



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE  
INULINA, COMPOSICIÓN PROXIMAL Y  
CONTENIDO DE FIBRA DIETÉTICA EN  
MUESTRAS DE ORIGEN VEGETAL.**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**P R E S E N T A N:**

**IVONNE LIZBETH VELA CANALES**

**TANIA PAULINA VILLAFUERTE PALACIOS**



**MÉXICO, D.F.**

**2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado

Presidente	M. en C. Bernardo Lucas Florentino
Vocal	Francisca Aida Iturbe Chiñas
Secretario	Lucia Cornejo Barrera
1er Suplente	Hilda Elizabeth Calderón Villagomez
2do Suplente	Leticia Gil Vieyra

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio 111, Departamento de Farmacia.

Conjunto E. Facultad de Química, UNAM.

Asesor: M. en C. Bernardo Lucas Florentino. \_\_\_\_\_

M. en C. Ángela Sotelo López†.

Supervisor Técnico Q.A Argelia Sánchez Chinchillas. \_\_\_\_\_

Sustentantes: Ivonne Lizbeth Vela Canales. \_\_\_\_\_

Tania Paulina Villafuerte Palacios. \_\_\_\_\_

Esta tesis forma parte del proyecto PAPIIT IN203008 “Influencia de la inulina en el tiempo de recuperación y desaparición de los cambios bioquímicos y estructurales producidos en ratas jóvenes desnutridas”.

### ***Agradecimientos.***

*Antes que nada quiero agradecerle a Dios por haberme permitido llegar hasta aquí y poder cumplir este objetivo, a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por haberme arropado durante todo este tiempo, por haberme dejado corear orgullosamente un "Goya" y por haber convertido mi sangre azul y mi piel dorada para siempre.*

*Gracias a todos mis profesores por compartirme sus conocimientos y por todo su apoyo, ya que ellos también son parte de este gran logro.*

*Gracias a la profesora Angela Sotelo† por haber despertado en mí la inquietud y el interés por este proyecto. Al profesor Bernardo Lucas por haber adoptado a dos alumnas más y por haberse involucrado tanto en este proyecto.*

*Gracias Arge por todo tu apoyo y tus conocimientos aportados a este proyecto, profesora Rosita y doña Vicky muchas gracias por sus porras y por su compañía.*

*Gracias a mis compañeras del Lab. 111, Yes, Gretel y Anelí, por haber compartido tantas risas, sin ustedes mi estancia en el laboratorio no hubiera sido la misma.*

*A mis amigos del Lab. 115 Félix, Ernesto, Erick, Víctor y profesora Bety muchas gracias por el apoyo incondicional, por las miles de risas y aventuras, en ustedes he encontrado verdaderos amigos. Mil gracias por estar siempre ahí apoyándome.*

*Al original SADAPI 10. Lulú, Juliana, Gira, Marisol y César gracias por su amistad y por todas esas alegrías que jamás voy a olvidar.*

*Ivonne (mi equipo favorito) ha sido un placer conocerte y convivir contigo todo este tiempo, gracias por todo tu apoyo, tus consejos, las desveladas, las aventuras y las risas.*

*Gracias por haber compartido conmigo este proyecto y por ser testigo de este logro tan importante.*

### ***Dedicatoria.***

*Dedico este logro a mi motor de vida a MI FAMILIA pues es el reflejo de todo nuestro esfuerzo, sin ustedes nada de esto hubiera sido posible. Gracias má, gracias pá por ser las estrellas que siempre me han guiado en esta vida, por sus consejos tan valiosos, por haber vivido nuevamente esta etapa, pues estudiaron conmigo, se desvelaron conmigo, fueron mi equipo incondicional y siempre han estado al pie del cañón, de verdad agradezco todo su apoyo y todo su amor.*

*A mis dos mejores amigos, mis hermanos Sandy y Paco a quienes amo y respeto mucho, gracias por la alegría que le dan a mi vida, por todos esos momentos tan divertidos que nunca deben terminar.*

*Gracias por confiar en mí, por estar ahí siempre. Este es nuestro logro y vendrán más. Los amo.*

*Ha sido un placer coincidir en esta vida.*

**TANIA PAULINA.**

## ***Agradecimientos***

*Empezare escribiendo dos palabras, que si tal vez pueden sonar simples y sin ningún sentido, para mi tienen un gran significado "uff...por fin". Estas palabras reflejan la tranquilidad de haber concluido la universidad, de que a pesar de que el camino fue sinuoso aprendí en el transcurso gran cantidad de conocimientos científicos y humanos, pero antes de seguir quiero hacer hincapié en que esto fue logrado al solido pilar que me sostiene y este, son mis padres **Roberto Vela y Estela Canales** a los cuales les agradezco todo lo que me dieron y que a pesar de los tropiezos y aciertos en mi educación, fueron los apropiados.*

*Les agradezco aquellos consejos que me dieron, el apoyo incondicional tanto en mis metas como en mis fracasos, por preocuparse de mí en esas noches de desvelo o aquellas veces que mataba mis horas de comida. Gracias por todos los consejos recibidos, la educación que me han dado y sobre todo por creer en mi, todo esto me han hecho ser la persona que soy. Y también le agradezco a Dios por estar siempre a mi lado y nunca dejarme caminar sola.*

*Agradezco a todos aquellos profesores que fueron formadores de mi conocimiento científico y por que no? Desarrollaron mi perspectiva de ver al mundo, compartiéndome enseñanzas de vida. Gracias a la profesora Ángela Sotelo que nos dio la oportunidad y por supuesto el reto para el desarrollo de este trabajo, que aunque no está ya físicamente presente, siempre nos guio.*

*Al profesor Bernardo Lucas por adoptarnos y el apoyo que nos brindo para lograr concluir la tesis. A Argelia por asesorarnos en el desarrollo del proyecto. A la profesora Rosita y a todos los amigos que conocí en el Lab. III, con los cuales compartí gran parte del día. Y también agradezco a la Sra. Vicky que siempre tenía una palabra de aliento para los momentos de frustración, cuando no le encontrábamos fin a este proyecto.*

*En el transcurso de la vida conocí a personas s que jamás me abandonaron y siempre me ofrecieron su apoyo incondicional, ellas son mis mejores amigas Julieta Sandoval y Fabiola Pantoja, a las cuales agradezco todos sus consejos a los amigos que conocí en el SADAPI IO: Juliána, Lulú, Gira Juan, en fin tengo que agradecer a todas a aquellas personas a las que conocí en el transcurso de mi vida y por lo mucho o poco que aprendí de ellas.*

*Y por último pero no menos importante agradezco a mi compañera de toda la carrera Paulina Villafuerte, a la que conozco desde el primer semestre y de la cual he recibido apoyo y palabras de aliento con quien compartí todas o la mayoría de las clases, comidas, momentos de ocio, pláticas, estrés, risas, etc. Y por que no? la elaboración de la tesis.*

*Solo me resta decir que mi estancia en la facultad fueron los mejores años, fue mi segunda casa, donde forme lazos de amistad, muchas experiencias inolvidables y conocimientos que me servirán en mi vida profesional. Gracias!!!*

*"Vivir no es sólo existir, sino existir y crear,  
saber gozar y sufrir y no dormir sin soñar.  
Descansar, es empezar a morir."*

***IVONNE LIZBETH***



# ÍNDICE

Resumen

	Página
1. Introducción	1
2. Objetivos	4
2.1 Objetivo general	4
2.2 Objetivos específicos	4
3. Antecedentes	5
3.1 Origen e historia de la inulina	6
3.2 Estructura química de la inulina y FOS	7
3.3 Fuentes e identificación de inulina y FOS	10
3.4 Inulina como prebiótico	11
3.5 Microbiota intestinal	12
3.6 Propiedades promotoras de la salud de un agente prebiótico (inulina y FOS)	14
3.6.1 Absorción de minerales y síntesis de vitaminas	14
3.6.2 Protección contra infecciones intestinales	15
3.6.3 Otros beneficios	15
3.7 Tecnología de producción	16
3.8 Usos alimentarios de la inulina	18



---

3.9 Método alternativo para la extracción y cuantificación de inulina y FOS	21
3.10 Particularidades de la metodología propuesta y de las especies vegetales	21
3.10.1 Especies vegetales	21
3.10.1.1 Aspectos generales de los bulbos	21
3.10.1.2 Clasificación de los bulbos	23
3.10.1.3 Características particulares de cebolla y cebollina blanca	23
3.10.1.4 Características particulares de la jícama	24
3.10.1.5 Agaves	25
3.10.1.6 Clasificación y características de los agaves	26
3.10.2 Enzimas	43
3.10.2.1 $\alpha$ - amilasa	43
3.10.2.2 Proteasa	44
3.10.2.3 Amiloglucosidasa	45
3.10.3 Equipo	46
3.10.3.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	46
3.10.3.2 Cromatografía de exclusión molecular	47
3.10.3.3 Cromatografía de intercambio iónico	47



---

---

3.10.3.4 Detector de índice de refracción	48
3.10.4 Definición de validación	48
4 Metodología	50
4.1 Diagrama general	50
4.2 Diagrama de extracción y cuantificación de inulina y FOS	51
4.3 Material biológico empleado	52
4.4 Acondicionamiento de las muestras	53
4.5 Análisis químico proximal	53
4.6 Metodología establecida para la extracción y cuantificación de inulina y FOS	54
4.6.1 Extracción de inulina y FOS	54
4.6.1.1 Material y reactivos	54
4.6.1.2 Procedimiento	55
4.6.2 Cuantificación de inulina y FOS	55
4.6.2.1 Material y reactivos	56
4.6.2.2 Condiciones de trabajo	56



---

4.6.2.3 Procedimiento	57
4.7 Cálculos	59
5. Resultados y discusión	61
5.1 Composición proximal	61
5.2 Parámetros de validación de la metodología propuesta	64
5.3 Composición de FDT	65
5.4 Contenido cuantitativo de inulina y FOS	68
5.4.1 Curva patrón	69
5.4.2 Análisis cuantitativo de inulina y FOS en las muestras	70
6. Conclusiones	72
7. Recomendaciones	74
Bibliografía	75
Anexo A (cromatogramas)	80
Anexo B	
Sección 1	86
Sección 2	87
Sección 3	96



## RESUMEN

La presente investigación surgió por la necesidad de conocer los beneficios que son producidos por la inulina, así como el contenido presente en diferentes muestras. El interés por la inulina y los fructooligosacáridos (FOS) surgió por la relación entre la salud y la microflora intestinal, por otra parte se conoce que la inulina y los FOS no son degradados por las enzimas humanas por lo que no son absorbidos por el intestino delgado y se han utilizado como sustitutos en alimentos para diabéticos ya que no tienen influencia como lo hace la glucosa, no estimulan la secreción de insulina ni la secreción de glucagón.

Se planteó conocer el contenido de inulina y FOS en alimentos y subproductos de origen vegetal con la finalidad de aprovechar aquellos cuya composición fuera adecuada. Dentro de las muestras estudiadas se encuentran plantas bulbosas como: Cebolla blanca (*Allium cepa*), Cebollina blanca (*Allium scaposum*), Jícama (*Pachyrhizus erosus*) y pencas de 10 diferentes especies de agave: *Agave angustifolia*, *A. celsii*, *A. convallis*, *A. cupreata*, *A. filifera*, *A. lechuguilla*, Maguey de mezcal (*A. potatorum*), Maguey pulquero (*A. salmiana*), *A. tequilana*, *A. victoriae-reginae*.

Se incluyeron pencas de diferentes especies de agave, las cuales son desechadas en gran cantidad por la industria tequilera y en la extracción de fibra; la cebolla y jícama se emplearon debido a su alto consumo por la población mexicana. El proyecto pretende utilizar estos dos factores (desecho y consumo abundante) para obtener el mayor aprovechamiento de éstos, debido a que en la literatura se reportan como vegetales con un alto contenido de inulina y FOS.

Se realizó el análisis químico proximal y de fibra dietética total (FDT) de acuerdo a las técnicas oficiales del AOAC a las trece muestras de origen vegetal. Posteriormente se desarrolló una metodología para la extracción de inulina y FOS basada en el análisis de FDT descrita en el AOAC, método 962.09. y un método de cuantificación de los mismos por el método de HPLC, empleando una columna de exclusión molecular y un detector de índice de refracción. Una vez realizada una validación parcial del método se cuantificó el contenido de FOS en las trece especies estudiadas. Los resultados del proyecto indicaron que nueve de ellas contienen inulina y FOS, siendo *Allium cepa* la especie con una mayor concentración (31.14%).

La metodología desarrollada fue aceptable ya que además de cumplir con los parámetros establecidos de la validación, es adecuada para la extracción y cuantificación de muestras con diferente composición.



## Capítulo 1

### INTRODUCCIÓN

Hoy en día uno de los grandes problemas de salud pública que afecta a México son las enfermedades gastrointestinales debido a un manejo inadecuado de los alimentos, así como por algunos trastornos en la alimentación.

En años recientes se ha incrementado el interés por la relación entre la microflora intestinal y sus beneficios a la salud. Este interés se ha desarrollado a partir del conocimiento de los microorganismos en el colon donde predomina la flora benéfica, no patógena y saludable, la cual protege al cuerpo de manera natural desarrollando resistencia contra las bacterias patógenas.

La inulina posee un impacto positivo en la resistencia natural de nuestro cuerpo, ya que contribuye a tener un tránsito intestinal regular y suave, mejora la absorción en el cuerpo de importantes nutrimentos como calcio e incluso podría reducir el riesgo de cáncer intestinal y mantiene un sistema digestivo saludable.

La inulina y los FOS son hidratos de carbono que al ser hidrolizados por la inulinasa (enzimas presentes en algunas bacterias) liberan además de fructosa, glucosa en un 5 a 6%. Este monosacárido se encuentra en los extremos de la cadena, estos FOS son producidos por una gran variedad de especies de origen vegetal. Se concentran o almacenan en el tejido fino de plantas, generalmente en raíces y rizomas en donde se encuentran mayores concentraciones.



En el organismo humano, la inulina y los FOS no son degradados por las enzimas habituales del tracto digestivo, y por consecuencia no hay absorción en el intestino delgado lo que genera una estimulación selectiva en la flora intestinal benéfica, produciendo un efecto prebiótico, un ejemplo de ello son las bifidobacterias. Un efecto prebiótico significa que se alimenta y estimula selectivamente el crecimiento de la propia flora intestinal “buena”, mediante la ingesta de inulina en la dieta.

Además de los beneficios a la salud aportan beneficios tecnológicos, nutricionales y fácilmente pueden ser incorporados a una gran gama de productos alimenticios.

La inulina y los FOS son obtenidos generalmente de la raíz de achicoria y también se encuentran presentes en alimentos de origen vegetal como: ajo, cebolla, trigo e incluso plátano.

Investigaciones recientes han demostrado la presencia de inulina y FOS en diferentes géneros de agave debido a sus adaptaciones morfológicas y fisiológicas para sobrevivir, así mismo en plantas bulbosas donde son utilizados como fuente de reserva energética.

Una de las necesidades actuales es ampliar el conocimiento acerca de la utilización de especies vegetales alimenticias producidas en el país, esto traería como consecuencia un incremento en la demanda de cultivos mexicanos y a su vez mejoraría el mercado y generaría mayores inquietudes para el aprovechamiento de los recursos vegetales y sus subproductos, con el fin de



ser utilizados en la industria como aditivos o bien, para disminuir las enfermedades gastrointestinales proporcionando una mejor calidad de vida al ser humano.

Las plantas bulbosas poseen un gran impacto en la dieta mexicana, debido a: su alto consumo, fácil adquisición y su gran aceptabilidad sensorial. Por otro lado el agave ha sido utilizado por la industria tequilera generando gran cantidad de desecho (pencas de agave). Es por ello que otras industrias se han alentado a encontrar usos alternativos.

Por esta razón se propone una metodología para la extracción y cuantificación de inulina y FOS en este tipo de vegetales, basada en la metodología de fibra dietética total y cromatografía líquida de alta resolución.



## Capítulo 2

### OBJETIVOS

#### 2.1 Objetivo general

- Determinar la composición proximal y el contenido de inulina y fructooligosacáridos de 13 especies vegetales para su posible aprovechamiento en la industria alimentaria.

#### 2.2 Objetivos específicos

- Conocer la composición proximal de las trece especies de origen vegetal de acuerdo a la metodología establecida por el AOAC.
- Seleccionar una metodología para la extracción de inulina y FOS en diferentes especies de origen vegetal.
- Establecer y validar las condiciones cromatográficas para la cuantificación de inulina y FOS, empleando una columna de exclusión molecular y un detector de Índice de refracción.
- Aplicar tanto el método de extracción como el método cromatográfico para la cuantificación de inulina y FOS en las muestras en estudio.



## Capítulo 3

### ANTECEDENTES

En la actualidad el uso de alimentos que promueven beneficios a la salud y reducción de riesgos de enfermedades se han vuelto muy populares en la población, incluso aquellos con alto contenido de inulina y fructooligosacáridos (FOS), ya que poseen propiedades anticancerígenas, un bajo valor calórico y la estimulación del crecimiento de la flora benéfica en el colon.<sup>1, 2</sup>

Los estudios enfocados en nutrición y salud humana han estudiado los beneficios de la inulina y FOS en personas con trastornos alimentarios con el fin de reducir los riesgos de cáncer; aumento de la absorción de diferentes minerales; disminución de colesterol, triglicéridos, y fosfolípidos en sangre; reducción de riesgos de diabetes y obesidad e inhibición de diarrea provocada por bacterias patógenas, debido que al ser fermentados por la flora intestinal disminuyen el pH provocando la reducción del crecimiento de la flora patógena aunado al incremento de la flora benéfica.<sup>3,4</sup>

Se ha reportado que para tener un efecto significativo se debe consumir al menos 8 g/día de FOS totales <sup>5</sup>, sin embargo, un consumo mayor a 40 g/día FOS totales provoca diarrea. <sup>6</sup>



### 3.1 Origen e historia de la inulina

La inulina fue descubierta por el científico alemán Rose en 1804, en un extracto de agua después de hervir las raíces de *Inula helenium*. En 1818, Thomson, un científico británico, le confirió el nombre actual.<sup>7</sup>

La inulina pertenece a los hidratos de carbono de origen natural conocidos como oligosacáridos no digeribles (NDO, por sus siglas en inglés) y se sintetiza naturalmente en las plantas. Después de la celulosa y el almidón, estos son los hidratos de carbono más abundantes encontrados en la naturaleza.<sup>8</sup> Se ha estimado que un tercio de la vegetación total en la tierra contiene fructanos. La inulina ha sido consumida por los humanos desde tiempos remotos, en diversas plantas comestibles y frutas.

La inulina se encuentra soluble en agua y se almacena en las raíces o en los rizomas de las plantas que lo contienen y, en el caso particular del agave, en el tallo, actúa como osmoregulador. Al cambiarse el grado de polimerización (DP) de la molécula en la vacuola, la planta puede modificar fácilmente el potencial osmótico de sus células sin afectar la cantidad total de moléculas de hidratos de carbono. La hidrólisis interna de la inulina ( $GF_n$ ) por endoinulinasas, baja el DP de las moléculas permitiendo a las plantas su osmoregulación, para su sobrevivencia en periodos de invierno en regiones moderadamente frías y con sequía.<sup>9</sup>



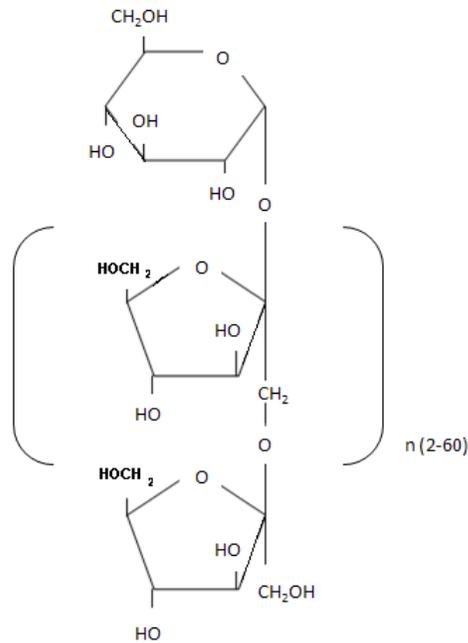
Históricamente varios alimentos que contienen inulina, especialmente la achicoria (*Cichorium intybus*), la dalia (*Dahlia pinnata Cav*), la alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus*) y el yacón (*Smallanthus sonchifolius*), han sido usados como alimento principal o como cosechas de sustento.<sup>10,11</sup> Por ejemplo la raíz de achicoria en Europa Occidental ha sido cultivada en gran escala desde el Siglo XVI, utilizándose inmadura, e incluso con raíz para el consumo humano. Después de la segunda guerra mundial, poblaciones de Inglaterra y Alemania asaron la raíz de achicoria para utilizarla como complemento o sustituto de granos de café y desde entonces las variedades de achicoria han sido usadas en Europa y Norteamérica para impartir el color adicional, el cuerpo y la acción sedativa del café o como sustituto del mismo.<sup>12</sup> Aproximadamente una taza de café de achicoria puede contener 3 g de inulina.<sup>13</sup>

### **3.2 Estructura química de la inulina y FOS.**

La inulina es un polímero lineal de D-fructosa unidas por enlaces glucosídicos  $\beta(2\rightarrow1)$  y una D-glucosa terminal unida al polímero por un enlace  $\alpha(1\rightarrow2)$ .<sup>14</sup> Debido a estos enlaces glucosídicos la inulina y sus subgrupos no son digeridos por las enzimas humanas.<sup>15</sup>



En la Figura 1 se muestra la estructura química general de la inulina, FOS y oligofruktanos.



**Figura 1. Estructura química general de la inulina, FOS y oligofruktanos <sup>16</sup>.**

Por sus propiedades químicas son considerados como fibra dietética porque se encuentran dentro de la definición empleada por la AOAC la cual la define como: “remanentes de células de las plantas resistentes a la hidrólisis por las enzimas que actúan en la alimentación humana”. <sup>17, 18</sup>

Los FOS y los oligofruktanos son subgrupos de la inulina que poseen un grado de polimerización diferente. El grado de polimerización (GP) depende del número de unidades de fructosa presentes en la cadena.



En la Tabla 1 se muestran los diferentes grados de polimerización de los diversos fructooligosacáridos.

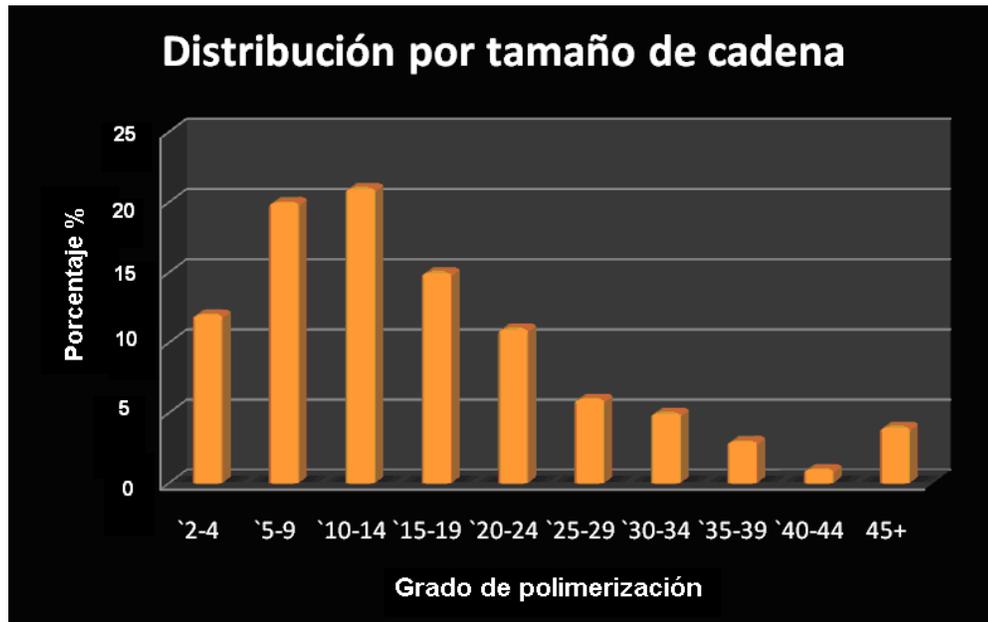
**Tabla 1** <sup>16</sup> *Comparación entre los diversos fructooligosacáridos*

Origen	Inulina Extracción a partir de vegetal (achicoria)	Oligofruktosa hidrólisis enzimática de la Inulina	FOS transfructosilación de la sacarosa
Rango GP	2-60	2-9	2-4
Gp prom	10-12 <sup>(23)</sup>	4-5	3-7
Estructura química	Lineal (1-2 % ramificación) <sup>(7)</sup>	Lineal	Lineal

La linealidad o ramificación de los fructanos depende en gran medida de su origen vegetal o microbiano y suelen definirse en términos de grado de polimerización promedio ( $GP_{prom}$ ), siendo la inulina el compuesto con el mayor rango y promedio. Los FOS y los oligofruktanos son muy similares, pero con diferencias estructurales asociadas a sus formas de obtención (hidrólisis enzimática de inulina para los oligofruktanos y transfructosilación de sacarosa para los FOS). Las diferencias estructurales entre ellos condicionan sus características físicas y químicas, y las propiedades que determinan su uso como aditivo. <sup>16,19</sup>



En la Gráfica 1 se muestra la distribución porcentual de los FOS presentes en la naturaleza de acuerdo a su grado de polimerización.



*Gráfica 1. Distribución porcentual de FOS de acuerdo al grado de polimerización.<sup>20</sup>*

### 3.3 Fuentes e identificación de la inulina y FOS

La inulina y los fructooligosacáridos (FOS) son hidratos de carbono de almacenamiento que están presentes en más de 36 000 plantas en diferentes concentraciones.

La fuente industrial más común es la achicoria, que posee aproximadamente 15 a 20 % de inulina y 5 a 10 % de FOS y cuando se reduce la humedad puede llegar hasta un 80 %.



En la Tabla 2 se muestra el contenido porcentual de inulina en algunas especies de origen vegetal, en base seca.

**Tabla 2. Contenido aproximado de inulina en plantas comestibles <sup>16</sup>**

Especie vegetal	Inulina (g/100g base seca)
Pataca ( <i>Helianthus tuberosus</i> )	89
Achicoria ( <i>Cichorium intybus</i> )	79
Raíz de dalia ( <i>Dahlia spp.</i> )	59
Cebolla ( <i>Allium cepa L.</i> )	48
Ajoporro ( <i>Allium porrum L.</i> )	37
Ajo ( <i>Allium sativum</i> )	29
Yacón ( <i>Smallanthus sonchifolius</i> )	27
Agave ( <i>Agavaceae</i> )	25
Espárrago ( <i>Asparragus officinalis L.</i> )	4
Cambur ( <i>Musa cavendishii</i> )	2
Centeno ( <i>Secale cereale</i> )	1

### 3.4 Inulina como prebiótico

Los prebióticos son ingredientes alimentarios que no son digeridos ni en el estómago ni en el intestino delgado debido a que la hidrólisis ácida es limitada y no hay hidrólisis enzimática, por ende no son absorbidos y llegan intactos al colon donde estimulan selectivamente el crecimiento de bacterias benéficas para la salud, como se muestra en la Figura 2. La inulina y los FOS son prebióticos utilizados actualmente como ingredientes en la alimentación. Los productos originados durante su metabolismo aumentan la presión osmótica del contenido intestinal lo que da lugar a una mayor motilidad aumentando la frecuencia de las deposiciones. <sup>21</sup>

Las propiedades fisicoquímicas y biológicas de la inulina y los FOS son similares a los de la fibra dietética y son de suma importancia en la salud humana. El aumento de las defensas se debe a las capacidades



inmunomoduladoras de las bacterias lácticas que crecen a expensas de los fructanos, es decir está implícito en la acción simbiótica. Debido a su proceso fermentativo, ellos pueden afectar el epitelio intestinal favoreciendo el desarrollo de la mucosa y aumentando la resistencia a las enfermedades intestinales por un mecanismo de barrera, donde los FOS y las bifidobacterias inhiben el crecimiento de bacterias dañinas, estimula los componentes del sistema inmune, ayuda a la absorción de ciertos iones y a la síntesis de la vitamina B.

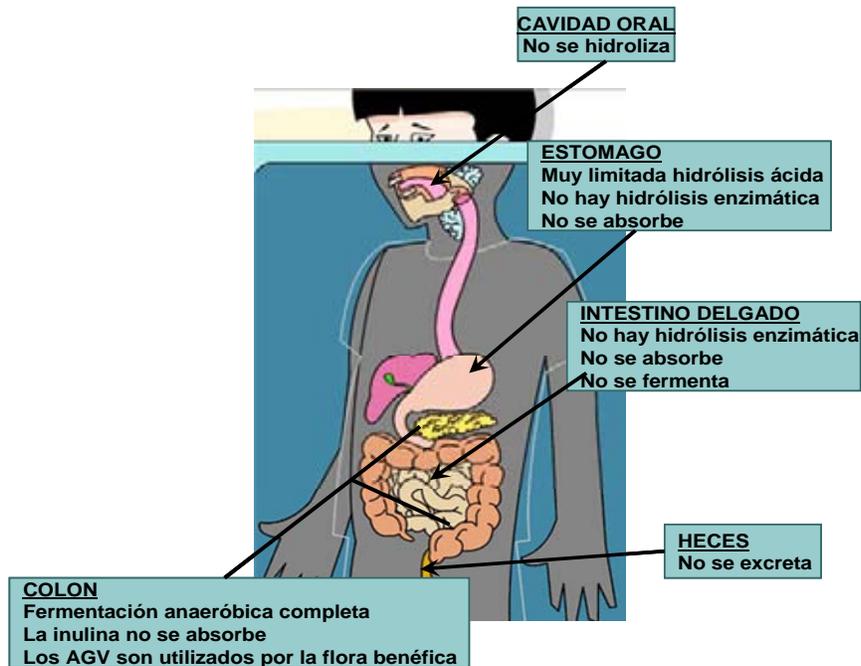


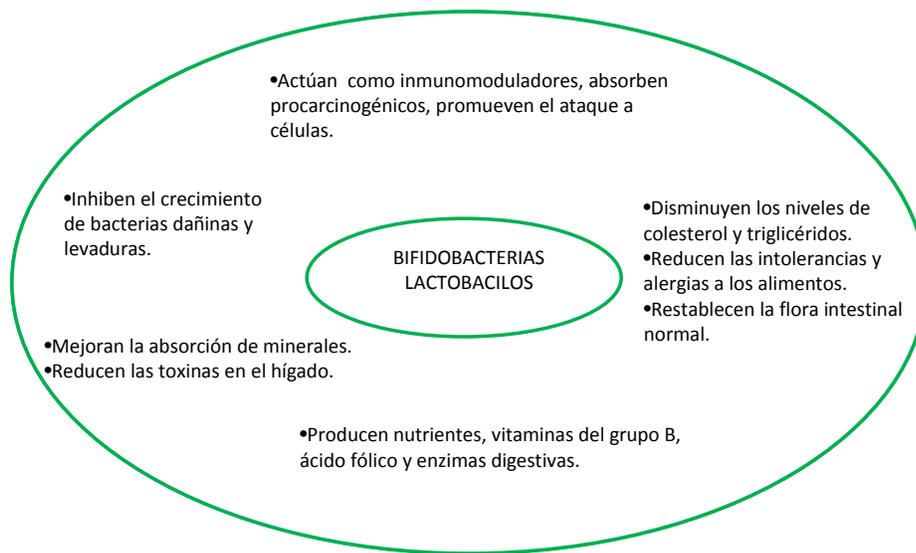
Figura 2. Metabolismo de la inulina a través del tracto digestivo<sup>22</sup>.



### 3.5 Microbiota Intestinal.

La población microbiana del tracto gastrointestinal del ser humano constituye un ecosistema altamente complejo que incluye numerosos tipos de microorganismos. La microbiota de un individuo cualquiera está formada por más de 400 especies diferentes de bacterias. Algunas poseen efectos patógenos y por consecuencia la producción de toxinas y carcinogénicos, mientras que otras son consideradas promotoras de la salud entre éstas se encuentran los *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

En la Figura 3 se muestran los beneficios de los lactobacilos y bifidobacterias.



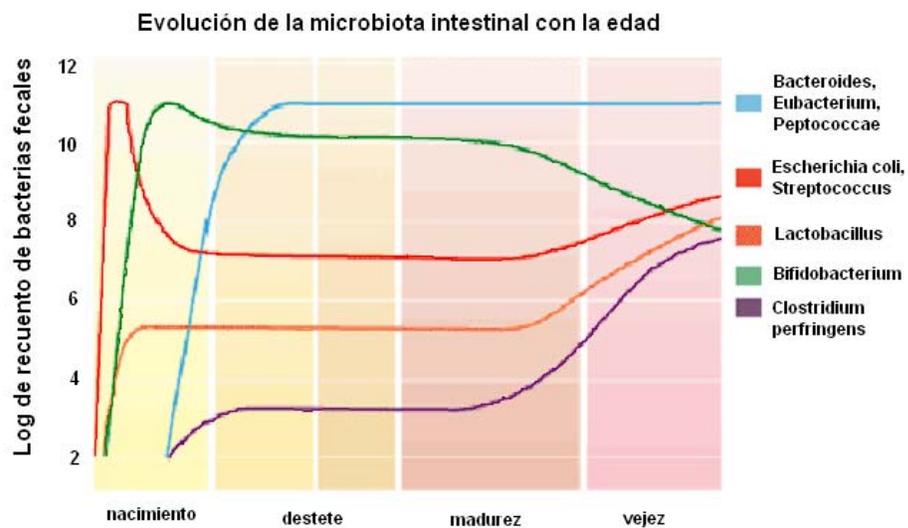
**Figura 3. Beneficios de lactobacilos y bifidobacterias<sup>22</sup>**

Normalmente ambos tipos se encuentran en equilibrio e intervienen directamente en la digestión de alimentos y por lo tanto, en la obtención de energía.



En los individuos sanos este ecosistema es relativamente estable. Sin embargo, está relacionado en forma estrecha con el medio ambiente y puede variar a lo largo del tiempo. Esta situación es influida por varios factores que incluyen la edad, el tipo de alimentación, el uso de medicamentos (especialmente los antibióticos), y el estado de salud, así como el estrés.<sup>7</sup>

La Figura 4 muestra la evolución de la microbiota intestinal con la edad del ser humano desde el nacimiento hasta la vejez.



**Figura.4 Evolución de la microflora intestinal con le edad<sup>21</sup>.**



### **3.6 Propiedades promotoras de la salud de un agente prebiótico (inulina y FOS)**

#### **3.6.1 Absorción de minerales y síntesis de vitaminas**

Los beneficios a la salud son atribuidos a la flora intestinal benéfica que inhibe el crecimiento de bacterias dañinas, estimula los componentes del sistema inmune y ayuda a la absorción de ciertos iones como calcio y magnesio y a la síntesis de las vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub>, ácido nicotínico y ácido fólico. <sup>14</sup>

#### **3.6.2 Protección contra infecciones intestinales**

Algunos estudios relacionados con nutrición y salud humana indican que tanto la inulina como los FOS al ser ingeridos se fermentan en su totalidad por la microflora habitual del colon aumentando la población y la producción de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>. La energía se deriva en gran parte al resultado de la producción de lactato y ácidos grasos de cadena corta (SCFA's, por sus siglas en inglés) como: ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico. Debido a la fermentación la microflora disminuye el pH intestinal afectando el epitelio, favoreciendo el desarrollo de la mucosa y aumentando la resistencia a las enfermedades intestinales por un mecanismo de barrera.

#### **3.6.3 Otros beneficios**

Recientemente se ha mostrado el papel de los SCFA's generados durante la fermentación de inulina y FOS en la reducción de los niveles de colesterol. La proporción de acetato/propionato es de vital importancia ya que el acetato se



conoce como un precursor del colesterol, donde se ha encontrado que los propionatos son inhibidores de la síntesis del colesterol hepático. La proporción de acetato/propionato resulta de la fermentación de inulina y favorece la disminución del colesterol.<sup>23</sup>

### **3.7 Tecnología de producción.**

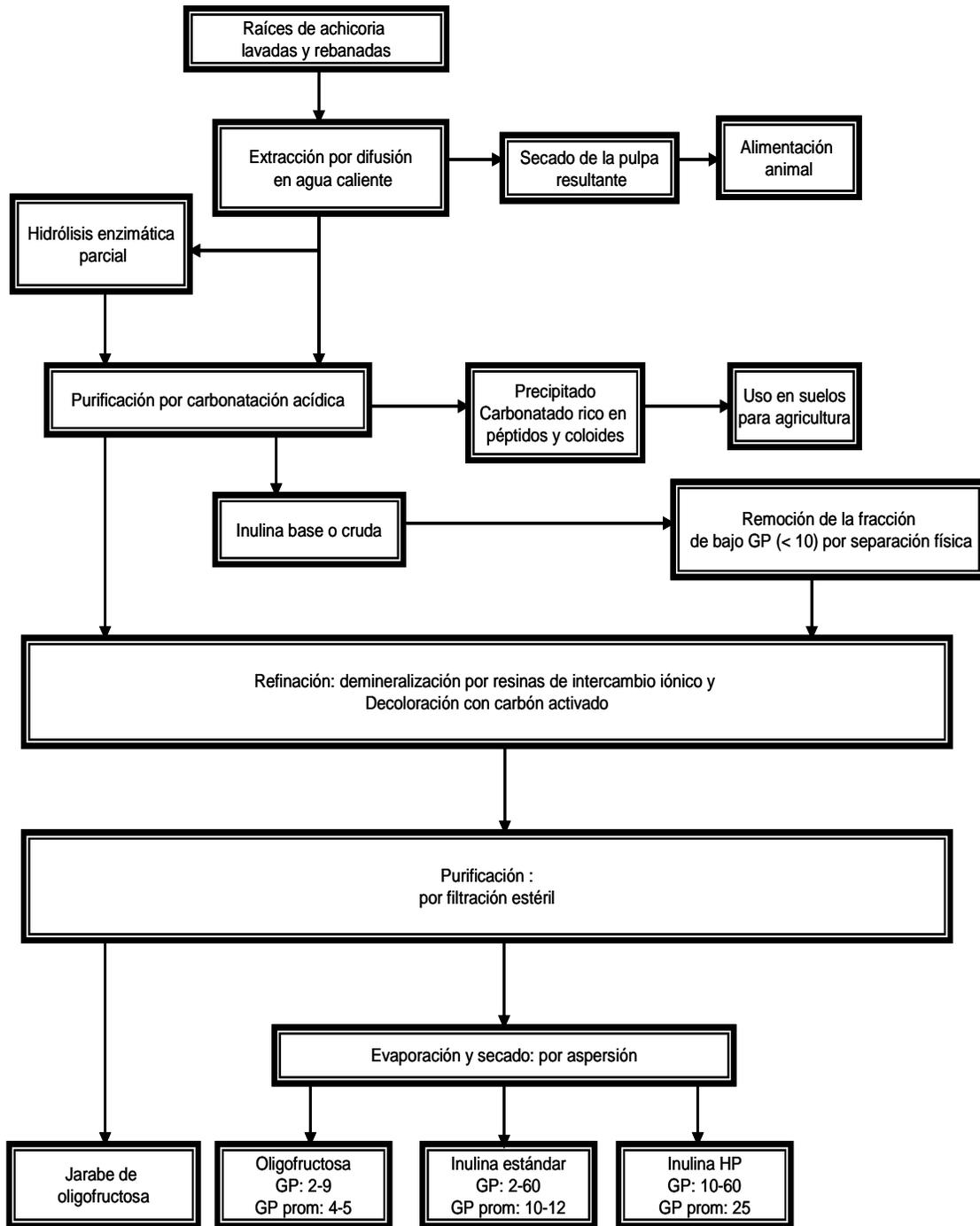
La producción industrial de la inulina y sus derivados se obtiene generalmente de la raíz de la achicoria. Alternativamente, los FOS se pueden sintetizar a partir de la sacarosa, la cual es sometida a transfructosilación por acción de la enzima  $\beta$ -fructofuranosidasa.

Existen productos comerciales como el Raftiline (inulina) y el Raftilose (oligofructosa) que son fibras dietéticas solubles que se usan ampliamente en aplicaciones de bebidas lácteas y alimentos debido a que poseen un sabor neutro, mejoran la textura, sensación y estabilidad.

En la Figura 5 se muestra el proceso de obtención industrial de la inulina y sus derivados.



Figura 5. Procesos de obtención industrial de la inulina y derivados <sup>16</sup>





A nivel industrial, la inulina se presenta como un polvo blanco, sin olor, con sabor neutral y sin efecto residual, pero la oligofruktosa además de su presentación en polvo se consigue como jarabe viscoso (75% de sólidos totales), ambos incoloros. La inulina nativa, a diferencia de la inulina HP (*high performance*) o de alta pureza, contiene azúcares libres (glucosa, fructosa, sacarosa), lo que le confiere cierto dulzor (10% del dulzor de la sacarosa). La inulina HP presenta menor solubilidad que la inulina nativa, debido a la escasez de azúcares libres (0,5 g de inulina HP/ 100 mL de agua). Entre otros productos derivados de la inulina está la carboximetil-inulina (CMI), un compuesto obtenido por carboxilación de la inulina, usado para reducir la formación y crecimiento de incrustaciones en las paredes de las tuberías, contenedores, cámaras de reacción o separación <sup>24</sup>.

En la Tabla 3.<sup>25</sup> se muestran las diferencias fisicoquímicas entre estos tres polímeros.

**Tabla 3. Características fisicoquímicas de la inulina, “inulina de alto desempeño” (HP) y oligofruktosa.** <sup>25</sup>

Característica	Inulina	Inulina HP	Oligofruktosa
Estructura química	GFa (2 = n = 60)	GFb (10 = n = 60)	GFa + Fb (2 = n = 7)
GP prom	12	25	4
Materia seca (g/100g)	95	95	95
Pureza (g/100g)	92	99.5	95
Azúcares (g/100g)	8	0.5	5
pH	5 a 7	5 a 7	5 a 7
Cenizas (g/100g)	< 0.2	< 0.2	< 0.2
Metales pesados (g/100g secos)	< 0.2	< 0.2	< 0.2
Apariencia	polvo blanco	polvo blanco	polvo blanco o jarabe viscoso
Sabor	neutral	neutral	moderadamente dulce
Dulzor % (vs sacarosa=100%)	10	ninguno	35
Solubilidad en agua a 25°C (g/L)	120	25	>750
Viscosidad en agua (5% p/p sol. acuosa) a 10°C (mPas)	1.6	2.4	<1.0
Funcionalidad en alimentos	Sustituto de grasa	Sustituto de grasa	Sustituto de azúcar
Sinergismo	Con agentes gelificantes	Con agentes gelificantes	Con edulcorantes intensos

\* G= unidades de glucosa, F= unidades de fructosa



### **3.8 Usos alimentarios de la inulina.**

La inulina y los FOS son ampliamente utilizados en productos alimenticios actúan como: espesantes, emulsificantes, gelificantes, sustitutos de azúcares y grasas, humectantes, depresores del punto de congelación, etc. En la industria farmacéutica se emplean como excipientes, aditivos, agentes tecnológicos o coadyuvantes; en la industria de la alimentación animal, y se está considerando su uso como constituyente de los empaques, por su carácter de material bioactivo. <sup>16, 26</sup>

Se sabe que la inulina y los FOS son usados para aumentar la cantidad de fibra a los alimentos, ya que el sabor que aportan es casi nulo y no afectan la viscosidad.

La inulina tiene propiedades similares a las del almidón, mientras que los FOS presentan un 30% del dulzor de la sacarosa. La inulina mejora la aceptabilidad de yogures elaborados con leche descremada (bajos en grasa), ya que imparte una mayor cremosidad, también actúa como agente espesante debido a que retiene el agua y estabiliza geles. La capacidad de formar gel es determinante en su uso como sustituto de grasas en productos lácteos, untables, aderezos, salsas y otros productos en los que las propiedades funcionales que otorgan las grasas son indispensables para lograr los efectos sensoriales deseados por los consumidores. Mejora la estabilidad de emulsiones y espumas, por lo que se usa como estabilizante en diversos productos alimenticios (helados, salsas, untables, postres cremosos, etc.). Se ha observado una sinergia entre la inulina



y otros agentes gelantes como la gelatina, alginatos, carraginos, gomas y maltodextrinas. Con respecto a la oligofructosa y los FOS, tienen mayor solubilidad y dulzor, así como un efecto sinérgico con edulcorantes como el acesulfame-K y el aspartame.<sup>27</sup>

En la elaboración de panes de trigo la adición de inulina sustituye la grasa vegetal, ya que no modifica las características reológicas de la masa antes de hornear ni la calidad sensorial del producto terminado. Su uso en la formulación de pastas da como resultado productos con propiedades sensoriales sin diferencias significativas de aquellas elaboradas con sólo trigo. Se han logrado formulaciones a base de chocolate, barras energéticas y cereales extruidos con un desempeño similar o incluso mejorado en sabor, color y textura.

Un punto importante que debe tomarse en cuenta al emplear la inulina y los FOS, es que a pH menores de 4, los enlaces tipo  $\beta$  de las unidades de fructosa, se hidrolizan con la consecuente formación de fructosa. Por esta razón, estos compuestos no pueden ser usados en alimentos con pH muy ácido.<sup>28</sup>

En la Tabla 4<sup>25</sup> se muestran las propiedades funcionales de la inulina y los sistemas alimentarios en que se aplican.

**Tabla 4. Propiedades funcionales de la inulina.**<sup>25</sup>

Aplicación	Funcionalidad
Productos lácteos	Cuerpo y palatabilidad, capacidad de formar gel, emulsificantes, sustituto de azúcares y grasas, sinergismo con edulcorantes
Productos congelados	Textura, depresión en el punto de congelación, sustituto de azúcares y grasas, sinergismo con edulcorantes
Productos untables	Estabilidad de emulsión, textura y capacidad de ser untado, sustituto de grasas
Productos horneados	Disminución de $a_w$ , sustitutos de azúcares
Cereales de desayuno	Crujencia, capacidad de expansión
Preparación con frutas (no ácidas)	Cuerpo y palatabilidad, capacidad de formar gel, estabilidad de emulsión, sustituto de azúcares y
Aderezos en ensaladas	Cuerpo y palatabilidad, sustituto de grasas
Productos cárnicos	Textura, estabilidad de emulsión, sustituto de grasas
Chocolate	Sustituto de azúcares, humectante

### 3.9 Método alternativo para extracción y cuantificación de inulina y FOS.

Estudios recientes<sup>29</sup> proponen alternativas para la determinación específica de inulina en diferentes matrices obteniendo altos rendimientos.

Una de estas alternativas es la hidrólisis enzimática seguida por una cromatografía de intercambio aniónico. Basada en las propiedades de las enzimas, carga y tamaño molecular de los hidratos de carbono.

Se propuso una metodología basada en la determinación de FDT establecida en el AOAC, considerando el fundamento antes mencionado. Ésta nos permitió eliminar interferencias provocadas por la naturaleza de las muestras y posteriormente cuantificar la inulina y los FOS en cromatografía de intercambio aniónico acoplado a un detector de índice de refracción.



### **3.10 Particularidades de la metodología propuesta y de las especies vegetales empleadas.**

A continuación se mencionan las propiedades de las especies vegetales, enzimas, y equipo empleado en el método alternativo de extracción y cuantificación de inulina y FOS, así como las características de validación.

#### **3.10.1 Especies vegetales.**

##### **3.10.1 1 Aspectos generales de los bulbos<sup>30</sup>**

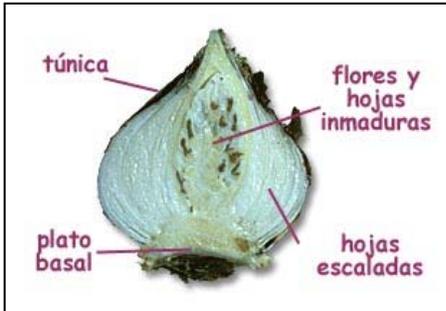
Los bulbos, son órganos subterráneos de almacenamiento de nutrimentos. Las plantas que poseen este tipo de estructuras se denominan colectivamente plantas bulbosas.

El bulbo está formado por el engrosamiento de la base de las hojas y consta de 5 partes principales (ver Figura 6):

- El disco basal, que corresponde a la parte inferior del bulbo desde donde crecen las raíces.
- Las escamas carnosas, que son el órgano de almacenamiento principal, ya que en sus tejidos es dónde se acumulan los nutrimentos.
- La túnica, es una capa que rodea a las escamas y las protege de la desecación.
- El vástago, que consiste en una yema floral y otras yemas en desarrollo.



- Yemas laterales, las que durante el período de crecimiento darán origen a nuevos bulbos, denominados bulbillos.



*Figura. 6 Esquema general de la estructura de un bulbo<sup>31</sup>.*

### 3.10.1.2 Clasificación de los bulbos

Los bulbos se clasifican en dos tipos:

- *Tunicados*, en los que sus bases están rodeadas por capas superpuestas, como la cebolla.
- *Escamosos*, en los que dichas bases están imbricadas (como las tejas de un tejado) y son más carnosas como la alcachofa.

Ambas clases producen bulbillos que sirven para la reproducción de las plantas, una vez que han alcanzado el tamaño suficiente.



### 3.10.1.3 Características particulares de cebolla y cebollina blanca



(a) *Allium cepa*



(b) *Allium scaposum*

**Figura 7 Especies de cebolla**

FAMILIA: *Liliáceas*

GÉNERO: *Allium*

NOMBRE CIENTÍFICO: *Allium cepa* y *Allium scaposum* (Figura 7 respectivamente)

NOMBRE COMÚN: Cebolla y cebollina blanca

HÁBITAT: Son bulbos de climas templados, aunque en las primeras fases de cultivo toleran temperaturas bajo cero, para la formación y maduración del bulbo, pero requieren temperaturas más altas y días largos, cumpliéndose en primavera para las variedades precoces o de día corto, y en verano-otoño para las tardías o de día largo, la temperatura óptima de cultivo es de 15<sup>o</sup>-23 °C.

Prefieren suelos sueltos, sanos, profundos, ricos en materia orgánica, de consistencia media y no calcáreos. En terrenos pedregosos, poco profundos, mal labrados y en los arenosos pobres, los bulbos no se desarrollan bien y adquieren un sabor fuerte, el pH ideal debe ser ligeramente ácido.



En suelos poco fértiles se producen cebollas que se conservan mejor, pero su desarrollo es menor.

DESCRIPCIÓN: Las plantas de las cebollas poseen un bulbo formado por numerosas capas gruesas y carnosas al interior, que realizan las funciones de reserva de sustancias nutritivas necesarias para la alimentación de los brotes y están recubiertas de membranas secas, delgadas y transparentes, que son base de las hojas.

Las capas de las cebollas tienen el papel de órganos de reserva para las hojas que salen de ellas y que son las que realizan la fotosíntesis y hacen crecer la planta.

USO: Alimentación humana.

#### **3.10.1.4 Características particulares de la jícama <sup>31</sup>**

FAMILIA: *Fabaceae*

GÉNERO: *Pachyrhizus*

NOMBRE CIENTÍFICO: *Pachyrhizus erosus*

NOMBRE COMÚN: Jícama, yacón o nabo mexicano

HÁBITAT: Originaria de México y Centroamérica, cultivada especialmente por su tubérculo comestible. Crece en lugares donde el agua y sol son moderados.





DESCRIPCIÓN: La planta es una enredadera que crece 4 a 5 m. El tubérculo puede tener hasta 30 cm de diámetro. El exterior de éste es amarillo, mientras que su interior es blanco cremoso, con una textura quebradiza que se asemeja a la de una papa cruda o una pera. El sabor es dulce y almidonado.

El periodo de cosecha comprende los meses de octubre a marzo, siendo los puntos con mayor producción entre diciembre y febrero.

USO: Alimentación humana.

### **3.10.1.5 AGAVES** <sup>32, 33</sup>

El género *Agave* está compuesto por plantas suculentas pertenecientes a una extensa familia botánica del mismo nombre: Agavaceae. Se les conoce con el nombre común de agave, pita, maguey, cabuya, ó mezcal. Es originario de México, aunque actualmente se distribuyen desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Venezuela. Se reconocen más de 200 especies pertenecientes a este género con una gran diversidad en cuanto a formas tamaños, colores y estrategias de vida.

En la figura 8 se muestra la anatomía general de los agaves.

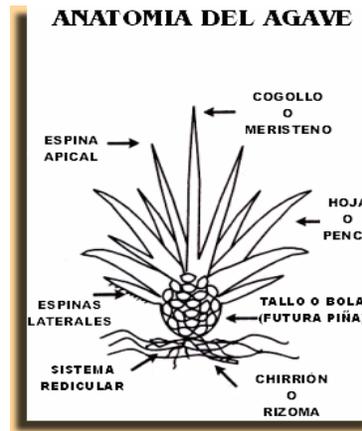


Figura 8. Anatomía del agave.

### 3.10.1.6 Clasificación y características de los agaves

#### *Agave filifera.*

FAMILIA: *Agavaceae*

GENERO: *Littaea*

GRUPO: *Filiferae*



Figura 9. *Agave filifera*

NOMBRE(S) COMÚN(ES): Maguey, Cabuya, Cabuyo

HABITAT: Agave localizado principalmente en México (Hidalgo y Aguascalientes)

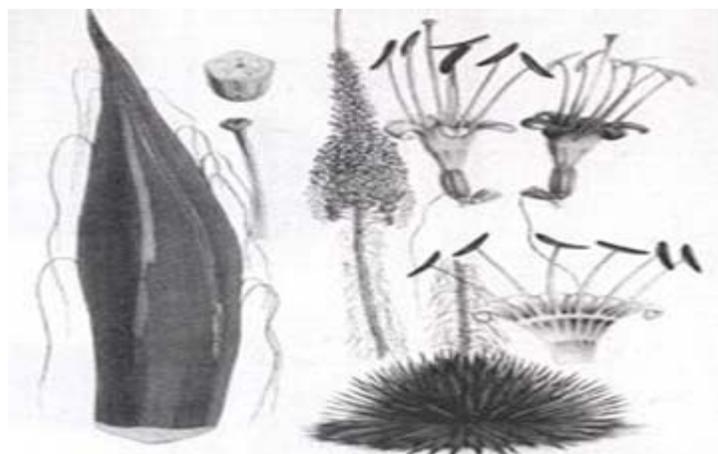
DESCRIPCION: Planta madura con grupos largos de rosetas verdes y filamentos gruesos. Posee hojas lanceoladas de 15-30 x 2-4 cm, gruesas y convexas en la parte superior y de la mitad de la base forma una lámina, el color



de las hojas es blanco con brotes impresos; las espinas van de 1-2 cm de largo, grisáceas, planas en la parte superior y redondeadas en la parte inferior.

La Inflourescencia se da en la punta, afilada de 2-2.5 m de alto, la floración es densa con largos caudales recubiertos con brácteas en la parte superior del eje; las flores van de 30-35 mm largo, rojizas, sobre todo germinadas, existe una ascendente curvatura en pediceles densamente pequeños; el ovario mide de 13-15mm de largo, fusiforme, angular, con un cuello y un tubo surcado; el tubo va de 5-6 mm de profundidad, 8 mm de par en par en forma de embudo; los filamentos van de 30-35 mm de largo, delgados y rojizos; las anteras miden de 7-12 mm largo, rojizas, regulares y céntricas. (Figura 10).

USOS: Son fuente de tequila, pulque destilado y bebidas fermentadas. Los tallos de la espiga de flotación se utilizan para cuerdas y fibras. También se emplean para rocallas, macetas y jardineras. Muy apreciado por su aspecto decorativo.



**Figura10. Ilustración de *Agave filifera***

***Agave lechuguilla.***FAMILIA: *Agavacea*GENERO: *Littaea*GRUPO: *Marginatae**Figura 11 Agave lechuguilla*

NOMBRE(S) COMÚN(ES): Lechuguilla

HÁBITAT: Agave localizado principalmente en los desiertos de Chihuahua y Sonora, casi siempre sobre piedra caliza, crece en suelos rocosos a altitudes de entre 900 y 2100 m (3000 y 7000 pies).

DESCRIPCION: La planta florece una vez antes de morir, el néctar es un gran nutrimento en la dieta de insectos, murciélagos y algunas aves.

Las hojas son fuertes y rígidas, con puntas endurecidas y muy afiladas, poseen un color verde pálido o amarillento, la extensión es erecta, la punta cóncava y la base convexa, forman grupos densos de rosetas pequeñas de 30-50 x 40-60 cm, con flores amarillas o rojizas de 25-50 x 2.5-4 cm, los dientes de las hojas son típicamente desviados van de 2-5 mm largo, cafés o ligeramente grisáceas; las espinas son gruesas de 1.5- 4 cm de largo; el pico va de 2.5-3.5 m alto; las flores son cortamente pediceladas en dos o tres y raramente largas (2-15 cm).Las flores crecen en ascensión lateral; posee flores de 30-45 mm largo, amarillas frecuentemente teñidas de rojo o púrpura;

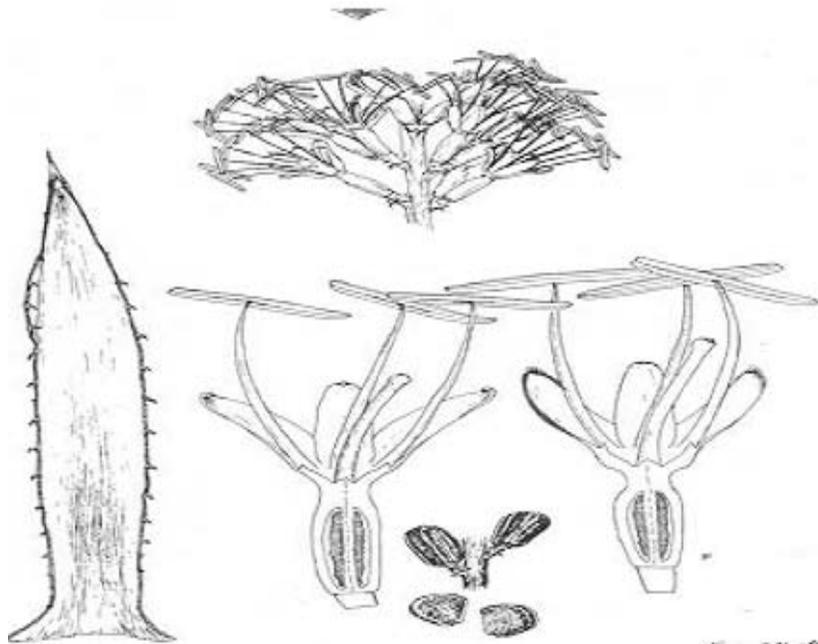


los ovarios van de 15-22 mm, largos, fusiforme; el tubo mide de 2.5-4 mm de largo, bajo y abierto; los filamentos van de 25-40 mm de largo (Figura 12).

HÁBITAT. Tiene uno de los más extensos rangos, es abundante desde el sureste de Nuevo México y suroeste de Texas por el Desierto de Chihuahua al Estado de México e Hidalgo.

USOS: Los nativos habitantes de esas regiones utilizan las fibras de las hojas succulentas para confeccionar cuerdas y tapetes (comúnmente llamado "ixtle") y una fibra dura conocida con el nombre comercial "fibra Tampico".

El agua almacenada en esta planta es rica en sales y minerales, a menudo es vendida en México como una bebida deportiva, sin embargo la planta en sí misma es venenosa para el ganado, cabras y ovejas.



**Figura 12** *Agave lechuguilla*. Hoja, flor, racimo y capsulas

***Agave victoriae-reginae.***FAMILIA: *Agavaceae*GENERO: *Littaea*GRUPO: *Marginatae**Figura 13 Agave victoriae-reginae*

NOMBRE(S) COMÚN(ES): Agave de la reina Victoria, Noha, Pintillo

HÁBITAT. Desierto de Chihuahua

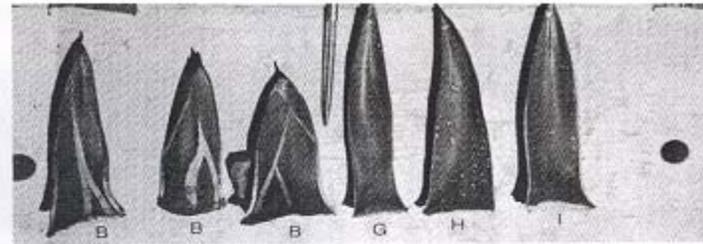
DESCRIPCIÓN: La planta es pequeña, compacta, suculenta (capacidad de soportar largos períodos de sequía) o cespitosa, plantas muy variables. Las hojas son cortas, verdes con conspicuos blancos, 15-20 (-25) x 4-6 cm, lineal-oval, redondeada en el ápice, rígida, densamente plana a cóncava en la parte superior, redondeada y abundantemente abultada; usualmente desdentada; las espinas terminales van de 1.5-3 cm de largo, triangulares cónicas, muy amplias en la base, con surcos en la parte superior y redondeado en la parte inferior. Las hojas de *A. victoriae-reginae* varían en su tamaño dependiendo de sus subgrupos como se observa en la Figura 14.

El pico de inflorescencia va de 3-58 m alto, erecto, florescencia abundante, situada en la parte superior de la mitad del eje; las flores, se encuentra en pares o triadas cortas; los pedicelos van de 40-46 mm largo, con colores variados; los estambres frecuentemente están teñidos con rojo o púrpura; los



ovarios miden de 18-24 mm largo, densamente fusiformes, con cuello pequeño; el tubo es bajo y extenso que va de 3 x 8-10mm; los filamentos van de 45-50 mm largo, insertados en el borde del tubo; la cápsula es ovoide de 17-20 x 10-13 mm, redondeado en la base y las semillas de 3-5 x 2.5-3.5 mm son hemisféricas.

USOS: Excelente como planta de ornamento por su poco desarrollo y gran elegancia (imagen poliédrica).



**Figura 14. Serie de hojas de *Agave victorie-reginae***

### ***Agave celsii.***

FAMILIA: *Agavaceas*

GENERO: *Littaea*

GRUPO: *Polycephalae*



**Figura 15. *Agave celsii***

DESCRIPCIÓN: Planta perenne con ramificaciones auxiliares y floraciones, formando largos grupos de suaves y suculentas rosetas, libremente sembradas. La hoja de 30-60 x 7-13 cm es oval, ovoide o espatulada, forma curva en la



parte ascendente, cóncava en la parte superior y convexa en la parte inferior, densamente carnosa, el color va de verde a gris. Posee pequeños espacios de dientes cerrados de 1-3 mm largo, frecuentemente bicúspides, algunas veces con crestas ciliadas, blanquecinas a café rojizo; las espinas son débiles, aciculares de 1-2 cm de largo de color pardusco.

El pico de inflorescencia va de 1.5-2.5 m de alto, floración densa, conversión lenta en frutas; las flores son carnosas de 40-60 mm largo, el color fuera de la flor es de un toque verde, amarillo a rojizo y dentro de ella el color va de lavanda a púrpura, incluyendo pistilos y filamentos; los ovarios van de 13-20 mm largo; los filamentos de 40-60 mm de largo, están insertado en el ápice del tubo que es de color variable; las capsulas son carnosas, cafés de 18-25 x 9x12 mm; las semillas de 4x3 mm a 3x2 mm son hemisféricas con un margen completamente desarrollado (Figura 16).

HÁBITAT. Se localiza en la región de la “Huasteca” en Nuevo León y al este de San Luis Potosí hasta “Jalaca” en Hidalgo.



**Figura 16.** Ilustración del tipo de planta de *Agave celsii*

***Agave cupreata.***FAMILIA: *Agavacea*GENERO: *Agave*GRUPO: *Crenatae**Figura 17. agave cupreata*

NOMBRE(S) COMÚN(ES): Maguey de mezcal

HÁBITAT: Se encuentra extensamente dispersa en cuencas de montaña como el Río Balsas en Michoacán y Guerrero a gran altitud, entre 1.500 y 2.000 metros (4.900 a 6.600 pies). Resiste grandes calores, sequías y fuertes heladas en invierno.

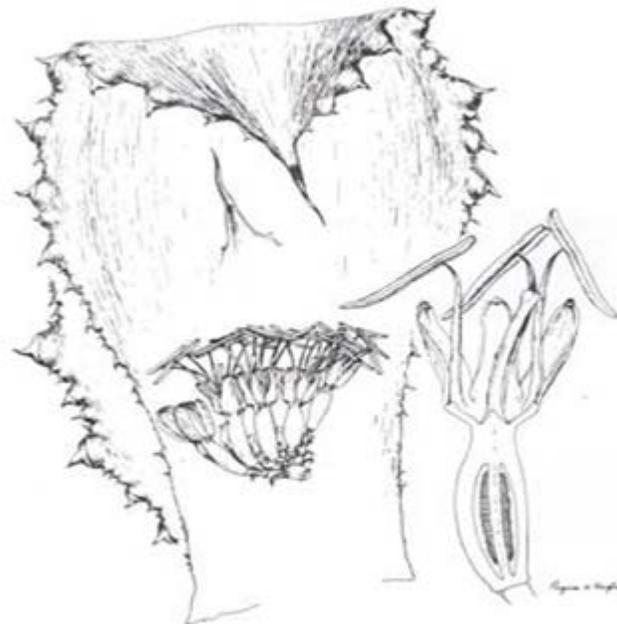
DESCRIPCION: La planta posee una sola roseta de tamaño medio, verde brillante; las hojas son lanceoladas u ovaladas de 40-80 x 18-20 cm, fuertemente angostas en la base y densamente carnosas, planas a levemente cóncavas en la parte superior; los dientes son dimórficos, fuertemente aplanados, rectos o curvos, grisáceos y el tamaño del largo varia; las espinas van de 3-5 cm de largo, delgadas, sinuosas, de café claro a grisáceas, ampliamente acanaladas en la parte superior, con bordes agudos en dientes superiores.

Las flores son difusivas con un color naranja-amarillo de 55-60 mm de largo, con pedicelos oscuros; el ovario va de 30-35 mm largo, verde olivo, fusiforme con 3 cuellos dobles estrechos y acanalados; el tubo va de 6-7 mm de ancho y



de 14-15 mm de amplio con forma de embudo, lleno de protuberancias; los filamentos de 35-40 mm largo se encuentran insertado a la mitad del tubo en la parte superior de la base. (Figura 18).

USOS: Producción de mezcal.



*Figura 18 .Agave cupreata dibujo de Gentry 22553 (izquierda) y Gentry 22554. Colectado cerca de Tzitzio, Michoacán, 15 Dic. 1967*

***Agave potatorum.***

FAMILIA: *Agavacea*

GENERO: *Agave*

GRUPO: *Hiemiflorae*



*Figura 19. Agave potatorum*



NOMBRE(S) COMÚN(ES): “Papalometl” (Nahuatl), Maguey de mezcal, Maguey mezcalero, Tobala.

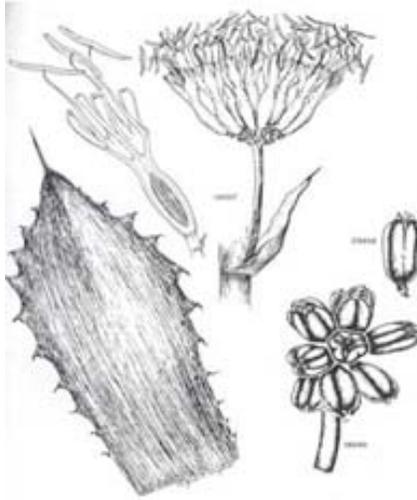
DESCRIPCIÓN: Planta polimórfica con rosetas pequeñas, compacta o abierta, generalmente posee de 50-80 hojas; las hojas van de blancas a verdosas, con una medida de 25-40 x 9-18 cm de largo, oval a lanceoladas, planas, angostas hacia la base, suaves, carnosas pero algo rígidas; los dientes son prominentes de 5-10 mm de largo con una distancia de 1-3 cm, la base es poco amplia; las espinas generalmente de 3-4.5 cm de largo, amplias en la base, agudamente acentuadas, ampliamente acanaladas a planas en la parte superior, son rígidas hasta aproximarse al diente superior poseen un color que va de castaño a café grisáceo.

La inflorescencia va de 3-6 m de alto, con flores racimosas o paniculares con pedúnculos laterales; las flores son polimórficas, de verde claro a amarillentas, frecuentemente con un tinte rojo o púrpura en los brotes; el ovario va de 25-50 mm largo, generalmente con cuello liso; el tubo de 10-17 mm cilíndrico o forma de embudo y acanalado; los filamentos son pequeños de 35-50 mm largo, amplios en la parte inferior, algunas veces presentan color y un pistilo largo; las capsulas son largas de 4-5.5 x 2 cm y ovoides; las semillas de 6-7 x 5-6 mm, negras y brillosas. (Figura 20).

HÁBITAT: El rango de *A. potatorum* se localiza en montañas semi-áridas de Puebla y Oaxaca entre 1,240 y 2,300 m de elevación, donde esta asociado a cuevas herbosas con remanentes de vegetación de pinos y robles.



USOS: Se emplea en rocallas, macetas, y zonas ajardinadas con bajo mantenimiento, obtención de mezcal y también es elaborada la bebida destilada denominada “Bacanora” en el estado de Sonora.



*Figura 20. Agave potatorum. Hoja, flor y cápsula*

***Agave angustifolia.***

FAMILIA: *Agavacea*

GENERO: *Agave*

GRUPO: *Rigidae*



*Figura 21. Agave angustifolia*

NOMBRE(S) COMÚN(ES): Espadín, Marginata,

DESCRIPCION: Las rosetas son suculentas; las hojas generalmente de 60-120 x 3.5-10 cm, lineales a lanceoladas, rígidas, fibrosas, ascendentes a

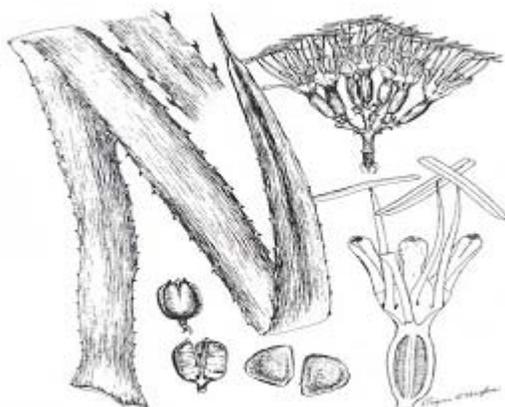


horizontales, de color verde claro, cóncavas en la parte superior y convexas en la parte inferior, angostas y espesas hacia la base, algunas veces ligeramente cartilaginosas; los dientes son pequeños, generalmente de 2-5 mm de largo con un espacio reducido entre ellos, comúnmente café rojizo o café oscuro; las espinas son variables de 1.5-3.5 cm de largo, cónicas y poseen un color café oscuro; la panícula va de 3-5 m de alto.

Las flores van de verde a amarillo de 50-65 mm de largo, cilíndricas y angulares con cuello corto y ligeramente acanaladas; los filamentos de 35-45 mm largo son delgados y se encuentran insertados en la parte media del tubo; las antenas son amarillas de 20-30 mm de largo; las capsulas son ampliamente ovoides, largas de 3 x 5 cm y con un color café oscuro; las semillas son largas y van de 9-12 x 7-8 mm. (Figura 22).

**HÁBITAT:** Posee un rango amplio de distribución en Norteamérica. Es una planta de tierra caliente que va de Costa Rica pasando por las costas pacificas hasta Tamaulipas.

**USOS:** Producción de fibra y mezcal.



**Figura 22** *Agave angustifolia*. Hojas, flor y semillas

***Agave Tequilana.***

FAMILIA: *Agavacea*

GENERO: *Agave*

GRUPO: *Rigidae*



*Figura 23. Agave tequilana*

NOMBRE(S) COMÚN(ES): Pita, maguey, cabuya, mezcal

DESCRIPCION: Planta suculenta de 1.2-1.8 m de alto; las hojas van de 90-120 x 8-12 cm son lanceoladas, fibrosas, rígidas, cóncavas, angostas y espesas hacia la base; los dientes generalmente son de un tamaño regular de 3-6 mm largo y son de color café claro a café oscuro, están apartados entre ellos de 1-2 cm, son acanalados en la parte superior y amplios en la base; la panícula va de 5-6 m de alto; las flores de 68-75 mm de largo en pequeños pedicelos de 3-8 mm de largo; los filamentos van de 45-50 mm de largo doblados hacia el pistilo, se encuentran insertados de 5-7 mm por encima de la base del tubo.

HÁBITAT: *A. tequilana* crece en cuevas semi-áridas del oeste y sur de la región de Tequila que se sitúa a lo largo del camino de Colula a Tecolotlán, Jalisco.

Sólo la variedad Azul es la que da origen al Tequila. El agave Tequilana Weber se encuentra en cinco estados de la República como Jalisco, Michoacán, Nayarit, Guanajuato y Tamaulipas y solamente en estos lugares se puede utilizar la materia prima para la elaboración del tequila.



USOS: Producción de tequila.

***Agave Salmiana.***

FAMILIA: *Agavacea*

GENERO: *Agave*

GRUPO: *Salmianae*



*Figura 24. Agave salmiana*

NOMBRE(S) COMÚN(ES): Maguey pulquero, manso o de montaña

DESCRIPCIÓN: La planta va de una medida media a larga, forma rosetas masivas de 1.5-2m de alto; las hojas van de 100-200 x 20-35 cm son ampliamente lineales y lanceoladas, de color verde a grisáceo, convexas en la base y cóncavas en la parte superior; los dientes de 5-10 mm de largo separados entre si de 3-5 cm, de color café a café grisáceo; las espinas son largas de 5-10 cm, de color café oscuro, acanaladas en la punta; las flores van de 80-110 mm de largo, amarillas en la parte superior y con un ovario verde; los ovario van de 50-60 mm de largo, delgados, cilíndricos con un cuello estrecho; el tubo es largo de 21-24 mm de profundidad; los filamentos de 55-70 mm de largo insertado en la parte superior de la mitad del tubo; la cápsula de 5.5-7 x 2-2.2 cm de color café; las semillas poseen un color negruzco y van de 8-9 x 6-7 mm de largo.

HÁBITAT: *A. salmiana* es nativa de montañas de México central y existen numerosos formas de cultivo salvaje. Generalmente se desarrolla en



elevaciones de 1,230-2,460 m, con una precipitación con promedio anual de 15-36 pulgadas (360-1,000 mm), el 70-80% de lluvia cae durante Mayo y Octubre.

USOS: Producción de pulque, alimento de ganado lechero, algunas veces se utiliza para proteger propiedades formando cercas y como ornamento.

De la cutícula de la penca puede obtenerse una hoja que es empleada para envolver alimentos.

***Agave convallis.***

FAMILIA: *Agavacea*

GENERO: *Agave*



**Figura 25. *Agave convallis***

DESCRIPCIÓN: Planta suculenta, está compuesta por grandes hojas carnosas dispuestas en una roseta. El agave florece solo una vez después de 15 a 20 años de vida y muere. La inflorescencia se produce en verano por la aparición de un tallo de varios metros de alto.

HÁBITAT: Se localiza en algunas regiones de México, como son: Hidalgo, Oaxaca y Puebla a una latitud de 1800 a 2400 m.



### 3.10.2 Enzimas <sup>34</sup>

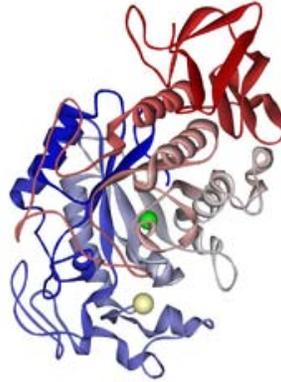
#### 3.10.2.1 $\alpha$ -amilasa

La amilasa, es una hidrolasa que tiene la función de digerir el glucógeno y el almidón para formar azúcares simples, se produce principalmente en las glándulas salivares (sobre todo en las glándulas parótidas) y en el páncreas. Su función óptima es a pH 7.

La digestión del almidón, principalmente fuente de hidratos de carbono en la dieta humana, comienza en la boca. La saliva contiene  $\alpha$ -amilasa, que hidroliza al azar todos los enlaces  $\alpha$  (1 $\rightarrow$  4) glucosídicos del almidón, excepto los más externos y los próximos a las ramificaciones. Cuando los alimentos completamente masticados llegan al estómago, en donde la acidez inactiva a la  $\alpha$ -amilasa, la longitud media de la cadena de almidón es reducido de varios millares a menos de ocho unidades de glucosa. La digestión del almidón continúa en el intestino delgado, bajo la influencia de la  $\alpha$ -amilasa pancreática, que es semejante a la enzima salivar. Esta enzima degrada el almidón a una mezcla del disacárido maltosa, que contienen glucosa con uniones  $\alpha$  (1 $\rightarrow$  4) y oligosacáridos conocidos como dextrinas, que contienen las ramificaciones  $\alpha$  (1 $\rightarrow$  6). Estos oligosacáridos son hidrolizados para rendir sus componentes monosacáridos por enzimas específicas contenidas en los *microvilli* de la membrana de la mucosa intestinal.



En la Figura 26 se muestra la estructura tridimensional de la  $\alpha$ -amilasa contenida en la saliva humana.



**Figura 26.  $\alpha$ -amilasa de saliva humana<sup>34</sup>**

### **3.10.2.2 Proteasa**

Las proteasas (peptidasas) son enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas. Usan una molécula de agua para hacerlo y por lo tanto se clasifican como hidrolasas.

Las proteasas se encuentran naturalmente en organismos vivos, donde se usan para la digestión molecular y la reducción de proteínas no deseadas. Las proteasas pueden romper ya sea enlaces peptídicos específicos (*proteólisis limitada*), dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la proteína, o pueden reducir un péptido completo a aminoácidos. (*proteólisis ilimitada*).

Su origen puede ser fúngico (*Aspergillus oryzae*), bacteriano (*Bacillus*, *Streptococcus*) y vegetal (*Canica papaya* L: Papaína).



Su actividad comprende un margen de pH de 3 hasta 9 y alcanza un óptimo entre 40 y 70 °C.

Existen también las proteasas pancreáticas (tripsina, quimotripsina, elastasa y carboxipeptidasa) que se sintetizan en el páncreas y se segrega a través del conducto pancreático al duodeno del intestino delgado, en respuesta a una señal hormonal generada cuando el alimento sale del estómago. Sin embargo, no se sintetizan en su forma activa, puesto que una batería de potentes proteasas libres en el páncreas causaría una digestión del tejido pancreático. En su lugar, se elaboran en forma de moléculas ligeramente más grandes, catalíticamente inactivas, denominadas zimógenos.

Los zimógenos deben romperse proteolíticamente en el intestino para producir las enzimas activas. Estas enzimas se degradan tras haber cumplido sus fines, por lo que no ponen en peligro el tejido intestinal, que también está de alguna manera, protegido por su superficie glucosilada.

### **3.10.2.3 Amiloglucosidasa**

Los polisacáridos se mantienen juntos por enlaces glucosídicos (unión de un carbono anomérico al oxígeno acetálico) entre unidades de monosacáridos vecinos. La hidrólisis de los enlaces glucosídicos es catalizada por enzimas conocidas con el nombre de glucosidasas que se diferencian en especificidad según la identidad de la configuración anomérica del glucósido pero que, con frecuencia, son insensibles a la identidad del resto alcohólico.



El almidón está formado por la fracción *amilasa* de cadena recta de moléculas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1,4); en tanto que la fracción *amilopectina*, además de la cadena recta, presenta ramificaciones con enlaces glucosídicos 1, 6.

La amiloglucosidasa, también llamada glucoamilasa, tiene la capacidad de hidrolizar tanto los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1,4) como los  $\alpha$ -(1,6); su acción prolongada puede causar la ruptura total del almidón. Ésta enzima se obtiene de un hongo, *Aspergillus rhizopus*, y actúa sobre las dextrinas produciendo glucosa, por lo que se emplea en la fabricación de los jarabes de glucosa.

### 3.10 3.1 Equipo <sup>35,36</sup>

#### 3.10.3.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida (LC) es el nombre generalmente usado para describir un procedimiento cromatográfico en que la fase móvil es un líquido. El gran poder de la LC reside en la combinación de un amplio intervalo de posibles propiedades para la fase móvil, junto con la elección de numerosos tipos de fases estacionarias, significativamente diferentes, así como una amplia variedad de detectores.

Es importante entender que la separación por LC no se produce por un único tipo de interacción entre los analitos y la fase estacionaria, siempre hay otras interacciones además de la empleada, pero la predominante nos indicará el tipo de cromatografía.



Las interacciones fase estacionaria-analito que se presentan en la columna empleada en esta investigación son: exclusión molecular e intercambio iónico.

### **3.10.3.2 Cromatografía de exclusión molecular**

Una columna de exclusión molecular es un método por el cual las moléculas se separan en solución según su peso molecular, o específicamente según su radio de Stokes. Es una técnica utilizada para separar eficientemente azúcares con diferente pesos moleculares. En este tipo de cromatografía las moléculas excluidas se mueven continuamente junto con el eluyente, en tanto que aquellas que por su tamaño pueden ingresar a la fase estacionaria son retenidas en función de sus tamaños. Por lo tanto, las primeras moléculas que eluyen son las excluidas, y luego, en orden de tamaño decreciente, las moléculas no excluidas.

### **3.10.3.3 Cromatografía de intercambio iónico**

Los materiales de la fase estacionaria contienen zonas cargadas que se denominan resinas de intercambio iónico. La razón por la que se denominan resinas de intercambio iónico se debe a que el balance iónico global siempre contienen el mismo número de cargas positivas y negativas; es decir, que son eléctricamente neutras. Por lo tanto, los iones de la resina están siempre unidos con algún ión de la fase móvil cuya carga sea la contraria a la de la resina.

Es decir, el ión inicialmente unido a un determinado sitio solo puede dejarlo cuando se intercambie con otro.



Los iones positivos (cationes) se intercambian en la fase estacionaria formada por polímeros con enlaces cruzados con cargas negativas fijas. Se denominan resinas de intercambio catiónico.

#### **3.10.3.4 Detector de Índice de refracción**

La detección por los cambios en el índice de refracción (IR) depende de las propiedades refractantes del líquido (reflexión de la luz). El IR de la luz cambia al variar el IR del eluyente en presencia de los solutos. Los detectores IR son universales: la presencia de cualquier soluto produce una respuesta.

#### **3.10.4 Definición de validación <sup>37</sup>.**

Un método analítico se define como la secuencia de actividades que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico (analito) en una muestra. La validación es proporcionar la información necesaria para comprobar que un método cumple con el objetivo para el que fue diseñado, es decir, es la evidencia documentada, de los estudios de laboratorio, de que un método satisface con seguridad los requisitos para su aplicación analítica, permitiendo la obtención de resultados confiables y cercanos al valor real.

La evidencia documentada de la validez de un método se expresa por medio de la evaluación de distintos parámetros; precisión/adecuabilidad del sistema, linealidad del sistema, especificidad, exactitud y repetibilidad, linealidad del método, precisión del método (intermedia o tolerancia interdía/analista) en función de las características del análisis. Cada parámetro debe cumplir con



---

ciertos criterios de aceptación para considerar que la metodología es válida (cada uno de los parámetros anteriores se detalla en el Anexo B sección 3).

Los métodos que aparecen en la literatura oficial reconocida (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, métodos oficiales de análisis de la AOAC, etc.) se consideran válidos y sólo debe cumplirse con una etapa de adecuación, verificando que los resultados obtenidos cumplan con los criterios de aceptación.

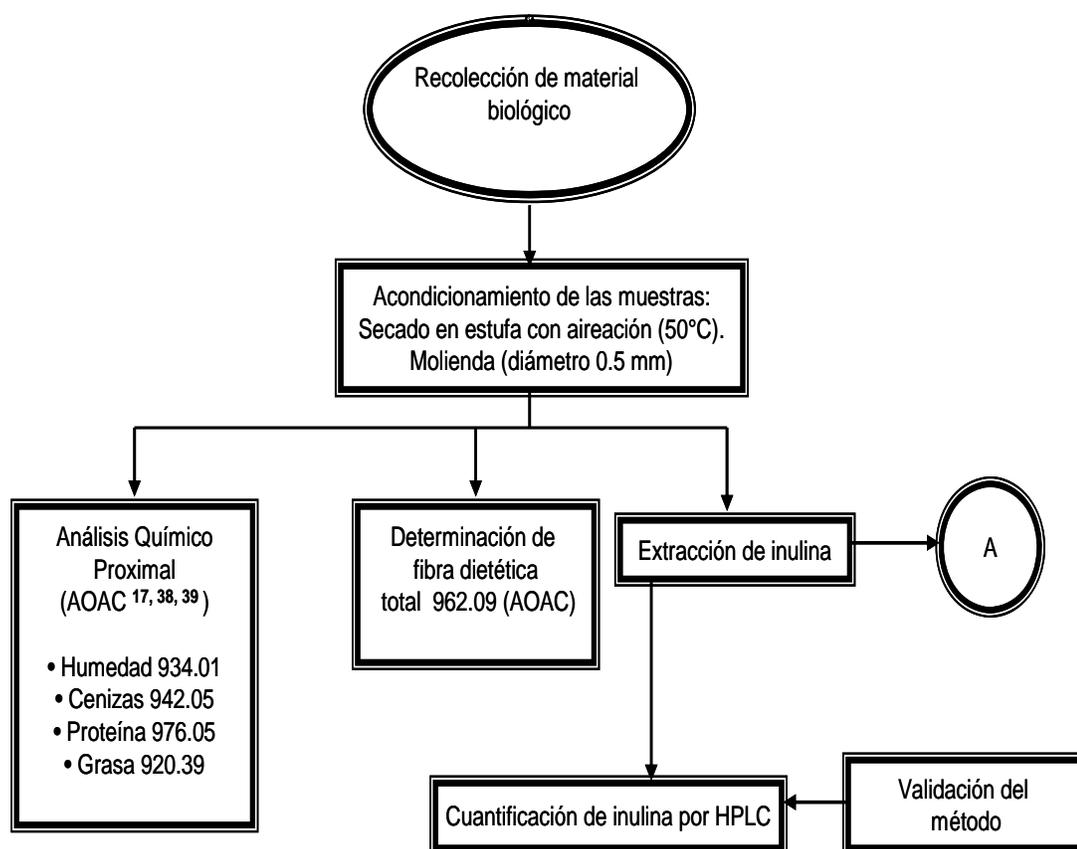


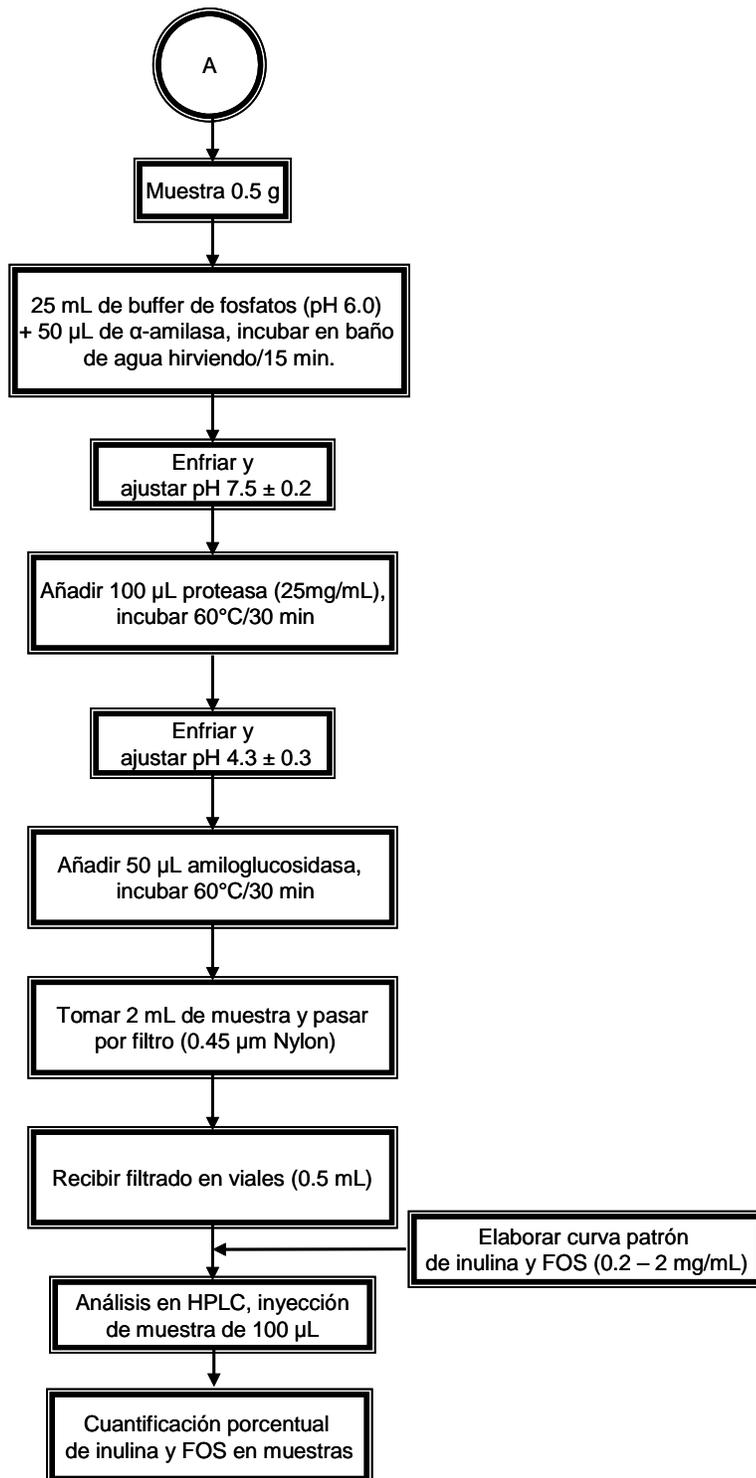
## Capítulo 4

### METODOLOGÍA

#### 4.1 Diagrama general.

El proyecto consta de un análisis químico proximal para la caracterización de las muestras, la metodología de extracción propuesta esta basada en el método de FDT y la cuantificación se realizó por HPLC.



4.2 Diagrama de extracción y cuantificación de inulina y FOS <sup>7, 29,40</sup>



### 4.3 Material biológico empleado

Agaves	Bulbos
<i>Agave lechuguilla</i>	<i>Allium cepa</i>
<i>A. convallis</i>	<i>Allium scaposum</i>
<i>A. angustifolia</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>
<i>A. potatorum</i>	
<i>A. cupreata</i>	
<i>A. filifera</i>	
<i>A. tequilana</i>	
<i>A. victoriae-reginae</i>	
<i>A. salmiana</i>	
<i>A. celsii</i>	

Para el análisis se emplearon 10 variedades de pencas de agave maduras, comúnmente utilizadas y/o desechadas en la industria. Se obtuvieron del Jardín Botánico de la UNAM, el cual presenta un suelo rico en minerales y otros nutrimentos. Las muestras fueron proporcionadas y clasificadas por el Dr. Abisai García. La edad de las pencas oscilaba entre 7 y 10 años, fueron seleccionadas de manera aleatoria y recolectadas de forma tradicional.



Figura 27. Jardín Botánico, UNAM



Los bulbos (Cebolla blanca, cebollina blanca y jícama) empleados en la determinación fueron obtenidos del mercado sobre ruedas debido a su accesible adquisición.

#### **4.4 Acondicionamiento de las muestras**

Los agaves y bulbos poseen una gran cantidad de agua en su estructura lo cual los hace perecederos, fue necesario aplicar un tratamiento previo de secado a una temperatura no mayor de 55°C en estufa con aireación y una posterior molienda para facilitar la manipulación y la realización de las determinaciones de cada muestra.

Los materiales, reactivos y procedimiento del acondicionamiento se describen detalladamente en el anexo B sección 1.

#### **4.5 Análisis Químico Proximal**

La determinación de humedad<sup>934.01</sup>, cenizas<sup>942.05</sup>, proteína<sup>976.05</sup> y grasa<sup>920.39</sup> fueron realizadas de acuerdo al AOAC y los hidratos de carbono se obtuvieron por diferencia.

La determinación de FDT se realizó de acuerdo al método publicado en la 16<sup>va</sup> edición, volumen II, sección 45.4.0, método 985.29 AOAC 1995, modificado por Almanzan & Zhou, 1994. La metodología se muestra en el anexo B sección 2.



## 4.6 Metodología establecida para la extracción y cuantificación de inulina y FOS

### 4.6.1 Extracción de inulina y FOS

La metodología está basada en el análisis de FDT<sup>962.09</sup> establecido por el AOAC siguiéndose la sección de hidrólisis enzimática, donde se emplearon las siguientes enzimas:  $\alpha$ -amilasa, proteasa y amiloglucosidasa. La finalidad de dicha hidrólisis fue eliminar posibles interferencias (proteínas, almidón e hidratos de carbono de bajo peso molecular) que modificaran o afectaran el análisis de las muestras, así como la cuantificación de los analitos. Una vez realizada la extracción se analizaron por HPLC con el fin de realizar un análisis cualitativo para comprobar la presencia de inulina y FOS y basado en esto realizar un análisis cuantitativo posterior.

Las ventajas de esta metodología fueron comparadas con metodologías de extracción previamente propuestas en donde se modificaron tiempo y temperatura, disolventes (etanol, acetonitrilo, acetona y agua), técnicas de filtración, ultrafiltración, tiempos y “g” de centrifugación.

#### 4.6.1.1 Material y reactivos

- Enzimas  $\alpha$ -amilasa, proteasa y amiloglucosidasa (Kit Total Dietary Fiber Assay (SIGMA TDF-100A)).
- Inulina de achicoria. Sigma #079F7105.
- Oligofructanos.



#### **4 6.1.2 Procedimiento**

##### **Hidrólisis enzimática**

Se realizó de acuerdo al análisis de FDT (sección de hidrólisis enzimática hasta hidrólisis con amiloglucosidasa).

##### **4.6.2 Cuantificación de inulina y FOS**

Se probaron diferentes proporciones de la fase móvil, temperatura de la columna, flujo de elución. Aunado a esto se probó una cuantificación realizando una hidrólisis con invertasa e inulinasa seguida de un método colorimétrico basado en la cuantificación indirecta de hidratos de carbono (Fenol- Sulfuro Somogyi-Nelson, Cisteína-Carbazol y GOD-POD).

Las metodologías previas no fueron las adecuadas debido a que seguían existiendo interferencias de macronutrientes, condiciones no adecuadas para las enzimas, pérdida del analito y consumo excesivo de reactivos.

Por lo que se optó por una cuantificación basada en las propiedades de carga y tamaño molecular de los hidratos de carbono. De acuerdo a lo anterior, se propuso una separación cromatográfica de exclusión molecular empleando una columna de intercambio aniónico acoplado a un detector de índice de refracción.



#### 4.6.2.1 Material y reactivos

- Inulina de achicoria. Sigma, N0. de catálogo: #079F7105.
- Filtros de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  Millex.
- Membranas de Filtración para agua desionizada tipo GN 0.20 $\mu\text{m}$  y para H<sub>2</sub>O:ACN tipo GV 0.22 $\mu\text{m}$ .
- Aparato de filtración de disolventes Millipore.
- Agua desionizada previamente filtrada.
- ACN grado HPLC previamente filtrado.

#### 4.6.2.2 Condiciones de trabajo

- Equipo: HPLC, Alliance®, Waters 2695 Separation module.
- Detector: IR, Waters 2410. sensibilidad 4, polaridad (+), unidades mV.
- Temperatura de trabajo: Detector 35°C (interna), Columna 65°C  $\pm$  5°C.
- Volumen de inyección: 100  $\mu\text{L}$
- Fase móvil: agua:acetonitrilo (95:5)
- Columna\*: Tipo SP0810, contraíón Pb<sup>2+</sup>, modo de separación SEC+ LE (Stands for ligand exchange), tamaño 8x300 mm, límite de exclusión 1000, Número de platos por columna  $\geq$  11,000, disolvente H<sub>2</sub>O.
- Flujo de inyección de la fase móvil: 0.7 mL/min.



#### **4.6.2.3 Procedimiento**

##### **Preparación de la fase móvil**

Lavar material previamente con HNO<sub>3</sub> al 5% y enjuagar con agua desionizada\*\*

En un matraz volumétrico de 1000 mL, adicionar 50 mL de acetonitrilo\*\* y llevar hasta el aforo con agua desionizada\*\* y mezclar.

La mezcla se filtra utilizando una membrana de 0.22 µm tipo GV.

Verter la fase en el recipiente que corresponda a la fase móvil del HPLC.

##### **Acondicionamiento de columna**

Se programó un tiempo de 30 min. con 100% de H<sub>2</sub>O:ACN de fase móvil. Se acondicionó en un tiempo de 40 minutos, llegando a las condiciones de trabajo especificadas (0.7 mL/min y 65°C).

Al llegar a las condiciones de trabajo y/o al recambio de fase, el detector de IR debe ser purgado y ajustado a cero para eliminar el ruido en los cromatogramas que pudiese ser provocado por un ligero cambio en las concentraciones de la fase móvil

##### **Lavado de columna**

Este se realizó después de cada 25 muestras inyectadas para eluir compuestos existentes en la fase estacionaria afectando el tiempo de retención de los analitos.



Se programo un tiempo de 120 min. con una composición de fase móvil de 50% de H<sub>2</sub>O y 50% de ACN, disminuyendo el flujo y la temperatura gradualmente hasta llegar a un flujo de 0.1 mL/min y una temperatura de columna de 20 °C\*\*\* .

### **Estándares**

Se realizó un estándar de inulina, FOS, glucosa y fructosa (grado analítico) para conocer el tiempo de retención (tr) en la columna empleada para poder caracterizar cada pico en el cromatograma y posteriormente compararlos con la muestra.

### **Curva de calibración de inulina y FOS**

Preparación de solución Stock.

Se pesó 50 mg de inulina y 50 mg de FOS, se disolvió en 10 mL de agua desionizada caliente y se llevó a un volumen de 25 mL.

A partir de la solución stock se realizaron las disoluciones correspondientes para obtener concentraciones de 0.2 – 2 mg /mL.\*\*

### **Análisis de muestra en el HPLC**

Del extracto obtenido en la hidrólisis se tomaron dos mL de la muestra ya tratada y se pasaron por filtros de Nylon de 0.45 µm, recibiendo el filtrado a partir de la tercera gota en viales para HPLC.



Se colocaron los viales en el equipo inyectándose 100  $\mu\text{L}$  de la muestra por triplicado, utilizando una temperatura de columna de  $65^{\circ}\text{C}$ , un flujo de 0.7 mL/min, una fase móvil de  $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$  95:5.

Nota

- \* Después de un uso frecuente de la columna es apropiado calcular el número de platos teóricos para verificar su eficiencia (fase móvil  $\text{H}_2\text{O}$ , flujo de 1 mL/min, temperatura de columna  $80^{\circ}\text{C}$ , muestra 1% de glicerol y vol. De inyección 5  $\mu\text{L}$ ).
- \*\* Los reactivos deben ser previamente filtrados con el tipo de membrana correspondiente.
- \*\*\* A temperaturas altas, la columna no debe de permanecer sin flujo.

#### 4.7 Cálculos

Una vez obtenidos los cromatogramas de la curva patrón se integraron los picos empleando el software Empower 2.0 para obtener las áreas de respuesta y poder determinar la concentración de inulina y FOS en las muestras

El valor interpolado en la curva patrón esta dado en mg de inulina y FOS totales/mL. Para el calculo se considero el aforo, el peso de la muestra y se expreso en gramos de FOS totales/100g de muestra.

$$\text{Area} = [ ] \text{mg} / \text{mL}$$

Área = área del pico de interés

[ ] mg/mL = concentración obtenida a partir de la ecuación de regresión lineal

$$\% \text{ Inulina y FOS totales} = \frac{[ ] \text{g} / \text{mL} * 25 \text{mL}}{m} * 100$$



% Inulina y FOS totales = g de inulina y FOS/ 100g de la muestra seca

[ ] g/mL = concentración obtenida a partir de la ecuación de regresión lineal

25 mL = aforo empleado

m = g de la muestra

### **Validación de la metodología propuesta**

La validación del método propuesto se realizó para verificar su eficiencia tomando en cuenta los siguientes parámetros: precisión/adecuabilidad del sistema, linealidad del sistema, especificidad, exactitud y repetibilidad, linealidad del método, precisión del método (intermedia o tolerancia inter día/analista) en función de las características del análisis.

Los parámetros se describen en el anexo B sección 3.



## Capítulo 5

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Composición proximal

Se realizó la composición proximal de las trece especies de origen vegetal estudiadas con el objeto de obtener un perfil general y conocer la proporción de macronutrientes en las muestras.

#### **Bulbos**

Los bulbos comestibles poseen gran cantidad de hidratos de carbono que son empleados como reserva de energía y durante su desarrollo.

En la Tabla 5 se observa que los tres bulbos usados estos poseen un porcentaje de humedad variado, siendo *Allium cepa* y *Pachyrizus erosus* las que contiene un porcentaje mayor.

En cuanto a la proteína cruda y cenizas se encontraron contenidos bajos en las tres especies que se debe a la naturaleza de las muestras por ser órganos de almacenamiento de hidratos de carbono lo cual influye en la proporción de los macronutrientes.

La cantidad de extracto etéreo (grasa) es muy bajo como se esperaba debido a que este macronutriente es utilizado casi en su totalidad al inicio de su ciclo de vida.



Debido a la estructura física de los bulbos comestibles se encuentra una gran concentración de hidratos de carbono (celulosa, almidón, maltodextrinas, etc.), la cual se ve reflejado en la Tabla 5 donde se observa que éste es el componente mayoritario.

**Tabla No.5 Análisis proximal de las muestras (bulbos)<sup>a</sup>**

Nombre científico	Base Seca (g/100 g muestra)					
	Humedad	Proteína cruda	Extracto etéreo	Cenizas	Fibra dietética	Carbohidratos <sup>c</sup>
					total (%) <sup>b</sup>	
<i>Allium cepa</i>	92,22 ± 0,12	12,36 ± 0,36	0,66 ± 0,02	4,66 ± 0,01	10,44 ± 0,01	71,88
<i>Allium scaposum</i>	87,95 ± 0,025	10,53 ± 0,03	0,79 ± 0,02	6,42 ± 0,35	5,66 ± 4,7	76,6
<i>Pachyrhizus erosus</i>	92,05 ± 0,002	6,7 ± 0,02	0,46 ± 0,013	3,55 ± 0,02	29,05 ± 0,01	60,24

<sup>a</sup> Valor promedio ± desviación estándar de las determinaciones realizadas por triplicado (n=3)

<sup>b</sup> FDT en sustitución de Fibra cruda

<sup>c</sup> Dato obtenido por diferencia, de acuerdo al esquema Weede.

## Agaves

Las agaváceas crecen en zonas áridas y/o en zonas donde el fenómeno pluvial es escaso, por ende almacenan gran cantidad de agua para su sobrevivencia. En la Tabla 6 se observa un contenido de humedad alto en las pencas de las 10 especies estudiadas, que va de 76 – 96% dependiendo de la especie.

En cuanto a la proteína y extracto etéreo el contenido es bajo por ser estructuras de soporte que se componen en gran medida de hidratos de carbono complejos.

De las especies de pencas analizadas, la mayoría posee un porcentaje de cenizas bajo. Sin embargo *A. angustifolia* y *A. salmiana* tienen un contenido relativamente alto en comparación a las 8 especies restantes.



Los agaves poseen un alto contenido de hidratos de carbono y gran parte de ellos se acumulan en tallos y en las bases de las hojas como se observa en la tabla 6, donde van de un rango de 33 – 60% en base seca.

**Tabla No.6 Análisis proximal de las muestras (pencas de agave)<sup>a</sup>**

Nombre científico	Base Seca					
	Humedad	(g/100 g muestra)				
		Proteína cruda	Extracto etéreo	Cenizas	Fibra dietética	Hidratos de carbono <sup>c</sup>
total (%) <sup>b</sup>						
<i>Agave lechuguilla</i>	76,21 ± 0,17	2,37 ± 0,07	0,43 ± 0,01	6,99 ± 0,14	32,46 ± 0,91	57,75
<i>A. convallis</i>	89,88 ± 0,07	1,52 ± 0,02	0,47 ± 0,21	5,56 ± 0,06	59,06 ± 0,70	33,39
<i>A. angustifolia</i>	92,37 ± 0,05	2,15 ± 0,07	0,39 ± 0,14	10,19 ± 0,26	54,13 ± 0,89	33,14
<i>A. potatorum</i>	90,69 ± 0,01	1,88 ± 0,07	0,61 ± 0,11	2,92 ± 0,07	34,22 ± 0,56	60,37
<i>A. cupreata</i>	88,33 ± 0,01	3,03 ± 0,05	0,50 ± 0,27	5,72 ± 0,09	30,51 ± 0,83	60,24
<i>A. filifera</i>	86,34 ± 0,01	1,67 ± 0,02	0,45 ± 0,11	7,85 ± 0,39	41,68 ± 0,91	48,35
<i>A. tequilana</i>	92,07 ± 0,14	2,39 ± 0,02	0,45 ± 0,24	6,29 ± 0,11	48,12 ± 0,80	42,75
<i>A. victoriae-reginae</i>	87,71 ± 0,07	1,27 ± 0,07	0,43 ± 0,87	6,43 ± 0,02	36,12 ± 0,73	55,75
<i>A. salmiana</i>	93,02 ± 0,37	2,54 ± 0,03	0,87 ± 0,03	19,05 ± 0,44	44,11 ± 0,73	33,43
<i>A. celsii</i>	96,12 ± 0,04	2,89 ± 0,03	0,78 ± 0,08	6,82 ± 0,07	37,27 ± 0,70	52,24

<sup>a</sup> Valor promedio ± desviación estándar de las determinaciones realizadas por triplicado (n=3)

<sup>b</sup> FDT en sustitución de Fibra cruda

<sup>c</sup> Dato obtenido por diferencia, de acuerdo al esquema Weede.



## 5.2 Parámetros de validación de la metodología propuesta

*Tabla No. 7. Parámetros de validación de la metodología propuesta.*

Parámetros de validación		
Parámetro de desempeño (contenido/potencia/valoración)	Criterio de aceptación	Valores experimentales obtenidos
Presición del sistema	$c.v \leq 1.5 \%$	$c.v = 0.99 \%$
Adecuabilidad del sistema	$c.v \leq 2.0 \%$	$c.v = 1.45 \%$
Linealidad del sistema	$r^2 \geq 0.98$ , IC( $\beta_1$ ) no debe incluir cero La respuesta del método	$r^2 = 0.998$ , IC( $\beta_1$ )= 0.648 - 1.134
Especificidad	unicamente debe ser debido al análisis	aceptable
Exactitud/Repetibilidad	IC ( $\mu$ ) = 98-102% $c.v \leq 2\%$	IC ( $\mu$ ) = 98.363 - 101.08 $c.v = 1.2\%$
Linealidad del método	Porcentaje de recobro: IC ( $\mu$ ) = 98-102% $c.v \leq 2\%$	$86 \% \pm 1.01$ $c.v = 1.17\%$
Precisión del método o precisión intermedia	$c.v \leq 2\%$	$c.v = 1.7 \%$

IC = intervalo de confianza para la pendiente

$\mu$  = intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro

Para la mayoría de los casos, se cumple con los criterios de aceptación a excepción del porcentaje de recobro que tiene un valor promedio de 86% como se muestra en la Tabla No 7, esto puede atribuirse al tipo de oligofuctanos presentes en el estándar, ya que dependiendo del grado de polimerización (GP) las cadenas cortas se perdían durante el proceso, sin embargo los valores obtenidos para la exactitud y repetibilidad entran en el criterio de aceptación, lo que hace aceptable la metodología propuesta.

La precisión del método es adecuada porque además de cumplir con los parámetros establecidos para la validación de un método cromatográfico se



logró eliminar las interferencias provocadas por la complejidad y la variabilidad de las matrices logrando identificar el pico de inulina y FOS para cada muestra.

Las ventajas ofrecidas por la metodología propuesta además de criterios de validación confiables son: un tiempo de análisis relativamente corto, debido a que el tiempo de retención del analito de interés es menor a 20 minutos, esto ayuda a que la extracción y cuantificación se realicen el mismo día ya que en algunos casos la inulina y los FOS precipitaban junto con otros compuestos debido al almacenamiento a bajas temperaturas, aunque podía solucionarse con la resuspensión en agua caliente sin embargo, no se solubilizaba en su totalidad provocando una subestimación.

Los materiales son de fácil acceso, además de que la composición de la fase móvil no invierte gran cantidad de disolventes orgánicos.

Los parámetros de validación poseen coeficientes de variación bajos, lo que da la facilidad de extrapolar la metodología a otros analistas sin un incremento significativo en éstos, es decir seguir dentro del rango de aceptación.

### **5.3 Composición de FDT**

El análisis de FDT se realizó en sustitución a la fibra cruda, debido a que la primera semeja las condiciones del proceso de digestión en el ser humano porque se utilizan enzimas que están presentes en el tracto digestivo lo que permite simular el proceso de digestión debido a la selectividad de las enzimas,



mientras que la fibra cruda utiliza condiciones severas provocando una sobreestimación de fibra.

Se sabe que la inulina y los FOS forman parte de la FDT, sin embargo en algunos vegetales se demostró que estos oligofruktanos no están presentes en el contenido de macronutrientes. Como se observa en los datos que a continuación se muestran.

Los datos presentados en las siguientes tablas están expresados en base seca.

### Bulbos

En el caso de *Allium scaposum* se observa un contenido bajo de FDT y en *Pachyrhizuz erosus* el contenido es alto; sin embargo a pesar de las diferencias de concentración de FDT entre las tres muestras, se puede observar presencia de inulina y FOS en *Allium cepa* y en *Allium scaposum*.

**Tabla No. 8 Determinación de fibra dietética total y presencia de inulina y FOS<sup>a</sup>.**

<b>Nombre Científico</b>	<b>Base seca Fibra dietética total (%)</b>	<b>Inulina y FOS (cualitativamente)</b>
<i>Allium cepa</i>	10.44 ± 0.01	+
<i>Allium scaposum</i>	5.66 ± 4.7	+
<i>Pachyrhizuz erosus</i>	29.05 ± 0.01	-

<sup>a</sup> Valor promedio ± desviación estándar de la determinación realizada por cuadruplicado (n=4)

Nota: Para la identificación de los analítos se tomó en cuenta sólo un pico, debido a que los tr de inulina y FOS son similares.



## Agaves

En la Tabla No.8 Se observa que las pencas de agaves tienen gran contenido de FDT tal como se esperaba ya que la mayoría son utilizadas para la obtención de fibra y elaboración de productos derivados de ésta.

Se esperaría que hubiese una relación entre FDT, inulina y FOS, ya que al ser hidratos de carbono complejos estos siempre deben formar parte de la fibra, sin embargo se observa que en algunos casos la relación FDT y presencia de inulina y FOS no se cumple, es decir el hecho de que un material de origen vegetal contenga una concentración alta de FDT no implica que exista presencia de inulina y FOS como se muestra en la tabla número 9.

**Tabla No.9 Determinación de fibra dietética total y presencia de inulina y FOS<sup>a</sup>.**

Nombre Científico	Base seca	Inulina y FOS
	Fibra dietética total (%)	(cualitativamente)
<i>Agave lechuguilla</i>	32,46 ± 0,91	+
<i>A. convallis</i>	59,06 ± 0,70	+
<i>A. angustifolia</i>	54,13 ± 0,89	-
<i>A. potatorum</i>	34,22 ± 0,56	-
<i>A. cupreata</i>	30,51 ± 0,83	+
<i>A. filifera</i>	41,68 ± 0,91	-
<i>A. tequilana</i>	48,12 ± 0,80	-
<i>A. victoriae-reginae</i>	36,12 ± 0,73	+
<i>A. salmiana</i>	44,11 ± 0,73	+
<i>A. celsii</i>	37,27 ± 0,70	+

<sup>a</sup> Valor promedio ± desviación estándar de la determinación realizada por cuadruplicado (n=4)



#### 5.4 Contenido cuantitativo de inulina y FOS

Se analizó un estándar de inulina y uno de FOS, se observó que los tr eran similares y por ende la separación de los picos no se logró, por lo que se realizó una mezcla tomando un solo pico de referencia.

Los tiempos de retención obtenidos para la inulina y FOS, glucosa y fructosa se muestran en la Tabla No. 10

*Tabla No.10 Tiempos de retención de los estándares.*

<b>Analito</b>	<b>tr (min)</b>
Inulina y FOS	6.884
Glucosa	12.370
Fructosa	17.294

Los tr de los estándares obtenidos se deben al tipo de columna empleada (exclusión molecular e intercambio aniónico); es decir primero eluyen la inulina y los FOS por ser hidratos de carbono de alto peso molecular seguidos de los monosacáridos glucosa y fructosa. Estos tiempos nos permiten identificar los picos de interés presentes en las muestras tratadas.

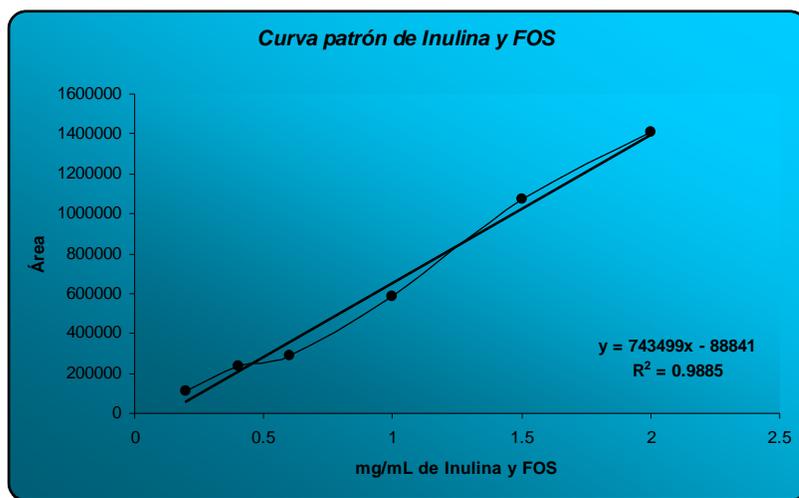


### 5.4.1 Curva patrón

Para la curva patrón se realizó una mezcla de inulina y FOS (50:50) y sus respectivas áreas se observan en la Tabla No.11.

*Tabla No.11. Concentraciones de la curva patrón*

Inulina y FOS (mg/mL)	Área
0.2	115001.50
0.4	236079.33
0.6	289066.67
1	584726.00
1.5	1070623.33
2	1409398.33



*Gráfica No. 2. Curva patrón de inulina y FOS*

La curva patrón no muestra una gran dispersión entre los puntos obtenidos y al realizar la regresión lineal se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.9885 lo que indica aceptabilidad para su uso.



### 5.4.2 Análisis cuantitativo de inulina y FOS en las muestras

De las trece muestras analizadas nueve de ellas contienen inulina y FOS en proporciones variadas, las cuales se muestran en la Tabla No. 12.

*Tabla No.12. Contenido porcentual de inulina y FOS.*

#### **Contenido porcentual de Inulina y FOS<sup>a</sup>**

<b>Nombre Científico</b>	<b>Inulina y FOS (%) Base Seca</b>
<i>Allium cepa</i> (cebolla blanca)	31.14 ± 4.77
<i>Allium scaposum</i> (cebollina blanca)	26.08 ± 0.17
<i>Agave lechuguilla</i>	1.45 ± 2.11
<i>A.cupreata</i>	1.24 ± 0.004
<i>A. convallis</i>	1.16 ± 0.01
<i>A. celsii</i>	1.13 ± 2.95
<i>A. salmiana</i>	0.62 ± 2.39
<i>A. victoriae-reginae</i>	0.57 ± 0.99
<b><i>Pachyrhizus erosus</i> (jícama)</b>	<b>0.49 ± 0.01</b>

<sup>a</sup> Los datos están expresados en base seca (n=3)

Nota. Ver cromatogramas en Anexo A.

Los cromatogramas de las muestras presentan picos anchos debido a la naturaleza de inulina y FOS presentes en cada matriz; es decir debido a la variabilidad de las muestras, estas contienen oligofructanos con diferentes grados de polimerización lo que genera tiempos de retención diferentes. Estas cadenas pueden eluir antes o después del estándar de inulina y FOS generando picos anchos.



La muestra con un contenido mayor de inulina y FOS es *Allium cepa* (31.14% base seca), el cual al tomar en cuenta el 86% de recobro es similar a la concentración reportada en la literatura (48% base seca).

*Allium cepa* y *Allium scaposum* poseen una concentración mayor al de la alcachofa (14-19% base seca) <sup>40</sup> la cual fue utilizada como parámetro de comparación debido a que es una de las plantas que mas se emplea para la extracción industrial de inulina y FOS.

Se ha reportado que la piña de agave contiene una gran concentración de inulina y FOS (16-25% base seca) <sup>40</sup> lo cual nos hacía suponer que en las pencas de agave se encontraría un porcentaje alto. Sin embargo, el bajo contenido puede atribuirse a que las pencas eran maduras, lo que nos hace suponer que la inulina y los FOS por ser hidratos de carbono de reserva pudieron haber sido utilizados durante su desarrollo, además de que las pencas son estructuras de soporte y no de reserva como es el caso de la piña de agave, en cuanto a las variedades de especies analizadas, se observa que el contenido de inulina y FOS oscila alrededor del 1%, este es un contenido bajo comparado con la referencia, sin embargo debido a que el porcentaje anual de pencas desechadas es muy alto (80 Kg de pencas/cosecha) se puede obtener una cantidad significativa de inulina y FOS extraídos que pueden ser empleados en diferentes productos.



## Capítulo 6

### CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados y el trabajo experimental realizado se concluye.

- En la caracterización de los macronutrientes en las plantas bulbosas el contenido de humedad es alto, *Allium cepa* es la que posee un alto porcentaje de proteína (12.36%) en base seca (BS), mientras que *Allium scaposum* presenta el mayor contenido de hidratos de carbono con un valor promedio de 76.6 % y el valor más alto de FDT lo tiene *Pachyrhizus erosus* con un valor de 29.05%, ambos en base seca.
- En la caracterización de las pencas de agave el contenido de humedad se encuentra entre un intervalo de 76-96 %. Los hidratos de carbono son altos (33-60 % en BS) y la FDT se encuentra en un intervalo de 30-59 % en BS, siendo *A.conavallis* la del mayor porcentaje, mientras que el resto de los macrocomponentes se encuentran en baja concentración.
- Del total de muestras analizadas cualitativamente para inulina y FOS se encontró que: *Allium cepa*, *Allium scaposum*, *Pachyrhizus erosus*, *A. lechuguilla*, *A. convallis*, *A.cupreata*, *A. victorea-reginae*, *A. salmiana* y *A. celsii* los contienen.



- En cuanto al análisis cuantitativo de inulina y FOS, las muestras vegetales que poseen el mayor contenido son *Allium cepa* (31.14% en BS) y *Allium scaposum* (26.08% en BS).
- En las pencas de agave el contenido de inulina y FOS oscila entre 1% siendo este un valor bajo, comparado con la concentración reportada en la piña de agave (16-25% en BS).<sup>16</sup>
- No existe relación entre la concentración de inulina y FOS/FDT, ya que un alto contenido de FDT no asegura la presencia de inulina y FOS.
- La metodología propuesta es aceptable a pesar de tener un porcentaje de recobro de 86% (inferior al criterio de aceptación) debido a que es exacta y reproducible.
- La ventaja de la metodología propuesta es la reducción de la cantidad empleada de muestra ya que la cuantificación de inulina y FOS se realiza a partir del extracto obtenido en el análisis de FDT.



---

---

## Capítulo 7

### Recomendaciones

Debido a la eficiencia de la metodología, puede emplearse para el análisis de otras muestras sin importar la variabilidad en su composición en especial en matrices alimenticias.

Por la escasa concentración encontrada de inulina y FOS en las pencas de agave, podría utilizarse la piña de agave para la extracción y cuantificación de inulina y FOS utilizando la metodología propuesta, ya que se reporta en la literatura gran concentración de oligofructanos en esta matriz.

La cebolla puede ser una nueva fuente de extracción de inulina y FOS debido a su alto contenido y por su fácil adquisición.



---

---

## BIBLIOGRAFÍA

1. Voragen, A.G.J.(1998). Technological aspects of functional food-related carbohydrates. Trends in Food Science & Technology 9, 328-335.
2. Kaur, N., & Gupta, A. K. (2002) Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. Journal of Biosciences. 27: 703-714.
3. Younes, H., Demigné, C., & Rémésy, C. (1996) Acidic fermentation in the caecum increases absorption of calcium and magnesium in the large intestine of the rat. British Journal of Nutrition. 75, 301-314.
4. Yun, J. W.(1996). Fructooligosaccharides – occurrence, preparation and application. Enzyme and Microbial Technology. 19, 107-117.
5. Cummings, J. H. & Englyst, H. N. (1995) Gastrointestinal effects of food carbohydrate. American Journal of Clinical Nutrition. 61: 938S-945S.
6. Sako, T., Matsumoto, K., Tanaka, R., (1999) Recent progress on research applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. Physiology of Human Nutrition. 09: 69-80.
7. López, M. D., Navarro M. Ma., Rojas M. F. (2005). Molecular properties effect of inulin obtained from artichoke (Cynara scolymus L) Phytochemistry. 66:1476-1484.
8. Carpita, N.C., Kanabus, J., & Housley, T.L. (1989). Linkage structure of fiuctans and fiuctan oligomers from Triticum aestivum and Festuca arundinacea leaves. Journal of Plant Physiology.134:162-168.



9. French, A.D. (1989). Chemical and physical properties of fructans. Journal Plant Physiology. 134:125-136.
10. Gott, B. (1984) Murnong - A victorian staple food: some nutritional implications. Archaeology at ANZAAS.111-114.
11. Marchetti, G. (1993). Chicory (Cichorium intybus) and Jerusalem artichoke (Helianthus tuberoses L.) as inulin sources. L 'Industria Saccarfera Italiana 86; (2) 47-54.
12. Meijer, W. J. M., Mathijssen, E. W. J. & Borm, G. E. L. (1996) Crop characteristics and inulin production of Jerusalem artichoke and chicory in inulin and Inulin containing crops studies in plant science. Industrial Crops and Products 5: 253-264.
13. Van Loo, J., Coussement, P., Leenheer, L., Hoebregs H., & Smits, G. (1995) On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. Critical Review in Food Science Nutrition 35(6):525-552.
14. Jenkins, J.A, Kendall, W.C, Vuksan, V. (1999). Inulin, Oligofructose and Intestinal Function. Journal of Nutrition. 129: 1431S-1433S.
15. Prosky, L., Hoebregs, H. (1999). Methods to Determinate Food Inulin and Oligofructose. Journal of. Nutrition. 129: 1418S-1423S.



16. Madrigal L & Sangronis E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales Universidad Simón Bolívar. Departamento de procesos biológicos y bioquímicos, Caracas Venezuela.
17. Helrich, K.(1995). Official Methods of Analysis of AOAC International, 16<sup>th</sup> edition, Association of Official Analytical Chemist, Arlington, Volume II, pp. 70-71.
18. Schneeman, O. B. (1999). Fiber, inulin and oligofructose: Similarities and Differences. British Journal of Nutrition. 129: 1424S-1427S.
19. Cherbut, C. (2002). Inulin and oligofructose in the dietary fibre concept. British Journal of Nutrition. 87: S59-S162.
20. Castañeda M.D., Ph. D. (2007) Oligosacaridos en formulas infantiles. NeoLac. ISSN 0001-6640, Vol.65 N°4: pp. 175-178.
21. Castillo, M.D., Olano,A. (2005). ANS. Alimentación, nutrición y salud, ISSN 1136-4815, Vol. 12, N°. 2,pp. 82-90.
22. Gibson, G.R. (1995). Inulina: Un prebiótico Natural. Biochemistry and Physiology of Bifidobacteria; Gastroenterology 108: 975-982 DVA Group.
23. Mussatto, S.I, Mancilha,I.M (2006). Non-digestible oligosaccharides: A review, Carbohydrate Polymers, 68:587-597.
24. Aswell M. (2004). Conceptos sobre Alimentos Funcionales. Edición en Español. Washington, USA: International Life Science Institute Press; pp. 48.



25. Franck A. (2006). Inulin in Food Polysaccharides and Their Applications. Stephen A. (Editor). Second Edition. Nueva York, USA: Marcel Dekker; pp.733.
26. Niness, R.K. (1999). Inulin and Oligofructose: What are they? Journal of Nutrition 129: 1402S-1406S.
27. Milner J. (1999). Functional foods and health promotion. Journal of Nutrition; 129: 1395-1397.
28. Silveira M, Monereo S, Molina B (2003). Alimentos funcionales y nutrición óptima. ¿Cerca o lejos?. Revista Española de Salud Pública 77; 317-331.
29. Quemener, B. (1994). Determination of inulin and oligofructose in food products, and integration in the AOAC Method for measurement of total dietary fibre. Lebensm-Wiss. Technology, 27,125-132.
30. Brewster, J.L. (2001) Las cebollas y otras Alliums. Editorial Acribia S.A., Zaragoza (España) pp 2-18.
31. Infojardin (Octubre 2008) <http://foroantiguo.infojardin.com> Jelsost enterprises Ltd. Buscador Google.
32. Howard, S.G. (1982) Agaves of continental north America. Editorial. Arizona, U.S.A. pp.154-609
33. Nobel, P. S. (1998) Los incomparables agaves y cactus Editorial Trillas, México ,D.F. pp 37-58.
34. Voet,D. (1992.) Bioquímica, Ediciones Omega, S.A.. Plato 26, Barcelona. pp.81, 276-277.



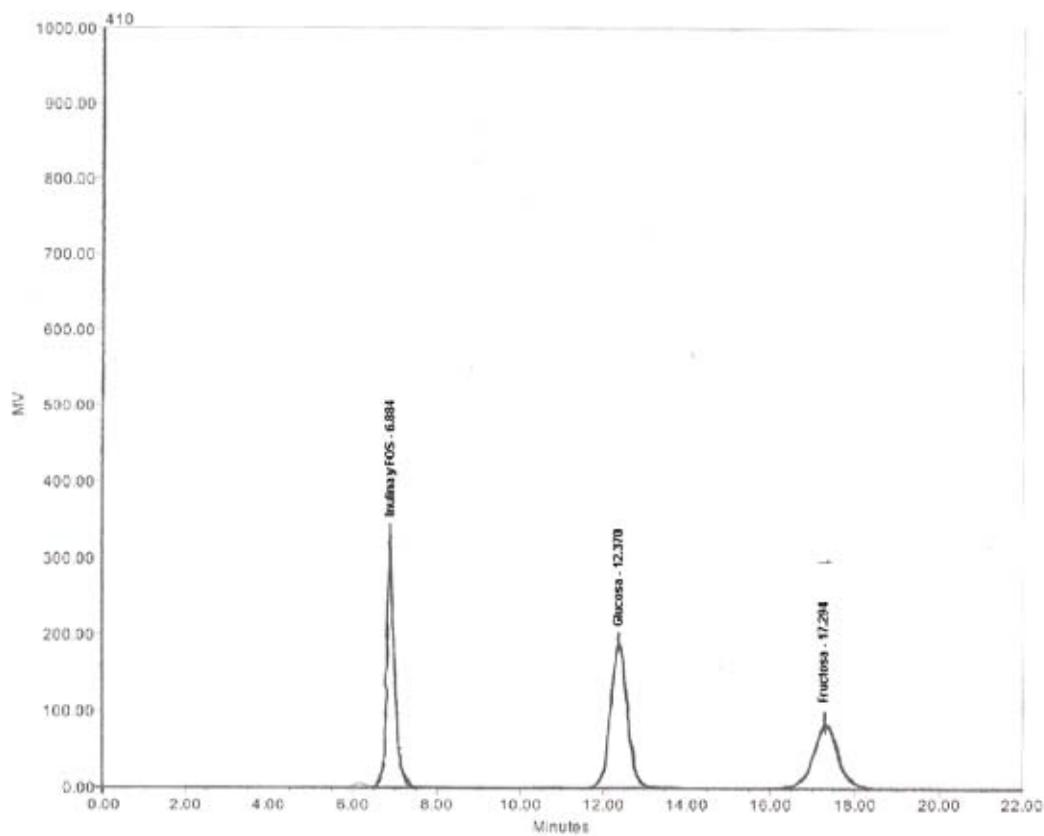
35. Braithwaite A., Smith F.J. (1994)., Chromatographic methods. Editorial Chapman and Hall, London, pp. 212-228.
36. Rubinson, K. A. & Rubinson, J. F. (2001). Análisis instrumental. Editorial Prentice Hall, Madrid (España), pp. 635-675.
37. Garcia Ma. A.(2002),Guía de validación de métodos analíticos. Editorial. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, México A.C.
38. Helrich, K. (1990). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15<sup>th</sup> edition, Published by AOAC, Inc. Vol. I, pp. 17,18,40-62, 69-83, Vol. II, pp 1012, Arlington.
39. Helrich, K (1995)., Official Methods of Analysis of AOAC International, 16<sup>th</sup> edition, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Volume I, pp.7.
40. Lingyum W. Jianhua W.(2006). Studies on the extracting technical conditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers, Journal of Engineering. 79:1087-1093.



## Anexo A

### Cromatogramas

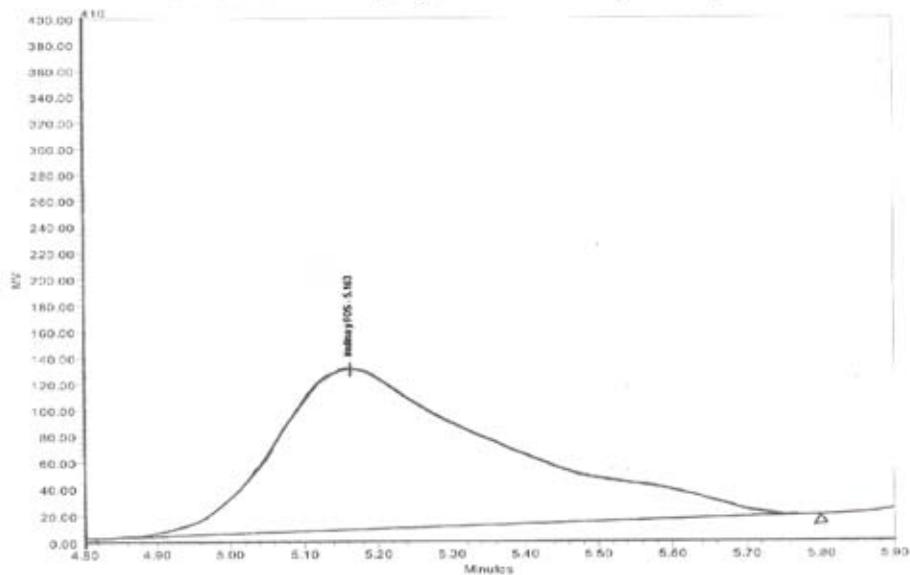
#### *Estándares*



<b>Analito</b>	<b>tr (min)</b>
<b>Inulina y FOS</b>	<b>6.884</b>
<b>Glucosa</b>	<b>12.37</b>
<b>Fructosa</b>	<b>17.294</b>

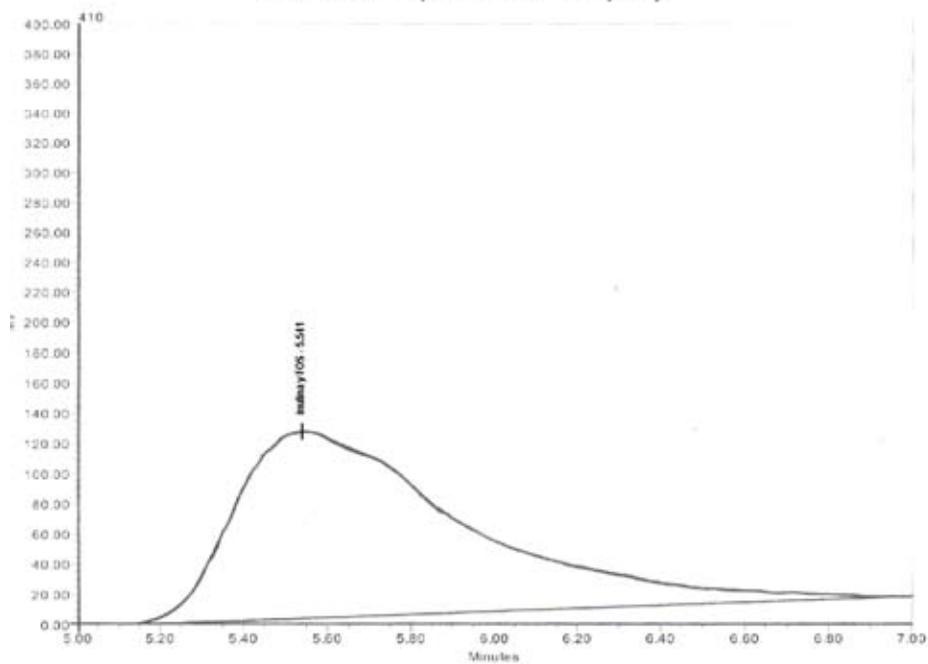


### Alcachofa (*Cynara scolymus*)



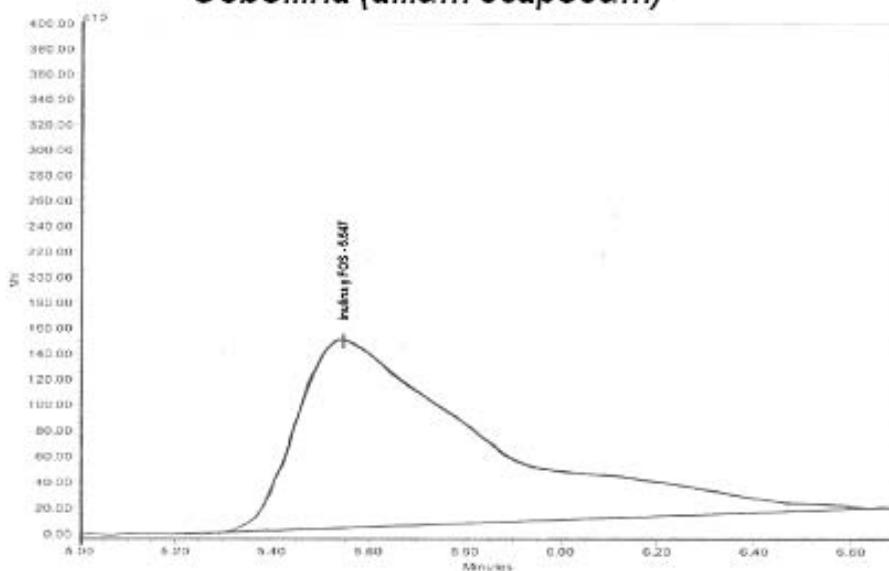
Muestra	tr (min)	Área (prom)
<i>Cynara scolymus</i>	5.163	313639.66
<i>Allium cepa</i>	5.541	4454836.00

### Cebolla (*Allium cepa*)



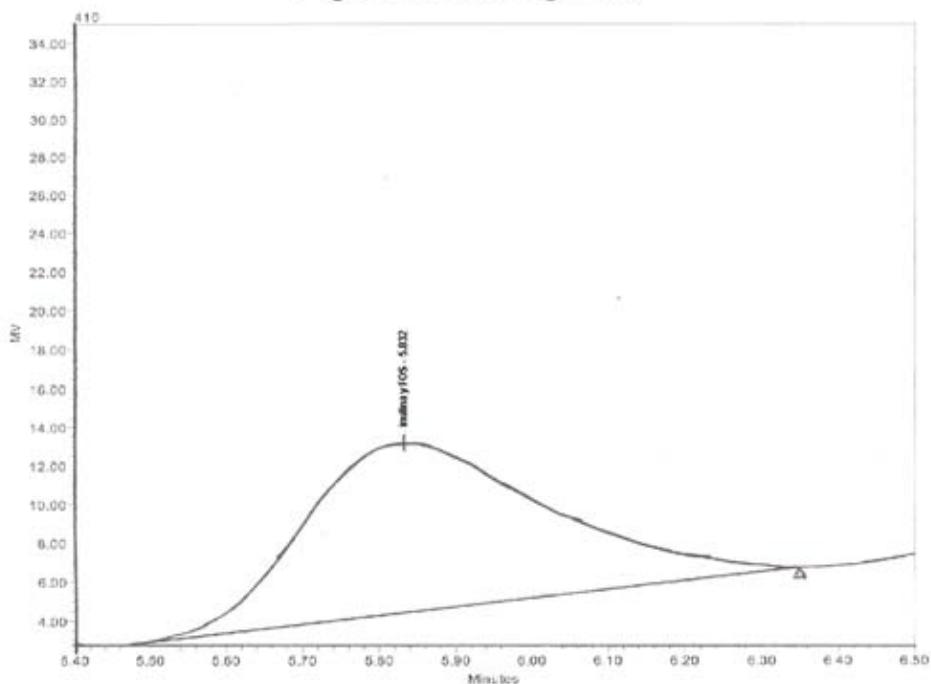


### Cebollina (*allium scaposum*)



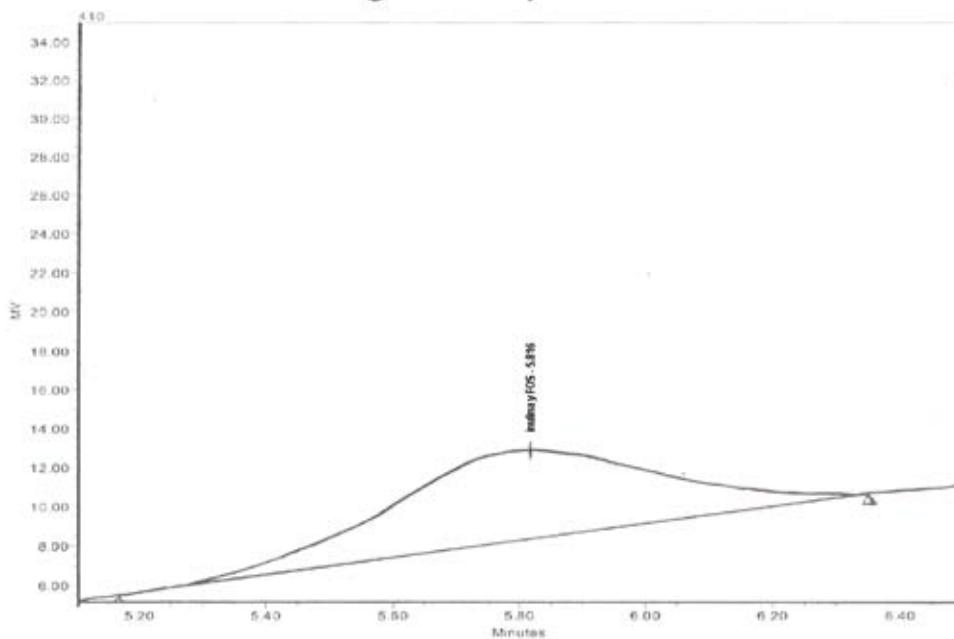
Muestra	tr (min)	Área (prom)
<i>Allium scaposum</i>	5.547	4433867.00
<i>A. lechuguilla</i>	5.832	195231.66

### Agave lechuguilla



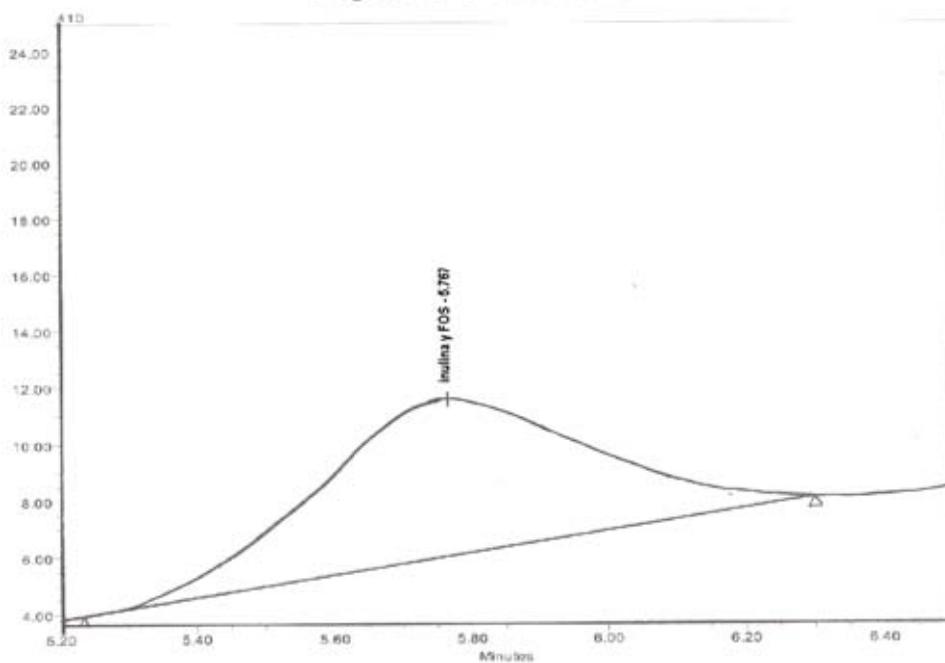


### Agave cupreata



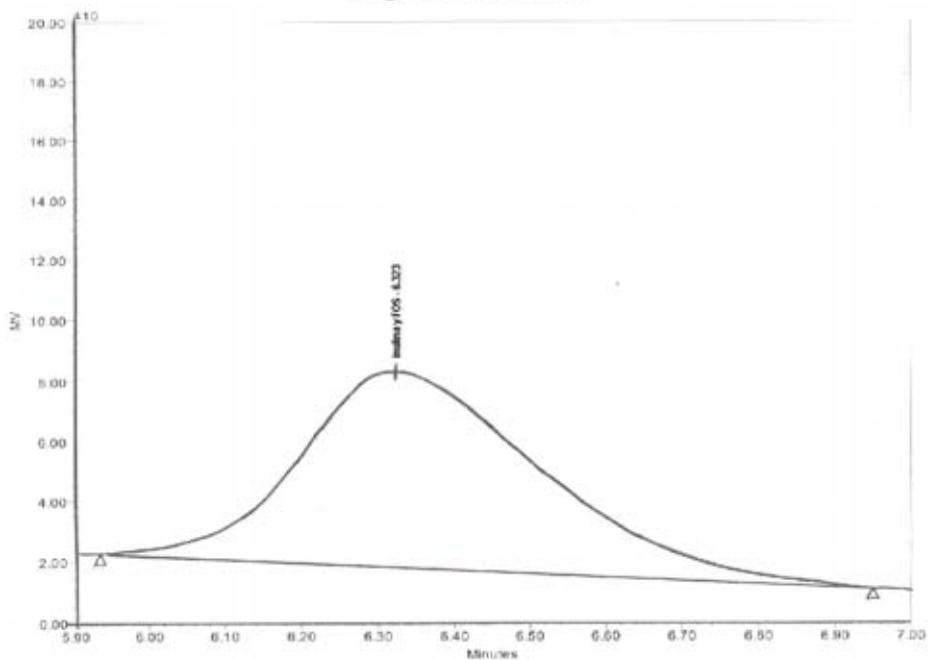
Muestra	tr (min)	Área (prom)
<i>A. cupreata</i>	5.816	164057.33
<i>A. convallis</i>	5.777	152936.33

### Agave convallis



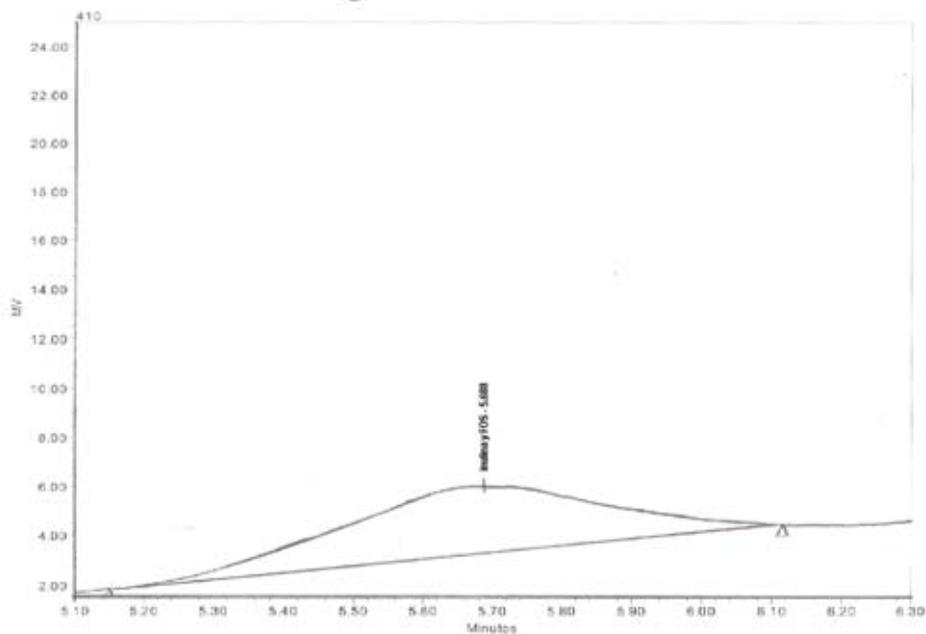


### Agave celsii



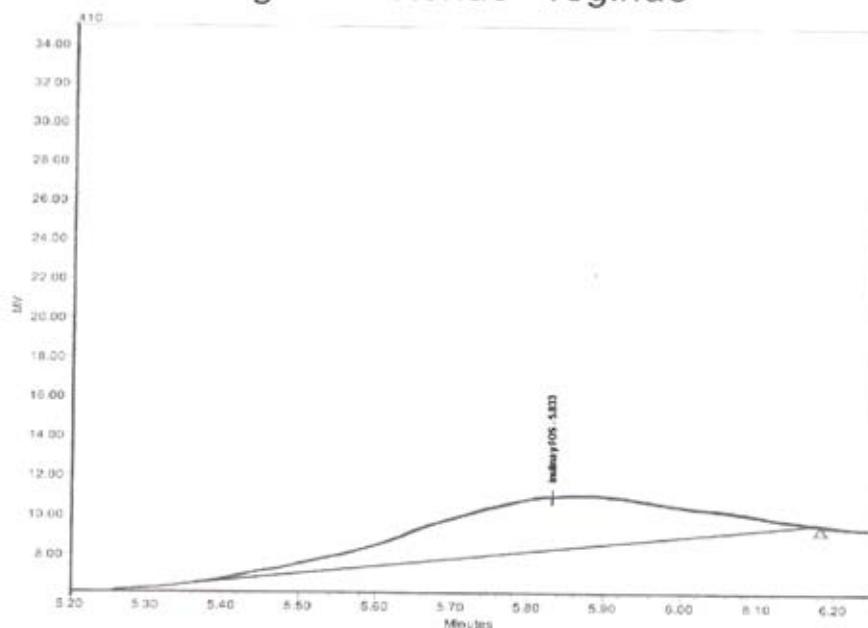
Muestra	tr (min)	Área (prom)
<i>A. celsii</i>	6.323	148647.25
<i>A. salmiana</i>	6.688	76638.00

### Agave salmiana



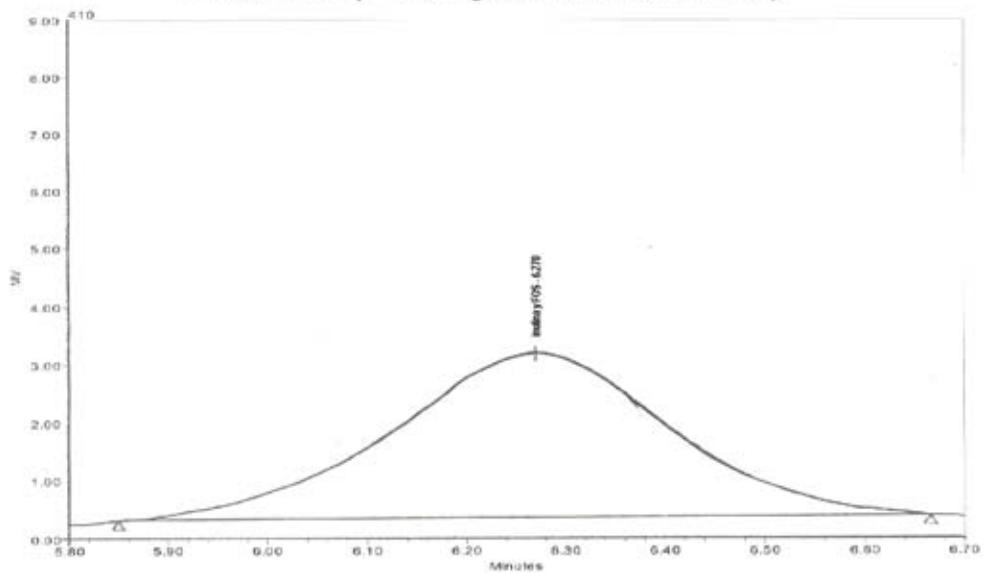


### Agave victoriae - reginae



Muestra	tr (min)	Área (prom)
<i>A. victoriae-reginae</i>	5.833	69176.40
<i>Pachyrizus erosus</i>	6.270	57615.00

### Jícama (*Pachyrhizus erosus*)





---

---

## ANEXO B

### Sección 1

#### Acondicionamiento del material biológico

##### Material y reactivos

- Estufa con temperatura controlada y aireación Lab-line Imperial 3.
- Balanza analítica y/o granataria.
- Molino de cuchillas de acero inoxidable Thomas-While Modelo 4.

##### Procedimiento

- Se pesó la muestra en balanza granataria.
- Se colocó la muestra en la estufa de temperatura controlada (50-55°C) y una adecuada aireación y se dejó ahí toda la noche para que se evaporara la mayor cantidad de agua posible.
- Una vez seca la muestra, se procedió a pesarla en la balanza granataria y posteriormente se molieron los trozos secos en un molino de acero inoxidable haciendo pasar la muestra molida por una malla de 0.5 mm para obtener una harina la cual se homogenizó y se almacenó en recipientes de plástico a temperatura ambiente en un lugar fresco y seco.



## Sección 2

### Análisis Químico Proximal

La determinación de humedad<sup>934.01</sup>, proteína<sup>976.05</sup>, grasa<sup>920.39</sup> y cenizas<sup>942.05</sup> fueron realizadas de acuerdo al AOAC.<sup>17,39</sup>

### Determinación de Fibra Dietética Total (FDT)

El interés por el consumo de fibra, ha sido relacionado a la ausencia de fibra en la dieta con las enfermedades crónicas como son: estreñimiento, diverticulitis y cáncer de colón. La fibra dietética induce efectos fisiológicos que dependen de las propiedades físicas y químicas de sus componentes individuales, estos efectos inducen el aumento de la masa fecal, el descenso de los niveles de colesterol del plasma. De ahí la importancia de reconocer a la fibra como componente principal de la dieta y de su nutrición en diversas matrices alimentarias.

### Fundamento

En este ensayo se midió el contenido de fibra dietética de los alimentos usando una combinación de métodos enzimáticos y gravimétricos. Las muestras de alimentos secas y libres de grasa fueron gelatinizadas con  $\alpha$ -amilasa estable al calor, posteriormente fueron digeridas enzimáticamente con proteasas y amiloglucosidasa para eliminar la proteína y almidón presente en la muestra. Para precipitar la fibra dietética soluble se adicionó etanol. Los residuos obtenidos se filtraron y lavaron con etanol y acetona. Después de secarlos, los



residuos se pesaron. En la mitad de las muestras se midió la proteína y las otras fueron calcinadas a cenizas. La fibra dietética se obtuvo restando al peso del residuo, el peso de la proteína y el de las cenizas.

### Material/Reactivos

- Kit Total Dietary Fiber Assay (SIGMA TDF-100A). Contiene reactivos para realizar 200 determinaciones.
  1.  $\alpha$ -amilasa, estable al calor (10mL); (Sigma A 3306).
  2. Proteasa de *Bacillus licheniformis* (500mg); (Sigma P 3910).
  3. Amiloglucosidasa de *Aspergillus Níger* (50g); (Sigma A 9913).
  4. Celita <sup>TM</sup>, lavada con ácido (50g) ; (Sigma C 8656).
- Kit Total Dietary Fiber Assay Control (SIGMA TDF-C10). Cada frasco contiene reactivos para aproximadamente 10 análisis.
  1. Arabinogalactana (1g); (Sigma A 9788).
  2. Caseína (5g); (Sigma 7906).
  3.  $\beta$ -Glucano (1g); (Sigma G 7391).
  4. Pectina (1g); (Sigma P 7536).
  5. Almidón de maíz (10g); (Sigma S 2388).
  6. Almidón de trigo (10g); (Sigma S 1514).
- Éter de petróleo, reactivo analítico.
- Alcohol etílico, reactivo analítico.
- Acetona, reactivo ASC.
- Fosfato de sodio dibásico anhidro, reactivo analítico.



- Fosfato de sodio monobásico anhidro, reactivo analítico.
- Hidróxido de sodio, 1.0 N.
- Ácido clorhídrico, 1.0 N.

### **Material/Equipo**

- Crisol Gooch: Porosidad #2 (grueso 40-60 micrones).
- Fuente de vacío. Con trampa para prevenir la contaminación en caso de que se pase líquido.
- Horno a 105°C o un horno con vacío a 70°C.
- Desecador.
- Mufla THERMOLYNE, mod. 1500.
- Baño de agua hirviendo.
- Baño de agua a temperatura constante (60°C) que proporcione agitación a los vasos de digestión durante la hidrólisis enzimática.
- Vasos de precipitados KIMAX de: 100, 400 y 600 mL de forma alta.
- Balanza analítica capaz de pesar hasta 0.1mg.
- Potenciómetro: Estandarizado a pH 4.0 y pH 7.0.
- Matraces kitasato de 1000 mL.
- Alargadera de hule para crisol Gooch.
- Barras magnéticas 22x8 mm.
- Pipeta automática de 50-200  $\mu$ L.
- Termómetro (-10 a 100°C).



---

---

## **Procedimiento**

Se usó un blanco de cada muestra a lo largo de todo el procedimiento para corregir cualquier contribución de los reactivos. A las muestras y blancos que se les determinó el contenido de fibra dietética se les realizó un cuádruplicado para tener duplicados de proteína y cenizas.

### Preparación de los crisoles

Se lavaron los crisoles, se secaron, se remojaron y se volvieron a enjuagar con agua y se secaron, posteriormente se colocaron en la mufla a 450°C hasta peso constante. Se agregó 0.5g de Celita a cada crisol y se colocaron en la estufa a 130°C hasta obtener un peso constante (una hora o más), este peso se registró como “Celita + Peso del crisol o P<sub>1</sub>” y se conservaron en el desecador hasta utilizarlos.

### Preparación de las muestras

Primero se secó y molió con una malla de 0.3-0.5 mm y se desengrasó la muestra.

## **Determinación de fibra dietética**

### Hidrólisis enzimática

Se pesó un cuádruplicado de la muestra de 0.5g de cada material por analizar y se colocó en un vaso de precipitado de 100 mL de forma alta y se registraron los pesos.



Se agregó, a cada vaso 25 mL de amortiguador de fosfatos pH 6.0, 0.05 mL de  $\alpha$ -amilasa (Clave A 3306) a cada vaso y se mezcló muy bien, se cubrió cada vaso con papel aluminio y se colocó en un baño de agua hirviendo agitando suavemente los vasos a intervalos de 5 minutos posteriormente se incubó por 15 minutos después de que la temperatura de los vasos alcanzó los 95°C.

Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se ajustó el pH de las soluciones a  $7.5 \pm 0.2$  agregando hidróxido de sodio 0.275 N a cada vaso. Inmediatamente se preparó una solución de proteasa (Clave P 3910) de 25 mg/mL en amortiguador de fosfatos pH 6.0 y se pipeteó 0.1 mL (2.5 mg de proteasa) dentro de cada vaso.

Se cubrió cada vaso con papel aluminio y se colocó en un baño de agua con agitación continua a 60°C, para incubar por 30 minutos después de que la temperatura en las soluciones alcanzó los 60°C.

Se enfriaron las soluciones a temperatura ambiente y se ajustó nuevamente el pH de las soluciones a un pH de 4.0-4.6 agregando HCl 0.325N a cada vaso e inmediatamente se agregó 0.05 mL de amiloglucosidasa (Clave A 9913) a cada vaso. Los vasos se cubrieron con papel aluminio nuevamente y se pusieron en un baño de agua con agitación continua a 60°C para ser incubados por 30 minutos después de que la temperatura en las soluciones alcanzó los 60°C.

Posteriormente se dejaron enfriar los vasos y se trasvasaron cuantitativamente las muestras a un matraz con la ayuda de 125 mL de etanol al 95% a cada vaso



y se dejó reposar durante toda la noche a temperatura ambiente para permitir la precipitación completa.

### Filtración

Se montó un sistema de filtración al vacío para cada crisol Gooch. Humedeciendo y redistribuyendo la cama de Celita en cada crisol usando etanol al 78%, se aplicó succión suave para atraer la Celita al filtro y formar una superficie lisa, manteniendo la succión suave se pasó cuantitativamente el precipitado y suspensión de cada uno de los vasos a sus respectivos crisoles.

Se lavó el residuo con tres porciones de 10 mL de etanol al 78%, dos porciones de etanol al 95% y dos porciones de 5 mL de acetona.

Posteriormente se secaron los crisoles durante la noche en una estufa con aire a 105°C, después se enfriaron en un desecador y se pesaron hasta que el peso se mantuvo constante, este peso se registro como “Residuo + Celita + Peso del crisol” o P<sub>2</sub>.

### Determinación de proteína

Con ayuda de una espátula se sacó el residuo + Celita de cada crisol, se pesó, molió en un mortero y se pesó de ese polvo por duplicado 100 mg para hacer la determinación de proteína y con éste dato se calculó el contenido de proteína en el residuo de cada crisol junto con los dos blancos por medio del método de Kjeldahl, como se especifica en el procedimiento del AOAC<sup>5</sup>.

Nota: Se usó el factor de 6.25 para convertir el nitrógeno medido en el análisis.



## Cálculos

Contenido de proteína

$$\% N = \frac{(V_m - V_b) * meq * NHCL}{m} * 100$$

$$\% P = \% N * F$$

Donde:

% N = porcentaje de nitrógeno (g N/100g de muestra).

% P = porcentaje de proteína (g de proteína/100g de polvo).

V<sub>m</sub> = volumen de HCl gastado en la titulación de la muestra.

V<sub>b</sub> = volumen en HCl gastado en la titulación del blanco.

Meq = miliequivalentes del N (peso molecular/1000 = 0.014).

N<sub>HCl</sub> = normalidad de la solución valorada de HCl.

m = g de la muestra utilizada en la determinación.

F = factor de conversión a proteína 6.25.

$$P = \frac{(R + Celita) * \% P}{100}$$

Donde:

P = g de proteína en el crisol.



(R + Celita) = g de residuo + celita del crisol.

% P = porcentaje de proteína (g proteína / 100g de polvo).

### Determinación de cenizas

De los dos crisoles restantes de las muestras y de los blancos, se calcinó el residuo a 450°C hasta peso constante y se registró este peso como “cenizas + Celita + peso del crisol” o P<sub>3</sub>.

### **Cálculos**

Contenido de fibra dietética total

$$\% FDT = \frac{R - P - C - B}{pm} * 100$$

B = R blanco – P blanco – C blanco.

Donde:

FDT = fibra dietética total.

R = peso del residuo que corresponde a la definición de P<sub>2</sub> – P<sub>1</sub> (mg).

P = peso de proteína en el crisol (mg).

C = peso de cenizas en el crisol (mg) o (P<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>).

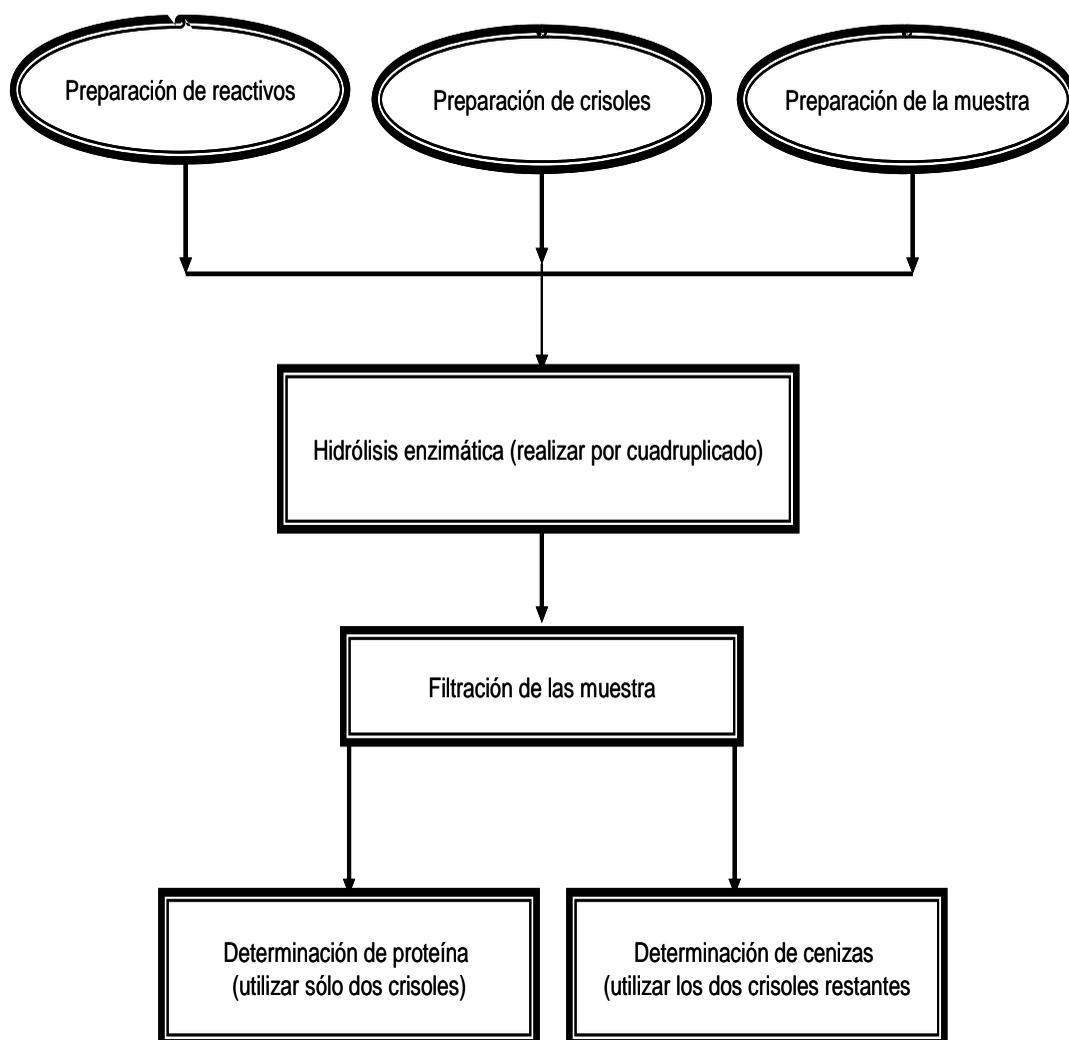
pm = peso de la muestra (mg).



Resultados

De los valores del % de FDT de cada uno de los cuadruplicados se reportó el promedio  $\pm$  desviación estándar y coeficiente de variación de cada muestra.

Diagrama general para la determinación de fibra dietética total.





---

---

## Sección 3

### Validación del método analítico

#### Linealidad

La linealidad es la proporcionalidad que existe entre la concentración de un analito y la respuesta (directa u obtenida por medio de transformaciones matemáticas definidas) que genera. Se utiliza el modelo de la ecuación de la línea recta ( $Y = mx + b$ ) para su evaluación. También se evalúa el intervalo dentro del cual se cumple dicha proporcionalidad.

Existe la posibilidad de que la proporcionalidad buscada no sea descrita por un modelo lineal. Pueden utilizarse otros modelos matemáticos que permitan obtener la proporcionalidad entre la respuesta generada y la concentración de un analito dado, siempre que sean cubiertos los requisitos específicos para el modelo encontrado.

La linealidad del sistema es la proporcionalidad del análisis de estándares de referencia en el sistema de cuantificación. Permite obtener curvas de calibración que relacionan la respuesta que genera el analito (Y) en una metodología dada, con la concentración de soluciones estándar del analito (x). Las curvas de calibración se preparan con al menos 5 niveles de concentración del estándar, cada nivel, al menos por triplicado.

La ecuación que describe la tendencia se obtiene por el método de cuadrados mínimos, donde se obtiene el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), pendiente (m) y



ordenada al origen (b); además se estima el intervalo de confianza de la pendiente. El coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.98 para considerar adecuado el modelo lineal; el intervalo de confianza para la ordenada al origen, si éste incluye el cero, se considera que es adecuado analizar muestras comparando su respuesta contra la respuesta generada por un estándar en un solo nivel de concentración, es decir, sin necesidad de una curva de calibración para cada análisis.

La linealidad del método es el comportamiento entre la concentración del compuesto de interés, en la muestra, y la respuesta obtenida, descrito mediante la ecuación de la línea recta. En este punto debe abarcar la metodología involucrada en la preparación de la muestra, dentro de un intervalo dinámico de trabajo y después de haber preparado la muestra de modo conveniente para el análisis. Se utilizan al menos tres niveles de concentración.

Existen dos formas de evaluar la linealidad del método:

Cuando se conoce la totalidad de los componentes de la matriz donde se encuentra el analito, se prepara un placebo y se adiciona, en tres niveles de concentración, el analito a cuantificar, el análisis se hace por triplicado.

Cuando no se conocen los componentes de la matriz, se utiliza la muestra misma como matriz; sin adicionar y adicionado tres niveles más de concentración, cada uno por triplicado. En cada nivel, se mantiene constante la cantidad de muestra utilizada, con la finalidad de restar este resultado de las muestras adicionadas. Cuando no es posible adicionar de manera directa el



analito a la muestra, la adición se hace en alguna de las primeras etapas del método, para lograr asegurar que las etapas posteriores no dan lugar a resultados incorrectos.

Los niveles de adición se realizan considerando que los resultados obtenidos estarán dentro del intervalo de linealidad del sistema. Se utiliza como referencia la misma sustancia adicionada. La metodología de la cuantificación debe ser realizada por el mismo analista y bajo las mismas condiciones.

En ambos casos, se reporta la cantidad recuperada (Y) en función de la cantidad adicionada (x). También se utiliza el método de cuadrados mínimos para calcular la pendiente (m), ordenada al origen (b) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ). Se estiman también, los intervalos de confianza para la pendiente y la ordenada al origen, además del coeficiente de variación de la regresión. El coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.98 para considerar que el modelo lineal es adecuado; el intervalo de confianza de la pendiente debe incluir el cero. Si no ocurre así, es posible utilizar los modelos obtenidos para encontrar factores de ajuste que permitan llevar los valores encontrados en el análisis de muestras al valor real.

### **Exactitud**

Se define como la concordancia entre un valor obtenido, empleando el método, y el valor de referencia. Se expresa de dos maneras:



A. Se conocen los componentes de la muestra y es posible preparar un placebo analítico.

B. No se conocen los componentes de la muestra.

Se determina la cantidad recuperada del analito y se expresa como el porcentaje de recobro del análisis de muestras o placebos adicionados (cantidad cuantificada / cantidad adicionada x 100). El intervalo de confianza del promedio de recobro debe incluir el 100 % o, el promedio aritmético, de al menos seis determinaciones, de la recuperación debe estar incluido dentro de un intervalo dado en función del tipo de análisis que se realiza.

Si el método lo permite y se cuenta con justificación para ello, se pueden utilizar factores de corrección cuando no se alcance el 100 % de recobro utilizando el método que se está validando.

Cuando se hace la evaluación de la linealidad del método, puede determinarse simultáneamente la exactitud del método, pues en la evaluación de cada nivel de concentración adicionado, se determina la cantidad de muestra recuperada.

### **Precisión**

Es el grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra a referencia homogéneos. Se expresa matemáticamente como la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (%C.V): (desviación estándar muestral / media aritmética) x 100.



Este punto incluye la precisión y adecuabilidad del sistema y la precisión del método.

La evaluación de adecuabilidad permite encontrar el error en el análisis debido únicamente al equipo. Se examina seis veces una sola muestra, empleando las mismas condiciones en el análisis.

La precisión del sistema se determina a partir del análisis de una solución a un solo nivel de concentración, por sextuplicado.

La precisión del método (o precisión intermedia) se obtiene del análisis por triplicado de una muestra homogénea o sustancia de referencia en dos días diferentes y por dos analistas diferentes.

### **Repetibilidad / Reproducibilidad.**

La repetibilidad es la precisión expresada como la concordancia entre las determinaciones independientes, aplicando el método desarrollado, realizadas bajo las mismas condiciones (muestra, analista, tiempo, aparato, condiciones, etc.). La reproducibilidad también se refiere a precisión, pero expresada en términos de determinaciones independientes, realizadas en condiciones diferentes (analista, laboratorio, equipo, etc.), analizando una misma muestra. La desviación estándar relativa es la forma de evaluar la reproducibilidad y repetibilidad.