



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO FITOQUÍMICO DE
Eriobotrya Japonica (níspero)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

OFELIA ALVAREZ JUÁREZ



MÉXICO, DF.

2010



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: Dra. Yolanda Caballero Arroyo

VOCAL: M. A.O. Rosa Luz Cornejo Rojas

SECRETARIO: Q. Katia Solórzano Maldonado

1er. SUPLENTE: M.C. Nayeli López Balbiaux

2° SUPLENTE: Dr. Eduardo Arturo Vázquez López

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 2B EDIFICIO A
FACULTAD DE QUIMICA. UNAM

ASESOR DEL TEMA:

DRA. YOLANDA CABALLERO ARROYO

SUSTENTANTE (S):

OFELIA ALVAREZ JUAREZ



Agradecimientos

Al jurado asignado para la revisión de este trabajo

A la Dra. Yolanda Caballero Arroyo por la dedicación en este trabajo, por su paciencia al realizar la revisión, por haberme brindado sus conocimientos, por permitirme haber sido parte de su equipo de trabajo, pero sobre todo por haberme brindado su confianza y su amistad. Dios la cuide y la bendiga siempre.

A la M.A.O Rosa Luz Cornejo Rojas por su dedicación en la revisión de este trabajo, por sus consejos y por ser una maravillosa persona y profesionista.

A la Q. Katia Solórzano Maldonado por su valiosa revisión en este trabajo, por su amistad, por ser una persona que siempre tenía para mí una sonrisa, gracias Mtra. Katy.

Al Dr. Bob Johnson por guiarme en este camino, por su paciencia en escuchar mis aciertos así como mis errores, por sus consejos que nunca echare de menos, por su apoyo y amistad. Gracias.

A la Dra. Ma. Elvira Santos por el apoyo económico que me brindo para terminar de realizar este trabajo, mil gracias que Dios la bendiga.

Al Dr. Andrés Guillermo Martínez Cazas por su apoyo y sincera amistad.

Al Dr. Pedro Villanueva por permitirme realizar la prueba de cenizas totales en el laboratorio 3D.

Al Dr. Bernardo Lucas Florentino por permitirme realizar la prueba de Proteínas en el laboratorio 111 del conjunto E.

A la Q. Araceli Tovar, por la realización de determinación de minerales por absorción atómica en posgrado en el laboratorio de la U.S.A.I.





Al Sr Ernesto y Sr Sergio por el préstamo de material del laboratorio para la realización de mi tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, que fueron mi segunda casa, gracias por haberme formado para mi vida profesional, y porque en ella conocí a personas muy importantes para mí, que ahora forman parte de mi familia. Gracias.

Lo que sabemos es una gota de agua, lo que ignoramos es el océano.

ISAAC NEWTON





Dedicatorias

Este trabajo indudablemente no hubiese sido posible, sin tener el apoyo de una persona muy importante en mi vida que me ha dado el ejemplo de salir adelante, de ser una mujer fuerte y valiosa, de ser padre y madre a la vez, de perdonar mis errores así como aplaudir mis aciertos, pero sobre todo de ser una mujer valiosa que merece mi amor, respeto y gratitud eterna. Mami este no solo ha sido mi esfuerzo es de ambas. Gracias por darme la vida, sin ti jamás lo hubiese logrado.

A mi hija Alondra quien espero sea mejor que yo como persona y algún día como profesionista, gracias por ser ese angelito que vino a llenar de luz mi vida, y por quien he luchado y lucharé para seguir adelante, perdóname el tiempo que no pude dedicarte, mi ausencia en momentos importantes y mis malos momentos, por darme fuerza y valor. Te amo.

A Jorge por su amor, apoyo y comprensión, por ser alguien muy especial en mi vida, gracias por ser mi consejero y mi confidente, gracias por soportar mis malos ratos y por nunca reprochármelos, por ser mi amigo incondicional. Gracias por permitirme ser parte de tu vida. Eres una persona a la cual quiero y admiro. Te amo.

A mis papás Raúl y Margarita por darme ese ejemplo de lucha constante, y de amor incondicional, por ser un gran ejemplo en todos los aspectos, gracias por su amor, por sus valiosos consejos y por su cariño, que Dios me los cuide. Gracias papás.

A mi hermano Raúl por estar a mi lado y apoyarme en todos los aspectos, gracias por compartir juntos esos momentos de soledad y felicidad en nuestra vida, por ser en algunas ocasiones mi confidente, por tu risa que sin duda me alegra el día. Te quiero hermano y seguiremos en la lucha por alcanzar nuestros sueños.





A mis hermanas Margarita, Mariana y Dalia por estar conmigo en esos momentos especiales, por compartir momentos de alegría y de llanto juntas. Sé que cada una tomará rumbos distintos pero sepan que siempre estaré con ustedes para apoyarlas. Las quiero mucho.

A mis tíos Mario, Iván y Eduardo que son y serán siempre como mis padres, gracias por su apoyo y consejos, a mis tías Noemí y Concepción gracias por su apoyo y su amor para mí, los quiero mucho.

A mi nana Mary que me ha dado consejos en estos 26 años de mi vida, por estar a mi lado siempre que la necesito pero sobre todo por ser una segunda madre para mí. Sabes que te quiero mucho y siempre tendrás un lugar muy especial a mi lado. Gracias.

A mis primos Raúl y Eduardo los quiero mucho, hagan lo que hagan en su vida tendrán mi apoyo incondicional, pero sobre todo sean felices.

A mis amigas y confidentes de la facultad con las cuales compartí muchos momentos a veces difíciles, muchos alegres, mucho estrés, pero indudablemente conocí grandes personas que me han demostrado su amistad incondicional, les deseo la mayor felicidad en su vida: Alejandra Santiago, Edith Velasco, Ana Silvia Ochoa, Berenice Presteguí, Jeanete Rosas, Jazmín Colula, Alejandra Cortes, Alicia Mejía, Alicia Trujillo, Diana Jiménez, Perla Sandoval, Lina Vanessa, Leslie López y Elva Maguey, gracias, siempre las recordaré con cariño.

Y por último y no menos importante a Dios por darle a mis seres queridos y a mí, salud, amor y por siempre rodearme de personas maravillosas, por darme la oportunidad de despertar cada día y disfrutar esta maravillosa vida.

Poder disfrutar de los recuerdos de la vida es vivir dos veces.

Marco Valerio Marcial





Contenido

<i>Agradecimientos.....</i>	<i>1</i>
<i>Dedicatorias.....</i>	<i>3</i>
<i>Capítulo I. Introducción.....</i>	<i>8</i>
<i>Capítulo II. Objetivos.....</i>	<i>10</i>
<i>Capítulo III. Antecedentes.....</i>	<i>11</i>
3.1. <i>Historia y origen.....</i>	<i>11</i>
3.2. <i>Descripción botánica.....</i>	<i>12</i>
3.2.1. <i>Familia Rosaceae.....</i>	<i>12</i>
3.2.2. <i>Subfamilia Moloidae.....</i>	<i>13</i>
3.2.3. <i>Clasificación taxonómica.....</i>	<i>13</i>
3.3. <i>Descripción del árbol.....</i>	<i>14</i>
3.3.1. <i>Composición química.....</i>	<i>16</i>
3.4. <i>Clima y suelo para su cultivo.....</i>	<i>17</i>
3.4.1. <i>Variedades del níspero.....</i>	<i>18</i>
3.4.2. <i>Temporada.....</i>	<i>18</i>
3.4.3. <i>Plagas.....</i>	<i>19</i>
3.4.4. <i>Enfermedades del níspero.....</i>	<i>19</i>
3.4.5. <i>Fisiopatías del níspero.....</i>	<i>19</i>
<i>Capítulo IV. Fundamentos teóricos.....</i>	<i>20</i>
4.1. <i>Determinación de humedad.....</i>	<i>20</i>
4.1.1. <i>Método de secado.....</i>	<i>20</i>
4.1.2. <i>Método de secado de estufa.....</i>	<i>21</i>
4.1.3. <i>Método de secado en estufa de vacío.....</i>	<i>21</i>
4.1.4. <i>Método de secado en termobalanza.....</i>	<i>21</i>
4.1.5. <i>Método de destilación azeotrópica.....</i>	<i>22</i>





4.1.6. Método de Karl Fisher.....	22
4.2. Determinación de cenizas.....	24
4.2.1. Método de cenizas totales.....	24
4.2.2. Determinación de cenizas en húmedo.....	25
4.3. Determinación de elementos minerales.....	26
4.4. Determinación de glucósidos cianogénicos.....	26
4.4.1. Toxicidad de HCN.....	27
4.4.2. Reacción de hidrólisis de glucósido cianogénico.....	28
4.5. Determinación de proteínas.....	29
4.5.1. Método de Kjeldahl.....	29
4.5.2. Cuantificación mediante UV.....	31
4.5.3. Método de Biuret.....	32
4.5.4. Método de Lowry.....	32
4.5.5. Método turbidimétrico.....	33
4.5.6. Unión con colorantes.....	33
4.6. Cuantificación de azúcares reductores.....	35
4.6.1. Azúcares en solución.....	36
4.6.2 Método ácido dinitrosalicílico DNS.....	36
Capítulo V. Parte experimental.....	38
5.1. Determinación de humedad.....	40
5.2. Determinación de cenizas totales.....	41
5.3. Determinación de glucósidos cianogénicos.....	42
5.3.1. Ensayo cualitativo.....	42
5.3.2. Preparación del reactivo de Guignard.....	42
5.3.3. Preparación de la muestra.....	42
5.3.4. Ensayo cuantitativo.....	43
5.4. Determinación de proteínas.....	45
5.5. Determinación de almidón.....	46
5.5.1. Prueba cualitativa.....	46



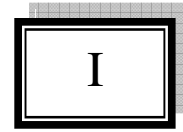


<i>5.6. Determinación de azúcares reductores.....</i>	<i>46</i>
<i>5.6.1. Prueba cualitativa.....</i>	<i>46</i>
<i>5.6.2. Solución acuosa de azúcares reductores.....</i>	<i>47</i>
<i>5.6.3 prueba cuantitativa.....</i>	<i>47</i>
<i>5.6.4. Preparación de la solución del DNS.....</i>	<i>47</i>
<i>5.6.5. Preparación de la curva patrón de glucosa.....</i>	<i>47</i>
<i>5.6.6. Preparación de la muestra para la cuantificación de azúcares reductores.....</i>	<i>48</i>
<i>5.7. Prueba de identificación de fenoles.....</i>	<i>49</i>
<i>5.8. Determinación de minerales.....</i>	<i>49</i>
<i>Capítulo VI. Resultados.....</i>	<i>54</i>
<i>Capítulo VII. Conclusiones.....</i>	<i>55</i>
<i>Capítulo VIII. Anexos</i>	
<i>Índice de tablas.....</i>	<i>57</i>
<i>Índice de figuras.....</i>	<i>58</i>
<i>Capítulo IX. Referencias.....</i>	<i>59</i>





CAPÍTULO



INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha venido resurgiendo el interés por el uso de las plantas medicinales, lo que ha permitido que la herbolaria recobre una posición científica que parecía perdida después de la aceptación de la industria química farmacéutica.

Actualmente el conocimiento de la medicina tradicional se ha venido rescatando y validando por instituciones científicas.

La cifra de especies vegetales en México oscila en 30,000, catalogadas en 220 familias y 2410 géneros. Del total de esta flora se considera que el 50% de las especies son utilizadas para satisfacer alguna necesidad humana, siendo las plantas medicinales las que ocupan el principal porcentaje, calculado en 3500 especies.

Éste total se considera que el 11%, es decir un promedio de 350 a 400 especies medicinales se comercializan en mercados de la capital mexicana con un volumen de 20,000 toneladas de plantas secas al año provenientes de 15 regiones y subregiones del país.

En México la producción de níspero alcanza las 10,128 toneladas, obtenidas en una superficie de 1.963 hectáreas, distribuidas en la zona costera del golfo de México, en los estados de Veracruz, Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo y en los estados de Nayarit, Guerrero, Oaxaca y Chiapas. También se le cultiva en el estado de Morelos.

El hombre ha hecho uso de los productos de la naturaleza desde tiempos inmemorables, no solo para satisfacer su hambre, sino también con la finalidad de sanar sus enfermedades o cicatrizar sus heridas.





La medicina tradicional como parte importante de la cultura de los pueblos, ha sido durante siglos, el único sistema utilizado en la restauración de la salud de las generaciones pasadas, donde las plantas medicinales han cumplido un rol fundamental como medio para curar enfermedades.

El presente trabajo es una contribución al estudio de los productos naturales y pretende hacer notar la importancia de preservar la riqueza herbolaria de nuestro país, ya que forma parte del equilibrio ecológico.

Considero que es importante este estudio, ya que el peso de la semilla en el fruto es aproximadamente la mitad del peso total de éste por lo que el tratamiento de diversas enfermedades y/o padecimientos. Por otro lado, el níspero como tal tiene propiedades curativas para eliminar los cálculos acumulados en la bilis, además por su gran contenido de agua actúa en el control del sobrepeso, y es un diurético.





CAPÍTULO

The Roman numeral 'II' is enclosed in a double-lined rectangular box with a grey grid background.

Objetivos

Generales:

- ✓ Extracción de los compuestos químicos de la semilla de *Eriobotrya japonica*.
- ✓ Purificación de algunos compuestos.
- ✓ Identificación de los componentes de la semilla (*Eriobotrya japonica*) por métodos físico químicos.
- ✓ Cuantificación y aislamiento de algunos componentes.

Particulares:

- ❖ Determinación de humedad.
- ❖ Determinación de cenizas totales.
- ❖ Determinación de glucósidos cianogénicos.
- ❖ Determinación de proteínas.
- ❖ Determinación de azúcares reductores.
- ❖ Determinación de minerales.





3.1 Historia y origen

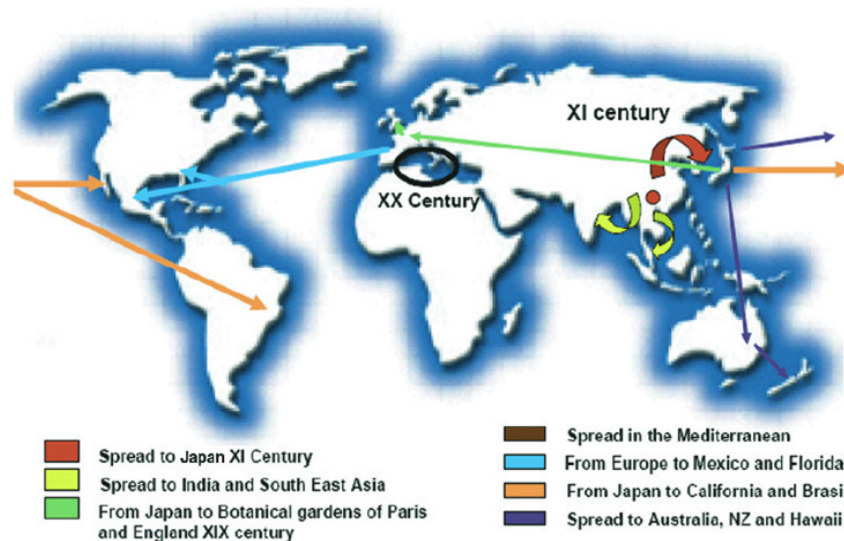


Figura 1. Origen y distribución de nisperos

El níspero japonés es originario del sudeste de China, donde se conoce desde hace 2.000 años. De allí pasó a Japón, país en el que se cultiva desde 1180. En Europa se cultiva desde el siglo XVIII. Se cree que fue introducido por los jesuitas, que lo llevaron de Japón a la isla Mauricio y de allí a Francia, al Jardín de las Plantas de París.

Después se extendió por toda la cuenca del Mediterráneo, donde ha encontrado un hábitat muy favorable para su cultivo en países como Argelia, Turquía, Israel, Italia y España.





En España fue introducido por los marinos mercantes en la zona de Sagunto (ciudad de Valencia, España), desde donde se expandió por todo el este y sudeste de la península Ibérica.

El níspero llegó a Yucatán y posiblemente a otras partes cercanas del sur de México, así como al norte de Belice y el noreste de Guatemala.

La especie se encuentra en bosques en toda Centroamérica, donde al parecer ha sido cultivada desde tiempos antiguos.

Se introdujo hace mucho tiempo en toda la América tropical y las Antillas, las Bahamas, las Bermudas, los Cayos de la Florida y la parte meridional de la península de Florida.

Los principales mercados de exportación en América son el Salvador 87.7%, Bélgica 9.6% y Honduras 2.7%; el 37% de la producción española de níspero se destina a la exportación europea, principalmente a Italia y solo el 7% se destina al enlatado.

3.2 DESCRIPCIÓN BOTANICA

3.2.1 Familia Rosaceae

Importante familia de gran número de plantas leñosas y herbáceas, muy estimada principalmente por sus árboles y arbustos frutales, así como por numerosas especies de valor ornamental. Pertenecen a esta familia árboles, arbustos, matas y hierbas, perennifolios o caducifolios.

Flores normalmente bisexuales, regulares, con frecuencia grandes. Presentan por lo general 5 sépalos y 5 pétalos, aunque en las formas de jardinería aparecen flores con mayor número de pétalos. Estambres numerosos dispuestos en diversos verticilos, normalmente múltiplos de 5.





Frutos variados: aquenios, folículos, bayas, pomos, drupas, etc., con variable número de semillas. Comprende alrededor de 100 géneros y más de 3.000 especies ampliamente distribuidas por todas las partes del mundo, con mayor presencia en las regiones templadas.

Los arbustos y árboles frutales más importantes de las regiones templadas pertenecen a esta familia, con un gran interés económico: (manzano, peral, melocotonero, cerezo, ciruelo, albaricoquero, almendro, etc.

3.2.2 SUBFAMILIA MOLOIDAE

La subfamilia de la Moloideae pertenece a la familia de las Rosaceae caracterizadas por poseer fruto pomo, y por ser haploide con 17 cromosomas. Son arbustos o pequeños árboles. La subfamilia incluye un número de plantas comercialmente importantes por sus frutos, como manzanas y peras.

3.2.3 CLASIFICACIÓN TAXONOMICA DEL GENERO *Eriobotrya* Japónica.

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Rosales

Familia: Rosaceae

Subfamilia: Moloideae

Genero: *Eriobotrya*





3.3 Descripción del árbol del níspero

Eriobotrya japónica, el níspero del Japón, es un árbol frutal de 6 metros o más de altura de la subfamilia Maloideae de la familia Rosácea, originaria del sudeste de China.



Figura 2. Árbol de *Eriobotrya Japonica*

Las hojas pueden tener forma ovada o ser un poco alargadas, miden entre los 8 y los 25 cm, son lustrosas por el anverso y peludas por el reverso.



Figura 3 .Hojas de *Eriobotrya Japonica*





Las flores son blancas, se encuentran agrupadas en panículas, muy numerosas, blancas y con olor a heliotropo. Las panículas son pilosas y se encuentran rodeadas por una hoja en forma de penacho al final del ramo fructífero. Florece en otoño e invierno y los frutos aparecen antes de primavera.



Figura 4. Flores blancas de *Eriobotrya Japonica*.

El fruto de este árbol, el níspero japonés, ha ido sustituyendo al del níspero europeo de forma que en la actualidad, al decir «níspero» se da por entendido que se refiere al níspero japonés.

Los frutos del níspero son carnosos, de pulpa abundante de sabor dulce y textura "arenosa" al paladar, de cáscara gruesa de color amarillo, y son muy notables por su variabilidad fenotípica, lo cual significa que la forma y el tamaño varían considerablemente de un árbol a otro.

Cada fruto de forma ovoide, de 3 a 5 cm de longitud, con una cutícula lisa o pilosa de color amarillo-anaranjado, pulpa carnosa y semidulce, puede contener de 1 a 4 semillas en forma de gota, planas, duras y aproximadamente de 1 cm de diámetro, de color café y muy notables por la presencia de un amplio hilo u obliquo blanco que ocupa casi la mitad de la superficie de la semilla.





Figura 5. Fruto de Eriobotrya Japonica.

El fruto se consume fresco y dada la consistencia de su pulpa es ideal para tartas, jaleas y en conservas.

3.3.1 Composición química reportada en la literatura.

En un estudio químico realizado a la pulpa del níspero se encontró la siguiente composición¹:

- Agua (68%)
- Proteínas (0,5%)
- Lípidos (0,4%)
- Hidratos de carbono (18 %)
- Vitamina A (270 UI por 100 gramos)
- Vitamina B1 (0,4 mg por 100 gramos)
- Vitamina B2 (0,5 mg por 100 gramos)
- Vitamina C (10 mg por 100 gramos)
- Potasio (210 mg por 100 gramos)





Contiene potasio en cantidades apreciables y algunas vitaminas y no aporta nutrientes importantes al organismo

Es un alimento que aporta muy pocas calorías al organismo, por lo que puede ser usado en tratamientos (o regímenes) para el control de peso.

El peso del fruto está representado por un 54.54 % de pulpa y un 45.46 % de la semilla, por lo que el estudio de la semilla puede dar información sobre las aplicaciones que se puedan dar a esta parte del fruto que no ha sido estudiado.

3.4 Clima y suelo para el cultivo del níspero:

Especie moderadamente resistente al frío, pero sin requerimientos de horas-frío, es decir la cantidad de horas con temperatura menor que 7°C se cuenta como 1 hora frío.

Es un frutal de litoral, donde las temperaturas disminuyen mucho durante el otoño e invierno, coincidiendo con los procesos de floración y fructificación.

Su límite norte está determinado por las zonas en las que la temperatura invernal alcanza valores bajo cero, aunque sobrevive a temperaturas menores de 10°C, a esta temperatura es difícil su desarrollo.

El cultivo comercial del níspero requiere un clima cálido, con una temperatura media anual superior a 15 °C. Los golpes de sol, las heladas y el viento deprecian el fruto; en el caso de producirse fuertes vientos pueden derribar el árbol debido a su débil anclaje.

Puede cultivarse en una amplia gama de suelos, aunque deben presentar un buen drenaje y pH comprendido entre 6 y 8. Los suelos arenosos proporcionan mayor precocidad pero menor calibre, mientras que los arcillosos aumentan el calibre y retrasan la maduración. Es una especie muy sensible a la salinidad.





En suelos calizos sufre frecuentemente problemas de clorosis, al igual que el patrón de membrillero, el cual es más sensible aún a la caliza. Las raíces del níspero son sensibles a la asfixia.

3.4.1 Variedades de nísperos:

Las variedades más difundidas en Japón, California y Argelia son: Advance, Champagne, Indostac, Premier, Early Red, Tanaka y Thales. Las variedades más difundidas en España son Tanaka y Algerie.

La variedad Takana es de maduración tardía que está más expuesto al golpe de sol y presenta frutos de buen calibre y extraordinario sabor.

El cultivar Algerie constituye el 95% de la producción de Alicante, siendo también cultivado en Almería por su mayor precocidad. Sin embargo, los frutos son de menor tamaño y peor sabor, aunque la productividad es muy buena.

Por tanto, generalmente se cumple que a mayor precocidad, menor es el calibre y peores son el color y el sabor, ya que el fruto tarda menos tiempo en engordar y madurar.

También están entrando dos variedades (Magdall y Golden Nugget) que son peores en cuanto a sabor, pero más precoces, y se están cultivando en la zona de Málaga y Granada.

Otras variedades son: Algar, Callosa, Bernia y Nadal.

3.4.2 Temporada

Los frutos maduran de 4 a 6 meses después de la floración. En los trópicos, algunos cultivares se producen casi continuamente.





En la India, la principal temporada es de diciembre a marzo. Los árboles producen de mayo a septiembre en la Florida, con un pico en la cosecha en junio y julio.

En México, hay dos temporadas: de febrero a abril y de octubre a diciembre. Su época de cultivo es de marzo a junio. En México se consume crudo o como mermelada y en pastelería.

3.4.3 Plagas:

- Mosca de la fruta (*Ceratitis capitata*).

Consumen muy ávidamente los frutos y son controlados mediante redes.

3.4.4 Enfermedades de los nísperos:

Moteado o roña (*Fusicladium eryobotryaea*)

3.4.5 Fisiopatías de los nísperos:

Mancha morada: es una alteración fisiológica que afecta a la epidermis de los frutos, produciendo manchas de color pardo que deprecian el aspecto del producto y hacen difícil su comercialización. Los factores que favorecen la aparición de la mancha morada son todos aquellos fenómenos meteorológicos que producen un desequilibrio hídrico en la planta, sobre todo en la época que empieza la maduración, otros son la carencia de calcio y zinc.





CAPÍTULO

The Roman numeral 'IV' is centered within a double-bordered rectangular box, which is placed to the right of the chapter title.

Fundamentos teóricos

4.1 Determinación de humedad

Todos los alimentos, cualquiera que sea el método de industrialización a que hayan sido sometidos, contienen agua en mayor o menor proporción. Las cifras de contenido en agua varían entre un 60 y un 95% en los alimentos naturales. En los tejidos vegetales y animales, puede decirse que existe en dos formas generales: “agua libre” y “agua ligada”.

El agua libre o absorbida, que es la forma predominante, se libera con gran facilidad. El agua ligada se halla combinada o absorbida; se encuentra en los alimentos como agua de cristalización (en los hidratos) o ligada a las proteínas y a las moléculas de sacáridos y absorbida sobre la superficie de las partículas coloidales. (Hart, 1991).

4.1.1 Métodos de secado

Los métodos de secado son los más comunes para valorar el contenido de humedad en los alimentos y/o semillas; se calcula el porcentaje en agua por la pérdida en peso debida a su eliminación por calentamiento bajo condiciones normalizadas.

Aunque estos métodos dan buenos resultados que pueden interpretarse sobre bases de comparación, es preciso tener presente que: algunas veces es difícil eliminar por secado toda la humedad presente.

A cierta temperatura el alimento es susceptible de descomponerse, con lo que se volatilizan otras sustancias además de agua. (Kirk et al, 1996)





4.1.2 Método por secado de estufa

La determinación de secado en estufa se basa en la pérdida de peso de la muestra por evaporación del agua. Para esto se requiere que la muestra sea térmicamente estable y que no contenga una cantidad significativa de compuestos volátiles.

El principio operacional del método de determinación de humedad utilizando estufa y balanza analítica, incluye la preparación de la muestra, pesado, secado, enfriado y pesado nuevamente de la muestra. (Nollet, 1996).

4.1.3 Método por secado en estufa de vacío

Se basa en el principio fisicoquímico que relaciona la presión de vapor con la presión del sistema a una temperatura dada. Si se abate la presión del sistema, se abate la presión de vapor y necesariamente se reduce su punto de ebullición. Si se sustrae aire de una estufa por medio de vacío se incrementa la velocidad del secado.

Es necesario que la estufa tenga una salida de aire constante y que la presión no exceda los 100 mm Hg y 70°C, de manera que la muestra no se descomponga y que no se evaporen los compuestos volátiles de la misma, cuya presión de vapor también ha sido modificada (Nollet, 1996).

4.1.4 Método de secado en termobalanza.

Este método se basa en evaporar de manera continua la humedad de la muestra y el registro continuo de la pérdida de peso, hasta que la muestra se sitúe a peso constante.





El error de pesada en este método se minimiza, cuando la muestra no se expone constantemente al ambiente (Nollet, 1996).

4.1.5 Método de destilación azeotrópica.

El método se basa en la destilación simultánea del agua con un líquido inmiscible en proporciones constantes. El agua es destilada con un líquido inmiscible de alto punto de ebullición, como son tolueno y xileno.

El agua destilada y condensada se recolecta en una trampa Bidwell para medir el volumen (Nollet, 1996).

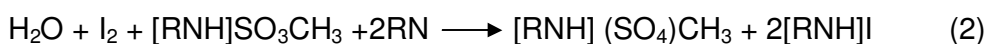
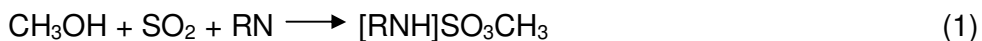
4.1.6 Método de Karl Fischer.

Es el único método químico comúnmente usado para la determinación de agua en alimentos, que precisamente se basa en su reactivo.

Este reactivo fue descubierto en 1936 y consta de yodo, dióxido de azufre, una amina (originalmente se empleaba piridina, sin embargo por cuestiones de seguridad y toxicidad se está reemplazando por imidazol) en un alcohol (ejemplo metanol). Inicialmente, el dióxido de azufre reacciona con el metanol para formar el éster el cual es neutralizado por la base (1).

El éster es oxidado por el yodo a sulfato de metilo en una reacción que involucra al agua (2).

Las reacciones son las siguientes (James, 1999):



Donde RNH es la base





Tabla 1. Comparación entre los métodos para determinar humedad.

Método	Ventajas	Desventajas
Secado en estufa	<ul style="list-style-type: none">• Es un método convencional.• Es conveniente por la pérdida de sustancias volátiles.• Es rápido y preciso.• Se pueden acomodar varias muestras.• Se llega a la temperatura deseada más rápidamente.	<ul style="list-style-type: none">• La temperatura va fluctuar. debido al tamaño de la partícula, peso de la muestra, posición de la muestra en el horno, etc.• Pérdida de sustancias volátiles durante el secado.• Posible descomposición de la muestra.
Secado en estufa de vacío	<ul style="list-style-type: none">• Se calienta a baja temperatura y por lo tanto se previene la descomposición de la muestra.• Es recomendable para muestras que contengan compuestos volátiles orgánicos.• Calentamiento y evaporación constante y uniforme.	<ul style="list-style-type: none">• La eficiencia es baja para alimentos con alta humedad.
Destilación azeotrópica	<ul style="list-style-type: none">• Determina el agua directamente y no por pérdida de peso.• El dispositivo es sencillo de manejar.• Toma poco tiempo por lo que se previene la oxidación de la muestra.• No afecta la humedad del ambiente.	<ul style="list-style-type: none">• Baja precisión del dispositivo para medir volumen de agua.• Los disolventes inmiscibles en agua como tolueno son inflamables.• Se pueden registrar elevadas cantidades de destilado, debido a la destilación de componentes solubles en agua.• Cualquier impureza puede generar resultados erróneos.
Secado en termobalanza	<ul style="list-style-type: none">• Es un método semiautomático o automático.• La muestra no es removida por lo tanto el error de pesada es mínimo.	<ul style="list-style-type: none">• Es excelente para investigación.
Karl Fischer	<ul style="list-style-type: none">• Es un método estándar para ensayos de humedad.• Precisión y exactitud más altas que otros métodos.• Es útil para determinar agua en grasas y aceites previniendo que la muestra se oxide.• Una vez que el dispositivo se monta la determinación toma pocos minutos.	<ul style="list-style-type: none">• Los reactivos deben ser RA para preparar el reactivo de Fischer.• El punto de equivalencia de titulación puede ser difícil de determinar.• El reactivo de Fischer es inestable y debe estandarizarse in situ.• El dispositivo de la titulación debe protegerse de la humedad atmosférica debido a la excesiva sensibilidad del reactivo a la humedad.• El uso de la piridina que es muy reactiva.

(Nollet, 1996)





4.2 Determinación de cenizas

Las cenizas de un alimento son un término analítico equivalente al residuo inorgánico que queda después de calcinar la materia orgánica. Las cenizas normalmente no son las mismas sustancias inorgánicas presentes en el alimento original, debido a las pérdidas por volatilización o a las interacciones químicas entre los constituyentes.

El valor principal de la determinación de cenizas es que supone un método sencillo para determinar la calidad de ciertos alimentos, por ejemplo en las especias y en la gelatina es un inconveniente un alto contenido de cenizas. Las cenizas de los alimentos deberán estar comprendidas entre ciertos valores, lo cual facilitará en parte su identificación de los minerales presentes en la muestra. (Kirk et al, 1996).

En las cenizas de los vegetales predominan los derivados de potasio y en las cenizas animales los del sodio. El carbonato potásico se volatiliza apreciablemente a 700 °C y se pierde casi por completo a 900 °C. El carbonato sódico permanece inalterado a 700 °C, pero sufre pérdidas considerables a 900 °C. Los fosfatos y carbonatos, además reaccionan entre sí. (Hart, 1991).

4.2.1 Método de cenizas totales

La determinación en seco es el método más común para cuantificar la totalidad de minerales en alimentos y se basa en la descomposición de la materia orgánica quedando solamente materia inorgánica en la muestra, es eficiente ya que determina tanto cenizas solubles en agua, insolubles y solubles en medio ácido. En este método toda la materia orgánica se oxida en ausencia de flama a una temperatura que fluctúa entre los 550-600°C; el material inorgánico que no se volatiliza a esta temperatura se conoce como ceniza. (Nollet, 1996)





4.2.2 Determinación de cenizas en húmedo.

Para la determinación húmeda se dan cenizas alcalinas, ácidas y neutras y esto se basa en el tipo de anión o catión ya sea metálico o complejo, por ejemplo hay minerales como tartratos o citratos que producirán cenizas con un carácter alcalino. Es necesario tomar en cuenta que también un índice de alcalinidad de cenizas es muestra del contenido de carbonatos en disolución acuosa. (Nollet, 1996).

Tabla 2. Comparación entre métodos para determinar cenizas totales

Método	Ventajas	Desventajas
Seco	<ol style="list-style-type: none">1. Simple.2. No se requiere atención durante la generación de cenizas.3. No se requieren reactivos.4. Se pueden manejar muchas muestras.5. Es un método estándar para la determinación de cenizas6. Se puede determinar cualquier tipo de materia inorgánica..	<ol style="list-style-type: none">1. Se requiere alta temperatura.2. El equipo es caro.3. Hay pérdidas por volatilización.4. Hay interacciones entre minerales y recipientes.5. Hay absorción de elementos traza por recipientes de porcelana o sílice6. Poca utilidad para análisis de Hg, As, P y Se7. Calentamiento excesivo puede hacer ciertos componentes insolubles.8. Hay una dificultad en el manejo de cenizas por ser higroscópicas, sensibles a la luz, etc.
Húmedo	<ol style="list-style-type: none">1. Relativamente no se requiere alta temperatura2. El dispositivo es simple3. La oxidación es rápida4. Se mantiene la disolución acuosa lo cual es bueno para análisis mineral.5. El equipo no es caro.6. No hay volatilización de minerales	<ol style="list-style-type: none">1. Se requieren altas cantidades de materiales corrosivos.2. Se requieren ácidos explosivos3. Se requiere estandarizar los reactivos4. Las reacciones son fumantes5. Manejar sistemáticamente varias muestras no es sencillo6. El procedimiento es tedioso y gasta mucho tiempo.

(Nollet, 1996)





4.3 Determinación de elementos minerales

En los alimentos se encuentran elementos presentes en los compuestos orgánicos como son el carbono, el hidrógeno, el nitrógeno, el oxígeno y el azufre; además de otros elementos en pequeñas cantidades que se agrupan como “elementos minerales” estos se presentan en cantidades minoritarias en los alimentos, y que suelen determinarse como elementos más que como compuestos específicos o grupos de compuestos.

El número de estos elementos que se encuentran en los alimentos es considerable, se incluyen el: silicio, calcio, magnesio, sodio, potasio, fósforo, azufre, cloro, hierro, aluminio, manganeso, flúor, arsénico, cobalto, cobre, mercurio, molibdeno, plomo, selenio, estroncio, zinc, yodo, mercurio y boro. En algunos casos estos elementos son naturales en los alimentos, mientras que en otros casos son producto de la contaminación.

4.4 Determinación de glucósidos cianogénicos

Glucósido cianogenico: Estos glucósidos poseen cianuro en su aglucón y lo liberan cuando el glucósido contacta con una glucosidasa del propio vegetal, de la cual se encuentra físicamente separado. El cianuro liberado forma ácido cianhídrico (HCN), un tóxico violento y de rápido efecto por inhibir la respiración celular.

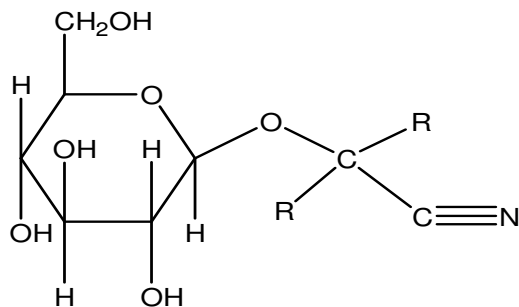


Figura 6. Estructura general del glucósido cianogénico.





Los glucósidos cianogénicos se sintetizan a partir de aminoácidos como parte del metabolismo vegetal, y al hidrolizarse liberan cianuro de hidrogeno (HCN)

La determinación de cianuro de hidrogeno en una planta y/o semilla es de gran importancia en la dieta de animales y humanos. Por eso en este trabajo se determinó la cantidad de cianuro de hidrogeno, liberado a partir de los glucósidos cianogénicos presentes en semillas de *Eriobotrya Japonica*, relacionando la concentración con su potencial toxicológico.

La acción tóxica del ácido cianhídrico se produce al reaccionar con el hierro trivalente de la citocromo oxidasa en las mitocondrias, impidiendo la fijación de oxígeno en las células del torrente sanguíneo, las cuales ya no pueden transportarlo, inhibiendo la respiración celular en los tejidos al quedarse con deficiencia del mismo, lo que ocasiona en el organismo la asfixia. El grado de toxicidad del cianuro de hidrógeno (HCN) para los humanos depende del tipo y tiempo de exposición.

4.4.1 Toxicidad del HCN

Se sabe que el cianuro es un anión químico tóxico, una pequeña cantidad de cianuro es fatal. El cianuro está en contacto con el cuerpo humano en niveles no dañinos en la vida diaria, a través del humo del cigarrillo y muchos alimentos. El cuerpo humano puede desintoxicar en forma natural los bajos niveles de cianuro.

En la tabla no **3** se muestran los efectos probables de exposición al HCN de un individuo promedio.





Tabla 3. Efectos probables a diferentes concentraciones de HCN

Concentración de HCN	Características
2-5 ppm	Limite de olor
10 ppm	Limite máximo permitido
20-40 ppm	Síntomas leves
45-55 ppm	Tolerable durante 0.5 hrs., sin efectos inmediatos ni retardados
100-240 ppm	Fatal en 0.5 hrs.
300 ppm	Fatal inmediatamente

Las cifras presentadas asumen que no hay primeros auxilios ni asistencia médica. La detección por olfato del HCN varía de una persona a otra. Algunas personas la describen como un olor, otras como un gusto o una sensación.

4.4.2 Reacción de hidrólisis de glucósido cianogénico.

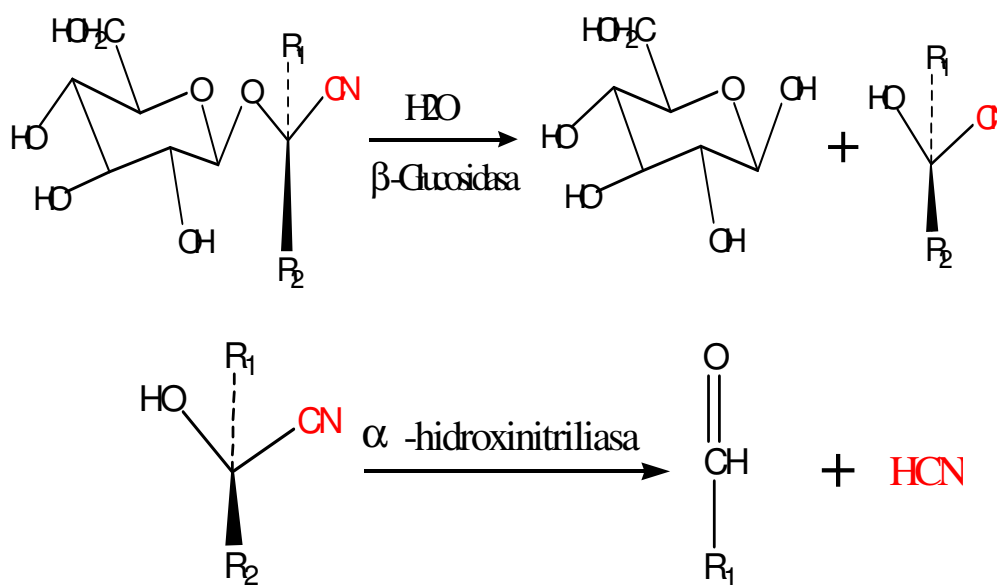


Figura 7. Reacción de hidrólisis del glucósido cianogénico





El HCN se puede cuantificar empleando el reactivo de Guignard y tiras de papel filtro impregnado con ácido pícrico. Se genera la isopurpurina y ésta a su vez es la base del método de cuantificación por ácido pícrico.

Al liberarse el HCN de la muestra, éste reacciona con una tira reactiva impregnada con el ácido pícrico, lo cual genera la isopurpurina y ésta a su vez es la base del método de cuantificación por el ácido pícrico.

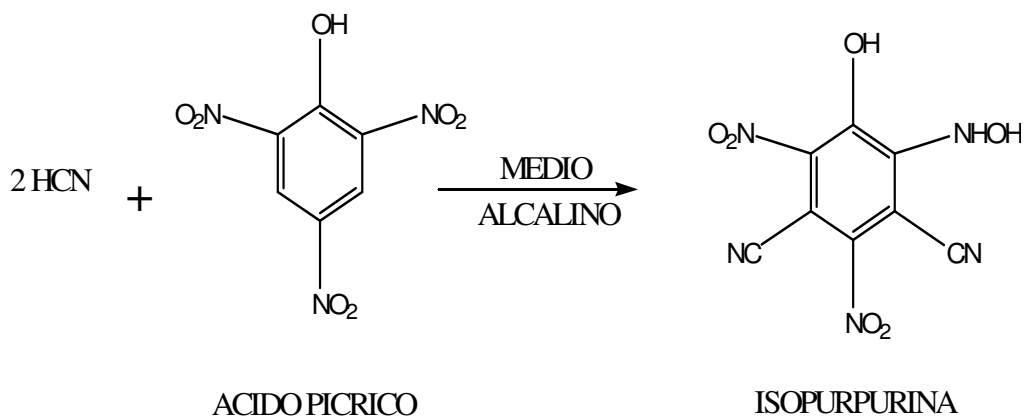


FIGURA 8. Reacción de formación de la isopurpurina.

4.5 Determinación de proteínas

4.5.1 Método de Kjeldahl

En el trabajo cotidiano, es más frecuente determinar proteínas totales que las proteínas o los aminoácidos individuales. El procedimiento más empleado es el Kjeldahl en el cual se determina la materia nitrogenada total, que incluye tanto las no proteínas como las proteínas verdaderas (Aurand et al, 1987).





El método se basa en la determinación de la cantidad de Nitrógeno orgánico y se realiza en dos pasos consecutivos:

- a) La descomposición de la materia orgánica bajo calentamiento en presencia de ácido sulfúrico concentrado.
- b) La cuantificación de la cantidad de amoníaco obtenida de la muestra

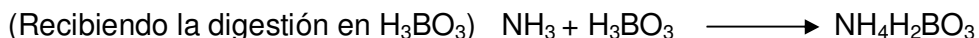
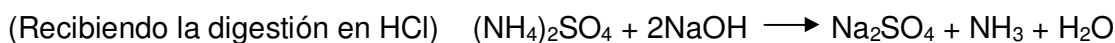
Durante el proceso de descomposición ocurre la deshidratación y carbonización de la materia orgánica combinada con la oxidación del carbono a dióxido de carbono. El nitrógeno orgánico es transformado en amoníaco que se retiene en la disolución como sulfato de amonio.

La recuperación del nitrógeno y la velocidad del proceso pueden ser incrementados adicionando sales (como el sulfato de potasio) que abaten la temperatura de la reacción o por la adición de oxidantes (peróxido de hidrógeno, persulfatos o ácido crómico) y por la adición de un catalizador. (Nollet, 1996)

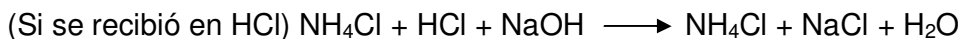
El método de Kjeldahl consta de las siguientes etapas:



b) Destilación:



c) Titulación:





En la mezcla de digestión se incluye sulfato sódico para aumentar el punto de ebullición y un catalizador, como el sulfato de cobre, para acelerar la reacción. El amoníaco en el destilado se retiene o bien por un ácido normalizado y se valora por retroceso, o por el ácido bórico y se valora directamente.

El método Kjeldahl no determina, sin embargo, todas las formas de nitrógeno a menos que se modifiquen adecuadamente; esto incluye el empleo nitratos y nitritos. (Pearson, 1993). Para convertir el nitrógeno a proteína se emplea el factor de 6.25, el cual proviene de la consideración de que la mayoría de las proteínas tienen una cantidad aproximada de 16% de nitrógeno.



Figura 9. Unidad de digestión Kjeldahl.

4.5.2 Cuantificación mediante UV

La cuantificación de las proteínas, basada en la absorción en la región de UV, tiene la ventaja de que no es necesario utilizar reactivos y la muestra no se daña o destruye durante la determinación.

La mayoría de las proteínas muestran una absorción a 280 nm, la cual se atribuye al grupo fenólico de la tirosina y al grupo indólico del triptofano.





Se realiza una comparación con una proteína estándar, de la que se debe conocer su composición. Se toma en cuenta la absorción del disolvente, ya que este puede absorber en la misma región. Este método sufre interferencias de compuestos que contengan anillos de purina y pirimidina. (Nollet, 1996).

4.5.3 Método de Biuret

El método comprende un ensayo colorimétrico de un paso donde se cuantifica la formación de un complejo estable entre proteínas y cobre (II).

El complejo se da por la coordinación de un átomo de cobre con cuatro átomos de nitrógeno, presenta un color violeta característico, que se puede observar a 310nm o 540-560nm. El complejo se basa en la desprotonación de los grupos amida para formar los enlace con el cobre (II), o por el establecimiento de un enlace coordinado entre el metal y los pares de electrones libres de los átomos de oxígeno y de nitrógeno del péptido.

Después de la adición del reactivo de cobre se requiere de tiempo para desarrollar una coloración de Biuret estable; es necesario considerar la posible influencia de aminoácidos libres y amoniaco, por lo que se puede adicionar un buffer (Nollet, 1996)

4.5.4 Método de Lowry

El método de Lowry et al (1951), combina la reacción de Biuret con la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico), el cual lleva a cabo la oxidación de tirosina, triptófano, cisteína, cistina de las cadenas polipeptídicas (Nielsen, 1988). El proceso de oxido-reducción se acompaña de la formación de un color azul característico.





Los quelatos de cobre en la estructura del péptido facilitan la transferencia de electrones de los grupos funcionales amino al cromóforo ácido. Este método es útil para determinar pequeñas cantidades de proteína en una disolución. El desarrollo de color es dependiente del pH, por lo que se debe mantener entre 10 y 10.5. (Nollet, 1996)

4.5.5 Método turbidimétrico

La turbidez producida cuando una proteína se mezcla con alguno de los precipitantes comunes, se puede utilizar como un índice de la concentración de proteínas y se emplea cuando están en bajas concentraciones.

Los precipitantes más empleados son: el ácido tricloroacético, el ácido sulfosalicílico y el ferrocianuro de potasio en ácido acético.

Las técnicas turbidimétricas son rápidas y convenientes, sin embargo las principales desventajas que presentan es que las proteínas difieren en la velocidad de precipitación, además el método no permite diferenciar entre proteínas y compuestos insolubles en ácidos tales como ácidos nucleicos. (Layne, 1957)

4.5.6 Unión con colorantes

Controlando el pH y la fuerza iónica del medio los grupos funcionales ácidos y básicos de las proteínas pueden interactuar con grupos orgánicos de carga opuesta. Al realizarse la unión se presenta coloración o bien un cambio de ésta.

Comúnmente se usan colorantes sulfonados los cuales reaccionan a pH ácido con el grupo amino de la lisina, el grupo guanidina de la arginina, el imidazol de la histidina y un número limitado de α -amino terminales. (Nollet, 1996)





Tabla 4. Comparación entre los métodos para determinación de proteínas.

Método	Ventajas	Desventajas
Kjeldahl	<ul style="list-style-type: none">• Es apropiado para varios tipos de productos.• Alta confiabilidad y disponibilidad.• Esta incluido en los métodos aprobados por las organizaciones internacionales.	<ul style="list-style-type: none">• Llega haber interferencia de compuestos nitrogenados no proteicos.• Durante la digestión se produce demasiado humo.• Uso de catalizadores caros o tóxicos.• Baja sensibilidad.• Tarda demasiado tiempo.
Cuantificación mediante UV	<ul style="list-style-type: none">• Rápida y no destructiva.• No se necesitan reactivos.• Alta sensibilidad.• Baja dependencia de la respuesta de la señal a la composición del aminoácido.• Baja interferencia de ácidos nucleicos y nucleótidos.	<ul style="list-style-type: none">• Interferencia de otros compuestos que absorba en UV.• Se necesita usar muestras limpias y lámparas relativamente nuevas.
Biuret	<ul style="list-style-type: none">• No hay interferencia de aminoácidos libres.• Pequeña influencia de la composición del aminoácido en el desarrollo de color.• La operación es simple y se puede manejar número grande de muestras.	<ul style="list-style-type: none">• Interferencia de amoniaco, buffer, detergentes.• Baja sensibilidad.
Lowry	<ul style="list-style-type: none">• Alta sensibilidad.• Fácil de operar.• Fácil de manejar un gran número de muestras.	<ul style="list-style-type: none">• Dependencia del color con la composición del aminoácido.• Interfieren un buen número de compuestos.• Inestabilidad del reactivo Folin-Ciocalteau a pH alcalino.• La curva estándar no es lineal para altas concentraciones de proteínas, por lo tanto, es necesario diluir mucho antes de medir.

(Nollet, 1996)





4.6 Cuantificación de azúcares reductores

Azúcares reductores: son aquellos azúcares que poseen su grupo carbonilo (grupo funcional) intacto, y que a través del mismo pueden reaccionar con otras moléculas.

Reacción de Fehling: se basa en determinar si el azúcar posee poder reductor ya que los azúcares reductores tienen una coloración rojiza debido al óxido cuproso que se forma por oxidación del azúcar por medio del catión Cu^{2+} .

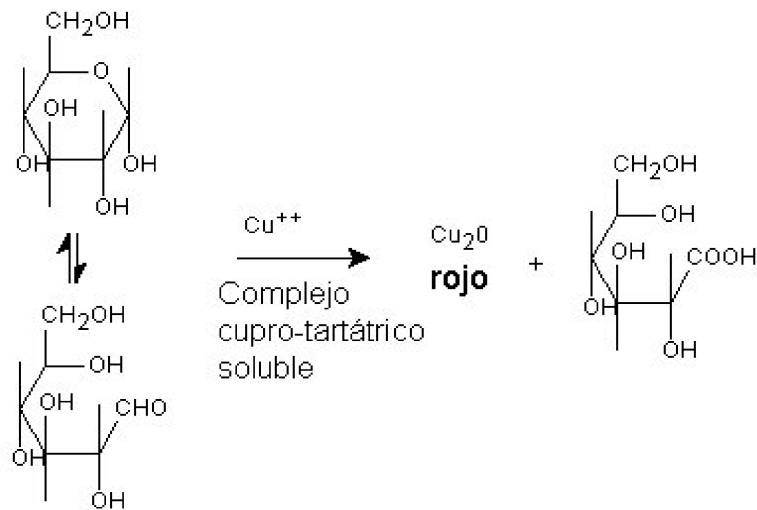


Figura 10. Reacciones de Fehling y Benedict

Reacción de Benedict: El reactivo de Benedict se utiliza como prueba para la presencia de todos monosacáridos, y generalmente también azúcares de reducción. Éstos incluyen glucosa, galactosa, manosa, lactosa y maltosa. Más generalmente, la prueba de Benedict detectará la presencia de aldehídos.





El reactivo de Benedict se puede preparar de carbonato de sodio, citrato de sodio y sulfato del cobre (II). El reactivo de Benedict contiene (II) los iones de cobre azules (Cu^{2+}) cuáles se reducen al cobre (I) (Cu^+). Éstos son precipitado como rojo óxido del cobre (I) cuál es insoluble en agua.

4.6.1. Azucares en solución

Antes de la cuantificación, se requiere remover de las muestras, las sustancias que pueden interferir. Los pigmentos y otras sustancias coloridas interfieren con procedimientos colorimétricos y otras técnicas, particularmente con los métodos de reducción. Para decolorar se han utilizado una gran variedad de métodos como el uso de carbón activado y tratamientos con sales de plomo.

Cuando se usan sales de plomo se debe de evitar el uso de acetato de plomo básico para medidas polarimétricas, en cuyo caso se prefiere acetato de plomo neutro, este se utiliza en solución acuosa saturada y el exceso se elimina con oxalato de plomo u oxalato de sodio. (Southgate, 1991)

4.6.2 Método ácido dinitrosalicílico (DNS)

La determinación de azucares reductores se realiza utilizando el método colorimétrico de Ácido Dinitrosalicílico (DNS).

Los azucares deben estar como monosacáridos. En disolución alcalina el monosacáridos reduce a un grupo nitro del DNS, para dar el producto monoamino que es colorido a este pH.





Este método se seleccionó por ser rápido y reproducible. El método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), se basa en la reducción del DNS (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo) (Chaplin, 1986), cuya presencia puede detectarse por lectura de la Absorbancia en la zona de 540-570 nm.

La concentración se obtiene a partir de la recta obtenida al realizar la curva de calibración, que correlaciona la Absorbancia medida a 540 nm con la concentración de Glucosa.

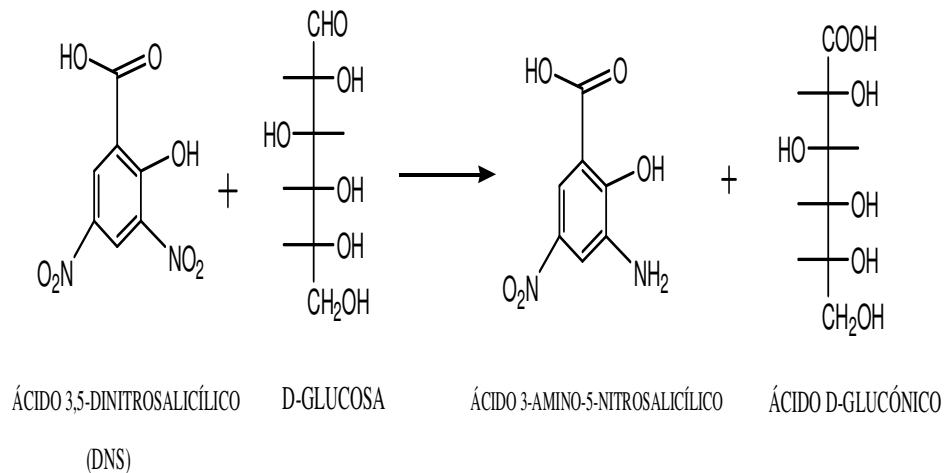
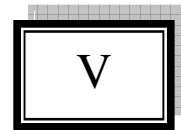


Figura 11. Reacción de cuantificación por el método del DNS





CAPÍTULO



PARTE EXPERIMENTAL

Los fundamentos teóricos de las determinaciones se mencionan en la parte teórica.

Se describe a continuación el procedimiento experimental que se siguió en el trabajo.

Para este estudio se trabajó con semillas de Níspero, que fueron recolectadas en los meses de agosto y septiembre del 2009. Se separó manualmente la parte carnosa y comestible del fruto, y las semillas se dejaron secar a temperatura ambiente en el laboratorio 2B de la Facultad de Química.

Se pesaron los frutos del níspero y las semillas; los resultados se muestran a continuación.

TABLA 5. DETERMINACIÓN DEL PESO DE LA SEMILLA

Peso del fruto	Peso de la semilla
7.3210 g	3.5662 g
6.9952 g	2.9536 g
7.2015 g	3.2632 g
Prom.. = 7.1726 g	Prom. = 3.2610 g

7.1726 g ----- 100%

3.2610 g ----- X

X= 45.46 %

Se observa que el peso de la semilla representa un 45.46 % del peso del fruto.





Posteriormente se separo la película que las cubre y se molieron en un molino de forma manual. Una vez molida la semilla se pesaron 32.00 g de esta y se colocaron en el cartucho de un equipo de Soxhlet.

Se realizo la extracción con:

Hexano

Cloruro de metileno

Acetona

Metanol

En la extracción con cada uno de los disolventes, se mantuvo la extracción continua durante 2 horas.

Posteriormente los extractos obtenidos se vaciaron en frascos de vidrio previamente pesados, se dejó evaporar el disolvente y de esta manera se obtuvo el extracto concentrado correspondiente

Las cantidades de sólidos que se obtuvieron fueron las siguientes:

TABLA 6. OBTENCION DE EXTRACTOS

No de extracto	Disolvente	Cantidad obtenida de solido
1	Hexano	0.0505 g
2	Cloruro de metileno	1.5125 g
3	Acetona	3.9249 g
4	Metanol	0.0531 g
	Total	5.5410 g

Rendimiento:

32.00 g ----- 100 %

5.5410 g ----- X X= 17.3156 %





Posteriormente cada uno de los extractos se analizó mediante cromatografía en capa fina y se observaron mezclas de los componentes que no fueron separados, ya que las pruebas que se realizarían son muy específicas y no requerían tener los compuestos puros.

5.1 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

Se hicieron varias pesadas de la semilla del níspero molida, se pesó de 1 a 2 g de muestra en un vidrio de reloj (previamente pesado).

Se secó la muestra en la estufa aproximadamente 2 hrs. a 100 - 110°C. Se retiró de la estufa y se dejó enfriar. Al llegar a temperatura ambiente se pesó. Se repitió la operación hasta tener peso constante.

Posteriormente se calculó el porcentaje de humedad.

TABLA 7. DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD

Peso níspero húmedo (g)	Peso níspero seco (g)	Perdida por humedad (g)	% de humedad
1.5857	1.4585	0.1272	12.72
1.1283	1.0384	0.0899	8.99
1.8198	1.6650	0.1548	15.48
0.9818	0.8238	0.158	15.8
1.6899	1.4580	0.1419	14.19
1.1138	0.9957	0.1181	11.81
1.0078	0.9344	0.0734	7.34
0.2122	0.1290	0.0832	8.32
0.1882	0.0770	0.1112	11.12
$\bar{x} = 11.75$			

El porcentaje de humedad contenido en las semillas del níspero es de 11.75 %





5.2 DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES

Se pesó de 3 a 5 g de muestra en el crisol (la muestra no debe sobrepasar la mitad del crisol) previamente pesado.

Se colocó a peso constante un crisol 2 hrs. aproximadamente en la mufla a 600 °C.

Se enfrió en un desecador y se pesó.



Figura 12. Equipo utilizado para la determinación de cenizas.

TABLA 8. Determinación de materia inorgánica por el método de cenizas

<i>Muestra</i>	<i>Muestra (g)</i>	<i>Ceniza (g)</i>	<i>% Materia Inorgánica</i>
N1	4.1704	0.0393	0.9424
N2	3.1522	0.0480	1.5227
N3	3.6530	0.0581	1.5905
N4	4.9194	0.0859	1.7461
N5	5.247	0.0620	1.1816
X= 1.40 %			

El porcentaje de materia inorgánica en la muestra fue de 1.40 %





5.3. DETERMINACION DE GLUCÓSIDOS CIANOGENICOS

5.3.1 Ensayo cualitativo

Para llevar a cabo esta prueba se peso alrededor de 0.5 g de muestra.

5.3.2 Preparación del reactivo de Guignard:

Se coloco 2.5 g de ácido pícrico en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se disolvió con 200 mL de agua destilada. Enseguida se agregó 12.5 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3) y se agitó hasta disolverse. Posteriormente se llevó la solución a un volumen de 500 mL con agua destilada.

Preparación de la tira reactiva: Se sumergió la tira reactiva (papel filtro) en el reactivo de Guignard, la cual da una coloración amarilla.

5.3.3 Preparación de la muestra

La semilla se trituro en un mortero, está fue colocada en un tubo de plástico y se agregó agua destilada, posteriormente se adicionó aproximadamente 0.05 mL de HCl 0.5 N, se introdujo la tira de papel filtro cuidando de no rosar con las paredes del tubo sujetándola con el tapón del tubo, se tapo el recipiente y se introdujo en una estufa a 40 °C alrededor de 20 min.

Se considera una prueba positiva cuando la tira reactiva presenta un color café- rojizo.

Resultado. Prueba positiva, la tira de papel filtro presento la coloración café-rojizo a los 10 min, dicha coloración indica que se encuentra presente HCN.

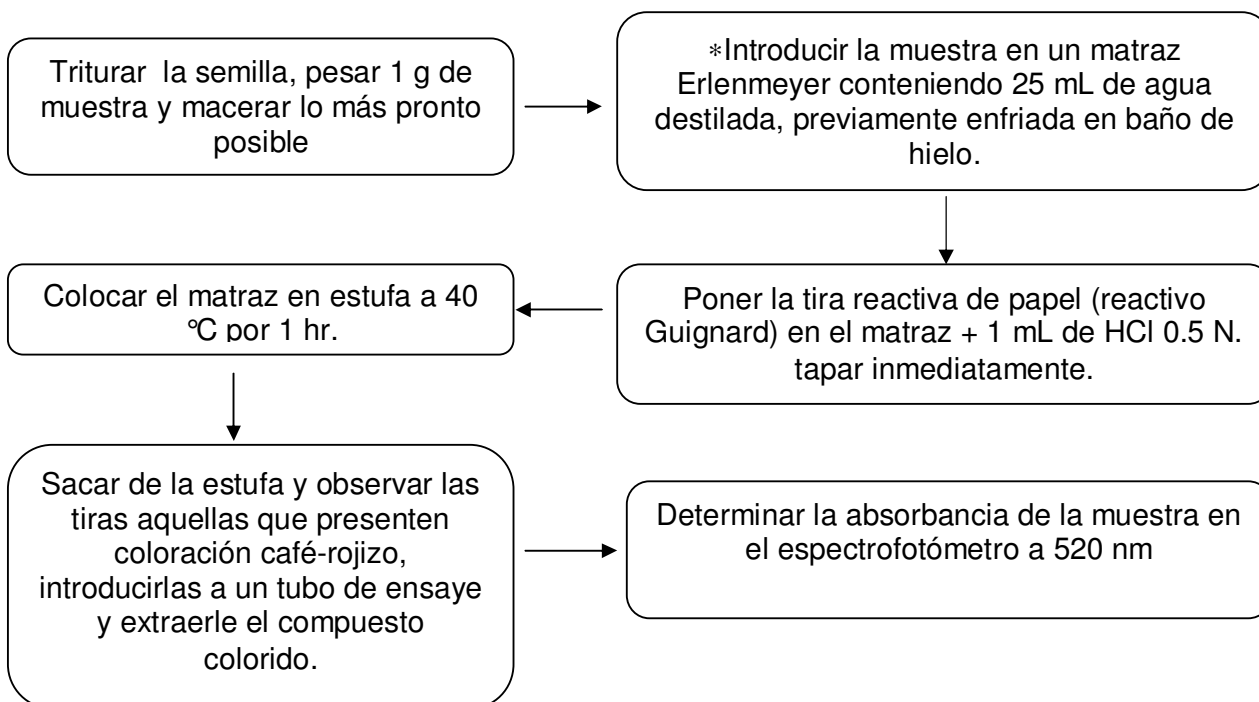




5.3.4 Ensayo cuantitativo:

Se realizó la cuantificación de Cianuro de Hidrogeno, como tóxico volátil, a partir de glucósidos cianogénicos, por medio del método espectrofotométrico:

Preparación de las muestras:



La curva estándar de HCN se preparó colocando en matraces volumétricos de 25 mL, alícuotas de la solución patrón de KCN y llevando al aforo con agua destilada. * Una vez preparadas las soluciones, se vaciaron a matraces Erlenmeyer y se realizó el mismo tratamiento que a las muestras de semillas.

Los volúmenes de las alícuotas y su concentración, se muestran en la siguiente tabla:





Tabla 9. Curva patrón de HCN

Alícuota de la solución patrón de KCN (mL)	Concentración (µg/mL)
0.0	Blanco
0.1	0.4
0.2	0.8
0.3	1.2
0.4	1.6
0.5	2.0

La ecuación de la recta de la curva patrón fue:

$$y = 0.0245 x + 0.0145$$

$$R^2 = 0.91292$$

De donde se obtienen los siguientes resultados:

Tabla 10. Concentración de HCN contenidos en muestra

No Muestra	Concentración (µg/g muestra)
Muestra 1	1.2449
Muestra 2	1.2441
Muestra 3	1.2452

Conforme a los resultados, se observa que la semilla contiene 1.245 µg/g o 1.245 ppm de HCN.

Al comparar este resultado con los valores de la Tabla 3 de toxicidad de HCN, se observa que se requiere de una dosis mayor para que el alimento sea considerado tóxico.

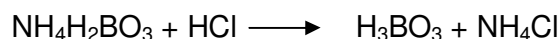




5.4. DETERMINACION DE PROTEINAS

Esta prueba se llevo a cabo en el edificio E de la Facultad de Química, en el laboratorio 111 del departamento de Farmacia, esta determinación estuvo a cargo del M. en C. Bernardo Lucas Florentino, y quien realizó la determinación fue la Q.A Ana Lilia Zárate Martínez. A continuación se presenta la metodología empleada, así como los resultados:

La determinación se realizó según el método micro Kjeidahl, el cual se basa en la oxidación de la materia orgánica mediante una mezcla digestiva con catalizador (H_2SO_4 , H_3PO_4 y $CuSO_4 \cdot 5H_2O$), formándose una sal (NH_4HSO_4). Posteriormente se alcaliniza la mezcla con NaOH y se destila. En este proceso se libera amoniaco de dicha sal, que se recibe en ácido bórico (H_3BO_4), el cual se titula con HCl 0.01N. Realizando algunos cálculos se obtiene el porcentaje de nitrógeno en la muestra, el cual al multiplicarlo por el factor 6.25, indica el % de proteína cruda (asumiendo que la proteína tiene un 16% de nitrógeno).



La determinación se efectuó por triplicado; en la **Tabla 11**, se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 11. Resultado de la determinación de proteínas.

Peso de la muestra (g)	% Proteína (N *6.25)	Promedio $\pm \sigma$	Coficiente de variación
0.1797	4.7	5.02 \pm 0.044	0.87%
0.1792	5.04		
0.1798	5.05		

El porcentaje de proteína en la muestra es de 5.02 %.





5.5 Determinación de almidón

5.5.1 Prueba cualitativa

Para llevar a cabo esta técnica, se pesó alrededor de 2g de muestra y se puso a hervir con agua destilada y con agitación constante durante 5 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente. Una vez frío, se adicionaron 4 gotas de solución de yodo-yoduro. Si la muestra contiene almidón, se debe observar un color azul marino intenso

Resultado: Prueba positiva.

5.6. Determinación de azúcares reductores

5.6.1 Pruebas cualitativas:

Prueba de Fehling.

Se mezcló 1 mL de la solución A² (Cu₂SO₄ al 3%) y 1 mL de la solución B² (15% de Tartrato de sodio y potasio (TSK) en solución acuosa de NaOH al 5%) en un tubo de ensayo, se agregó 0.5 g de la muestra y se calentó a ebullición.

La formación de un precipitado rojo y la decoloración de la disolución, indica prueba positiva para azúcar reductora.

Resultado: Prueba positiva

Prueba de Benedict.

Se colocó 1 mL de la solución de Benedict (complejo cúprico con ion citrato) y se agregó 0.5 g de la muestra, se calentó a ebullición y se dejó enfriar a temperatura ambiente.





Una decoloración de la disolución y formación de un precipitado que va de amarillo hasta rojo, indica prueba positiva.

Resultado: Prueba positiva.

5.6.2 Solución acuosa de azúcares reductores

Se pesaron 0.300 g de la muestra, posteriormente se hizo una hidrólisis ácida (20 mL de agua + 5 mL de HCl por 15 min.), por triplicado, esta solución se utilizó para la determinación de azúcares reductores.

5.6.3. Prueba cuantitativa:

Esta determinación se realizó por el Método del DNS empleando como reactivo (ácido dinitrosalicílico).

5.6.4 Preparación de la solución de DNS

En un matraz volumétrico de 50 mL se colocaron 8 mL de NaOH al 10 %, se adicionaron 15 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado (TSKT), se añadieron 0.5 g de DNS y se llevó al aforo con H₂O.

5.6.5. Preparación de la curva patrón de glucosa.

Se realizó una curva patrón de glucosa en un intervalo de 0.2 a 2.0 mg/mL, para lo cual se hizo reaccionar 1 mL de glucosa de concentración conocida con 1 mL de DNS, y posteriormente se tomó la lectura a 540 nm.





5.6.6. Preparación de las muestras para la cuantificación de azúcares reductores.

La solución acuosa de azúcares reductores, se colocó en una matraz aforado de 10 mL y se llevo al aforo.

Se tomo 1 mL de esta última solución, se colocó en un tubo de ensaye, se adicionó 1 mL del reactivo de DNS y se calentó por 5 min en baño María, posteriormente se enfrió y aforo a 10 mL.

A continuación, se leyó en el espectrofotómetro la absorbancia del derivado obtenido. De acuerdo al método seleccionado, se tomó la lectura a 540 nm tanto de la curva patrón como de las muestras.

Se cuantificaron los azúcares reductores interpolando los valores de absorbancia obtenidos de la muestras, en la curva patrón preparada.

La ecuación de la recta de la curva patrón es:

$$y = 0.2576 x + 0.0412$$

Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 12. Porcentaje de azúcares reductores obtenida en la muestra

Muestras hidrolizadas	% de azúcares reductores
1	59
2	62
3	62
	Promedio = 61

El % de azúcares reductores presentes en la muestra es del 61 %





5.7. Prueba de Identificación de Fenoles:

Esta técnica se llevó a cabo con el reactivo cloruro férrico al 1%. La reacción prueba se considera positiva cuando la reacción entre la muestra y el reactivo.

Resultado: Prueba negativa

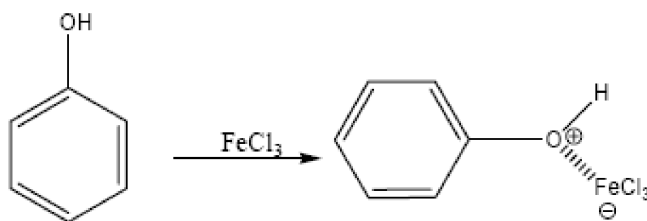


Figura 13. Reacción para identificación de fenoles.

5.8. Determinación de minerales

Esta determinación se llevo a cabo en el U.S.A.I., edificio B Facultad de Química, a cargo de la Q. Araceli Tovar Tovar.

Método analítico utilizado: Espectrofotometría de Absorción Atómica

Equipo empleado: Varian Spectr AA 220.

Análisis realizado siguiendo el procedimiento técnico: PT-USAI-FQ-AA-001.

La muestra fue digerida en horno de microondas marca CEM modelo MDS 2000, empleando ácido nítrico.

A continuación se presentan las curvas de calibración obtenida durante el análisis.





Tabla 13. Determinación de Calcio (Ca)

Concentración (ppm)	Absorbancia
0.2	0.0471
0.4	0.0871
0.6	0.1213
0.8	0.1666
1	0.191

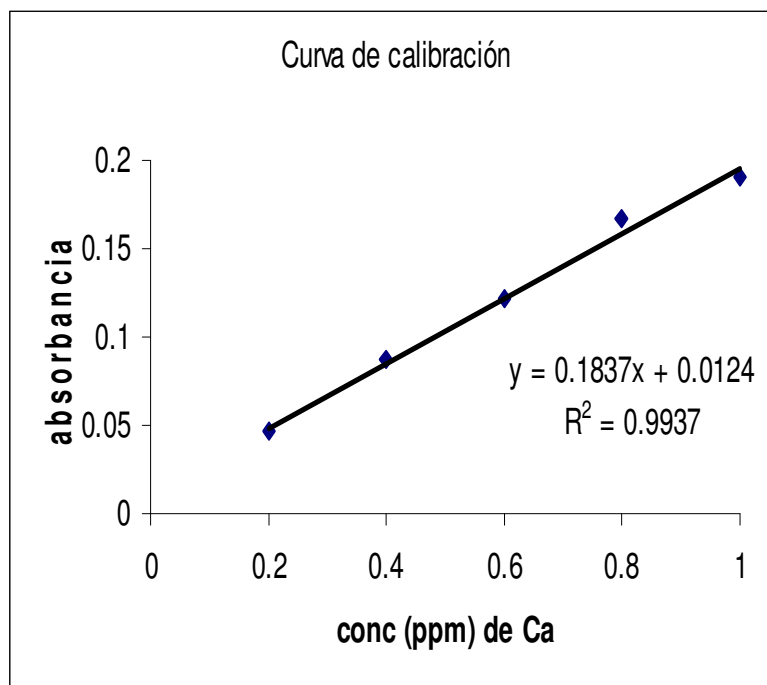


Figura 14. Curva de calibración para calcio (Ca).





Tabla 14. Determinación de Sodio (Na)

Concentración (ppm)	Absorbancia
0.1	0.1473
0.2	0.2001
0.3	0.2447
0.4	0.2766
0.5	0.37014

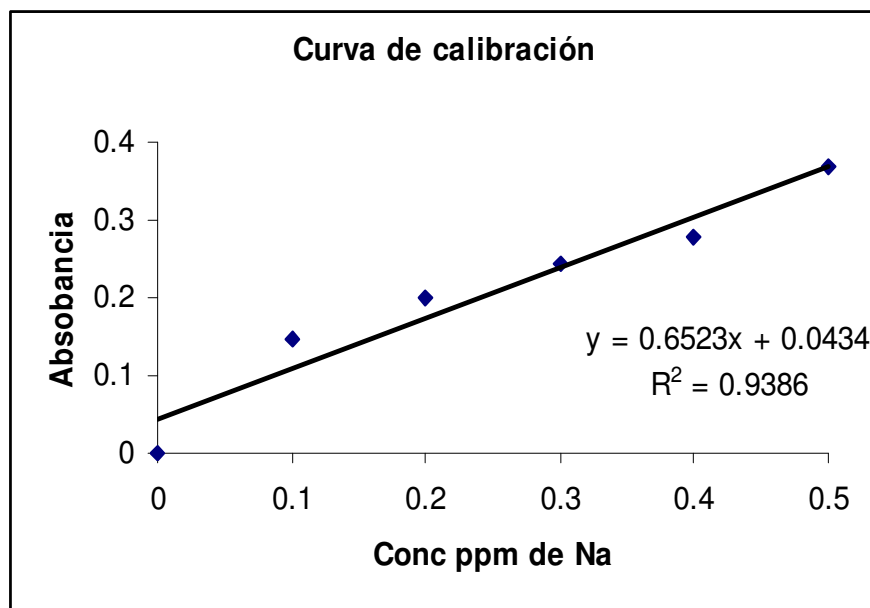


Figura 15. Curva de calibración para sodio (Na).





Tabla 15. Determinación de Potasio (K)

Concentración (ppm)	Absorbancia
0.2	0.0617
0.4	0.1659
0.6	0.2791
0.8	0.388
1	0.4379

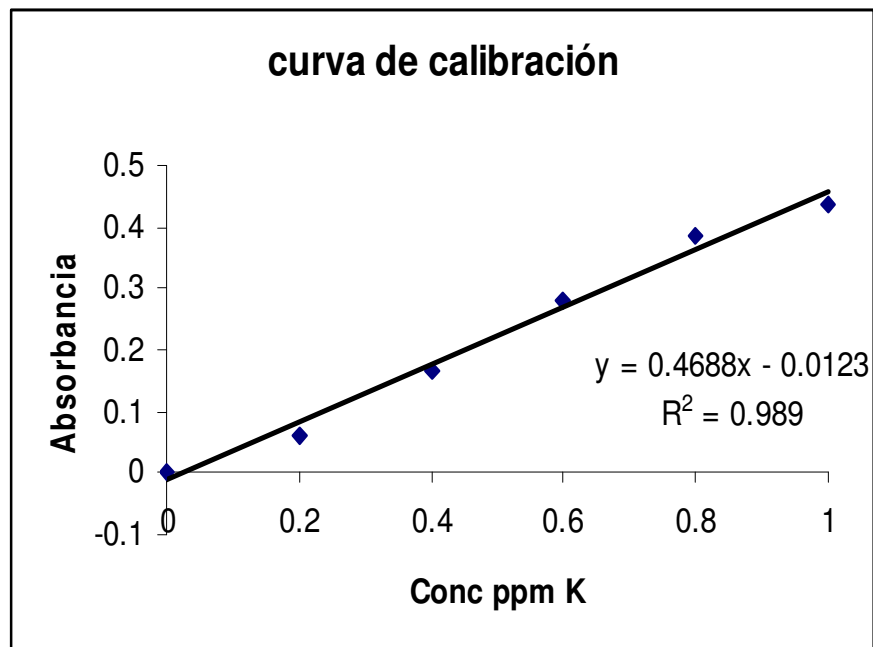


Figura 16. Curva de calibración para potasio (K).





Resultado de la concentración de calcio, magnesio y potasio en una muestra sólida de semillas del níspero:

Tabla 16. Resultados de la determinación de minerales

Muestra	Ca (ppm)	Na (ppm)	K (ppm)
Promedio	30017.061	28859.245	19022.165

ppm= mg/L





CAPÍTULO

VI

RESULTADOS

A continuación se muestran los resultados de los análisis efectuados a la semilla de níspero.

Humedad.....	11.75%
Cenizas totales.....	1.40 %
Glucósidos cianogénicos.....	1.245 ppm
Proteínas.....	5.02 %.
Almidón. Prueba cualitativa positiva	
Azucares reductores.....	60.0 %
Fenoles. Prueba negativa	
Minerales:	
Calcio.....	30017.061 ppm
Potasio.....	19022.16 ppm
Magnesio.....	28859.245 ppm

Se cuantificaron los glucósidos cianogénicos, y se encontró una cantidad que no representa un riesgo en su consumo.

Es importante recordar que la semilla no se consume, pero en el campo puede darse un consumo accidental por los niños o los animales.

Con el trabajo experimental realizado se logro contribuir al estudio químico de la semilla del níspero.





CAPÍTULO

VII

Conclusiones

- ✓ Se realizó el estudio fitoquímico de la semilla de *Eriobotrya japonica* (Níspero).
- ✓ Se determinó el contenido de humedad en la semilla la cual es del 11.75%.
- ✓ El porcentaje de materia inorgánica es de 1.40 %
- ✓ Se realizó la cuantificación de cianuro de hidrogeno en una muestra de semillas de níspero. La cantidad encontrada fue de 1.24 ppm, por lo que en caso de ser consumida no ocasionaría un daño apreciable en el organismo, por lo que sólo sería tóxica si se consumiera en grandes cantidades. ya que la toxicidad se manifiesta cuando la concentración de cianuros está por arriba de 100 ppm.
- ✓ Se determinó la cantidad de proteínas en la muestra la cual es de 5.02 %
- ✓ Aplicando la técnica de DNS se cuantificaron los azúcares reductores, con tal fin se preparó una curva patrón. Esta técnica puede ser incorporada como un experimento para la química asignatura de química orgánica III (1521), dentro del tema “Carbohidratos”





✓ Los resultados obtenidos por medio de absorción atómica, indican la presencia de calcio, potasio y magnesio. Por esto y dada la baja cantidad de glucósidos cianogénicos, se puede sugerir su empleo como complemento alimenticio para algunos animales.

✓ Este trabajo presenta una aportación al conocimiento del níspero *Eriobotrya japonica*, que es un producto natural de consumo en la vida cotidiana y específicamente un componente de la planta; la semilla de la cual no se conoce una aplicación.





CAPÍTULO

VIII

ANEXO

Índice de tablas

Tabla	Título	Página
1	Comparación entre los métodos para determinar humedad.	23
2	Comparación entre los métodos para determinar cenizas totales.	25
3	Efectos probables a diferente concentración de HCN.	28
4	Comparación entre los métodos para la determinación de proteínas.	34
5	Determinación del peso de la semilla.	38
6	Obtención de extractos.	39
7	Determinación del porcentaje de humedad.	40
8	Determinación de materia inorgánica por el método de cenizas.	41
9	Curva patrón de HCN	44
10	Concentración de HCN contenido en la muestra.	44
11	Resultados de la determinación de proteínas.	45
12	Porcentaje de azúcares reductores obtenido en la muestra.	48
13	Determinación de calcio (Ca).	50
14	Determinación de sodio (Na).	51
15	Determinación de potasio (K)	52
16	Resultados de la determinación de minerales.	53





Índice de figuras

Figura	Título	Página
1	Origen y distribución de nísperos	11
2	Árbol de <i>Eriobotrya japónica</i>.	14
3	Hojas de <i>Eriobotrya japónica</i>.	14
4	Flores blancas de <i>Eriobotrya japónica</i>.	15
5	Fruto de <i>Eriobotrya japónica</i>.	16
6	Estructura general de glucósido cianogénico.	26
7	Reacción de hidrólisis del glucósido cianogénico.	28
8	Reacción de formación de la isopurpurina.	29
9	Unidad de digestión Kjeldahl.	31
10	Reacción de Fehling y Benedict.	35
11	Reacción de cuantificación por el método de DNS.	37
12	Equipo para la determinación de cenizas.	41
13	Reacción para la identificación de fenoles.	49
14	Curva de calibración obtenida de calcio (Ca).	50
15	Curva de calibración para el sodio (Na).	51
16	Curva de calibración para el potasio (K).	52
17	Resultados de la determinación de minerales.	53





CAPÍTULO

VIII

Referencias

- ¹ <http://articulos.infojardin.com/Frutales/fichas/nispero-nisperos.htm>.
- ² Manual de Química Orgánica 1521. Facultad de Química, UNAM.
- THE REVIEW OF NATURAL PRODUCT 4^a EDICION, EDITORIAL FACTS AND COMPARISONS, USA 2005.
- FLORA MEDICINAL DE MÉXICO TOMOS 1, 2, 3. SEDESOL, México 1994.
- Manual Análisis de alimentos fundamentos y técnicas, facultad de química, UNAM.
- NIELSEN S. (ed); Food Analysis Second Edition; An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland. 1998.
- NIELSEN S. (ed); Food Analysis Laboratory Manual; Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nueva York, 20.
- NOLLET, L. M. L (Ed).; Handbook of Food Analysis; M. Dekker, Nueva York 1996.
- HART F. L; Análisis moderno de los alimentos; Acribia. Zaragoza (España), 1991.
- JAMES, C.S; Analytical Chemistry of Foods: An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland. 1999
- KIRK R. S., Sawyer R; Egan, H. Composición y análisis de alimentos de Pearson, segunda edición; Compañía editorial continental SA de CV, México, 1996.
- LAYNE E. 1957. Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. Methods in Enzimology, 3:447-454





- PEARSON. D; Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos; Acribia, S.A. Zaragoza (España) 1993.
- SOUTHGATE, D.A.T.; Determination of Food Carbohydrates Second Edition; Elsevier Applied Science, Nueva York 1991.
- <http://www.arbolesornamentales.es/Rosaceae.htm>
- [http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/4085/1/tesis doctoral susana selle s.pdf](http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/4085/1/tesis%20doctoral%20susana%20selle%20s.pdf)
- <http://www.saludparati.com/plantasmedi1.htm>
- http://dietaysalud.iespana.es/plantasm/plantas_medicinales.htm
- www.ivia.es/sdta/pdf/libros/n52.pdf
- [Elmundoforestal.com/el corazón/níspero/níspero.html](http://Elmundoforestal.com/el_corazon/nispero/nispero.html)
- www.dspace.espol.edu.ec/ introducción a México
- <http://articulos.infojardin.com/Frutales/fichas/nispero-nisperos.htm>

