



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**EVALUACIÓN NUTRIMENTAL Y TOXICOLÓGICA DE
ALGUNAS PLANTAS CULTIVABLES Y
SILVESTRES MEXICANAS**

T E S I S

Que para obtener el Título de

QUÍMICO DE ALIMENTOS

P r e s e n t a

RENÉ VÍCTOR CAMPOS HERNÁNDEZ



México, DF.

2006.



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.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por darme la fuerza suficiente para lograr esta meta.

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Por haber sido mi segunda casa y brindarme la oportunidad de crecer en ella.

A la Facultad de Química y a los Profesores

Por haber guiado mi camino hasta este momento.

A mis Padres

*Como un testimonio de cariño y eterno agradecimiento por mi existencia, valores morales en mi formación profesional, por que sin escatimar esfuerzo alguno han sacrificado gran parte de su vida para formarme y porque nunca podré pagar todos sus desvelos ni aun con la riqueza mas grande del mundo, por lo que soy y por todo el tiempo que les robe pensando en mi.....
GRACIAS!!!!!!!!!!!!!! CON AMOR Y RESPETO.*

A mis hermanos

Por que gracias a su apoyo y cariño eh logrado llegar a esta meta, con mucho amor y cariño para ustedes.

A mis abuelos

Como un testimonio de gratitud por haber significado la inspiración que necesitaba, gracias a sus bendiciones y a su amor.

A mi familia

Por la herencia mas valiosa que podía recibir, fruto del inmenso apoyo y confianza que en mi se deposito para que los esfuerzos y sacrificios hechos por mi no fueran en vano. Con admiración y respeto.

A mi novia

Por el cariño y amor que me haz dado, te agradezco con infinita ternura por el aliento que me brindas para continuar día con día adelante. TE AMO.

A los y las de la oficina

No es fácil llegar, se necesita ahínco, lucha y deseo, pero sobretodo apoyo como el que eh recibido durante este tiempo de parte de ustedes. Los aprecio mucho.

A mis amigas y amigos

Que me brindaron el apoyo incondicional, su comprensión y su gran amistad.

A mi asesora M. en C. Ángela Sotelo

Por el apoyo brindado durante el tiempo de elaboración de este trabajo.

A mi asesora Técnica M. en C. Rosa María Argote

Por el apoyo y cariño brindado durante el tiempo compartido.

A mi Honorable jurado

Por la dedicación a la culminación de este gran logro, gracias por sus palabras sabias y consejos.

ÍNDICE

CAPITULO 1 RESUMEN	1
CAPITULO 2 INTRODUCCIÓN	3
CAPITULO 3 OBJETIVOS	5
3.1 Objetivo general	5
3.2 Objetivos específicos	5
CAPITULO 4 ANTECEDENTES	6
4.1 Plantas cultivables y silvestres	6
Tabla 1 Análisis bromatológico de chicozapote y zapote	8
Tabla 2 Análisis bromatológico de semilla de calabaza	10
Tabla 3 Análisis bromatológico de pepino kakuuk	11
4.2 Azucares	11
4.3 Factores tóxicos	12
4.3.1 Alcaloides	13
4.3.2 Glucósidos cianogénicos	13
4.3.3 Hemaglutininas o lectinas	14
4.4 Factores antinutricionales	15
4.4.1 Ácido fítico	15
4.4.2 Inhibidores de proteasas	15
4.4.3 Taninos	16
4.5 Rumiantes	17
4.5.1 Alimentación de rumiantes	18
4.5.2 Digestión ruminal	19
4.5.3 Características del rumen	20
Tabla d Requerimientos nutricionales para animales en etapa de desarrollo	22
CAPITULO 5 METODOLOGÍA	23
5.1 Diagrama general	23
5.2 Acondicionamiento de la muestra	24
5.3 Análisis proximal	25
5.3.1 Determinación de humedad	25
5.3.1.1 Fundamento	26
5.3.1.2 Material y reactivos	26
5.3.1.3 Procedimiento	26
5.3.1.4 Cálculos	27
5.3.2 Determinación de cenizas	27
5.3.2.1 Fundamento	27
5.3.2.2 Material y reactivos	27
5.3.2.3 Procedimiento	28
5.3.2.4 Cálculos	28
5.3.3 Determinación de grasa cruda	29
5.3.3.1 Fundamento	29
5.3.3.2 Material y reactivos	29
5.3.3.3 Procedimiento	30
5.3.3.4 Cálculos	31

5.3.4	Determinación de proteína cruda	31
5.3.4.1	Fundamento	31
5.3.4.2	Material y reactivos	33
5.3.4.3	Procedimiento	34
5.3.4.4	Cálculos	35
5.3.5	Determinación de fibra cruda	36
5.3.5.1	Fundamento	36
5.3.5.2	Material y reactivos	36
5.3.5.3	Procedimiento	37
5.3.5.4	Cálculos	38
5.4	Pruebas de identificación y cuantificación de factores tóxicos	39
5.4.1	Determinación semi-cuantitativa de alcaloides	39
5.4.1.1	Material y reactivos	40
5.4.1.2	Procedimiento	42
5.4.2	Determinación de glucósidos cianogénicos	44
5.4.2.1	Fundamento	44
5.4.2.2	Material y reactivos	45
5.4.2.3	Procedimiento	46
5.4.2.3.1	Curva estándar de HCN	46
5.4.2.3.2	Curva estándar para obtener HCN por interpolación	48
5.4.3	Determinación de hemaglutininas (prueba semicuantitativa)	49
5.4.3.1	Fundamento	49
5.4.3.2	Material y reactivos	49
5.4.3.3	Procedimiento	50
5.5	Pruebas de identificación y cuantificación de factores antinutricionales	54
5.5.1	Determinación de ácido fítico	54
5.5.1.1	Fundamento	54
5.5.1.2	Material y reactivos	54
5.5.1.3	Procedimiento	55
5.5.1.4	Ejemplos de cálculos	57
5.5.1.4.1	Datos de la curva patrón	58
5.5.2	Determinación de inhibidores de tripsina	59
5.5.2.1	Fundamento	59
5.5.2.2	Material y reactivos	60
5.5.2.3	Procedimiento	60
5.5.2.4	Cálculos para determinar los inhibidores de tripsina	62
5.5.3	Determinación del contenido de taninos	64
5.5.3.1	Fundamento	64
5.5.3.2	Material y reactivos	65
5.5.3.3	Procedimiento	65
5.5.3.4	Cálculos	67
5.6	Determinación de azúcares (reductores directos y totales)	68
5.6.1	Extracción de azúcares (reductores directos y totales)	68
5.6.1.1	Fundamento	68
5.6.1.2	Material y reactivos	69
5.6.1.3	Procedimiento	69
5.6.2	Cuantificación de azúcares (reductores directos) por el método DNS	70
5.6.2.1	Material y reactivos	70
5.6.2.2	Procedimiento	70
5.6.3	Determinación de azúcares totales (después de la hidrólisis)	71
5.6.3.1	Material y reactivos	71
5.6.3.2	Procedimiento	72

5.6.3.3 Cálculos	73
5.7 Digestibilidad <i>in vitro</i> con líquido ruminal	74
5.7.1 Fundamento	74
5.7.2 Material y reactivos	74
5.7.3 Procedimiento	75
5.7.4 Cálculos	77
CAPITULO 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	78
6.1 Análisis proximal	78
Tabla 1 Análisis bromatológico de leguminosas y cucurbitáceas en base húmeda	79
Tabla 1a Análisis bromatológico de leguminosas y cucurbitáceas en base seca	80
Tabla 2 Análisis bromatológico de frutos en base húmeda	81
Tabla 2a Análisis bromatológico de frutos en base seca	82
6.2 Factores tóxicos	82
Tabla 3 Factores tóxicos en las plantas analizadas	83
6.3 Factores antinutricionales	84
Tabla 4 Factores antinutricionales en las plantas analizadas	84
6.4 Azúcares reductores directos y totales	86
Tabla 5 azúcares reductores directos y totales en frutos analizados	86
6.5 Digestibilidad <i>in vitro</i> con líquido ruminal	87
Tabla 6 Digestibilidad <i>in vitro</i> con líquido ruminal	87
CAPITULO 7 CONCLUSIONES	89
CAPITULO 8 BIBLIOGRAFÍA	90
CAPITULO 9 ANEXOS CURVAS ESTANDAR	95
9.1 Anexo I Determinación de ácido fítico	95
9.2 Anexo II Determinación de taninos	96
9.3 Anexo III Azúcares reductores directos	97
9.4 Anexo IV Azúcares reductores después de la hidrólisis	97

En esta investigación se estudiaron nueve diferentes plantas tanto cultivables como silvestres, que a su vez pueden ser aprovechadas en la alimentación humana o animal. Estas plantas son pertenecientes a los estados de Yucatán, Michoacán, Quintana Roo y Guerrero que son regiones tropicales y que tienen una gran diversidad. Se estudiaron dos leguminosas llamadas Balché (*Lonchocarpus longystilus pitt*) y Palo morado (*Peltogyne mexicana*) y *Heteroflorum sp.* Una planta de la que se utiliza su vaina y semilla. De la familia de las cucurbitáceas se analizaron dos diferentes especies una llamada *Cucurbita pepo* y la otra *Cucurbita moschata Duch.* Y por otro lado, tres frutos, dos de la familia de las sapotáceas, el Chicozapote (*Achras zapota*) y el Zapote (*Manilkara Sapotilla*) en dos muestras diferentes: la primera solo pulpa y la segunda la pulpa con cáscara; y un Pepino kaat o de ardilla (*Parmentiera aculeata*), el cual es un fruto perteneciente a la familia de las bignoniáceas. Se determinó el valor nutrimental de cada una de las plantas estudiadas encontrándose que no en todos los casos este valor es semejante entre miembros de la misma familia o bien al compararlas con información de ellas mismas en otras investigaciones anteriores. Los estudios toxicológicos no mostraron la presencia de alcaloides ni de glucósidos cianogénicos y las lectinas se encontraron en límites permitidos. En cuanto a los factores antinutricionales analizados: ácido fítico, inhibidores de tripsina y taninos las cantidades encontradas son muy pequeñas y por consiguiente el efecto no es importante al ser consumidas.

Los azúcares reductores directos y totales se encuentran en una elevada cantidad en los frutos. La digestibilidad *in vitro* con líquido ruminal es considerable ya que se obtienen valores por arriba del 50 %. Con estos resultados todavía no podemos definir que plantas son las adecuadas para formar forrajes que den buenas expectativas y excelente alimentación y nutrición al animal.

CAPITULO 2

INTRODUCCION

En el último siglo se ha acentuado la selección de plantas destinadas a la agricultura, ya que en la actualidad el hombre depende de unas cuantas especies vegetales que suministran el 90% de nuestros víveres. Esto indica que sólo dependemos de unas cuantas especies vegetales, a la vez de tener una dieta restringida.

Un factor importante íntimamente relacionado con los alimentos, lo constituye la tasa de crecimiento poblacional. Es trascendental el aumento en la disponibilidad de los alimentos, y este incremento no ha sido proporcional al crecimiento poblacional.

En México, la población sobre todo en zonas rurales consumen muchas plantas silvestres, debido a la escasez de los alimentos o por no contar con los recursos económicos para adquirirlos.

Aun cuando estos alimentos silvestres y otros más que se cultivan tengan un consumo importante en algunas regiones rurales, existe poca información con respecto a su contribución tanto al aporte nutrimental como a los contenidos de tóxicos y/o factores antinutricionales de la dieta, por lo que el objetivo del presente trabajo fue analizar la composición bromatológica de las siguientes plantas, Balché (*Lonchocarpus longistylus pitt*), Semilla de calabaza (*Cucurbita pepo L.* y *Cucurbita moschata Duch*), Pepino Katkuuk o de ardilla (*Parmentiera aculeata*) del

estado de Yucatán, Chicozapote (*Achras zapota*) y zapote (*Manilkara sapotilla*), para el estado de Quintana Roo, *Heteroflorum sp.* del estado de Michoacán y Palo morado (*Peltogyne mexicana*) del estado de Guerrero. Así mismo se les determinaron los siguientes factores tóxicos: alcaloides, glucósidos cianogénicos, hemaglutininas y factores antinutricionales: ácido fítico, inhibidores de tripsina y taninos. También se midió la digestibilidad *in vitro* con líquido ruminal.

Los resultados obtenidos podrán dar la dirección hacia nuevos objetivos, como fomentar el cultivo de las plantas para poder crear un alimento de consumo humano o elaborar forrajes. Así mismo, para conservar plantas que se encuentran en peligro de extinción y que tienen un valor nutritivo importante.

3.1 Objetivo General

- Evaluar algunas plantas cultivables y silvestres mexicanas obteniendo el valor nutrimental, tóxico, antinutricional y digestibilidad *in vitro* con líquido ruminal.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar un análisis bromatológico a cada una de las plantas.
- Determinar los factores tóxicos y antinutricionales en semillas y frutos a analizar.
- Comparar los resultados del análisis bromatológico con los reportados en la literatura de plantas de la misma especie.
- Conocer en el chicozapote y zapote los azúcares reductores directos y totales.
- Determinar en las plantas seleccionadas la digestibilidad *in vitro* con líquido ruminal.

4.1 Plantas cultivables y silvestres

Se analizaron plantas de la región de Guerrero, Michoacán, Quintana Roo y de Yucatán. Debido al clima cálido que estos estados presentan, tienen una gran diversidad de plantas silvestres, de las cuales la población las ocupa tanto para consumo humano como para ganadería.



Razón por la cual se llevará acabo este estudio con los frutos o semillas de plantas como: Balché, Xbal-ché, Saayab, Palo de patlaches (*Lonchocarpus longistylus pitt*), proviene de un árbol de hojas alternas, pinadas, con unas 15 hojuelas ovadas u oblongas de 3.5-8.5 cm. Flores papilionadas moradas; fruto una vaina, comprimida indehiscente, con la corteza por fermentación, los lacandones preparan una bebida alcohólica con estas semillas, pertenecientes a la familia de las Leguminosae (Fabaceae).¹



Palo morado (*Peltogyne mexicana*) es un árbol de 15-20 m de hojas bifoliadas, con las hojuelas falcadas, emarginadas, glandulosas, de 4-6 y hasta 8 cm; inflorescencia en panículas vellosas de 8 cm., cáliz de 4 sépalos, 5 pétalos oblongos de 5 mm, glandulosos, fruto oblongo falcado de 5 a 6 cm madera morada. Pertenecientes a la familia de las Leguminosae.¹



La planta *Heteroflorum* sp. Una planta en vaina sumamente dura de un tamaño de 20 a 25 cm, contiene de 4 a 5 semillas de diámetro de 1 cm, todavía no se conoce su género, por lo tanto hay poca información acerca de ella.



Dentro de los frutos a estudiar se encuentran el Zapote o sapotillo (*Manilkara sapotilla*) y Chicozapote o árbol de chicle (*Achras zapota*) es un árbol de 30 m o más con jugo lechoso, hojas alternas y amontonadas en la extremidad de las ramillas oblongas o elípticas, coriáceas y brillantes de 8-12 cm, flores blancas o algo rosadas fruto globoso u ovoide de 6-7 cm con 4-5 semillas elipsoides y brillantes; el jugo lechoso de árbol coagulado por medio de calor constituye el chicle en bruto. Pertenecientes a la familia de las Sapotáceas.^{1, 2}

Tabla 1. Análisis bromatológico de chicozapote y zapote (g/100g muestra)

Nombre científico	Humedad	Cenizas	Grasa	Proteínas	Fibra cruda	Hidratos de carbono
<i>Achras zapota</i> ^a	77.40	0.40	0.66	0.87	2.15	18.52
<i>Achras zapota</i> ^b	-----	1.77	2.92	3.85	9.50	81.95
<i>Manilkara sapotilla</i> ^a	78.60	2.70	0.10	1.12	0.80	16.68
<i>Manilkara sapotilla</i> ^b	-----	12.61	0.50	5.23	3.74	77.94

^a en base húmeda.

^b en base seca.

Fuente: ³



Semilla de calabaza *Cucurbita pepo* L. y semilla de calabaza amarilla o de bola *Cucurbita moschata* Duch, son plantas herbáceas, de tallos largos que se arrastran por el suelo, o se enganchan a toda clase de soportes por medio de zarcillos, los frutos se caracterizan por ser de una consistencia carnosa, succulenta y tener una corteza resistente que puede variar desde semiblanda a muy dura, de tallos flexibles cubiertos de pelos e incluso espinas; hojas alternas, generalmente simples, zarcillos simples o compuestos. La forma más típica y popular de la calabaza es redonda pero las hay alargadas, más o menos cilíndricas y aún torcidas. Las hay desde muy pequeñas hasta de 100 Kg de peso. Pueden ser andromonoicas (flores hermafroditas y masculinas en la misma planta), o monoicas (flores masculinas y femeninas en la misma planta), o dioicas (plantas con flores masculinas y plantas con flores femeninas), las más seleccionadas son las ginicas (solamente flores femeninas).^{1, 4}

C. moschata son de desarrollo tardío, sus frutos, llamados en las Antillas y América con el nombre de “melocotón” se pueden consumir sin estar maduros. Con la maduración difunde un olor penetrante que se pueden utilizar para perfumar. Es la especie mejor adaptada a las temperaturas elevadas.⁴

Tabla 2. Análisis bromatológico de semillas de calabaza (g/100g muestra)

Nombre científico	Humedad	Cenizas	Grasa	Proteínas	Fibra cruda	Hidratos de carbono
<i>Cucurbita moschata</i> ^a	7.70	3.10	27.97	36.00	4.95	28.28
<i>Cucurbita moschata</i> ^b	-----	3.36	30.30	39.00	5.40	30.64
<i>C. pepo</i> ^a	4.30	4.80	44.00	36.90	2.55	7.45
<i>C. pepo</i> ^b	-----	5.52	46.43	39.83	6.11	2.20

^a en base húmeda.

Fuente: ³

^b en base seca.

Henderson et al, 1986 realizaron la identificación y cuantificación de factores tóxicos y antinutricionales de las siguientes especies: *C. foetidissima* y *C. digitata* (calabaza xerofíticas) así como *C. moschata* y *C. pepo* (calabazas comunes). Contienen inhibidores de tripsina activos en cucúrbitas, pero sólo tienen el 1 al 2% respectivamente, comparadas con la semilla de soya la cual fue usada como material de referencia.⁵



Pepino Katkuuk o de ardilla (*Parmentiera aculeata*) arbusto o árbol de 3.5-7.5 m espinoso, de hojas largamente pecifoliadas, con hojuelas obovadas o

suborbiculares de 1-3 cm decurrentes flores monopetalos solitarias; verdosas, la corola con 5 lóbulos; fruto de 18-25 cm por 1cm de grosor. Perteneciente a la familia de las Bignoniáceas.³¹

Tabla 3. Análisis bromatológico de pepino katkuuk (g/100g muestra)

Nombre científico	Humedad	Cenizas	Grasa	Proteínas	Fibra cruda	Hidratos de carbono
<i>Parmentiera aculeata</i> ^a	87.60	0.30	0.09	1.43	0.35	10.23
<i>Parmentiera aculeata</i> ^b	-----	2.42	0.73	11.53	2.82	82.50

^a en base húmeda.

^b en base seca.

Fuente:³

4.2 Azúcares

Los azúcares son aldehídos o cetonas con múltiples grupos hidroxilo.

Los frutos contienen principalmente dos hexosas las más abundantes la D-glucosa (una aldosa) y la D-fructosa (una cetosa) que se caracterizan por tener 6 átomos de carbono en su molécula. Estas dos moléculas son las que se determinarán a los frutos en estudio debido a que en ellos están presentes en abundancia.

Sirven como almacenes de energía, combustibles e intermediarios metabólicos. El almidón de las plantas y glucógeno en animales son dos polisacáridos que rápidamente se movilizan para liberar glucosa, el combustible primordial para generar ATP, la unidad biológica de energía libre. Además de que

algunas azúcares como la ribosa y desoxirribosa forman parte de la trama estructural del ARN y ADN. Los polisacáridos son elementos estructurales de las paredes celulares de bacterias y plantas, forman parte del exoesqueleto de los artrópodos. La celulosa es el principal componente de las paredes celulares de las plantas. Se encuentran unidos a muchas proteínas y lípidos.^{6, 7}

La reserva nutricional de las plantas es el almidón, del que existen dos formas, la amilosa, almidón no ramificado, consiste en una serie de residuos de glucosa unidos por enlace α (1-4). La amilopectina, la forma ramificada, tiene un enlace α (1-6) por cada treinta enlaces α (1-4). Las dos son hidrolizadas por la α -amilasa, secretado por las glándulas salivales y páncreas originando maltosa, maltotriosa y α -dextrina.⁸

En las paredes de las plantas, las fibrillas de celulosa, se hallan aglutinadas por una matriz de otros tres materiales polímeros: la hemicelulosa, la pectina y la extensina.

Las hemicelulosas son polímeros de las pentosas, sobre todo D-xilanos con enlaces β (1-4) y poseen cadenas laterales de arabinosa y de otros azúcares. La pectina es un polímero formado por galacturonato.⁷

4.3 FACTORES TÓXICOS

Los factores tóxicos son sustancias presentes en los alimentos capaces de producir efectos dañinos, una anomalía fisiológica, que no puede ser atenuada por una suplementación de nutrimentos.⁹

4.3.1 ALCALOIDES

Los alcaloides son compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno en su molécula y se comportan como álcali químico. Estructuralmente tienen estructuras diversas y se identifican por reacciones generales muy variadas. Bioquímicamente siguen un complejo ciclo del metabolismo nitrogenado, con actividades biológicas importantes, por su mimetismo hormonal y su intervención en las reacciones principales del metabolismo celular.⁹

Algunos de los alcaloides en las plantas son neurotóxicos. Puede ser muy variado pero se considera que un consumo de 1% a 5% de alcaloides con respecto al peso corporal del animal de uno a dos días puede causar una intoxicación aguda en el organismo.¹⁰

4.3.2 GLUCÓSIDOS CIANOGENÍCOS

Los glucósidos cianogénicos se encuentran distribuidos en una amplia gama de vegetales, entre los que se encuentran algunas leguminosas. El efecto tóxico se presenta cuando la enzima β -glucosidasa hidroliza el enlace glucosídico y la hidroxinitrilasa libera el ácido cianhídrico. En condiciones normales no tiene lugar la hidrólisis de los glucósidos cianogénicos, ésta es resultado de la pérdida de integridad en las células vegetales (plantas marchitas, congeladas o mal desarrolladas). En el caso de los rumiantes las lesiones pueden presentarse durante la masticación del vegetal o en el rumen, que presenta un ambiente favorable para la hidrólisis.^{10, 11}

Se considera que un contenido de cianuro de 500 a 750 partes por millón en el alimento representa un riesgo moderado de intoxicación en el animal. Alimentos con valores superiores a las 1000 partes por millón no son aptos para su consumo.¹⁰

4.3.3 HEMAGLUTININAS O LECTINAS

Las lectinas o hemaglutininas son un grupo de proteínas o glicoproteínas tóxicas presentes en la mayoría de las leguminosas comestibles, que se caracterizan por tener una gran afinidad con los residuos glucídicos presentes en la superficie de los glóbulos rojos sanguíneos ocasionando aglutinación. El efecto tóxico se debe a la unión con las proteínas de células epiteliales de la pared del intestino, ocasionando una mala absorción de nutrimentos. Sin embargo, es importante mencionar que la presencia de hidratos de carbono en la molécula de lectinas les da especificidad hacia las células, lo que repercute de manera importante en su acción, ya que de ser inespecíficas no pueden unirse a las células y causar daño. Por otra parte, para que se lleve a cabo un efecto por la vía oral es necesario que las lectinas resistan el ataque de las proteasas a lo largo del tracto digestivo; posible motivo por el cual no existen reportes de su efecto tóxico en rumiantes.^{12, 13}

Las lectinas por su naturaleza proteica pueden destruirse por métodos de calentamiento como son el secado y la cocción.

4.4 FACTORES ANTINUTRICIONALES

Los factores antinutricionales disminuyen la disponibilidad o provocan una pérdida suplementaria de los nutrientes esenciales. Estas sustancias provocan un desequilibrio, que se compensa por un aporte suplementario de los nutrientes implicados y a la larga determinan la aparición de una patología particular.⁹

4.4.1 ÁCIDO FÍTICO

En el pericarpio de los productos vegetales existe fósforo en forma de fitatos, que son sales de ácido fítico, derivado del enocitol y ácido fosfórico. En especies de animales monogástricos aumentan la pérdida fecal de calcio y contribuyen a la descalcificación del organismo; además se consideran una fuente de fósforo no bioasimilable debido a la ausencia de la enzima fitasa sin embargo, se ha comprobado que en el rumen del ganado ovino se produce la hidrólisis de los fitatos por las fitasas bacterianas. Por consiguiente, parece que los rumiantes utilizan el fósforo de los fitatos del mismo modo que otras fuentes de fósforo. En fitatos las concentraciones de 0.4 a 6.4% causan desmineralización.^{9, 14}

4.4.2 INHIBIDORES DE PROTEASAS

Los inhibidores de proteasas son sustancias antinutricionales de naturaleza proteínica presentes en la mayoría de las leguminosas y cereales; se caracterizan por inhibir la actividad de las proteasas, enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos de las proteínas y péptidos permitiendo su asimilación.

Se sabe que menos de 10 UTI/ mg de muestra en cuanto a frijoles no causan problemas.

El inhibidor de tripsina es uno de los más abundantes y de mayor importancia, dada su naturaleza proteínica existen numerosos métodos usados comúnmente para desnaturalizar o inactivar este tipo de sustancias, el más utilizado consiste en brindar un calentamiento adecuado al alimento que permita destruir o bien disminuir el efecto de los principales inhibidores de proteasas.¹⁵

4.4.3 TANINOS

Los taninos son compuestos polifenólicos solubles en agua que se encuentran presentes en algunas leguminosas; se clasifican como condensados e hidrolizables con base en su tipo estructural y su reactividad contra agentes hidrolíticos, particularmente ácidos. Los taninos son considerados nutricionalmente indeseables, ya que son capaces de formar un complejo tanino-proteína que tiene lugar cuando los grupos fenólicos de los taninos se oxidan a quinonas, con la posibilidad de formar enlaces covalentes entre los grupos amino-épsilon de las lisinas y de las argininas en las cadenas peptídicas precipitándolas y reduciendo el valor nutrimental del alimento.¹²

Los taninos son hidrolizados al llegar al rumen generando un sin número de compuestos fenólicos, donde se consideran como posibles inhibidores de las células, ya que se ha observado una disminución de la digestibilidad ruminal de diversos forrajes.^{10, 16} Por otra parte es importante mencionar que el nivel de astringencia de las raciones parece tener una función importante en la elección

alimentaria manifestándose en una reducción de la ingestión de alimentos ricos en taninos.⁹

La DDA de ácido tánico es de 500 mg/kg de peso corporal / día, se considera que un consumo de 30 g/kg/día de una persona de 60 kg se hace presente el efecto antinutricional. Se ha observado que alimentos que poseen un porcentaje del 3 a 9 % de taninos en su composición pueden causar desorden fisiológico en los animales que los consumen.¹⁰

4.5 RUMIANTES

Se presentan algunos aspectos generales sobre la alimentación de una de las especies más importantes que forman parte de la producción animal en México.

La industria del ganado se ha convertido en una parte altamente especializada del campo agropecuario. La necesidad de obtener una conversión alimentaria eficiente para minimizar los costos de alimentación que van de un 60 a 80% del costo total de la producción animal. Otra necesidad es el incremento de fuentes de proteína y grasa, ambas para el crecimiento de la población humana y la alimentación animal.¹⁷

Es frecuente la utilización de subproductos o alimentos de desecho, de los cuales no se tiene buena información en cuanto a su valor nutritivo. Lo que ha traído como consecuencia la utilización masiva de granos procesados en diferentes formas. Los animales rumiantes necesitan adaptarse al alimento;

principalmente, debido a que los microorganismos del rumen, que predigieren el alimento, se desarrollan en poblaciones que reflejan la composición del alimento.¹⁸

4.5.1 Alimentación de rumiantes

Los rumiantes domésticos se alimentan principalmente de forrajes: plantas herbáceas, pastos, plantas forrajeras cultivadas y subproductos agrícolas.

(Pajas, alfalfa, semillas, etc.)

La cantidad de energía que un rumiante puede obtener de un forraje consumido a voluntad depende de dos características de este forraje:

Su ingestibilidad, que es la cantidad de forraje ingerida y se expresa siempre en Kg de materia seca, para obviar el inconveniente que representan las grandes variaciones existentes en el contenido de agua de los alimentos.

Su digestibilidad, es decir la proporción de este forraje, o más precisamente de su materia orgánica, que se absorbe en el tubo digestivo. Este parámetro determina el valor energético.

Estas dos características varían dentro de límites muy amplios. De manera general, ambas disminuyen en el curso del ciclo de vegetación, al aumentar las proporciones de tallos, de tejidos lignificados y de paredes celulares.¹⁹

En las raciones de los animales con producciones elevadas, los forrajes se complementan con alimentos más digeribles, con menor (o nulo) contenido de tejidos lignificados, y que son ricos en proteínas y otros constituyentes intracelulares; estos alimentos son los frutos, los granos y las raíces, así como diversos subproductos de todos ellos.²⁰

4.5.2 Digestión ruminal

Los rumiantes son mamíferos que se caracterizan por poseer pezuñas, dedos pares y molares cuya corona presentan crestas en forma de media luna, no presentan dientes incisivos superiores y solo algunas especies tienen dientes caninos; los molares de los rumiantes tienen tal forma y están tan separados que el animal puede masticar en un solo lado de la mandíbula a la vez. La producción de saliva en los rumiantes es muy abundante, posee una gran capacidad amortiguadora y ayuda a mantener un pH apropiado en el rumen^{18, 21, 22}

Poseen un estómago compuesto de cuatro compartimentos: retículo, rumen, omaso y abomaso.

El retículo en movimiento manda al alimento ingerido hacia el rumen o hacia el omaso. El rumen contiene del 70% al 75% del volumen total del aparato digestivo y actúa como una cámara de fermentación en la cual los microorganismos ruminales atacan a ciertos nutrimentos para desdoblarlos. El omaso permite reducir el tamaño de partícula del alimento ingerido y absorber algunos elementos. El abomaso efectúa la secreción de pepsina y ácido clorhídrico para el desdoblamiento de proteínas.²³

Un fenómeno característico de los rumiantes es la rumia, una forma controlada de vómito que logra que los materiales semilíquidos sean regurgitados al esófago, los líquidos sean deglutidos y además permite la remasticación e ingestión del bolo alimenticio que se forma en el proceso. Los rumiantes pueden pasar rumiando hasta 8 horas o más, lo que depende de la naturaleza del alimento.¹⁸

La fermentación microbiana en el rumen da como resultado la producción de una gran cantidad de gas en cuya composición se encuentra: dióxido de carbono, metano, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, los cuales deben ser eliminados. Esto se lleva a cabo por medio de contracciones de los sacos superiores del rumen que empujan el gas hacia delante y hacia abajo; el esófago se dilata y permite que el gas escape ocasionando el eructo del animal.^{14, 18}

Aproximadamente dos terceras partes de la sustancia orgánico digerible y de la energía se absorbe en el estómago anterior (retículo, rumen, y omaso); el resto se digiere en los intestinos.²⁴ Sin embargo, la digestibilidad de un alimento puede verse afectada por trastornos digestivos, deficiencias de nutrimentos, frecuencia de las comidas y tratamientos previos que se le han dado a los alimentos.²⁵

4.5.3 Características del rumen

Los microorganismos del rumen son predominantemente anaerobios obligados aunque pueden tolerar algo de oxígeno, a lo largo de la fermentación, éste es introducido a través del alimento y el agua, y se difunde a través de la pared del rumen.

La población microbiana en el rumen esta regulada por el peculiar balance ecológico que da condiciones para que prevalezcan ahí. El ambiente del rumen contiene un número de cualidades únicas que provocan diferencias con otros sistemas anaeróbicos ya que es esencialmente isotérmico y esta regulado por el metabolismo homeotérmico de los animales huéspedes.

La población del rumen incluye: bacterias, protozoos y hongos.

Existen más de 200 especies de bacterias, aproximadamente 10^{10} bacterias por mL de contenido ruminal, donde destacan las especies celulolíticas, que tienen un papel irremplazable al atacar las paredes celulares intactas. Una parte de las bacterias son destruidas en el rumen por los protozoos, pero la mayor parte, sin embargo, abandona el rumen, pasando hacia el omaso y cuajar, bien en el líquido ruminal o bien adheridas a las partículas del alimento, sin embargo estas pérdidas son compensadas permanentemente mediante la multiplicación de la población.

Los protozoos del tipo ciliado prosperan en el rumen, estos atacan todos los constituyentes principales de los alimentos, degradando incluso, algunos de ellos, las paredes celulares. Estos están en competencia con las bacterias por los sustratos nutrimentales y por la importante depredación que realizan sobre éstas. En su mayor parte permanecen en el rumen.

Los hongos que se fijan sobre soportes rígidos, son capaces de degradar la celulosa y la hemicelulosa a pesar de la presencia de lignina.^{19, 20, 26}

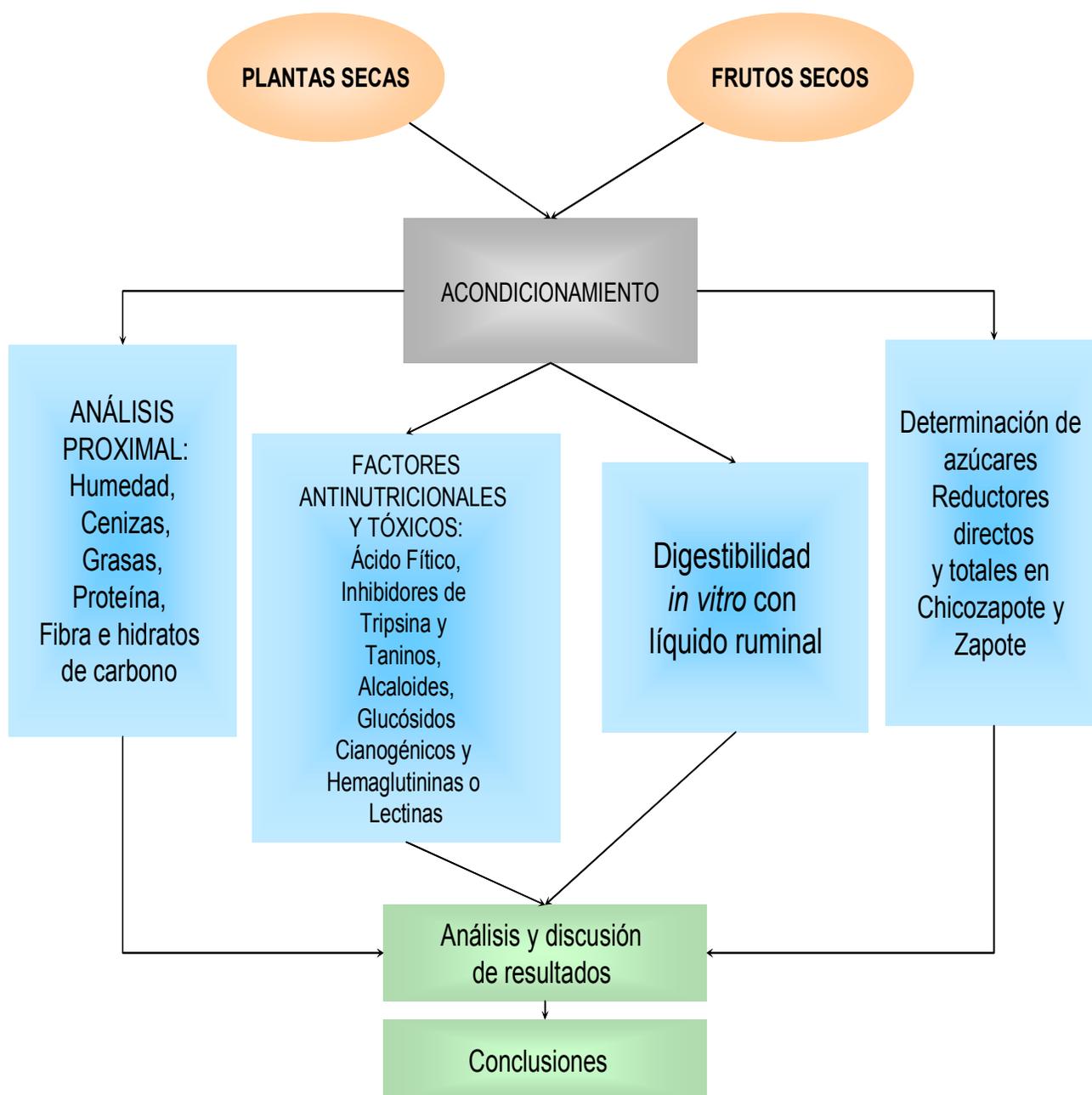
Tabla 4. Requerimientos nutricionales para animales en etapa de desarrollo.^{24, 27, 28}

Requerimiento (% en la ración)	Rumiantes	Cerdos	Aves
Proteína total	10-12	15	14-18
Proteína digerible	7.5	***	***
Calcio	0.20-0.25	0.60	3.20
Fósforo	0.20-0.21	0.50	0.56

***valores no reportados para esa especie.

Los valores pueden variar dependiendo el estado de desarrollo del animal, así como la función del mismo.

5.1 Diagrama general



5.2 Acondicionamiento de la Muestra

Las muestras fueron proporcionadas por el Botánico M. en C. Salvador Flores de la Universidad de Yucatán México.

Las plantas se recibieron secas, fueron molidas y pasadas por una malla de 0.5 mm de diámetro, para su acondicionamiento.

Nombre científico: *Lonchocarpus longistylus* Pitt

Lugar de recolección: Yununcan Yuc. Mérida.

Parte utilizada para el análisis: semilla y vaina.

Nombre científico: *Peltogyne mexicana*

Lugar de recolección: Guerrero.

Parte utilizada para el análisis: semilla.

Nombre científico: *Heteroflorum* sp.

Lugar de recolección: Michoacán.

Parte utilizada para el análisis: semilla y vaina.

Nombre científico: *Cucurbita moschata* Duch

Lugar de recolección: Yaxcabá Yuc.

Parte utilizada para el análisis: semilla completa.

Nombre científico: *Cucurbita pepo* L.

Lugar de recolección: Valladolid Yuc.

Parte utilizada para el análisis: semilla completa.

Nombre científico: *Achras sapota*

Lugar de recolección: Carrillo Puerto Q. Roo.

Parte utilizada para el análisis: fruto sin semilla.

Nombre científico: *Manilkara sapotilla*

Lugar de recolección: Carrillo Puerto Q. Roo.

Parte utilizada para el análisis: fruto solo pulpa y fruto con pulpa y cáscara.

Nombre científico: *Parmentiera aculeata*

Lugar de recolección: Mérida Yuc.

Parte utilizada para el análisis: fruto completo.

5.3 Análisis Proximal

5.3.1 Determinación de Humedad ²⁹

Técnica descrita por la AOAC (1990) N° 925.09.

5.3.1.1 Fundamento

El método de secado se basa en la eliminación del agua libre en el alimento a temperaturas de 100 a 110 °C.

5.3.1.2 Material y reactivos

- ☞ Estufa de vacío LAB-LINE mod. 3620
- ☞ Balanza analítica Santorius
- ☞ Desecador
- ☞ Pesafiltros
- ☞ Estufa con corriente forzada LAB-LINE, mod. IMPERIAL III

5.3.1.3 Procedimiento

Primeramente se pone a peso constante el pesafiltro. Los pesafiltros son colocados de 2 a 4 horas en la estufa es suficiente.

A continuación se adiciona la muestra de 2-5 g, tratando de que presente la mayor superficie de evaporación, introduzca en la estufa que se encuentre entre 100-110 °C. El tiempo de permanencia dentro de la estufa depende del material de que se trate, hasta peso constante.

Todas las pesadas que se efectúen deben hacerse inmediatamente después que son enfriadas en el desecador. Se considera a peso constante una muestra cuando al pesarla en la balanza analítica solo se presente variación en la cuarta cifra decimal.

5.3.1.4 Cálculos

Teniendo el peso del pesafiltro con muestra antes y después de sacada, y con el peso del pesafiltro solo, se puede hacer la determinación.

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

Donde:

P_i = peso del pesafiltro con muestra antes de secada (en gramos)

P_f = peso del pesafiltro con muestra después de secada (en gramos)

m = peso de muestra (en gramos)

5.3.2 Determinación de cenizas ²⁹

Técnica descrita por la AOAC (1990) N° 923.03

5.3.2.1 Fundamento

Es el producto de la eliminación del material orgánico a altas temperaturas (500 °C), este residuo contiene óxidos y sales.

5.3.2.2 Material y reactivos

- ☞ Mufla THERMOLYNE, mod. 1500
- ☞ Balanza analítica Santorius.
- ☞ Mechero Bunsen
- ☞ Crisoles de porcelana

☞ Desecador

5.3.2.3 Procedimiento

Previamente se deben de poner a peso constante los crisoles, los cuales se deben colocar en la mufla a una temperatura de 500 °C, marcándolos con lápiz o cualquier sustancia que no se elimine en el proceso de incineración.

Al crisol se le coloca de 2-5 gramos de muestra aproximadamente, se pone a carbonizar a la flama de un mechero y bajo una campana, ya que se desprenderá una gran cantidad de humo. Cuando ya no se presente desprendimiento de humo, se puede introducir el crisol a la mufla, la cual debe encontrarse entre 500-550 °C, el tiempo de permanencia es muy variable, y depende del material que se esté trabajando.

Si después de la incineración se obtienen cenizas con manchas negras, es conveniente adicionarle unas gotitas de agua destilada y volver a meter a la mufla para obtener cenizas grisáceas o blancas homogéneas; lo que nos indica el punto final de esta determinación. Es conveniente dejar enfriar un poco el crisol antes de meterlo al desecador, para su posterior pesada en la balanza analítica.

5.3.2.4 Cálculos

El cálculo de cenizas en términos de porcentaje es el siguiente:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{P_f - P_o}{m} \times 100$$

Donde:

Pf = peso del crisol con la muestra después de incinerada (en gramos)

Po = peso del crisol a peso constante (en gramos)

m = peso de muestra (en gramos)

5.3.3 Determinación de grasa cruda ²⁹

Técnica descrita por la AOAC (1990) N° 989.05;

5.3.3.1 Fundamento

La determinación del extracto etéreo, incluye una gran variedad de compuestos orgánicos, únicamente unos pocos de ellos tienen interés nutricional; aquellos que se encuentran en gran cantidad incluyen la grasa verdadera, ácidos grasos y sus ésteres, vitaminas liposolubles y provitaminas tales como son los carotenoides.

Se utilizó éter de petróleo para hacer la extracción.

5.3.3.2 Material y reactivos

- ☞ Aparato de extracción Goldfish, LABCONCO
- ☞ Cartuchos de celulosa de 22x80 mm
- ☞ Estufa de vacío LAB-LINE, mod. 3620

☞ Vasos de borde esmerilado KIMAX

☞ Éter de petróleo de p. e. 30-60 °C

☞ Balanza analítica

5.3.3.3 Procedimiento

Dentro de un cartucho de celulosa se coloca de 2 a 5 gramos de muestra (dependiendo del contenido de grasa), se tapa con un pedazo de algodón. En este caso el cartucho de celulosa se coloca en el portadedal y éste a su vez en el seguro metálico del aparato Goldfish, es un dispositivo comercial que consta de 6 unidades de extracción. A continuación se coloca aprox. 50 mL de disolvente sobre el vaso de borde esmerilado, y éste con la ayuda del anillo metálico con rosca se asegura al aparato de extracción.

Primero se abre la llave del agua para que circule ésta sobre los refrigerantes. Para el calentamiento en el aparato, se sube la parrilla hasta que esté en contacto con el vaso. Es conveniente colocar el control de calentamiento en intermedio. El período de calentamiento es variable, que va de 2 a 8 horas, dependiendo de la cantidad de grasa que contenga la muestra.

Una vez transcurrido el tiempo de extracción, se bajan las parrillas de calentamiento, y se colocan los platillos de seguridad, se quita el anillo de rosca y se saca el portadedal con el cartucho, sustituyéndose por el tubo colector volviéndose nuevamente a colocar el vaso para nuevamente proceder a calentar, para recuperar el disolvente.

Una vez que el vaso este libre de disolvente, se coloca en la estufa de vacío para la completa eliminación del disolvente y humedad, con el fin de obtener únicamente el peso de la fracción lipóide.

5.3.3.4 Cálculos

Se debe tener el peso del recipiente colector tanto antes como después del procedimiento de extracción. A esta determinación se le conoce como extracto etéreo.

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

Donde:

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

Po = peso del recipiente antes de la extracción (en gramos)

m = peso de la muestra seca (en gramos)

5.3.4 Determinación de proteína cruda ²⁹

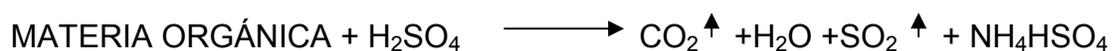
El contenido de proteína se determina con el método AOAC. (1990) N° 977.14

5.3.4.1 Fundamento

El método empleado usualmente para la determinación de nitrógeno en alimentos, es el método Kjeldahl y varias modificaciones se han desarrollado en la

actualidad. El procedimiento consiste en la digestión que es una oxidación de la materia orgánica por acción del ácido sulfúrico y la liberación del nitrógeno como sulfato de amonio; la destilación del nitrógeno amoniacal y la titulación de éste con un ácido como se observa en las siguientes reacciones:

Digestión



Destilación



Titulación



La digestión de la muestra para formar el sulfato de amonio, es la parte más difícil de la operación. Muchos agentes catalizadores han sido usados para aumentar la velocidad de digestión de la muestra; como son el cobre, mercurio y el selenio entre otros. Numerosos agentes oxidantes han sido adicionados al final del período de digestión para obtener una completa oxidación; en varios tipos de muestras la pérdida de nitrógeno a través de la formación de aminas o de nitrógeno libre se ha presentado por el uso de estos agentes a excepción del uso del peróxido

de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno debe ser usado cuidadosamente ya que es común preservarlo con acetanilida para reducir la formación de oxígeno y agua.

Sales como sulfato de potasio o de sodio son comúnmente adicionadas para aumentar el punto de ebullición de la mezcla de digestión sin embargo, la relación sal/ácido no debe ser muy alta ya que se podría presentar la pérdida de amoníaco de la sal de amonio.

El amoníaco obtenido después de la digestión, es liberado por una gran variedad de métodos; siendo el más usado por acción de un álcali y atrapando el amoníaco liberado en una cantidad conocida de ácido valorado.

5.3.4.2 Material y reactivos

- ☞ Digestor TECATOR, mod. Ab-20/40
- ☞ Dispositivo de microdestilación LABCONCO
- ☞ Tubos de digestión TECATOR de 75 mL
- ☞ Mezcla digestiva (a)
- ☞ Peróxido de hidrógeno al 30%
- ☞ Sulfato de potasio (R.A.)
- ☞ Solución de NaOH al 40%
- ☞ Solución de ácido bórico con indicadores (b)
- ☞ Solución de HCl 0.01N valorada

(a). Disolver 3g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 20 mL de agua destilada; a continuación se agrega 50 mL de ácido ortofosfórico (H_3PO_4) y

una vez que este bien disuelta la sal, se adiciona con mucho cuidado y resbalando por la pared del recipiente 430 mL de ácido sulfúrico concentrado. Esta mezcla se deja agitando por aproximadamente 30 min.

(b). Se pesan 10g de ácido bórico y se coloca en un matraz aforado de 1L; se adiciona agua y a continuación 10 mL del indicador B (100 mg de verde de bromocresol en 100 mL de metanol) y 7 mL de rojo de metilo (100 mg en 100 mL de metanol). Se ajusta el color a un tono rojizo grisáceo con ácido o álcali según se requiera y se afora a 1 L con agua destilada.

5.3.4.3 Procedimiento

Pesar de 10-100 mg de muestra y colocarlos en el tubo de digestión, se le agrega aprox. 0.5 g de K_2SO_4 y 3 mL de mezcla de digestión; se pone el tubo en el digestor a una temperatura menor de $340\text{ }^{\circ}\text{C}$ por espacio de 15 minutos y después de ello se saca del digestor para que se enfríe un poco. Adicionar 1.5 mL de H_2O_2 y nuevamente colocarlo en el digestor que se encuentre a $370\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se considera que la digestión esta realizada cuando el tubo no muestra manchas y puntos negros y además la mezcla de digestión sea transparente. Una vez efectuada la digestión se deja enfriar y se procede a realizar la destilación.

Se le agregan al tubo de digestión 25 mL de agua destilada y se coloca en el destilador y se descarga NaOH al 40%. El destilado se recibe en un recipiente que contenga 50 mL de ácido bórico, y la destilación se continúa hasta completar 100-125 mL. Una vez completada la destilación se continúa con la titulación del

amoníaco atrapado en el ácido bórico con HCl 0.01 N, hasta un vire de color verde esmeralda a un rosa claro.

5.3.4.4 Cálculos

Para realizar los cálculos es conveniente correr un blanco, en donde se sustituye la muestra por el equivalente en peso de glucosa o sacarosa; trabajándolo de la misma forma.

$$\% N_2 = \frac{(P-B) \times N \times \text{meq} \times 100}{m}$$

$$\% \text{ Proteína} = \% N_2 \times F$$

Donde:

P = mL de la titulación de la muestra

B = mL de la titulación del blanco

N = normalidad de la solución de HCl

meq = miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m = peso de la muestra (en gramos)

F = factor de conversión (6.25)

Con respecto al factor de conversión debemos aclarar que este depende a cada tipo de muestra, el cual esta relacionado con el contenido de nitrógeno de la proteína en estudio.

5.3.5 Determinación de fibra cruda ²⁹

Técnica descrita por la AOAC (1990) N° 962.09.

5.3.5.1 Fundamento

Dentro del interés analítico de un alimento, podemos dividir los hidratos de carbono no estructurales como son los almidones, azúcares y fructosanas; y por otro lado los hidratos de carbono estructurales, tales como la celulosa y hemicelulosa, que corresponden a la fibra cruda.

Por definición de acuerdo al método Weende, la fibra cruda es la pérdida por ignición del residuo seco remanente después de la digestión de la muestra con ácido sulfúrico al 1.25 % y NaOH al 1.25 % bajo condiciones bien especificadas, de una muestra previamente desengrasada.

Para la determinación de fibra de una muestra es necesario trabajar con una muestra desengrasada y someterla a una hidrólisis ácida seguida de una hidrólisis alcalina con una posterior incineración del material insoluble para que por diferencia se calcule el contenido de hidratos de carbono no-degradables.

5.3.5.2 Material y reactivos

- ☞ Vasos de Berzelius de 600 mL KIMAX
- ☞ Aparato de digestión LABCONCO
- ☞ Estufa de vacío LAB-LINE, mod. 3620
- ☞ Mufla THERMOLYNE, mod. 1500

- ☞ Crisoles de porcelana
- ☞ Buchner con embudos con filtro de lino
- ☞ Solución de H_2SO_4 al 1.25 % (m/v)
- ☞ Solución de NaOH al 1.25% (m/v)
- ☞ Antiespumante (emulsión SIGMA-B)
- ☞ Alcohol etílico
- ☞ Silicato de aluminio

5.3.5.3 Procedimiento

Se pesan de 3-5 g de muestra desengrasada sobre un vaso de Berzelius que contenga 0.5 g de silicato de aluminio y unas perlas de vidrio. A continuación se le adiciona 200 mL de H_2SO_4 al 1.25 % (m/v) que esté hirviendo, y unas gotas de antiespumante e inmediatamente se coloca en el aparato de digestión, el cual debe estar previamente caliente; se deja digerir por espacio de 30 minutos exactos. Después de dicho período se vacía el contenido sobre un Buchner que contenga filtro de lino y se realiza la filtración con ayuda de vacío; se lava el residuo con agua destilada caliente, hasta eliminar el ácido (aprox. 500 mL). Una vez lavado el residuo se transfiere nuevamente al vaso de Berzelius, se le adiciona unas gotas de antiespumante y 200 mL de NaOH al 1.25 % (m/v) que este hirviendo y se mantiene en el aparato de digestión por exactamente 30 minutos. Transcurrido este tiempo se vacía nuevamente al filtro de lino y se filtra, lavando el residuo con agua caliente (aprox. 500 mL), hasta eliminar el álcali y también quitar las perlas de vidrio

lavándolas con agua para recuperar el material adherido. Por último se le adiciona al residuo 25 mL de alcohol etílico.

El residuo se pasa a un crisol de porcelana (a peso constante) cuidando de pasarlo en forma cuantitativa, se coloca en la estufa de vacío para su secado (aprox. 4-8 horas) y después se pesa. A continuación se carboniza y se introduce en mufla para su incineración, hasta peso constante.

5.3.5.4 Cálculos

Ya que se requiere trabajar con muestras previamente desengrasadas, es recomendable usar la muestra a la que se le determino humedad y grasa; por lo cual el peso de la muestra, será el referido al peso inicial previo de las anteriores determinaciones.

$$\% \text{ Fibra} = \frac{P_s - P_c}{m} \times 100$$

Donde:

P_s = peso del crisol con residuo después de secado (en gramos)

P_c = peso del crisol con residuo después de calcinado (en gramos)

m = peso de la muestra (en gramos)

5.4 Pruebas de Identificación y cuantificación de factores tóxicos

5.4.1 Determinación Semi-Cuantitativa de Alcaloides ³⁰

El método está basado en la comparación de la cantidad de precipitado obtenido con 7 diferentes reactivos para alcaloides. El material seco y desengrasado de la planta se extrae con metanol. Una solución acuosa de la porción soluble en ácido del extracto con metanol pasa hacer básica con amoníaco y sujeto a extracción diferencial con cloroformo- etanol. Los 2 extractos así obtenidos fueron entonces ensayados con 7 reactivos para alcaloides:

- 1) Reactivo de MAYER (cloruro de mercurio y yoduro de potasio).
- 2) Reactivo de WAGNER (triyoduro de potasio).
- 3) Reactivo de DRAGENDORFF (nitrato de bismuto y yoduro de potasio).
- 4) Reactivo de SONNENSCHNEIDER (ácido fosfomolibdénico).
- 5) Reactivo de HAGER (ácido pícrico).
- 6) Reactivo de SCHEIBLER (ácido fosfotúngstico).
- 7) Reactivo de ÁCIDO SILICOTÚNGSTICO.

El precipitado formado con los reactivos para alcaloides varía en cantidad con los diferentes alcaloides; en consecuencia, una estimación de la concentración de alcaloides a partir de la cantidad de precipitado con un reactivo, es solamente aproximado. La exactitud puede ser mejorada usando varios reactivos y el método está basado en la comparación de la cantidad de precipitado obtenido con los 7

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

5.4.1.1 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.
- * Rotovapor marca BUCHI Mod. R.
- * Ácido nítrico (30 % ó $\delta = 1.180$)
- * Ácido Clorhídrico (1%)
- * Ácido silicotgstico ($4H_2O-SO_2-12WO_2-22H_2O$).
- * Metanol.
- * Amoníaco concentrado (aprox. 25%).
- * Cloroformo.
- * Etanol.
- * Sulfato de sodio anhidro.
- * Estricnina.
- * Reactivo de MAYER (1).
- * Reactivo de WAGNER (2).
- * Reactivo de DRAGENDORFF (3).
- * Reactivo de SONNENSCHNEIDER (4).
- * Reactivo de HAGER (5).
- * Reactivo de SCHEIBLER (6).
- * Reactivo de ÁCIDO SILICOTUGSTENICO (7).

(1) Se disuelven 1.36 g de $HgCl_2$ en 60 mL de agua y 5.0 g de KI en 10 mL de agua. Se juntan las dos soluciones y se aforan a 100 mL con agua destilada.

(2) Se disuelven 1.27 g de yodo (resublimado) y 2 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua; la solución se afora a 100 mL con agua destilada.

(3) Se disuelven 8.0 g de nitrito de bismuto pentahidratado en 20 mL de ácido nítrico ($\delta = 1.186$ al 30%) y 27.2 g de KI en 50 mL de agua. Se mezclan

las dos soluciones y se dejan reposar 24 h. Se decanta la solución y se afora con agua a 100 mL.

(4) A 100 mL de una solución caliente de molibdato de amonio (43g/100mL), adicionar 100 mL de una solución caliente de fosfato de sodio dibásico anhidro (10g/100mL); a esta solución clara adicionar 10 mL de ácido nítrico concentrado; al precipitado amarillo que se formó dejar reposar durante una hora. Decantar el líquido sobrenadante y desecharlo, suspender el 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 (28g/100mL). Una solución clara debe formarse, y esta solución es evaporada en cápsula a sequedad; flamear la superficie del polvo con un mechero Bunsen hasta encenderse para evaporar las sales de amonio. Pesar el polvo, y debe ser aprox. 30 g. Disolver el polvo con 200 mL de agua destilada hasta llevar a un aforo de 300 mL; resultando una solución clara amarilla de ácido fosfomolibdico.

(5) Preparar una solución acuosa saturada de ácido pícrico (2.0 g / 100 mL).

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

(7) Se disuelven 5 g de ácido silicotúgstico en el ácido sulfúrico (6N) necesario para formar 100 mL de solución.

5.4.1.2 Procedimiento

Pesar de 2 a 4 g de muestra seca y molida (la muestra debe ser secada por debajo de los 50°C) manteniéndola toda la noche con 40 mL de metanol; a continuación calentar durante 4 horas a 50°C (agitando intermitentemente). La mezcla es entonces filtrada, y el residuo es lavado con 20 mL de metanol los extractos se combinan y se evapora el metanol en un rotavapor. El residuo es resuspendido con 2 mL de metanol y 12 mL de HCl al 1%; la mezcla es agitada y filtrada; para lavar el residuo se usan 8 mL de HCl al 1%, se combinan los extractos filtrados y se hace básico con amoníaco concentrado (aproximadamente al 25%). Se extrae con 3 porciones de 20 mL de cloroformo cada una, dando la fracción "A".

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

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

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

- 1) Reactivo de MAYER: El reactivo solo debe añadirse a soluciones previamente aciduladas con HCl ó H₂SO₄ diluidos. La solución no debe contener ácido acético o etanol, porque disuelven el precipitado. Sólo deben agregarse unas cuantas gotas de reactivo porque algunos alcaloides son insolubles en exceso de reactivo.
- 2) Reactivo de WAGNER: La mayoría de las soluciones aciduladas de alcaloides forman precipitados floculentos color marrón.
- 3) Reactivo de DRAGENDORFF: Se usa sobre soluciones aciduladas. Se puede recoger el precipitado anaranjado-marrón, liberar los alcaloides con solución de carbonato de sodio y extraerse con éter etílico o un disolvente similar.
- 4) Reactivo de SONNENSCHNEIDER: Los alcaloides y sales de amonio dan precipitados amarillos. Se pueden recuperar los alcaloides disolviendo en amoníaco.
- 5) Reactivo de HAGER: La mayoría de soluciones aciduladas de alcaloides forman precipitados color amarillo.
- 6) Reactivo de SCHEIBLER: La solución acidulada da un precipitado blanco-grisáceo.
- 7) Reactivo de ÁCIDO SILICOTUNGSTÉNICO: La solución acidulada da un precipitado blanco-grisáceo.

Resulta frecuente obtener reacciones falsas-positivas con los reactivos para alcaloides, motivo por el cual solo se considera como positiva la presencia de ellos

cuando cualquiera de las dos fracciones (A y B) da reacción positiva con los siete reactivos anteriormente enumerados.

El reactivo de HAGER (ácido pícrico) presenta una baja sensibilidad, de modo que 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 puede ser empleada de forma semi-cuantitativa comparando los precipitados formados con soluciones de estricnina de concentración conocida.

5.4.2 Determinación de glucósidos cianogénicos ³¹

5.4.2.1 Fundamento

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

Para poder cuantificar el HCN total que potencialmente puede ser liberado se hace uso de una hidrólisis enzimática (por medio de α -glucosidasa) del correspondiente glucósido cianogénico; y para poder cuantificar en forma precisa el HCN liberado, es conveniente trabajar algunos pasos a temperaturas bajas. Con este método es posible detectar cantidades del orden de 5 μ g de HCN, equivalentes a 46 mg de glucósidos cianogénicos referidos como linamarina.

5.4.2.2 Material y reactivos

- * Potenciómetro, CORNING, pH meter 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 PIREX # 9825.
- * Micro-molino marca TECATOR, mod CICLO-TEC.
- * Papel indicador de HCN (a).
- * Solución de β -glucosidasa con activador (b).
- * Solución de KCN equivalente a 100 μ g HCN/mL (KCN 24.1 mg/100mL).
- * Buffer de fosfatos pH 7 (c).
- * HCl 0.5 N.
- * Solución de pícrato de sodio alcalinizada (d).

(a)Papel Whatman del # 2 se cortan tiras bien medidas de 2x10cm y se remoja en una solución de pícrato 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 min.

(b)0.25 g de β -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 NaNO_3 , el cual actúa como activador de dicha enzima; todo lo anterior se lleva a un volumen de 250 mL con el mismo buffer para obtener una concentración de 1 mg de β -glucosidasa / mL y 0.08 M de 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.

5.4.2.3 Procedimiento

Curva estándar: se realizó como se indica en el siguiente cuadro, se usó una solución de cianuro de potasio cuya concentración equivale a 100 μg HCN/mL. Además con el fin de simular la interacción muestra-HCN liberada, se introduce como matriz alimenticia la fécula de maíz comercial. La curva estándar va de 5-60 μg 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.

5.4.2.3.1 Curva estándar de HCN.

Solución estándar (mL)	Matriz alimenticia (mg)	Buffer pH 7 (mL)		HCl 0.5 N (en frío) (mL)	Concentración de HCN (μg)
0.00	500	5	4 horas a 40°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

Preparación de la muestra: Es necesario partir del material íntegro; se sometió a una molienda fina e inmediatamente se pasa a un frasco que cierre

perfectamente y si no se va a realizar en ese momento la determinación se procede a colocar la muestra ya molida en el congelador.

Liberación del HCN de la muestra: se colocó en un tubo de cultivo Pirex # 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 adicionan 5 mL de solución de β -glucosidasa (1 mg de β -glucosidasa / mL y 0.08 M de NaNO_3 fría) se homogeneiza y se procede a colocar la tira de papel indicador humedecida (aproximadamente con 8 gotas de agua) en la boca del tubo y se cierra herméticamente con un tapón de rosca. Cuidando que la tira no gotee y no entre en contacto con la muestra.

Una vez que se tiene el anterior dispositivo se coloca en un baño maría a una temperatura de $40 \pm 1^\circ\text{C}$ y con una velocidad de agitación 30 r.p.m., transcurrido el tiempo se colocó en el congelador por 30 min., se saca el tubo y se destapa y se adiciona 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 tapó y se homogeneizó teniendo la precaución de que el líquido no toque el papel indicador y se colocó nuevamente en la incubadora por espacio de 15 min. 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 ligero color se consideran positivos, y se procede a su detección cuantitativa.

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 2-5min.) se recupera el disolvente (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).

5.4.2.3.2 Curva estándar para obtener HCN por interpolación.

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 siguiente formula para obtener los mg HCN/g de la muestra.

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

Donde:

X = μg de HCN.

m = mg de muestra.

5.4.3 Determinación de hemaglutininas (prueba semicuantitativa)³²

5.4.3.1 Fundamento

La detección de hemaglutininas o lectinas se basa en la observación de la aglutinación de glóbulos rojos provocada por un extracto de lectinas proveniente de una muestra. La técnica incluye diluciones seriadas del extracto, en la cual se determina el punto final por una estimación visual de la aglutinación de los glóbulos rojos los cuales son lavados y activados con una solución de proteasa (pronasa), lo cual aumenta la sensibilidad de la aglutinación.

5.4.3.2 Material y reactivos

- * Parrilla múltiple con agitación marca THERMOLYNE mod.4.
- * Centrífuga marca DINAC.
- * Tubos de centrifuga de 15 mL con graduación.
- * Incubadora marca BLUE-M.
- * Espectrofotómetro marca SEQUOIA-TURNER mod.340.
- * Adaptador para celdas de 10x75 mm (acondicionado a una abertura de 1 cm²).
- * Microtiter kit (Cook Eng-Alexander Virginia USA).

- * Filtro de vidrio con fibra de vidrio.
- * Sangre de hámster desfibrinada y lavada.
- * Solución anticoagulante. (a)
- * Solución salina al 1.0%.
- * Solución salina al 0.9%.
- * Solución de pronasa de E. de *streptomyces griseus* (SIGMA P-5147) al 0.2% en solución salina.

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

Sol. Heparina: sangre = 15-20 UI: 1 mL 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 sangre fresca.

b) en términos generales se usa pronasa al 0.2 % en solución salina, para el proceso de sensibilización; cuando se trabaja con sangre de hámster.

5.4.3.3 Procedimiento

(a). Preparación del extracto.

Se requiere 1g 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 hrs a 300 r.p.m. a temperatura ambiente.

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

(b). Preparación de la sangre.

Una vez que se sangra al animal (Hámster), la sangre se coloca en un matraz pequeño que contenga solución anticoagulante, agitar suavemente para la completa homogenización 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 min. Después del último lavado, se mide en el tubo de centrifuga, la cantidad de paquete de eritrocitos y se diluyen al 4% para lo cual se agregan por cada 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 hr. 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 pequeños), 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 cortó.

(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 un adaptador de celdas que permite el paso de solo 1 cm² 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 μ L del extracto y se procedió a realizar 24 diluciones sucesivas en forma de culebra (ocupando dos hileras).

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

Nota: es recomendable verificar que el volumen que se está tomando en el microdilutor, sea el requerido. Por lo que se realiza primero en una placa de prueba.

(f). Lectura.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se coloca la placa sobre el dispositivo de lectura, se observa a través del espejo el fondo de los pozos de cada una de las hileras de prueba.

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).

Se reporta el título de la determinación que corresponde al pozo de la máxima dilución que presenta prueba positiva de aglutinación.

5.5 Pruebas de Identificación y cuantificación de factores antinutricionales

5.5.1 Determinación de ácido fítico^{33, 34}

5.5.1.1 Fundamento

Este método emplea una columna de intercambio iónico, con el fin de purificar los extractos del ácido fítico, eliminando las fracciones menores de fosfatos de inositol, permitiendo una cuantificación real del ácido fítico. A su vez, la determinación colorimétrica se basa en la medida de la disminución de la absorbancia del complejo FeCl_3 -ácido sulfosalicílico (Reactivo de Wade) debido al enlace del Fe(III) con el ácido fítico.

5.5.1.2 Material y reactivos

- * Resina de intercambio aniónico Dowex AG1 X8 (200-400 mesh, Bio Rad No. de catálogo 140-1451)
- * Centrífuga CLAY-ADAMS, Dynac™.
- * Agitador mecánico tipo vortex LAB-LINE mod. 1192.
- * Tubos para centrífuga de 15 mL.
- * Vaso de precipitado de 50 mL.
- * Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER mod. 340.
- * HCl 2.4% o 0.65 N.
- * Jeringas de 3 mL (Plastipak)
- * NaCl con 0.7 N, 0.1 N y 1 N
- * Solución estándar, preparar una solución concentrada de ácido fítico que contenga 1000 μg ácido fítico/mL: pesar exactamente 0.080g de la sal de fitato de sodio, la cual tiene una pureza del 94% y humedad del 8.3 % (Sigma Co. P-3168) y aforar con agua desionizada hasta un volumen de 50 mL.
- * Reactivo de Wade (0.03 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Co. F-2877) + 0.3 g ácido sulfosalicílico (Sigma Co. S-0640) y disolverlos en agua desionizada hasta un volumen de 100 mL). El reactivo debe ser preparado en el momento de hacer la determinación espectrofotométrica, y una vez adicionado a las muestras debe leerse en menos de 30 minutos.

5.5.1.3 Procedimiento

Extracción del ácido fítico.

Pesar 1 g de alimento el cual debe contener menos de 5% de grasa), se coloca dentro de un vaso de precipitado de 50 mL y se le adiciona 20 mL de HCl 2.4 % (0.65 N), el pH de la mezcla debe ser menor o igual a 1, con el fin de disociar al fitato de complejos con minerales y proteínas. Se somete a agitación vigorosa durante 2 hrs. a temperatura ambiente y el extracto obtenido se transfiere cuantitativamente a unos tubos para centrifugarlos a 17,300 g (12000 r.p.m.) a temperatura ambiente, una vez transcurrido este tiempo se colecta el sobrenadante.

Preparación de columnas de intercambio iónico.

Pesar aproximadamente 0.5 g de resina de intercambio aniónico Dowex AG1 X8 (200-400 mesh, Bio Rad No. de catálogo 140-1451) e hidratarla con 0.6 mL de agua desionizada. Al mismo tiempo preparar las "columnas" utilizando jeringas de 3 mL (Plastipak) e introduciéndole en el fondo de la misma un tapón de fibra de vidrio (cuidando de no poner en exceso) y colocarla sobre un soporte. Agregarle a la columna la resina hidratada cuidando que quede asentada uniformemente. Una vez que la resina esté bien empacada en la columna adicionarle 15 mL de NaCl 0.7 N y posteriormente lavar con 30 mL de agua desionizada cuidando de dejar líquido suficiente (aproximadamente 0.5 cm de altura arriba de la resina empacada) para que no se seque la resina y quede lista para usarse.

Purificación por columna de intercambio iónico:

Se toma una alícuota de los sobrenadantes colectados y se diluye con agua desionizada para disminuir la concentración total del anión. Se recomienda la dilución de 1:25 para alimentos que contengan 1% o más de ácido fítico, la dilución de 5:25 en caso de contener menos. Para obtener mejores recuperaciones el pH de la alícuota diluida se ajusta a 6 (superior al punto isoeléctrico de las proteínas) con NaOH 1 N. Lavar la columna con 15 mL de NaCl 0.1 N (para eliminar el fósforo inorgánico y fracciones menores de inositol) y desechar el agua de lavado. Eluir el fitato con 15 mL de NaCl 0.7 N y coleccionar el extracto purificado.

Determinación espectrofotométrica.

Se toman 3 mL de agua desionizada (usada como blanco), o 3 mL de los estándares (soluciones de fitato de sodio conteniendo de 5 a 50 $\mu\text{g/mL}$ en agua desionizada) preparados de la siguiente forma:

mL solución concentrada (1000 μg ácido fítico / mL)	Aforar con agua desionizada hasta	Concentración final (μg ácido fítico / mL)
0.125	25 mL	5
0.250		10
0.500		20
0.750		30
1.000		40
1.250		50

Y los extractos purificados a través de la columna, los cuales fueron previamente ajustados a pH 3 y se les adicionan 1 mL de reactivo de Wade (0.03% de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ + 0.3% ácido sulfosalicílico en agua desionizada) se somete a agitación en un vortex por 5 seg. y se lee la absorbancia a 500 nm.

Se utiliza una celda con agua desionizada para calibrar el espectrofotómetro en cero, se lee la absorbancia del blanco, las muestras problema y los estándares, cada una de estas se le resta por separado el blanco para así obtener la absorbancia corregida respectiva. Realizar la curva patrón, regresión lineal, interpolar los datos y obtener la concentración de ácido fítico presente en las muestras.

5.5.1.4 Ejemplo de cálculos

Valores que se toman en cuenta de una muestra: fibra de trigo con ácido fítico All Bran®

Peso de la muestra: 1.0088g, volumen de HCl para extracción 20 mL, dilución empleada 1 mL / 25 mL, factor: 10 mL / 15 mL se refiere a la alícuota que se coloca en la columna de intercambio iónico y el volumen al que se lleva con la solución de NaCl 0.7 N que lo eluye.

5.5.1.4.1 Datos de la curva patrón

μg ácido fítico / mL	Absorbancia promedio ^a	Absorbancia corregida ^b
5	0.481	0.029
10	0.456	0.054
20	0.399	0.111
30	0.335	0.175
40	0.267	0.243
50	0.198	0.312

^a promedio de tres lecturas.

^b absorbancia corregida = absorbancia del blanco – absorbancia experimental

absorbancia del blanco = 0.510

Se elabora una curva patrón con los datos de absorbancia contra concentración de los estándares (5-50 μg ácido fítico / mL), calculando la regresión lineal y obteniendo la ecuación de la recta: $y = m x + b$

Para que con estos datos se puedan interpolar el valor de absorbancia obtenido para cada problema, y así conocer el valor correspondiente de concentración.

Regresión lineal

Ordenada al origen = $-5.701 \text{ e-}3$

Pendiente = $6.218 \text{ e-}3$

Coefficiente de correlación = 0.9988

Para la muestra absorbancia: 0.359 absorbancia corregida = 0.151

Absorbancia corregida = absorbancia del blanco – absorbancia experimental

Por interpolación en la curva patrón: 25.198 µg ácido fítico / mL

Cálculo: $\frac{1.0088 \text{ g}}{20 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ mL}}{25 \text{ mL}} \times \frac{10 \text{ mL}}{15 \text{ mL}} = 1.3450 \text{ e-3 g de polvo / mL}$

1.3450 e-3 g polvo ----- 100 %

25.198 e-6 g ác. Fítico ----- x = 1.8734 % de ácido fítico

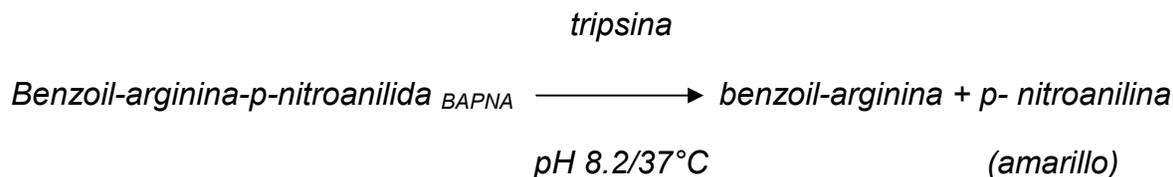
5.5.2 Determinación de inhibidores de tripsina ³⁵

5.5.2.1 Fundamento

Se basa en la inhibición producida por un extracto acuoso (solución de NaOH 0.01N), de la muestra sobre una solución estándar de tripsina.

El extracto se pone en contacto con una solución estandarizada de tripsina (20 µg/mL) y después de cierto tiempo se determina la actividad proteolítica remanente, por medio de un sustrato sintético (BAPNA), el cual producirá coloración, al ser hidrolizado por la enzima, la cual se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm, donde la coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de la muestra.

La reacción antes mencionada es la siguiente:



5.5.2.2 Material y reactivos

- * Potenciómetro CORNING mod. 430.
- * Parrilla de calentamiento y agitación múltiple THERMOLYNE mod. SP-13025.
- * Agitador mecánico tipo vortex LAB-LINE mod. 1192.
- * Baño regulador de temperatura GRANT mod. LR 22493.
- * Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER mod. 340.
- * Papel filtro Whatman #1.
- * NaOH 0.01 N.
- * HCl 0.001 N.
- * Hidroximetil-amino-metano (TRIS).
- * Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida-HCl (BAPNA).
- * Solución amortiguadora para TRIS (P. M. 121.14) pH 8.2/0.05 M (6.05g de TRIS y 2.94g 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 1L).
- * Solución α -N benzoil-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) (100mg 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). PREPARADA EL MISMO DÍA Y CUANDO ESTE EN USO DEBE MANTENERSE A 37°C.
- * Solución estándar de tripsina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (pesar con mucha exactitud 4 mg de tripsina bovina SIGMA # T-8253 y se disuelven en 200 mL de HCl 0.001 N). Debe ser almacenada en refrigeración donde puede durar de 2-3 semanas sin pérdida apreciable de actividad.
- * Ácido acético al 30%. (30 mL de ácido acético en 100 mL de agua desionizada).

5.5.2.3 Procedimiento

a) Preparación del extracto.

Se pesa 1 g de muestra finamente molida y desengrasada y se le adiciona 45 mL de NaOH 0.01N, se ajusta el pH de ésta suspensión a 9.6 ± 0.2 y se afora con NaOH 0.01N a 50 mL. Se transfiere a un vaso de precipitados y se agita la suspensión

mecánicamente por espacio de 2 ½ hrs. Después de dicho tiempo se deja ½ hr en reposo, y por simple decantación se obtiene el sobrenadante eliminando el residuo insoluble.

El sobrenadante se diluye 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 siguiente se observa como se trabajo una serie de tubos para determinar la actividad inhibitoria de la muestra

CLAVE	EXTRACTO (ML)	AGUA (ML)	TRIPSINA (ML) A 37°C	ÁCIDO ACÉTICO 30% ML		BAPNA (ML) A 37°C		ÁCIDO ACÉTICO 30% ML
B1	1.8	0.2	2.0	1	Baño a	5	Baño a	--
1	1.8	0.2	2.0	--		5		1
B2	1.4	0.6	2.0	1	37°C	5	37°C	--
2	1.4	0.6	2.0	--		5		1
B3	1.0	1.0	2.0	1	10 min.	5	10 min.	--
3	1.0	1.0	2.0	--		5		1
B4	0.6	1.4	2.0	1	Exactos	5	Exactos	--
4	0.6	1.4	2.0	--		5		1
B5	0	2.0	2.0	1		5		--
5	0	2.0	2.0	--		5		1

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, o es centrifugado por 15 min.

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.

5.5.2.4 Cálculos para determinar los inhibidores de tripsina

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 Kakadé 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 1 mL de extracto. Si el % de inhibición no cae dentro del rango de 40 al 60% de inhibición es necesario hacer un ajuste del extracto para que cumpla este requisito.

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

Donde:

R = U.T. de la referencia (tubo con 0.0 mL de extracto).

A₃ = 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.

$$\text{U.T.I.} = R - \text{U.T.}$$

Donde:

R = valor de unidades de tripsina de la referencia.

U.T. = Unidad de Tripsina de cada tubo de la muestra analizada.

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.

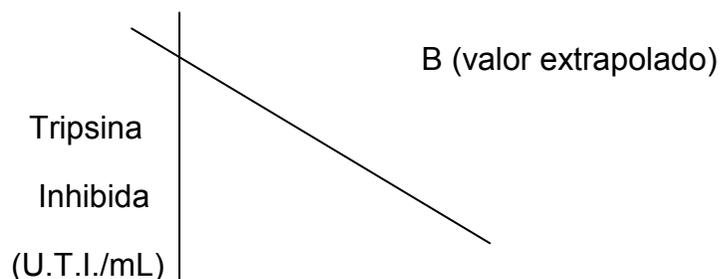


Figura a. Gráfica U.T.I./mL vs. mL de extracto

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.

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

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

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

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 $F = 1$.

N = concentración de la muestra mL / mg de muestra.

5.5.3 Determinación del contenido de taninos (Método ISO 9648: 1988 (E))³⁶

5.5.3.1 Fundamento

Se basa en la reducción del ión férrico, debido a los polifenoles con la posterior formación de un complejo colorido en condiciones aleatorias cuantificado

espectrofotométricamente a una longitud de onda 525 nm. Este método no es específico para un solo tipo de polifenoles.

5.5.3.2 Material y reactivos

- * Centrifuga CLAY-ADAMS, Dynac™.
- * Tubos para centrifuga de 15 mL.
- * Vasos de precipitado de 50 mL.
- * Agitador mecánico tipo Vórtex 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, proteger de la luz. La solución sólo se puede almacenar por una semana).
- * Amoníaco 8 g/L de NH₃ (de un reactivo de hidróxido de amonio con 28-30% de NH₃ y una densidad de 0.896 g/L se deben medir 3.1 mL de hidróxido de amonio y llevar a 100 mL con agua desionizada).
- * Dimetilformamida al 75% v/v (DMF) (colocamos 75 mL de dimetilformamida en un matraz aforado de 100 mL. Diluir con agua destilada; permitir que la solución llegue a temperatura ambiente y después llevar al aforo. Precaución la dimetilformamida puede ser peligrosa para la salud cuando se inhala o hace contacto con la piel. También es irritante para los ojos).
- * Solución de Citrato férrico amoniacal (3.5 g/L). (preparar 24hr antes de usarse 0.35g de citrato férrico amoniacal aforados en 100 mL de agua desionizada. El reactivo debe tener entre 17 y 20 % de hierro (m/m)).

5.5.3.3 Procedimiento

Se pesa alrededor de 1 g de muestra finamente molida y desengrasada y en un vaso de precipitado se agrego 25 mL de DMF y se colocó el agitador magnético, se agito durante 1 hora. Transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL, enjuagado 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 min. a 2700 r.p.m. y luego se decanta el sobrenadante y se homogeneizo. Cada lectura se realiza a 525 nm. Se toma tres alícuotas del extracto y se trabaja de la siguiente manera:

- a) A cada uno de los tres tubos rotulados, donde uno de ellos será el blanco se agrega 1 mL de extracto.
- b) Se adiciono 5 mL de agua desionizada y al blanco 6 mL, se agito con el vórtex, enseguida se agrego 1 mL de citrato férrico de amoniacal y agito nuevamente, por último se adiciono 1 mL de amoníaco con excepción del blanco.
- c) Se incubo durante 10 min. a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ y se realizo la lectura a 525 nm en el espectrofotómetro.

Medición del contenido de taninos

Se preparan 8 matraces aforados de 25 mL y se les adicionó respectivamente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 mL de la solución de ácido tánico (2 mg/mL), y se llevaron hasta la marca del aforo con dimetilformamida.

La escala de concentración así obtenida le corresponden los contenidos de ácido tánico de 0, 0.08, 0.16, 0.24, 0.32, 0.40, 0.48, 0.56 mg/mL respectivamente.

De cada uno de los matraces se midió 1 mL de solución e introdujeron en un tubo de ensaye. Se añadió 5 mL de agua y 1 mL de citrato férrico amoniacal a cada tubo; se agito unos segundos haciendo uso del vórtex. Se añadió 1 mL de solución

de hidróxido de amonio a cada tubo, se agitó nuevamente con el vórtex por unos segundos. Después de 10 min. \pm 1 min. se midió la absorbancia, a 525 nm, ajustando el espectrofotómetro con un blanco de agua.

Trazar una gráfica de absorbancia contra concentración de ácido tánico (expresado como mg/mL de ácido tánico). Nota: la curva puede no pasar por el origen sin embargo, no deberá de ser corregida por el cero de la escala.

5.5.3.4 Cálculos

El contenido de taninos, expresados como porcentaje de masa de ácido tánico en relación a la materia seca es igual a:

$$\frac{C \times \text{Vol. Total} \times 100}{m} = \text{Ácido Tánico mg} / 100 \text{ gramos de muestra}$$

Donde:

C = Concentración de ácido tánico, en mg/mL, de la solución de prueba leída, en la curva de calibración.

Vol. Total = Volumen de extracción de la muestra en mL.

m = Peso, en gramos, de la porción de la muestra.

5.6 Determinación de azúcares (reductores directos y totales)

5.6.1 Extracción de los azúcares ²⁹

5.6.1.1 Fundamento

El método se basa en la extracción de la matriz alimentaria con etanol a reflujo, en donde los vapores condensados arrastran los hidratos de carbono solubles los cuales después pueden ser cuantificados por algún método colorimétrico. En este caso se empleó el método DNS (ácido dinitro salicílico), el cual se basa en el aprovechamiento de las propiedades reductoras de los azúcares, donde los grupos nitro del DNS son reducidos a grupos amino por los azúcares reductores, apreciándose un cambio de coloración que va del amarillo al naranja. Dicha coloración permite construir una curva patrón en donde se aprecia una respuesta proporcional al color producido en función de la concentración.

Finalmente para la determinación de azúcares como reductores totales es necesario llevar a cabo un proceso de hidrólisis ácida el cual nos permite conocer el contenido de azúcares totales que existen en la matriz. Dicha hidrólisis libera azúcares que están unidos por enlaces glucosídicos exponiendo el grupo carbonilo; los cuales presentan propiedades reductoras para poder ser cuantificados.

5.6.1.2 Material y reactivos

- ◊ Matraz de bola de 250 mL Kimax.
- ◊ Matraz aforado de 100 mL.
- ◊ Parilla eléctrica con calentamiento y agitación.
- ◊ Refrigerante.
- ◊ Mangueras.
- ◊ Papel filtro Whatman # 40.
- ◊ Bomba de recirculación de agua (Little Grant pump. Mod. 1).
- ◊ Rotavapor (Büchi Mod. RE 111).
- ◊ Baño para rotavapor (Büchi Mod. 461 water bath).
- ◊ Solución de etanol al 80 %.

5.6.1.3 Procedimiento

En los matraces de bola se colocaron aproximadamente 2 g del residuo desengrasado y molido. Se adicionaron 100 mL de la solución de etanol al 80 % (v/v), se colocó el refrigerante y se sometió a reflujo por un periodo de 2 horas y media. Al término de este tiempo el extracto se dejó enfriar y se filtró a través del papel Whatman.

Se eliminó el residuo y el extracto etanólico se colocó en un rotavapor a una temperatura de 70 °C hasta la eliminación del etanol sin llevar el residuo a sequedad. El extracto sin etanol se aforo a 100 mL a partir del cual se realizó la cuantificación de azúcares como reductores directos y totales por el método DNS.

5.6.2 Cuantificación de azúcares (reductores directos) por el método de DNS. ²⁹

5.6.2.1 Material y reactivos

- ◊ Tubos de ensayo.
- ◊ Gradilla para tubos.
- ◊ Espectrofotómetro Sequoia-Turner mod. 340.
- ◊ Balanza analítica Sartorius Analytc.
- ◊ Celdas de vidrio para el espectrofotómetro de 1 cm de paso de luz.
- ◊ Baño de agua hirviendo.
- ◊ Solución de NaOH al 1.4 % (1.4 g de NaOH se aforo a 100 mL con agua destilada).
- ◊ Reactivo Ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). Disolver 10 g de DNS con 16 g de NaOH y 300g de tartrato de sodio y potasio en un litro de agua desionizada. Mantener la solución en un frasco ámbar y prepararla dos días antes de usarla. La solución es estable por 6 meses a temperatura ambiente.
- ◊ Solución estándar de glucosa 2 mg/mL (0.2 g de glucosa anhidra se aforaron a 100 mL con agua desionizada). Debe utilizarse el mismo día de la preparación o bien adicionar 1 mL de tolueno y almacenar en refrigeración para su conservación.

5.6.2.2 Procedimiento

Se tomó 1 mL del extracto preparado y se colocaron en un tubo de ensaye, se adicionó 1 mL de la solución DNS y se colocaron en un baño de agua hirviendo por 5 min exactos.

Pasando este tiempo se sacan los tubos y se dejan enfriar para finalmente diluir con 10 mL de agua desionizada. Así mismo se corrió un blanco en donde se

sustituyó 1 mL del extracto por 1 mL de agua destilada. Finalmente se ajustó con este blanco el espectrofotómetro y se midió la absorbancia de la muestra a longitud de onda de 540 nm.

Al mismo tiempo que se trabajó con la muestra, se realizó una curva de calibración, la cual permitió cuantificar posteriormente el contenido de reductores directos en el residuo; se adicionaron 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mL de la solución estándar de glucosa 2 mg/mL y se completó hasta un volumen final de 1 mL con agua desionizada cada tubo y se prosiguió de la misma manera en que se trató la muestra. Finalmente se construyó una curva de absorbancia en función de la concentración.

El resultado obtenido es considerado como la cantidad de reductores directos obtenidos en el extracto. De cada extracto se desarrolló color por triplicado.

5.6.3 Determinación de azúcares totales (después de la hidrólisis) ²⁹

5.6.3.1 Material y reactivos

- ◊ Matraces de 250 mL.
- ◊ Matraces aforados de 100 mL.
- ◊ HCl concentrado (densidad 1.18 g/mL a 20 °C y pureza 37.3 %).
- ◊ Hidróxido de sodio 1 N.

- ◊ Solución de azúcar invertido al 1 % (m/v) (se pesaron 9.5 g de sacarosa pura y se adicionaron 5 mL de HCl concentrado con 100 mL de agua destilada, se almacenó por 3 días a temperatura ambiente (20-25 °C), al término de este tiempo se diluyó con agua destilada hasta 1 L.
- ◊ Solución estándar de azúcar invertido (glucosa 50% y fructosa 50%) 2 mg/mL (se neutralizó una alícuota de la solución de azúcar invertido al 1 % con NaOH 1N y se diluyó hasta alcanzar la concentración deseada en el estándar de azúcar invertido (diluir 1:5), la cual fue de 2 mg/mL).

5.6.3.2 Procedimiento

Se tomó una alícuota de 50 mL del extracto del residuo y se agregaron 5 mL de HCl concentrado, se almacenó durante 3 días a temperatura ambiente (20-25 °C).

Cuando la hidrólisis se completo, se neutralizó el extracto hidrolizado con NaOH 1N y se llevó a un volumen final de 100 mL a partir del cual se tomó 1 mL del extracto preparado y se colocaron en un tubo de ensaye, se adicionó 1 mL de la solución DNS y se colocaron en un baño de agua hirviendo por 5 min exactos.

Pasando este tiempo se sacaron los tubos y se dejan enfriar para finalmente diluirlos con 10 mL de agua desionizada. Así mismo se corrió un blanco en donde se sustituyó 1 mL del extracto por 1 mL de agua destilada. Finalmente se ajustó con este blanco el espectrofotómetro y se midió la absorbancia de la muestra a longitud de onda de 540 nm.

Al mismo tiempo que se trabajó con la muestra, se realizó una curva de calibración, la cual permitió cuantificar posteriormente el contenido de reductores después de la hidrólisis en el residuo; se adicionaron 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mL de la solución estándar de azúcar invertido 2 mg/mL y se completó hasta un volumen

final de 1 mL con agua desionizada cada tubo y se prosiguió de la misma manera en que se trató la muestra. Finalmente se construyó una curva de absorbancia en función de la concentración.

Del extracto se hizo por triplicado cada determinación colorimétrica así como para el tratamiento de hidrólisis.

5.6.3.3 Cálculos

Reductores directos

$$X \text{ Concentración de glucosa mg/ml} = \frac{Y(\text{absorbancia}) - 0.0554}{0.6378}$$

$$\frac{X \text{ Concentración de glucosa mg/ml} * \text{Factor de dilución ml} * 100\text{g muestra}}{\text{Cantidad de muestra empleada}}$$

Reductores después de la hidrólisis

$$X \text{ Concentración de glucosa mg/ml} = \frac{Y(\text{absorbancia}) - 0.019}{0.394}$$

$$\frac{X \text{ Concentración de glucosa mg/ml} * \text{Factor de dilución ml} * 100\text{g muestra}}{\text{Cantidad de muestra empleada}}$$

Se continua con la siguiente ecuación.

$$\text{reductores después de la hidrólisis en glucosa/fructosa} = (\text{reductores después de la hidrólisis en sacarosa} - \text{reductores directos}) \times 0.95$$

Los reductores después de la hidrólisis se encuentran en forma de sacarosa hay que transformar el valor a moléculas de glucosa y fructosa (factor 0.95), para poder continuar con la siguiente fórmula.

Reductores totales = reductores directos + reductores después de la hidrólisis en glucosa/fructosa

5.7 Digestibilidad *in vitro* con líquido ruminal ^{18, 19, 37, 38, 39}

5.7.1 Fundamento

Esta determinación esta basada en la simulación del proceso de digestión de los rumiantes y consiste en poner en contacto una muestra con líquido ruminal en condiciones anaerobias, se efectúa una digestión bacteriana y después se adiciona pepsina en medio ácido para permitir el desarrollo de una digestión enzimática.

Posteriormente se lleva a cabo una determinación gravimétrica de los constituyentes no digeridos de las paredes celulares para obtener finalmente la digestibilidad de la muestra, tomando en cuenta el peso final de la misma.

5.7.2 Material y reactivos

- ⊗ Baño de agua con agitación (Lab-Line/Dubnoff incu-Shaker Mod. 357).
- ⊗ Tapones de hule acondicionados con una aguja hipodérmica (No. 21) simulando una válvula de Bunsen.
- ⊗ Matraces Erlenmeyer de 25 mL.
- ⊗ Papel filtro Whatman # 4 (filtración rápida).
- ⊗ Solución amortiguadora de McDougall. (1)
- ⊗ Solución de pepsina ácida. (2)
- ⊗ Solución de HCl 6 N.

- ⊗ Solución de $MgCl_2$ al 4% (m/v).
- ⊗ Solución de HCl 3 N.
- ⊗ Líquido ruminal.

(El líquido ruminal se extrajo de un rumiante fistulado, el cual fue transportado al laboratorio de investigación bajo condiciones controladas de temperatura. Su lugar de procedencia fue el Colegio de Post-graduados de la Universidad Autónoma Chapingo).

(1) Solución amortiguadora de McDougall:

Solución 1: Se pesaron 3.7 g de Na_2HPO_4 , 9.8 g de $NaHCO_3$ y se llevaron a un volumen final de 1 L con agua desionizada a 40°C.

Solución 2: Se pesaron 4.7 g de NaCl, 5.7 g de KCl, 0.4 g $CaCl_2$ y 0.6 g de $MgCl$ y se llevaron a un volumen final de 100 mL.

La solución amortiguadora se preparó adicionando 10 mL de la solución 2 a 1 L de la solución 1, y se agitó durante 15 minutos, esta solución fue preparada el mismo día en que inició la determinación.

(2) Solución de pepsina ácida: Se pesaron 0.2 g de pepsina y se disolvieron en 1 mL de HCl 6N. Esta relación es por cada matraz.

5.7.3 Procedimiento

a) Preparación de la solución amortiguadora-líquido ruminal

1. Una vez extraído el líquido ruminal se mantiene a temperatura constante.
2. Se filtra el líquido ruminal a través de gasas y se mantiene a 38°C.

3. Se ajusta la solución amortiguadora de McDougall a pH = 7 y se adicionó 1 mL de $MgCl_2$ al 4% por cada litro de solución amortiguadora McDougall utilizada.
4. Se tomaron 5 mL de solución amortiguadora y se mezclaron con 15 mL de líquido ruminal.
5. La solución amortiguadora-líquido ruminal se introdujo en un baño de agua a 38°C y se le burbujeo CO_2 durante 8 minutos.

b) Determinación de la digestibilidad ruminal

Nota: La determinación se efectúa por duplicado.

Es necesario correr un blanco de la reacción que contenga todos los reactivos (excepto la muestra en estudio), y otro blanco que contenga alfalfa excepto la muestra en estudio, y sean tratadas bajo las mismas condiciones de experimentación.

1. Se pesó 0.25 g de muestra molida y colocada en un matraz Erlenmeyer.
2. Se adicionó 20 mL de la solución amortiguadora-líquido ruminal a 38°C.
3. Se tapó los matraces con tapón de hule acondicionado con la aguja hipodérmica para eliminar el CO_2 .
4. Se introdujeron en el baño de agua a una temperatura de 38°C bajo condiciones de oscuridad durante 48 horas.
5. Una vez transcurrido el tiempo, se sacaron los matraces del baño de agua y se adicionó 5 gotas de HCl 3N para detener la digestión bacteriana.
6. Se adicionaron a cada matraz 1 mL de la solución de pepsina ácida, agitando suavemente.

7. Se introdujeron en baño de agua a una temperatura de 38°C bajo condiciones de oscuridad durante 48 horas.
8. Se sacaron los matraces del baño de agua y se filtraron por gravedad (colocando en el embudo círculos de papel Whatman # 4 que se deben tener a peso constante).
9. Se lavó el residuo con agua destilada y se dejan filtrando el tiempo necesario.
10. Una vez transcurrido el tiempo se dejó secar el papel con el residuo digerido en estufa de vacío hasta peso constante.

5.7.4 Cálculos

$$\text{Muestra digerida} = [\text{Peso}_{\text{muestra digerida}} + \text{Peso}_{\text{papel}}] - \text{Peso}_{\text{papel}}$$

$$\% \text{ Digestibilidad} = \frac{\text{Peso}_{\text{muestra}} - (\text{Peso}_{\text{muestra digerida}} - \text{Peso}_{\text{blanco digerido}})}{\text{Peso}_{\text{muestra}}} \times 100$$

6.0 Resultados y Discusión

A través de esta investigación se logró conocer la calidad nutricia de las plantas tanto cultivables como silvestres, e igualmente, obtener información sobre su parte toxicológica y antinutricional. En los frutos la cantidad de azúcares reductores directos y totales, así como la digestibilidad *in vitro* con líquido ruminal para rumiantes.

6.1 Análisis proximal

En la Tabla 1 se muestra el análisis proximal de *Lonchocarpus longystilus* pitt Balché, *Peltogyne mexicana* Palo morado, *Heteroflorum* sp. Pertenecientes a la familia de las leguminosas y *Cucúrbita moschata*, *Cucúrbita pepo* semillas de calabaza pertenecientes a la familia de las cucurbitáceas. Es importante mencionar que todas estas semillas se trabajaron secas sin embargo, se realizó humedad residual con el fin de hacer los cálculos en base seca.

Tabla 1. Análisis bromatológico de leguminosas y cucurbitáceas en base húmeda (g/100g muestra)

Planta nombre Científico	Humedad	Cenizas	Grasa	Proteína	Fibra cruda	Hidratos de carbono ^a
<i>Lonchocarpus longystilus pitt</i>	7.58±0.09	5.35±0.06	13.96±0.08	22.68±0.23	4.74±0.15	45.69
<i>Peltogyne mexicana</i>	9.44±0.04	2.08±0.02	5.16±0.06	9.20±0.19	28.68±0.87	45.43
<i>Heteroflorum sp.</i>	8.28±0.06	3.99±0.15	1.79±0.03	9.75±0.38	32.75±0.50	43.52
<i>Cucurbita moschata</i>	3.97±3.93	3.93±0.08	34.46±0.36	38.48±0.70	9.34±0.34	9.82
<i>Cucurbita pepo</i>	4.69±0.08	5.43±0.09	36.92±0.33	40.24±0.17	10.38±0.41	2.34

Los valores son el promedio ± desviación estándar de un triplicado con un C. V. < 5%.

^a Obtenido por diferencia.

Por lo que en la Tabla 1a se presentan los resultados en base seca para un mejor análisis de los componentes.

Tabla 1a. Análisis bromatológico de leguminosas y cucurbitáceas en base seca (g/100g muestra)

Planta nombre Científico	Cenizas	Grasa	Proteína	Fibra cruda	Hidratos de carbono ^a
<i>Lonchocarpus longystilus pitt</i>	5.79±0.06	15.10±0.08	24.55±0.25	5.13±0.16	49.43
<i>Peltogyne mexicana</i>	2.29±0.02	5.71±0.21	10.17±0.21	31.67±0.63	50.16
<i>Heteroflorum sp.</i>	4.36±0.17	1.95±0.03	10.54±0.42	35.7±0.4	47.45
<i>Cucurbita moschata</i>	4.1±0.08	35.87±0.41	40.10±0.73	9.73±0.35	10.20
<i>Cucurbita pepo</i>	5.69±0.11	38.74±0.34	42.23±0.18	10.88±0.43	2.45

Los valores son el promedio ± desviación estándar de un triplicado con un C. V. < 5%.

^a Obtenido por diferencia.

De las leguminosas analizadas, la semilla de Balché (*Lonchocarpus longystilus pitt*) es la que tiene un alto contenido de proteína, grasa y cenizas que caracteriza a esta familia, además de un bajo valor en fibra. En cuanto a la semilla de Palo morado (*Peltogyne mexicana*) es baja en proteína y alta en fibra. El alto valor que presentó *Heteroflorum sp.* se debe a que se molió la vaina y semilla, al igual de un bajo valor en proteína y grasa. Estos resultados se asemejan a un cereal.

En las cucurbitáceas (*cucurbita moschata* y *cucurbita pepo*) los valores obtenidos de proteína y de grasa son altos, con poca variabilidad al ser comparados con los reportados en otras investigaciones.

En la Tabla 2 y 2a se muestra el análisis proximal de los frutos: Chicozapote (*Achras zapota*) y Zapote (*Manilkara sapotilla*) a analizar en dos formas: la primera solo la pulpa y en la segunda pulpa con cáscara. Otro fruto estudiado fue el Pepino kaat (*Parmentiera aculeata*).

Tabla 2. Análisis bromatológico de frutos en base húmeda (g/100g muestra)¹

Planta nombre Científico	Humedad	Cenizas	Grasa	Proteína	Fibra cruda	Hidratos de carbono ²
<i>Achras zapota</i>	10.04±0.19	3.46±0.05	13.30±0.16	8.08±0.03	10.39±0.32	54.73
<i>Manilkara sapotilla</i> *	11.56±0.07	1.97±0.04	1.43±0.06	2.48±0.03	5.27±0.05	77.28
<i>Manilkara sapotilla</i> **	10.35±0.07	1.76±0.05	2.86±0.12	2.51±0.04	8.32±0.30	74.20
<i>Parmentiera aculeata</i>	15.05±0.17	4.14±0.04	0.20±0.04	7.89±0.31	7.22±0.06	65.50

Los valores son el promedio ± desviación estándar de un triplicado con un C. V. < 5%.

¹Las muestras fueron adquiridas ya secas, en los frutos frescos la humedad va de 70 a 90%.

²Obtenido por diferencia.

* Solo pulpa

** pulpa con cáscara

Tabla 2a. Análisis bromatológico de frutos en base seca (g/100g muestra)

Planta nombre Científico	Cenizas	Grasa	Proteína	Fibra cruda	Hidratos de carbono ^a
<i>Achras zapota</i>	3.85±0.06	14.75±0.34	9.01±0.04	11.55±0.25	60.84
<i>Manilkara sapotilla</i> *	2.23±0.04	1.62±0.07	2.80±0.05	5.96±0.06	87.39
<i>Manilkara sapotilla</i> **	1.96±0.06	3.28±0.17	2.86±0.04	9.31±0.21	84.55
<i>Parmentiera aculeata</i>	4.87±0.04	0.24±0.04	9.30±0.37	8.50±0.07	77.10

Los valores son el promedio ± desviación estándar de un triplicado con un C. V. < 5%.

^a Obtenido por diferencia.

* Solo pulpa

** pulpa con cáscara

Las sapotáceas son frutos por lo que presentan un alto contenido en azúcares, en el chicozapote (*Achras zapota*) resalta el alto porcentaje de grasa y un moderado aumento en los valores de cenizas y proteína con respecto a los reportados en otras investigaciones. En cuanto al zapote (*Manilkara sapotilla*) se observa que el contenido de cenizas es más bajo que el reportado en la literatura.

En cuanto a la *Parmentiera aculeata* o pepino kaat se obtuvieron valores ligeramente altos en cenizas y fibra, al ser comparados con los reportados en la literatura.

6.2 Factores tóxicos

En la Tabla 3 se muestran los factores tóxicos: alcaloides, glucósidos Cianogénicos y hemaglutininas o lectinas, tanto como para las semillas y frutos.

Tabla 3. Factores tóxicos en las plantas analizadas

Planta nombre Científico	Alcaloides	Glucósidos cianogénicos detección cualitativa ^a	Hemaglutininas Título de aglutinación ^b
<i>Lonchocarpus longystilus pitt</i>	Negativo	Negativo	10
<i>Peltogyne mexicana</i>	Negativo	Negativo	9
<i>Heteroflorum sp.</i>	Negativo	Negativo	10
<i>Cucúrbita moschata</i>	Negativo	Negativo	8
<i>Cucúrbita pepo</i>	Negativo	Negativo	7
<i>Achras zapota</i>	Negativo	Negativo	ND
<i>Manilkara sapotilla*</i>	Negativo	Negativo	ND
<i>Manilkara sapotilla**</i>	Negativo	Negativo	ND
<i>Parmentiera aculeata</i>	Negativo	Negativo	ND

ND = No Detectado *Solo pulpa ** pulpa con cáscara. ^a muestras que no presentaron coloración en el papel indicador. ^b Título: máxima dilución en la que se presentó aglutinación en eritrocitos de hámster.

La presencia de alcaloides y glucósidos cianogénicos es negativa en las plantas analizadas.

Las leguminosas y los cucurbitáceas presentan títulos de aglutinación que van desde 7 hasta 10, aunque se conoce que las hemaglutininas o lectinas presentan un efecto tóxico con un número de aglutinación mayor a 10. Por lo que se consideran títulos de aglutinación permitidos para su consumo.

6.3 Factores antinutricionales

En la Tabla 4 se muestran los factores antinutricionales determinados a las plantas cultivables y silvestres, como es ácido fítico, inhibidores de tripsina y taninos.

Tabla 4. Factores antinutricionales en las plantas analizadas

Planta Nom. Científico	Ácido fítico	Inhibidores de Tripsina	Taninos
Expresado en:	g/100g mta	UTI ¹	g/100g mta
<i>Lonchocarpus longystilus pitt</i>	0.78±0.01	0.69±0.02	ND
<i>Peltogyne mexicana</i>	1.30±0.06	2.99±0.01	5.20±0.01
<i>Heteroflorum sp.</i>	0.75±0.06	0.50±0.01	ND
<i>Cucúrbita moschata</i>	2.45±0.05	0.27±0.00	ND
<i>Cucúrbita pepo</i>	3.50±0.10	0.94±0.02	ND
<i>Achras zapota</i>	0.20±0.00	2.21±0.10	0.91±0.02
<i>Manilkara sapotilla</i> *	ND	1.12±0.05	ND
<i>Manilkara sapotilla</i> **	0.26±0.01	1.71±0.1	ND
<i>Parmentiera aculeata</i>	ND	0.94±0.03	ND

¹Los inhibidores de tripsina están dados en UTI / mg de muestra. UTI =Unidades de tripsina inhibida. Los valores son el promedio ± desviación estándar de un triplicado con un C. V. < 5%.

ND = No Detectado.

* Solo pulpa

** pulpa con cáscara

En la determinación de ácido fítico los valores que destacan por ser mayores al 1% se encuentran la leguminosa *Peltogyne mexicana* o palo morado y las cucurbitáceas. Las demás plantas obtuvieron valores menores al 1% o no contenían ácido fítico. Los valores en realidad no son tan altos pero pueden ejercer su valor antinutricional al disminuir la absorción de calcio, aunque parece que los rumiantes utilizan el fósforo de los fitatos del mismo modo que otras fuentes de fósforo. Los valores fueron obtenidos al ser sustituidos en la fórmula de la línea recta de la gráfica, ver ANEXO I.

En los inhibidores de tripsina de las plantas que sobresale es la leguminosa *Peltogyne mexicana* o palo morado y las sapotáceas con valores desde 1.12 a 2.99 UTI/ mg de muestra. Las demás plantas analizadas presentaron valores menores a una UTI/ mg de muestra. En ninguno de los casos estas cantidades se consideran un riesgo para la salud.

La leguminosa *Peltogyne mexicana* o palo morado es la que presentó un porcentaje alto de taninos comparado con las demás plantas que obtuvieron valores menores al 1%. Se conoce que un porcentaje de entre 2 a 9 puede causar desorden fisiológico en animales. Los valores fueron obtenidos al ser sustituidos en la fórmula de la línea recta de la gráfica, ver ANEXO II.

6.4 Azúcares reductores directos y totales

La Tabla 5 muestra los valores obtenidos para los frutos específicamente que son el Chicozapote *Achras zapota*, Zapote *Manilkara sapotilla* solo pulpa y pulpa con cáscara.

Tabla 5. Azucares reductores directos y totales en los frutos analizados (g/100g muestra) en base seca

Planta nombre Científico	Reductores directos	Reductores después de la hidrólisis	Totales
<i>Achras zapota</i>	5.57±0.16	11.17±0.05	16.74±0.05
<i>Manilkara sapotilla</i> *	25.6±0.56	45.45±3.4	71.08±3.4
<i>Manilkara sapotilla</i> **	17.25±0.12	22.76±0.4	40.01±0.4

Los valores son el promedio ± desviación estándar de un triplicado con un C. V. < 5%.

* Solo pulpa

** pulpa con cáscara

Los frutos de la familia de las sapotáceas tienen un alto contenido de hidratos de carbono (61-87% en base seca). En el caso del chicozapote aproximadamente un 27% son reductores totales en cambio en la pulpa de zapote constituyen el 81% del total.

La proporción de reductores directos, es semejante en chicozapote y zapote en sus dos presentaciones, 35% de los reductores totales.

El chicozapote tiene un contenido mayor de hidratos de carbono diferentes de los azúcares reductores.

Los valores se obtuvieron al ser sustituidos en la fórmula de la línea recta obtenida de las gráficas, ver ANEXO III y IV.

6.5.1 Digestibilidad *in vitro* con líquido ruminal

En la Tabla 6 se presentan los datos obtenidos después de llevar a cabo la digestibilidad *in vitro* de las plantas en estudio empleando líquido ruminal de un animal fistulado. También se efectuó la digestión de alfalfa como muestra de referencia para asegurarnos que las condiciones del medio de reacción fueran las adecuadas.

Tabla 6. Digestibilidad *in vitro* con líquido ruminal

Planta nombre Científico	% digestibilidad en rumiantes ^a
Alfalfa	72.65±1.16 ^b
<i>Lonchocarpus longystilus pitt</i>	53.57
<i>Peltogyne mexicana</i>	60.88
<i>Heteroflorum sp.</i>	61.59
<i>Cucúrbita moschata</i>	53.95
<i>Cucúrbita pepo</i>	52.85
<i>Achras zapota</i>	53.50
<i>Manilkara sapotilla</i> *	52.75
<i>Manilkara sapotilla</i> **	61.01
<i>Parmentiera aculeata</i>	98.25

^a Los valores son el promedio de un duplicado

^b Valores son el promedio ± la desviación estándar de un triplicado con un C. V. < 5%.

* Solo pulpa ** pulpa con cáscara

En la digestibilidad para rumiantes la planta que resalta por el valor obtenido es la de pepino kaat (*Parmentiera aculeata*) con un 98% que es mayor a la de la alfalfa, esto se puede deber a su composición que es notablemente baja en lípidos. Las demás plantas se encuentran entre un rango de 52 al 62 % de digestibilidad, podemos mencionar que la digestibilidad de las plantas dependerá de la composición de cada una de ellas para ser total o parcialmente aprovechadas por el rumiante. Los valores de digestibilidad de estas plantas es adecuada para ser utilizadas como alimento para humanos y en algunos casos como forrajes para rumiantes.

7 Conclusiones

- ❖ Se determino el valor nutrimental de cada una de las plantas cultivables como silvestres, se concluye que no en todos los casos se demostró la misma calidad y cantidad de los componentes, al compararla con su familia o ellas mismas en investigaciones anteriores, algunos valores son diferentes probablemente debido a factores como el clima, el tipo de suelo u otros factores externos.
- ❖ En cuanto a la parte toxicológica se observo que no se encontraron presentes alcaloides, ni glucósidos cianogénicos por lo que podemos decir que estos factores no producen ningún efecto tóxico, al ser consumida alguna de estas plantas.
- ❖ Las hemaglutininas o lectinas mostraron valores bajos en general.
- ❖ Los azúcares tanto reductores directos y totales se encuentran en una buena cantidad en el chicozapote y zapote como era de esperarse.
- ❖ La digestibilidad con líquido ruminal en las plantas analizadas es buena al ser comparadas con la alfalfa.
- ❖ Finalmente, las plantas silvestres estudiadas pueden ser utilizadas en alimentación animal. Así mismo los tres frutos de consumo humano: chicozapote, zapote y pepino que son de fácil descomposición, pueden ser también aprovechados como alimento animal en casos de que no se vendan o que su transportación sea cara; de esta manera ser aprovechadas.

9 Bibliografía

1. Martínez M. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Editor. Fondo de Cultura Económica, México, D.F., (1987).
2. García L. Ma. L. Selección de tipos criollos de chicozapote (*Achras sapota*). Tesis Licenciatura Iztacala, UNAM, México, D.F., (1981).
3. Bourges, H., Camacho, Ma. E., Morales de León, J., Escobedo, G., Composición de alimentos mexicanos. INCMNSZ. (1999).
4. Paredes, C. Ma. P. Evaluación de toxicidad aguda y subaguda de la fracción proteínica de la semilla de calabaza (*C. pepo*). Tesis Licenciatura Facultad de Química, UNAM, México, D.F., (2001).
5. Curtis, HW, SC Joseph and BW James. Antinutritional factors in cucurbita seed meals. J. Agric. Food Chem. 34, 434-436 (1986).
6. Fennema, O., Química de alimentos. 2ª edición. Acribia, pp. 65-71, 100-101, 140-150, 960-965, Zaragoza, España (1993).
7. Stryer, L., Bioquímica. 4a edición. Ediciones Reverté. pp. 263-478, Barcelona, España (1995).
8. Lehninger, A. L., Bioquímica las bases moleculares de la estructura y función celular. 2ª edición. Ediciones Omega, pp. 270-281, Barcelona, España (1994).

9. Darache, R. Toxicología y seguridad de los alimentos. Ediciones Omega, pp. 109-132, 233-247, Barcelona, España (1990).
10. Roder, J. D. Veterinary toxicology. Ed. Butterworth Heinemann, pp 138-143, 205-207, 221-223, 255-258, USA (2001).
11. Buck, W. B., Osweiller, G. D. Toxicología veterinaria clínica y diagnóstica. Ed. Acribia, pp. 127-141, Zaragoza, España (1981).
12. Lindner, E. Toxicología de los alimentos. 2a edición, Ed. Acribia, pp. 15-19, 82-95, Zaragoza, España (1962).
13. Valle, V. P. Toxicología de alimentos. 2ª edición, OPS-OMS, Edo. de Méx., pp.6, 17 (1991).
14. McDonald, P., Edwards, R., Greenhalgh, J.F.D. Nutrición animal. Ed. Acribia, pp. 26, 108-109, 163, 401, Zaragoza, España (1993).
15. Martínez, B. y Rincón, F. Inhibidores de tripsina II: Efectos del proceso y métodos de determinación. Alimentaría, 279 (Ene-Feb): 33-38 (1997).
16. Van Soest, P. J. Nutritional ecology of the ruminant. Cornell University Press, pp 82-84 120-122, 127-132, USA (1982).
17. Velásquez, P., Efecto del tratamiento térmico y paletizado sobre la composición química y digestibilidad de los residuos orgánicos utilizados en la alimentación de cerdos. Tesis Licenciatura, UNAM, México D.F. pp. 2-3, 36, 66. (1998).
18. Church, D. Basic animal nutrition and feeding. John Willey and Sons, Inc. Vo. 1, 2 th edition, pp. 15, 31-47, 279-294, Portland (1987).

19. López, V. G., Estudio de la composición y valor nutritivo de los residuos de uva (*Vitis vinifera*) y su posible uso en alimentación animal. Tesis Licenciatura UNAM, México D.F. pp. 28-170, (2003).
20. Gonzalez, C. J., Alimentación de bovinos, ovinos y caprinos. Mundi-prensa, pp. 29-42, Madrid, España (1990).
21. Church, D. and Pond, W. Basic animal nutrition and feeding. O & B Books, pp 14-26, 84-97, 346-355, Portland (1976).
22. Church, D. El rumiante (Fisiología digestiva y nutrición). Ed. Acribia, pp. 137, 321, 322, Zaragoza, España (1993).
23. Lewis, D. Fisiología digestiva y nutrición de los rumiantes. Ed. Acribia, pp. 25-27, Zaragoza, España (1962).
24. Church, D. C. Alimentos y alimentación del ganado. Mundi prensa, 1ª edic. pp. 704-724, Barcelona, España (1997).
25. Church, D. and Pond, W. Bases científicas para la nutrición y alimentación de los animales domésticos. Ed. Acribia, pp. 24-28, 57, Zaragoza, España (1977).
26. Hughes, M. D., Heath, M. E., Metcalfe, D., Forages, The science of grassland agriculture. The Iowa State University Press, 2ª ed. pp. 95-117, 152-177, Iowa, USA (1966).
27. Fraga, F., Fernández, C., Alegre, J. Alimentación de los animales monogástricos; cerdo, conejos y aves. Mundi-Prensa, pp. 24-28, 37-50, 67-84, 103-122, Madrid, España (1985).
28. Church, D. Digestive Physiology and Nutrition. Vol. 3, Practical nutrition., O & B Books, 2ª ed. pp. 35-39, 379-386, Portland O, (1974).

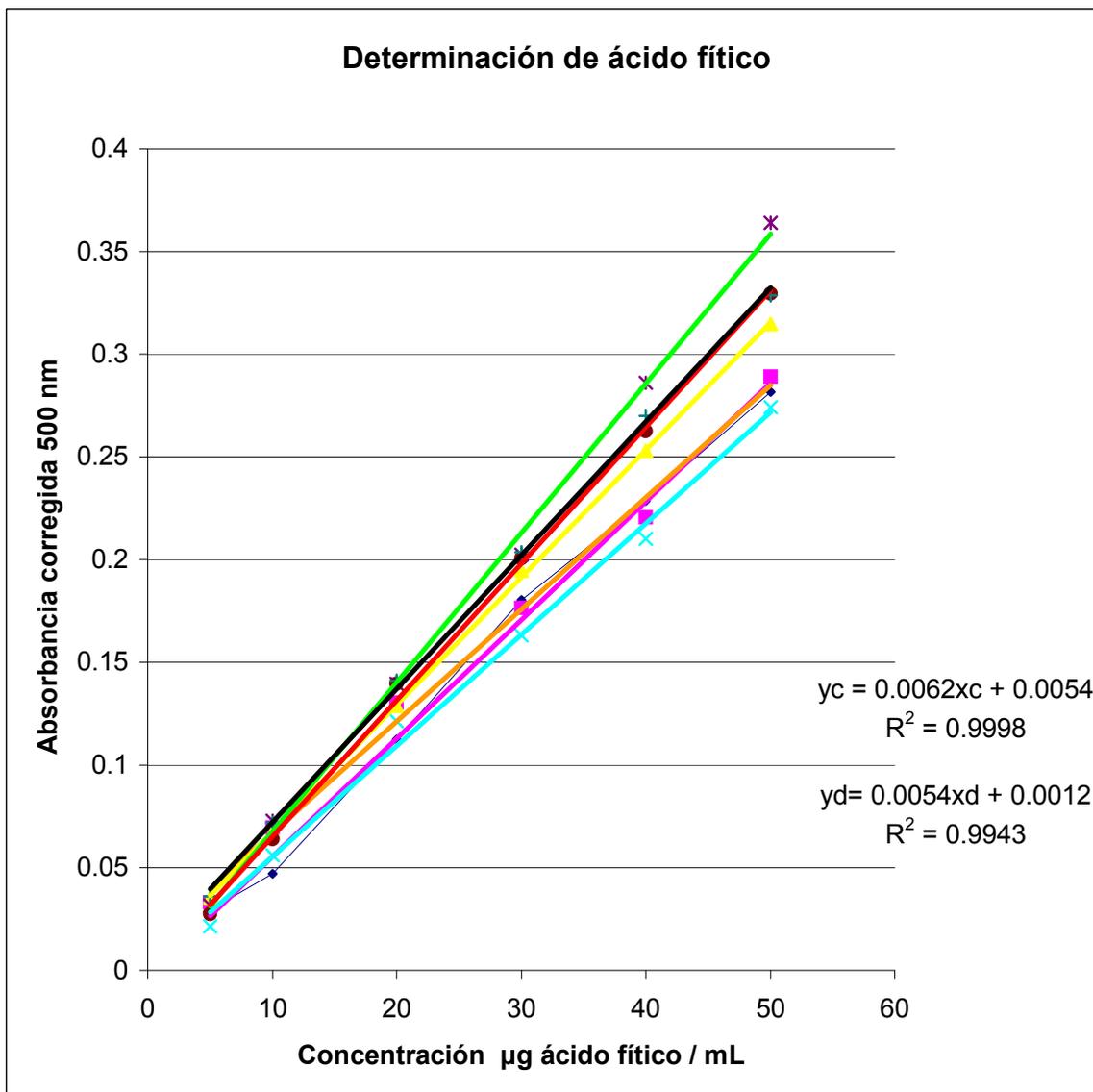
-
29. A.O.A.C. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistries, Herrichi K. 15 th, Vol. I and II, pp. 16, 60, 249, 1097, EU (1990).
 30. Abisch, E. and Reichstein, T. Alkaloid screening (micromethod). *Helvetica Chemica Acta*, 43, 1861-1884, (1960).
 31. Lucas, B., Sotelo, A. A simplified test for the quantification of cyanogenic glucosides in wild and cultivated sedes. *Nutr. Rep. Int.* 29: 711-719, (1984).
 32. Jaffe, W.G., Levy, A., Gonzalez, D.I. Isolation and partial characterization of bean phytohemagglutinins. *Phytochem.* 13: 2685-2693, 1974.
 33. Frühbeck, G., Alonso, R., Marzo, F., Santillan, S. A modified method for the indirect quantitative analysis of phytate in foodstuffs. *Anal Biochem.* 225:206-211, (1995).
 34. Mendoza, J. B., Validación de una metodología para la determinación de ácido fítico en alimentos. Tesis Licenciatura UNAM. México D.F., pp. 50-52,82-85, (2001).
 35. Kakadé M. Rackis J. McGhee J. And Puski G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products a colaborative analysis of a improved procedure. *Cereal Chem* 51:376-382, (1974).
 36. ISO 9648:1988 Determination of tannin content in sorghum. International Organization for Standardization. International Standard. pp 12-15.
 37. Serrano C. S. E. Evaluación bromatológica de la vaina de cacahuanano (*Gliricidia sepium*) y su uso potencial en alimentación animal. Tesis Licenciatura Facultad de Química, UNAM, México, D.F. (2004).

38. Aguilar, R. M. Evaluación química y biológica de nuevas fuentes de alimentos para rumiantes. Tesis Licenciatura Facultad de Química, UNAM, México, D.F. (1978).
39. Weimer, P. J., Mackney, J. M., Jachim G. J., Hatfield R. D., Fermentations of a bacterial cellulose/xylan composite by mixed ruminal microflora: implications for the role of polysaccharide matrix interactions in plant cell wall biodegradability, J. Agric. Food Chem. 48:1727-1733, (2000).
40. Fourzali M. R. Anteproyecto para la industrialización de *Achras sapota* (chicozapote) en el estado de Chiapas. Tesis Licenciatura Facultad de Química, UNAM, México, D.F., (1975).

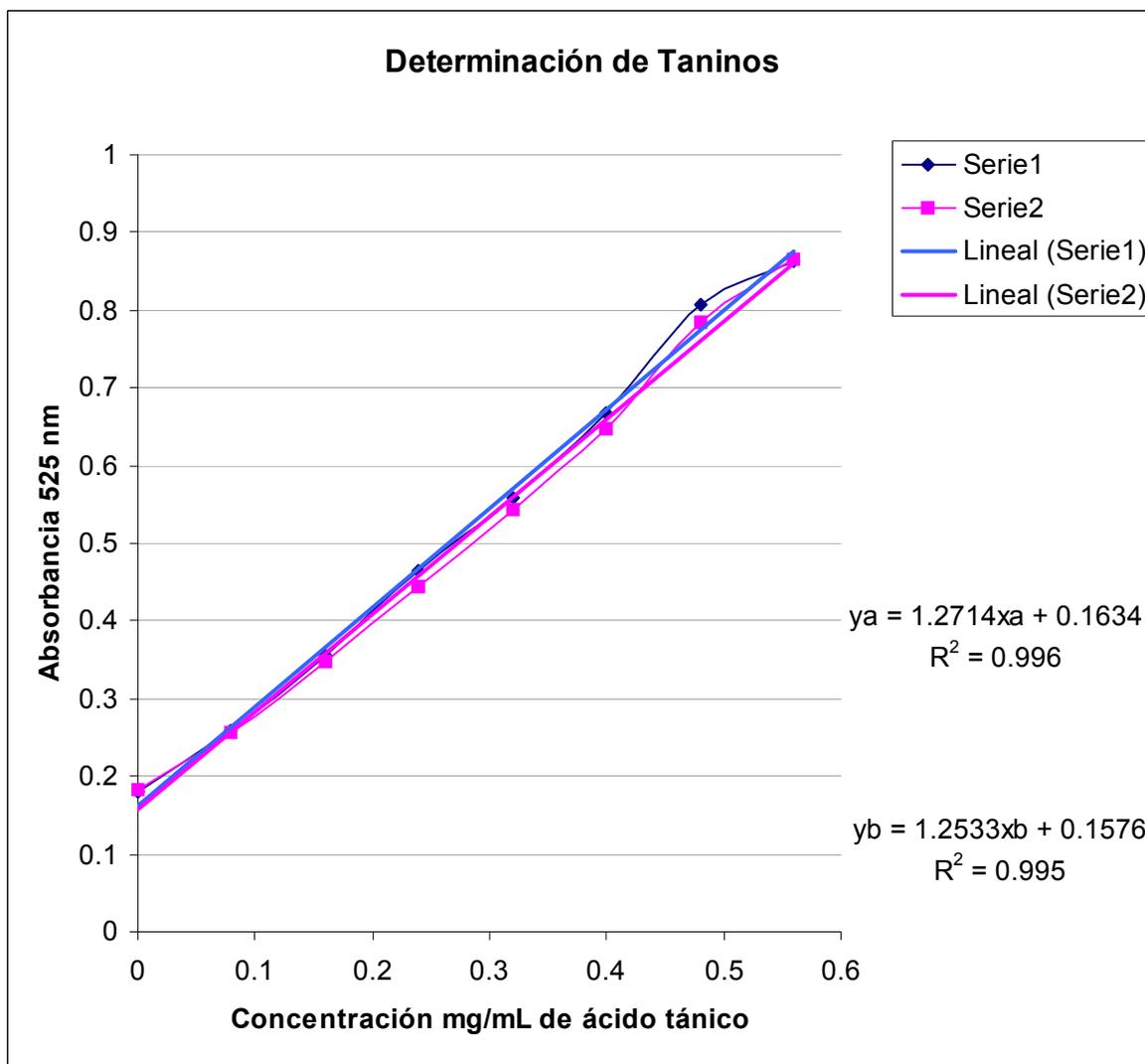
9 Anexos

Curvas estándar

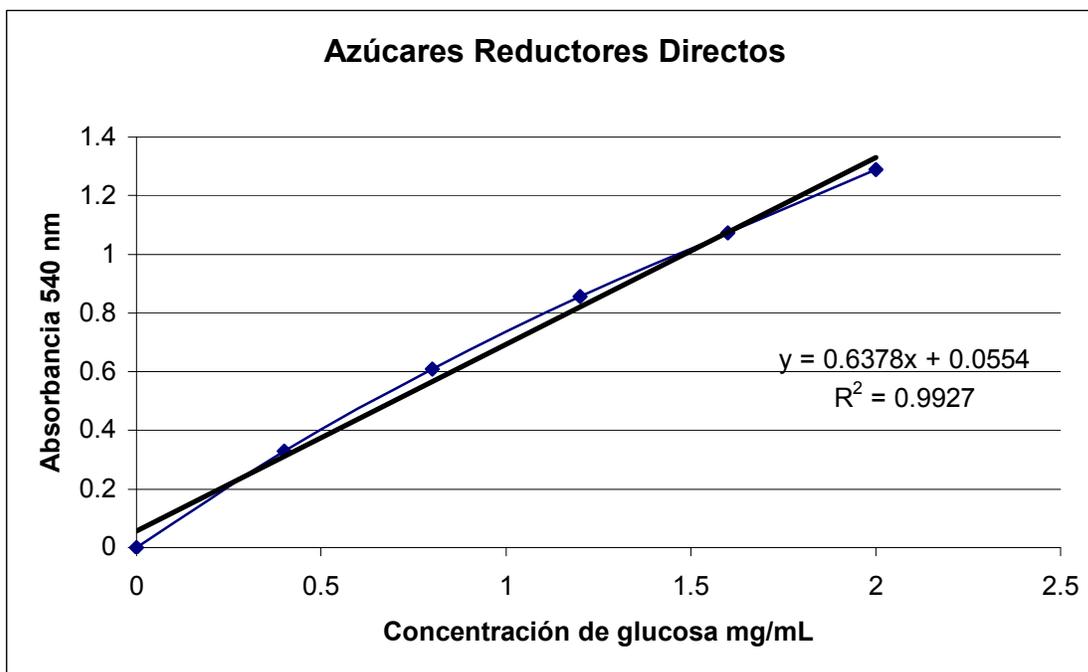
9.1 ANEXO I



9.2 ANEXO II



9.3 ANEXO III



9.4 ANEXO IV

