



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EVALUACIÓN BROMATOLÓGICA DE LA FRACCIÓN  
PROTEÍNICAS DE LA ALMENDRA DESTOXIFICADA DE  
HIGUERILLA (*Ricinus communis*)**

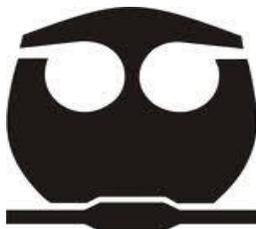
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

P R E S E N T A :

**MÓNICA CASTILLO SILVA**



**MÉXICO, D. F.**

**2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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:**                   **Profesor:** BERNARDO LUCAS FLORENTINO

**VOCAL:**                           **Profesor:** INOCENCIA MARIA DE LOURDES FLORES TELLEZ

**SECRETARIO:**               **Profesor:** LUCIA CORNEJO BARRERA

**1er. SUPLENTE**               **Profesor:** LILIANA ROCIO GONZALES OSNAYA

**2do. SUPLENTE**               **Profesor:** JEANETTE ADRIANA AGUILAR NAVARRO

## **SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

Está Tesis se Desarrollo en el Laboratorio 111, Departamento de Farmacia, conjunto E de la Facultad de Química, UNAM.

**ASESOR DEL TEMA:**

---

M. en C. BERNARDO LUCAS FLORENTINO

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

Q.A JESUS ANTONIO BEAZ RIVERA

**SUSTENTANTE:**

---

MÓNICA CASTILLO SILVA

**Esta tesis fue elaborada con el apoyo brindado por el  
Colegio de profesores de la Facultad de Química y la Sección  
024 del AAPAUNAM a través de la cátedra  
"Ninfa Guerrero de Callejas".**

**Semestre**

**2010-2**



# Agradecimientos

A Dios por permitirme vivir cada minuto de mi vida y darme mucha salud para terminar unos de mis más grandes logros.

A mi madre que es el ser más maravilloso del mundo, gracias por darme la vida y por el apoyo moral tú cariño y comprensión que desde siempre me has brindado y estar junto a mí en los momentos más difíciles.

A mi padre, porque has sido para mí un hombre grande y maravilloso, gracias por guiar mi camino con mucha energía positiva y por los buenos consejos, los cuales han hecho que sea lo que soy.

A mi hermano por el buen ejemplo a seguir de culminar mi carrera con esfuerzo y dedicación.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la máxima casa de estudios, a la Facultad de Química y por su puesto a todos los profesores por brindarme todos los conocimientos y habilidades que me han permitido desarrollarme como una gran profesionista.

Al profesor Bernardo Lucas Florentino, por haberme apoyado en todo momento a lo largo de mi proyecto de tesis por ser una excelente persona que sabe brindar todo su apoyo y comprensión siempre depositando una gran confianza.

A Miguel Angel Escamilla Vázquez por haberme brindado siempre su apoyo, confianza, comprensión, cariño y amistad en todo momento.

A Toño por dedicarme tiempo y apoyo en este proyecto.



A mis padres por no dejar de creer en mí, por el inmenso apoyo y confianza que en mí depositaron, por haberme dado lo mejor de la vida: la existencia misma, que me permitió el logro de una de mis grandes metas... el término de mi carrera.



## INDICE TEMATICO

	Página
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
2.1 Objetivo General	4
2.2 Objetivos Específicos	4
<b>3 ANTECEDENTES</b>	<b>5</b>
3.1 La higuera ( <i>Ricinus communis</i> )	5
3.1.1 Orígenes	6
3.1.2 Taxonomía	7
3.1.3 Morfología	7
3.1.4 Composición química de la semilla de higuera	8
3.1.5 Usos y aplicaciones	10
3.1.6 Análisis Económico	11
3.2 Factores tóxicos y antinutricionales	11
3.2.1 Factores tóxicos y antinutricionales en la Almendra de higuera	12
3.2.1.1 Lectinas	12
3.2.1.2 Alcaloides	14
3.2.1.3 Inhibidores de Tripsina	17
3.2.2 Factores tóxicos de la fracción lipofílica en la Almendra de higuera	18
3.2.2.1 Esteres de forbol	18
3.3 Digestibilidad “ <i>in vitro</i> ”	19
3.4 Estudio toxicológico “ <i>in vivo</i> ”	21
3.4.1 Variables Generales	22
3.4.1.1 Elección del modelo biológico	22
3.4.1.2 Elección de la vía de administración	23
3.4.1.3 Elección de la dosis	24
3.4.2 Toxicidad Aguda	24
3.5 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	27
<b>4 METODOLOGÍA</b>	<b>31</b>
Desarrollo experimental	31
4.1 Recolección de la semilla	32
4.2 Limpieza y selección de la semilla	32
4.3 Descascarado	32
4.4 Parámetros físicos	33

4.4.1 Dimensiones	33
4.4.2 Peso Hectolítrico	33
4.4.3 Peso unitario	33
4.4.4 Relación cáscara-almendra	34
4.5 Fraccionamiento de la almendra	34
4.6 Análisis Próximo	34
4.6.1 Humedad por secado al vacío	34
4.6.2 Cenizas totales	35
4.6.3 Proteína cruda	35
4.6.4 Cuantificación de Grasa	36
4.6.5 Fibra cruda	36
4.6.6 Hidratos de Carbono	37
4.7 Desengrasado	37
4.8 Determinación de factores tóxicos	37
4.8.1 Inhibidores de Tripsina	37
4.8.2 Determinación Cuantitativa de Lectinas	38
4.8.3 Determinación semi-cuantitativa de Alcaloides	39
4.8.4 Determinación Cuantitativa de Alcaloides	40
4.8.5 Determinación de esteres de forbol por HPLC	40
4.9 Digestibilidad proteica “ <i>in vitro</i> ”	40
4.10 Tratamiento con calor húmedo	41
4.11 Evaluación biológica	41
<b>5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>42</b>
5.1 Parámetros físicos	42
5.2 Análisis proximal	43
5.3 Factores tóxicos	45
5.4 Factores Tóxicos residuales después del tratamiento térmico	54
5.5 Digestibilidad “ <i>in vitro</i> ”	56
5.6 Toxicidad aguda	58
<b>6 CONCLUSIONES</b>	<b>64</b>
<b>7 BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO I</b>	<b>72</b>
<b>ANEXO II</b>	<b>113</b>

## INDICE DE TABLAS

Tabla No		Página
1	Taxonomía de la higuera	7
2	Clasificación de productos tóxico por vía oral	27
3	Parámetros físicos de la semilla y la almendra de la higuera	42
4	Análisis proximal de la semilla y almendra integra de higuera	44
5	Análisis proximal de la harina de la almendra desengrasada cruda y desengrasada destoxificada de higuera	44
6	Comparación del análisis proximal de la almendra de higuera en estudio con otras variedades	45
7	Factores tóxicos termolábiles presentes en la harina de la almendra integra desengrasada de higuera	47
8	Determinación de alcaloides cualitativamente	48
9	Factores tóxicos termolábiles presentes en la harina de la almendra integra de higuera desengrasada y destoxificada	55
10	Digestibilidad “ <i>in vitro</i> ”	57
11	Síntomas clínicos observados de inmediato al suministro de cada dosis para el estudio de toxicidad agudo.	59
12	Peso promedio de los ratones por lote durante los 14 días de estudio de toxicidad aguda	62
13	Prueba de comparación múltiple para el día 5	63
14	Distribución de animales conforme a su peso de acuerdo al método de la culebra Japonesa	109
15-21	Análisis estadístico (ANOVAS)	114

## INDICE DE FIGURAS

Figura No		Página
1	Hojas y fruto de higuera	8
2	Fruto y semillas de higuera	8
3	Estructura Química de la Ricinina	9
4	Diagrama general de desarrollo experimental	31
5	Cromatograma de la inyección del disolvente (THF)	52
6	Cromatograma de la inyección del estándar (éster de forbol 12 miristato, 13 acetato)	52
7	Cromatograma de la extracción de los ésteres de forbol de la almendra de higuera	53
8	Cromatograma de la inyección de la grasa de higuera	53
9	Cromatograma de la inyección de una muestra desengrasada de higuera	54
10	Equipo soxhlet	84
11	Forma para marcar ratones para un estudio de toxicidad	109
12	Dosificación de muestra para el estudio de toxicidad aguda	111

## 1. INTRODUCCIÓN

En México el hambre y la desnutrición continúa siendo un problema, debido a la escasez de alimentos, el crecimiento demográfico y la situación económica de la población, provocando un alto porcentaje de desnutrición proteínico-energético afectando principalmente a la población de bajos recursos económicos y la población infantil.

Actualmente esto ha llevado a investigadores a buscar nuevas alternativas de alimentos con potencial proteico-energético, los cuales deben ser de buena calidad nutricional. Estos estudios se han enfocado principalmente al aprovechamiento de nuevas fuentes de semillas oleaginosas.

El mal planeado desarrollo agropecuario en muchas comunidades rurales, pone en peligro la conservación de plantas silvestres o de cultivo incipiente, no importando que algunas de ellas tengan un alto potencial alimenticio y que sean apreciadas y utilizadas de manera sustentable en dichas comunidades. En estos entornos indígenas se destruye vegetación silvestre en forma indiscriminada (Flores, N., 1988), el riesgo de la implantación de la modernidad mal planeada en estas zonas, pone en peligro la pérdida de especies vegetales que hasta el momento no han sido valoradas en su plenitud (Hernández, J.E. et al ,1992)

En México existe una gran biodiversidad de plantas silvestres cuyas semillas tienen una alta potencialidad productiva y que pueden ser una fuente de nutrimentos para la alimentación humana o animal, un ejemplo de estas son las semillas de higuera (***Ricinus communis***) pertenecientes a la familia ***Euphorbiaceae***. Planta herbácea, resistente a sequías, heladas y plagas, que

puede crecer en áreas pedregosas, poco fértiles y con bajo contenido de nutrientes. La almendra de la semilla presenta un alto contenido de proteína (~18%) y grasa (46-55%); se ha reportado la presencia de factores altamente tóxicos como la ricina y ricinina, la primera es una lectina de las más potentes y mortíferas toxinas vegetales conocidas, por lo que se considera a estas semillas como venenosas, la segunda es un alcaloide que estimula el sistema nervioso central. La torta que se obtiene de estas semillas después de la extracción de aceite, es actualmente utilizado como fertilizante, ya que no es comestible debido a la presencia de dichos factores tóxicos; pero tiene potencial para ser utilizado como alimento para animales porque es rica en proteína cruda (~36%)(Pablo F. Politl, et al,1976).

En este trabajo se estudian las semillas de higuerilla que crecen de manera silvestre en los alrededores de Zacualtipan, Hgo., principalmente de San Agustín Metzquititlan. En un inicio se realizó el análisis proximal para la semilla, almendra integra y desengrasada, posteriormente en la almendra destoxificada. Ya que lo que se busca es el aprovechamiento de estas semillas como fuente potencial de proteína, se evaluó la digestibilidad "*in vitro*" de la harina desengrasada para contar con datos químicos que nos permitan predecir la calidad nutritiva de estas semillas. Se determinó el contenido de lectinas, alcaloides e inhibidores de tripsina en los diferentes preparados obtenidos de la almendra de higuerilla. Además se realizó la detección de Esteres de Forbol (carcinogénicos epigenicos) ya que estos compuestos tóxicos parecen estar restringidos a la familia *Euphorbiaceae* y hay

estudios recientes que reportan que existen miembros de esta familia que sí los presentan.

Para la destoxificación de la almendra de higuera se realizó un tratamiento con calor húmedo para su posterior desengrasado, con el fin de inactivar la ricina, la ricinina y de igual manera la inactivación de factores antinutrientales como lo son los inhibidores de tripsina ya que se sabe que estos son termolábiles. Se realizó la cuantificación de factores tóxicos residuales en la harina desengrasada destoxificada para verificar que su contenido no represente un riesgo toxicológico, finalmente se realizó un estudio de toxicidad aguda, para observar los efectos tóxicos adversos que aparecen en un periodo corto después de la administración de una dosis única y saber si la cantidad de tóxicos residuales no representan un riesgo significativo, se utilizó como modelo biológico ratones macho de la cepa ICR de 18-22 g de peso corporal de 1-2 semanas de edad, la administración fue por vía oral a una dosis inicial de 15 000 mg/kg de p.c , el periodo de observación de los animales fue de 14 días, se incluyó un lote control a los que solo se les suministro el vehículo, durante el experimento se realizó la observación clínica y un registro de peso corporal; ya que la pérdida de peso corporal es un índice simple de efecto tóxico.

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo General:

Evaluación bromatológica y toxicológica de la fracción proteínica destoxificada de la almendra de higuera (*Ricinus communis*), recurso vegetal de amplia distribución en el municipio de Zacualtipan, Hgo., con la finalidad de visualizar su posible aprovechamiento para alimentación animal.

### Objetivos específicos:

- ✓ Evaluar los parámetros físicos de la semilla de higuera para la caracterización de la variedad estudiada.
  - ✓ Realizar el análisis proximal de la semilla, almendra integra y en la harina desengrasada cruda y destoxificada.
  - ✓ Determinar el contenido de lectinas, inhibidores de tripsina, alcaloides y esteroides de forbol en los diferentes preparados obtenidos en la almendra de higuera.
  - ✓ Destoxificación de almendra de higuera por tratamiento con calor húmedo para inactivación de la ricina.
  - ✓ Obtención de la harina desengrasada de la almendra destoxificada.
  - ✓ Cuantificación de factores tóxicos residuales en la harina desengrasada destoxificada.
- 
- ✓ Determinación de toxicidad aguda en ratón hasta una dosis de 15,000 mg/kg p.c.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 La higuera (*Ricinus communis*)

En México existe una gran biodiversidad de plantas silvestres cuyas semillas tienen una alta potencialidad productiva y que pueden ser una fuente de nutrimentos para la alimentación humana o animal; sin embargo estos recursos están infrutilizados, en algunas ocasiones justificado por la presencia de sustancias dañinas que se presentan en forma natural. Tal es el caso de las semillas de higuera (*Ricinus communis*) pertenecientes a la familia *Euphorbiaceae* originaria del norte de África, donde se conoce desde hace más de 6.000 años. En la actualidad es cultivado con la finalidad de obtener el aceite de ricino, que tiene al menos 700 aplicaciones y la torta que se obtiene de estas semillas después de la extracción de aceite, es actualmente utilizado como fertilizante; en el suroeste de Nigeria, las semillas se fermentan y destoxifican para obtener un sazón llamado “ogiri-isi” (una especie de pasta elaborada con aceites) que se usa como condimento en sopas, ensaladas y guisos de arroz (Eugene N. Onyeike, et., al.2002).

La higuera se da muy bien en tierras marginales, y por lo tanto no compite con el cultivo de alimentos y ofrece una solución viable para convertir tierras marginales en tierras económicamente productivas (CONABIO, 2008).

La producción de la planta resulta económica para el campesino, pues no se necesitan fungicidas para el control de plagas debido a que el aceite sirve como repelente, y tampoco necesita estimulantes para su crecimiento. Tiene la facultad

de disminuir el nivel de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), ya que la planta toma el CO<sub>2</sub> del aire y mediante fotosíntesis lo convierte en aceite, lo cual regula la contaminación. Se puede cosechar todo el año, ya que el arbusto tiene racimos en distintos grados de maduración al mismo tiempo (CEIEGDRUS, 2006).

### 3.1.1 Orígenes

La higuera corresponde a *Ricinus communis*, familia de las *Euphorbiaceae*; *Ricinus* proviene del latín que significa garrapata y hace referencia a la forma de la semilla y *Communis* que significa común o corriente. Es originaria de África tropical (Abisinia) donde se conoce desde hace más de 6.000 años; y se extendió en los climas cálidos de todo el mundo. En el antiguo Egipto utilizaban el aceite de la semilla antes de que se conociera el aceite de oliva, como aceite de lámpara. De allí, pasó a ser cultivado en los demás continentes (CEIEGDRUS, 2006).

Otros nombres comunes usados en español son: ricino, palmacrísti, higuera, higuera del diablo, higuera infernal, tlapatl y palmacrísti.

Nombres en otros países e idiomas: castor bean, castor seed, castor-oil plant, palma Christi (inglés); catapucia mayor, ricino, higuera (Colombia); degha, higuera, koch, palma Christi, ricino (Cuba); higuera (Puerto Rico); mamona, mamoneira, tártago, ricino, ricino mamona, carrapateiro, palma Christi (Brasil); mbai-sivó, ambaí-sivó, palma Christi, higuera infernal (Paraguay); rizinussamen (alemán); semences de ricin (francés); tártago (Venezuela); tártago, higuera, castor (Argentina) (Martínez M. , 1979).

**3.1.2 Taxonomía**

Tabla 1. Taxonomía de la higuera

SUBREINO	<b><i>TRACHEOBIONTA</i></b>
División	<b><i>Magnoliophyta</i></b>
<b>Clase</b>	<b>Magnoliopsida</b>
Subclase	<b><i>Rosidae</i></b>
Orden	<b>Euphorbiales</b>
Familia	<b>Euphorbiaceae</b>
Género	<b><i>Ricinus</i></b>
Especies	<b><i>Ricinus communis</i></b>

Fuente: Rzedowski, 2001

**3.1.3 Morfología**

Se trata de una planta herbácea, a veces algo arbustiva, de color verde claro a azul-grisáceo, sus hojas están partidas de 5 a 8 segmentos tienen forma de estrella, con nervaduras rojizas y bordes dentados de tamaño irregular (Figura 1), sus flores se encuentran en racimos y los frutos son cápsulas espinosas de 1 a 2 cm de diámetro, en su interior hay 3 semillas de 10 a 7 mm de largo que pueden ser negras o jaspeadas, con la superficie lisa y brillante (Figura 2).

Habita en climas cálido, semicálido y templado, desde el nivel del mar hasta los 3000 metros sobre el nivel de mar. De amplia distribución, resistente a sequías, heladas y plagas, que puede crecer en áreas pedregosas, poco fértiles y con bajo contenido de nutrientes, como en terrenos de cultivo abandonados, a orillas de

caminos, ríos y riachuelos, está asociada a bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio y perennifolio, bosque espinoso, matorral xerófilo y bosques mesófilo de montaña, de encino y de pino (CEIEGDRUS, 2006; Medicina Tradicional Mexicana, UNAM)



**Figura 1.** Hojas y fruto de higuera (*Ricinus communis*.)



**Figura 2.** Fruto y semillas de higuera (*Ricinus communis*.)

### 3.1.4 Composición Química de la semilla de higuera

Las semillas contienen en promedio alrededor 46-55% de aceite, el ácido ricinoleico comprende más del 89% de los ácidos grasos de este aceite. Los demás ácidos grasos presentes son linoléico (4.2%), oleico (3.0%), esteárico (1%), palmítico (1%), di hidroxistearico (0.7%), ácido linolénico (0.3%) y ácido eicosánoico (0.3%) (D.S.Ogunniyi, 2006).

La higuera contiene 1-5% ricina y 0.3-0.8% de ricinina. La ricina es una de las más potentes y letales toxinas vegetales conocidas. Todas las partes de la planta contienen la ricina, pero las semillas son especialmente ricas con ella y son altamente tóxicas, otra sustancia tóxica presente en la higuera es la ricinina, un alcaloide de fórmula  $C_8H_8N_2O_2$  su nombre químico de acuerdo a la Unión

Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) es 4-metoxi-1-metil-2-oxo-piridine-3-carbonitrilo, su estructura química se observa en la Figura 3; este alcaloide se encuentra en las hojas y el pericarpio del fruto y pequeñas cantidades de ricinina se puede extraer junto con la ricina (M.R. Aslani, et. al, 2007). Pero se menciona que este contenido de ricinina varía mucho entre las partes de la planta: hojas de 1.3% (peso seco), el 2.5% en plántulas ahiladas, 0.03% en el endospermo de la semilla y 0.15% en la testa (cubierta de las semillas) ( BiodieselBR, 2011).

En la literatura también se menciona que estas presentan inhibidores de tripsina, factores antinutricionales que actúan inhibiendo a la tripsina, enzima proteolítica de suma importancia en la digestión de los humanos y animales monogástricos (Eugene N. Onyeike, et., al.2002; Liener, 1975).

La almendra de la semilla de higuierilla presenta un alto contenido de proteína (~18%), lo que hace que sea una potencial alternativa de este nutriente; la torta que se obtiene de estas semillas después de la extracción de aceite, es utilizado como fertilizante, pero tiene potencial para ser utilizado como alimento para animales ya que es rica en proteína cruda (~36%)( Pablo F. Polítl, et al,1976).

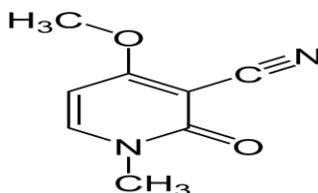


Figura 3. Estructura química de la Ricinina de formula  $C_8H_8N_2O_2$  (PM= 164.16)

### 3.1.5 Usos y aplicaciones

La planta de higuierilla o ricino se usa con fines medicinales, la aplicación más conocida de su aceite es como purgante para combatir trastornos digestivos, inflamación de la matriz, dolores estomacales, heridas, inflamaciones, abscesos, reumatismo, entre otras. Las hojas pueden ser empleadas como "cataplasma" para aliviar padecimientos físicos. La raíz tiene propiedades que ayudan a disminuir la fiebre. Sin embargo, puede ser tóxico cuando se ingieren dosis de aceite más altas de las que producen el efecto purgante o a problemas de tipo alérgico sobre la piel, causando una dermatitis por contacto con la semilla o el aceite. (Medicina Tradicional Mexicana, UNAM; Tlahui-Medic, 2008).

El aceite de ricino, es considerado como el "petróleo verde", actualmente tiene al menos 700 aplicaciones para elaborar plásticos, cosméticos, pinturas, recubrimientos, fungicidas, aplicaciones en la industria de motores de alta revolución, en la industria aérea, entre otras, es la única oleaginosa natural cuyas propiedades químicas le brindan la facultad de poderse transformar en una gran cantidad de productos que podrían reemplazar algunos derivados del petróleo como el biodiesel, el cual se puede utilizar de forma directa sin hacer modificaciones al motor con una eficiencia de 95 % en relación con el diesel de origen fósil ( CEIEGDRUS, 2006).

El aceite de ricino es señalado el mejor biocarburante o "biodiesel por ser el único soluble en alcohol, pues para ser utilizado debe de ser sometido a una reacción con alcohol etílico o metílico y sosa cáustica. Es considerado una fuente

importante de energía renovable puesto que el aceite de higuera puede reemplazar los plásticos que utilizan clorofluorocarburos (CFC) y con esto se protege también la desgastada capa de ozono y alivia el efecto invernadero (CEIEGDRUS, 2006).

### **3.1.6 Análisis Económico**

Hoy entre los mayores productores se citan India, China y Brasil; en Brasil se alcanza un rendimiento de hasta 1,5 tons/ha de semillas de ricino, mientras que el promedio mundial es de apenas 750 kg/ha (Sotologo, 2000).

Francia tiene un consumo por día de 20 toneladas de aceite y Estados Unidos de 137. México, en cambio importa 5 toneladas diarias para satisfacer las necesidades de la industria en sus diferentes empleos. Por cada 3 toneladas de semilla se puede obtener una tonelada de aceite, esto significa que las otras 2 toneladas es bagazo el cual puede ser aprovechado para la alimentación animal con un previo tratamiento térmico para su destoxificación; lo cual no se hace, ya que este actualmente lo utilizan como fertilizante. Su precio mínimo comercial por kilogramo de aceite es de 19.27 pesos con un costo de producción incluido: semillas, fletes, envases e impuestos es de 11.62 pesos por kilogramo. Con lo cual se obtiene una utilidad de 7.65 pesos por kilogramo de aceite. Margen que se considera de alta rentabilidad (CEIEGDRUS, 2006).

### **3.2 Factores Tóxicos y antinutricionales**

Por su modo de acción las sustancias nocivas en los alimentos pueden clasificarse en dos grandes grupos (López, 2000).

a) Sustancias antinutritivas: Su efecto tóxico se basa en disminuir la disponibilidad o provocar una pérdida suplementaria de los nutrientes esenciales. Estas sustancias provocan un desequilibrio que a largo plazo determinan la aparición de una patología particular, pero se puede compensar con un aporte adicional de los nutrientes implicados.

Pertenecen a este grupo, por ejemplo antivitaminas, antienzimas y secuestrantes de minerales. Los efectos nocivos de estas sustancias pueden pasar desapercibidos en el caso de una abundante alimentación.

b) Sustancias tóxicas: Son compuestos que tienen un efecto tóxico directo sobre el organismo. Su modo de acción puede explicarse por su particular reactividad, que hace que sean sustancias con un alto grado de toxicidad y pueden actuar por un mimetismo molecular de las hormonas, aminoácidos o en ciertos casos por la existencia de una información genética que favorezca la aparición de una determinada patología y produce una intoxicación aguda en ocasiones con una sola dosis.

### **3.2.1 Factores Tóxicos y antinutricionales en la almendra de higuera**

#### **3.2.1.1 Lectinas o Fitohemaglutininas**

Las lectinas son un grupo importante de proteínas y glicoproteínas que tienen la propiedad de ligar ciertos hidratos de carbono. Cuando estos hidratos de carbono forman parte de las paredes celulares las lectinas causan la aglutinación de las células que las contienen. Cuando las lectinas se unen a los hidratos de carbono

de las células epiteliales intestinales provocan una disminución de la absorción de nutrientes del tracto digestivo (Takayuki Shibamoto, 1996).

La primera descripción de una lectina fue presentada por Stiillmarken 1889, quien estudio la semilla de ricino y atribuyo su toxicidad a una proteína que llamo ricina, cuando observó que el extracto de las semillas aglutinaba las células sanguíneas. Hoy se sabe que la aglutinación por el extracto de las semillas de ricino se debe a otra toxina llamada RCA (Aglutinina del *Ricinus communis*).

Jaffé en 1960 encontró que la causa del efecto tóxico de las lectinas ingeridas se relaciona con su acción sobre la absorción intestinal, la lectina interacciona con grupos receptores situados en las superficies de las células que conforman la mucosa gástrica, interfiriendo en la absorción de nutrientes. Se ha observado que cuando los animales en experimentación consumen una dieta preparada con semillas de leguminosas con elevado contenido de lectinas tóxicas presentan diarrea, daño hepático, absorción reducida de aminoácidos, hipoglucemia, pérdida de peso y si la ingesta continua se presenta un daño severo al tracto gastrointestinal que puede producir la muerte del animal, por lo cual actualmente se consideran autenticas enterotoxinas (Jaffé 1968, Linener, 1975).

Se han encontrado lectinas en muchas legumbres utilizadas como alimentos, como en el frijol negro, semillas de soja, frijol de lima, guisantes y lentejas.

Las semillas de higuera contienen una lectina una de las sustancias naturales más tóxica, la ricina que pertenece a la familia de proteínas conocidas como proteínas inactivantes de los ribosomas que se unen de forma irreversible a los

ribosomas de las células eucarióticas impidiendo la síntesis de proteínas. La ricina es una glucoproteína compuesta de 2 cadenas, A y B, unidas por un puente disulfuro. La cadena B es una lectina y se une a la galactosa que contienen glucoproteínas y glucolípidos expresado en la superficie de las células, facilitando la entrada de ricina en el citosol. La cadena A inhibe la síntesis de proteínas mediante la inactivación de los ribosomas de células eucariotas a través de la eliminación de un único residuo de adenina en el bucle de RNA del ribosoma 28S que figura en las subunidades 60. Este proceso evita la elongación de la cadena de polipéptidos y conduce a la muerte celular. La dosis letal media (DL<sub>50</sub>) por vía oral en ratones es de 30 mg / kg p.c.

### **3.2.1.2 Alcaloides**

Los alcaloides constituyen un grupo muy heterogéneo de bases vegetales nitrogenadas con acción fisiológica mas o menos intensa sobre los animales. Hay algunos cuantos alcaloides de nitrógeno amídico que son neutros, como la colchicina y ricinina. La mayoría de los alcaloides se hallan en los vegetales como sales de ácidos orgánicos, en otras plantas puede haber un ácido asociado a los alcaloides, aunque con frecuencia se agrupan los alcaloides de acuerdo con su procedencia botánica, se les a considerado como productos terminales del metabolismo del nitrógeno.

Algunas funciones de los alcaloides en el mundo vegetal son las siguientes:

- Valor defensivo: Protección del vegetal ante los actos predatorios de insectos y animales herbívoros, aunque hay alcaloides que son tóxicos tanto para el hombre como para los animales superiores, pero no para los insectos.

-Valor alelopático: Las plantas utilizan los alcalóides para influir positiva o negativamente sobre otras especies próximas, bien para comunicarse con especies similares o inhibir el crecimiento de otras que podrían resultarles competitivas, como la cocaína, la cafeína o la estricnina que impide el crecimiento de otras especies junto a ellas.

Se han aportado datos que sugieren que algunos alcaloides intervienen en el crecimiento vegetal ya sea por su capacidad de formar quelatos o intervenir en fenómenos de oxidación-reducción, en lo que concierne su distribución en la planta, en ocasiones, se hallan restringidos a cierto órgano o a ciertas partes de la planta, a veces se les encuentra en toda la planta, hay casos en los que solo aparece en una etapa de crecimiento o época del año o en determinadas condiciones ecológicas (Xorge A. Dominguez, 1979).

Algunos alcaloides centran su radio de acción en alguna parte concreta del cuerpo, aunque muchos de ellos pueden actuar en distintos frentes a la misma vez, entre las partes más afectadas están las siguientes:

- Sistema nervioso: Algunos ejercen una función estimulante del sistema nervioso central (SNC) como la cafeína, la teobromina o la estricnina. Hay también algunos, como la aconitina que aunque inicialmente sean estimulantes,

posteriormente son paralisantes, también pueden actuar sobre ciertos músculos concretos, provocando su dilatación.

-Sistema digestivo: algunos son muy tóxicos para el aparato digestivo, produciendo irritaciones violentas de todas las mucosas gástricas con manifestaciones tan típicas como diarrea, vómitos, etc. entre estos están la ricinina cuyas propiedades se han utilizado como purgante.

-Sistema circulatorio: Su efecto se realiza sobre los vasos circulatorios como la reserpina de la *Rauwolfia vomitória* que baja la presión sanguínea, por lo que se utiliza para tratar la hipertensión.

-Sistema respiratorio: Se encuentran alcaloides que tiene la capacidad de dilatar los bronquios posibilitando un aumento de la respiración.

-Psicotrópicos: Alcaloides que afectan a la mente, alterando la percepción entre los que se mencionan: alucinógenos (producen alucinaciones o alteraciones en el pensamiento), narcóticos (inducen a un estado de somnolencia), estimulantes (producen un estado de euforia ).

La ricinina, es un alcaloide presente en las plantas de higuera; se pueden encontrar en todas partes de la planta principalmente en las hojas y pericarpio, se puede detectar desde las primeras etapas de desarrollo. Fue aislado por primera vez por Tuson en 1864, y su estructura se determinó por Henry en 1949 (Figura 3). La contribución de la toxicidad ricinina es muy pequeña debido a su baja actividad tóxica ya que está presente en bajas concentraciones, existen estudios que han demostrado que el pericarpio del fruto es cuatro veces más tóxico que

las hojas y los signos de intoxicación observados es que estos estimulan el sistema nervioso central (SNC) (Anete C. Ferraz, 1999, BiodieselBR, 2011) .

### **3.2.1.3 Inhibidores de Tripsina**

Son proteínas que tienen la capacidad de inhibir la actividad proteolítica de ciertas enzimas, actúan inhibiendo a la tripsina la cual es una enzima proteolítica de suma importancia en la digestión de los humanos y animales monogástricos. Son proteínas termolábiles que se encuentran en granos y semillas cuyo consumo reduce la digestibilidad y el aprovechamiento de proteínas que participan en el proceso digestivo. Los inhibidores más conocidos son los de Kunitz y Browman-Birk de la soya. El primero es una proteína celular, no helicoidal, con 197 aminoácidos, con un peso molecular de 21500 Daltons con dos enlaces disulfuro de los cuales una de ellos es fundamental para su actividad, el segundo consta de 72 aminoácidos, con un peso molecular de 7975 Daltons, este contiene 8 enlaces disulfuro, se asocia reversiblemente y forma una mezcla de monómero-dímero siendo más estable al calor, a los ácidos y a la pepsina que el primero. Ambos inhiben el crecimiento, reducen la absorción de lípidos, la digestibilidad de proteínas, causan hipertrofia pancreática, aumento de la secreción de bilis y jugo pancreático (Liener, 1975).

Nutricionalmente los inhibidores de tripsina causan un retraso en el crecimiento o un índice bajo de la eficiencia (PER). Estos inhibidores al ser inactivados por tratamientos térmicos hacen que el PER aumente.

La mayoría de los inhibidores de tripsina pueden ser destruidos mediante un adecuado tratamiento térmico, con lo que se logra mejorar el valor nutritivo de las proteínas.

### **3.2.2 Factores Tóxicos de la fracción lipofílica en la almendra de higuera**

#### **3.2.2.1 Esteres de forbol**

El término "Esteres de Forbol" (EF) se utiliza hoy para describir una familia de compuestos de origen natural ampliamente distribuida en las especies de plantas de las familias *Euphorbiaceae* y *Thymelaeaceae* (Haas et al. ,2002).

Los EF son los metabolitos a los que se les atribuye la principal causa de envenenamiento por el consumo de las semillas de *Jatropha curcas* (miembro de la familia *Euphorbiaceae*) y con base a su concentración son clasificadas como tóxicas o no tóxicas (Haas y Mittelbach, 2000). La cuantificación de los EF es un punto clave para el aprovechamiento de la harina de *Jatropha curcas* en la industria alimentaria; por lo que también sería un punto clave para la harina de las semillas de higuera, es por ello que se evaluó el contenido de EF en las semillas de higuera (*Ricinus communis*) para así clasificar a las semillas estudiadas como tóxicas o no tóxicas en función de la presencia de dichos metabolitos (Haas et al. ,2002).

Los EF son derivados de diterpenos tetracíclicos, estos compuestos son frecuentemente estudiados debido a sus actividades promotoras de tumores e inflamatorias. La actividad promotora de tumores parece estar asociada a la habilidad que los EF presentan de sustituir al diacilglicerol (DAG) como activador

de la proteína proteína quinasa C (PKC). Los EF actúan como un análogo de DGA y son fuertes activadores de la PKC. Estos activan la PKC y desencadenan la proliferación celular, lo que amplifica la eficacia de los agentes carcinógenos, promoviendo el crecimiento del tumor tras la exposición a dosis subcarcinogénicas de carcinógeno. De este modo, puede considerarse como co-carcinógeno. La concentración de los EF varía de 2 a 3mg/g en el núcleo y 2 a 4mg /g en el aceite en sus distintas variedades de ***Jatropha curcas***. A pesar de que los esteres de forbol son lipolíticos, pueden estar muy ligados a la matriz de la harina del núcleo. En un estudio realizado aproximadamente el 30% de los EF total estuvieron presentes en el núcleo de la semilla que contenía <1% de aceite (Cai-Yan et al., 2010).

Los estudios realizados en la última década muestran que ***Jatropha curcas*** exhibió toxicidad a una amplia variedad de organismos, desde los microorganismos a los animales mayores (Cai-Yan et al., 2010).

### **3.3 Digestibilidad “*in vitro*” de la proteína**

La digestibilidad es un indicador inicial de la calidad nutritiva de un alimento, aunque no siempre se cumple, y es definida como “la disponibilidad de los aminoácidos constituyentes de la proteína para ser absorbidos por el organismo de prueba” (Robinson, D.S ,1991)

Durante la digestión de las proteínas por animales monógtricos como el hombre los enlaces peptídicos se deben hidrolizar en forma relativamente rápida mediante las acción de enzimas proteolíticas específicas, las cuales son secretadas por el

estomago, la mucosa intestinal y el páncreas, de tal forma que se liberan aminoácidos y péptidos pequeños, los cuales en la mucosa intestinal pasan a aminoácidos libres y son absorbidos en el intestino delgado, donde pasan a la vena porta para distribuirse a través del sistema cardiovascular a todo el organismo (Moltó, J.C., 2006).

En general se conoce que los alimentos proteínicos de origen animal son más digeribles que los de origen vegetal (Swaisgood, H.E., 1991). Algunos factores que pueden influir en la digestibilidad de la proteína dietética son:

- La fracción proteínica dentro de los alimentos de origen vegetal, puede estar protegida de la acción enzimática por materiales celulares estructurales, como son hemicelulosa, lignina, etc.
- El procesamiento térmico en ocasiones puede mejorar la digestibilidad, debido a la desnaturalización de las proteínas nativas y hacerlas más susceptibles a la acción de las enzimas digestivas; sin embargo lo anterior se puede revertir para el caso de un sobrecalentamiento, ya que se puede modificar la solubilidad de las proteínas y hacerlas poco digeribles.
- Algunos alimentos de origen vegetal pueden contener factores tóxicos y antinutricionales que disminuyen la función de absorción de la mucosa intestinal o bien disminuyen la biodisponibilidad de los aminoácidos.

La digestibilidad de una proteína alimenticia se puede determinar por procedimientos "*in vivo*" e "*in vitro*". Los métodos "*in vitro*" simulan condiciones y reacciones fisiológicas que se llevan a cabo dentro del organismo; no obstante

de ser mas practicas en muchas ocasiones este tipo de métodos aunque son más precisos y reproducibles, pueden dar resultados inexactos. Por lo tanto, hasta la fecha los ensayos “*in vivo*” para la digestibilidad, son más confiables (Swaisgood, H.E., 1991).

### **3.4 Estudio toxicológico “*in vivo*”**

De modo genérico se puede definir la toxicidad de una sustancia como la capacidad de producir efectos nocivos aun organismo vivo. De este modo habrá sustancias que producirán efectos nocivos a bajas dosis y sustancias débilmente toxicas que acarrearán efectos nocivos solo si se utilizan o administran en dosis elevadas (Derache, 1990).

Uno de los conceptos fundamentales de toxicología es que solo la dosis determina la toxicidad, como observo Paracelso (1493-1541), “Todas las sustancias son venenosas, no hay ninguna que no sea venenosa .La dosis es lo que diferencia el veneno del remedio”. No obstante actualmente hay una propiedad intrínseca de cualquier sustancia que es su grado de toxicidad; así se tiene sustancias altamente tóxicas hasta aquellas relativamente inocuas.

A la hora de estudiar la toxicidad de un agente tóxico es preciso definir una gran cantidad de factores, dentro de los cuales los de mayor importancia son:

- ❖ Selección del organismo apropiado para la prueba (especie, sexo, edad, etc.)
- ❖ Dosificación: cantidad de sustancia por peso corporal.
- ❖ Tipo de Dosis: única o repetida.

- ❖ Vía de administración: oral, intraperitoneal, inyección, entre otras.

Las exigencias actuales de seguridad obligan, en todos los campos que se evalúen los niveles de riesgo que puede presentar un determinado xenobiótico para el hombre y para el medio ambiente (Derache, 1990).

### **3.4.1 Variables generales**

La primera variable que hay que considerar en un ensayo biológico toxicológico es el efecto biológico a monitorear, ya que de acuerdo a la respuesta biológica a evaluar se define el modelo biológico, la vía de administración entre otros. Además es necesario disponer del máximo de datos que den información sobre las características fisicoquímicas de la sustancia estudiada lo que permite definir las condiciones de manipulación y almacenamiento de dicha sustancia, así como definir ciertos modelos experimentales especialmente en relación a la vía o modo de administración.

#### **3.4.1.1 Elección del modelo biológico**

Es una de las tareas más difíciles con las que se encuentra el toxicólogo ya que, a pesar de que existen especies que presentan similitudes con el hombre, ninguna de ellas permite una extrapolación directa de los efectos observados en el animal al caso humano.

Dependiendo del tipo de efecto toxicológico estudiado se tendrá que el ratón, la rata, el conejo, el perro, el mono u otras especies serán, cada una en un caso determinado las que más se acerquen a la especie humana. La elección de la especie ha dependido frecuentemente de los siguientes elementos: la

disponibilidad de un determinado momento, la facilidad de manipulación del animal, un periodo de crecimiento corto, etc. De este modo para los estudios de administración por vía oral, cutánea o por inhalación, los animales preferidos son los roedores especialmente la rata y el ratón (Derache, 1990).

### **3.4.1.2 Elección de la vía de administración**

Por lo general los tóxicos deben administrarse por la misma vía por la cual los seres humanos quedarían expuestos. Por vía oral el producto puede administrarse con ayuda de una sonda esofágica o estomacal, mezclando el tóxico en la comida o en el agua de bebida de los animales. El primero es el más utilizado para los estudios cortos, el segundo para los estudios de toxicidad crónica o subaguda. La vía oral es la que más comúnmente se utiliza, usualmente se requiere un medio para disolver o suspender el tóxico a fin de facilitar su administración, aun cuando el tóxico sea líquido puede necesitar un diluyente, el medio *per se* debe tener poco o ningún efecto de toxicidad y no debe reaccionar el tóxico; algunos vehículos o disolventes son: el agua, solución salina, gomas y derivados de celulosa (Derache, 1990; Frank C. Lu, 1992).

Para la dosificación se debe administrar un volumen el cual sea lo suficientemente grande para medirlo con facilidad, pero a su vez debe ser lo bastante pequeño para no producir traumatismo en el animal, cuando se ha de administrar una dosis alta del tóxico a un animal puede ser aconsejable utilizar dosis divididas. El máximo volumen permitido en ratones, tanto por vía oral como intraperitoneal es de 1 mL (Frank C. Lu, 1992).

### **3.4.1.3 Elección de la dosis**

La elección de las dosis varía en función del estudio toxicológico a realizar. El estudio de la toxicidad aguda necesita utilizar fuertes dosis de sustancias, obteniendo así intoxicaciones en animales, está además autorizada, con ciertas reservas, la extrapolación al hombre en caso de absorción masiva voluntaria o accidental. Se oscila siempre entre dos soluciones, dosis demasiado bajas que no permiten conocer los efectos tóxicos después de una administración repetida del producto y dosis excesivamente altas que conllevan una mortalidad elevada que nos enmascara los otros efectos tóxicos que deseábamos observar (Derache, 1990).

En el procedimiento descrito en la guía OECD 425, para estimar la toxicidad aguda oral por el método Up-and-Down (UDP) sugiere que se use el factor de dosis progresivo de 3.2 entre las dosis que produce los mejores resultados, ya que reduce al mínimo el número de animales necesarios para estimar la toxicidad aguda por vía oral de una sustancia química. Además de que los intervalos de confianza y la prueba permiten la observación de signos de toxicidad, un uso más eficiente de los animales y aumenta la precisión en la predicción de la DL50. (OECD Test Guideline 425, 2001).

### **3.4.2 Toxicidad aguda**

La toxicidad aguda se definió como los efectos tóxicos adversos que aparecen en un corto periodo después de la administración de una dosis única o de múltiples dosis repartidas en un intervalo de 24 horas.

La evaluación de la toxicidad aguda se efectúa administrando la sustancia o las sustancias problema una sola vez, con el fin de establecer la dosis que provoca la muerte del 50% de los animales o causa un efecto no deseado. (Derache, 1990).

La toxicidad aguda de una sustancia se expresa como los mg/kg de peso corporal (c.p) necesarios para provocar la muerte al 50% de la población de animales de estudio lo cual ha sido definido como la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) (Tabla 2).

El estudio de toxicidad aguda permite:

- Calcular una dosis o concentración letal media ( $DL_{50}$ ), que es por definición la expresión estadística de la dosis única de una sustancia que provocaría supuestamente la muerte al 50 % de los animales.
- Definir la naturaleza de los efectos tóxicos observados, estableciendo una relación directa entre su intensidad y la dosis o concentración administrada.
- Ofrecer recomendaciones sobre cómo llevar a cabo los estudios toxicológicos de larga duración.

Se debe realizar sobre grupos homogéneos de animales que reciben la sustancia a estudiar en concentraciones crecientes, de modo que se pueda calcular por una forma matemática la dosis que provoca la muerte del 50% de los animales. Este valor, dosis o concentración letal media ( $DL_{50}$ ), calculada por un procedimiento estadístico, debe reportarse siempre por los límites de confianza indicando la estimación del error en el valor obtenido.

La duración del periodo de observación de los animales es en general de 14 días. Las especies con las que se realizan los estudios de toxicidad aguda son el ratón, rata y ocasionalmente conejo.

Durante el ensayo de toxicidad se registran los síntomas de intoxicación, la mortalidad, lesiones de los órganos observados durante un examen macroscópico realizado durante la autopsia de los animales muertos durante el periodo de observación y de los animales supervivientes sacrificados al final del periodo.

Algunos de los síntomas clínicos que se deben observar y que señalan toxicidad son:

- Lardosis: curvatura de la columna vertebral caracterizada por un movimiento ondulante del lomo.
- Xifosis: Curvatura dorsal de la columna vertebral caracterizada por un movimiento ondulante de la cadera.
- Disnea: frecuencia anormal de la respiración.
- Cianosis: coloración azulada en la piel debido a la falta de oxigenación.
- Ataxia: Falta de coordinación muscular manifestada por un trastorno de equilibrio.
- Piloerección: estimulación del sistema nervioso simpático provoca la contracción de los músculos erectores, ubicados en la base de los folículos pilosos, lo que ocasiona que se levanten. Esto cierra los poros y evita la pérdida de calor.
- Aletargamiento: periodo de inactividad y reposo de algunos animales.

**Tabla 2.** Clasificación de productos tóxicos (por vía oral)

CATEGORIA	DL50
Supertóxico	5 mg / kg
Extremadamente tóxico	5-50 mg /kg
Altamente tóxico	50- 500 mg /kg
Moderadamente tóxico	0.5-5 g/kg
Ligeramente tóxico	5-15 g/kg
Prácticamente no tóxico	>15 g/kg

### 3.5 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

La Cromatografía líquida de alta eficacia o *High performance liquid chromatography* (HPLC), también se la denomina a veces Cromatografía líquida de alta presión o *High pressure liquid chromatography* (HPLC). Es un método de separación física basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre una fase estacionaria y una fase móvil que en este caso es un líquido. La cromatografía líquida “clásica” se lleva a cabo en una columna generalmente de vidrio, la cual está rellena con la fase estacionaria. Luego de sembrar la muestra en la parte superior, se hace fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad. Con el objeto de aumentar la eficiencia en las separaciones el tamaño de las partículas de fase fija se fue disminuyendo hasta el tamaño de los micrones lo cual generó la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que la fase móvil fluya a velocidades razonables. De esta manera, nació la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que requiere de instrumentación

especial que permita trabajar con las altas presiones requeridas. Dependiendo del tipo de fase estacionaria y del tipo de fenómeno físico que provoca la separación, la cromatografía líquida de alta resolución puede clasificarse en:

1. Cromatografía de adsorción: La fase estacionaria es un sólido y se utiliza casi exclusivamente sílice (sílica) y en casos discretos alumina.
2. Cromatografía de reparto o partición. Actualmente se utiliza como fase estacionaria compuestos ligados químicamente a un soporte sólido de sílice. Se puede subdividir en cromatografía en fase normal y en fase inversa (usualmente mal llamada reversa por traducción de “reversed”). En la cromatografía en fase normal la fase estacionaria es polar (como por ejemplo sílice) y la fase móvil es poco polar (hexano, diclorometano, cloroformo). En esta modalidad los compuestos más polares quedan más retenidos mientras que los menos polares eluyen primero. En la cromatografía en fase inversa, el compuesto unido químicamente es no polar, frecuentemente hidrocarburo alifático, y se emplean las fases móviles con solventes polares (agua, metanol, acetonitrilo). En este caso, las sustancias más polares eluyen primero y las hidrofóbicas quedan más retenidas.
3. Cromatografía de iones: Se utilizan columnas rellenas con fases estacionarias con una determinada carga que retienen iones de carga opuesta. Las fases estacionarias para la modalidad clásica de esta cromatografía son las resinas de intercambio iónico.

4. Cromatografía de exclusión por tamaño: La fase estacionaria está formada por partículas de porosidad definida y uniforme. Las moléculas de mayor tamaño tienen menor capacidad para acceder a los poros y por mantenerse “excluidas” eluyen más rápido, mientras que las de menor tamaño que pueden penetrar en los poros y permanecer allí más tiempo eluyen en último lugar.

La fase móvil puede ser un solvente puro o una mezcla de solventes. Cuando se trata de una mezcla, puede programarse la bomba para que tome solventes de diferentes botellas en una proporción determinada y realice la mezcla en una cámara de mezclado. Cuando durante toda la separación se utiliza siempre el mismo solvente, se denomina isocrática, sin embargo es normal realizar gradientes de composición de solvente para aumentar el rango de polaridades de sustancias a separar acortando el tiempo total de análisis. Estos gradientes de solvente también son realizados en forma automática por las bombas. La bomba envía al solvente hacia la válvula inyectora a través de tuberías de diámetro pequeño, de acero inoxidable o de plásticos especiales.

Luego de que se produce la separación en la columna, los componentes de la mezcla pasan por el detector que genera una señal eléctrica ante el pasaje de los analitos proporcional a la cantidad de sustancia. Esa señal es enviada al registrador o a la PC en donde queda registrado el cromatograma. En el caso ideal los picos cromatográficos son gaussianos y cada pico corresponde a un componente de la muestra original. El integrador puede calcular además el área

correspondiente a cada pico, la cual es proporcional a la cantidad de sustancia. Dado que los detectores de HPLC son no destructivos, es posible recuperar los productos que salen de él. De esta manera, dependiendo del tamaño del loop de inyección y de la columna, y del tipo de bomba, es posible realizar además de separaciones analíticas, cromatografías preparativas. Por otra parte es necesario tener en cuenta que dado que se utilizan altas presiones, es imprescindible evitar la presencia de partículas que puedan obstruir las tuberías y la formación de burbujas que puedan deteriorar el relleno de las columnas y producir inestabilidad en la señal del detector. Para evitar las obstrucciones, los solventes y las muestras a inyectar se filtran con membranas de 0,45 a 0,22  $\mu\text{m}$ . Para evitar la formación de burbujas, los equipos de HPLC cuentan con desgasificadores de solvente por vacío o por burbujeo con He, y, en el caso de no contar con los mismos, se deben desgasificar los solventes por medio de ultrasonido o agitación bajo vacío antes de utilizarlos como fase móvil (Skoog, 2001).

4. METODOLOGÍA

A continuación se representa en la Figura 4 el diagrama de trabajo general posteriormente se describe con más detalle algunos aspectos de este diagrama.

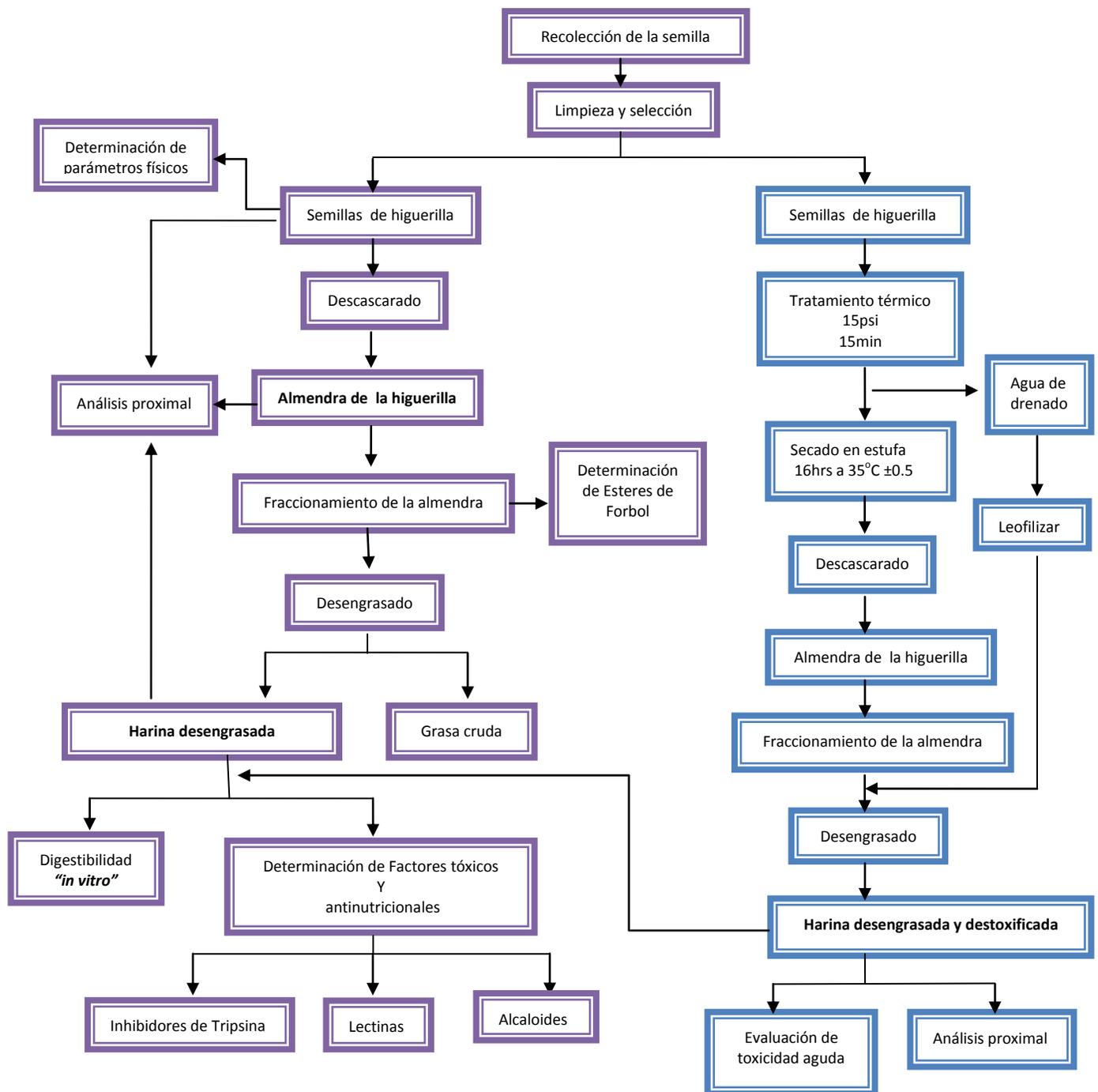


Figura 4. Diagrama General de desarrollo experimental

### **4.1 Recolección de la semilla**

Las semillas de higuera fueron recolectadas de plantas silvestres que crecen en los alrededores del Municipio de Zacualtipan Hidalgo, principalmente de San Agustín Metzquititlan, en el estado de Hidalgo.

### **4.2 Limpieza y selección de la semilla**

La semilla fue recolectada de las plantas silvestres y algunas de ellas aun venían en el fruto, por lo que se sacaron con ayuda de unas pinzas de punta, de manera cuidadosa sin dañar la semilla y una vez que se tuvo suficiente semilla se procedió a realizar un análisis selectivo, en el cual se separaron las semillas que estaban quebradas e inmaduras.

También se realizó una limpieza y clasificación, para separar impurezas, polvo y cuerpos extraños.

Una vez que se tuvo las semillas limpias y seleccionadas se tomó un lote representativo para realizar las determinaciones.

### **4.3 Descascarado**

Esta parte tiene como objetivo obtener la almendra integra de la semilla de higuera, esto se realizó con la ayuda de unas pinzas de punta procedimiento que consistió en tomar una semilla de higuera y colocarla entre las pinzas apretando ligeramente (con cuidado para evitar dañar a la almendra) hasta quebrar la cáscara, después se sacó la almendra manualmente de la cáscara; la almendra integra obtenida se colocó en un recipiente color ámbar y se guardó en refrigeración hasta su uso.

## **4.4 Parámetros físicos**

Con la finalidad de comparar los resultados obtenidos con otras variedades, se determinaron algunos parámetros físicos, las técnicas utilizadas se detallan en el (ANEXO I).

### **4.4.1 Dimensiones**

Se determinaron con el fin de caracterizar la semilla de higuera, las dimensiones que se midieron fueron ancho y largo tanto de la semilla como de la almendra esto con ayuda de un Vernier.

### **4.4.2 Peso hectolítrico**

*Fundamento:*

El peso hectolitro es el criterio más utilizado para determinar el grado y la calidad de los cereales. Se relaciona con la densidad real del grano.

Se cuantifica midiendo el peso de una muestra representativa del lote que ocupa un volumen estandarizado, es decir la densidad aparente del grano. Generalmente el valor se expresa en kg/HL (Serna, 1996).

### **4.4.3 Peso unitario**

*Fundamento:*

Es el peso de un volumen determinado de semillas; para una misma especie, parámetro de calidad que nos ayuda a caracterizar y comparar con otras especies ya que no sólo basta que una semilla sea genéticamente idónea, sino además que se encuentre en un estado fisiológico óptimo.

#### **4.4.4 Relación cáscara-almendra**

Esta parte tiene como objetivo conocer la relación porcentual de cáscara y almendra de la semilla de higuera.

#### **4.5 Fraccionamiento de la almendra**

La almendra integra de la semilla de higuera tiene una alta concentración de grasa, por lo cual es necesario solo fraccionarla (no molerla) para su posterior desengrasado ya que si esta se pasa por un molino se perdería gran cantidad de muestra al quedarse adherida al molino.

#### **4.6 Análisis Próximo**

El análisis proximal fue desarrollado por Weende hace más de 100 años, en este tipo de estudio se determinan los componentes principales de los alimentos como humedad, proteína, grasa, cenizas, fibra e hidratos de carbono por diferencia. Los resultados de este análisis son de suma importancia ya que son una guía hacia dónde dirigir un estudio posterior. Este análisis se hará siguiendo las técnicas descritas y aprobadas en el AOAC (Horwitz, W. and Latimer, Batemen, 2006) las cuales se detallan en el (ANEXO I).

##### **4.6.1 Determinación de Humedad por secado al vacío**

*Fundamento:*

El agua en los alimentos se encuentra en dos formas como “agua libre” o “agua ligada”, el agua libre es la forma predominante y es la que no está físicamente unida a la matriz del alimento y se puede perder con facilidad por secado, mientras que el agua ligada se halla combinada o absorbida, se encuentra en los alimentos

como agua de cristalización o ligada a las proteínas y las moléculas de sacáridos. La Humedad se define como la pérdida de agua debido a la evaporación de la muestra durante el secado; esta determinación se realizó en estufa al vacío a 60-65 °C.

## 4.6.2 Cenizas totales

*Fundamento:*

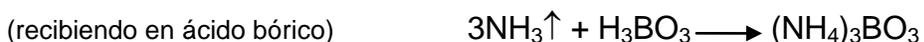
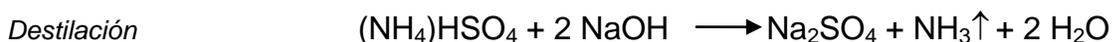
De la carbonización y posterior calcinación de la muestra a 550 °C se obtiene lo que se denomina cenizas y que comprende el material inorgánico (minerales).

(Kirk et al., 2006).

## 4.6.3 Proteína cruda

*Fundamento:*

El método de Kjeldahl se basa en la combustión en húmedo de la muestra por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado en presencia de catalizadores metálicos, para reducir el nitrógeno orgánico de la muestra hasta nitrógeno en forma de amoníaco, el cual queda en solución en forma de sulfato ácido de amonio. El resultado de la digestión, una vez alcalinizado se destila directamente o por arrastre de vapor para desprender el amoníaco, el cual es atrapado en una solución de ácido bórico formando borato de amonio, el cual se titula con HCl.



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 tiene una cantidad aproximada de 16% de Nitrógeno (Kirk et al., 2006).

#### **4.6.4 Cuantificación de grasa**

*Fundamento:*

Las grasas se definen como un grupo heterogéneo de compuestos que son insolubles en agua, pero solubles en compuestos orgánicos tales como cloroformo, benceno, hexano, éter etílico y éter de petróleo. El contenido de grasa se determina comúnmente por métodos de extracción con disolventes orgánicos los cuales al ponerse en contacto con el alimento, solubilizan la grasa y la arrastra consigo para su posterior cuantificación (Nielsen, 1998).

#### **4.6.5 Fibra cruda**

*Fundamento:*

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

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

## **4.6.6 Hidratos de Carbono**

*Fundamento:*

Se determinan por diferencia, es decir; la suma de los porcentajes de los componentes principales (humedad, cenizas, fibra, proteínas y lípidos) menos 100%, proporciona los Hidratos de Carbono presentes en la muestra.

## **4.7 Desengrasado**

*Fundamento:*

Las grasas son solubles en disolventes orgánicos y la grasa presente en la muestra tiene una alta solubilidad en hexano por lo que al estar en contacto con este disolvente es extraída dando como resultado una harina desengrasada.

## **4.8 Determinación de Factores tóxicos**

Las técnicas se describen detalladamente en el (AXEXO I).

### **4.8.1 Inhibidores de Tripsina**

*Fundamento:*

La técnica es la utilizada por Kakade y colaboradores, donde el extracto directo o diluido se pone en contacto con una solución estandarizada de tripsina (40  $\mu\text{g}/10$  mL), y después de cierto tiempo se determina la actividad proteolítica remanente, por medio de un substrato sintético (BAPNA), el cual producirá una coloración leyendo su absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410nm, la absorbancia es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de la muestra.

Una unidad de tripsina (U.T.) es arbitrariamente definida como un incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm por 10 mL de mezcla de reacción descritas por Kakade y colaboradores. La actividad de inhibidores de tripsina se expresa en términos de unidades de tripsina inhibida (U.T.I.) (Kakade, M, et al., 1974).

### **4.8.2 Determinación cuantitativa de Lectinas (Hemaglutininas)**

*Fundamento:*

La técnica se basa en la capacidad de aglutinar los eritrocitos por efecto de la cantidad de lectinas presentes. Se realiza mediante el método de microtitulación que es rápido y requiere una mínima cantidad de muestra.

Consiste en diluciones seriadas de las cuales se determina el punto final de la aglutinación de los glóbulos rojos obtenidos de la sangre de hamster lavados y sensibilizados con solución de proteasa para mejorar la sensibilidad (desdoblamiento de los glóbulos para mejorar la exposición de su superficie y favorecer la unión de las lectinas a la pared de estos); se determina la cantidad mínima del extracto acuoso de una muestra vegetal, que produce prueba positiva de aglutinación con los eritrocitos de hámster y este valor se relaciona con la cantidad mínima de ricina que produce prueba positiva de aglutinación definiéndose como una unidad hemaglutinante (U.HG.) el equivalente a 1 mg de dicha lectina ( Lucas B. et al., 1993).

### 4.8.3 Determinación semi - cuantitativa de Alcaloides

*Fundamento:*

La técnica se basa en una primera extracción con metanol del material biológico seco y desengrasado. Después la acidificación con el fin de precipitar proteínas y componentes que puedan intervenir en la determinación. El filtrado se alcaliniza y se hace una extracción con cloroformo para extraer los alcaloides. Posteriormente se lleva a sequedad y el residuo obtenido es entonces ensayado con los siguientes 7 reactivos para alcaloides:

- 1) Reactivo de Mayer (Cloruro de mercurio y yoduro de potasio)
- 2) Reactivo de Wagner (Triyoduro de potasio)
- 3) Reactivo de Dragendorff (Nitrato de bismuto y yoduro de potasio)
- 4) Reactivo de Sonnenschein (ácido fosfomalibdénico)
- 5) Reactivo de Hager (ácido pícrico)
- 6) Reactivo de Scheibler (ácido fosfotúngstico)
- 7) Reactivo de ácido silicotugstenico

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

### **4.8.4 Determinación cuantitativa de Alcaloides**

*Fundamento:*

Debido a las propiedades ácido-básicas que presentan los alcaloides, es posible su cuantificación. Consiste en la extracción de los alcaloides de la muestra con disolventes orgánicos y sus propiedades básicas (pka) para hacer una micro titulación analítica ácido-base con una solución de NaOH valorada (Sotelo, A., et al. ,2003).

### **4.8.5 Determinación de ésteres de forbol**

*Fundamento:*

Se basa en la extracción de los esteres de forbol con un disolvente orgánico como el diclorometano, sujeto a ondas ultrasónicas evaporando posteriormente el disolvente para finalmente ser redissuelto en Tetrahidrofurano (THF) y se inyecta en el equipo de HPLC para su cuantificación. Se utiliza la técnica propuesta por Makkar la cual se detalla en el (ANEXO I).

### **4.9 Digestibilidad proteínica “*in vitro*”**

*Fundamento:*

Los métodos “*in vitro*” pretenden simular la digestión de los alimentos en el estomago, midiendo la digestibilidad de proteínas mediante el uso de enzimas proteolíticas; al utilizar como proteína patrón a la caseína. Se usa la técnica propuesta por la AOAC con ligeras modificaciones, la cual se detalla en el (ANEXO I) (Herlich K., 1990).

### **4.10 Tratamiento con calor húmedo**

*Fundamento:*

El tratamiento con calor húmedo consiste en generar una atmósfera saturada de vapor de agua, generalmente se utiliza una autoclave u olla de presión estos equipos permiten calentar las muestras por calor húmedo a temperaturas superiores a las de ebullición del agua (sin que ésta hierva), debido a que el tratamiento se efectúa en un compartimento saturado con vapor de agua y a presiones superiores a la atmosférica (temperatura 121°C y 10-15 min). Esto con el fin de inactivar los factores tóxicos y antinutricionales presentes en la semilla de higuierilla. La técnica se detalla en el (ANEXO I).

### **4.11 Evaluación biológica**

El procedimiento se detalla en el (ANEXO I).

#### **4.11.1 Ensayo de toxicidad aguda**

*Fundamento:*

La toxicidad aguda son los efectos tóxicos adversos que aparecen en un corto periodo después de la administración de una dosis única o de múltiples dosis repartidas en un intervalo de 24 hrs (Derache, 1990).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Parámetros físicos

En la Tabla 3 se muestra los resultados de los parámetros físicos de la semilla y la almendra integra de higuera (*Ricinus communis*); en la literatura se reporta que las semillas van de 5mm a 15mm de largo (Rzedowski et. al., 2001) por lo que la variedad estudiada esta dentro de este rango. Se observa que el % en peso de la almendra integra en la semilla es de 74.38% lo que significa que el 25.62% restante corresponde a la cascara.

**Tabla 3.** Parámetros físicos de la semilla y almendra integra de higuera <sup>a</sup>

Parámetro	Semilla	Almendra Integra
Largo (mm)	9.85 ± 0.03	8.11 ± 0.04
Ancho (mm)	6.15 ± 0.04	5.22 ± 0.04
Peso (g)	0.15 ± 0.00	0.12 ± 0.04
Peso hectolítrico (kg//100L)	61.49 ± 0.25	56.84 ± 0.51
% en peso de la almendra en la semilla	-----	74.38 ± 1.41

<sup>a</sup> Valor promedio ± desviación estándar

### 5.2 Análisis proximal

En la Tabla 4 se presenta el análisis proximal de la semilla y la almendra integra, de higuera.

Se observa que la semilla de higuera, presenta un alto contenido de fibra como era de esperar, ya que como se dijo anteriormente el 25.62% de la semilla es cáscara.

Al observar el análisis proximal de la almendra integra (Tabla 4), se corrobora que este material biológico presenta un alto contenido de proteína y grasa, además, cuando esta se desengrasa el contenido de este componente se reduce a menos del 1%, concentrándose las proteínas hasta un nivel de 65.67% (Tabla 5), por lo cual se puede considerar como un auténtico concentrado proteínico con posible uso en la alimentación animal. Al comparar estos resultados con otras variedades se observa que sí hay diferencia en cuanto al % de grasa y proteína en la almendra, pues para la variedad estudiada el % de proteína es de 23.81% y de grasa 56.87 %, mientras que para otras variedades, como por ejemplo; variedades del estado de Michoacán se reporta 28.48% de proteína y 51.60 % grasa (María de Jesús, 2009) y para las variedades de Brasil se reporta 17.85% de proteína y 47.91% de grasa (Pablo F. Polit et al., 1976) esta comparación se observa en la Tabla 6; con respecto al concentrado proteínico que se obtiene una vez que se fracciona la almendra y se desengrasa (Tabla 5), se observa que este es de 65.67% , mayor que para el concentrado proteico de las semillas estudiadas en Brasil que reporta 35.20% de concentrado proteico (Pablo F. Polit et al., 1976).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 4.** Análisis proximal de la semilla y almendra integra de higuera <sup>a, b</sup>

Componente <sup>c</sup>	Semilla		Almendra integra	
	Base Húmeda	Base Seca	Base Húmeda	Base Seca
<b>Humedad</b>	5.66 ± 0.059	-----	3.89 ± 0.077	-----
<b>Cenizas</b>	3.54 ± 0.087	3.86 ± 0.087	3.12 ± 0.066	3.37 ± 0.095
<b>Proteína</b>	<b>18.92 ± 0.120</b>	19.97 ± 0.159	<b>23.81 ± 0.400</b>	24.77 ± 0.415
<b>Grasa</b>	<b>41.51 ± 1.960</b>	43.87 ± 2.011	<b>56.87 ± 1.002</b>	57.84 ± 0.012
<b>Fibra</b>	23.80 ± .380	25.24 ± 0.396	4.98 ± 0.064	4.86 ± 0.182
<b>Hidratos de Carbono<sup>d</sup></b>	6.57	7.06	7.45	9.16

<sup>a</sup> Se reporta el promedio expresado en g del componente por 100 g de muestra (%).

<sup>b</sup> Valor promedio ± desviación estándar.

<sup>c</sup> La determinación para cada componente se realizó por triplicado (n=3)

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

**Tabla 5.** Análisis proximal de la harina de la almendra integra de higuera <sup>a, b</sup>

Componente <sup>c</sup>	Harina de la almendra integra			
	Desengrasada cruda		Desengrasada y Destoxificada	
	Base Húmeda	Base Seca	Base Húmeda	Base Seca
<b>Humedad</b>	7.96 ± 0.039	-----	2.74 ± 0.089	-----
<b>Cenizas</b>	8.28 ± 0.043	8.99 ± 0.046	8.20 ± 0.02	8.43 ± 0.02
<b>Proteína</b>	<b>65.67 ± 3.04</b>	71.34 ± 3.27	<b>61.23 ± 0.61</b>	63.25 ± 0.65
<b>Grasa</b>	0.54 ± 0.01	0.58 ± 0.01	2.62 ± 0.18	2.69 ± 0.19
<b>Fibra</b>	8.39 ± 0.320	8.73 ± 0.421	13.59 ± 0.613	13.85 ± 0.57
<b>Hidratos de Carbono<sup>d</sup></b>	9.16	10.36	10.59	11.78

<sup>a</sup> Se reporta el promedio expresado en g del componente por 100 g de muestra (%).

<sup>b</sup> Valor promedio ± desviación estándar.

<sup>c</sup> La determinación para cada componente se realizó por triplicado (n=3)

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

**Tabla 6.** Comparación del análisis proximal de la almendra de higuierilla en estudio con otras variedades <sup>a</sup>

Componente	Variedad		
	Estado de Hidalgo <sup>b</sup>	Estado de Michoacán <sup>c</sup>	Brasil <sup>d</sup>
<b>Humedad</b>	<b>3.89</b>	5.64	6.36
<b>Cenizas</b>	<b>3.12</b>	3.80	2.41
<b>Proteína</b>	<b>23.81</b>	28.48	17.85
<b>Grasa</b>	<b>56.87</b>	51.60	47.91
<b>Fibra</b>	<b>4.86</b>	4.30	6.65
<b>Hidratos de Carbono<sup>c</sup></b>	<b>7.45</b>	6.18	18.82

<sup>a</sup> Se reporta el promedio en g del componente por 100g de muestra (%)

<sup>b</sup> Variedad en estudio proveniente de Zacualtipan Hidalgo, principalmente de San Agustín .

<sup>c</sup> Fuente: María de Jesús et, al. , Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional.

<sup>d</sup> Fuente: Pablo F. Polit et al., 1976

### 5.3 Factores Tóxicos

En la Tabla 7 se reportan los resultados de los compuestos tóxicos presentes en la almendra de la semilla de higuierilla.

Como ya se mencionó en los antecedentes, las semillas de higuierilla contienen una albumina muy tóxica, la ricina, una de las más potentes y mortíferas toxinas vegetales conocidas, cuyos resultados de toxicidad es la inhibición de la síntesis de proteínas que llevan a la muerte celular, se observa que la variedad estudiada presenta 82.21 UHG/g M lo que es igual a 82.21 mg de ricina por gramo de muestra, que en % equivale a 8.22 %, este valor es muy alto ya que en la literatura se reporta que la semilla contiene un porcentaje de ricina entre 1-5% (M. R. Aslani et al.,2006). Este valor representa un riesgo significativo para la alimentación animal y humana, pero en la literatura se reporta que esta lectina puede ser

inactivada fácilmente con calor húmedo (Pablo F. Polit et al., 1976); por lo tanto este nivel tan alto de lectinas podría ser disminuido a niveles bajos aplicando un adecuado tratamiento con calor.

La ricinina es otra sustancia tóxica presente en las semillas de higuera, es un alcaloide que estimula el sistema nervioso central y que también puede ser inactivado por el calor (Pablo F. Polit et al., 1976). Para este tóxico primero se realizó la determinación Semi-Cuantitativa como prueba presuntiva de la presencia de alcaloides, los resultados para esta prueba se muestran en la Tabla 8, se observa mayor sensibilidad con los reactivos Wagner y Dragendorff ya que fueron las únicas pruebas que resultaron positivas a pesar de que se sabe que el reactivo más sensible es el Reactivo de Mayer.

Posteriormente se realizó la determinación cuantitativa y el valor obtenido fue de 0.34 mg/g M (Tabla 7) que en % equivale a 0.034%, en la literatura se reporta que la semilla presenta entre 0.3-0.8% de ricinina presente en las hojas y el pericarpio del fruto (M.R. Aslani, et. al, 2007). Pero también se menciona que este contenido de ricinina varía mucho entre las partes de la planta: hojas de 1.3% (peso seco), el 2.5% en plántulas ahiladas, 0.03% en el endospermo de la semilla y 0.15% en la testa (cubierta de las semillas) (BiodieselBR, 2011). Para la cuantificación de alcaloides se utilizó la harina de la almendra desengrasada, es decir, toda la parte interior de las semillas (la almendra) que comprende el endospermo, por lo que el valor obtenido de alcaloides (0.034%) es igual al que se reporta en la literatura para esta parte de la planta. La contribución de la toxicidad de ricinina es muy

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

pequeña, debido a su baja actividad tóxica, ya que está presente en baja concentración.

Con respecto a los inhibidores de tripsina el valor encontrado en la muestra fue de 7.09 UTI/ mg M, valor abajo del límite máximo permitido (10 UTI/mg) para fines alimenticios, además, que en la bibliografía se reporta que estos factores tóxicos son termolábiles (Makkar, et.al., 1997), por lo que también es posible disminuir estos factores antinutricionales en la muestra, después de un adecuado tratamiento con calor.

**Tabla 7.** Factores tóxicos termolábiles presentes en la harina de la almendra integra desengrasada de higuera.

Factor tóxico	Harina de la almendra integra desengrasada	
	Clasificación	Concentración
Lectinas	Tóxico	82.21 (UHG/g M) <sup>a, d</sup>
Alcaloides	Tóxico	0.34 ± 0.025(mg /g M) <sup>b</sup>
Inhibidores de Tripsina	Antinutricional	7.09 ± 0.667(UTI/mg M) <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Unidades Hemaglutinantes por gramo de muestra

<sup>b</sup> mg de Alcaloide referidos a la Ricinina por g de muestra.

<sup>c</sup> Unidades de Tripsina Inhibidas por mg de muestra

<sup>d</sup> Valor expresado como la media

**Tabla 8.** Determinación de alcaloides cualitativa.

Reactivo	Precipitado	Resultado	
		Fracción A	Fracción B
Mayer	Precipitado	-	-
Wagner	Color-marrón	+	-
Dragendorff	Anaranjado-marrón	+	-
Sonnenchein	Amarillos	-	-
Hager	Amarillos	-	-
Scheibler	Blanco grisáceo	-	-
Ac. Silico Tugstenico	Blanco grisáceo	-	-

+ Presencia de precipitado, Reacción positiva  
 - Ausencia de precipitado, Reacción negativa

Se sabe que la familia botánica *Euphorbiaceae* a la que pertenece *Ricinus communis* hay especies que presentan Ésteres de Forbol (EF), xenobióticos de cierta relevancia toxicológica, término que se utiliza hoy para describir una familia de compuestos de origen natural ampliamente distribuida en las especies de las plantas *Euphorbiaceae* y *Thymelaeceae* (EuroJournals Publishing, Inc.2009) que son promotores de tumores e inflamaciones, por lo que su estudio en las semillas de higuera resulta interesante, pues probablemente la alta toxicidad de esta semilla se deba también a la presencia de EF y no solamente a la ricina, además de que en la literatura no se encontraron estudios que reporten la presencia de estos tóxicos en las semillas de higuera, es por ello que en el presente trabajo se realizó su detección usando la técnica propuesta por Makkar (Makkar, et.al.,

1997), técnica que utiliza la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para su detección y cuantificación .

Para esta determinación primero se lavó y acondicionó la columna y lo que se inyectó primero en el equipo de HPLC fue el disolvente Tetrahidrofurano (THF) en el que se re suspendió el extracto de EF, esto con el fin de observar el comportamiento de la línea base, aunque el disolvente utilizado es grado HPLC es posible que existiera algún compuesto que pudiera ser detectado a estas condiciones y confundido con algún componente de la muestra; el cromatograma obtenido se muestra en la Figura 5, en este se observa un pico con un Tiempo de Retención (TR) de 56.48 minutos, aunque el gradiente para la separación de los esteres de acuerdo a la técnica utilizada termina a los 55 minutos no importaría mucho este pico, pero si es importante mencionar que este corresponde al disolvente y no a la muestra.

Se utilizó como estándar el forbol 12-miristato 13-acetato (SIGMA P8139-5MG) el cual puede ser utilizado como equivalente para expresar los resultados en el caso de que se detecte un EF en las semillas de higuera, el cromatograma que se obtuvo después de la inyección del estándar se muestra en la Figura 6, se observa que el TR para el estándar es de 44.24 minutos.

En la Figura 7 se muestra el cromatograma que se obtiene de la extracción de los EF de la almendra de las semillas de higuera, se observa un pico en un TR de 49.18 minutos. Estudios recientes han evaluado el contenido de EF utilizando también la técnica propuesta por Makkar en semillas de *Jatropha curcas*

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

(semillas que pertenecen a la misma familia que *Ricinus communis*) y actualmente los EF son los metabolitos a los que se les atribuye la principal causa de envenenamiento y con base a su concentración las plantas de *Jatropha curcas* son clasificadas como tóxicas o no tóxicas (Haas y Mittelbach, 2000) y los análisis de EF por HPLC para *Jatropha curcas* muestran cuatro EF cuyos picos aparecen entre 26 y 31 minutos con el método propuesto por Makar, los resultados son expresados en equivalentes de forbol 12-myristato 13-acetato cuyo pico aparece entre 34 y 36 minutos (J. Martínez- Herrera, 2006). Por lo tanto haciendo una comparación de los resultados obtenidos de las semillas de *Ricinus communis* con *Jatropha curcas*, se podría decir que el pico obtenido con un TR 49.18 minutos para *Ricinus communis* no es un EF ya que este sale después que el estándar (forbol 12-myristato 13 acetato, TR 44.24) y en *Jatropha curcas* los esteres de forbol salen antes que el estándar, y como se trata del mismo estándar se esperaría que el comportamiento de estos fuera similar, no importando el TR ya que este puede variar de acuerdo a la columna utilizada y eficiencia de esta, entre otras cosas; pero si se esperaría que el orden en que eluyen los compuestos sea similar, primero los EF presentes y luego el estándar. Además se sabe que los EF son lipofílicos (se encuentran en la fracción lipídica) por lo tanto si el pico con un TR de 49.18 minutos pertenece a un EF; entonces en la fracción grasa de higuera este compuesto se encontraría en mayor cantidad, por lo que si se le da el mismo tratamiento para la extracción de dichos esteres, se esperaría que este pico se vea incrementado y al observar el cromatograma en la

Figura 8, resulta que este pico no cambia en su área significativamente, lo que indica que no se trata de un EF.

A pesar de que los EF son lipofílicos (como ya se menciono) estos se encuentran fuertemente ligados a la matriz de la harina, un estudio realizado detecto que aproximadamente el 30% del total de EF estuvieron presentes en la matriz que contenía menos de 1% de lípidos (Cai-Yan Li et al., 2010; Makkar et al., 2008); por lo que se decidió hacer la extracción de los esteres a una muestra desengrasada que contenía 0.54% de grasa y se inyectó; el cromatograma obtenido se muestra en la Figura 9, se observa el mismo pico con un TR de 49.20 minutos, pero éste es más pequeño, de acuerdo a esto se pensaría que si se trata de un EF, solo que está presente en menor cantidad, puesto que se trata de una muestra desengrasada.

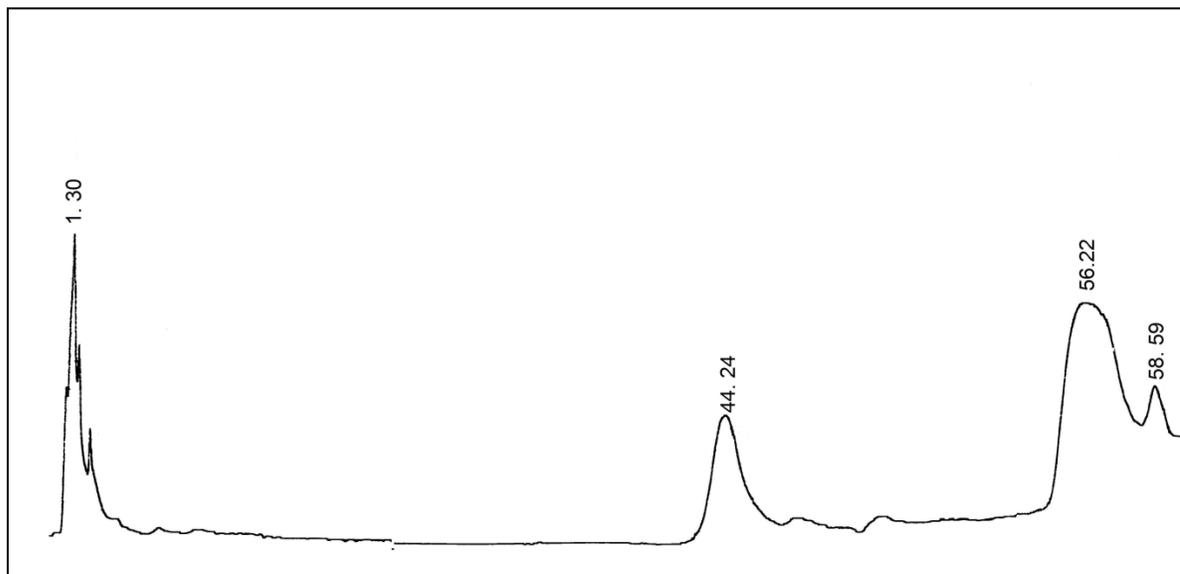
Como la presencia de los esteres de forbol en la muestra de estudio no es concluyente de acuerdo a estos resultados, se procedió a realizar un bioensayo de toxicidad aguda con ratones, con ello se podrá evaluar si la harina desengrasada presenta este toxico (EF) o no, ya que estudios realizados en la última década muestran que en ***Jatropha curcas*** exhibió toxicidad para una amplia variedad de organismos desde microorganismos a animales superiores, los síntomas comunes fueron eritema, edema, necrosis, diarrea, descamación y engrosamiento de la piel. La alimentación de ***Jatropha curcas*** por semillas, y semillas desengrasadas tóxicas causo síntomas graves de toxicidad antes de la muerte. Por lo que si las semillas de higuierilla presentan EF se observaran síntomas similares.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



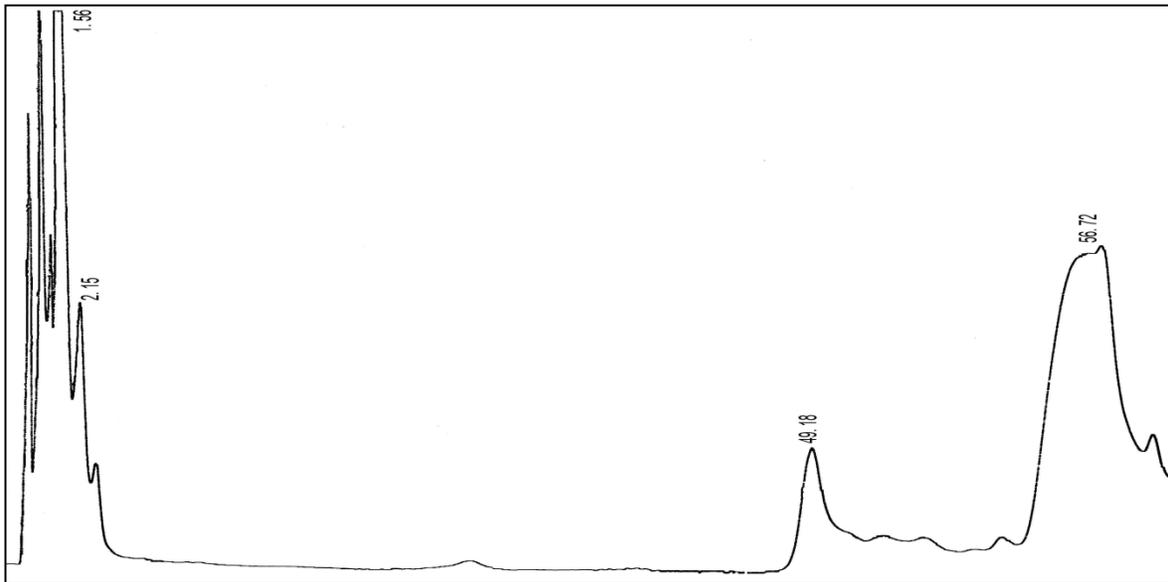
Tiempo de retención (min)

**Figura 5.** Cromatograma del disolvente utilizado (THF) en el que se re suspende la muestra una vez que se extraen los esteres de forbol, presenta un pico en el Tiempo de Retención de 56.48 min.



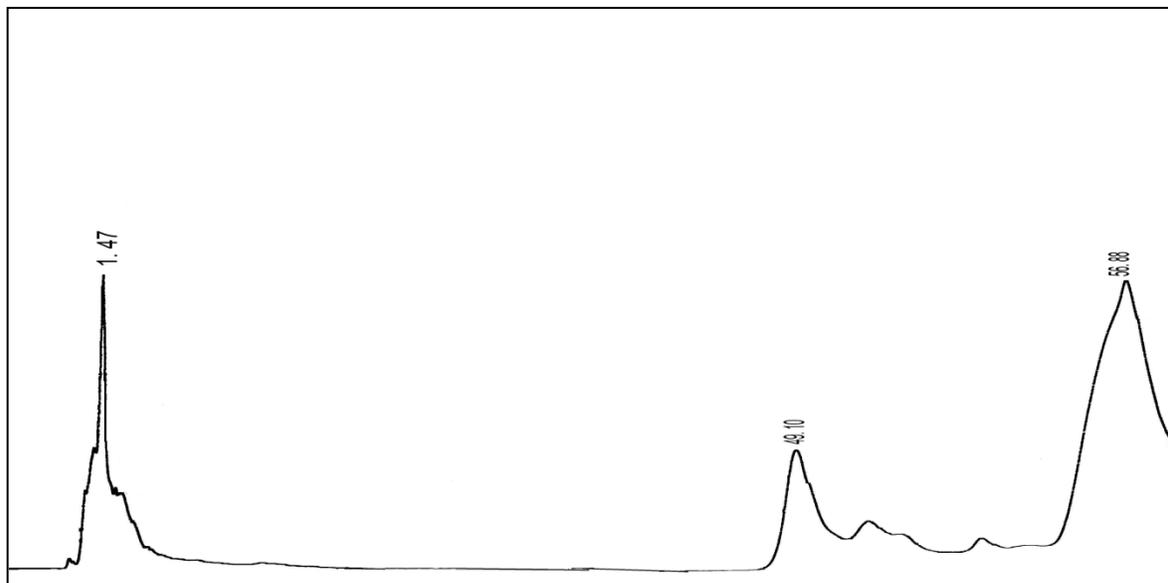
Tiempo de retención (min)

**Figura 6.** Cromatograma de la inyección del estándar (ester de forbol 12- miristato 13- Acetato), cuyo pico aparece a los 44.24 min.



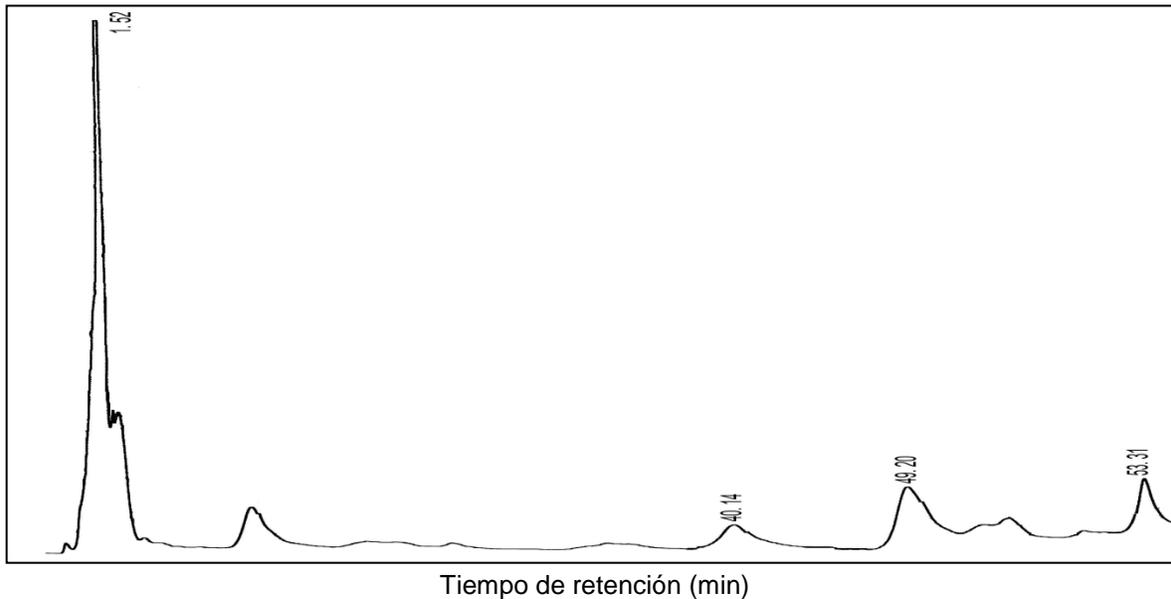
Tiempo de retención (min)

**Figura 7.** Cromatograma de la inyección de la extracción de los **esteres de forbol de la muestra** (almendra de higuera), se observa un pico en el Tiempo de Retención de **49.18** y otro en **56.72** que pertenece al disolvente.



Tiempo de retención (min)

**Figura 8 .** Cromatograma de la inyección de la grasa de higuera en el que se observa un pico en el Tiempo de Retención de **49.10**.



**Figura 9.** Cromatograma de la inyección de una muestra desengrasada de higuera en el que se observa un pico en el Tiempo de Retención de **49.28** que corresponde probablemente a la presencia de un ester de forbol.

### 5.4 Factores Tóxicos Residuales después del tratamiento térmico

En la Tabla 8 se muestran los resultados de la determinación de los tóxicos después de aplicar un tratamiento con calor húmedo a las semillas de higuera, como se observa las lectinas se disminuyeron considerablemente hasta 0.004 UHG/g M ya que estas son termolábiles, los alcaloides hasta 0.02 mg /g M y los inhibidores de tripsina 0.65 UTI/mg M, la comparación de la disminución drástica de estos tóxicos comparados con los determinados en la harina de la almendra integra desengrasada antes de este tratamiento se pueden observar en el Grafico1.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 9.** Factores Tóxicos termolábiles presentes en la Harina de la almendra integra desengrasada y destoxificada.

Factor tóxico	Harina de la almendra desengrasada y destoxificada	
	Clasificación	Concentración
Lectinas	Tóxico	0.004 (UHG/g M) <sup>a, d</sup>
Alcaloides	Tóxico	0.02 ± 0.001(mg /g M) <sup>b</sup>
Inhibidoresde Tripsina	Antinutricional	0.65 ± 0.32(UTI/mg M) <sup>c</sup>

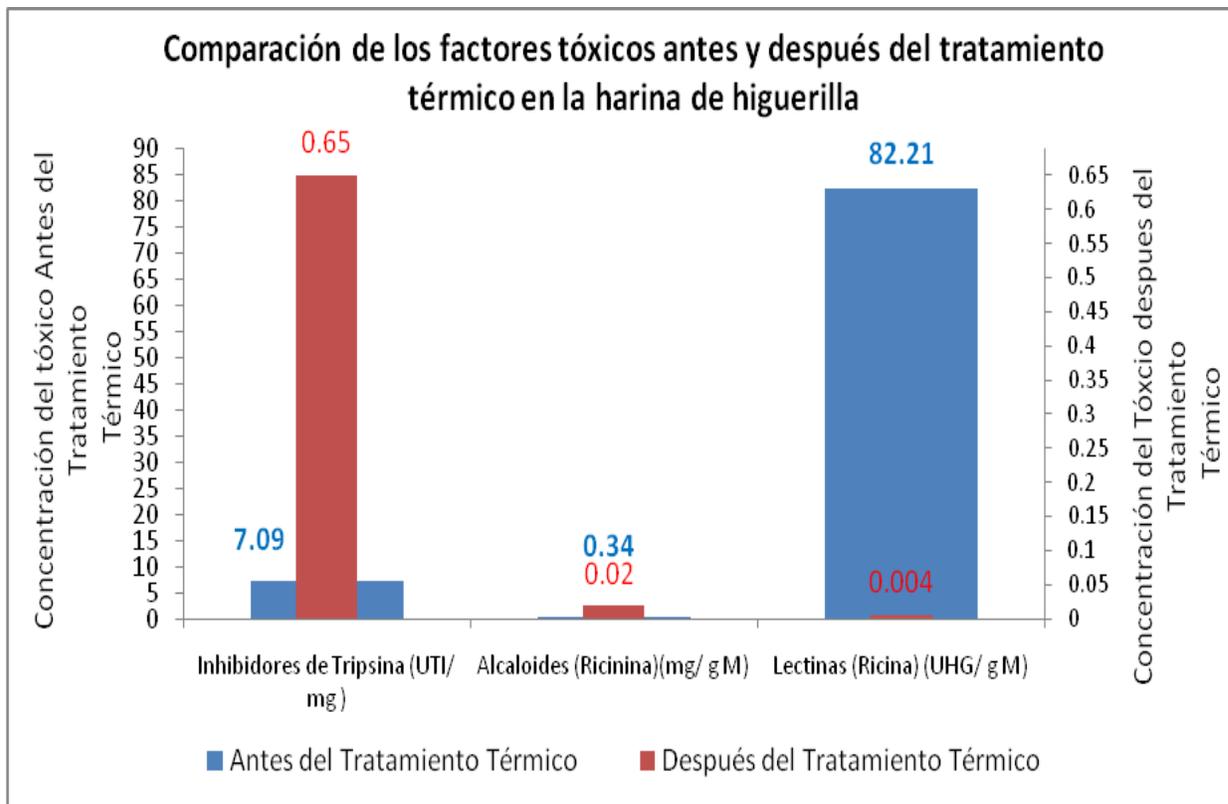
<sup>a</sup> Unidades Hemaglutinantes por gramo de muestra

<sup>b</sup> mg de Alcaloide referidos a la Ricinina por g de muestra

<sup>c</sup> Unidades de Tripsina Inhibidas por mg de muestra

<sup>d</sup> Se obtuvo de la media

**Gráfico 1.** Gráfica comparativa de los factores tóxicos presentes en los diferentes preparados de la harina de higuierilla.



### 5.5 Digestibilidad “*in vitro*”

En la Tabla 10 se reporta el valor de digestibilidad “*in vitro*”, para la harina de la almendra desengrasada cruda y destoxicada; este método “*in vitro*” permite predecir la disponibilidad de una fuente proteínica por medio de un sistema multienzimático bajo condiciones bien establecidas de tiempo y temperatura. Se utilizó como proteína patrón la caseína que presentó una alta digestibilidad (90.12%), esta se determinó antes de medir la digestibilidad de los diferentes preparados de la muestra con el fin de corroborar que las condiciones del sistema multienzimático fueran adecuadas; el pH de la caseína patrón debe ser de  $6.42 \pm 0.05$  por lo que el % de digestibilidad esta en el rango de 88.88 - 91.13 % (Horwitz,W. and Latimer,E. 2006), el valor obtenido para la caseína patrón esta dentro de este rango, lo que indica que las condiciones del sistema multienzimático fueron adecuadas para medir la digestibilidad de la muestra de estudio. Se consideró importante realizar la determinación de digestibilidad “*in vitro*” de la proteína, ya que esta es el indicador predictivo de la digestibilidad en nuestro organismo, al obtener valores de digestibilidad “*in vitro*” superiores a 80% también nos indica la ausencia de factores antinutricionales como los inhibidores de tripsina. Se observa que la digestibilidad “*in vitro*” de la harina de la almendra desengrasada cruda fue de 81.88%, se puede decir que se tiene una buena disponibilidad de la proteína presente en la almendra de higuera, ya que casi se aproxima a la de la caseína, además es aun mejor la disponibilidad de la proteína

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

presente en la almendra de higuierilla comparada con la digestibilidad “*in vitro*” de la harina de soya la cual está en el rango de 64.4-75.3%.

El % de digestibilidad de la proteína se ve incrementada en un 3.05% para la harina de la almendra desengrasada y destoxificada, como se observa en el Grafico 2. Se sabe que un tratamiento térmico provoca la desnaturalización de la proteína (Liu, 1995) y con ello la digestibilidad aumenta, por lo que es más fácil la degradación de la proteína para las enzimas utilizadas durante la prueba; asociado a esto Njintang *et al.* (2001), mencionan que la digestibilidad “*in vitro*” de la proteína también aumenta con el secado que se les da a las muestras antes de su análisis.

**Tabla 10.** Digestibilidad “*in vitro*”

	Proteína patrón Caseína <sup>a</sup>	Harina de la Almendra	
		Desengrasada <sup>b</sup>	Desengrasada y Destoxificada <sup>c</sup>
<b>% Digestibilidad</b>	90.12	81.88 ± 1.276	84.93 ± 0.48

<sup>a</sup> Se reporta promedio y desviación estándar.



**Grafico 2.** Digestibilidad de la harina de la almendra desengrasada y la harina de la almendra desengrasada y destoxificada.

### 5.6 Toxicidad aguda

Se evaluaron los efectos tóxicos adversos que aparecen en un periodo corto después de la administración de una dosis única. Se realizó durante 14 días, la vía de administración fue por vía oral a una dosis inicial de 15000 mg/kg de p.c (peso corporal) realizando una disminución de la dosis usando el factor de dosis progresivo de 3.2 para las demás, se tuvo un lote control al cual solo se le suministró el vehículo.

Solo la primera dosis de 15000 mg/kg p.c se suministró en dos partes, cada una de 7500 mg/kg p.c, para lograr preparar una suspensión homogénea y cubriendo así la dosis inicial planteada. Cabe mencionar que esta segunda dosis se suministró una hora después de la primera.

Una vez que se suministró la dosis correspondiente a cada lote, los ratones se mantuvieron en observación 24 hrs, los síntomas clínicos que se monitorearon fueron: Lordosis, Xifosis, Ataxia, Piloerección, Erección Caudal, Agresividad, Aletargamiento, Excitación, Disnea, Cianosis e Hipotermia. En la Tabla 11 se muestra los síntomas clínicos observados una vez que se suministró la dosis respectiva para cada lote, en el lote 2 que corresponde a la dosis más alta (15000 mg/kg p.c) para la primera administración (dosis de 7500 mg/kg p.c) se observó aletargamiento (periodo de inactividad o reposo) en los ratones 1, 2, 4, 5, 6 y en la segunda administración (7500 mg/kg p.c) solo el Ratón 1 y 5 presentaron nuevamente aletargamiento. El ratón 1 del lote 3 también presento este síntoma,

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

mientras que en los demás lotes no se observó ningún síntoma inmediato una vez que se suministró la dosis respectiva.

**Tabla 11.** Síntomas clínicos observados de inmediato al suministró de cada dosis para el estudio de toxicidad aguda.

LOTE	Síntoma clínico										
	Lardosis	Xifosis	Ataxia	Piloerección	Erección caudal	Agresividad	Aletargamiento	Excitación	Disnea	Cianosis	Hipotermia
<b>Lote 1 Control</b>											
Ratón 1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ratón 2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ratón 3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ratón 4	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ratón 5	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ratón 6	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>Lote 2 Dosis:15000mg/kg p.c</b>											
Ratón 1*	x	x	x	x	x	x	✓	x	x	x	x
Ratón 2	x	x	x	x	x	x	✓	x	x	x	x
Ratón 3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ratón 4	x	x	x	x	x	x	✓	x	x	x	x
Ratón 5*	x	x	x	x	x	x	✓	x	x	x	x
Ratón 6	x	x	x	x	x	x	✓	x	x	x	x
<b>Lote 3 Dosis: 4687.5 mg/kg p.c</b>											
Ratón 1	x	x	x	x	x	x	✓	x	x	x	x
Ratón 2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ratón 3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ratón 4	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ratón 5	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ratón 6	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>Lote 4 Dosis: 1464.8 mg/kg p.c</b>											
Ratón 1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ratón 2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ratón 3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ratón 4	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ratón 5	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ratón 6	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>Lote 5 Dosis: 457.8 mg/kg p.c</b>											
Ratón 1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ratón 2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ratón 3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ratón 4	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ratón 5	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ratón 6	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

\*Presentaron aletargamiento al suministrar la segunda parte de la dosis.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

Los ratones se mantuvieron en observación durante las siguientes 24 horas, pero estos no presentaron ningún síntoma.

Durante el estudio se monitoreo el peso de cada ratón con el fin de observar si la administración de la muestra de estudio tuvo una influencia sobre los animales ya que la pérdida de peso corporal es un indicador de efecto tóxico. En la Tabla 12 se muestra el peso promedio de los ratones por lote durante los 14 días del ensayo de toxicidad aguda, estos datos también se muestran representados en la Gráfica 3 donde se observa la curva de crecimiento de los ratones durante el estudio, al comparar los lotes con el control no se observa una diferencia significativa a excepción del día 5 donde se presenta una pequeña desviación; pero para saber sí realmente hay o no hay diferencia significativa entre los lotes se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) para probar la hipótesis de que no existe diferencia significativa entre los lotes incluyendo el lote control (para este Análisis ver ANEXO II). Se realizó un Análisis de Varianza para cada día; por ejemplo, para el día 0 la Hipótesis nula ( $H_0$ ) planteada fue: "no existe diferencia significativa entre el lote1 (Control), lote2 (15000 mg/kg p.c), lote 3 (4687.5 mg/kg p.c), lote 4 (1464.8 mg/kg p.c) y lote 5 (457.8 mg/kg p.c); es decir, todas las medias( $\mu$ ) de los lotes son iguales:  $H_0 = \mu_{\text{lote1}} = \mu_{\text{lote2}} = \mu_{\text{lote3}} = \mu_{\text{lote4}} = \mu_{\text{lote5}}$  para el día 0, contra la hipótesis alterna ( $H_A$ ) de que sí existe diferencia significativa entre algún o algunos lotes.

El resultado del Análisis de Varianza demostró que no existe diferencia significativa entre los lotes para los días 0, 3, 7, 10, 12 y 14; al no haber diferencia significativa se acepta la hipótesis nula de que  $H_0 = \mu_{\text{lote1}} = \mu_{\text{lote2}} = \mu_{\text{lote3}} = \mu_{\text{lote4}} = \mu_{\text{lote5}}$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

para los días ya mencionados. Pero para el día 5 sí existe diferencia significativa por lo que la  $H_0$  se rechaza. Para saber entre que lote hay diferencia para este día se realizó un análisis de comparación múltiple, prueba de Tukey, que generalmente se conoce como prueba de DVS (Diferencia Verdaderamente Significativa) el cual demostró que existe diferencia entre la media del lote 1(Control) y la media del lote 3 (dosis de 4687.5 mg/kg p.c) y también existe diferencia entre la media del lote 3 y la media del lote 5( 457.8 mg/kg p.c), estas comparaciones múltiples para el día 5 se observan en la Tabla 13. Al haber diferencia entre un lote y otro no implica problema, pero si al haber diferencia con respecto al control, ya que esto indica que en el día 5 hubo un problema con esta dosis para este lote que causo un efecto en el sistema de los ratones que provocó variación en el peso, convendría hacer un estudio a mediano y largo plazo (toxicidad subcrónica y crónica) para ver si este efecto continua después de una administración repetida o frecuente, para que proporcione información sobre los efectos tóxicos principales y los órganos diana implicados e indicaciones sobre la reversibilidad o irreversibilidad de los efectos, precisando si estos son acumulativos o retardados; ya que esta variación pudo a ver sido un efecto reversible o variación intraespecie ya que en los demás días no se muestra ninguna diferencia significativa con respecto al control e incluso para la dosis más alta (15000 mg/kg p.c) no se muestra ninguna diferencia significativa.

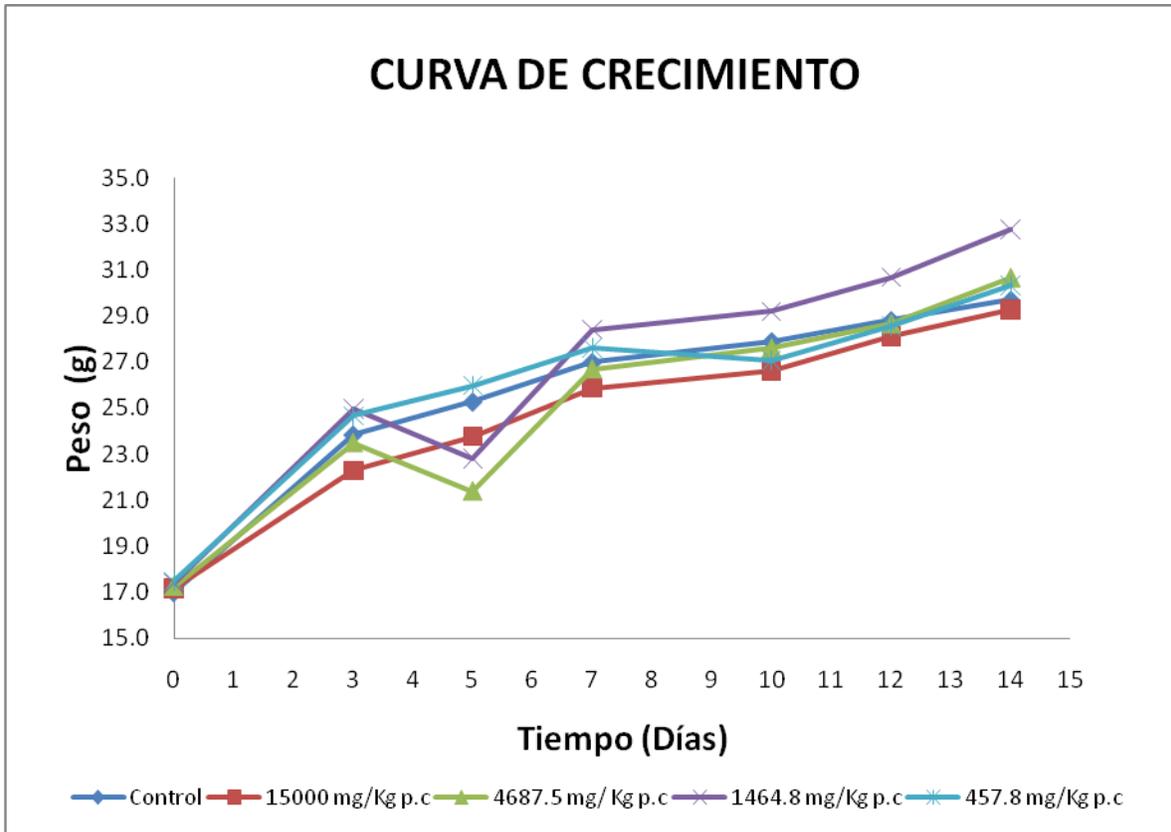
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 12.** Peso promedio de los ratones por lote durante los 14 días del estudio de toxicidad aguda.

Lote	0	3	5	7	10	12	14
<b>Lote1 Control</b>	<b>Peso(g)</b>						
Ratón 1	15.6	22.8	24.7	26.2	27.6	28.1	28.1
Ratón 2	16.7	22.1	23.5	25.4	26.1	28.1	28.4
Ratón 3	16.8	24.4	25.8	27.1	27.9	28.3	29.8
Ratón 4	17.6	22.5	23.0	25.3	25.8	26.3	27.1
Ratón 5	17.6	25.0	26.0	27.9	28.9	30.0	30.8
Ratón 6	18.9	26.3	28.7	30.1	31.1	32.1	34.0
Peso Promedio (g)	<b>17.2</b>	<b>23.9</b>	<b>25.3</b>	<b>27.0</b>	<b>27.9</b>	<b>28.2</b>	<b>29.7</b>
D.E	1.11	1.65	2.06	1.82	1.95	1.31	2.48
C.V	6.45	6.92	8.13	6.73	6.98	4.65	8.35
<b>Lote 2 Dosis: 15000mg/Kg p.c</b>	<b>Peso(g)</b>						
Ratón 1	16.2	21.5	24	26.5	28.4	29.2	31.5
Ratón 2	16.6	22.2	22.8	24.5	24.7	27.2	27.8
Ratón 3	16.9	24.8	27.3	29.9	31.4	32.4	33.1
Ratón 4	17.5	18.7	19.1	20.5	20.9	22.3	24.3
Ratón 5	17.6	25.2	27.6	30.1	30.8	32.6	32.8
Ratón 6	18.7	21.3	21.8	23.7	23.6	25.00	26.1
Peso Promedio (g)	<b>17.25</b>	<b>22.28</b>	<b>23.77</b>	<b>25.87</b>	<b>26.63</b>	<b>28.12</b>	<b>29.27</b>
D.E	0.88	2.42	3.28	3.74	4.22	4.10	3.72
C.V	5.10	10.86	13.80	14.46	15.84	14.58	12.69
<b>Lote3 Dosis: 4687.5 mg/Kg p.c</b>	<b>Peso(g)</b>						
Ratón 1	16.4	23.2	21.3	26.5	27.1	28.5	30.5
Ratón 2	16.5	23.3	20.3	26.8	27.0	27.3	29.3
Ratón 3	17.0	20.8	19.5	25.2	26.4	27.9	29.6
Ratón 4	17.4	25.7	22.7	28.5	30.5	32.4	34.6
Ratón 5	17.7	23.8	21.8	27.2	28.1	29.0	31.4
Ratón 6	18.4	24.1	22.7	26.0	26.5	26.9	28.6
Peso Promedio (g)	<b>17.23</b>	<b>23.48</b>	<b>21.4</b>	<b>26.7</b>	<b>27.6</b>	<b>28.7</b>	<b>30.7</b>
D.E	0.76	1.59	1.29	1.12	1.54	1.98	2.16
C.V	5.79	6.79	6.05	4.20	5.59	6.92	7.04
<b>Lote 4 Dosis: 1464.8 mg/Kg p.c</b>	<b>Peso(g)</b>						
Ratón 1	16.4	23.7	21.4	26.8	26.6	28.5	30.0
Ratón 2	16.5	23.0	21.1	25.4	25.9	27.8	29.9
Ratón 3	17.1	25.0	22.3	28.0	28.8	30.2	32.6
Ratón 4	17.3	25.5	24.1	30.0	31.7	33.2	35.3
Ratón 5	17.9	26.4	24.0	30.5	31.5	32.7	35.0
Ratón 6	18.4	26.1	23.9	29.8	30.7	31.7	33.7
Peso Promedio(g)	<b>17.27</b>	<b>25.0</b>	<b>22.8</b>	<b>28.4</b>	<b>29.2</b>	<b>30.7</b>	<b>32.8</b>
D.E	0.78	1.35	1.37	2.03	2.51	2.22	2.37
C.V	4.52	5.41	6.03	7.15	8.61	7.25	7.25
<b>Lote 5 Dosis: 457.8 mg/Kg p.c</b>	<b>Peso(g)</b>						
Ratón 1	16.4	23.4	24.4	25.6	25.1	26.8	28.7
Ratón 2	16.5	23.9	25.2	25.9	25.9	27.4	29.6
Ratón 3	17.2	25.3	26.9	29.4	27.8	29.2	31.3
Ratón 4	17.2	24.6	25.0	26.9	26.5	28.6	30.7
Ratón 5	18.0	24.7	25.4	27.3	26.4	27.4	29.6
Ratón 6	18.3	26.1	29.0	30.6	30.6	32.0	32.0
Peso Promedio (g)	<b>17.27</b>	<b>24.7</b>	<b>26.0</b>	<b>27.6</b>	<b>27.1</b>	<b>28.6</b>	<b>30.3</b>
D.E	0.77	0.96	1.70	1.99	1.95	1.90	1.23
C.V	4.46	3.91	6.52	7.19	7.21	6.65	4.06

**Tabla 12.** Se observa el peso promedio de los ratones por lote durante los 14 días del estudio de Toxicidad aguda así como desviación estándar (D.E) y coeficiente de variación (C.V).

**Grafica 3.** Curva de crecimiento durante el estudio de toxicidad aguda.



**Gráfica 3.** Se observa el peso promedio de los ratones por lote durante los 14 días que duro el ensayo de Toxicidad aguda.

**Tabla 13.** Prueba de comparación múltiple para el día 5

Hipótesis	DVS	Decisión estadística
$H_0 = \mu_{1\text{control}} = \mu_{2\text{lote2}}$	3.47	No se rechaza $H_0$ dado que $1.5 < 3.46$
$H_0 = \mu_{1\text{control}} = \mu_{3\text{lote3}}$	3.47	Se rechaza $H_0$ dado que $3.9 > 3.46$
$H_0 = \mu_{1\text{control}} = \mu_{4\text{lote4}}$	3.47	No se rechaza $H_0$ dado que $2.5 < 3.46$
$H_0 = \mu_{1\text{control}} = \mu_{5\text{lote5}}$	3.47	No Se rechaza $H_0$ dado que $0.7 < 3.46$
$H_0 = \mu_{2\text{lote 2}} = \mu_{3\text{lote3}}$	3.47	No se rechaza $H_0$ dado que $2.4 < 3.46$
$H_0 = \mu_{2\text{lote 2}} = \mu_{4\text{lote4}}$	3.47	No se rechaza $H_0$ dado que $1.0 < 3.46$
$H_0 = \mu_{2\text{lote 2}} = \mu_{5\text{lote5}}$	3.47	No Se rechaza $H_0$ dado que $2.2 < 3.46$
$H_0 = \mu_{3\text{lote3}} = \mu_{4\text{lote 4}}$	3.47	NoSe rechaza $H_0$ dado que $1.4 < 3.46$
$H_0 = \mu_{3\text{lote 3}} = \mu_{5\text{lote5}}$	3.47	Se rechaza $H_0$ dado que $4.6 > 3.46$
$H_0 = \mu_{4\text{lote4}} = \mu_{5\text{lote5}}$	3.47	No se rechaza $H_0$ dado que $3.2 < 3.46$

**Tabla 13.** Prueba de DVS (Diferencia Verdaderamente Significativa) la cual muestra que existe diferencia significativa entre la media del lote control y la media del lote 3 y diferencia entre la media del lote 3 y lote 5, para el día 5.

### 6. CONCLUSIONES

- ✓ Se corrobora que la almendra integral de las semillas de higuera (*Ricinus communis*) provenientes de Zacualtipan Hidalgo; principalmente de San Agustín Metzquitlan, presentan alto nivel de proteína y grasa y que cuando se desengrasa el contenido de proteína se concentra a un nivel mayor de 50%, por lo cual se puede considerar como un autentico concentrado proteínico.
- ✓ Respecto a la cuantificación de factores tóxicos presentes en la Harina de la almendra desengrasada se reporta que:
  - El contenido de Lectinas es de 82.21 UHG/g M referidos a la ricina, valor que provoca un riesgo significativo para la alimentación animal y humana.
  - La presencia de Alcaloides en la almendra de higuera (endospermo) es de 0.34 mg de ricinina /g M, valor que también esta reportado en la literatura y debido a que está presente en bajas concentraciones la contribución de la toxicidad de ricinina es muy baja.
  - La presencia de Inhibidores de Tripsina es de 7.09 UTI/mg M, valor abajo del límite máximo permitido (10 UTI/mg) para fines alimenticios, por lo que no representan ningún riesgo a la salud.
  - La detección por HPLC de esteres de forbol indica que estos compuestos tóxicos no se encuentran presentes en la semillas de higuera.

## CONCLUSIONES

---

- ✓ Para los tóxicos residuales presentes en la Harina de la almendra desengrasada de higuera después del tratamiento térmico se reporta lo siguiente:
  - Las Lectinas se ven inactivadas hasta 0.004 UHG/g M, valor que se considera como su ausencia y que no presenta ningún riesgo a la salud.
  - Los Alcaloides se ven disminuidos hasta 0.02 mg de ricinina /g M, se puede considerar que esta cantidad no representa un riesgo significativo a la salud ya que no se observó efecto tóxico en el estudio de toxicidad aguda.
  - Los Inhibidores de Tripsina también se ven disminuidos hasta 0.65 UTI/mg M valor que no causa ningún riesgo a la salud ya que estos se encuentran por debajo del límite permitido.
- ✓ El % de digestibilidad para la harina de la almendra desengrasada cruda fue de 81.88 % y para la destoxificada de 84.93 %, el tratamiento térmico además de inactivar los factores tóxicos y antinutricionales, mejoró la digestibilidad de las proteínas ya que estos valores son muy cercanos al de la caseína (88.88 - 91.13 %) y superiores a la digestibilidad de la soya (64.4 - 75.3 %).
- ✓ La prueba de toxicidad aguda realizada con una dosis inicial de 15 000 mg/kg p.c de la harina de la almendra desengrasada y destoxificada de higuera (***Ricinus communis***) administrado por vía oral en ratones, permite concluir que el material biológico evaluado, es relativamente “no tóxico” debido a que:

## CONCLUSIONES

---

- La dosis más alta (15 000 mg/ kg p.c), no influye en el crecimiento de los animales, ya que su peso se ve incrementado durante los 14 días sin mostrar diferencia significativa con respecto al control.
  - Este estudio permitió corroborar que el nivel de lectinas residuales así como el de alcaloides no representan ningún riesgo significativo, no obstante que se considera de alta toxicidad aguda.
  - Este estudio también permitió demostrar que los esteres de forbol no están presentes en la semillas de higuerrilla ya que los animales de estudio no mostraron síntomas que indiquen la presencia de estos.
- ✓ Los resultados preliminares de este estudio pueden ofrecer una base científica para el uso de las semillas de este municipio, en un principio para la alimentación animal, ya que la harina de la almendra integra desengrasada de higuerrilla (***Ricinus communis***) después del tratamiento térmico, presenta un alto contenido de proteína (>60 %) y buena digestibilidad ( > 80%); además de que el estudio de toxicidad aguda demostró que los factores tóxicos residuales presentes no causan un efecto toxicológico inmediato en los animales de estudio y que no hay presencia de esteres de forbol que la hagan altamente tóxica. Lo que sí es necesario hacer es un estudio de toxicidad a largo plazo (toxicidad crónica) para poder visualizar los efectos tóxicos, sí es que existen, después de la administración repetida por un largo periodo para poder evidenciar determinadas afecciones en algún órgano o alguna función dañada; para así poder tener la certeza de que esta harina de

## CONCLUSIONES

---

la almendra integra desengrasada y destoxificada de higuera (*Ricinus communis*) sí puede ser utilizada para fines alimenticios.

---

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Anete C. Ferraz, Miriam Elizabeth M. Angelucci; *Pharmacological Evaluation of Ricinine,*
- *a Central Nervous System Stimulant Isolated from **Ricinus communis**,* Pharmacology Biochemistry and Behavior, 63( 3), 367–375, (1999).
- Aslani M.R., *Castor bean (**Ricinus communis**) toxicosis in a sheep flock,* Toxicon 49, 400–406 (2007).
- Cai-Yan Li, Rakshit K. Devappa, Jian-Xin Liu, Jian-Min Lv , H.P.S. Makkar , K. Becker, *Toxicity of **Jatropha curcas** phorbol esters in mice,* Food and Chemical Toxicology, 48, 620–625, (2010).
- Derache R., *Toxicología y Seguridad de los Alimentos,* Ediciones OMEGA, S.A pp. 57-63, 1990.
- Ogunniyi D.S., *Castor oil: A vital industrial raw material,* Bioresource Technology, 97, 1086-1091, (2006).
- Eugene N. Onyeike, Gloria N. Acheru; *Chemical composition of selected Nigerian oil seeds and physicochemical properties of the oil extracts,* Food Chemistry 77, 431–437, (2002).
- Flores, N. (Editor), *¿Producir para la desnutrición?,* Centro de ecodesarrollo, 13-34,243-266, México, D.F (1988).
- Frank C. Lu, *Toxicología Básica, Riesgos por exposición a sustancias tóxica,* HARLA, 99-110, Mexico (1992).
- Haas W., and Mittelbach M., *from **Jatropha curcas** L. Industrial Crops and Products,* 12, 111-118. (2000).
- Haas W.,Sterk H. y Mittelbach M., *Novel 12-Deoxy-16- hidroxiphorbol diesters isolated from the seed oil of **Jatropha curcas**,* Journal of Natural Products, 65, 1434-1440 (2002).
- Herlich, K. Official Methods of Analysis of the AOAC. 15<sup>th</sup> edition, published by AOAC Inc. Vol. II pp.1012, Arlington, (1990).
- Hernández, J.E. y León, C. *Cultivos marginados (otra perspectiva de 1942) FAO: colección de alimentos y Nutrición* No2, IX-XI, 3-33, 37-120; Roma (1992).
- Horwitz, W. and Latimer, G. AOAC Official Methods of Analysis. 18<sup>th</sup> edition, published by AOAC International, Chap. 4: 1-8, 33-36, 42-47, Gasthersburg (2006).
- Jaffé, W.G., *Factores tóxicos en leguminosas,* Archivos Latinoamericanos de Nutrición 18, 205-218(1968).
- Kakade, M., Rackis, J., Mc. Ghee, J., and Puski, G. *Determination of Trypsin Inhibitor activity of soy products. Cereal Chemistry,* 51, 376-382(1974).
- Kirk R., Sawyer R., Eagan H. *Composición y análisis de alimentos de pearson.* 2<sup>a</sup> Edición, Editorial CECSA, México, pp19, 35,199 (2006).

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Liener, I.E., *Effects of antinutritional and toxic factors on utilization of legume proteins*, In *Protein nutritional quality of foods and feeds*. Frieman, M. Ed. Marcer Deekker. Inc, Vol.2, 523-550 (1975).
- López, Ml., *Determinación de factores tóxicos en varias almendras no tradicionales con potencial aporte de proteína y grasa dietética*. Tesis de Licenciatura Facultad de Química, UNAM, México, D.F (2000).
- Lucas B. and Sotelo A., A useful modification of the hemagglutination method for screening of lectins in legume seeds, 2th International Workshop on ANFs. In legume seeds. EAAP Publication No 70,p.p 71-74,Wageningen(1993).
- Makkar, H.Becker, K., Spores F. and Wink M., *Studies on nutritive potential and toxics constituents of different provenances of **Jatropha curcas***, Journal of Agricultural and Food Chemistry 45, 3152-3157 (1997).
- Martínez M., *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. Fondo de Cultura Económica, 321-325, México, D.F. (1979).
- Moltó, J.C., *Proteínas en Nutrición básica humana*, Soriano del Catillo, Ed., Publicaciones Universidad de Valencia, Valencia, 99-116 (2006).
- Nielsen S., *Food Analysis Second Edition*; An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland, 1998.
- Njintang, N. Y.; Mbofung, C. M. F. and Waldron, K. W., *In vitro protein digestibility and physicochemical properties of dry red bean (*Phaseolus vulgaris*) flour: effect of processing and incorporation of soybean and cowpea flour*. 49, 2465–2471, (2001).
- Pablo F. Polit y Valdemoro C. Sgarbieri, *Some Physicochemical and Nutricional Properties Castor Bean (**Ricinus communis**) Protein*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 24(4) , 795-798 (1976).
- Robinson, D.S, *Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos*, Editorial Acribia, Zaragoza, 109-141(1991).
- Rzedowski, G. C. de, J. Rzedowski y colaboradores, *Flora fanerogámica del Valle de México*, 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán, México (2001)
- Serna. S. Química, Almacenamiento e Industrialización de los cereales, Ed.AGT, pp81, 123(1997).
- Sotelo, A.; Argote, R.; Moreno, R.; Flores, N.; Díaz, M. *Nutritive evaluation of seed, germinated seed, and string bean of **Erythrina americana** and the detoxification of the material by boiling*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 2821-2825 (2003).
- Skoog, Douglas A.F.J. Holler, T.A. Nieman. *Principios de Análisis instrumental*, Mc Graw Hill Interamericana, 5ª edición, 467-469, N.Y, (2001).
- Swaisgood, H.E., Catignani, G.L., Protein digestibility: *in vitro* methods of assessment, *Advances in Food and Nutrition Research* 35, 185-236, (1991).
- Takayuki Shibamoto y Leonard F.Bjeldanes, *Introducción a la toxicología de los alimentos*, Editorial Acribia, S.A., 73-78, (1996).

- Xorge A. Domínguez, *Métodos de Investigación Fitoquímica*, Edit. Limusa, México, D.F., 211-215, (1979).

### ELECTRONICAS

- ◆ BiodiselBR 2011; fecha de consulta 28/11/2010, disponible en:  
<http://www.biodieselbr.com/plantas/mamona/ricinina.htm>
- ◆ Biblioteca digital de Medicina Tradicional Mexicana, UNAM, fecha de consulta 16/11/09, disponible en:  
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Higuerilla&id=7702>
- ◆ CEIEGDRUS, Comité Estatal de Información Estadística y Geográfica para el Desarrollo Rural Sustentable, Boletín Estadístico del Sector Agropecuario, México Numero 7, Año 2 Agosto 2006, pag.2y 3, fecha de consulta 25/08/2009, disponible en:  
[http://www.oeidrus-portal.gob.mx/oeidrus\\_mic/seidrus/publicaciones/revistas/Revista7%20web.pdf](http://www.oeidrus-portal.gob.mx/oeidrus_mic/seidrus/publicaciones/revistas/Revista7%20web.pdf)
- ◆ Cindy Trinidad Gonzáles Garduño, La higuerilla (*Ricinus communis*), Tlahui-Medic. No. 25, 1/2008, fecha de consulta 02/09/2010 disponible en:  
[http://www.tlahui.com/medic/medic25/higuerilla\\_elia.htm](http://www.tlahui.com/medic/medic25/higuerilla_elia.htm)
- ◆ CONABIO,s.f., fecha de consulta 29/08/2010, disponible en:  
<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/euphorbiaceae/ricinuscommunis/fichas/ficha5>
- ◆ Cromatografía de Líquidos de alta Resolución, fecha de consulta 28/11/2010, disponible en:  
<http://catedras.quimica.unlp.edu.ar/qa3/guias/2008-TP-12-HPLC.pdf>
- ◆ European Journal of Scientific Research, *Phorbol Ester as Toxic Constituents of Tropical **Jatropha curcas** seed Oil*, ISSN1450-216X Vol. 31 No.3, 429-436, (2009), fecha de consulta 13/06/2010, disponible en:  
<http://www.eurojournals.com/ejsr.htm>
- ◆ Plantas venenosas; fecha de consulta 28/11/2010, disponible en:  
<http://www.botanical-online.com/plantasvenenosas.htm>

- ◆ OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS, 17<sup>th</sup>, pp.425 (2001), fecha de consulta, 20/03/2010, disponible en :

<http://www.oecd.org/dataoecd/17/51/1948378.pdf>

- ◆ SIIT, Sistema Integrado de Información Taxonómica, de CONABIO, México, fecha de consulta 28/08/09, disponible en:

[http://siit.conabio.gob.mx/pls/itisca/next?v\\_tsn=28393&taxa=&p\\_king=Plantae&p\\_string=containin g&p\\_format=&p\\_ifx=itismx&p\\_lang=es](http://siit.conabio.gob.mx/pls/itisca/next?v_tsn=28393&taxa=&p_king=Plantae&p_string=containin g&p_format=&p_ifx=itismx&p_lang=es)

- ◆ Sotologo Pérez, *Posibilidades del Biodisel*, 2000 ,fecha de consulta 12/08/2010,disponible en:

<http://www.energia.inf.cu/eventos/memorias4/trabajos/Biodisel.pdf>.

- ◆ Juan Carlos Piola, fecha de consulta 6/02/2011, disponible en:

<http://www.sertox.com.ar/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=521#chapid1444N>

---

## ANEXO I

### Parámetros físicos

#### ❖ Dimensiones

##### Material

- Vernier Stainless Hardened

##### Procedimiento

1. Se tomaron de manera aleatoria 50 semillas de higuera del lote representativo.
2. Se midió con el vernier ancho y largo de cada semilla, se sacó el promedio y este mismo procedimiento se hizo con la almendra integra.

#### ❖ Peso hectolítrico

##### Material

- Probeta de 100 mL marca KIMAX
- Balanza analítica marca Sartorius analytic

##### Procedimiento

1. Se colocó la probeta en la balanza, se taró, se llenó con las semillas hasta la marca de 100 mL, se trató de acomodar las semillas en la probeta con ligeros golpes en la mesa, se registró el peso.
2. Se realizó por triplicado tanto para la semilla como para la almendra.
3. El peso volumétrico corresponde al peso en gramos de las semillas contenidas en la probeta con el resultado obtenido se saca la relación de kg por HL de la siguiente forma:

$$\text{Peso Hectolítrico} = \frac{\text{g de semillas}}{100\cancel{\text{mL}}} \times \frac{1 \text{ kg}}{1000\cancel{\text{g}}} \times \frac{1000\cancel{\text{mL}}}{1 \text{ L}} = \frac{\text{kg}}{100\text{L}} = \frac{\text{kg}}{\text{HL}}$$

❖ **Peso unitario**

Material

- Balanza analítica Sartotius analytic

Procedimiento

1. Se tomó aleatoriamente 50 semillas.
2. Se pesó cada semilla y se sacó el promedio para obtener el peso unitario de la semilla esta operación, lo mismo se hace con la almendra integra.

❖ **Relación cáscara-almendra**

Material

- Balanza analítica Sartotius analytic
- Pinzas de punta
- 2 Vasos de precipitados de 50 mL

Procedimiento

1. Se tomó aleatoriamente 10 semillas.
2. Se pesaron en el vaso de precipitados previamente tarado.
3. Se descascararon las semillas con ayuda de las pinzas cuidadosamente para no dañar la almendra, se colocaron las cáscaras en el vaso de precipitados previamente tarado y se pesa la cáscara y posteriormente las almendras integras. A partir de estos datos se calculó el porcentaje que representa el peso de la almendra en la semilla. Esta determinación se realizó por triplicado.

**Fraccionamiento de la almendra**

Material

- Picatodo MOD. ADO-1 Osterizer
- Balanza granataria Sartotius analytic

### Procedimiento

1. La almendra se colocó en el picatodo marca Osterizer y se procedió a fraccionar, cuidando de no fraccionar demasiado ya que se forma una pasta que se adhiere en el recipiente por lo que se perdería muestra.

2. Una vez fraccionada se colocó en un recipiente con etiqueta y se guardó en el refrigerador hasta su uso.

Nota: es importante no fraccionar demasiado ya que se formaría una pasta que se pegaría en el recipiente por lo que se perdería grasa y muestra.

### **Determinación de humedad por secado al vacío**

#### Material

- Estufa de vacío LAB-LINE Mod. 3620
- Balanza analítica Sartorius analytic
- Desecador
- Pesafiltros o charolas de aluminio
- Estufa con corriente forzada LAB-Line, Mod. IMPERIAL III

#### Procedimiento

1. Se colocó las charolas de aluminio de 2 a 4 horas en la estufa hasta peso constante.

2. En las charolas se pesó 3 g de muestra y se extendió por toda la superficie de la charola para tener mayor superficie de evaporación

3. Las charolas con la muestra se metieron en la estufa de secado al vacío, a una temperatura de 60-65° C hasta peso constante de la muestra.

Nota: Se considero a peso constante la muestra cuando al pesarla en la balanza analítica solo se presentó variación en la cuarta cifra decimal.

Cálculos:

$$\% \text{Humedad} = (P_i - P_f / m) * 100$$

Donde:

P<sub>i</sub> = peso charola con muestra húmeda (g)

P<sub>f</sub> = peso charola con muestra seca (g)

m = peso de muestra (g)

### **Determinación de cenizas totales**

Material

- Mufla Thermolyne, Mod. 1500
- Balanza analítica Sartorius analytic
- Mechero Bunsen
- Crisoles de porcelana
- Desecador
- Tripie
- Triangulo de porcelana
- Pinzas para crisol

Procedimiento

1. Se puso a peso constante los crisoles en la mufla a una temperatura de 550 °C.
2. Se colocaron 2 g de muestra en el crisol.
3. Se carbonizo primero a la flama de un mechero y bajo la campana de extracción. Se retiró cuando ya no se produjo humo.
4. Se introdujo el crisol a la mufla a una temperatura de 500-550 °C

---

5. Los crisoles se retiraron de la mufla hasta que las cenizas presentaron peso constante.

Cálculos:  $\% \text{cenizas} = (P_f - P_o / m) * 100$

Donde:

$P_f$  = peso de crisol con la muestra después de incinerada (g)

$P_o$  = peso del crisol a peso constante (g)

$m$  = peso de muestra (g)

### **Determinación de proteína cruda**

#### Material

- Digestor TECATOR, mod. Ab-20/40
- Dispositivo de destilación TECATOR, Kjeltec Auto 1030 Analyzer .
- Tubos de digestión Tecator de 100 mL
- Balanza analítica Sartotius analytic
- Equipo de microdestilación (Kjeltec Auto Analizar Tecator, Modelo 1030.

#### Reactivos

- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Sulfato de potasio (R.A.)
- Solución de NaOH al 40%( 40 g de NaOH en 100 ml de agua destilada).
- Mezcla digestiva (3 g  $\text{Cu SO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , 50 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 430 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado
- Solución de ácido bórico con indicadores (10 g de ácido bórico en 1 L de  $\text{H}_2\text{O}$ , 10 mL de verde de bromocresol al 0.001%, 7 mL rojo de metilo al 0.001%).

- Solución de HCL 0.01N valorada
- Glucosa anhidra
- Caseína libre de vitaminas

#### Procedimiento

1. Se pesó por triplicado 0.05 mg de muestra en el papel de celulosa y cada uno se colocó en el tubo de digestión.
2. A cada tubo se agregó 0.5g de sulfato de sodio y 3 mL de mezcla digestiva.
3. Los tubos se colocaron en el digestor por espacio de 15 minutos (340<sup>0</sup>C).
4. Se sacaron, se enfriaron y se les agregó 1.5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y nuevamente se colocaron en el digestor a una temperatura de 370<sup>0</sup>C.
5. La digestión concluyó cuando el tubo no mostró manchas ni puntos negros (la mezcla de digestión es transparente con un ligero tono verde-azuloso).
6. Una vez efectuada la digestión los tubos se colocaron en una gradilla y se dejaron enfriar y se procedió a realizar la microdestilación.
  - a) Se agregó a cada tubo digerido 25 mL de agua destilada y se introdujeron uno a uno en el quipo Kjeltel para su destilación y titulación.
  - b) Se registró la cantidad de ácido para titular.
  - c) Se calculó el contenido de proteína utilizando el factor de 6.25.
  - d) Se realizó un blanco negativo con dextrosa y un control positivo con caseína.

#### Cálculos:

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

Donde:

P = mL de la titulación de la muestra

B = mL de la titulación del blanco

N = normalidad de la solución de HCl

Meq = miliequivalente de nitrógeno (0.014)

m = peso de la muestra (g)

F = factor de conversión (6.25)

### **Cuantificación de grasa por el método de Goldfish**

Material

- Aparato de extracción Goldfish, LABCONCO, Modelo 35001-00CV)
- Dispositivo de extracción Soxhlet
- Cartuchos de celulosa de 22x80 mm (Whatman)
- Portadedales de vidrio
- Estufa de vacío LAB-LINE, Mod. 3620
- Vasos de borde esmerilado LABCONCO
- Balanza analítica Sartorius analytic
- Bomba de recirculación (Little Grant puma. Modelo 1)

Reactivos

- Éter de petróleo p. eb. 30-60 °C

Procedimiento

1. Se puso los vasos esmerilados (LABCONCO) en la estufa a peso constante.
2. Se pasó directamente la muestra seca que se obtuvo de la determinación de humedad a un cartucho de celulosa este se tapó con un pedazo de algodón y se colocó en portadedal.

3. Para la extracción se utilizó como disolvente éter de petróleo para ello se adicionó aproximadamente 50 mL de éter de petróleo en el vaso LABCONCO y este con ayuda del anillo metálico con rosca se aseguro al equipo de Goldfish.
4. Se abrió la llave del agua para que circulara en el refrigerante.
5. Se subió la parrilla hasta que estuviera en contacto con el vaso.
6. Se prendió el equipo manteniendo temperatura baja.
7. Se hizo la prueba de papel filtro, que consistió en tomar un pedazo de papel filtro limpio y se puso en contacto con un poco de disolvente que pasa por la muestra, si sobre el papel no se observa una mancha de grasa, se considera que la muestra está desengrasada en caso contrario se continuo con el proceso de desengrasado hasta que la prueba del papel filtro fue negativa.
8. Una vez que la prueba de papel filtro fue negativa se cambiaron los portadedales por tubos colectores para recuperar el éter de petróleo.
9. Se retiraron los vasos de equipo cuando estuvieron casi libres de disolvente y fueron colocados en la campana de extracción para eliminar el disolvente residual.
10. Se colocaron en la estufa de vacío hasta peso constante.
11. Se enfriaron en un desecador y se pesaron.

### Cálculos

$$\%Grasa = (Pf - Po/m)*100$$

Donde:

Pf = peso del recipiente después de la extracción (g)

Po = peso del recipiente antes de la extracción (g)

m = peso de la muestra (g)

Nota: Para esta determinación se uso la muestra previamente seca; por lo que para el cálculo el peso de la muestra, será el referido al peso inicial previo a la determinación de humedad.

### **Determinación de Fibra cruda**

#### Material

- Aparato de digestión marca LABCONCO
- Embudo buchner con malla metálica tipo California (California buchner funnel LABCONCO No. 26617-032)
- Vasos de Berzelius de 600 mL KIMAX
- Estufa de vacío LAB-LINE, Mod. 3620
- Mufla THERMOLYNE, Mod. 1500

#### Reactivos

- Solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1.25% (m/v)
- Solución de NaOH al 1.25% (m/v)
- Antiespumante (emulsión SIGMA-B)
- Alcohol etílico

#### Procedimiento

1. La muestra que se obtuvo después de la determinación de humedad y grasa se pasó directamente sobre un vaso de Berzelius.

3. Se agregó 0.5 g de Silicato de aluminio y unas perlas de vidrio.

4. Se adicionó 200 mL de  $H_2SO_4$  al 1.25 % hirviendo y unas gotas de antiespumante e inmediatamente se colocó en el aparato de digestión Labconco el cual ya estaba previamente caliente.
5. Se dejó digerir por espacio de 30 minutos exactos.
6. Se vació el contenido sobre un buchner California con malla metálica de 200 mesh y se realizó la filtración con ayuda de vacío.
7. Se lavó el residuo con agua destilada caliente, hasta eliminar el ácido (aprox. 500 mL).
8. Nuevamente se transfirió el residuo ya lavado al vaso Berzelius.
9. Se adicionó unas gotas de antiespumante y 200 mL de NaOH 1.25% hirviendo
10. Se mantuvo en el aparato de digestión exactamente 30 minutos.
11. Transcurrido el tiempo se vació el contenido sobre un buchner California con malla metálica de 200 mesh y se realizó la filtración con ayuda de vacío.
12. Se lavó el residuo con agua caliente (aprox. 500 mL), hasta eliminar el álcali y también quitar las perlas de vidrio lavándolas con agua para recuperar el material adherido.
13. Se adicionó al residuo 25 mL de alcohol etílico.
14. El residuo se paso a un crisol de porcelana (a peso constante).
15. Se colocó en la estufa de vacío para su secado (aprox. 4 – 8 horas) hasta peso constante.
- 16.- Se pesó el crisol con residuo después de secado.

17. Se introdujo en la mufla para su incineración a una temperatura de 500-550 °C, hasta que las cenizas obtenidas estuvieran a peso constante.

18. Se sacaron y se enfriaron los crisoles en un desecador.

19. Se pesó el crisol con residuo después del calcinado.

Cálculos:

$$\%Fibra = (Ps - Pc / m) * 100$$

Donde:

Ps = peso crisol con residuo después de secado (g)

Pc = peso crisol con residuo después de calcinado (g)

\*m = peso de muestra (g)

\* Ya que para esta determinación se uso la muestra previamente desengrasada y seca; el peso de la muestra, será el referido al peso inicial previo de las anteriores determinaciones.

### **Desengrasado del material biológico para el Análisis proximal y determinación de factores tóxicos.**

Material

- Equipo de extracción Soxhlet
- Matraz bola de 3 L
- Canastilla de calentamiento
- Rotavapor Büchi modelo RE-111
- Baño de agua Büchi modelo 461
- Bomba de agua
- Charola de plástico
- 2 mangueras de látex
- Papel filtro
- Termómetro de -20<sup>0</sup> 400<sup>0</sup>C

### Reactivos

- Hexano (R.A)

### Procedimiento

1. Se pesaron 70 g de la almendra fraccionada en el cartucho de celulosa este se colocó en el equipo de extracción Soxhlet.

2. Se agregó hexano al matraz bola hasta la mitad de su capacidad, se agregaron perlas de ebullición y este se colocó en la canastilla de calentamiento, adicionalmente se conectaron las mangueras de entrada y salida de agua del refrigerante.

4. Una vez montado el equipo (Figura 10) se abrió la llave del agua para que circulara en el refrigerante y el equipo se mantuvo a una temperatura de 60-70<sup>0</sup>C por 12 hrs.

Nota: Se hizo la prueba de papel filtro, que consistió en tomar un pedazo de papel filtro limpio y ponerlo en contacto con un poco de disolvente que pasa por la muestra, si sobre el papel no se observa una mancha de grasa, se considera que la muestra está desengrasada en caso contrario se continua con el proceso de desengrasado hasta que la prueba del papel filtro sea negativa.

5. La muestra desengrasada obtenida se colocó en una charola de aluminio la cual colocó en la campana de extracción para eliminar el disolvente residual, posteriormente se almacenó en un recipiente etiquetado.

6. Con ayuda de un rotovapor a una temperatura de 50 <sup>0</sup>C y a presión reducida se eliminó el disolvente para recuperar la grasa cruda.

7. La grasa cruda obtenida se almacenó en un frasco color ámbar, en refrigeración.

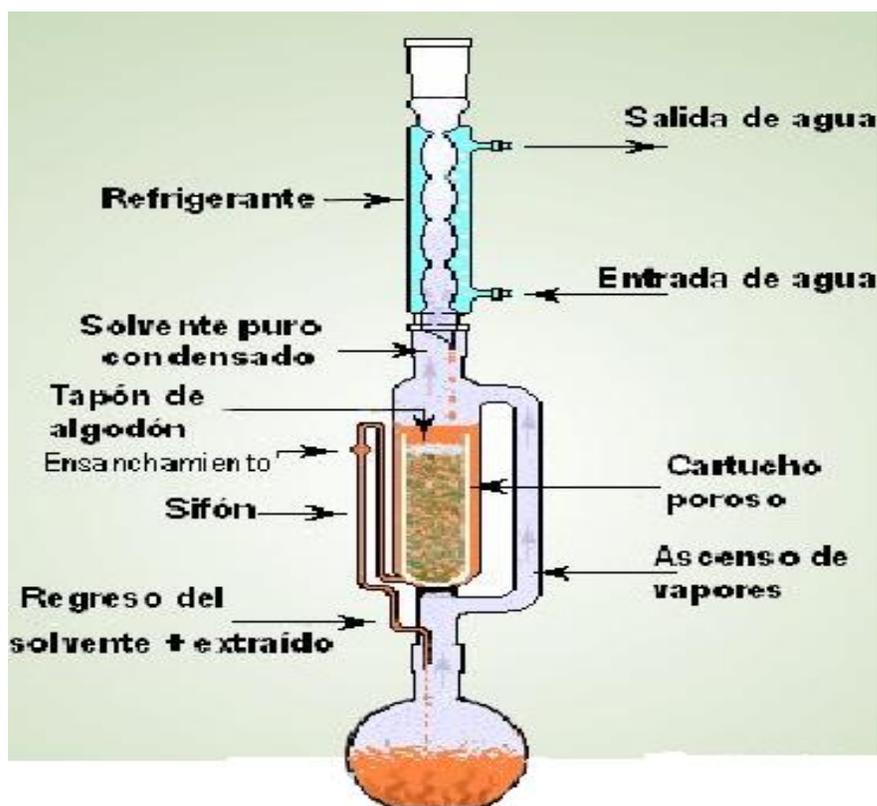


Figura 10. Equipo Soxhlet

### Determinación de Factores tóxicos

#### ❖ Inhibidores de Tripsina

#### Material

- Potenciómetro Corning pH Meter 430
- Parrilla con agitación magnética CORNING STIRRER multiple position 5 x 400 mL
- Baño de temperatura controlada 37°C GRANT INSTRUMENTS
- Espectrofotómetro Thermo-scientific Genesys 10-S

- Mezclador de tubos Vortex Lab-line

### Reactivos

- NaOH 0.01N
- Solución amortiguadora de TRIS, pH 8.2 , 0.05 M (a)
- Solución BAPNA (b) (SIGMA B4875-10G)
- Ácido acético al 30%
- Solución estándar de tripsina 20 µg/mL (c) (Type II No. T-8128)
- HCl 0.001N

(a) Se pesó 6.05 g de TRIS (hidroximetil-amino-metano P.M. 121.14) y 2.94 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y se disolvió en 900 ml de agua destilada. Se ajustó el pH a 8.2 y se aforó a un volumen de 1L.

(b) Se pesó 100 mg de  $\alpha$ -N Benzoil- DL-arginina -p-nitroanilida-HCl (BAPNA) se disolvió en 2.5 mL de dimetilsulfóxido y se diluyó en 250 ml con amortiguador TRIS previamente calentado a 37 ° C. Esta solución se preparó el mismo día y cuando se uso se mantuvo a 37 ° C.

(c) Se pesó con mucha exactitud 4 mg de tripsina bovina (SIGMA T-8253) y se disolvió en 200 mL de HCl 0.001N. Se almacenó en refrigeración, esta solución puede durar de 2-3 semanas sin pérdida apreciable de actividad.

### Procedimiento

#### 1. Preparación del extracto:

- a) Se pesó 1 g de muestra finamente molida y desengrasada (<5% de grasa) en un vaso de precipitado.
- b) Se adicionó 45 mL de NaOH 0.01N.

- c) Se ajustó el pH a  $9.6 \pm 0.2$  y se colocó en un matraz aforado de 50 mL aforando con agua destilada.
- d) Se transvasó a un vaso y se colocó una barra magnética.
- e) Se agitó 2 ½ hora a 300 r.p.m (revoluciones por minuto).
- f) Se dejó ½ hora en reposo.
- g) Por decantación se separó el sobrenadante y se eliminó el residuo insoluble.
- h) El sobrenadante se diluyó 1:10 para producir que 1 mL produjera una inhibición de 40-60% esto con el fin de reducir la desviación estándar relativa.

### 2. Determinación de la actividad:

- a) Se pipeteó en tubos de ensaye por duplicado porciones de 0.0, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8 mL de extracto diluido (1:10)
- b) Se ajustó el volumen a 2.0 mL con agua destilada.
- c) Se introdujo en un baño de 37 °C.
- d) Se adicionó 2.0 mL de solución estándar de tripsina (previamente mantenida a 37 °C).
- e) Se incubó por espacio de 10 minutos exactos.
- f) Se adicionó 5 mL de solución de BAPNA (a 37 °C) a cada tubo.
- g) Se mantuvo dicha mezcla de reacción por 10 minutos exactos.
- h) La reacción enzimática se detuvo por la adición de 1 mL de ácido acético al 30%.

i) Se homogeneizó inmediatamente.

### 3. Lectura de la absorbancia de las muestras

a) Se realizó en el espectrofotómetro a 410 nm (antes de la lectura de cada una de las alícuotas del extracto, primero se ajustó el aparato a 0.00 de absorbancia (100 % T) con su respectivo blanco)

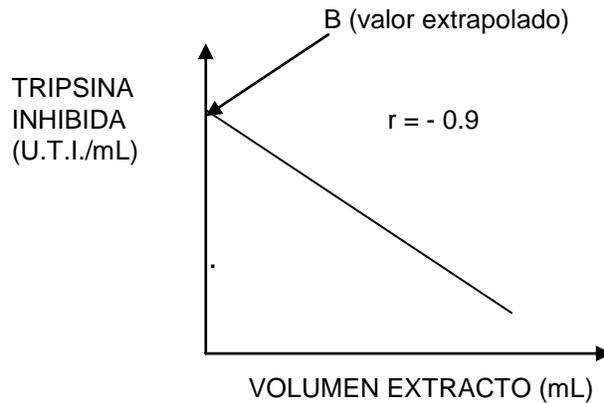
b) El tubo con 0.00 mL de extracto es la referencia (40 µg de tripsina/10mL), sobre el cual se basare los cálculos.

### 4. Cálculos:

a) La lectura de absorbancia (A), directamente se pasa a unidades de tripsina:  
$$U.T. = A \times 100$$

b) Como se tiene una serie de alícuotas del extracto, se tiene a su vez una serie de valores de U.T., cada valor de UT obtenido se resta al dato de referencia, obteniendo así los respectivos valores de unidades de tripsina inhibida (U.T. I.)

c) Se puede calcular el valor de U.T.I./ mL de cada una de las alícuotas y cuando se grafica la actividad enzimática inhibitoria (U.T.I./ mL) como una función de la alícuota del extracto de prueba, se observa una correlación lineal negativa, de donde se puede obtener el valor extrapolado, correspondiente al valor cero de la solución inhibitoria.



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

Cuando se obtiene una correlación lineal no satisfactoria ( $< -0.9$ ), se puede trabajar el valor promedio de la serie de alícuotas, reportado en términos de U.T.I./mL.

$$\text{U.T.I./mg muestra} = B \times F \times \frac{50}{1000 \text{ mg}}$$

Donde:

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

F = Factor de dilución, el cual depende de la (s) dilución (es) realizada (s).

Cuando se trabaja el extracto directo  $F=1$

$$F = \frac{A_1}{a_1} \times \frac{A_2}{a_2}$$

$A_i = \text{aforo (s)}$

$a_i = \text{alícuota (s)}$

---

**❖ Determinación cuantitativa de Lectinas (Hemaglutininas)****Material**

- Parrilla de múltiple agitación Corning stirrer
- Centrífuga eppendorf 5702
- Tubos de centrífuga de 15 mL con graduación.
- Incubadora Blue M
- Espectrofotómetro Sequoia-turner
- Adaptador para celdas de 12 x 80 mm (acondicionado a una abertura de 1 cm<sup>2</sup>)
- Microtiter Kit. Microdilutor 50 µL
- Embudos pequeños
- Balanza analítica sartorius
- Pipeta automática multicanales
- Dispositivo de lectura de placas
- Fibra limpia de vidrio
- Placas de microtitulación tipo "V"

**Reactivos**

- Solución anticoagulante (Heparina 1000 UI)
- Solución salina (NaCl) al 1%.
- Solución salina (NaCl) al 0.9%.
- Solución del estándar de lectina ***Ricinus communis*** (SIGMA L-7886-5 MG ) (a)
- Proteasa al 0.2% (SIGMA P-5147).

(a) La concentración inicial reportada en el estándar de Lectina ***Ricinus communis*** fue de 11.89 mg de ricina/mL en un volumen de 0.48 mL por lo que a partir de este dato se realizó el cálculo para tomar un volumen que tuviera una concentración de 0.1 mg de ricina/mL , al realizar el cálculo para

5 mL el volumen que presenta esta concentración fue de 43  $\mu$ L, por lo que se midió este volumen con la mayor exactitud y cuidado, se colocó en un matraz aforado de 5 mL y a continuación se aforo con solución isotónica (0.9%). De esta solución se realizó una dilución 1:10 que fue el estándar que se ocupó en la determinación, con la finalidad de definir la cantidad mínima de *Ricinus communis* que produce prueba positiva de aglutinación (L).

### Procedimiento

#### 1. Preparación del extracto:

- a) La muestra con un contenido < 5% de grasa se molió finamente con un mortero.
- b) Se suspendió 0.10 g de muestra en 10 mL de solución salina al 1%.
- c) Se efectuó la extracción con agitación mecánica durante 2 horas a 300 r.p.m a temperatura ambiente.
- d) Se centrifugó el extracto a 3000 rpm., durante 10 minutos para eliminar el residuo insoluble.
- e) Se filtró el sobrenadante a través de un filtro de vidrio de porosidad gruesa.
- f) Se lavó el residuo con solución salina al 1%.
- g) El extracto filtrado se llevo al volumen inicial (10 mL).

#### 2. Preparación de la sangre:

- a) Se sangró al hámster por vía ocular.

- b) Se colocó la sangre en un matraz pequeño con solución anticoagulante.
  - c) Se agitó suavemente para la completa homogeneización de la sangre con la solución anticoagulante.
  - d) Para evitar al máximo la coagulación, se diluyó esta con solución salina isotónica.
  - e) Se transvaso la sangre con anticoagulante a tubos de centrifuga.
  - f) Se lavo 3 veces con solución salina al 0.9%, la relación “sangre: solución salina” fue de aproximadamente 1:13.
  - g) Se centrifugo a 3000 rpm. durante 10 minutos.
  - h) Después del último lavado, se medio en el tubo de centrifuga la cantidad de paquete de eritrocitos.
  - i) Se diluyó al 4% para lo cual se agrego por cada 1 mL de glóbulos rojos 24 mL de solución salina al 0.9%.
2. Sensibilización de los glóbulos rojos:
- a) A cada 10 mL de suspensión de glóbulos rojos al 4 % se agrego 1 mL de solución de pronasa al 0.2 %.
  - b) Se colocaron en incubadora por espacio de 1 hora a  $36.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ .
  - c) Se centrifugo para eliminar la enzima sobrenadante y se dio 3 lavados con solución salina al 0.9%.
  - d) Después del último lavado se re suspendió el paquete de glóbulos rojos al 4 %, para lo cual, por cada mililitro del paquete de eritrocitos se adiciono 24 mL de solución salina al 0.9%.

### 3. Ajuste de la suspensión de glóbulos rojos:

- a) Se tomó 0.1 mL de la suspensión de glóbulos rojos ya sensibilizados y se agregó 4.9 mL de solución salina al 0.9 %.
- b) Se leyó en el espectrofotómetro a 620 nm, usando un adaptador de celdas que permitió el paso de solo 1 cm<sup>2</sup> de luz y como blanco solución salina al 0.9%.
- c) La lectura que se debe obtener debe estar en un rango de 24 a 29% de transmitancia.

Nota: En caso contrario se tiene que realizar la dilución necesaria para que la suspensión de glóbulos quede dentro de dicho rango.

### 4. Microtitulación:

- a) En las placas tipo “V” del microtiter se colocó en cada pozo de las hileras que se van a usar 100 µL de solución salina al 0.9% con la pipeta automática multicanales evitando tocar las paredes del pozo
- b) Se llenó el microdilutor con 50 µL, esto se hizo introduciéndolo en el extracto problema y al sacarlo se absorbió con mucho cuidado la solución adherida en el vástago del microdilutor.
- c) Se introdujo en el primer pozo de la hilera, girándolo sin excesiva presión y se pasó con mucho cuidado al siguiente pozo y así sucesivamente hasta completar una hilera para obtener las diluciones seriadas.
- d) Se realizó lo anterior para el estándar, solución diluida (1:10) de ***Ricinus communis*** que sirvió como referencia para la determinación cuantitativa.

Nota: Para cada placa se preparó una hilera para el estándar de ***Ricinus communis*** y una hilera para la prueba negativa de lectinas a la cual solo se le colocó solución salina isotónica.

- e) Con un pipetero de gota se colocó en cada pozo 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizados y ajustados.
- f) Se giró la placa en forma circular y se colocó en la incubadora a  $36.5 \pm 0.5$  °C durante 1 hora.

### 5. Lectura:

- a) Se colocó la placa sobre el dispositivo de lectura.
- b) Se observó a través del espejo el fondo de los pozos de cada hilera de prueba.
- c) Se reportó la máxima dilución que presenta prueba positiva de aglutinación, tanto del extracto de la muestra a ensayar como de la dilución del estándar de ***Ricinus communis***.

### Recomendaciones:

- Realizar la dilución necesaria para que el extracto produzca un título dentro de los primeros 10 pozos de una hilera.
- Cuidar el rango de temperatura establecida y todo el material que se utilice debe estar perfectamente limpio.

### Cálculos:

- La máxima dilución que presenta aglutinación se denomina como título (t) de la muestra.

- 
- La prueba debe efectuarse varias veces para mayor representación y confiabilidad de la determinación (mínimo por triplicado). Se saca el promedio de los títulos de las diferentes lecturas y se redondea al número entero más cercano.
  - Se calcula el límite de detección del método usando como referencia la Lectina *Ricinus communis*.; para lo cual, primero fue necesario conocer la cantidad de lectina que se utiliza realmente en la determinación y se calcula de la siguiente forma:

$$E = M \cdot D$$

Donde:

E: Cantidad de lectina para el primer pozo de la hilera respectiva (expresada en  $\mu\text{g}$ )

M: [lectina] en la solución diluida (expresada en  $\mu\text{g/mL}$ )

D: Cantidad de muestra tomada por el microdilutor ( $\mu\text{L}$ )

- Conociendo este dato se puede efectuar el cálculo para obtener el límite de detección del método:

$$L = 2 (E/3^t)$$

Donde:

L: Límite de detección, cantidad mínima de lectina que produce prueba positiva de aglutinación (expresada en  $\mu\text{g}$ )

t : Título o el promedio de los títulos redondeando al entero inmediato.

- 
- Con el resultado del límite de detección, se calculo las unidades hemaglutinantes (UHG) de la muestra problema, para lo cual fue necesario calcular la cantidad utilizada realmente de la muestra problema en el primer pozo de la hilera respectiva como se hizo anteriormente, pero expresada en mg.

$$e = M \cdot D$$

Donde:

e: Cantidad de la muestra en el primer pozo de la hilera respectiva (expresada en mg de lectina).

M: [muestra] en la solución diluida (expresada en  $\mu\text{g/mL}$ )

D: Cantidad de muestra tomada por el microdilutor ( $\mu\text{L}$ )

- Se calculó la cantidad mínima de muestra que produce prueba positiva de aglutinación (título de la muestra problema).

$$MA = 2 (e/3^t)$$

Donde:

MA: Cantidad mínima de muestra que produce aglutinación (expresada en mg)

e: Cantidad de muestra en el primer pozo (expresado en mg)

t: Título o promedio de los títulos redondeado al entero inmediato.

- Con los datos anteriores se pudo determinar la concentración equivalente de lectina que tiene la muestra problema de acuerdo a la siguiente expresión:

$$LE = L/MA$$

Donde:

LE: Cantidad de lectina de referencia expresada en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de muestra que también equivale a 1 mg de lectina/g de muestra.

Si por definición establecemos que 1 unidad de hemoaglutinación (UHG) es equivalente a 1 mg de lectina bajo las condiciones establecidas, podemos expresar nuestros resultados en UHG/g de muestra.

### **Determinación semi - cuantitativa de Alcaloides**

Material

- Parrilla de agitación CORDING Mod. PC-351
- Rotavapor marca BUCHI Mod. R.
- Papel filtro Whatman #1
- Matraz de bola 100mL

Reactivos

- Metanol R.A
- Ácido clorhídrico 1%
- Reactivo de Mayer (1)
- Reactivo de Wagner (2)
- Reactivo de Draendorff (3)
- Reactivo de Sonnenschein(4)
- Reactivo de Hager(5)
- Reactivo de Scheibler (6)
- Reactivo de acido Silicotugstenico(7)

(1) Se disolvió 1.36 g de  $\text{HgCl}_2$  en 60 mL de agua y 5.0 g KI en 10 mL de agua.

Se juntó las dos soluciones y se aforo a 100 mL con agua destilada

(2) Se disolvió 1.27 g de yodo (resublimado) y 2 g de yoduro de potasio en 20mL

de agua; la solución se aforó a 100 mL con agua destilada.

- (3) Se disolvió 8 g de nitrato de bismuto penta hidratado en 20 mL de ácido nítrico y 27.2 g de KI en 50 mL de agua.

Se mezcló las dos soluciones y se dejó reposar durante 24 horas.

Se decantó la solución y se aforó con agua a 100 mL.

- (4) A 100 mL de una solución caliente de molibdato de amonio (43 g/100 mL), se adiciono 100 mL de una solución caliente de fosfato de sodio dibásico anhidro (10 g/100 mL), a esta solución clara se le adicionó 10 mL de ácido nítrico concentrado; al precipitado amarillo que se formo se dejó reposar durante 1 hora. Se decantó el líquido sobrenadante y se desecho, se suspendió el precipitado amarillo en 50 mL de agua destilada y se calentó. A la suspensión caliente se le adiciono 100 mL de la solución de carbonato de sodio anhidro caliente (28 g/100 mL). Una solución clara debe formarse, y esta solución se evaporo en la capsula a sequedad, se flameo la superficie del polvo con un mechero bunsen hasta encenderse, para evaporar las sales de amonio. Se pesó el polvo y el cual fue de aproximadamente 30 g el cual se disolvió en 200 mL de agua destilada caliente se calentó y adiciono a esta solución 50 mL de ácido nítrico concentrado, a esta solución de adicionó agua destilada hasta llevar a un aforo de 300 mL; resultado una solución clara amarilla de ácido fosfomolibdico.

- (5) Se preparó una solución acuosa saturada de ácido pícrico (2 g/100 mL).

- (6) Se disolvió en 50 mL de agua 10 g de tungstato de sodio y 7 g de fosfato

disódico. La solución se acidulo con ácido nítrico.

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

### Procedimiento

- a) Se pesó 4 g de muestra seca y molida finamente.
- b) Se mantuvo toda la noche con 40 mL de metanol.
- c) Se calentó durante 4 horas a 50 °C, agitando interrumpidamente.
- d) La mezcla se filtró.
- e) El residuo se lavó con 20 mL de metanol los extractos obtenidos se combinaron.
- f) Se evaporó el disolvente en el rotovapor.
- g) El residuo se resuspendió con 2 mL de metanol y 12 mL de HCl al 1% para retirar el resto del residuo se uso 8 mL de HCl al 1%.
- h) La mezcla se agitó y filtró
- i) El filtrado se hizo básico con amoniaco concentrado.
- j) La solución anterior se extrajo con tres porciones de 20 mL de cloroformo cada una, dando la fracción "A".
- k) La solución acuosa residual de la anterior extracción, se extrajo con una mezcla de cloroformo-etanol (3:2 v/v) con tres porciones de 20 mL cada una, esta fue la fracción "B".
- l) Las fases orgánicas (A y B) se lavaron con 5 mL de solución media saturada de sodio y secada con sulfato anhidro.

- m) Las dos fracciones A y B se evaporaron en un rotovapor por separado.
- n) El residuo se re suspendido con 1.5 mL de HCl al 1% y 1.5 mL de cloroformo.
- o) Se agitó vigorosamente y la fase acuosa de cada fracción se y filtró a través de algodón y se dividió en 7 porciones.
- p) Estas alícuotas se ensayaron con los 7 reactivos de alcaloides
- q) La presencia de precipitado indicó una prueba positiva.

### **Determinación cuantitativa de Alcaloides**

#### Material

- Embudo de separación de 125 mL
- Parrilla de agitación
- Papel filtro Whatman 1
- Matraces bola de 100 mL

#### Reactivos

- Metanol
- Amoniacó concentrado 30%
- Cloroformo R.A
- Etanol R.A
- Sulfato de sodio anhidro
- Solución de sulfato de sodio saturada
- Rojo de metilo (1%)
- NaOH 0.1N (Valorada)
- Acido sulfúrico 0.01N
- Mezcla de cloroformo–etanol (3:2 v/v)

#### Procedimiento

- a) Se pesó 5 g de muestra previamente desengrasada.

- b) Se colocó en un matraz con 40 mL de metanol.
- c) Se dejó en agitación toda la noche a temperatura ambiente.
- d) Transcurrido el tiempo se colocó en un baño a  $46\pm 2$  °C con agitación constante durante 4h.
- e) La mezcla se filtro con papel Watman # 52 y el residuo se lavó con 20 mL de metanol.
- f) Se evaporó el disolvente en un rotovapor a 60°C a sequedad.
- g) Se re suspendió el residuo con 2 mL de metanol y se le adiciono 12 mL de HCl 1% se coloco en un vaso de precipitados y el matraz bola se lavo con 8 mL de HCl 1%
- h) Se filtró con papel Watman # 52.
- i) Este filtrado se alcalinizo llevando a un pH de  $9.5\pm 0.2$  con  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado.
- j) Se pasó a un embudo de separación y se extrajo con tres porciones de cloroformo de 20 mL cada una.
- k) Se recupero la fase orgánica (inferior) (A).
- l) A la fase acuosa se le midió el volumen, y se le agrego el mismo volumen medido de una solución saturada de sulfato de sodio, se extrajo con tres porciones de la mezcla cloroformo-etanol de 20 mL cada una.
- m) Se recupero la fase orgánica y se junto con la de la anterior (A)
- n) Esta fase orgánica se pasó a un embudo de separación y se le adiciono 10 mL de una solución saturada de sulfato de sodio.

- 
- o) La fase orgánica se recibió en un vaso que contenía 5 g de sulfato de sodio anhidro.
- p) Por decantación se pasó la fase orgánica a un matraz bola.
- q) Se evaporó a sequedad el disolvente.
- r) Al residuo se le adicionó exactamente 10 mL de ácido sulfúrico 0.01N con pipeta volumétrica, se homogenizó y el matraz bola se lavó con 10 mL de agua desionizada.
- s) Se adicionó 5 gotas de rojo de metilo al 0.1% y se realizó una microtitulación con NaOH 0.1N.

Cálculos:

$$\text{mg. de alcaloide / g de muestra} = \frac{(A-B) * N * \text{meq} * 1000}{\text{g muestra}}$$

Donde:

A= mL de NaOH 0.1N gastados por el blanco

B= mL de NaOH 0.1N gastados por la muestra

N= Normalidad 0.1N

Meq= 0.1642 (Dos moléculas de alcaloide referidas a la ricinina (PM: 164.16) reaccionan con una molécula de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en medio acuoso, formándose la sal correspondiente de alcaloide).

### **Determinación de ésteres de forbol**

Materiales

- Rotovapor
- Baño de agua.
- Bomba de agua

- Charola de plástico
- 2 Mangueras de látex
- Termómetro de  $-20$  a  $400^{\circ}\text{C}$
- Mortero con pistilo
- Columna: Nucleosil 100-5 C18, 150 mm 4.6 mm, tamaño de partícula  $5\ \mu\text{m}$
- Sistema de ultrafiltración Millipore
- Membranas de filtración de  $0.45\ \mu\text{m}$
- Integrador Millipore Waters 745
- Detector UV –VIS Waters 2487
- Bomba
- Sonicator ultrasonico: Branson modelo 3210
- Matraz Kitasato de 250 mL
- Buchner con alargadera.

### Reactivos

- Tetrahidrofurano(THF) grado HPLC
- Acetonitrilo grado HPLC (solvente B)
- Acido fosfórico (R.A)
- Diclorometano(R.A)
- Estandar de forbol 12-miristato 13-acetato (SIGMA P8139-5 MG)
- Arena (Grado Analítico)

### Procedimiento

#### 1. Extracción de los esteres de forbol:

- a) Se eligieron 5 almendras representativas del lote de las semillas de higuera.
- b) Se pesaron y se molieron con un poco de arena de mar grado analítico, usando un mortero con pistilo y 200 mL de diclorometano por 5 min, el

material se dejó asentar y el diclorometano se filtró en frío utilizando el vacío y papel filtro del No 50.

c) El residuo en el papel filtro y en el pistilo es recuperado usando otros 20ml de diclorometano y homogenizado por otros 5 min. La fase líquida fue de nuevo colectada, este procedimiento se repitió 3 veces y el filtrado de las 5 extracciones fue recolectado.

d) El residuo (de la arena y las semillas) fue sujeto a ondas ultrasónicas (105W) por 3 min con 50 mL de diclorometano, posteriormente se filtró y este filtrado se juntó con el resto de las extracciones previas.

e) El filtrado se llevó a sequedad con un rotovapor a una temperatura de 40°C con vacío.

### 2. Preparación de la muestra:

a) El residuo seco de la muestra se aforó a 5 mL con THF.

b) Se filtró en frío a través de una membrana de millipore de 0.45 µm recibiendo este filtrado en un vial.

### 3. Preparación del estándar:

a) Se pesó 1mg del estándar de forbol 12-miristato 13-acetato (SIGMA P8139-5 MG) y se aforó con 1mL de Tetrahidrofurano (THF).

b) Se filtró en frío a través de una membrana de millipore de 0.45 µm recibiendo este filtrado en un vial, se mantuvo en frío debido a que el THF es muy volátil.

### 4. Preparación de buffer de ácido fosfórico (disolvente A):

- a) Se tomó con la pipeta 1.75 mL de ácido fosfórico al 65% y se llevó este volumen a 1L con agua destilada
- b) Se ajustó el pH a  $1.80 \pm 0.02$  con HCl 0.01N.
- c) Se filtró por un sistema millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  y se almacenó en refrigeración dentro de un frasco ámbar.

### 5. Acondicionamiento del equipo:

- a) Se realizó un lavado de columna con agua previamente filtrada por un sistema millipore de 0.45  $\mu\text{m}$ , la cantidad de agua para lavarla fue de 15 a 20 volúmenes, durante 1 hora,
- b) Se dejó 1 hora con las condiciones de inicio del gradiente.

### 6. Condiciones de cuantificación:

- a) Detector de UV- Vis
- b) Fase móvil:

Fase móvil A: buffer de ácido fosfórico

Fase móvil B: acetronitrilo

Los cuales se desgasifican por 1h en el sonicador antes de usarse.

c) Gradiente:

Tiempo (minutos)	Fase A %	Fase B %
0	60	40
10	50	50
40	25	75
55	0	100

a) La cuantificación se llevó a cabo a temperatura ambiente, los picos se integraron a 280nm.

b) Después de cada corrida la columna se lavó por 15 min con THF al 100% y posteriormente se volvió a ajustar el equipo con las condiciones iniciales.

6. Inyección de la muestra y el estándar:

De la muestra así como del estándar se inyectan 20  $\mu$ L, cada uno se inyecta por triplicado.

#### **Digestibilidad proteínica “in vitro”**

Material

- Baño de agua Grant modelo 5E-10 a 37 °C
- Baño de agua Polystat a 55°C
- Balanza analítica sartorius modelo A-210-P
- Potenciómetro Corning pHmeter modelo 10, con electrodo de calomel
- 2 vasos de precipitados de 1L para cambio de baños

Reactivos

- HCl diluido

- NaOH diluido
- Solución enzimática A(a)
- Solución enzimática B (b)

(a) Se aforó con 10 mL de agua destilada las siguientes enzimas:

- Tripsina pancreática porcina (Tipo IX)  
227040 unidades BAEE de tripsina (SIGMA T-0134)
- Pepsina porcina de mucosa gástrica  
0.520 unidades BAEE de pepsina (SIGMA P7000-25G)
- $\alpha$ -quimotripsina pancreática bovina (Tipo II)  
1860 unidades BAEE de alfa quimitripsina (SIGMA C-1421)

Nota: En la preparación de esta solución enzimática se realizó una modificación ya que en lugar de usar la Peptidasa intestinal porcina (Grado I) enzima propuesta en la metodología original publicada en la AOAC; se utilizó la Pepsina porcina de mucosa gástrica (SIGMA P7000-25G).

(b) Se aforó con 10 mL con agua destilada la siguiente enzima:

- Proteasa bacteriana 65 unidades de caseína de proteasa (SIGMA P5147-1G)

#### Procedimiento

- a) Se pesó la muestra que contenía 10 mg de  $N_2$ ,
- b) Se utilizó como control cuantitativo la caseína liofilizada.
- c) Se adicionó 10 mL de agua destilada.
- d) Se equilibró el pH a  $8.00 \pm 0.03$  utilizando HCl y NaOH diluido.
- e) Se dejó una hora remojando y en agitación en un baño de  $37^\circ\text{C}$ .
- f) Se equilibró las soluciones enzimáticas a pH de  $8.00 \pm 0.03$  y  $37^\circ\text{C}$ .
- g) Transcurrida la hora se añadió 1 mL de solución A mientras se agita.

- h) Exactamente 10 minutos después de añadida la solución A, se adicionó 1 mL de la solución B y al mismo tiempo se transfirió el vial a un baño de 55 °C.
- i) Exactamente 19 minutos después de añadida la solución A, se transfirió el vial a un baño de 37°C.
- j) A los 20 minutos después de añadida la solución A medir el pH
- k) El pH del control de caseína debe ser de  $6.42 \pm 0.05$ .

Cálculos:

Calcular el % de proteína digerida o % de digestibilidad de la siguiente forma:

$$\% \text{ digestibilidad} = 234.84 - 22.56 \text{ (lectura de pH)}$$

### **Tratamiento con calor húmedo**

#### Materiales

- Vaso de precipitados 1L
- Balanza granataría
- Termómetro
- Autoclave
- Estufa
- Charola de aluminio

#### Procedimiento

- a) Se pesó 500 g de semillas en un vaso de precipitados en la balanza granataría.
- b) Por cada gramo de semillas se agrego 1mL de agua.

- c) El vaso se tapo con papel aluminio (con unos pequeños orificios )
- d) Se metió a la autoclave a una presión de 15 psi por 15 minutos, el tiempo se conto a partir de que el manómetro de la Autoclave registro 15 psi,
- e) Transcurrido el tiempo se apago el equipo y hasta que descendió la presión se abrió la autoclave para sacar las semillas.
- f) Las semillas se extendieron en charolas de aluminio para posteriormente meterlas en la estufa para su secado, el tiempo de secado fue de 16 hrs a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ .

### **Ensayo de toxicidad aguda**

#### Materiales

- Balanza Granataria (OHAUS) para animales de laboratorio
- Rack de jaulas de acero inoxidable
- Jaulas de acrílico con comedero y bebedero
- Marcador de orejas metálico
- Jeringa hipodérmica de 1mL (tipo insulina)
- 30 ratones macho de la cepa ICR de 18-22g.

#### Procedimiento

##### 1. Selección de la especie:

- a) Se ocuparon ratones macho de la cepa ICR de 18-22 g de peso corporal, se eligieron ratones de 1-2 semanas de edad con el fin de observar su crecimiento durante el bioensayo.

##### 2. Distribución de los animales:

- a) Primero se les suprimió el alimento y solamente se les dejo agua.

b) Se pesó y marcó cada ratón con un orador especial de acuerdo a la siguiente anotación:

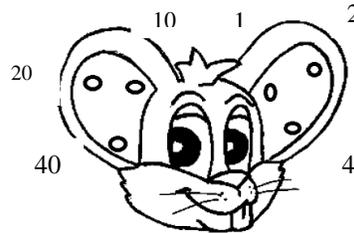


Figura 11. Forma para marcar ratones.

c) Se pesaron los animales y la distribución se hizo de acuerdo al método de la “culebra japonesa” colocando como mínimo 6 ratones por lote.

Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5
15.6	16.2	16.4	16.4	16.4
16.7	16.6	16.5	16.5	16.5
16.8	16.9	17.0	17.1	17.2
17.6	17.5	17.4	17.3	17.2
17.6	17.6	17.7	17.9	18.0
18.9	18.7	18.4	18.4	18.3

Tabla 14. Distribución de animales conforme a su peso de acuerdo al método de la “Culebra Japonesa”

### 3. Preparación de la muestra:

a) Como el máximo volumen permitido en ratones, tanto por vía oral como intraperitoneal es de 1 mL y considerando que en promedio un ratón pesa 30 g, se calculó esta relación la cual fue de 0.03333 mL/g p.c. (p.c= peso corporal) equivalente a 33.33 mL/kg p.c con este factor se logró realizar los cálculos necesarios para preparar las dosis.

- b) Se partió de una dosis inicial de 15000 mg/kg de p.c realizando una disminución de la dosis usando el factor de dosis progresivo de 3.2 para las demás, por lo que las dosis quedaron de la siguiente forma: 15000 mg/kg p.c, 4687.5 mg/kg p.c, 1464.8 mg/kg p.c, 457.8 mg/kg p.c.
- c) Las dosis se prepararon a partir de la muestra desengrasada y destoxificada, para la primera dosis resultó difícil preparar la suspensión homogénea, ya que se necesitaba mucha muestra debido a que la harina de la semilla de higuera desengrasada y destoxificada resulta ser una harina muy fina y de poca densidad, por lo que la primera dosis se suministró en dos partes; cada una de 7500 mg/kg p.c, suministrando la segunda dosificación una hora después de la primera.

Ejemplo de cálculo para la preparación de la primera dosis:

$$7500 \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \left( \frac{\text{kg p.c}}{33.33 \text{ mL}} \right) = 225.023 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \left( \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \right) = 0.225 \text{ g muestra/mL}$$

- d) Por lo que para la primera dosis se pesó 0.225 g de muestra.
- e) Como vehículo para la suspensión de la muestra se usó goma Xantana al 0.1%, también se le agregó colorante (rojo #40) al 0.01% esto con el fin de visualizar mejor el volumen de la muestra en el momento de la administración.
- f) Una vez que se pesó la muestra se aforó a 10 mL con la solución de goma Xantana al 0.1%.

g) Todas las dosis se prepararon minutos antes de la administración, se mantuvieron a la temperatura corporal del animal (36-37°C) y para esto se colocaron en un baño con esta temperatura hasta el momento de la administración.

#### 4. Dosificación:

a) Se preparó la jeringa con el respectivo volumen para cada ratón de acuerdo a su peso, por ejemplo para el primer ratón se suministro del lote control se suministro 0.51 mL.

Porque: 
$$15.6 \cancel{g} \left( \frac{0.033 \text{ mL}}{\cancel{g} \text{ p.c}} \right) = 0.51 \text{ mL}$$

- b) Se sujetó al ratón con la mano izquierda de la nuca y el pescuezo.
- c) Se introdujo lateralmente a través del espacio interdental y con una suave rotación se avanza dentro del esófago hasta un nivel conveniente y se procedió a descargar el líquido.



Figura 12. Dosificación

### 5. Observaciones clínicas:

- a) Se observó su comportamiento inmediato al momento de suministrarle cada dosis y se registro.
- b) Se monitoreo su comportamiento cada hora durante 24 horas con el fin de observar síntoma clínico anormal.
- c) Los síntomas clínicos que se monitorearon fueron: Lordosis, Xifosis, Ataxia, Piloerección, Erección Caudal, Agresividad, Aletargamiento, Excitación, Disnea, Cianosis e Hipotermia.
- d) Se mantuvieron en observación 14 días y cada tercer día se pesaron los ratones de cada lote, con el fin de observar si la administración de la muestra de estudio tuvo una influencia sobre los animales ya que la pérdida de peso corporal es buen indicador de efecto tóxico.
- e) Al finalizar el estudio se realizó un grafico donde se observa la curva de crecimiento del peso promedio de cada lote durante los 14 días.
- f) Finalmente se realizó un Análisis Estadístico para ver la diferencia de cada dosis suministrada con respecto al lote control.

## ANEXO II

Se muestra el Análisis de Varianzas (ANOVAS), por día, la hipótesis planteada fue:

- Hipótesis nula ( $H_0$ ): "no existe diferencia significativa entre el lote1 (Control), lote2 (15000 mg/kg p.c), lote 3 (4687.5 mg/kg p.c), lote 4 (1464.8 mg/kg p.c) y lote 5 (457.8 mg/kg p.c); es decir, todas las medias( $\mu$ ) de los lotes son iguales:  $H_0 = \mu_{\text{lote1}} = \mu_{\text{lote2}} = \mu_{\text{lote3}} = \mu_{\text{lote4}} = \mu_{\text{lote5}}$
- Hipótesis alterna ( $H_A$ ): "Sí existe diferencia significativa entre el lote1 (Control), lote2 (15000 mg/kg p.c), lote 3 (4687.5 mg/kg p.c), lote 4 (1464.8 mg/kg p.c) y lote 5 (457.8 mg/kg p.c); es decir, todas las medias( $\mu$ ) de los lotes son diferentes:  $H_A = \mu_{\text{lote1}} \neq \mu_{\text{lote2}} \neq \mu_{\text{lote3}} \neq \mu_{\text{lote4}} \neq \mu_{\text{lote5}}$

**Tabla 15.** Análisis de Varianza del peso promedio por lote para el día 0.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Conclusión
Entre grupos	0.80	4	0.200	0.27	0.89	2.76	<b>No hay diferencia</b>
Dentro de los grupos	18.24	25	0.73				
Total	19.03	29					

**Tabla 16.** Análisis de Varianza del peso promedio por lote para el día 3.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Conclusión
Entre grupos	26.79	4	6.70	2.42	0.08	2.76	<b>No hay diferencia</b>
Dentro de los grupos	69.34	25	2.77				
Total	96.13	29					

**Tabla 17.** Análisis de Varianza del peso promedio por lote para el día 5

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Conclusión
Entre grupos	82.80	4	20.70	4.83	0.01	2.76	<b>Si hay diferencia</b>
Dentro de los grupos	107.18	25	4.29				
Total	189.97	29					

**Tabla 18.** Análisis de Varianza del peso promedio por lote para el día 7

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Conclusión
Entre grupos	22.14	4	5.53	1.04	0.41	2.76	<b>No hay diferencia</b>
Dentro de los grupos	133.11	25	5.32				
Total	155.25	29					

**Tabla 19.** Análisis de Varianza del peso promedio por lote para el día 10

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Conclusión
Entre grupos	23.15	4	5.79	0.85	<b>0.51</b>	2.76	<b>No hay diferencia</b>
Dentro de los grupos	170.53	25	6.82				
Total	193.67	29					

**Tabla 20.** Análisis de Varianza del peso promedio por lote para el día 12

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Conclusión
Entre grupos	23.65	4	5.91	0.89	0.48	2.76	<b>No hay diferencia</b>
Dentro de los grupos	166.25	25	6.65				
Total	189.90	29					

**Tabla 21.** Análisis de Varianza del peso promedio por lote para el día 14

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Conclusión
Entre grupos	43.66	4	10.92	1.72	0.18	2.76	<b>No hay diferencia</b>
Dentro de los grupos	158.81	25	6.35				
Total	202.47	29					