecular baja requieren mayor cantidad de álcali para la saponificación. De tal modo, el índice de saponificación es inversamente proporcional al promedio de las masas moleculares de los ácidos grasos de los acilgliceroles presentes. Sin embargo, el índice de saponificación no es tan útil para la identificación como el índice de yodo debido a que muchos aceites tienen índices de saponificación semejantes. Sin embargo, es muy usado para detectar la posible adulteración de una grasa en particular con aceite de coco, aceite de nuez de coco y grasa de

mantequilla, los cuales contienen una elevada proporción de ácidos grasos de bajo peso molecular. Además, la presencia de hidrocarburos parafínicos se pueden detectar por la aparición de turbidez al añadir agua a la solución etanólica del aceite o grasa saponificados.<sup>(8,11)</sup>

#### **Índice de acidez**

El índice de acidez se define como el número de miligramos de hidróxido de potasio requeridos para neutralizar los ácidos grasos libres de 1 gramo de muestra. El resultado también puede expresarse en términos de porcentaje de ácidos grasos libres, asumiendo que los ácidos grasos presentes tienen un peso molecular equivalente al del ácido oleico.<sup>(8,9)</sup>

El índice de acidez es usado comúnmente como el indicador del grado al cual se han descompuesto los acilglicérols del aceite por acción de las lipasas o por alguna otra causa, tales como el calor y la luz. Así mismo, como la rancidez es acompañada usualmente de una presencia relativamente alta de ácidos grasos libres, la determinación es usada como una indicación general de la condición y estabilidad de los aceites.<sup>(8,9,11)</sup>

#### **3.5.5 Refinación de aceites**

El proceso de refinación de una grasa se realiza para eliminar el contenido de ácidos grasos libres, proteínas, pigmentos y otras impurezas como fosfátidos y sustancias mucilaginosas. Es importante la reducción de los ácidos grasos libres ya que son los causantes de la rancidez. Los fosfátidos y las sustancias mucilaginosas son solubles en el aceite sólo en forma de anhídros y por medio de su hidratación y precipitación se separan fácilmente.<sup>(12,13)</sup>

El aceite crudo contiene una gran cantidad de impurezas por lo que es importante su refinación, los pasos son:

##### **Desgomado**

Este proceso consiste en la extracción acuosa de diversos compuestos hidrosolubles, tales como fosfátidos, el cual es posible separar ya que establece una fase inmiscible con el aceite; además de esta sustancia, también se extrae el agua que originalmente contiene la materia prima; el desgomado es indispensable ya que los fosfátidos aun en concentraciones bajas se hidratan y precipitan, provocando serios problemas en el almacenamiento, mayor susceptibilidad a la oxidación y formación de espumas durante el calentamiento.<sup>(13)</sup>

### **Neutralización**

El método se basa en una reacción de saponificación y se efectúa básicamente para eliminar los ácidos grasos libres que contengan los aceites, pero también se reduce los monoacilglicéridos y los fosfátidos que quedaron después del desgomado, es recomendable trabajar con aceite de semilla recién molidas, ya que al dejar pasar el tiempo, se incrementa considerablemente la cantidad de ácidos grasos libres, ya que las lipasas actúan más fácilmente sobre los triacilglicéridos y libera los ácidos correspondientes.<sup>(13)</sup>

### **Extracción de ceras.**

Este proceso es una forma muy especializada de cristalización fraccionada en donde se separa componentes no deseados de una grasa cruda, para esto se enfría la grasa con suficiente lentitud para que las ceras que tienen altos punto de fusión cristalicen de una forma selectiva, esto es sin formación de cristales mixtos, los cristales se separan por filtración o decantación. La presencia de la cera en el proceso de refinación origina efectos indeseables (apariencia turbia y consistencia chiclosa) y al encontrarse en una alta proporción, es imposible continuar con el proceso de refinación, a diferencia de los acilglicéridos de las grasas y aceites, las ceras son ésteres formados por una molécula de un alcohol monohidroxilado de cadena larga y una de ácido graso.<sup>(13)</sup>

### **Blanqueado.**

Este tratamiento se utiliza para eliminar las sustancias que le imparten color al aceite. El método más común se basa en un proceso de adsorción que utiliza diversos agentes adsorbentes, principalmente arcillas neutras o carbón activado. Las neutras son derivadas de la bentonita  $Al_2Si_4O_{10}(OH)_4 \cdot n(H_2O)$ ; pero el carbón activado es el más efectivo, aunque tiene el inconveniente de que es muy caro y de que retiene gran cantidad de aceite, por esta razón, para lograr mejores resultados en la decoloración, a veces se mezclan arcillas neutras con 5-10% de carbón activado, el poder decolorante de estos materiales depende de muchos factores, pero sobre todo de la forma microcristalina que presenten y de las impurezas que contengan. Las tierras tratadas con ácidos se deben lavar bien pues de otra manera llegan a conferir cierta acidez al aceite.<sup>(13)</sup>

### **3.5.6 Perfil de ácidos grasos**

El perfil de ácidos grasos se realiza para obtener información detallada acerca de su naturaleza, carácter, tratamiento y composición de una muestra, para efectuar este procedimiento se emplea la cromatografía de gases la cual se ha impuesto actualmente,

como método de separación en el campo analítico, por ser simple en su fundamento y desarrollo, por la sencillez de su manejo, por la rapidez con que se efectúan las separaciones y por que, en la mayor parte de los casos, la separación y la precisión alcanzables son altamente satisfactorias. En la cromatografía de gases, en la fase móvil se encuentra una mezcla a resolver, y se utiliza un gas no retenible o inerte adicional que puede ser Helio o hidrógeno, conocido como gas acarreador o fase móvil, que sirve para llevar la mezcla a la columna cromatográfica en donde se efectúa la separación, el propósito del detector es reconocer el paso de las sustancias que son eluidas por el gas acarreador conforme salen de la columna, la señal que se produce en el detector es procesada mediante un microprocesador que genera un gráfico de separación de las sustancias, la identificación de los compuestos de interés se realiza comparando los tiempos de retención de estándares comerciales y la muestra problema, para poder realizar un análisis cualitativo – cuantitativo, es necesario que a la muestra se le añada una sustancia de referencia no contenida previamente en ella, dicha sustancia se le llama estándar interno y deberá tener un tiempo de retención similar al de los componentes de interés.<sup>(14,15)</sup>

### 3.6 EXTRACCIÓN DE LIMONOIDES

De los estudios que se han realizado a la familia de las Meliáceas, se reporta que son ricas en diversos complejos llamados limonoides, estos son compuestos terpénicos de alto peso molecular en donde su utilidad principal es como insecticidas, entre las características que tienen es su especificidad con insectos y se ha visto que su efectividad es al 100% en larvas y 90% en insectos maduros, un ejemplo claro es la *Trichilia havanensis* la cual se encuentra distribuida en México, su nombre común es tinajillo, es utilizado en la sierra de Puebla para protección de sembradíos de maíz su empleo consiste en realizar una pasta con semilla madura la cual es colocada en la tierra alrededor del tallo, esto impide que gusanos e insectos dañen al cultivo.<sup>(45,50)</sup>

Por los motivos antes expuestos, la búsqueda de nuevos agentes insecticidas de origen vegetal con una toxicidad potencial menor se encuentra ampliamente justificada, en este contexto las plantas y semillas producen un rango muy diverso de metabolitos secundarios tales como terpenoides, alcaloides, flavonoides y cumarinas que están involucrados en los mecanismos de protección de las plantas al ataque de insectos y otras plagas, es importante mencionar que numerosos productos naturales con propiedades insecticidas son inocuos

para el hombre y otros vertebrados, sobre todo en comparación con los efectos neurotóxicos de los insecticidas sintéticos convencionales.<sup>(3)</sup>

Los insecticidas extraídos de limonoides se han convertido en una promesa para su utilización debido a que son biodegradables, pero su aislamiento es muy caro, se toma en consideración la variedad de Meliácea con la que se trabaja ya que debido a las complejas estructuras que poseen se encuentra de 6 a 8 tipos diferentes de limonoides y no todos tienen un empleo como insecticidas, de los limonoides extraídos de la variedad de *Trichilia hirta* no han sido investigados con respecto a su nivel de toxicidad argumentando que al ser insecticidas de origen natural son inocuos para el hombre y otros vertebrados, sin embargo la Meliácea *Azadirachata indica* especie obtenida de África, la cual se ha empezado a utilizar como insecticida y se ha encontrado que su dosis diaria admisible es de 5000 mg / Kg de p.c., esto indica que es necesario iniciar una investigación para la variedad de *Trichilia hirta*.<sup>(51,52)</sup>

Para obtener limonoides de alta pureza, se aplican diversos pasos que resultan laboriosos, como la *Trichilia dregeana*, ya que para obtener sus respectivos compuestos terpénicos es necesario eliminar la cascarilla y solo trabajar con los cotiledones.<sup>(48)</sup>

De la *Trichilia hirta* se han encontrado diversos tipos de limonoides, los más estudiados hasta este momento son: Melaniona, Hirtina, Melanodiol y Bourjotinolona-A. Existen mecanismos que no se han logrado explicar y son los de limonoides aislados de semillas inmaduras que revelan una disminución en el grado de oxidación del esqueleto del tetranotriterpenoide el cual es considerado precursor de los limonoides, en cambio en semillas maduras la oxidación es alta y como consecuencia la cantidad final de limonoides es mínima.<sup>(43,44,47)</sup>

Entre las numerosas técnicas que existen dos son ampliamente utilizadas una de ellas es: la cristalización en la cual utiliza un líquido madre, y dependerá del tipo de limonoide que se desee extraer, el segundo es más común y se divide en dos etapas una es en arrastrar diversos tipos de limonoides con hexano y separarlos con una mezcla de metanol-agua, la segunda etapa consiste en separar por Cromatografía en Fase Líquida y verificar su estructura por espectroscopia de Resonancia Magnética esta técnica fue la empleada en este estudio y se utilizó la primera etapa ya que nuestro interés reside en su extracción ya que interfiere con el valor del índice de acidez de la muestra en estudio, la desventaja radica en que solo extrae del 75 a 80% de limonoides.<sup>(43,44,46,49,52)</sup>

### 3.7 FACTORES TÓXICOS Y ANTINUTRICIONALES.

El medio ambiente ha dotado a las plantas con una capacidad genética de sintetizar sustancias tóxicas y que aseguran su supervivencia contra los depredadores tales como son los insectos, los hongos. o los animales incluyendo al hombre. Por su modo de acción, las sustancias nocivas de los alimentos pueden clasificarse en dos grandes grupos:

- ❖ Las sustancias antinutritivas: el efecto tóxico de las cuales se basa en disminuir la disponibilidad o provocar una pérdida suplementaria de los nutrimentos esenciales. Estas sustancias provocan un desequilibrio, que a la larga determinan la aparición de síntomas particulares que se compensa por un aporte suplementario de los nutrimentos implicados, en un inicio del trastorno.
- ❖ Los tóxicos de los alimentos de efectos indeseables no puede compensarse por aporte suplementario de nutrientes. Son compuestos que tienen un efecto tóxico directo sobre el organismo. Su modo de acción puede explicarse, sea por su particular reactividad, por un mimetismo molecular de las hormonas, aminoácidos o en ciertos casos por la existencia de una información genética que favorezca la aparición de una determinada patología.<sup>(16)</sup>

Por lo tanto, algunas semillas como Cacahuanano (*Gliricida sepium*) y colorín (*Erytrina americana*) no son usadas en forma directa como alimento humano porque contienen factores tóxicos y antinutricionales intrínsecos los cuales interfieren con los procesos digestivos, inhibición de crecimiento, hipoglucemia o daños a tejidos tales como páncreas o hígado. Especialmente se considera que un alimento en condiciones normales es aquel que al ser ingerido repercute en un beneficio, en cambio un agente tóxico causará un efecto adverso al organismo.<sup>(31)</sup>

#### **Inhibidores de proteasas.**

Los inhibidores de tripsina son también proteínas que tiene la capacidad de inhibir la actividad proteolítica de ciertas enzimas. Los inhibidores de tripsina son probablemente los mas distribuidos en el reino vegetal y particularmente en las leguminosas, actúan inhibiendo a la tripsina la cual es una enzima proteolítica de suma importancia en la digestión de animales monogástricos, estos inhibidores son considerados factores antitripsínicos ya que han sido aislados de una gran variedad de fuentes naturales vegetales. Los inhibidores de proteasas son proteínas termolábiles que se encuentran en granos y semillas, cuyo consumo reduce la digestibilidad y el aprovechamiento de proteínas que

participan en el proceso digestivo. Los inhibidores más conocidos son los de Kunitz y Bowman-Birk de la soya: el primero es una proteína celular, no helicoidal, con 197 aminoácidos de un peso molecular de 21, 500 con dos enlaces disulfuro, los cuales uno de ellos son fundamentales para su actividad; el segundo consta de 72 aminoácidos, con un peso molecular de 7,975, éste contiene 8 enlaces de disulfuro, que se asocia reversiblemente y forma una mezcla de monómero-dímero siendo más estable al calor, a los ácidos y a la pepsina que el primero, ambos inhiben el crecimiento, reducen la absorción de lípidos, la digestibilidad de proteínas, causan hipertrofia pancreática, aumento de la secreción de bilis y jugo pancreático. <sup>(17,18)</sup>

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

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

La mayoría de los inhibidores de proteasas son destruidos mediante un tratamiento térmico adecuado. <sup>(18)</sup>

### **Fitoheماغlutininas o lectinas.**

En muchas semillas principalmente de leguminosas existen sustancias de origen proteínico, llamadas fitoheماغlutininas o lectinas por la capacidad de aglutinar a los glóbulos rojos humanos y de otras especies animales debido a su especificidad para glucoproteínas de los sitios receptores en la superficie celular. La primera descripción de una lectina fue presentada por Stillmark que en 1889 estudió la semilla de ricino y atribuyó su toxicidad a una proteína que llamó ricina. Landstiner en 1908 encontró en las leguminosas el grupo de lectinas más importante, desde el punto de vista nutricional, observaron que los extractos producían aglutinación pero en otros no se detectaba acción tóxica. Posteriormente, Summer aisló de una leguminosa una globulina que llamó concavanina A, la cual tiene actividad aglutinante. La heماغlutinina de soya fue aislada por Liener en 1953 y Jaffé en 1960 encontró que la causa del efecto tóxico de las lectinas ingeridas se relaciona con su acción sobre la absorción intestinal. De los resultados obtenidos la lectina interacciona con grupos receptores situados en la superficie de las células que conforman la mucosa gástrica,

de una manera semejante como se combinan con los glóbulos rojos, interfiriendo en la absorción de nutrimentos y se ha observado que en estudios con animales en experimentación que consumen una dieta preparada con semillas de leguminosas con elevado contenido de lectinas presentan diarreas, daño hepático, absorción reducida de aminoácidos, hipoglucemia, pérdida de peso y en algunos casos la muerte. Las fitohemaglutininas como la mayoría de las proteínas, son termolábiles y generalmente su efecto tóxico se puede eliminar o disminuir notablemente por medio de un tratamiento térmico adecuado, presentándose así un incremento en cuanto al valor nutritivo de las leguminosas. (19, 30)

### **Alcaloides**

Los alcaloides son una clase heterogénea de productos naturales de las plantas. La palabra alcaloide es derivada del término "álcali", usado originalmente para describir un grupo de bases de origen botánico, lo cual nos indica que estas sustancias se comportan como álcali químico. Los alcaloides contienen nitrógeno en su molécula, frecuentemente en un anillo heterocíclico y son de naturaleza básica, generalmente se encuentran como sales de ácidos orgánicos y la mayoría poseen importantes propiedades farmacológicas, la mayoría contienen oxígeno y son sólidos cristalinos y todos son ópticamente activos, en general son insolubles en agua como base y solubles en disolventes orgánicos; sus sales son solubles en agua; en estas propiedades se basan los procedimientos que se siguen para su extracción de plantas, así como para su purificación. Algunos compuestos como la colchicina y ricinona han sido considerados excepciones de los alcaloides ya que no son básicos y en el caso de la efedrina, muscarina y mecalina porque no contiene nitrógeno en el anillo heterocíclico. Los alcaloides con anillos heterocíclicos son llamados Alcaloides verdaderos y son clasificados de acuerdo al sistema anular presente en la molécula. Además poseen las siguientes características:

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

Y aquellos que no tienen anillos heterocíclicos son conocidos como protoalcaloides y son aminas. Los protoalcaloides y los alcaloides verdaderos son generalmente derivados directamente de aminoácidos.<sup>(20, 21, 23)</sup>

Las monocotiledoneas son generalmente pobres en alcaloides a excepción de las Liliiflorae y Graminae. Los alcaloides tienden a acumularse en cuatro tipos de tejidos: tejido activamente creciendo, células epidérmicas e hipodérmicas, cubiertas vasculares y en vasos. Los alcaloides y sus preparados constituyen una importante proporción de las sustancias empleadas frecuentemente en la moderna terapéutica, como medicamentos se caracterizan por su gran potencia; una ligera disminución en la proporción de alcaloides en un preparado puede causar una importante reducción en su acción fisiológica y por otra parte, un ligero exceso puede ocasionar efectos tóxicos.<sup>(20, 21)</sup>

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

- ◆ Edad de la planta en el momento de la recolección.
- ◆ Estación del año en que se efectúa la colecta, clima y suelo en que se desarrolla la planta.
- ◆ Tipo de variedad de la misma especie.<sup>(20)</sup>

### Glucósidos cianogénicos.

Aparecen en algunos vegetales que al ser macerados o dañados pueden liberar cianuro por acción enzimática de las  $\beta$ -glucosidasa, y el ión cianuro a nivel de la citocromo-oxidada, es inhibidor de la cadena respiratoria. Algunas variedades de judías y guisantes contiene pequeñas cantidades de HCN (2mg /100g), en el sorgo el contenido es de 240mg /100g, la amigdalina fue el primer glucósido cianogénico identificado en las almendras amargas, presentándose también en otras clases de semillas, la durrina se encuentra en el sorgo y algunos pastos, en la linaza podemos encontrar lotastralina y linamarina, esta última se presenta en diferentes variedades de leguminosas. Otros alimentos que contiene glucósidos cianogénicos son: el frijol de lima, el lupino, la casava y la tapioca.<sup>(23, 24, 28, 29)</sup>

Los glucósidos cianogénicos no son tóxicos por sí mismos, sino lo son por el ácido cianhídrico liberado por vía enzimática, llegándose a presentar autólisis de estos compuestos, solo cuando hay un daño físico en la planta y depende de la presencia de la enzima específica  $\beta$ -glucosidasa y agua. Las enzimas se encuentran extracelulares y actúan solamente después de la ruptura de los tejidos de la semilla. La dosis letal media de ácido

cianhídrico para un individuo cuando es ingerida por vía oral se ha estimado entre 0,5-3.5 mg / Kg. de peso corporal, con esta dosis se presenta síntomas de adormecimiento periférico con ligeros mareos, seguidos por confusión mental, cianosis, temblores, convulsiones, coma y finalmente la muerte. El ácido cianhídrico es un potente inhibidor del sistema respiratorio celular, ya que su sitio de acción es sobre el citocromo oxidasa, la cual es un catalizador respiratorio terminal de los organismos aerobios. En caso de dosis subletales se puede presentar dolor de cabeza, sensación de opresión en la garganta, palpitaciones y debilidad muscular, en estos casos el organismo es capaz de llevar a cabo un proceso de destoxificación, ya que existe una sulfotransferasa (rodonasa) que cataliza la reacción del ácido cianhídrico con el tiosulfato formando sulfito y tiocianato que es eliminado por orina.<sup>(23,24,25)</sup>

### Fitatos

Químicamente el ácido fítico es hexafosfato de inositol, representan una clase de complejos que influyen sobre las propiedades nutrimentales de los alimentos, los fitatos pueden ser encontrados en una gran variedad de alimentos como los granos de cereales y leguminosas, localizándose con frecuencia en el pericarpio donde se encuentra en cantidades que oscilan de 0,2-0,5 %, este contenido varía de las condiciones de cultivo, especie y variedad con la que se trabaja.<sup>(16)</sup>

Puede ser desfosforilado en cierto grado hasta inositol en el lumen intestinal por la enzima fitasa, además se encuentra en abundancia en el trigo en el centeno y la cebada, la fitasa del centeno es más activa y es destruida por el calor, además el ácido fítico y sus sales, son componentes comunes de los tejidos vegetales relacionados con productos alimenticios.<sup>(26)</sup> Seis grupos reactivos de fosfato presentes en la molécula del ácido fítico hacen de este compuesto un agente fuertemente quelante, en el que 8 de los 12 protones disociables del fitato están disponibles para atrapar metales como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$  que se unen a minerales tales como el  $\text{Ca}^{2+}$ , bajo condiciones de pH en el interior del conducto gastrointestinal en la parte superior del intestino delgado, en donde el ácido fítico es dos veces desmineralizable; ya que en primer caso proporciona fósforo inutilizable; y una segunda cuando acompleja elementos indispensables de el organismo y provoca finalmente osteoporosis y/o raquitismo en animales monogástricos y seres humanos.<sup>(27,28)</sup>

## Saponinas

Las saponinas son glucósidos anfílicos, los cuales son resultado de la reacción de azúcares (pentosas, hexosas o ácidos urónicos) con un grupo no polar llamado aglicona o sapogenina, al final se obtiene la saponina el cual puede ser ya sea un esteroide ó triterpeno, aunque la mayoría de las saponinas que han sido identificadas son triterpenoides. (Figura 1)



Figura 1. Formación genérica de una saponina triterpenoide o esteroideal.

Las saponinas son sustancias en su mayor parte amorfas, de sabor amargo, en general son inodoras, de difícil cristalización; sus soluciones coloidales al producir espuma, reducen fuertemente la tensión superficial por lo que pueden estabilizar las emulsiones de grasas y aceites, tienen propiedades estomacatorias, irritan los ojos y la piel cuando se frotran, son termorresistentes, forman complejos con el colesterol y otros hidroxiesteroides. Son medianamente solubles en alcohol, al enfriarse las saponinas precipitan en disolventes orgánicos, son insolubles en ácido sulfúrico concentrado, las soluciones de saponinas esteroideales producen una coloración que varía del rojo al violeta, y se ha visto que algunas saponinas provenientes de alfalfa inhiben el crecimiento de ciertos microorganismos, y en la experimentación con animales monogástricos, se observaron diferentes respuestas dependiendo del contenido de saponinas de alfalfa administrada, en donde el resultado visible fue un decremento en el peso, en general el modo de acción de las saponinas sobre los animales monogástricos es poco conocido.<sup>(29,30,38)</sup>

En cuanto al contenido de saponinas para el hombre en ciertos productos alimenticios, no son tóxicas por ingestión oral. La dosis letal media (DL<sub>50</sub>), estudiada en perros, conejos y ratas va de 25 a 3000 mg /Kg. de peso corporal. Las saponinas crean lesiones gastrointestinales y si pasan a la corriente sanguínea pueden hemolizar las células de los glóbulos rojos, pueden producir fallas en la respiración, convulsiones y coma. Las saponinas producen hemólisis en diferentes tipos de glóbulos rojos; la hemólisis se define como la destrucción de los glóbulos rojos que produce la liberación de hemoglobina.

La toxicidad de las saponinas está a discusión ya que en algunos países tienen límites permitidos mientras que en otros se utilizan como aditivos para alimentos.<sup>(38)</sup>

## Taninos

Entre los compuestos polifenólicos que se encuentran en los alimentos, los taninos constituyen un grupo caracterizado por su facultad de combinarse con las proteínas. Esta reactividad particular en la que se basa el curtido de pieles, que presentan los taninos hidrolizables y los taninos condensados, define también su actividad biológica, que se manifiesta por su gusto astringente. La presencia de estos polifenoles en los alimentos determina una disminución del valor biológico de éstos, debido en gran parte, a una interferencia con la utilización digestiva de las proteínas, numerosos trabajos muestran el efecto de la acción antinutricional de los taninos presentes en los alimentos (cacao, plátanos, habas, sorgo), pero en la industria los taninos se utilizan como aditivos en la producción de vino, sidra y cerveza, contribuyendo al sabor y ayudando a la clarificación, su dosis diaria admisible es de 500 mg / kg p.c. / día.<sup>(29,54)</sup>

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

- ◆ Presencia en los alimentos del complejo tanino-proteína el cual es resistente al ataque de enzimas digestivas.
- ◆ Inhibición no específica de las enzimas digestivas por los taninos libres de los alimentos.
- ◆ Acción directa de los taninos sobre la mucosa digestiva que estimula las secreciones.

Es difícil evaluar la importancia relativa de estos mecanismos en el efecto final, que depende también del tipo de tanino presente en el alimento y de su estado, libre o asociado a proteínas, sin embargo se sabe que estos complejos, difícilmente hidrolizables por las enzimas proteolíticas, participan en la pérdida fecal de nitrógeno. La actividad antinutricional de los taninos puede manifestarse también por la aptitud que tienen estos polifenoles a asociarse a los iones di- y trivalentes. Se ha demostrado que la ingestión de té disminuye la disponibilidad de hierro del alimento, en cambio, la formación de complejos con el plomo y los metales pesados pueden tener una función protectora impidiendo su absorción. El ácido tánico, al combinarse con la vitamina B<sub>12</sub> y el factor intrínseco, disminuye la biodisponibilidad de esta vitamina, por otro lado, la vitamina B<sub>1</sub> puede ser destruida por los taninos del té al igual que las reservas hepáticas de vitamina A.<sup>(27,29)</sup>

## Nitratos

La presencia natural de nitratos en el medio ambiente es consecuencia del ciclo del nitrógeno, que consiste en el intercambio entre nitrógeno atmosférico y terrestre que tiene lugar por diferentes vías, el aire, el agua, el suelo, las plantas, los animales y el hombre, algunos alimentos como las espinacas, zanahoria, acelgas y remolacha, tiende a aumentar el contenido de nitratos cuando se realiza fertilización con nitrógeno. Se ha reportado que la metahemoglobinemia es el principal efecto tóxico de la ingesta de nitratos, está causada por nitritos, que son los productos de reducción de los nitratos, el proceso químico es el siguiente: los nitritos formados por reducción de los nitratos oxidan el hierro (II) de la hemoglobina a hierro (III), dando lugar a metahemoglobina que es incapaz de unirse al oxígeno, produciendo cianosis asintomática, acompañada de hipoxia, debilidad, disnea, taquicardia y pérdida de conocimiento, es por esto que este tipo de envenenamiento se le conoce como el síndrome del bebé azul, se han señalado casos de metahemoglobinemia en niños debidas a los nitratos presentes en vegetales, esto se debe a la menor acidez del estómago que permite el desarrollo de ciertos microorganismos que contienen enzimas que pueden reducir los nitratos a nitritos, los efectos tóxicos en adultos son poco comunes pero esto dependerá del consumo y condiciones del organismo. Los nitritos tienen otros efectos en adultos como la disminución de la eficiencia vitamínica de la ración alimentaria, especialmente interaccionando con la vitamina A y las vitaminas del grupo B, de los estudios realizados se ha concluido que los riesgos para la salud no sólo se deben a la concentración de nitratos en el agua y los alimentos, sino también a la presencia o ausencia de condiciones favorables a su reducción a nitritos.<sup>(32)</sup>

## IV. METODOLOGÍA

### 4.1 DIAGRAMA GENERAL DE LA INVESTIGACION.

En el siguiente diagrama de bloques se muestra el desarrollo que se siguió para realizar este estudio.

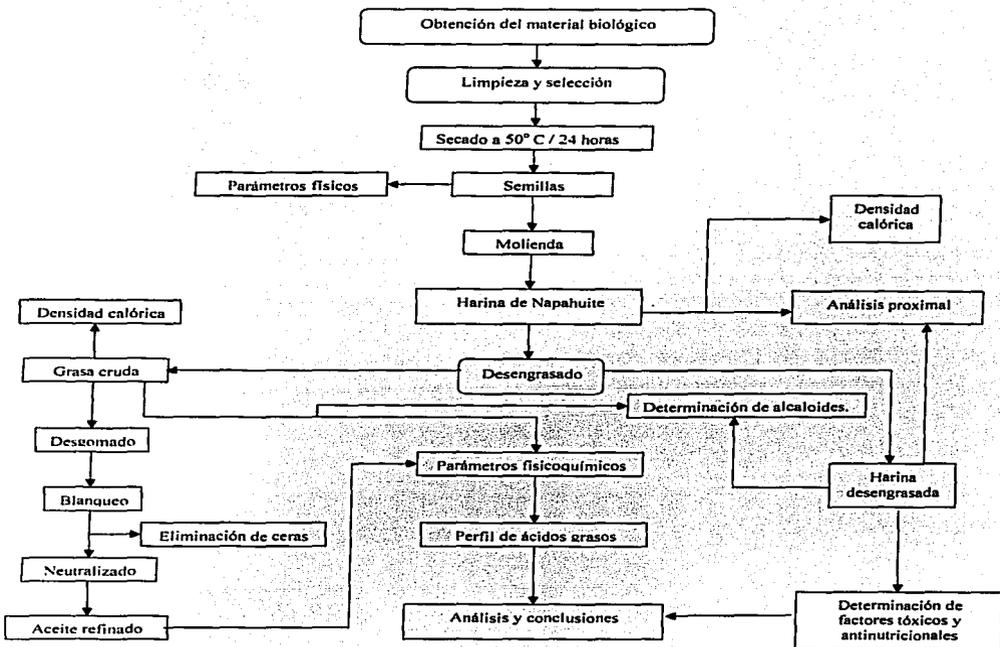


Figura 2. Diagrama general de trabajo para la semilla de napahuite, en donde se describe la secuencia de actividades.

A continuación se describe cada uno de los bloques del diagrama anterior.

## 4.2 OBTENCION DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

Se trabajo con semilla de Napahuite, la cual se adquirió en el mercado de Tapachula, Chiapas el peso del lote fue de 3 kg, y el precio del kilogramo fue de 35 pesos.

## 4.3 LIMPIEZA Y SELECCIÓN.

Se separo manualmente el material extraño (piedras semillas o granos extraños, material vegetativo) y las semillas dañadas física, química y biológicamente.

## 4.4 SECADO.

El material se extendió en charolas y se coloco en una estufa durante 24 horas a temperatura de 50 grados centigrados.

## 4.5 DETERMINACION DE PARÁMETROS FÍSICOS.

Con la finalidad de caracterizar la materia prima, se realizó la determinación de algunos parámetros físicos que permitirán en estudios posteriores identificar en forma rápida si se trata de la misma variedad.

### 4.5.1 PESO HECTOLITRICO

#### Fundamento:

Se cuantifica midiendo el peso de una muestra representativa del lote de semilla limpia que ocupa un volumen establecido, el valor se reporta en Kg / hl o g / 100 ml, en donde se sabe que existe equivalencia, ya que por términos prácticos, el resultado se expresa en g / 100 ml.

1 hectolitro = 100 litros = 100000 ml

1 Kg = 1000g

$$\frac{\text{Kg}}{\text{hl}} \times \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ Kg}} \times \frac{1 \text{ hl}}{100000 \text{ ml}} = \frac{\text{g}}{100 \text{ ml}}$$

#### Materiales y reactivos:

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

#### Procedimiento:

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

## 4.5.2 DETERMINACIÓN DE PESO Y TAMAÑO DE LA SEMILLA

### Materiales y reactivos:

- Balanza analítica Sartorius.
- Vernier.

### Procedimiento:

Se tomó una muestra representativa de 10 semillas y se pesó cada una por separado en la balanza analítica, a ésta misma se le midió el largo y el ancho usando el vernier. El procedimiento se repitió para otros dos lotes representativos de semillas.

El resultado se reportó como el promedio y su desviación estándar.

## 4.6 MOLIENDA

Con una muestra de semillas tomada al azar, se fraccionó en un molino Thomas-Wiley modelo 4 y se obtuvo la harina integral (tamaño de partícula de 1 mm de diámetro).

## 4.7 ANÁLISIS PROXIMAL.

### Fundamento:

El análisis proximal o sistema analítico Weende se desarrollo en Alemania hace más de 100 años, en la estación experimental que lleva su nombre. Este sistema se ha criticado mucho, pero hasta la fecha nadie ha desarrollado otro que sea tan práctico y aceptable.<sup>(34)</sup>

El análisis proximal se realizó de acuerdo a las técnicas descritas en el AOAC con pequeñas modificaciones:

- Humedad (H)
- Proteína cruda (P)
- Grasa cruda (G)
- Fibra cruda (F)
- Cenizas (C)
- Hidratos de carbono asimilables obtenidos teóricamente por diferencia:  
%Hidratos de carbono =  $100 - [\%H + \%P + \%G + \%F + \%C]$ .

#### 4.7.1 PROTEÍNA VERDADERA

##### Fundamento:

La técnica se basa en la solubilización del nitrógeno no proteínico y de la proteína soluble, y la posterior precipitación de dicha proteína con tungstato de sodio; con el fin de eliminar el nitrógeno no proteínico que puede contribuir en la determinación de nitrógeno por medio del método de Kjeldahl. Con este método la proteína no soluble también es tomada en cuenta, ya que en la etapa de filtración se incluye junto con la proteína soluble precipitada.<sup>(33,58)</sup>

##### Material y reactivos.

- > Digestor TECATOR mod. Ab 20/40.
- > Microdestilador TECATOR AUTO KJELTEC No 1030.
- > Agitador magnético THERMOLINE mod. Sp-13025.
- > Papel Whatman #50 o #542.
- > Tubos de digestión especiales TECATOR.
- > HCl 2N.
- >  $K_2SO_4$  (RA)
- > Solución de  $H_2O_2$  al 30%.
- > Solución precipitante (disolver 5 g de tungstato de sodio; 1.5 g de  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  en 20 ml de agua destilada; añadir 22 ml de HCl 2 N, mezclar y aforar a 50 ml con agua destilada).
- > Mezcla digestiva (mezclar por 30 minutos 3 g de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 300 ml de  $H_2SO_4$  concentrado y 100 ml de  $H_3PO_4$ ).
- > Solución de ácido bórico al 1% con indicadores.

##### Procedimiento.

Se peso de 50 a 100 mg de muestra finamente molida y desengrasada, y se agregaron 5 ml de agua caliente y se agito durante 15 minutos con agitación magnética, se añadió 2 ml de solución precipitante y se dejo reposar 10 minutos, se filtro con papel Whatman #50 o #542 usando 25 ml de agua caliente con ligera succión.

##### a) Proceso de digestión:

Se coloco el papel filtro con el precipitado en un tubo de digestión, más 0.5 g de  $K_2SO_4$ , 5ml de mezcla digestiva, y se coloco en el digestor a  $< 370^\circ C$  por 15 minutos. Después se retiro del digestor y se espero a que se enfriara para añadir 3 ml de  $H_2O_2$  al 30 % y se continuo calentando a  $370^\circ C$  hasta que la digestión se completo.

##### b) Destilación y titulación:

Después de la digestión se dejo enfriar los tubos para agregarles 25 ml de agua destilada, se coloco el tubo en el microdestilador para que la destilación y la titulación se efectuaran

automáticamente, se introdujo un blanco, donde se sustituyo la muestra por glucosa o sacarosa.

**c) Cálculos:**

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(\text{ml muestra} - \text{ml blanco}) \times N_c (\text{meq / ml}) \times 0.014 (\text{g N / meq N}) \times 100}{\text{g de M}}$$

$$\% \text{ Proteína Verdadera} = \% \text{ Nitrógeno} \times 6.25$$

## 4.8 DESENGRASADO.

### Fundamento.

Se basa en la extracción de grasa para obtener la fracción alta en contenido calórico y el motivo por el cual es importante aislar la grasa, es para que no interfiera y se permita aplicar la mayoría de las técnicas de la toxicología analítica.<sup>(8,9)</sup>

### Material y reactivos.

- > Molino Thomas- Wiley mod. 4
- > Hexano (Q.P.).
- > Dispositivo tipo Soxhlet.
- > Papel filtro.

La semilla íntegra fue fraccionada en un molino Thomas -Wiley modelo 4, usando una malla con aberturas de 3 mm de diámetro. La muestra se colocó en un cartucho elaborado de papel filtro y fue insertada en un dispositivo tipo Soxhlet para llevar a cabo la extracción de la grasa cruda de la semilla a una temperatura de 55 °C utilizando hexano (Q.P.) como disolvente, el procedimiento duro aproximadamente 14 horas.

Transcurrido el tiempo se espero a que se enfriara el dispositivo y se procedió a quitar el cartucho el cual contiene la muestra desengrasada, esta muestra se extendió en una charola para eliminar en su totalidad el disolvente y con el rotavapor se recupero el disolvente y a la grasa cruda obtenida se le insufló nitrógeno y se guardo en congelación.

## 4.9 TOXICOLOGÍA ANALÍTICA.

### Determinación de factores tóxicos y antinutricionales.

Se determinaron los factores tóxicos y antinutricionales que se presentan con mayor frecuencia en las semillas de leguminosas, en particular taninos, nitratos, lectinas, inhibidores de tripsina, saponinas y fitatos.

#### 4.9.1 TANINOS

##### Fundamento:

Adaptación del Método ISO 9648 de 1998 basado en la reducción del ión férrico debido a los polifenoles y la formación de un complejo colorido en condiciones alcalinas. Se realiza una extracción de los taninos presentes en la muestra con dimetilformamida y agitación, para después centrifugar y adicionar citrato férrico amoniacal y amoniaco a una alícuota de sobrenadante para desarrollar color y leer absorbancia de la solución obtenida a 525nm.<sup>(35)</sup>

##### Material y reactivos.

- ✓ Centrifuga CLAY-ADAMS, Dynac™.
- ✓ Tubos para centrifuga de 15ml.
- ✓ Agitador mecánico tipo Vortex LAB-LINE mod. 1192.
- ✓ Baño de temperatura controlada GRANT mod. LR-22493.
- ✓ Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER mod. 340.
- ✓ Solución estándar de ácido tánico (0.2g de ácido tánico en 100 ml de agua desionizada).
- ✓ Amoniac (0.8 g NH<sub>3</sub> / 100 ml)
- ✓ Dimetilformamida al 75 % v / v (DMF).
- ✓ Citrato férrico de amonio (preparar 24 horas antes de usarse 0.35 g de citrato férrico de amonio aforados en 100 ml de agua desionizada).

##### Procedimiento.

Se peso de 0.3 a 1 g de muestra finamente molida y desengrasada y en un vaso de precipitado se agrego 20 ml de DMF y se agito durante 1 hora.

Transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 ml, enjuagando con 3 ml de la solución de DMF y se llevo a la marca de aforo con este reactivo.

Se transfirió al tubo de centrifuga y se procedió a una centrifugación por 10 minutos a 2700 r.p.m. y luego se decanto el sobrenadante y se homogeneizo.

Cada lectura se realizo a 525 nm.

Se tomo tres alícuotas del extracto y se trabajo de la siguiente manera:

- a) A cada uno de los tres tubos rotulados, donde uno de ellos será el blanco se agrego 1 ml del extracto.
- b) Se adiciona 5 ml de agua desionizada y al blanco 6 ml, se agito con el vortex, enseguida agregar 1 ml de citrato férrico amoniacal y agitar nuevamente, por último se adiciona 1 ml de amoniaco con excepción del blanco.
- c) Se incuba durante 10 minutos a  $30 \pm 1$  °C y se realizo la lectura a 525 nm en el espectrofotómetro.

### Cálculos.

Para la realización de los cálculos se elaboro una curva estándar que tuvo una concentración de 80 a 560 µg de ácido tánico y se trabajo como indica el cuadro 4.

**CUADRO 4.**  
**Curva estándar para Taninos.**

| Tubo*         | µl estándar | µl DMF<br>75 % | µg de ácido<br>tánico | Agua<br>(ml) | Citrato férrico<br>amoniacal | Amoniaco<br>(ml) | Incubación<br>30± 1°C<br>10± 1min |
|---------------|-------------|----------------|-----------------------|--------------|------------------------------|------------------|-----------------------------------|
| 0<br>(Blanco) | 0           | 1000           | 0.0                   | 5            | 1                            | 1                |                                   |
| 1             | 40          | 960            | 80                    | 5            | 1                            | 1                |                                   |
| 2             | 80          | 920            | 160                   | 5            | 1                            | 1                |                                   |
| 3             | 160         | 840            | 320                   | 5            | 1                            | 1                |                                   |
| 4             | 240         | 760            | 480                   | 5            | 1                            | 1                |                                   |
| 5             | 280         | 720            | 560                   | 5            | 1                            | 1                |                                   |

\*Mezclar perfectamente el contenido de los tubos despues de cada adición de reactivo.

Mediante la ecuación de la línea recta obtenida con los datos de la curva estándar, se determino el contenido de taninos y se reporto como % de ácido tánico.

### 4.9.2 NITRATOS

#### Fundamento.

Método de Cataldo y colaboradores, donde se realiza una extracción de nitratos en tejidos vegetales, utilizando centrifugación y desarrollo de color en el sobrenadante (formación de un complejo) por nitración de ácido salicílico, que tiene su máximo de absorción a 410 nm en solución alcalina. La absorbancia del cromóforo es directamente proporcional a la cantidad de nitratos presente.<sup>(36)</sup>

#### Material y reactivos.

- Centrifuga CLAY-ADAMS mod. Dynac™
- Tubos de centrifuga con capacidad de 50 ml con tapas herméticas.
- Agitador mecánico tipo Vortex LAB-LINE mod. 1192.
- Baño regulador de temperatura GRANT mod. LR 22493.
- Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER mod.340.
- Papel Whatman # 542.
- Mortero con pistilo
- Solución patrón de nitrato (nitrato de potasio R.A.) de 10 mg / ml.
- Solución de ácido salicílico (R.A.) al 5 % m/v en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado.
- NaOH 2 M.
- Carbón activado R.A. (usar en muestras cuyo extracto esté muy pigmentado).

**Procedimiento.**

Se peso de 0.1 a 0.5 g de muestra finamente molida y desengrasada y se trituro en un mortero con 25 ml de agua destilada y 0.45 g aproximadamente de carbón activado, hasta obtener una papilla homogénea.

Se transfirió cuantitativamente a un tubo de centrifuga enjuagando con agua destilada para llegar a un volumen final de 30 ml y se centrifugo 1 hora a 2700-3000 r.p.m.

Se decanto el sobrenadante y se filtro con ayuda de vacío sobre papel Whatman # 542. La determinación se realizo por triplicado.

Se homogeneizo el extracto de la muestra y se trabajo de la siguiente forma:

- Se rotulo 4 tubos y a cada uno se le adiciono 100  $\mu$ l del extracto y 0.4 ml de solución de ácido salicílico, con excepción del blanco al cual se le agregaron 0.4 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Con ayuda de un vortex se mezclo por 15 segundos, después de cada adición.
- Se incubo 20 minutos a una temperatura de 30 °C.
- Transecruido el tiempo se espero 5 minutos para que se enfriaran y después se adiciono 9.5 ml de solución de NaOH y se incubo nuevamente a 30 °C durante 15 minutos.
- La lectura se efectúo a 410 nm en el espectrofotómetro.

**Cálculos.**

Se realizo una curva patrón con concentraciones de 6-60  $\mu$ g de nitrato, en un tubo de centrifuga se adiciono 3 ml de la solución patrón de nitrato de 10 mg /ml, y 0.45 g aproximadamente de carbón activado y 27 ml de agua destilada, se homogeneizo y centrifugo por 1 hora a 2700-3000 r.p.m, se decanto el sobrenadante y filtro con papel Whatman doble del # 542 con ayuda de vacío y homogeneizar. La lectura es a 410 nm.

La curva patrón y el filtrado se trabajo de acuerdo con el cuadro 5.

**CUADRO 5.**  
**Curva estándar para nitratos.**

| Tubo*         | Solución patrón de nitrato 1 mg / ml ( $\mu$ l) | Agua ( $\mu$ l) | Solución de ácido salicílico (ml) |                                 | Solución de NaOH (ml) |                                  |
|---------------|---|-----------------|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| 1<br>(Blanco) | 0   | 100             | 0.4                               | Incubación<br>30°C<br>20± 1min. | 9.5                   | Incubación<br>30°C<br>15± 1 min. |
| 2             | 6   | 94              | 0.4                               |                                 | 9.5                   |                                  |
| 3             | 10  | 90              | 0.4                               |                                 | 9.5                   |                                  |
| 4             | 30  | 70              | 0.4                               |                                 | 9.5                   |                                  |
| 5             | 40  | 60              | 0.4                               |                                 | 9.5                   |                                  |
| 6             | 60  | 40              | 0.4                               |                                 | 9.5                   |                                  |

\* Mezclar perfectamente por 15 segundos el contenido de los tubos despues de cada adición.

Mediante la ecuación de la línea recta obtenida con los datos de la curva patrón, determinar el contenido de nitratos y reportar como % de nitratos.

#### 4.9.3 ÁCIDO FÍTICO

##### Fundamento.

La metodología empleada es la propuesta por Haug y Lantzsh, la cual se basa en la determinación colorimétrica indirecta del fósforo del fitato presente en la muestra. El extracto de la muestra es calentado con una solución acidificada de concentración conocida de Fe (III) en exceso, el cual forma un complejo con el fitato. Se cuantifica el Fe (III) residual que el ácido fítico no alcanza a acomplejar mediante una reacción colorida con la 2,2-bipiridina, fácilmente medible espectrofotométricamente.<sup>(26)</sup>

##### Material y reactivos.

- Parrilla de calentamiento y agitación múltiple THERMOLYNE mod. Sp-13025.
- Centrifuga CLAY-ADAMS, Dynac™.
- Tubos para centrifuga con tapón.
- Vortex LAB-LINE mod. 1192
- Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER mod 340
- HCl 0.2 N.
- Sulfato férrico de amonio • 12 H<sub>2</sub>O.
- Ácido tioglicólico.
- Fitato de sodio
- Solución férrica (pesar 0.2 g de sulfato férrico de amonio • 12H<sub>2</sub>O, disolver en 100 ml de HCl 0.2 N y aforar a 1 L con agua desionizada).
- Solución de 2,2-bipiridina (pesar 1g de 2,2-bipiridina, medir 1ml de ácido tioglicólico y aforar a 100 ml con agua desionizada)
- Solución estándar de fitatos 1.5 mg / ml (pesar 0.1714 g de fitato de sodio (pureza de 94 % y humedad 8.3 %) aforar a 100 ml con agua desionizada).

##### Procedimiento.

- Se pesan de 40 a 120 mg. de muestra finamente molida y desengrasada, y se le adicionan 20 ml de HCl 0.2 N. para someter a una agitación mecánica a temperatura ambiente durante 20 minutos.
- Una vez transcurrido el tiempo, el extracto se centrifuga a 1200 r.p.m. durante 15 minutos a temperatura ambiente y se colecta el sobrenadante.
- Obtenido el extracto de la muestra, se toma una alícuota de 1 ml que se coloca en un tubo de ensayo, se adiciona 1 ml de solución férrica y se tapa con una canica.

- A partir de este paso para la corrida del blanco y de los estándares, se toma 1 ml de agua (para el blanco), o de c/u de los estándares (3-30  $\mu\text{g P / ml}$ ) y se sigue con el análisis desde el punto anterior.
- Los tubos se colocan en un baño de agua a ebullición por 30 minutos cuidando que el agua cubra totalmente el nivel del líquido.
- Transcurridos los 30 minutos hay que esperar que los tubos se enfríen. Una vez que han alcanzado la temperatura ambiente, se les agregan 2 ml de la solución de 2,2-bipiridina y se mezcla perfectamente el contenido.
- Se mide la absorbancia a 519 nm a los 30 segundos exactos después de haber agregado la 2,2-bipiridina a cada tubo.
- Se utiliza una celda con agua desionizada para ajustar el espectrofotómetro en cero y después se lee la absorbancia del blanco, la de las muestras problema y los estándares. Cada una de éstas se le resta por separado al blanco para así obtener la absorbancia corregida respectiva.

#### Cálculos.

- Las soluciones de la curva patrón se preparan diluyendo la solución de referencia de fitato con HCl 0.2 N en un rango de 3.30  $\mu\text{g}$  de fósforo fitico / ml.
- El fitato de sodio y/o ácido fitico contienen 6 átomos de fósforo (peso molecular = 30.97 g / mol), por lo que  $6 \times 30.97 = 185.82$  g de P / mol. El peso molecular del ácido fitico es de 660 g/mol y el peso molecular del fitato de sodio es de 923.8 g / mol.
- La solución patrón contiene 1.5 mg. de fitato / ml, o sea:

$$\frac{1500 \mu\text{g fitato de sodio}}{\text{ml}} \times \frac{185.82 \mu\text{g P}}{923.8 \mu\text{g fitato de sodio}} = 301.72 \mu\text{g P / ml}$$

Se realiza la curva estándar de acuerdo con el cuadro 6, en donde al final se interpola el valor de la muestra con el valor de la curva y de esta manera se obtiene la concentración final de fósforo en la muestra.

**CUADRO 6**  
**Curva estándar para fitatos.**

| Tubo | ml de solución estándar<br>(301.72 µg P / ml) | Aforar a<br>(ml) | Concentración final<br>µg P / ml |
|------|---|------------------|----------------------------------|
| 1    | 1   | 100              | 3.0172                           |
| 2    | 2   | 100              | 6.0344                           |
| 3    | 4   | 100              | 12.0688                          |
| 4    | 6   | 100              | 18.1032                          |
| 5    | 8   | 100              | 24.1376                          |
| 6    | 10  | 100              | 30.1720                          |

#### 4.9.4 INHIBIDORES DE TRIPSINA.

##### Fundamento.

La técnica es la utilizada por Kakade y colaboradores que se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso de la muestra sobre una solución estándar de tripsina. Y después se determina la actividad proteolítica remanente por medio de un sustrato sintético (BAPNA), el cual produce una coloración debida a la producción de p-nitroanilina que se lee en el espectrofotómetro a 410 nm. Dicha coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de la muestra.<sup>(37)</sup>

##### Material y reactivos.

- Potenciómetro CORNING mod. 430
- Parrilla de calentamiento y agitación múltiple THERMOLYNE mod. SP-13025.
- Agitador mecánico tipo vórtex LAB-LINE mod. 1192
- Baño regulador de temperatura GRANT mod. LR 22493.
- Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER mod. 340
- Papel filtro Whatman # 1
- NaOH 0.01N.
- HCl 0.001 N.
- Hidroximetil-amino-metano (TRIS).
- Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida-HCl (BAPNA).
- Solución amortiguadora para TRIS pH 8.2 / 0.05 M (6.05 g de TRIS y 2.94 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  se disuelven en 900 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 8.2 y se afora a 1 L).
- Solución BAPNA preparada el mismo día (100 mg de BAPNA se disuelven en 2.5 ml de dimetil-sulfóxido y se diluye a 250 ml con amortiguador TRIS previamente calentado a 37 °C).
- Solución estándar de tripsina 20 µg / ml (pesar con mucha exactitud 4 mg de tripsina bovina SIGMA # T-8253 y se disuelven en 200 ml de HCl 0.001 N).
- Ácido acético al 30 %.

### Procedimiento.

#### a) Preparación del extracto.

- Se peso 1 g de muestra finamente molida y desengrasada y se le adiciono 45 ml de NaOH, se ajusta el pH de ésta suspensión a  $9.6 \pm 0.2$  y se aforo a 50 ml.
- Transferir a un vaso de precipitados y se agita la suspensión mecánicamente por espacio de 2 1/2 horas a 300 r.p.m.
- Después de dicho tiempo se deja ½ hora en reposo, y por simple decantación se obtiene el sobrenadante eliminando el residuo insoluble.
- El sobrenadante se diluyo hasta el punto de que 1 ml produzca una inhibición de 40-60 % (esto es indispensable para reducir la desviación estándar relativa).

#### b) Determinación de la actividad.

- A continuación en el cuadro 7 se observa como se trabajo una serie de tubos para determinar la actividad inhibitoria de la muestra.

**CUADRO 7**  
**Secuencia para determinar la actividad inhibitoria de la muestra.**

| Clave* | Extracto (ml) | Agua (ml) | Tripsina (ml) a 37°C | Acido acético 30% |                            | BAPNA (ml) a 37°C |                                       | Acido Acético 30 % |
|--------|---------------|-----------|----------------------|-------------------|----------------------------|-------------------|---------------------------------------|--------------------|
| B1     | 1.8           | 0.2       | 2.0                  | 1 ml              | Baño a 37°C<br><br>10 min. | 5                 | Baño a 37°C<br><br>10 min.<br>Exactos | --                 |
| 1      | 1.8           | 0.2       | 2.0                  | --                |                            | 5                 |                                       | 1ml                |
| B2     | 1.4           | 0.6       | 2.0                  | 1ml               |                            | 5                 |                                       | --                 |
| 2      | 1.4           | 0.6       | 2.0                  | --                |                            | 5                 |                                       | 1ml                |
| B3     | 1.0           | 1.0       | 2.0                  | 1ml               |                            | 5                 |                                       | --                 |
| 3      | 1.0           | 1.0       | 2.0                  | --                |                            | 5                 |                                       | 1ml                |
| B4     | 0.6           | 1.4       | 2.0                  | 1ml               |                            | 5                 |                                       | --                 |
| 4      | 0.6           | 1.4       | 2.0                  | --                |                            | 5                 |                                       | 1ml                |
| B5     | 0             | 2.0       | 2.0                  | 1ml               |                            | 5                 |                                       | --                 |
| 5      | 0             | 2.0       | 2.0                  | --                |                            | 5                 |                                       | 1ml                |

\* Mezclar perfectamente el contenido de los tubos después de cada adición.

- La reacción enzimática se detiene por la adición del ácido acético al 30 %; si se enturbia o forma un precipitado, se filtra el contenido a través de papel filtro Whatman # 1.
- La lectura de cada tubo se realiza en el espectrofotómetro a 410 nm. Previamente se ajusto a 100 % de transmitancia con el respectivo blanco de cada dilución.

#### Cálculos.

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

Unidades de Tripsina Inhibida (U.T.I.), la lectura de absorbancia (A), puede ser transformada directamente en unidades de tripsina:

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

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

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

Donde:

R = U.T. de la referencia (Tubo con 0.0 ml de extracto).

A<sub>3</sub> = U.T.I. del tubo 3 (Tubo con 1.0 ml de extracto)

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

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

Donde:

R = Valor de unidades de tripsina de la referencia.

Cuando se grafica la actividad enzimática inhibitoria (U.T.I. / ml) vs. ml de extracto de prueba, se observa una correlación lineal negativa de donde se puede obtener el valor extrapolado que corresponde al valor cero de la solución inhibitoria.(Fig.3)

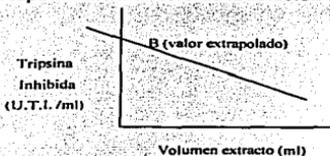


Figura 3 Gráfica U.T.I. / ml vs. ml de extracto.

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

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

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

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

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

Donde:

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

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

#### 4.9.5 DETERMINACIÓN DE LECTINAS.

##### Fundamento.

La determinación se basa en el poder aglutinante que tienen ciertos componentes de naturaleza proteínica hacia los eritrocitos. Se emplea la técnica de microtitulación basada en una serie de diluciones donde el punto final de aglutinación se determina mediante una estimación visual, para ello se requiere que los eritrocitos sean sensibilizados mediante una proteasa.<sup>(30)</sup>

##### Material y reactivos.

- Parrilla múltiple con agitación marca THERMOLINE, mod. 4
- Centrífuga Dynac
- Tubos de centrifuga de 15 ml con graduación.
- Incubadora marca BLUE-M
- Espectrofotómetro marca SEQUOIA-TURNER, mod. 340
- Adaptador para celdas de 10 x 75 mm (acondicionado a una abertura de 1cm<sup>2</sup>)
- Microtiter kit (Cook Eng-alexander Virginia USA)
- Filtro de vidrio con fibra de vidrio
- Sangre de hámster desfibrinada y lavada
- Solución anticoagulante.
- Solución salina al 1.0 %
- Solución salina al 0.9 %
- Solución de pronasa de S. Griseus (SIGMA P-5147) al 0.2 % en solución salina.

##### Procedimiento.

###### A. Preparación del extracto:

Se requiere 1 gramo de muestra finamente molida y desengrasada, la cual se suspendió en 10 ml de solución salina al 1 %, y se efectuó una extracción con agitación mecánica durante 2 horas a 300 r.p.m. a temperatura ambiente.

Después de este tiempo se centrifugo el extracto a 1400 r.p.m. durante 15 minutos para eliminar el residuo insoluble; el sobrenadante se filtro a través del filtro de fibra de vidrio y se aforo al volumen inicial con NaCl al 1 %.

###### B. Preparación de la sangre:

Una vez que se sangra al animal (hamster), la sangre se coloca en un matraz pequeño que contenga solución anticoagulante, agitar suavemente para la completa homogeneización de la sangre con la solución anticoagulante. La sangre con anticoagulante se trasvasa a tubos de centrifuga para lavarla (3 veces) con solución salina al 0.9 %. La relación sangre:solución salina es aproximadamente 1:5.

Se centrifuga a 1500 r.p.m. durante 10 minutos. Después del último lavado, se mide en el tubo de centrifuga, la cantidad de paquete de eritrocitos y se diluyen al 4 % para lo cual se agregan por cada 1.0 ml de glóbulos rojos 24 ml de solución salina al 0.9 %.

#### **C. Sensibilización de los glóbulos rojos:**

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

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

Después del último lavado resuspender el paquete de glóbulos rojos al 4 %, por lo cual cada 1.0 ml de paquete de eritrocitos se le adiciona 24 ml de solución salina al 0.9 %.

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

#### **D. Ajuste de la suspensión de glóbulos rojos:**

Se toma 0.1 ml de la suspensión de glóbulos rojos ya sensibilizados y se agregan 4.9 ml de solución salina al 0.9 %. Se lee en el espectrofotómetro a 620 nm, usando una adaptador de celdas que permite el paso de solo 1 cm<sup>2</sup> de luz y como blanco solución salina al 0.9 %.

La lectura que se debe obtener será de 24-29 % de transmitancia en caso contrario se realizará la dilución necesaria para que la suspensión de glóbulos quede dentro de dicho rango.

#### **E. Microtitulación:**

En las placas de microtitulación con fondo tipo "V" se colocaron en cada pozo de cada hilera 50 µl de solución salina al 0.9 % con el pipetero de gota evitando tocar las paredes del pozo.

En seguida, se llenó el microdilutor con 50 µl del extracto y se procedió a realizar 24 diluciones sucesivas en forma de culebra (ocupando dos hileras).

Finalmente en cada pozo se colocaron 50 µl de la suspensión de eritrocitos sensibilizada y ajustada. Las placas se rotaron en forma circular y horizontal y se introdujo en una incubadora a 37 °C por una hora.

*Nota: es recomendable verificar que el volumen que se este tomando el microdilutor, sea el requerido. Esto se realiza en una placa de prueba.*

#### **F. Lectura:**

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se colocó la placa sobre el dispositivo de lectura, y se reporta la máxima dilución que presenta aglutinación.

**Aglutinación negativa:** se observó la formación de un punto rojo que indica sedimentación de los glóbulos rojos.

**Aglutinación positiva:** se observó turbidez rojiza en el pozo, indicando la micro aglutinación de la sangre. (pequeños conglomerados de eritrocitos que se mantienen en suspensión)

### **4.9.6 SAPONINAS**

#### **Fundamento.**

La determinación está basada en el aprovechamiento de la capacidad hemolítica de las saponinas sobre eritrocitos. Se emplea un método de microtitulación en el cual se pone en contacto un extracto metanólico de la muestra resuspendido en solución salina, con los eritrocitos sensibilizados de conejo.<sup>(38)</sup>

#### **Material y reactivos.**

- Extractor de grasa Goldfish, LABCONCO.
- Cartuchos de celulosa Whatman 22 x 88 mm.
- Rotavapor Büchi, 461, modelo RE-111.
- Centrifuga Dynac.
- Incubadora bacteriológica, BLUE M.
- Espectrofotómetro COLEMAN, Junior II-A
- Tubos de centrifuga de 15 ml con graduación.
- Jeringa de 5 o 10 ml #22.
- Micrititer kit (Cook Eng-Alexander Virginia USA).
- Filtro de vidrio poroso.
- Solución de metanol (R.A.) y agua destilada al 85 % (v/v).
- Sangre de conejo desfibrinada y lavada.
- Solución anticoagulante (a)
- Solución salina al 1 %.
- Solución salina al 0,9 %.
- Tripsina de páncreas de bovino (Sigma t-8128 Tipo II) (b).
- Solución estándar de saponinas al 0,5 % en solución salina (c).

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

Solución heparina : sangre = 15-20 UI : 1 ml de sangre.

Solución de citrato : sangre = 0.1 ml : 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 usar como solución anticoagulante, la solución ELSEVER, en la siguiente proporción: 1:1 o sea 1 ml de solución ELSEVER por 1 ml de sangre fresca.

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

(c) El estándar de saponinas es una mezcla 1:1 de digitonina (saponina tipo esteroideal) y un extracto de quillaja (saponina tipo triterpenoide), al 0.5 % en solución salina.

### **Procedimiento.**

#### **A) Preparación de extracto:**

Una vez que se tiene la muestra finamente molida y desengrasada se peso 7.5 g en el cartucho de celulosa, se colocó en los porta dedales y en el extractor Goldfish. La extracción se realizó a la máxima temperatura del aparato por 2 horas, con metanol-agua (85:15) como solución extractora de las saponinas. Una vez transcurrido el tiempo de extracción, se concentró a sequedad en el rotavapor, a una temperatura aproximada de 65 °C, la muestra se predisolvió con solución salina 0.9 % y se filtro con ayuda de vacío y se aforo a 100 ml con la misma solución. Si no se realiza la determinación de inmediato, el extracto se debe refrigerar o congelar para evitar contaminación.

#### **B) Preparación de la sangre:**

La sangre de conejo se colocó en un matraz de 25 ml que tuviera solución anticoagulante, se agito suavemente para la completa homogeneización de la sangre con la solución anticoagulante. (no interrumpir hasta el momento de diluirla).

La sangre con anticoagulante se trasvaso a tubos de centrifuga para lavarla (3 veces) con solución salina al 0.9 %.

#### **C) Sensibilización de los glóbulos rojos:**

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

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

Después del último lavado se resuspendió el paquete de glóbulos rojos al 5 % por lo que por cada mililitro de paquete de eritrocitos se le adicionaron 19 ml de solución salina 0.9 %.

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

#### **D) Ajuste de la suspensión de glóbulos rojos:**

Se toma 1 ml de la suspensión de glóbulos rojos ya sensibilizados y se agrega 4 ml de solución salina al 0.9 %. se toma la lectura en el espectrofotómetro a 620 nm, usando un adaptador de celdas que permita el paso de solo 1 cm<sup>2</sup> de luz y como blanco solución salina al 0.9 %.

La lectura que se obtuvo fue de 25 % ± 1 de transmitancia, en caso contrario se realizará la dilución necesaria para que la suspensión de glóbulos quede dentro de dicho rango.

#### **E) Microtitulación:**

En las placas de microtitulación con fondo tipo "U" colocar, en cada pozo 50 µl de solución salina al 0.9 % con el pipeteador de gota evitando tocar las paredes del pozo.

A continuación llenar el microdilutor de 50 µl por contacto con la superficie del extracto problema para proceder a realizar las diluciones sucesivas en la hilera escogida, introduciendo el microdilutor en el pozo y rotándolo sin excesiva presión. Se elimina el residuo de la última dilución.

*Nota: Es recomendable chequear que el volumen que esté tomando el microdilutor, sea el requerido, esto se realiza con solución salina en una placa de prueba.*

Por último con un pipetero de gota colocar en cada pozo 50 µl de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizada, en cada placa que se realizo fue necesario realizar un control negativo con solución salina al 0.9 % sin extracto problema y un control positivo con solución salina al 0.9 % y el estándar de saponinas al 0.5 % en solución salina. Luego se rota la placa en forma circular y se dejo en la incubadora a 37 °C por espacio de una hora.

#### **F) Lectura:**

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

Por definición: 1 mg. del estándar es equivalente a 10 Unidades de Hemolíticas (U.H.) de tal manera que pueden expresarse los resultados en base a U.H. dependiendo del título obtenido para la muestra.

**G) Cálculos:**

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

La mezcla de saponinas triterpenoide y esteroide (1:1) tiene una concentración de 0.5 % en la solución estándar en donde se observa que:

$$\frac{500 \text{ mg}}{1000 \mu\text{l}} \times 50 \mu\text{l} = 0.25 \text{ mg (en los } 50 \mu\text{l) en el pozo.}$$

En una dilución seriada se tiene la siguiente formula:

$$\frac{\text{Concentración del extracto}}{2^t}$$

Donde:

t = título de hemólisis.

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

$$\text{(Pozo 8)} \frac{0.25 \text{ mg}}{2^4} = 0.00976 \text{ mg}$$

El cálculo para las muestras es:

La concentración del extracto de la muestra para todos los casos es de 75 mg / ml, en 0.05 ml tenemos 3.75 mg; para un título de hemólisis con valor de 4 se tiene la cantidad de muestra es ese pozo:

$$\frac{3.75 \text{ mg}}{2^4} = 0.234 \text{ mg de M}$$

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

$$\frac{10 \text{ U.H.}}{0.23 \text{ mg de muestra}} = 43.48 \text{ U.H. /mg de muestra}$$

#### 4.9.7 GLUCÓSIDOS CIANOGENÍCOS.

##### Fundamento.

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

Con este método se puede detectar cantidades del orden de 5  $\mu\text{g}$  de HCN, equivalente a 46  $\mu\text{g}$  de glucósidos cianogénicos (referido con linamarina).<sup>(30,39)</sup>

##### Material y reactivos.

- Potenciómetro, CORNING, phmeter 430.
  - Incubadora marca BLUE-M.
  - Congelador comercial.
  - Espectrofotómetro, SEQUOIA-TURNER, mod 340.
  - Baño de agua con agitación marca LAB-LINE INSTRUMENTS.
  - Tubos de cultivo con tapón de rosca PYREX #9825.
  - Micro-molino marca TECATOR, mod CYCLO\_TEC.
  - Papel indicador de HCN (a).
  - Solución de  $\beta$ -glucosidasa con activador (b).
  - Solución de KCN equivalente a 100  $\mu\text{g}$  HCN / ml (24.1 mg KCN / 100 ml).
  - HCl 0.5 N.
  - Buffer de fosfatos pH 7 (c)
  - Solución de picrato de sodio alcalinizada (d)
- (a) Papel Whatman del # 2 se remoja en una solución de picrato de sodio (d), se deja escurrir y se coloca en una estufa a secar a una temperatura de 55-60 °C por espacio de 30 minutos. A continuación se cortan tiras bien medidas de 2x10 cm.
- (b) 0.25 g de  $\beta$ -glucosidasa (250 mg) se disuelven con buffer de fosfatos pH 7 (c) teniendo la precaución de agitar suavemente (de lo contrario se formará espuma) una vez disuelta la enzima se le adiciona 1.7 g de  $\text{NaNO}_3$ .
- (c) Se preparan las siguientes soluciones:
1. Solución de fosfato de sodio monobásico 0.2 M (27.8 g en 1 L).
  2. Solución de fosfato de sodio dibásico 0.2 M (53.65 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ó 71.7 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  en 1 L). Mezclar 39 ml de A y 61 ml de B y aforarlo a 200 ml. Ajustar el pH a 7.0.
- (d) Se disuelven en agua destilada 2.5 g de ácido pícrico y a continuación 12.5 g de carbonato de sodio, llevándose a un volumen de 500 ml con agua destilada.

## Procedimiento.

- 1) **Curva estándar:** Para la elaboración de la curva estándar (cuadro 8), se uso una solución de cianuro de potasio cuya concentración equivale a  $100\mu\text{g HCN} / \text{ml}$ . Además con el fin de simular la interacción muestra-HCN liberada, se introduce la llamada matriz alimenticia, fécula de maíz comercial, la curva estándar va de  $5-60\mu\text{g}$  de HCN ya que fue el rango óptimo encontrado en la respuesta concentración de HCN vs. D.O. ( $r = 0.99$ ) en donde se cumple la ley de Lambert-beer.

**CUADRO 8**  
Curva estándar de HCN.

| Solución estándar (ml) | Matriz alimenticia (mg) | Buffer pH 7 (ml) |                                | HCl 0.5N (en frío) (ml) | Concentración de HCN ( $\mu\text{g}$ ) |
|------------------------|-------------------------|------------------|--------------------------------|-------------------------|--|
| 0.00                   | 500                     | 5                | 4 horas a $40^{\circ}\text{C}$ | 1                       | BLANCO                                 |
| 0.05                   | 500                     | 5                |                                | 1                       | 5                                      |
| 0.1                    | 500                     | 5                |                                | 1                       | 10                                     |
| 0.2                    | 500                     | 5                |                                | 1                       | 20                                     |
| 0.4                    | 500                     | 5                |                                | 1                       | 40                                     |
| 0.6                    | 500                     | 5                |                                | 1                       | 60                                     |

- 2) **Preparación de la muestra:** Cuando se requiere determinar con suma precisión el contenido de HCN en una muestra fresca, es necesario partir del material íntegro; se sometió a una molida fina e inmediatamente se pasa a un frasco que cierre perfectamente y si no se va a realizar en ese momento la determinación se procede a colocar la muestra ya molida en el congelador.
- 3) **Liberación del HCN de la muestra:** Se colocó en un tubo de cultivo Pyrex # 9826 de 20-500 mg de muestra, dependiendo de su contenido aproximado de glucósidos cianogénicos (cuando no se tiene información se coloca la cantidad máxima de 500 mg); a continuación se adicionaron 5 ml de solución de  $\beta$ -glucosidasa (fría) se homogeneiza y se procedió a colocar la tira de papel indicador humedecida (aproximadamente con 8 gotas de agua) en la boca del tubo y se cerro herméticamente con un tapón de rosca.

Una vez que se tiene el anterior dispositivo se colocó en un baño maría que esta a una temperatura de  $40^{\circ}\text{C} \pm 1$  y con el control de velocidad de agitación, transcurrido el tiempo se colocó en el congelador por 30 minutos, se saca el tubo y se destapa y se adiciono 1 ml de HCl 0.5 N (frío); hay que hacer notar que si se usan los tapones adecuados, la tira de

papel indicador quedará adherida a dicho tapón y no se presentaran problemas de manipulación en este paso.

Una vez adicionado el HCl, se tapo, y se homogeneizo teniendo la precaución de que el líquido no toque el papel indicador y se coloco nuevamente en la incubadora por espacio de 15 minutos a la temperatura de 60 °C. Transcurrido el tiempo se saca de la incubadora y se puede realizar visualmente la detección cualitativa, ya que aquellos tubos que no muestren ni siquiera ligera coloración café-rojiza en el papel indicador, se consideran negativos; en tanto que aquellos que si muestren aunque sea un ligero color se consideran positivos, y se precede a su detección cuantitativa.

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

Después de extraer el pigmento (aproximadamente de 2-5 minutos) se recupera el solvente (agua), eliminando los residuos del papel por una simple filtración (utilizando papel de filtración rápida).

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

#### **Cálculos.**

Al tener la curva estándar, en donde se encuentra relacionado el contenido de HCN vs Absorbancia, se interpola el valor obtenido de absorbancia y de acuerdo a la ecuación de regresión lineal, se obtiene el valor correspondiente de HCN (X) y al sustituir esta cantidad en la formula se obtendrá los mg HCN / g de M.

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

Donde:

X = µg de HCN  
m = mg de muestra.

#### 4.10 ALCALOIDES EN HARINA DESENGRASADA Y ACEITE (DETERMINACIÓN CUALITATIVA)

##### Fundamento.

Se fundamenta en extraer alcaloides de material seco y desengrasado, con metanol, en condiciones de agitación con un posterior calentamiento y evaporación del mismo, con el residuo se emplearan reactivos orgánicos y se obtendrá al final dos extractos A y B los cuales serán evaporados y el residuo seco será resuspendido con HCl al 1 % y 1ml de cloroformo. la fase acuosa de cada fracción será ensayada con los 7 reactivos para identificar alcaloides. (29)

##### Material y reactivos.

- Embudo de separación de 125 ml.
  - Parrilla de agitación CORNING, mod PC-351.
  - Estufa de vacío marca LAB-LINE INSTRUMENTS.
  - Papel filtro Whatman #1
  - Rotavapor Büchi 461, mod RE 111
  - Ácido nítrico (30 % o  $\delta = 1.180$ ).
  - HCl 1 %
  - Ácido silicotugstico ( $4 \text{ H}_2\text{O} \cdot \text{SO}_2 \cdot 12 \text{ WO}_2 \cdot 22 \text{ H}_2\text{O}$ ).
  - Metanol (R.A.)
  - Amoniaco concentrado (aproximadamente 25 %)
  - Diclorometano (R.A.).
  - Cloroformo
  - Mezcla de cloroformo-etanol (3:2 v/v)
  - Etanol (R.A.)
  - Sulfato de sodio anhidro (R.A.).
  - Brucina.
  - $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 N.
  - Brucina 0.01 g disuelta en HCl al 1 %.
  - Reactivo de MAYER (a)
  - Reactivo de WAGNER (b)
  - Reactivo de DRAGENDORFF ©
  - Reactivo de SONNENSCHNEIN (d)
  - Reactivo de HAGER (e)
  - Reactivo de SCHEIBLER (f)
  - Reactivo de ÁCIDO SILICOTUGSTENICO (g).
- (a) Se disuelven 1.36 g de  $\text{HgCl}_2$  en 60 ml de agua y 5 g de yoduro de potasio en 10 ml de agua. Se juntan las dos soluciones y se aforan a 100 ml con agua destilada.
- (b) Se disuelven 1.27 g de yodo (resublimado) y 2 g de yoduro de potasio en 20 ml de agua: la solución se afora con 100 ml de agua destilada.
- (c) Se disuelven 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 ml de ácido nítrico y 27.2 g de yoduro de potasio en 50 ml de agua. Se mezclan las dos soluciones y se dejan reposar 24 horas. Se decanta la solución y se afora con agua a 100 ml.
- (d) A 100 ml de una solución caliente de molibdato de amonio (43 g / 100ml), adicionar 100 ml de una solución caliente de fosfato de sodio dibásico anhidro (10 g / 100 ml); a

esta solución clara adicionar 10 ml de ácido nítrico concentrado; al precipitado amarillo en 50 ml de agua destilada y calentar. A la suspensión caliente adicionar 100 ml de la solución de carbonato de sodio anhidro caliente (28 g / 100 ml). Una solución clara debe formarse, y esta solución es evaporada en cápsula a sequedad; flamear la superficie del polvo con un mechero bunsen hasta encenderse para evaporar las sales de amonio. Pesar el polvo y debe ser aproximadamente 30 g. Disolver el polvo en 200 ml de agua destilada caliente, calentar y adicionar a esta solución 50 ml de ácido nítrico concentrado, a esta solución adicionar agua destilada hasta llevar a un aforo de 300 ml; resultando una solución clara amarilla de ácido fosfolibídico.

(c) Preparar una solución acuosa saturada de ácido pítrico (2 g / 100 ml).

(f) Se disuelven en 50 ml de agua 10g de tungstato de sodio y 7 g de fosfato disódico. La solución se acidula con ácido nítrico.

(g) Se disuelven 5 g de ácido silicótúgstico en el ácido sulfúrico (6 N) es necesario para formar 100 ml de solución.

#### **Procedimiento para la harina desengrasada.**

Se peso de 2-4 g de muestra seca, finamente molida y desengrasada en un vaso de precipitados de 100 ml, se mantuvo toda la noche con 40 ml de metanol con agitación (300 r.p.m.); al día siguiente se calentó en una Parrilla de agitación durante 4 horas a 50°C. La mezcla se filtra y el residuo se lava con 20 ml de metanol, los extractos se combinan y se evapora el metanol en el rotavapor. El residuo se resuspende con 2 ml de metanol y 12 ml de HCl al 1 % la mezcla se agita y filtra; para el lavado del residuo se usan 8 ml de HCl al 1 %. se combinan los extractos filtrados y con amoniaco concentrado llevar el pH a medio básico.

Se realizo una extracción con tres porciones de 20 ml de cloroformo cada una, dando la fracción "A".

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

Las fases orgánicas se lavan con 5 ml de solución media saturada de sulfato de sodio y se seca con sulfato de sodio anhidro.

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

#### **Procedimiento**

En un embudo de separación se agregaron 5 ml de aceite de Napahuite con 5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se agito vigorosamente (este paso se repite 4 veces), los alcaloides se encuentran en la parte

inferior como sal (fase acuosa), esta parte se separo y se llevo a un pH básico con amoniaco concentrado (pH = 9-10), esta porción se lavo con 20 ml de cloroformo (3 veces) dando la fracción "A" (fase orgánica).

A la solución acuosa residual de las anteriores extracciones, se extrajo con tres porciones de 20 ml de una mezcla de cloroformo-etanol (3:2 v/v), con este paso se obtuvo la fracción orgánica "B":

Las fases orgánicas A y B se lavaron con 5 ml de solución saturada de sulfato de sodio y se seco con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro.

Las dos fracciones, se evaporan en un rotavapor por separado; y el residuo se resuspende con 1.5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 N y 1.5 ml de cloroformo, se agito vigorosamente y la fase acuosa de cada fracción es pipeteada y dividida en 7 porciones, en donde son ensayadas con los reactivos para identificar alcaloides.

#### Resultados.

| Reactivo                | Precipitado             |
|-------------------------|-------------------------|
| Mayer                   | Bianco                  |
| Wagner                  | Fioculento color marrón |
| Dragendorff             | Anaranjado-marrón       |
| Sonnenschein            | Amarillo                |
| Hager                   | Amarillo                |
| Scheibler               | Bianco-grisáceo         |
| Acido silicotungsténico | Bianco-grisáceo         |

Debido a la frecuencia de reacciones falsas-positivas con los reactivos comunes de alcaloides, sólo se considera como positiva la presencia de ellos en una muestra, cuando cualquiera de las dos fracciones (A o B) da reacción positiva con todos o por lo menos con seis reactivos descritos anteriormente.

El reactivo de HAGER (ácido picrico), es de baja sensibilidad, por lo tanto cuando da una reacción negativa y todas las demás dan reacción positiva, este resultado se puede descartar, considerando positiva la presencia de alcaloides en la muestra.

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

## 4.11 DETERMINACIÓN DE DENSIDAD CALÓRICA.

### Fundamento.

Se basa en la determinación del contenido calórico del material en la bomba calorimétrica, sin embargo hay que tomar en cuenta que este dispositivo determina la energía liberada por la completa oxidación del alimento, mientras que el cuerpo humano realiza la oxidación en forma incompleta, en especial para el caso de las proteínas, por lo tanto la bomba calorimétrica nos da el máximo potencial energético de un alimento, que por convención se conoce como "Energía Gruesa o Bruta".<sup>(31)</sup>

### Material y reactivos.

- Ácido benzoico (con valor calórico certificado) (a).
- Desecador de vidrio.
- Balanza analítica (hasta 0.1 mg)
- Estufa de secado a presión reducida.
- Mecha de algodón de 75 mm de longitud (b).
- Crisol de acero inoxidable de 254 mm de diámetro (1 inch.)
- Mango metálico compactador.
- Bomba calorimétrica balística GALLENKAMP, mod CBB-330-010 L.

### Procedimiento para la muestra.

Se peso 0.5 g muestra triturada, en un crisol (a peso constante) junto con la mecha de algodón de tal manera que el hilo quede introducido dentro de la muestra y se procedió a pesar en una balanza analítica lo que corresponde al peso preliminar, recomendándose pesar un exceso aproximado de 10 % del peso deseado. Se compacto la muestra con el mango metálico de tal forma que quede lo mas uniforme posible y la mecha se introdujo dentro de la muestra, sobrando un tramo que servirá para contactar con el alambre de ignición de la bomba. Se elimino con mucho cuidado el material que no se halla compactado y el crisol con la muestra compactada se pesa nuevamente para tener el peso final, se realizo un triplicado de la muestra.

### Procedimiento para la grasa cruda.

Se pesaron 0.3 g de aceite en el crisol metálico, el cual tiene la mecha de algodón, se realizo un triplicado de la muestra.

Para cada uno de los crisoles se realizo lo siguiente:

El crisol se coloco en la base superior del pilar central de la bomba y con mucho cuidado se introdujo la punta suelta de la mecha de algodón en el alambre de ignición, a continuación se procede a realizar la combustión, para lo cual se reviso que el sello de hule "O-RING",

se encuentre en perfectas condiciones, ya que debe tener un cierre hermético. El cierre se realiza colocando el capuchón de la bomba sobre el anillo metálico y se gira éste hasta que coincida la rosca con el del capuchón, el sellado se debe hacer con la fuerza de la mano, no utilizar herramienta alguna. En seguida se coloca el sensor del termopar en el orificio del capuchón.

Teniendo suministro de oxígeno a presión (cilindro con mínimo 30 bars), se procedió a abrir la válvula de paso girando la perilla y se obtuvo una presión dentro de la bomba balística de 25 bars (1 bar = 0.987 Atmosferas) en aproximadamente 20 a 30 segundos. Una vez alcanzada la presión, se cerró la válvula de paso y se procedió a ajustar el galvanómetro a cero con ayuda del ajuste grueso y posteriormente con el dispositivo de ajuste fino. Si las condiciones anteriores se mantienen por aproximadamente 10 segundos, se oprime el botón de ignición y en 10 a 15 segundos se lleva a cabo la combustión, notándose por un aumento en la presión del manómetro, que a su vez se traduce en una señal en la escala del galvanómetro.

*Nota: Se debe observar con atención el movimiento del indicador en el galvanómetro, ya que una vez alcanzado el valor máximo empieza a decaer rápidamente.*

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

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

#### **Cálculos.**

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

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

$$1 \text{ g de ácido benzoico} = 26,454.3 \text{ Joules} = 26.45 \text{ KJ} = 6.317 \text{ Kcal.}$$

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

## 4.12 REFINACION DEL ACEITE DE NAPAHITE.

### Fundamento.

Los aceites y las grasas crudas contienen cantidades variables de sustancias, que pueden proporcionar aromas, colores o cualidades indeseables. Entre ellas están los ácidos grasos libres, los fosfolípidos, los hidratos de carbono, las proteínas y sus productos de degradación, los pigmentos (principalmente los carotenos y clorofila), los productos de oxidación de las grasas. Los aceites y grasas crudas se someten a procesos comerciales de refinado diseñados para eliminar sustancias y además puedan ser agradables a los consumidores. <sup>(11,12)</sup>

### 4.12.1 DESGOMADO

#### Fundamento.

El primer paso en el proceso de refinación es el desgomado. Los aceites crudos poseen niveles relativamente altos de fosfátidos, lecitina, cefalina, proteínas y productos de degradación como complejos metálicos y sustancias gomosas o mucilaginosas, los cuales son solubles en el aceite sólo en su forma anhidra, estos se pueden eliminar por precipitación con una simple hidratación, calor y agitación, añadiendo  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 0.1 %, se deja sedimentar y después se separa del aceite por centrifugación. El desgomado se puede mejorar agregando ácido cítrico o fosfórico o gel de sílica. <sup>(11,12)</sup>

#### Material y reactivos.

- Matraz Erlenmeyer de 250ml.
- Balanza analítica

- Parrilla de calentamiento y agitación múltiple THERMOLYNE mod. Sp-13025.
- Centrifuga CLAY-ADAMS, Dynac™.
- $H_3PO_4$  al 0.1 %.

#### **Procedimiento.**

- Determinar previamente el volumen del aceite a refinar, el cual será el volumen de referencia (100 %).
- Mezclar en un matraz Erlenmeyer el aceite con el  $H_3PO_4$  (0.1%), en una proporción del 3% con respecto al volumen de referencia (100%) del aceite a refinar.
- Se calentó la mezcla en una parrilla de calentamiento a 60°C durante 5 minutos con agitación.
- Se centrifugo a 2400 r.p.m. (80 U) a temperatura ambiente durante 15 minutos para precipitar los residuos del desgomado.
- Decantar el aceite.

#### **4.12.2 NEUTRALIZACIÓN**

##### **Fundamento.**

El aceite desgomado es tratado con un álcali para eliminar principalmente los ácidos grasos libres. El aceite se mezcla con sosa cáustica y calentamiento convirtiendo los ácidos grasos en jabones solubles en agua, la solución jabonosa se separa entonces del aceite por sedimentación o por centrifugación, y el jabón acumulado es removido por medio de lavados de agua caliente. El agua de lavado se separa del aceite también por sedimentación o centrifugación. <sup>(11,12)</sup>

##### **Material y reactivos.**

- Matraz Erlenmeyer de 250ml.
- Potenciómetro CORNING mod. 430.
- Parrilla de calentamiento y agitación thermolyn MOD. SP-13025.
- Centrifuga CLAY-ADAMS, Dynac™.
- Balanza analítica.
- Mechero Bunsen.
- NaOH al 15 %.
- Agitador de vidrio.
- Agua destilada.
- Tripie
- Tela de asbesto.

### **Procedimiento.**

Colocar el aceite previamente desgomado, en un matraz Erlenmeyer, y dejarlo en una parrilla de agitación, con el potenciómetro, determinar el pH del aceite y con una pipeta Pasteur se añadió NaOH al 15 % hasta obtener un pH neutro (pH = 7).

Inmediatamente se colocó el matraz con el aceite neutro en el tripié sobre la tela de asbesto, y se calentó la mezcla a 50 °C durante 5 minutos.

Se centrifugó a 2400 r.p.m. a temperatura ambiente durante 20 minutos, después se mezcló el aceite con agua destilada en una proporción del 10 % con respecto al volumen de referencia (100 %) del aceite a refinar, se calentó la mezcla a 80 °C durante 5 minutos, se centrifugó a 2400 r.p.m. a temperatura ambiente por 25 minutos, en este paso sí se forma una pasta chiclosa de apariencia desagradable indica la presencia de ceras, por lo tanto es necesaria su extracción para continuar con la refinación

### **4.12.3 EXTRACCIÓN DE CERAS**

#### **Fundamento**

Se fundamenta en separar del aceite las ceras, esto se efectúa para evitar la formación de una suspensión de cristales confiriendo un aspecto indeseable al aceite refinado.

Este proceso se recomienda cuando en la neutralización se forma una pasta indicando una alta concentración de ceras.<sup>(11,12)</sup>

#### **Material y reactivos.**

- Matraz Erlenmeyer 125 ml
- Centrifuga CLAY-ADAMS, Dynac™.
- Agua desionizada.

#### **Procedimiento.**

El aceite neutralizado, se colocó en un matraz Erlenmeyer de 125 ml y se adicionó 2 % de agua desionizada con respecto al volumen de referencia (100%) y se guardó en refrigeración (4 °C) por 72 horas, en este tiempo las ceras se depositan en el fondo del matraz debido a su alto peso molecular, transcurrido el tiempo, se sacó el matraz y se dejó ½ hora a temperatura ambiente, (25 °C) en este tiempo el aceite pasa de sólido a líquido, mientras que las ceras tardan más tiempo en recobrar su fluidez, y por decantación se recupera el aceite.

#### **4.12.4 BLANQUEO**

##### **Fundamento.**

Durante el proceso de blanqueo, trazas de metales, partículas coloridas tales como la clorofila, jabones y productos de la oxidación son removidos. La eliminación completa de los colorantes puede llevarse a cabo calentando el aceite y tratándolos con adsorbentes, como son las tierras diatomeas o el carbón activado. <sup>(11,12,13)</sup>

##### **Material y reactivos.**

- Parrilla de calentamiento y agitación múltiple THERMOLYNE mod. SP-13025.
- Papel filtro Whatman # 541.
- Embudo Pirex de poro muy fino 2-2.5  $\mu\text{m}$ . volumen de 30 ml.
- Carbón activado.
- Matraz Erlenmeyer 250 ml.

##### **Procedimiento.**

Se mezcla el aceite con carbón activado en un porcentaje del 10 % con respecto al volumen de referencia (100 %) del aceite a refinar, se calentó la mezcla en una parrilla de agitación durante 5 minutos a 90 °C, se espero a que se enfriara y se filtro a vacío con papel Whatman # 541, en un embudo Pirex de poro muy fino 2-2.5  $\mu\text{m}$  con capacidad de 30 ml, repetir el proceso de blanqueo en caso de que permanezca color en el aceite.

### **4.13 FACTORES FÍSICOS Y QUÍMICOS USADOS EN LA CARACTERIZACIÓN DE GRASAS Y ACEITES.**

#### **4.13.1 DENSIDAD**

##### **Fundamento.**

Se fundamenta en la determinación de la masa por unidad de volumen expresada en g /  $\text{cm}^3$ , a una temperatura dada, mediante la utilización de picnómetro calibrado a la misma temperatura del agua. <sup>(8)</sup>

##### **Material y reactivos.**

- Picnómetro de 10 ml.
- Baño de temperatura controlada GRANT Mod. SE-10
- Balanza analítica.

### **Procedimiento.**

Limpia cuidadosamente el picnómetro con mezcla crómica. Se enjuaga y seco completamente. Se lleno el picnómetro con agua recientemente hervida y enfriada a 20 °C y se coloco en un baño de temperatura controlada a 25 °C. Después de 30 minutos, se ajusto el nivel de agua en el picnómetro y su capilar, retirar del baño, se seco cuidadosamente y se peso. Se enjuago repetidamente con etanol y después con éter. Se evaporo cualquier residuo de éter y se seco y determinar por diferencia el peso de agua contenida en el picnómetro a 25 °C.

Para trabajar con la muestra se limpio y se seco el picnómetro cuidadosamente, se lleno con la muestra de aceite a 20 °C y se coloco en un baño a 25 °C, después de 30 minutos se ajusto el nivel de aceite en el picnómetro y su capilar, se retiro del baño, se seco cuidadosamente y se peso. Se Obtuvo el peso de la muestra por diferencia entre el picnómetro lleno con la muestra y el picnómetro vacío.

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

## **4.13.2 INDICE DE YODO**

### **Fundamento.**

Los ácidos grasos insaturados presentes en la grasa (principalmente los de la serie del ácido oleico) se unen mediante sus dobles enlaces a una cantidad definida de monobromuro de yodo (reactivo de Hanus), el cual es añadido en exceso en la determinación. La cantidad de halógeno restante es titulada con solución valorada de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  y por diferencia con un blanco se obtienen la cantidad de monobromuro de yodo adsorbido por la muestra.<sup>(8)</sup>

### **Material y reactivos.**

- Matraces Erlenmeyer con tapón de vidrio de 250 ml.
- Buretas graduadas de vidrio de 50 ml.
- Balanza analítica.
- Ácido acético glacial.
- Yodo.
- Tiosulfato de sodio 0.1 N (a).
- Solución de yoduro de potasio al 15 % p/v.
- Solución de almidón al 1 % p/v.
- Cloroformo.
- Ácido clorhídrico 1 N.
- Dicromato de potasio.

a) Preparación de solución de tiosulfato de sodio 0.1 N, disolver 25 g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en 1 litro de agua destilada. Llevar a ebullición moderada y mantener durante 5 minutos. Transferir en caliente a un frasco contenedor (de preferencia de color ámbar) previamente limpiado con mezcla crómica y enjuagado con agua destilada hervida. Guardar en la oscuridad en un lugar templado.

*Nota: no regresar residuos de reactivo al frasco.*

#### Valoración del $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ :

Se pesó en una balanza analítica 0.2000 a 0.2300 g de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (secado a 100 °C durante 2 horas) en un matraz Erlenmeyer, se disolvió 80 ml de agua destilada junto con 2 g de KI, y se añadió 20 ml de HCl 1 N y se guardó inmediatamente en la oscuridad durante 10 minutos. Se tituló con la solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , añadiendo unas gotas de solución indicadora de almidón al 1 % hacia el final de la valoración. Calcular la normalidad de la solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  la cual debe ser cercana a 0.1 N.

#### Procedimiento.

Se pesó 0.25 g de aceite en un matraz Erlenmeyer con tapón de vidrio y se disolvió en 10 ml de cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ), con la bureta graduada se añadió 25 ml de solución de Hg y se dejó reposar en la oscuridad durante 30 minutos, con agitación ocasional. Para resultados más precisos, es conveniente cumplir con los mismos tiempos de drenado de bureta y estancia en la oscuridad en todas las determinaciones.

Se añadió 10 ml de la solución al 15 % de KI; y se agitó vigorosamente y se añadió 100 ml de agua destilada recientemente hervida y enfriada, cuidando de lavar cualquier residuo que quede en el tapón de vidrio. Se tituló con solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0.1 N hasta que el color amarillo de la solución casi desapareciera, se añadió unas cuantas gotas de solución de almidón al 1 % y se continuó titulando hasta que el color naranja de la solución desapareciera. Hacia el final de la titulación, se tapó el matraz y se agitó vigorosamente para que el yodo remanente en solución en  $\text{CHCl}_3$  sea también titulado.

Se llevo a cabo 2 blancos bajo las mismas condiciones.

#### Cálculos.

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

**Donde:**

**B = ml de solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  gastados en blanco.**  
**S = ml de solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  gastados en la muestra.**  
**N = normalidad de la solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .**  
**12.69 = miliequivalentes de yodo**

#### **4.13.3 ÍNDICE DE SAPONIFICACIÓN.**

##### **Fundamento.**

Los ácidos grasos de la grasa son liberados con una solución de KOH (la cual se añade en exceso), obteniéndose glicerol y las sales respectivas de los ácidos grasos. El KOH sin reaccionar se titula con HCl 0.5 N y por diferencia con un blanco se determina la cantidad de KOH empleado para saponificar la muestra.<sup>(11)</sup>

##### **Material y reactivos.**

- ✓ Balanza analítica.
- ✓ Buretas graduadas de 50 ml.
- ✓ Condensador de aire.
- ✓ Canastilla de calentamiento.
- ✓ Matraces de bola de fondo plano de 250 ml.
- ✓ Matraz de fondo plano con cuello largo de 1 litro.
- ✓ Mortero.
- ✓ KOH (a).
- ✓ Óxido de calcio granulado.
- ✓ Etanol.
- ✓ Ácido clorhídrico 0.5 N.
- ✓ Solución indicadora de fenolftaleína al 1 % p / v en metanol.

##### **a. Preparación de solución etanólica de KOH.**

Se trituro 40 g de KOH en un mortero junto con 45 g de CaO granulado y se mezclo. De 1 litro de etanol, se añadió 100 ml a la mezcla en el mortero y se transferir a un matraz con cuello largo, transferir cuantitativamente la mezcla con ayuda de varias porciones de etanol. Se agrego el etanol restante al matraz, y se aforo se agito vigorosamente durante 5 minutos y se invirtió el matraz, dejando reposar la solución, se repitió la agitación varias veces durante el día, se dejo reposar durante toda la noche. Al día siguiente se filtro la solución para eliminar el CaO y se guardo en un frasco con tapón de vidrio.

##### **Procedimiento.**

Se peso en balanza analítica 0.5000 g de la grasa en un matraz de fondo plano de 250 ml. Se añadió con una bureta 50 ml de la solución de KOH y se conecto el matraz al

condensador de aire y se llevo a ebullición, y se mantuvo hasta que la muestra estuvo totalmente saponificada (aproximadamente 30 minutos). Se dejo enfriar y se titulo con HCl 0.5 N usando fenolftaleína al 1 % como indicador. Se llevo a cabo un blanco bajo las mismas condiciones que la muestra.

#### CÁLCULOS:

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

Donde:

B = ml de HCl 0.5N gastados en blanco.

S = ml de HCl 0.5N gastados en muestra.

56.1 = masa molecular de KOH x 0.5 N

#### 4.13.4 ÍNDICE DE ACIDEZ.

##### Fundamento.

El índice de acidez es una medida del contenido en ácidos libres presentes en grasas y aceites; además de los ácidos grasos libres, se determina los ácidos minerales que posiblemente se encuentran en la muestra. El conocimiento del contenido en ácidos grasos libres es indispensable para realizar adecuadamente el proceso de neutralización y sirve como prueba de pureza y en ocasiones permite deducir acerca del tratamiento o reacciones de degradación que se hayan producido.<sup>(7)</sup>

##### Material y reactivos.

- Matraces Erlenmeyer de 250ml.
- Bureta graduada de 50ml.
- Etanol.
- Solución indicadora de fenolftaleína al 1%.
- Hidróxido de sodio 0.1N.

##### Determinación.

Se neutralizo 50 ml de etanol con NaOH 0.1 N, usando fenolftaleína como indicador, hasta obtener una coloración levemente rosada. Se peso de 1 a 10 g de aceite en el matraz Erlenmeyer y se añadió el etanol neutralizado, se titulo con NaOH 0.1 N agitando

constantemente hasta que el color amarillo vire a rojo cereza y este permanezca durante 15 segundos. Preferentemente, la titulación no debe de consumir más de 10 ml.

**Cálculos.**

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

56.1 = masa molecular de KOH

#### 4.13.5 ÍNDICE DE REFRACCIÓN.

##### Fundamento.

Es una constante física para medir el fenómeno mediante el cual, cuando un rayo de luz monocromática pasa a través de una sustancia transparente a otra de diferente densidad, éste se desvía o refracta, excepto cuando penetra perpendicularmente a la superficie que separa ambas sustancias. El índice de refracción de una sustancia dada varía con la longitud de onda del rayo de luz refractado.<sup>(8,9)</sup>

##### Materiales y reactivos.

- Refractómetro de Abbé OPL N° 2154
- Aceite crudo y refinado.

##### Procedimiento.

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

Se Abrió el prisma girando el tornillo que lo mantiene cerrado; se añadió unas cuantas gotas del aceite y con una varilla de vidrio se extendió la muestra en toda la superficie del prisma. Se giro el tornillo para cerrar el prisma y se dejo la muestra unos minutos a que se atempere a la temperatura del agua circulante.

La medición se baso en la posición de la llamada *frontera de reflejo total* en relación a las caras del prisma. Se llevo este borde al punto de intersección indicando a través del ocular con ayuda del tornillo correspondiente, de tal manera que el campo de visión se hallo dividido en una mitad luminosa y otra oscura. En el otro ocular se hizo una lectura directamente en la escala el índice de refracción.

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

#### 4.13.6 PUNTO DE FUSIÓN

##### Fundamento:

Las grasas y aceites naturales, no tienen punto de fusión neto y definido, este procedimiento lo realiza gradualmente pasando de un estado sólido a uno líquido.

Por tal razón, el punto de fusión dependerá de las condiciones en que se realice la solidificación de la muestra.<sup>(7)</sup>

##### Material y reactivos.

- Capilares de vidrio (1mm de diámetro interno).
- Lente de aumento de vidrio.
- Parrilla de agitación.
- Termómetro graduado (-10°C a 100°C).

##### Procedimiento.

Se llena el capilar con la muestra hasta tener una columna de aproximadamente 1.5 cm de longitud. Se cerró el capilar a la flama cuidando de no quemar la muestra. Se guardó en condiciones de refrigeración (4-10 °C) durante 16 horas.

Se tomó el capilar con sumo cuidado y se sujetó al termómetro de tal forma que el fondo de la columna con muestra coincidió con el bulbo del termómetro. Se suspendió en un recipiente de 600 ml lleno a la mitad de agua. Como no se tenía una idea aproximada del punto de fusión de la muestra, se comenzó la determinación a -10 °C por abajo del mismo. Se comenzó el calentamiento a una tasa de 0.5 °C / min, llevando a cabo una agitación moderada para lograr homogeneidad en dicho calentamiento.

Se tomó como punto de fusión la lectura en el termómetro en la cual la muestra fue transparente. Generalmente, éste no es un punto en la escala, si no más bien un rango, en donde se reporta el rango observado.

## 4.14 PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS (CROMATOGRAFÍA DE GASES) EN GRASA CRUDA Y ACEITE REFINADO.

### Fundamento

Se fundamenta en obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos después de un proceso de saponificación, y son separados y determinados en un cromatógrafo de gases, mediante la utilización de una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria líquida contenida en una columna.<sup>(9,40)</sup>

### Material y reactivos.

- Tubos de ensaye con tapón de rosca.
- Baño a  $80 \pm 2$  °C (POLYSTAT Instrument Company Mod. 12002)
- Anticongelante para automóvil, marca BARDHAL.
- Cromatógrafo de gases (Perkin Elmer Auto System HP 5890 con detector de ionización de flama).
- Columna capilar de 30 m de longitud, Heliflex AT-Silar (50% cianopropil -50 metil polixiloxano).
- Temperatura del inyector 250 °C
- Temperatura del detector 300 °C.
- Temperatura inicial de la columna: 50 °C por 1 minuto, gradiente de temperatura de 10°C cada minuto hasta llegar a 180 °C y se mantiene por 2 minutos, (posteriormente sube 5 °C hasta llegar a 180 °C se mantiene por 2 minutos), posteriormente el gradiente es de 5 °C cada minuto hasta llegar a los 240 °C y se mantiene por 2 minutos.
- Gas acarreador: helio.
- Gas hidrógeno para el detector de ionización de flama.
- Aire de alta pureza (99.99 %)
- Estándares de referencia SIGMA (Esteres metílicos de palmitato C16, estearato C18, oleato C18:1, linoleato C18:3, araquidato C20:0)
- Pipetas Pasteur.
- KOH al 5 % en MeOH.
- HCl al 10 % en MeOH
- Mezcla de disolventes tolueno -hexano (80:20).
- Trifloruro de boro en metanol.
- Hexano grado cromatográfico.
- Matraz aforado de 5 ml.
- Cinta de teflón.

### Procedimiento.

#### ❖ Esterificación de los ácidos grasos.

En un tubo con tapón de rosca se pesaron 20 mg de aceite en el tubo de ensaye, adicionarle 2 ml de KOH al 5 % en MeOH y taponarlo con cinta teflón (es para evitar fugas), se calienta durante una hora a  $80 \text{ °C} \pm 2$ .

Transcurrido el tiempo sacar y enfriar a temperatura ambiente.

Se destapan los tubos y adicionar 2 ml de HCl al 10 % en MeOH y 100  $\mu$ l de BF<sub>3</sub>, y se vuelve a introducir en el baño durante una hora a 80 °C  $\pm$  2.

Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y transcurrido el tiempo se agregaron 4 ml de H<sub>2</sub>O destilada y 2 ml de la mezcla de disolventes Tolueno:Hexano (80:20), se agitó en un vórtex durante 1 minuto. Extraer la fase superior (orgánica) y colocarlo en el matraz y aforar a 5 ml con la mezcla de disolventes, de este extracto se inyectó 1  $\mu$ l. Al cromatógrafo de gases

La esterificación se llevó a cabo por triplicado, y de cada muestra esterificada se realizó una inyección.

### Cálculos.

De los cromatogramas obtenidos se obtiene la siguiente información:

❖ Perfil cualitativo de ácidos grasos:

Los picos del cromatograma obtenido se comparan e identifican con los correspondientes ácidos grasos del estándar inyectado de acuerdo con sus tiempos de retención ( $t_R$ ).

❖ Perfil cuantitativo de ácidos grasos:

La composición porcentual de la mezcla de ácidos grasos se obtiene refiriendo la superficie de cada pico  $P_i$  a la superficie total, suma de todos los picos ( $\Sigma P_i$ ), en donde se utiliza la siguiente formula:

$$\% \text{ de "X" ácido graso} = \frac{P_i}{\Sigma P_i} = 100$$

Donde:

X = fracción del componente  $i$  en la mezcla de ácidos grasos.

$P_i$  = superficie del pico correspondiente.

## 4.15 EXTRACCIÓN DE LIMONOIDES

### Fundamento.

Esta técnica esta fundamentada para semillas que no se sabe si se encuentran en un periodo maduro o inmaduro es por esto, que su recuperación de limonoides es de 75 al 80 %. Estos compuestos son conocidos como terpenoides compuestos químicos de más de 30 carbonos, y son empleados como insecticidas naturales, lo cual ha propiciado una extensa investigación en el campo de la síntesis de insecticidas. (1,43,50,59,60)

### Material y reactivos.

- ✓ Embudos de separación de 250 ml.
- ✓ Rotavapor marca BUCHI.
- ✓ Metanol-agua (19:1).
- ✓ Hexano (Q.P.)
- ✓ Equipo de Soxhlet

### Procedimiento.

Mediante un equipo de Soxhlet se extrae grasa cruda y limonoides utilizando hexano (Q.P.) el tiempo calculado para este procedimiento fue de 14 horas a 55 °C Después de realizar la extracción del aceite y limonoides se mide el volumen que se tiene al final, y de ahí se hace una relación que por cada 100 ml de volumen de hexano-aceite se le adiciono el mismo volumen de MeOH-H<sub>2</sub>O (19:1), y con la ayuda de embudos de separación se obtuvo la fase acuosa que es en donde se encuentran los limonoides, y en la orgánica esta el aceite.

Se concentro por separado cada una de las fases utilizando el rotavapor .

Al aceite recuperado se le realiza la prueba del índice de acidez y los limonoides obtenidos se guardan en refrigeración, como característica principal son de color amarillo de consistencia viscosa.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 5.1 PARÁMETROS FÍSICOS EN LA SEMILLA DE NAPAHUITE.

En el cuadro 9 se muestran los valores obtenidos de los parámetros físicos de la semilla de Napahuite (*Trichillia hirta*).

CUADRO 9  
Parámetros físicos de la semilla de Napahuite.

|                                   | VALOR OBTENIDO* |
|-----------------------------------|-----------------|
| Peso unitario (g)                 | 0.18 ± 0.03     |
| Peso volumétrico <sup>b</sup> (g) | 246.14 ± 6.61   |
| Número volumétrico <sup>c</sup>   | 43 ± 1.00       |
| Largo (cm)                        | 0.87 ± 0.06     |
| Ancho (cm)                        | 0.67 ± 0.07     |

\* Valor promedio de la determinación realizada por triplicado ± su desviación estándar

<sup>b</sup> Peso de semillas contenidas en una probeta marca Kimax de 100ml, Mex. PE 20°C. N 20024, Tot + 0.60 ml.

<sup>c</sup> Número de semillas contenidas en un volumen de 100 ml.

Se hizo la caracterización de la semilla, en donde físicamente la semilla presentó un aspecto ovalado de color café-anaranjado.

La determinación de los anteriores parámetros físicos en la semilla de Napahuite, es con la finalidad de hacer una rápida comparación con posteriores adquisiciones de este material biológico.

### 5.2 CARACTERIZACIÓN BROMATOLÓGICA DE LA HARINA INTEGRAL Y DESENGRASADA.

En el cuadro 10 se muestra la composición bromatológica de la harina integral y harina desengrasada de Napahuite (*Trichillia hirta*) y los resultados obtenidos en estudios anteriores<sup>(29,42)</sup>.

De los resultados obtenidos se resalta que la harina integral y harina desengrasada de Napahuite presenta altos niveles de grasa y fibra. La concentración de proteína obtenida es mayor que la de un cereal por ejemplo: Trigo 10.5 %, Cebada 11.8 %, Arroz vestido 9.1 % y Maíz 10 %, sin embargo el alto contenido en fibra limita su uso para consumo humano, ya que una dieta abundante en fibra puede provocar problemas estomacales, ya que al hidratarse ocasiona un desequilibrio en el contenido de agua intestinal, originando estreñimiento, además, la fibra se unen a elementos importantes, como calcio, zinc, hierro, magnesio, fósforo y cobre, así como la vitamina B<sub>12</sub> y algunos aminoácidos, lo que provoca

que estos nutrimentos no sean aprovechados, porque se eliminan en las heces, sería recomendable utilizar esta harina para alimentación de rumiantes.

**CUADRO 10**  
**Caracterización bromatológica de la semilla de Napahuite y de estudios previos.**  
**(g / 100 g de M)**

|                     |                              |                        |                                  | Estudios previos                    |                                     |
|---------------------|------------------------------|------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
|                     | Harina integral <sup>a</sup> | Harina integral (B.S.) | Harina desengrasada <sup>a</sup> | Harina integral <sup>b</sup> (B.S.) | Harina integral <sup>c</sup> (B.S.) |
| Humedad             | 0.99 ±0.04                   | ---                    | 3.91 ±0.07                       | ---                                 | ---                                 |
| Cenizas             | 2.78 ±0.05                   | 2.81                   | 3.82 ±0.11                       | 2.37                                | 2.65                                |
| Proteína            | 14.78 ±0.88                  | 14.93                  | 21.94 ±0.01                      | 12.03                               | 14.65                               |
| Grasa               | 44.44 ±0.43                  | 44.98                  | 6.9 ±0.17                        | 49.48                               | 51.51                               |
| Fibra               | 25.37 ±0.03                  | 25.62                  | 38.92 ±1.44                      | 19.97                               | 25.52                               |
| Hidratos de carbono | 11.64                        | 16.03                  | 25.08                            | 19.15                               | 5.66                                |

<sup>a</sup> Valor promedio de la determinación realizada por triplicado ± su desviación estándar.

<sup>b</sup> Fuente (42)

<sup>c</sup> Fuente (29)

(B.S.) Resultado expresado en base seca

Al comparar los resultados de harina integral en base seca con análisis previos, se observa que en los tres casos del estudio se presentan valores altos en fibra, grasa y proteína. Al observar el valor reportado de grasa en el año 2000 (fuente 29) el valor es ligeramente mayor, esto se debe al período de recolección en donde si la semilla es madura el contenido de grasa es mayor, pero en algunos casos es común que en mercados donde se adquieren semillas se mezcle madura con inmadura y tal vez por eso el contenido de aceite en la muestra actual presenta una ligera disminución.

### 5.3 PROTEÍNA VERDADERA Y PROTEÍNA CRUDA.

En el cuadro 11 se reportan los valores obtenidos de proteína verdadera en comparación con la proteína cruda y el % de nitrógeno no proteínico tanto para la harina integral y harina desengrasada.

**CUADRO 11**  
**Proteína verdadera y cruda de harina integral y desengrasada y % de nitrógeno no proteínico de Napahuite.**

| MUESTRAS <sup>a</sup> | % PROTEÍNA CRUDA | % PROTEÍNA VERDADERA | % DE NITRÓGENO NO PROTEÍNICO. |
|-----------------------|------------------|----------------------|-------------------------------|
| Harina integral       | 14.78± 0.88      | 10.75± 0.62          | 27.27                         |
| Harina desengrasada   | 21.94± 0.88      | 19.35± 0.01          | 11.80                         |

<sup>a</sup> Valor promedio de la determinación realizada por triplicado ± su desviación estándar.

Como se puede observar en el cuadro 11, la harina integral tiene un alto contenido de nitrógeno no proteínico lo que reduce el contenido de proteína original, este parámetro debe tomarse en cuenta, ya que una proporción importante de la proteína cruda esta constituida por compuestos nitrogenados no proteínicos que pueden enmascarar el verdadero valor nutritivo de las semillas en estudio ya sean Leguminosas o Meliáceas.<sup>(53,62,63)</sup>

**CUADRO 12**

**Contenido de proteína verdadera, cruda y % de nitrógeno no proteínico en tres muestras de harina desengrasada.**

| HARINA DESENGRASADA                                   | % PROTEÍNA CRUDA | % PROTEÍNA VERDADERA | % NITRÓGENO NO PROTEÍNICÓ |
|---|------------------|----------------------|---------------------------|
| NAPAHUITE ( <i>Trichilia hirta</i> ) <sup>a</sup>     | 21.94 ± 0.88     | 19.25 ± 0.01         | 11.80                     |
| CACAHUANANO ( <i>Girlicida septium</i> ) <sup>a</sup> | 59.68            | 34.14                | 42.35                     |
| SOYA ( <i>Glicine max</i> ) <sup>b</sup>              | 36.73            | 34.79                | 5.29                      |

<sup>a</sup> Valor promedio de la realización por triplicado ± su desviación estándar

<sup>b</sup> Fuente (31)

Si comparamos los valores del cuadro 12 observamos que la harina desengrasada de soya (*Glicine max*) contiene 5.29 % de nitrógeno no proteínico por lo que el valor nutritivo es mayor que el de Napahuite que tiene 11.80 % de compuestos nitrogenados no proteínicos, sin embargo si comparamos el valor obtenido de Napahuite con el de cacahuanano (*Girlicida septium*) observamos que el % de proteína original es mayor, en Napahuite que en cacahuanano ya que al tener un alto contenido de proteína, este se ve disminuido por tener un porcentaje considerable de nitrógeno no proteínico 42.35 %.

## 5.4 TOXICOLOGÍA ANALÍTICA DE LA HARINA DESENGRASADA DE NAPAHUITE.

En el cuadro 13 se presentan el contenido de factores tóxicos y antinutricionales que se determinaron en la harina desengrasada de la semilla de Napahuite.

A continuación se discuten cada uno de los tóxicos analizados, de acuerdo a los resultados obtenidos:

### ❖ **Lectinas.**

En la prueba de hemaglutininas por el método enlistado, se considera que un título mayor a 10. representa riesgo para la salud, ya que algunas lectinas poseen una afinidad por las células del intestino; sin embargo el título obtenido para Napahuite se encuentra por debajo del límite antes mencionado.

❖ **Glucósidos cianogénicos.**

Al realizar visualmente la detección cualitativa, esta fue negativa ya que los tubos que contienen la muestra no presentaron ninguna coloración café-rojiza en el papel indicador, lo que nos dice que la harina desengrasada del Napahuite presenta un valor menor al límite de detección (1 mg HCN / 100 g de M).

**CUADRO 13**  
Factores tóxicos y antinutricionales en la semilla de Napahuite (*Trichilia hirta*).

| FACTOR*   | UNIDADES   | HARINA<br>DESENGRASADA | MATERIAL ORIGINAL |
|---|--|------------------------|-------------------|
| Lectinas<br>(Tóxico / termolabil)                         | Título de aglutinación                                 | 6                      | 4                 |
| Glucósidos cianogénicos<br>(tóxico / termolabil)          | mg HCN / 100 g de M                                    | <1                     | <1                |
| Inhibidores de tripsina<br>(antinutricional / termolabil) | UTI / mg de M  | 0.61 ± 0.04            | 0.37              |
| Taninos<br>(antinutricional / termoestable)               | % de ácido tánico                                      | 1.40 ± 0.03            | 0.86              |
| Alcaloides<br>(tóxico / termoestable)                     | Prueba cualitativa                                     | Negativo               | Negativo          |
| Alcaloides en la grasa<br>(tóxico / termoestable)         | Prueba cualitativa                                     | Negativo               | Negativo          |
| Fitatos<br>(antinutricional / termoestable)               | % de ácido fítico                                      | 2.17 ± 0.15            | 1.33              |
| Nitratos<br>(tóxico / termoestable)                       | % de nitratos  | 0.19 ± 0.05            | 0.12              |
| Saponinas<br>(tóxico / termoestable)                      | Unidades de hemólisis / mg<br>de M<br>(U.H. / mg de M) | 43.48 ± 0.28           | 26.60             |

\* valor promedio de la realización por triplicado ± su desviación estándar.

❖ **Determinación de inhibidores de tripsina.**

El contenido de inhibidores de Tripsina es menor a 10 unidades de tripsina inhibida por mg de muestra, lo cual no se considera de riesgo, por lo tanto este factor antinutricional no presenta relevancia.

❖ **Determinación de taninos.**

El contenido de ácido tánico en la semilla de Napahuite es de 1.40 %, este valor es parecido al obtenido en el frijol colorado con 1.42 %.<sup>(58)</sup> Por otro lado, la dosis diaria admisible (DDA) para el ácido tánico es de 500 mg / kg p.c. / día.<sup>(54)</sup> Por lo tanto, el valor promedio del % de taninos de la muestra no presenta un riesgo para la salud.

❖ **Determinación de alcaloides.**

Tanto en la harina desengrasada como en el aceite de la semilla de Napahuite, no hay presencia de alcaloides, debido a que las fracciones de las muestras no presentaron reacción positiva con al menos 6 de los 7 reactivos que se utilizan para hacer la detección de este tipo de tóxicos.<sup>(20)</sup>

#### ❖ **Determinación de ácido fítico.**

En el caso del contenido de ácido fítico, se sabe que los alimentos con un contenido mayor de 400 mg / 100 g muestra, son considerados alimentos desmineralizantes,<sup>(29)</sup> por lo que la harina de Napahuite supera el valor antes descrito ya que contiene 2170 mg / 100g muestra, lo que implica que este factor antinutricional es considerado perjudicial para la salud, lo cual sería una limitante para su posible utilización, pues se trata de un compuesto termoestable, lo que hace difícil, la destoxificación de la harina, sería conveniente si se desea emplear para consumo mezclar la harina con algún otro producto, de modo que el ácido fítico sea diluido.

#### ❖ **Determinación de nitratos.**

Para los nitratos la DDA es de 3.65 mg / Kg p.c. / día,<sup>(32)</sup> en el caso de la harina de Napahuite el contenido es elevado 190 mg / 100 g muestra, lo cual se considera tóxico y al ser termoestable complica la destoxificación de la harina.

Al revisar en tablas se observa que para causar un daño tóxico en adultos se debe ingerir mas de 248 mg de nitratos al día, sin embargo de debe de tomar en cuenta que en individuos sanos esta cantidad varía ya que una parte de los nitratos se absorbe rápidamente en el tracto intestinal y pasa a la sangre, siendo parcialmente metabolizada por la orina, en cambio para los infantes hablar de cantidades como la antes descrita es un riesgo latente, ya que implica un trastorno serio.

#### ❖ **Determinación de saponinas.**

En estudios anteriores realizados con la misma metodología, se estudiaron diversas muestras que se conocen contienen saponinas.<sup>(38)</sup> En el cuadro 14 se presentan algunos datos, los cuales serán de utilidad como parámetro de comparación.

**CUADRO 14**  
**Contenido de saponinas en muestras vegetales.<sup>(38)</sup>**

| Muestra vegetal | U.H. / mg M. |
|-----------------|--------------|
| Maguey          | 341.4        |
| Haba            | 42.7         |
| Soya            | 21.3         |

Al cuantificar y expresar el resultado en Unidades hemolíticas / mg M, se puede comparar el resultado obtenido en este estudio, con los reportados en un trabajo anterior, en donde se observa que existen muestras como el maguey donde el contenido de saponinas es muy elevado comparado con la harina de Napahuite, y en muestras de consumo humano como el

haba donde su valor es muy parecido al obtenido en este trabajo por lo que no se consideraría tóxico.

## 5.5 CONTENIDO DE CERAS.

La grasa cruda de Napahuite presenta una considerable cantidad de ceras ya que tuvo un valor representativo al 25 % de la fracción extraída con hexano, y es necesaria su remoción ya que forma una pasta con características de adherencia que impide continuar con el proceso de refinación.

CUADRO 15  
Contenido de ceras en el Napahuite

| MUESTRA                         | % DE CERAS* |
|---------------------------------|-------------|
| Grasa cruda extraída con hexano | 25 ± 1.98   |

\* valor promedio de la determinación por triplicado ± su desviación estándar.

Al extraer ceras de la grasa de Napahuite, podría tener una utilidad que dependería de la composición y toxicidad, un ejemplo sería en la industria alimenticia donde utilizan ceras como la de candelilla para evitar que en frutos que son exportados pierdan humedad y sean atacados por gusanos y hormiga blanca tropical, si fuera tóxico en alimentos su uso recomendado sería en la industria de pinturas y barnices, ya que podrían elaborarse pastas para el lustrado de zapatos, removedores de pinturas, selladores de goma, en la manufactura de celuloide, etc; todo dependería de su composición de la cera de Napahuite y de ahí se determinaría el uso adecuado.<sup>(55)</sup>

## 5.6 PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS.

En el cuadro 16 se presentan los valores de los parámetros fisicoquímicos obtenidos en el aceite crudo y refinado (sin cera) de la semilla de Napahuite (*Trichilia hirta*) los cuales entran en el rango del grupo oleico-linoleico, con excepción del índice de acidez.

De los valores presentados en el cuadro anterior se observan valores altos en el índice de yodo, índice de refracción y densidad, lo que indica que se tiene una mezcla considerable de ácidos grasos insaturados. El índice de saponificación de los aceites comestibles más comunes oscila de 170 a 265 mg KOH/g de aceite<sup>(56)</sup>, el aceite de Napahuite se ubica dentro de este valor.

De los estudios que se han hecho a la semilla de *Trichilia hirta* se ha reportado que contienen un alto contenido de compuestos terpénicos llamados limonoides, los cuales

tienen como característica principal aumentar la acidez del aceite<sup>(51, 52)</sup>, de aquí surge la necesidad de eliminarlos, donde la técnica propuesta solo extrae del 75 al 85 % limonoides; por tal motivo, el índice de acidez del aceite refinado esta todavía arriba del nivel requerido.

**CUADRO 16**  
Parámetros fisicoquímicos del aceite crudo y refinado de la semilla de Napahuite (*Trichilia hirta*).

| PARÁMETRO <sup>a</sup>                         | GRASA CRUDA   | ACEITE REFINADO | GRUPO OLEICO - LINOLEICO <sup>b</sup> |
|--|---------------|-----------------|---------------------------------------|
| Punto de fusión (°C)                           | 0 a 8         | 0 a 6           | -5 a 29                               |
| Gravedad específica (25/25°C)                  | 0.94 ± 0.0007 | 0.93 ± 0.003    | 0.909-0.920                           |
| Índice de yodo (Hanus) (gI /100 g de aceite)   | 80.53 ± 1.91  | 99.14 ± 0.81    | 75 a 150                              |
| Índice de saponificación (mg KOH/g de aceite)  | 199.21 ± 2.8  | 193.23 ± 0.28   | 170 a 265                             |
| Índice de refracción (25°C)                    | 1.473 ± 0.001 | 1.488 ± 0.004   | 1.436-1.474                           |
| Índice de acidez <sup>c</sup> (% ácido Oleico) | 2.54 ± 0.15   | 1.58 ± 0.21     | 0.50                                  |

<sup>a</sup> Valor promedio de la determinación realizada por triplicado ± su desviación estándar.

<sup>b</sup> Fuente (55,56)

<sup>c</sup> Valor obtenido, con previa eliminación de limonoides en el aceite.

El valor obtenido en el índice de acidez supera, al valor recomendado y se observa en el cuadro 17 que el aceite crudo y refinado con limonoides el valor de acidez es alto, y cuando se eliminan estos compuestos terpénicos su acidez disminuye drásticamente pero aún así su valor es significativo al compararlo con el valor de 0.5 % recomendado para un aceite refinado, esto indica que todavía hay limonoides en el aceite.

**CUADRO 17**  
Valores obtenidos de índice de acidez de aceite crudo y refinado (*Trichilia hirta*) con y sin limonoides

| PARAMETRO <sup>a</sup>                   | GRASA CRUDA ( <i>Trichilia hirta</i> ) | ACEITE REFINADO ( <i>Trichilia hirta</i> ) |
|--|--|--|
| Índice de acidez (aceite con limonoides) | 20.54 ± 0.55                           | 18.70 ± 0.70                               |
| Índice de acidez (aceite sin limonoides) | 2.54 ± 0.15                            | 1.58 ± 0.21                                |

<sup>a</sup> Valor promedio de la determinación realizada por triplicado ± su desviación estándar.

## 5.7 VALOR ENERGÉTICO DE LA SEMILLA Y ACEITE DE NAPAHUITE.

La semilla de esta Meliáceae tiene un alto contenido de grasa, lo que contribuye a un valor de energía gruesa de 30.17 KJ /g en harina integral y 40.91 KJ /g en aceite. En el cuadro 18 se presentan los valores energéticos (energía metabolizable) de diversos granos usados como alimentos y se hace la comparación con la semilla de Napahuite.<sup>(31,59,61)</sup>

**CUADRO 18**  
Valor energético del Napahuite, de otras leguminosas y cereales.

| Semilla                                     | Nombre científico            | Densidad calorica (KJ / g) |
|---|------------------------------|----------------------------|
| Napahuite <sup>a</sup><br>(Harina Integral) | <i>Trichilia hirta</i>       | 30.17± 0.03                |
| Arroz <sup>b</sup>                          | <i>Oryza sativa L.</i>       | 15.38                      |
| Grano de trigo <sup>b</sup>                 | <i>Triticum sativum Lam</i>  | 15.48                      |
| Cacahuete crudo <sup>b</sup>                | <i>Arachys hypogaea L.</i>   | 19.60                      |
| Frijol negro <sup>b</sup>                   | <i>Phaseolus vulgaris L.</i> | 13.39                      |
| Semilla de lenteja <sup>b</sup>             | <i>Ervum lens L.</i>         | 13.76                      |
| Semilla de soya <sup>b</sup>                | <i>Glycine max</i>           | 16.52                      |

<sup>a</sup> Valor promedio de la determinación realizada por triplicado ± desviación estándar.

<sup>b</sup> Fuente (57)

El valor observado en el cuadro 18 para la muestra de Napahuite (harina integral) es la energía gruesa, y los otros son reportados de tablas y se representan como energía metabolizable, los valores no son equiparables ya que el término de energía gruesa no tiene un valor práctico desde el punto de vista alimenticio debido a que la cantidad de energía que obtiene el cuerpo del alimento es menor que la energía producida cuando se quema el alimento en la bomba calorimétrica. Por lo anterior fue necesario calcular la energía digerible (ED) la cual nos permite determinar la energía que aportaran los nutrimentos digeribles como carbohidratos, grasas y proteínas y la energía metabolizable (EM), nos indica el contenido de energía con la que se dispone para efectuar alguna función específica, es aquí donde radica su importancia ya que proporciona la energía biodisponible del alimento, los valores obtenidos para harina integral fue de 23.28 KJ /g para la (ED) y la energía metabolizable fue de 28.11 KJ / g., este valor calculado para (EM) presenta un contenido energético elevado comparado con las otras leguminosas y cereales debido a su alto porcentaje de grasa, por lo tanto esta semilla en estudio podría ser utilizada como un buen componente energético para alimentación animal.

**CUADRO 19**  
**Densidad calórica del aceite.**

| Aceite                 | Nombre científico      | Densidad calórica <sup>a</sup> |
|------------------------|------------------------|--------------------------------|
| Napahuite <sup>b</sup> | <i>Trichilia hirta</i> | 40.91 ± 0.29                   |
| Malz                   | <i>Zea mays L.</i>     | 37.65                          |
| Soya                   | <i>Glicine max</i>     | 37.65                          |

<sup>a</sup> Fuente (61)

<sup>b</sup> Valor promedio de la determinación realizada por triplicado ± su desviación estándar.

En el cuadro 19 se observa el contenido de energía gruesa del aceite crudo de la semilla de Napahuite y para compararlo con las otras muestras de aceite se reporta como 18.41 KJ / g de energía digerible (ED) y 38.86 KJ / g de energía metabolizable (EM) y al comparar con dos aceites de consumo humano se observa que el valor del aceite de Napahuite es ligeramente mayor, por lo que podría ser considerado como una buena fuente energética.

### 5.8 PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS.

En el cuadro 20 se muestra el perfil de ácidos grasos del aceite crudo y refinado de Napahuite, destacándose un contenido elevado de ácido oleico y linoleico, por lo que se incluye dentro del grupo oleico- linoleico, además tiene un contenido de ácido linolénico (C<sub>18:3</sub>), menor al 3 % por lo que se considera un aceite estable, valores mayores al 3 % son aceites susceptibles al fenómeno de reversión y enranciamiento.

**CUADRO 20**  
**Perfil de ácidos grasos del extracto lipídico crudo y refinado de la semilla de Napahuite**  
**(*Trichilia hirta*).**

| Acido graso | Insaturaciones    | Grasa cruda de Napahuite <sup>a</sup> (%) | Aceite refinado de Napahuite <sup>a</sup> (%) |
|-------------|-------------------|---|---|
| Palmítico   | C <sub>16:1</sub> | 24.17 ± 3.1                               | 26.13 ± 3.25                                  |
| Estearico   | C <sub>18:0</sub> | 10.01 ± 1.1                               | 11.11 ± 1.17                                  |
| Oleico      | C <sub>18:1</sub> | 32.18 ± 6.24                              | 23.24 ± 8.58                                  |
| Linoleico   | C <sub>18:2</sub> | 30.57 ± 3.1                               | 35.68 ± 3.67                                  |
| Linolénico  | C <sub>18:3</sub> | 3.06 ± 0.98                               | 2.59 ± 1.90                                   |

<sup>a</sup> Valor promedio de la determinación realizada por triplicado ± su desviación estándar.

Como se observa en el cuadro 20, el aceite crudo y refinado de la semilla de Napahuite presenta un elevado porcentaje del ácido graso indispensable linoleico. Comparando el

aceite crudo de la semilla de Napahuite con estudios previos realizados<sup>(42)</sup> se observa que no presenta variación en el porcentaje de los ácidos grasos. Por lo tanto este aceite podría considerarse como comestible, sin embargo la presencia de limonoides (insecticidas naturales) impide este empleo, sería necesario estudios más exhaustivos, para obtener una técnica con la cual se eliminen el 100 % del contenido de limonoides.

El valor obtenido del ácido graso linoléico en el aceite refinado es menor al 3 % por lo que no es susceptible al fenómeno de enranciamiento y reversión.

En los cromatogramas de perfil de ácidos grasos no se presentó ningún pico desconocido que indicara la presencia de algún ácido graso no común con posibles características de toxicidad, como el erúico. (anexo I), los picos pequeños son no identificables indicando que sería necesario inyectar un estándar con mas esteres metílicos para hacer su respectiva identificación.

## VI. CONCLUSIONES

- ✓ En la harina de la semilla de Napahuite (*Trichilia hirta*) se obtuvo un valor de proteína similar al de un cereal, pero al tener una cantidad de fibra considerable, no es recomendable para consumo humano y monogástricos, pero sería viable para consumo de rumiantes.
- ✓ El presentar valores significativos de fitatos y nitratos, hace de la harina de Napahuite tóxica y antinutricional para consumo humano, sería conveniente si se desea emplear en alimentación animal, mezclar la harina con algún otro producto, de modo que tanto los fitatos y nitratos sean diluidos.
- ✓ Este material vegetal presenta ciertos inconvenientes en su uso directo en la alimentación, por lo cual es recomendable la disminución de los tóxicos y aprovechar los subproductos como los limonoides.
- ✓ En el caso de los parámetros fisicoquímicos en la grasa cruda y el aceite refinado de la semilla de Napahuite los valores caen dentro del grupo oleico-linoleico a excepción del índice de acidez, como consecuencia se ve limitado para uso comercial.
- ✓ El aceite de Napahuite (*Trichilia hirta*) tiene un alto contenido energético (40.91%), por lo cual sería una buena fuente energética complementaria.
- ✓ El perfil de ácidos grasos de la grasa cruda y el aceite refinado no muestra concentraciones significativas de ácidos grasos poco comunes, y presenta un contenido significativo de ácido linoleico (> 30 %) el cual es esencial en la dieta humana

## BIBLIOGRAFÍA

1. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. Encuesta Nacional de Alimentación y Nutrición en el medio rural 1996. INNSZ, México, D.F., pág. 51-58. (1996)
2. Pennington, T.D. Meliaceae. Flora Neotropical Monograph. New York No 28: pp. 26-85. (1981)
3. Ramírez, M del C. Configuración absoluta y análisis conformacional de dolabelanos con actividad insecticida de la especie *Trichilia trifolia* (Meliaceae). Tesis de Doctorado. México, D.F., UNAM, pág 10-11, 14-15, 25-26. (2002)
4. Njembro, A. Árboles y arbustos útiles de México naturales e introducidos. Ed. Limusa México, D.F., pág 183. (1998)
5. Niembro, A. Semillas de plantas leñosas (Morfología comparada). Ed. Limusa México, D.F., pág 19-20. (1989)
6. Martínez, M. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de cultura económica, México, D.F., pág 193, 1122. (1987)
7. Matisek, R., Schnepel, F., Steiner, G. Análisis de los alimentos. Fundamentos, métodos-aplicaciones. Ed. Acribia Zaragoza, pág 31-75. (1990).
8. Madrid, V., Cenzaño, I., Madrid, I. Manual de aceites y grasas comestibles. Ed. Acribia Zaragoza pág 13-19. (1997)
9. Madrid, A.V., Producción, Análisis y Control de Calidad de Aceites y grasas comestibles ED. AMV. Madrid, pág 133-166 (1988)
10. Kirk, R., Sawyer, R., Egan, H. Composición y análisis de alimentos de Pearson. CECSA, 2ª edición, México D.F., pág. 12-29, 36-37, 119-250, 397. (1996)
11. Ziller, S. Grasas y aceites alimentarios. Zaragoza, pág 2-39. (1996)
12. Patterson, H. Bleaching and Purifying Fats and Oils. Theory and Practice. Illinois., pp. 1-60. (1992)
13. Badui, S. Química de los alimentos. Ed. alhambra México, D.F., pág 233-237. (1990)
14. Storch, J. Fundamentos de la cromatografía de gases. Ed. Alhambra, Zaragoza, pág 6-21. (1974)
15. Schumburg, G. Gas Chromatography. Ed. Gerhara, Weinheim, pp. 85-87, 123-124. (1990)

16. Partearroyo, M.A., Fernández-Quintela, A y Cid, C. Sustancias antinutritivas en alimentos de origen vegetal y su significado en la alimentación humana. *Alimentaria*. 267 (Nov): 115-120. (1995)
17. Martínez, B. y Rincón, F. Inhibidores de tripsina I: Características y significado en la alimentación humana. *Alimentaria*, 279 (Ene-Feb): 27-31. (1997)
18. Martínez, B. y Rincón, F. Inhibidores de tripsina II: Efectos del procesado y métodos de determinación. *Alimentaria*, 279 (Ene-Feb):33-38. (1997)
19. Jaffe, W., Levy, A., Gonzalez, D. Isolation and partial characterization of bean phytohemagglutinins. *Phytochem*.13: 2685-2693. (1974)
20. Hultin, E. And Tursell K. Alkaloid-screening of swedish plants. *Phytochem.*: 4, pp. 425-433. (1965).
21. Pelletier, S. Alkaloids: Chemical and biological perspectives. Ed. Willey and sons, New york. pág 1-7 (1982)
22. Fennema, R.O. Química de los alimentos. Acribia, Zaragoza, pág. 315-317, 367-371, (1993)
23. Lindner, E. Toxicología de los alimentos. Acribia, 2ª edic., Zaragoza, pág. 82-84, (1995)
24. Montgomery, R. Cyanogens. In toxic constituents of plant foodstuffs. Ed. Liener. New york. pp. 1-23. (1980)
25. Winkler, W. O. Report on hydrocyanic glucosides. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* pp. 3, 34, 541-548. (1951)
26. Haug, W and Lantsch, H.J. Sensitive Method for the Rapid Determination of Phytate in Cereal and Products. *J. Sci. Food Agric*, 34:1423-1426, (1983)
27. Derache, R. Toxicología y seguridad de los alimentos. Zaragoza, pág 111-121. (1990)
28. Silvestre, A.A., Toxicología de los Alimentos. Ed. Hemisferio sur, 2ª edic., Buenos Aires. Pág 73-77 (1996)
29. López, E.M. Determinación de factores tóxicos en varias almendras no tradicionales con potencial aporte de proteína y grasa dietética. Tesis de licenciatura, UNAM, México, D.F., pág 34-39, 56-62. (2000)
30. Cueto, N. Efecto de la germinación sobre el contenido de proteína y de factores antinutricionales en algunas semillas comestibles. Tesis UNAM México, D.F., pág 34-55. (2002)

31. Martínez, A. Evaluación bromatológica y Toxicologica de la fracción proteínica de la semilla de cacahuanano (*Glicirida sepium*). Tesis UNAM., México, D.F., pág 70-72. (2001).
32. Farré, R. y Frigola, C. Nitratos: aspectos bromatológicos, toxicológicos y analíticos. Alimentaria, 179 (Ene-Feb): 15-21 (1987)
33. Williams, S. Association of official agricultural Chemists. "Official Methods of Analysis" Washington D.C., 12ª edición pág 238. (1975)
34. Helrich, K., Williams S. Official Methods of Analysis of the Association of official Analytical Chemists. 15 th. Edition, Published by AOAC, Inc. Vol I, pp. 17-18, 40,62 y 69-83, Vol. II pág 1012. Arlington. (1990).
35. International for Standarization Organization. Sorghum. Determination of tannin content (ISO9648), ISO, 1ª edición., (1988)
36. Cataldo, D., Haroon, M., Schrader, L. and Youngs, V. Rapid colorimetric determination of nitrate in plan tissue by nitration of salicylic acid. Communication in soil science and plant analysis. 6: 71-80. (1975)
37. Kakade, M., Rackis, J., McGhee, J. and Puski, J. Determination of trypsin inhibitor of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. Cereal Chem. 51: 376-382, (1974)
38. Girón, M. Determinación Semicuantitativa de Saponinas en Muestras Vegetales aprovechando su capacidad hemolítica. Tesis, Facultad de Química. UNAM, México, D.F. (1992).
39. Lucas, B. and Sotelo, A. A simplified test for quantification of cyanogenic glucosides in wild cultivated seeds. Nutr. Rep. Int. 29:711-719, (1984)
40. Harris, C. Análisis químico cuantitativo, Iberoamericana., 1ª edición , México, D.F., pág 637-653. (1990).
41. Laureles, L. Variability in fatty acid and triacylglycerol composition of the oil of coconut (*Cocosnucifora L.*) Hybrids and their parentals., J. Agric. Food Chem., 50:1581-1585 (2002)
42. Sotelo, A., Lucas, B., Garza, L. and Giral, F. Characteristic and Fatty Content of the Fat of Seed of Nine Wild Mexican Plants. J. Agric. Food Chem., 38: pp 1503-1505. (1990)
43. Cortez, D., Viera, P., Fernández, J. And Ferreira, G. Limonoids from *Trichilia hirta*. Phytochem: 31: pp. 625-628. (1992)
44. Chan, R. and Taylor, D. Hirtin and Deacetylhirtin: new "limonoids" from *Trichilia hirta*. J. Chem. Comm. No 7. pp. 206-207. (1966)

45. Solomons, G. Química Orgánica 2ª edición, Ed. Limusa, México D.F. pág 1256-1257 (1995)
46. Tiwalade, A. and Saburi, A. Prieurianoside a prolimonoid glucoside from the leaves of *Trichilia prieuriana*. Phytochem. 54: 867-870 (2000)
47. Akinniyi, J., Connolly, J., Mulholland, D., Rycroft, D. and Taylor, D. Limonoid extractives from *Turrea floribunda* and *T. obtusifolia*. Phytochem. 25: 2187-2189 (1986)
48. Mulholland, D and Taylor, D. Limonoid from the seed of the natal mahogany *Trichilia dregeana*. Phytochem. 19: 2421,2425 (1980)
49. Govindachari, T., Narasimhan, N., Suresh, G., Parto, P and Gopalakrishnan, g. Insect antifeedant and growth-regulating activities of salannin and other C-seco limonoids from *Neem oil* in relation to azadirachtin. J. of chem. Eco. 22: 1453-1461. (1996).
50. Arenas, C and Rodriguez, L. Limonoids from *Trichilia havanensis*. Phytochem. 29: 2953-2956 (1990)
51. Bentley, M., Rajab, M., Mendel, M and alford, R. Limonoid model insect antifeedants. J. Agric. Food. Chem. 38: 1400-1403 (1990)
52. Brown, D. and Taylor, D. Limonoid extractives from *Aphanamixis polystacha*. Phytochem. 17: 1995-1999 (1978)
53. Lucas, B., Guerrero, A., Sigales, L. and Sotelo, A true proteins content and non protein aminoacids presents in legumes seeds. Nutr. Rep. Int. 37:(3) 545-553 (1995)
54. Hidalgo, A.G. Adaptación y validación de métodos cuantitativos para determinar Nitratos y Taninos en muestras vegetales. Tesis de Licenciatura, UNAM, México. D.F., pág 4-18,29, 115-119, (1999)
55. Formo, M., Jungermann, E., Norris, F. And Sonntag. I. Bailey's Industrial oils and Fat Products. Volumen I, New York., pág 352-423. (1979)
56. Hart, L., Análisis moderno de los alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza pág 343-356. (1998)
57. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. Tablas de Composición de Alimentos. Subdirección de Nutrición Experimental y Ciencia de los Alimentos, México. D.F., pág 1,15,29,33,41. 1996.
58. Castillo, J.C. Caracterización Bromatológica de varias semillas de frutos con potencial aporte de proteína y grasa dietética. Tesis Licenciatura UNAM., México D.F., pág.15-17. (1997)
59. Matthew, L. and Stanley, R. Métodos de laboratorio. Ed. Interamericana., New York., pág 65. (1972)

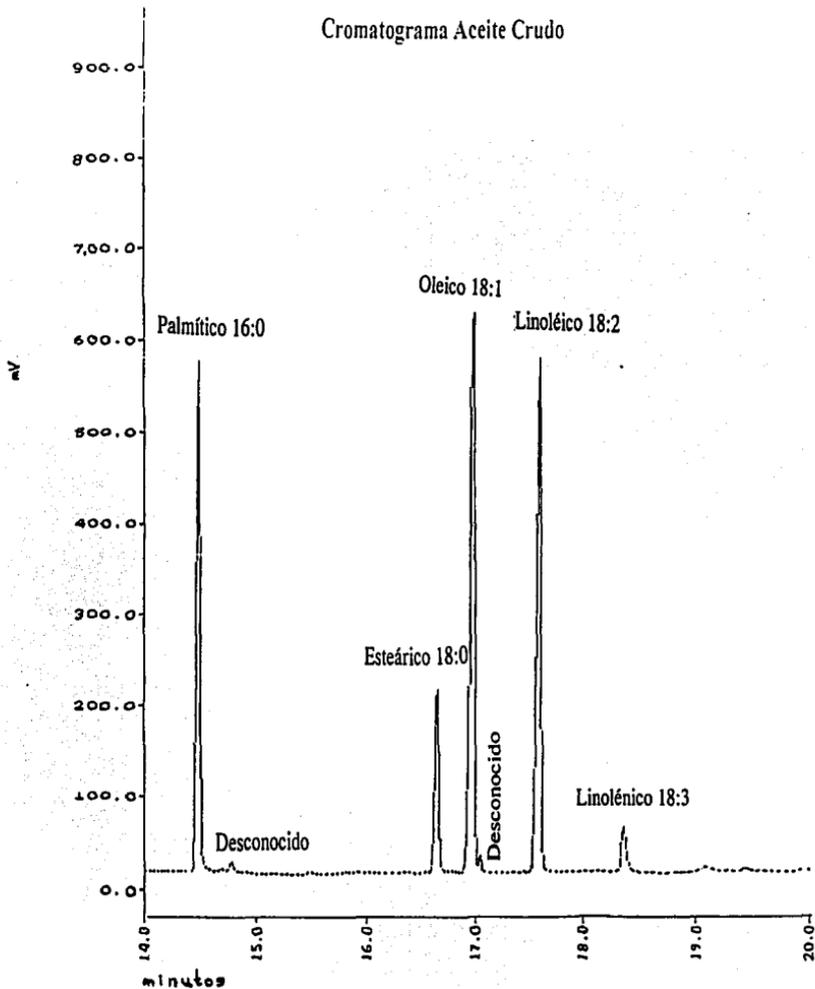
60. Sánchez, M., Desterpenación de Aceites Esenciales de Cítricos. Alimentaria: 73. Pág. 111-121. (2002)
61. Fisher, P. Valor Nutritivo de los Alimentos, Ed. Limusa and Willey., New york, pág 17-23 (1972)
62. Hernández, T., Hernández, A. y Martínez, C. Calidad de proteínas concepto y evaluación. Alimentaria 274 (Jul-Ago): 27-37, (1996)
63. Periago, M., Martínez, M y Rincón, F. El contenido de nitrógeno no proteico en legumbres de la dieta mediterránea como Factor Limitante de su Valor Nutritivo. Alimentaria, 234 (Jul-Ago): 51-54, (1992)

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

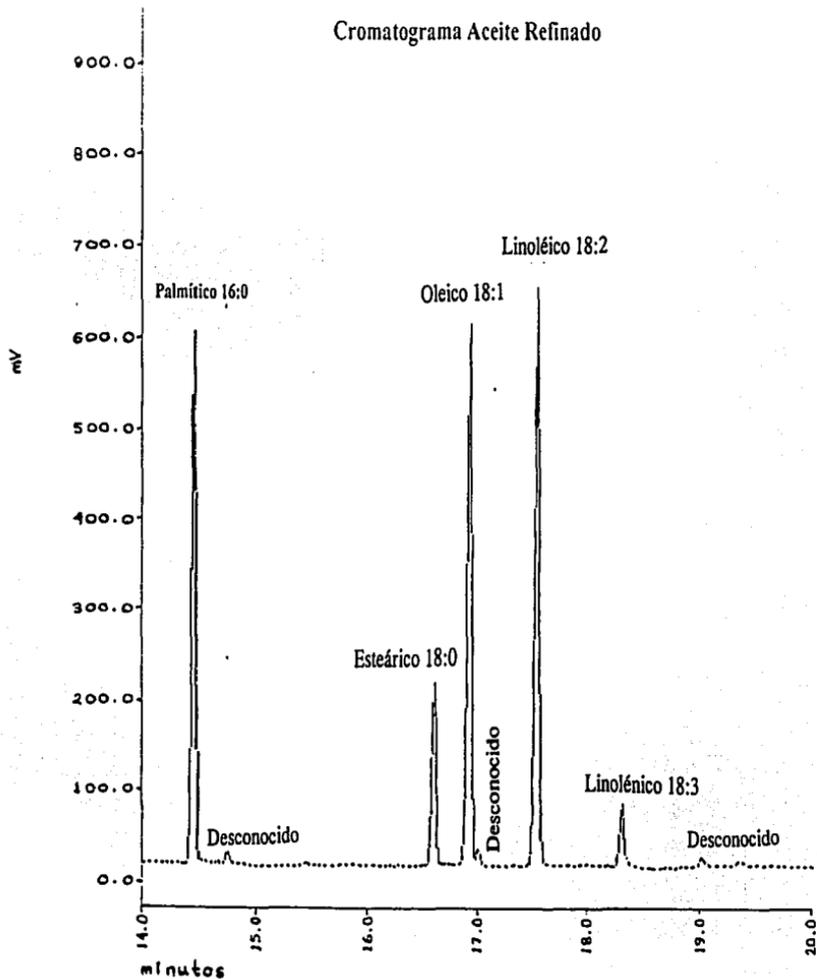
ANEXO I

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# Cromatograma Aceite Crudo



# Cromatograma Aceite Refinado



82