



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“CARACTERIZACIÓN COMPARATIVA DEL ASPECTO  
BROMATOLÓGICO Y TOXICOLÓGICO  
EN PAPITA DE MONTE (*Solanum cardiophyllum*)”**

**TESIS**

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

**PRESENTA**

**MAYRA JOSELYNE GUTIÉRREZ GARCÍA.**



**MÉXICO, D.F.**

**2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** DR. PEDRO VALLE VEGA.  
**VOCAL:** M. EN C. BERNARDO LUCAS FLORENTINO.  
**SECRETARIO:** M. EN C. LUCIA CORNEJO BARRERA.  
**1ER. SUPLENTE:** Q.F.B. JUAN DIEGO ORTIZ PALMA PÉREZ.  
**2º SUPLENTE:** DRA. ILIANA ELVIRA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ.

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

ANEXO DE LOS LABORATORIOS 4A Y 4C DEL DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA,  
EDIFICIO A DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

**ASESOR DEL TEMA:**  
M. en C. Bernardo Lucas Florentino.



**SUPERVISOR TÉCNICO:**  
Dr. Robert Bye Boettler.



**SUSTENTANTE:**  
Mayra Joselyne Gutiérrez García.



ESTA TESIS FUE ELABORADA CON EL APOYO BRINDADO POR EL  
COLEGIO DE PROFESORES DE LA FACULTAD DE QUÍMICA Y LA SECCIÓN 024  
DEL APAUNAM  
A TRAVÉS DE LA CÁTEDRA.  
**“NINFA GUERRERO DE CALLEJAS”**

---

# ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivos particulares	3
3. ANTECEDENTES	
3.1. Papita de monte ( <i>Solanum cardiophyllum</i> )	4
3.2. Componentes químicos de la papa	7
3.2.1. Agua	8
3.2.2. Hidratos de carbono	8
3.2.3. Proteína	10
3.2.4. Lípidos	11
3.2.5. Fibra	12
3.2.6. Cenizas	12
3.3. Complementación bromatológica	13
3.3.1. Vitamina C	13
3.3.2. Densidad calórica	14
3.3.3. Fibra dietaría total	15
3.4. Factores tóxicos y antinutricionales	17
3.4.1. Lectinas	18
3.4.2. Inhibidores de tripsina	18
3.4.3. Ácido oxálico	20
3.4.4. Ácido fítico	20
3.4.5. Saponinas	21
3.4.6. Glicoalcaloides	22

4. METODOLOGÍA	24
4.1. Acondicionamiento de material biológico	25
4.2. Diagrama de flujo	26
4.3. Análisis proximal	27
4.3.1. Humedad por secado al vacío	27
4.3.2. Cenizas totales	29
4.3.3. Proteína cruda	31
4.3.4. Grasa cruda	34
4.3.5. Fibra cruda	36
4.3.6. Hidratos de carbono	38
4.4. Complementación bromatológica	38
4.4.1. Densidad calórica	38
4.4.2. Fibra dietaría total	42
4.4.3. Vitamina C	49
4.5. Determinación de factores tóxicos y antinutricionales	52
4.5.1. Lectinas	52
4.5.2. Inhibidores de tripsina	58
4.5.3. Ácido oxálico	63
4.5.4. Ácido fítico	66
4.5.5. Saponinas	71
4.5.6. Determinación de $\alpha$ -solanina y $\alpha$ -chaconina mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	77
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
5.1. Análisis bromatológico	80
5.2. Complementación bromatológica	83
5.2. Análisis toxicológico y antinutricional	86
6. CONCLUSIONES	93
7. BIBLIOGRAFÍA	95
ANEXO I	101
ANEXO II	102

## RESUMEN.

En México el principal tubérculo cultivado y consumido ha sido la papa en su mayoría la especie (***Solanum tuberosum***). Sin embargo, una de las especies mexicanas no cultivadas es la papita de monte (***Solanum cardiophyllum***), se colecta y comercializa para el consumo humano en el Altiplano Potosino-Zacatecano y es aprovechado ampliamente. Las plantas son toleradas entre los cultivos de maíz y frijol, la recolección se realiza manualmente después que las parcelas se han arado en preparación para el siguiente ciclo agrícola. El consumo de esta papita es cocida y es muy importante saber que variaciones existen al someterla a tratamiento térmico, de tal manera que se realizaron los análisis bromatológico y toxicológico correspondientes.

En el primer análisis se observó que el valor nutrimental no se ve afectado por el tratamiento térmico. Sin embargo, los factores antinutrimientales y tóxicos en las muestras sometidas a tratamiento térmico disminuyeron considerablemente y en algunos casos no fue detectable la presencia de los mismos comparándolos con la muestra cruda.

## 1. INTRODUCCIÓN.

La agricultura representa una de las actividades más importantes que el ser humano desarrolla para obtener la mayor parte de los alimentos que consume y con el tiempo esta actividad ha experimentado avances importantes debido al desarrollo y avance tecnológico.

La domesticación de plantas y selección con ciertos atributos y ventajas adaptativas ha contribuido a un constante abastecimiento de alimento, un ejemplo claro de esta selección es la papa perteneciente a la familia botánica Solanaceae. El miembro representativo de esta familia es ***Solanum tuberosum***. La cual juega un rol importante en la dieta de diversos países, por lo cual es un cultivo de gran importancia en todo el mundo únicamente superado en consumo y producción total por el trigo, arroz y maíz (1).

Los tubérculos pertenecen al grupo de las hortalizas, las cuales son las partes comestibles de plantas herbáceas por lo común de cultivo anual y rara vez bienal (2). En México el principal tubérculo cultivado y consumido ha sido la papa común (***Solanum tuberosum***), considerada una excelente fuente de hidratos de carbono y posee cantidades significativas de fósforo, potasio, calcio y vitaminas.

Mientras que el contenido proteínico de la papa común varía entre el 10 y 15% de proteínas; sin embargo, en nuestro país existe una gran variedad de especies de papas silvestres, alrededor de 40 taxones de ***Solanum spp.*** Las cuales son recolectadas para autoconsumo y algunas se comercializan. Se encuentra

reportado que la mayoría de las papas silvestres presentan un sabor amargo y su consumo puede dar lugar a trastornos digestivos y vómito, para combatir estos efectos los consumidores suelen combinarlas con arcillas comestibles. Los estados mexicanos con mayor diversidad de este tipo de papas silvestres son Estado de México, Michoacán, Jalisco, Hidalgo, Oaxaca, Veracruz y Puebla (3).

Entre las especies de papas silvestres, se encuentra la papa de monte o papita güera (*Solanum cardiophyllum*); es considerada una especie promisoría para las zonas áridas del Altiplano Potosino-Zacatecano, por su resistencia a heladas, sequías y enfermedades. Es una especie arvense, cuyos tubérculos se recolectan para autoconsumo y su comercio es realizado por pobladores de la zona, en especial en época de cuaresma y decembrina, alcanzando precios muy elevados, debido a su gran demanda y poca oferta (4).

Esta especie de papa silvestre se encuentra en terrenos planos a ligeramente ondulados, ubicados en zonas de cultivo (principalmente de maíz y frijol), pero también se pueden encontrar bajo nopales, mezquites y huizaches, en localidades con temperaturas de 16.1 a 18.3°C (3).

## 2. OBJETIVOS.

### 2.1. OBJETIVO GENERAL.

- Determinar la variación en la composición bromatológica y de los factores tóxicos naturales en la papita de monte (*Solanum cardiophyllum*), tanto cruda como cocida, pasa su propuesta como alternativa de consumo.

### 2.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Determinar la composición bromatológica que se presentan en papita de monte cruda (*Solanum cardiophyllum*).
- Efectuar el tratamiento térmico simulando al efectuado para consumo de esta papita y determinar la composición bromatológica.
- Determinar cualitativa y cuantitativamente los factores antinutricionales y tóxicos en la muestra cruda y cocida de papita de monte.

### 3. ANTECEDENTES.

#### 3.1. PAPITA DE MONTE (*Solanum cardiophyllum*) Lindl.

Información taxonómica (5,6).

**Reino:** Plantae

**Phylum:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Orden:** Solanales

**Familia:** Solanaceae

**Género:** *Solanum* L.

**Sección:** *Petota* Dumortier

**Grupo:** Bulbocastana en Norte y Centro América

**Epíteto específico:** *cardiophyllum*

**Taxa:** 2

**Especies:** 2

**Nombre científico:** *Solanum cardiophyllum*

**Autor del nombre:** John Lindley., 1848.

El tubérculo es de forma redondeada un poco irregular, de color blanco crema, piel suave. Se observan ojos y yemas en la superficie de la papita de monte. En algunas papas se observan yemas desarrolladas, posiblemente, para formar nuevos tallos. El diámetro promedio de esta papa es de 3 cm y un peso de aproximado de 2 a 3 g.



En México el cultivo de papa (***S. tuberosum***) es de gran importancia económica, ya que es de los pocos cultivos que se desarrollan en casi todo el territorio nacional. Sin embargo, la papa tiene un gran número de especies silvestres, especialmente en Suramérica dentro de las cuales se encuentra la papita de monte o papa de tierra (***S. cardiophyllum***) (6).

La papa silvestre (***S. cardiophyllum***), conocida por los lugareños como “papita de monte o güera”, se colecta y comercializa para el consumo humano en el Altiplano Potosino-Zacatecano. Las plantas se producen en asociación con los cultivos de maíz y frijol, la recolección de los tubérculos se realiza manualmente después de que las parcelas se hayan arado en preparación para el siguiente ciclo agrícola. Los tubérculos se ponen a la venta en mercados municipales de Zacatecas, San Luis Potosí, Guanajuato y Jalisco (7).

La “papita de monte” muestra cualidades que la distinguen de otras especies de papas. Tiene una buena tenacidad a condiciones de baja humedad, además de una gran resistencia a la agresividad a plagas como los hongos (***Phytophthora infestans*** y ***Alternaria solani***) que ocasionan pérdidas significativas en el cultivo de papa. Además, su sabor amargo no es muy intenso y no presenta graves trastornos digestivos en comparación con otros tipos de papas silvestres (7,8).

La ingesta de esta papa silvestre (***S. cardiophyllum***), de acuerdo a los pobladores de la zona de recolección (Aguascalientes y Guanajuato), es cocida en agua hirviendo con un poco de sal y en algunas ocasiones; se combina con diversos tipos de carne.

Por otro lado, desde el punto de vista toxicológico, en el género ***Solanum*** se encuentra presente glicoalcaloides (**GL**) que son los responsables de la toxicidad de ciertas variedades de papas (***S. tuberosum***), que rebasan el límite máximo permisible (20 mg de total GL/100 g papa), aparte de contener otros factores tóxicos, que es común que se presenten en papas silvestres. La naturaleza ha proporcionado a los vegetales de la capacidad de sintetizar una gran diversidad de metabolitos secundarios que originan reacciones tóxicas cuando son ingeridos por el hombre o los animales. Los glicoalcaloides de la papa no se destruyen por cocción, horneado o congelado. Papas con un contenido de 0,1 % de glicoalcaloides se considera como no apto para consumo humano (**9,10**).

No obstante, muchos alimentos que todavía se consumen regularmente, incluidas algunas de las fuentes principales de proteína nutritiva, contienen sustancias que son dañinas si se consumen en cantidades abundantes. Los tóxicos naturales son productos originados en el metabolismo de animales, plantas o microorganismos que utilizamos como alimento, se desconocen los efectos derivados de un largo periodo de exposición a dosis bajas de tóxicos presentes naturalmente en los alimentos (**11**).

### 3.2. COMPONENTES QUÍMICOS DE LA PAPA.

La composición de los tubérculos varía con las condiciones de cultivo, crecimiento, el tipo de suelo e inclusive el almacenamiento. Los tubérculos contiene de 63 a 87% de agua; 13 a 30 % de hidratos de carbono; 0.7 a 4.6% de proteína; 0.02 a 0.96 % de grasa y 0.44 % de cenizas. Además de azúcares, enzimas, ácido ascórbico y otras vitaminas. En el caso de la papa fresca, se sabe, que 100 g de papa fresca proveen 2.1 g de proteína y gracias a su alto contenido de hidratos de carbono, la papa proporciona de 4 a 4.5 % de proteínas y energía diaria, también, cubre el 25 % del requerimiento diario de ácido ascórbico (10). La composición promedio de la papa se presenta en las siguientes tablas.

**Tabla 1. Composición de papa (*Solanum tuberosum*) fresca.**

<i>Componente</i>	<i>Rango (%)</i>
Agua	63 a 86
Materia seca	13 a 36
Hidratos de carbono	13 a 30
Proteínas	0.7 a 4.6
Lípidos	0.02 a 0.96
Cenizas	0.44 a 1.9

Fuente: Salunkhe, D.K., Kadam S., Jadhav S., 1991. (10)

**Tabla 2. Composición química de papa (*S. tuberosum*) en base seca.**

<i>Componente</i>	<i>Rango (%)</i>
Almidón	60 a 80
Sacarosa	0.25 a 15
Azúcares reductores	0.25 a 3.0
Nitrógeno total	1.0 a 2.0
Proteína	0.1 a 1.0
Grasa	0.1 a 1.0
Fibra dietaria	3 a 8
Minerales	4 a 6

Fuente: Salunkhe, D.K., Kadam S., Jadhav S., 1991. (10)

### 3.2.1. AGUA.

El agua es el principal componente de muchos alimentos, teniendo cada alimento su propio y característico contenido de este componente. El agua en la cantidad, localización y orientación apropiadas influye profundamente en la estructura, aspecto y sabor de los alimentos y en su susceptibilidad a la alteración. Las principales funciones biológicas del agua estriban fundamentalmente en su capacidad de transportar diferentes sustancias a través del cuerpo, disolver otras y mantenerlas tanto en solución como en suspensión coloidal; esto se logra por que puede permanecer líquida e un intervalo de temperatura relativamente amplio y porque tiene propiedades como disolvente **(12)**.

Las cifras del contenido de agua varían entre un 60 y 95 % en los alimentos naturales. En los tejidos vegetales y animales, pueden decirse que existen en dos formas generales: "agua libre" y "agua ligada". El agua libre o adsorbida, que es la forma predominante, se libera con gran facilidad, se encuentra sobre la superficie de las partículas coloidales. El agua ligada se halla combinada, se encuentra en los alimentos como agua de cristalización o ligada a las proteínas y a las moléculas de sacáridos **(11, 13)**.

### 3.2.2. HIDRATOS DE CARBONO.

Los hidratos de carbono constituyen más del 90 % de la materia seca de los vegetales. Poseen muchas estructuras moleculares diferentes, tamaños y formas, y exhiben una gran cantidad de propiedades físicas y químicas. El almidón, la

lactosa y la sacarosa, son digestibles por los humanos. Todos ellos, junto con la D-glucosa y la D-fructosa, son fuentes de energía, proveyendo el 70-80 % de las calorías de la dieta promedio **(11)**.

Los hidratos de carbono en la papa son el componente en mayor concentración que no es agua (en un rango del 62 al 86 %), compuestos principalmente de almidón. Es una importante fuente de energía, sin embargo, su principal desventaja es el gran volumen que debe de ser consumido (aproximadamente 3.5 kg) para satisfacer las necesidades diarias, ya que una papa de tamaño mediano produce alrededor de 100 cal. El almidón es el mayor componente en la papa. El almidón de la papa contiene amilosa y amilopectina con un 0.093 % de fósforo. La mayoría del almidón está presente en forma de gránulos. El contenido de amilosa aumenta conforme la papa madura. El contenido de almidón de la papa varía de acuerdo a la temperatura de almacenamiento, enfermedades de las papas y el uso de químicos **(10)**.

Entre los principales azúcares contenidos en la papa se encuentran, la sacarosa, glucosa y fructosa, en una proporción aproximada del 10 %. Siendo su mayor concentración en el centro de la papa que en el exterior. La papa también contiene otro tipo de hidratos de carbono, tales como: celulosa, sustancias pécticas y hemicelulosa en pequeñas cantidades (0.2 al 3.0 %). La piel de la papa contiene diez veces más pectina que la pulpa. Dentro de las sustancias pécticas, se pueden encontrar: protopectina el cual es un polímero de ácido galacturónico no metilado que se encuentra en frutas inmaduras, ácido péctico es un derivado desmetilado del ácido pectínico de cadena corta que se encuentra en frutas excesivamente

maduras y pectina soluble. El almacenamiento de la papa incrementa la pectina soluble y disminuye la protopectina. A medida que la papa va madurando la formación de ácido péctico aumenta, alcanzando hasta un 13.25 % de las sustancias pécticas de la papa **(10, 14)**.

### 3.2.3. PROTEÍNA.

Las proteínas difieren en su valor nutritivo. A estas diferencias contribuyen varios factores, como el contenido de aminoácidos esenciales y la digestibilidad. Las ingestas diarias recomendadas dependen del tipo y composición en proteínas de la dieta. La mayor parte de las proteínas se desnaturalizan al exponerlas a tratamiento térmicos moderados (60 a 90 ° C, durante 1 hora o menos). Es frecuente que las desnaturalizaciones intensas insolubilizan las proteínas, lo que puede perjudicar a sus propiedades funcionales dependientes de la solubilidad. Los tratamientos térmicos modernos son parcialmente beneficiosos en el caso de las proteínas de los vegetales, porque suelen ir acompañados de factores antinutritivos. Las proteínas de las leguminosas y de las papas contienen varios inhibidores de tripsina y quimiotripsina, las cuales inducen una sobreproducción y excreción de estas enzimas por el páncreas **(11)**.

La papa contiene cantidades sustanciales de proteínas, se encuentran en un rango del 0.7 al 4.6 %. Las papas contienen una alta concentración de lisina comparada con los cereales. Sin embargo, contienen una baja concentración de aminoácidos azufrados. Por lo tanto, la papa puede complementar una dieta a

base de cereales. Se sabe que 100 g de papa puede proporcionar del 5 al 7 % de energía diaria y del 10 al 12 % de proteína necesaria diariamente, en niños de 1 a 5 años **(10)**.

#### 3.2.4. LÍPIDOS.

Los lípidos constituyen un grupo diverso, generalmente solubles en disolventes orgánicos pero con escasa solubilidad en agua. La distinción entre grasas y aceite, se basa exclusivamente en el estado sólido o líquido de los lípidos a temperatura ambiente. Debido al alto aporte calórico que suministran los lípidos son considerados como un importante combustible, además, de representar una reserva importante de energía. Son considerados químicamente como ésteres de ácidos grasos y glicerol. Entre las funciones más importantes de las grasas se encuentran: el mantenimiento del calor corporal, reserva de energía y vehículo de vitaminas liposolubles entre otros **(15)**.

La cantidad de lípidos en la papa es pequeña, aproximadamente 0.1 % en base del peso fresco. La importancia nutricional de los lípidos en la papa no podría ser juzgada exclusivamente por su cantidad, especialmente teniendo en cuenta su papel en la estructura de la membrana **(10)**.

### 3.2.5. FIBRA.

Los hidratos de carbono han sido siempre la principal fuente de energía metabólica de los humanos, y también la vía para mantener la salud del tracto gastrointestinal. Los sacáridos de alto peso molecular pueden ser digestibles (productos basados en almidón), parcialmente digestibles (amilosa retrogradada y almidón resistente), o no digestibles (todos los demás polisacáridos). Aquellos hidratos de carbono que no son digeridos a monosacáridos por las enzimas del intestino delgado, pueden ser metabolizados por los microorganismos del intestino, produciendo también sustancias que son absorbidas y catabolizadas para la obtención de energía **(9)**.

La fibra cruda constituye un índice de las sustancias presentes en los alimentos de origen vegetal cuyo valor alimenticio es igual al del heno. Está constituida fundamentalmente por celulosa, lignina y pentosas, que constituyen junto con pequeñas cantidades de sustancias nitrogenadas la parte estructural de los vegetales. La fibra dietética es muy importante en la nutrición humana, puesto que mantiene el normal funcionamiento del tracto gastrointestinal, incrementa el volumen del bolo alimenticio y del resto fecal, lo que disminuye el tiempo de tránsito intestinal y ayuda a prevenir el estreñimiento **(13, 11)**.

### 3.2.6. CENIZAS.

Las cenizas de un alimento son un término analítico equivalente al residuo inorgánico que queda después de calcinar la materia orgánica. Las cenizas normalmente, no son las mismas sustancias inorgánicas presentes en el alimento

original, debido a las pérdidas por volatilización o a las interacciones químicas entre los constituyentes. El valor principal de la determinación de cenizas es que supone un método sencillo para determinar la calidad de ciertos alimentos; por ejemplo, en las especias y en la gelatina es un inconveniente presentar un alto contenido en cenizas (16).

En los vegetales predominan los derivados de potasio y en las cenizas animales los del sodio. El carbonato potásico se volatiliza apreciablemente a 700 °C y se pierde casi por completo a 900 °C. El carbonato sódico permanece inalterado a 700 °C, pero sufre pérdidas considerables a 900 °C (13).

### **3.3. COMPLEMENTACIÓN BROMATOLÓGICA.**

#### **3.3.1. VITAMINA C.**

La vitamina C es una acetona cíclica que corresponde a la forma enólica de la 3-ceto-1-gulofuranolactona; contiene un enol entre los carbonos 2 y 3 que la hace un agente ácido y muy reductor, por lo que se oxida fácilmente. Se encuentra principalmente en alimentos de origen vegetal. Los cereales, al igual que las carnes y los pescados y sus derivados, no la contienen. La cantidad de vitaminas que contienen los alimentos varía de manera considerable conforme a muchos factores; por ejemplo en el caso de las papas, las heridas o cortes que sufren provocan un gran aumento de la actividad respiratoria y de la división celular, que van acompañadas de un incremento de vitamina C. el frío inhibe sus síntesis, mientras que la temperatura ambiente y la oscuridad la favorece (12).

Las papas son una excelente fuente de ácido ascórbico (Vitamina C), contienen aproximadamente 30 mg de ácido ascórbico por cada 100 g de papa recién cosechada, sin embargo, este valor se ve afectado por el almacenamiento, cocinado o procesado. Las papas contienen mayor cantidad de vitamina C, comparada con zanahorias, cebollas y calabazas **(10)**.

Se sabe que la vitamina C es necesaria para la síntesis del tejido conectivo colágena, para la formación de huesos, de la dentina de los dientes, de los cartílagos y de las paredes de los capilares sanguíneos. La deficiencia de esta vitamina en la dieta puede llegar a provocar una enfermedad llamada escorbuto, que vuelve al individuo muy susceptible de contraer infecciones. Diversas combinaciones de alimentos ricos en vitamina C, pueden cubrir los requerimientos diarios de dicha vitamina **(12)**.

### 3.3.2. DENSIDAD CALÓRICA.

La estimación del contenido calórico en los alimentos o dietas es indispensable para estudios de metabolismo y balance de energía; así como en la propuesta de dietas en problemas de obesidad y malnutrición. Los nutrimentos se requieren en primera instancia para aportar la energía necesaria en el mantenimiento normal de las funciones vitales y suministrar de energía para la actividad física diaria **(17)**.

La densidad calórica es la cantidad de calor liberado cuando se quema en forma completa la masa de una sustancia a presión y temperatura constantes, ésta proporciona una medida de la energía química contenida en el alimento **(18)**. Una papa mediana contiene alrededor de 100 cal. La contribución de la papa a la ingesta de energía, varía notablemente, dependiendo de cómo se cocina. Si es hervida proporciona alrededor de 300 kJ/100 g de papa fresca y si son freídas en aceite proporcionan alrededor de 600 kJ/100 g de papa fresca **(11)**.

### 3.3.3. FIBRA DIETARÍA TOTAL.

La fibra dietaría es la parte del alimento que no es afectada por el proceso digestivo en el cuerpo. Sólo una pequeña cantidad de fibra es metabolizada en el estómago y el intestino; el resto pasa a través del tracto gastrointestinal y forma parte de las heces. Hay dos tipos de fibra dietaría:

- La fibra soluble retiene el agua y se vuelve gel durante la digestión e igualmente retarda la digestión y la absorción de nutrimentos desde el estómago y el intestino. Este tipo de fibra se encuentra en alimentos tales como el salvado de avena, la cebada, las nueces, las semillas, los frijoles, las lentejas, los guisantes y algunas frutas y hortalizas.
- La fibra insoluble parece acelerar el paso de los alimentos a través del estómago y los intestinos y le agrega volumen a las heces. Este tipo de fibra se encuentra en alimentos tales como el salvado de trigo, las hortalizas y los granos enteros.

La papa contiene del 1 al 2 % de fibra dietaría. Muchas veces la fibra dietaría incluye al almidón resistente a la hidrólisis por enzimas, aproximadamente de 20 a 50 % del peso de la fibra dietaría total en papa cocida. El contenido de fibra dietaría en papas frescas es similar al de la papa dulce (batata o camote), pero algo menor al de otras raíces y tubérculos, y mucho menor comparado con cereales y legumbres (10).

Según su composición, se puede clasificar a la fibra en:

- Fibra dietaría total: Incluye a la totalidad de todos los compuestos, fibrosos o no, que no son digeribles por las enzimas del intestino humano.
- Fibra cruda o bruta: Es el residuo libre de cenizas que resulta del tratamiento en caliente con ácidos y bases fuertes. Constituye del 20 al 50% de la fibra dietaría total. Es un concepto más químico que biológico.

### 3.4. FACTORES TÓXICOS Y ANTINUTRICIONALES.

Respecto al origen de los tóxicos en alimentos, se pueden considerar cuatro fuentes principales: naturales, intencionales, accidentales y generadas por el proceso. Los tóxicos naturales pueden causar ocasionalmente problemas, debido a que pueden encontrarse inesperadamente en alimentos con una concentración mayor a la normal.

Es conveniente diferenciar las sustancias xenobióticas que causan daño cuando son ingeridas a través de los alimentos (aquellas que producen un daño directo sobre un órgano o tejido), de las que interfieren con la biodisponibilidad de algún nutrimento; así podemos hacer la siguiente distinción:

- Agente tóxico: cualquier sustancia xenobiótica que es capaz de producir una anormalidad fisiológica y/o anatómica a corto plazo (toxicidad aguda o subaguda), la cual no puede ser atenuada por una simple fortificación o suplementación del alimento que lo contiene.
- Agente antinutricional: sustancia presente en el alimento, que tiene la capacidad de reaccionar o interferir con un nutrimento, disminuyendo su biodisponibilidad y a largo plazo (toxicidad crónica) es capaz de producir una anormalidad fisiológica y/o anatómica, que en la mayoría de los casos es irreversible. Sin embargo, el propio nutrimento puede actuar como antagonista; por lo cual, una fortificación de éste, en la etapa inicial del efecto dañino, puede atenuar o eliminar el problema (19).

### 3.4.1. LECTINAS.

Las hemaglutininas son glicoproteínas que tienen la capacidad de aglutinar *in vitro* los glóbulos rojos sanguíneos. Este efecto, que es muy específico para cada proteína, es consecuencia de su unión a la membrana plasmática del eritrocito; las hemaglutininas se han denominado <<lectinas>> debido a su especificidad de unión. Las lectinas también tienen la capacidad de estimular la mitosis en los cultivos celulares, habiéndose convertido en instrumentos útiles para el estudio de la estructura y función de las membranas. Las hemaglutininas han sido encontradas en una amplia variedad de plantas y en diferentes partes de ellas. La primera que se reconoció con las características antes descritas, fue la ricina de la semilla de ricino (*Ricinus cummunis*) la cual adicionalmente es de las proteínas más tóxicas, con un DL<sub>50</sub> de 0.05 mg/kg en ratón por vía intraperitoneal (19).

La toxicidad de las hemaglutininas se destruye por el calor húmedo (11). Todas las lectinas presentan síntomas parecidos, de mayor o menor gravedad, entre los que se resaltan en primer lugar la intensa inflamación de la mucosa intestinal, con la posterior destrucción de los epitelios y el edema y a la hemorragia del tejido linfático (20).

### 3.4.2. INHIBIDORES DE TRIPSINA.

En gran parte de las plantas consideradas como hortalizas se encuentran inhibidores de proteasas. Los inhibidores se presentan en gran cantidad, sobre todo en las partes comestibles de estas plantas. Estas sustancias son sobre todo

inhibidores de tripsina. Los mejor estudiados son los inhibidores de proteasa de la soya, hay por lo menos 5, y posiblemente 6, sustancias inhibidoras, la primera de las cuales fue aislada de semillas de soja y perfectamente estudiada por Kunitz en 1945. Este inhibidor con un peso molecular de 21 KDa y dos puentes disulfuro, tiene una especificidad directamente relacionada con la tripsina, de tal manera que este inhibidor neutraliza su mismo peso de tripsina **(20)**.

El inhibidor de Kunitz, aislado originalmente de las semillas de soya, se une a la tripsina con una estequiometría de 1:1. Estos inhibidores se destruyen por el calor, su destrucción puede estar relacionada con la mejora del valor nutritivo que la harina de soya húmeda experimenta **(11)**. Los inhibidores de Kunitz y de Browman-Birk, estos últimos son resistentes al calor, ácidos, álcalis. Provocan hipertrofia del páncreas, la cual se explica como un intento de la glándula para compensar la pérdida de la actividad de sus principales proteasas **(20)**.

Las papas contienen inhibidores de proteasa incluyendo inhibidores de tripsina. Estos inhibidores están implicados a la resistencia de la papa al tizón tardío, causado por (***Phytophthora infestans***), es una de las enfermedades más devastadoras de la papa a nivel mundial **(10)**. Los inhibidores de proteasa son proteínas relativamente pequeñas que ***in vitro*** tienen la propiedad de ligarse e inhibir las enzimas proteolíticas. La unión en general, se verifica rápidamente y el complejo formado es muy estable.

### 3.4.3. ÁCIDO OXÁLICO.

Es un ácido orgánico que dificulta la asimilación de minerales como hierro, calcio y magnesio, debido a que forma con ellos sales de oxalato. Los cálculos renales más comunes son los de oxalato cálcico, también es un producto no esencial del metabolismo intermediario de los tejidos. Los vegetales con mayor concentración de oxalato son la espinaca, remolacha y cacao en polvo (más de 100 mg/100 g) y los vegetales cuyo contenido es moderado (10 a 100 mg/100 g) se encuentran la frambuesa, calabaza y apio. El ácido oxálico y sus sales solubles, como el oxalato potásico, precipitan en el organismo en forma de oxalato cálcico, cuyos cristales se depositan en los conductos renales de los intoxicados e incluso en el interior de las células si la cantidad ingerida es grande **(21)**.

Normalmente la orina contiene pequeñas cantidades de ácido oxálico, ya que se trata de un producto del metabolismo intermediario. Sin embargo, es muy improbable que por consumo de verduras que contengan ácido oxálico lleguen a ingerirse cantidades tales que causen un descenso del nivel de calcio en sangre y una elevada eliminación renal **(22)**.

### 3.4.4. ÁCIDO FÍTICO.

Considerado un factor antinutricional ya que reduce la biodisponibilidad de proteínas y minerales. Debido a que la molécula de ácido fítico contiene seis grupos fosfato con carga negativa es un excelente agente quelante que forma complejos con cationes minerales y proteínas. Muchos de estos complejos son

insolubles y, si se considera que la solubilidad es un factor esencial para que los nutrimentos sean absorbidos, la presencia de ácido fítico hace que se reduzca la biodisponibilidad de éstos y, en consecuencia, va a influir en el valor nutritivo de los alimentos **(23)**.

El ácido fítico se encuentra naturalmente en diferentes alimentos, principalmente en cereales, leguminosas, oleaginosas y frutos secos, también en tubérculos y hortalizas aunque en menor cantidad. El ácido fítico se encuentra como un complejo de fitato-mineral-proteína. Este compuesto decrece la unión de gastroferrina ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ), disminuyendo así la absorción del calcio, magnesio, fósforo, zinc y molibdeno en el intestino **(19, 24)**.

#### 3.4.5. SAPONINAS.

Las saponinas son glucósidos formados por sapogenina y diversos azúcares. Las saponinas tienen propiedades espumantes y hemolíticas. Las saponinas disminuyen la tensión superficial y forman complejos con las proteínas y con los lípidos, por ejemplo, el colesterol. Debido sobre todo a su reacción como los lípidos, la membrana de los eritrocitos se hace permeable permitiendo la salida del pigmento sanguíneo. Normalmente solo una pequeña proporción de estas sustancias se absorbe en el intestino **(20)**.

Las saponinas se emplean también como aditivos para alimentos y bebidas, como correctores de sabor, agente espumante en cervezas y otras bebidas. Normalmente sólo una pequeña porción de estas sustancias se absorbe en el

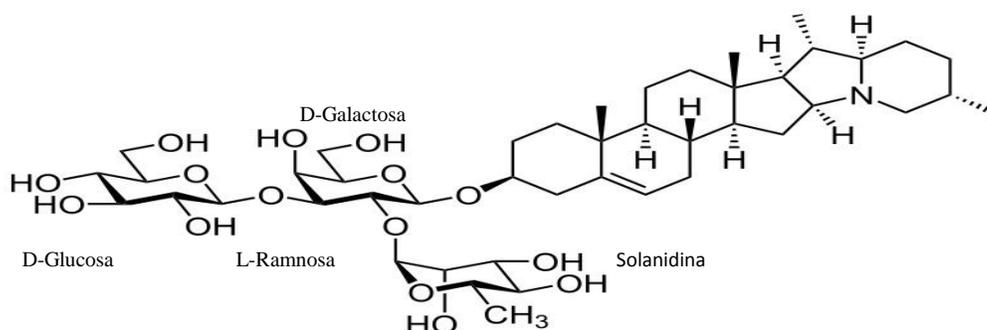
intestino. Esta absorción puede aumentar en casos de inflamación intestinal o por irritación con laxantes fuertes o purgantes. Se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal, donde se pueden encontrar en hojas, raíces, tallos y flores. Dentro de las plantas comestibles que contienen este tipo de sustancias, tenemos: la soya, alfalfa, betabel (remolacha), avena, papa y espinacas (**19, 11**).

#### 3.4.6. GLICOALCALOIDES.

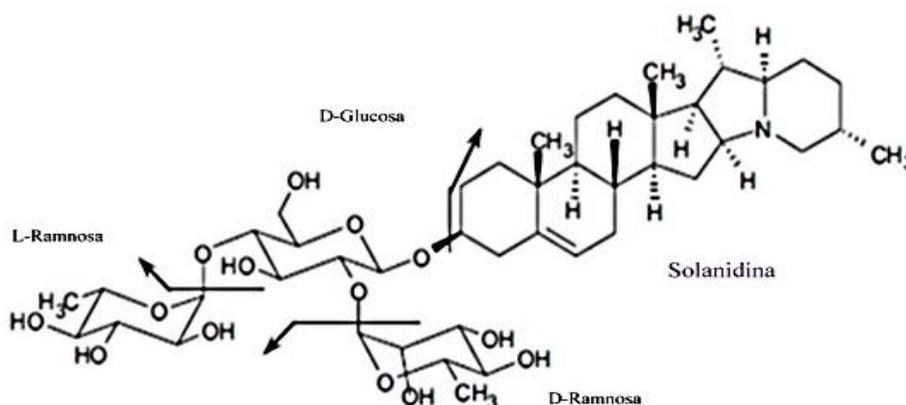
Los glicoalcaloides pertenecen al grupo de los alcaloides, los cuáles son compuesto básicos nitrogenados. Este tipo de alcaloides esteroidales se encuentran en las plantas en forma de glucósidos, los cuales son ésteres resultantes de la unión de un aglicón (porción no carbohidratada) y una parte carbohidratada, mediante un enlace éster. Dentro de estos ésteres se pueden distinguir dos tipos de estructuras la de la espirosolanos o tomatidina y las solanidinas. Los glicoalcaloides son toxinas vegetales presentes en la papa, para proteger compuestos o tejidos de una invasión de parásitos o insectos, principalmente  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -chaconina, que constituyen casi el 95 % del contenido de alcaloides. Se presentan sobre todo en papas inmaduras y en los nódulos verdosos de la papas en germinación, situándose sobre todo en la piel y el germen, se caracterizan por impartir un sabor amargo. La mayoría contiene entre 1,8 y 9,4 mg solanina / 100 g (**25,10**).

La acción de la solanina es semejante a la de saponinas; la administración parenteral produce hemólisis. Si el contenido asciende hasta 0,04 % aparecen intoxicaciones cuyos síntomas son ardor de garganta, dolor de cabeza, abatimiento, vómitos, dolor de vientre y diarrea (20).

Los glicoalcaloides de la papa no se destruyen por cocción, horneado o congelado. Papas con un contenido de 0,1 % de glicoalcaloides se considera como no apto para consumo humano. A concentraciones de 2.5 mg/kg de peso corporal presenta los síntomas antes mencionados y a concentraciones de 3 mg/kg peso corporal puede ser letal para los humanos (10).



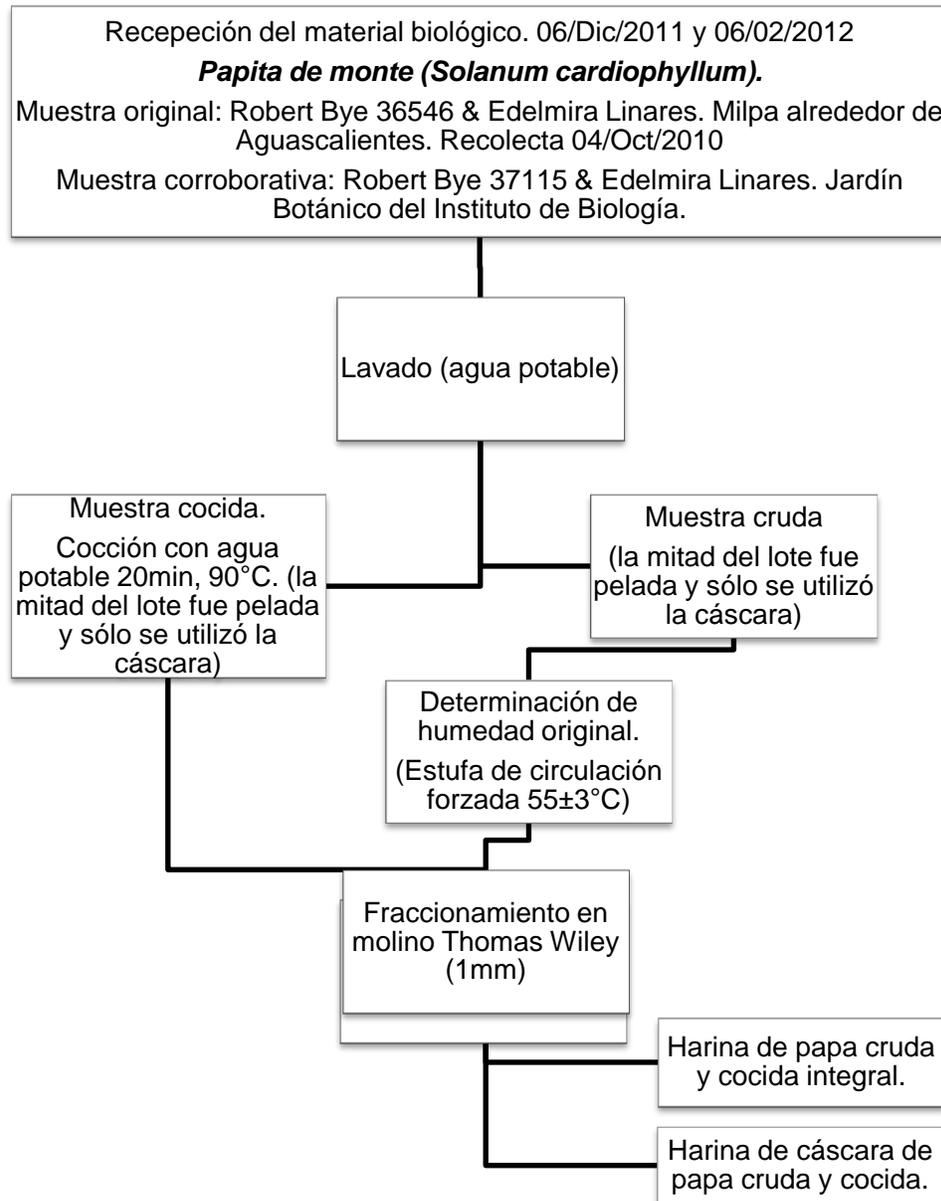
**Figura 1.**  $\alpha$ -Solanina. P.M. 868.04 g/mol ( $C_{45}H_{73}NO_{15}$ )



**Figura 2.**  $\alpha$ -Chaconina. P.M. 852.07 g/mol ( $C_{45}H_{73}NO_{14}$ )

#### 4. MATERIAL Y MÉTODOS.

A continuación se presenta el diagrama del acondicionamiento del material biológico



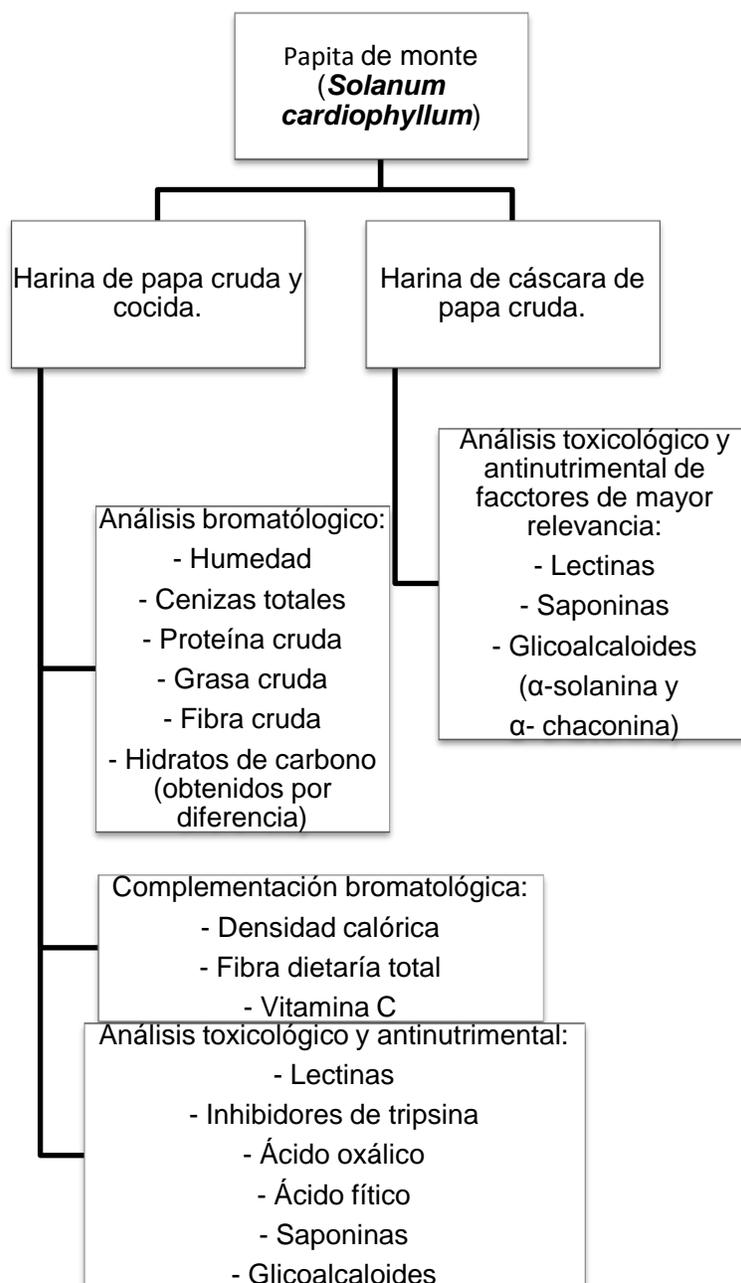
**Figura 3.** Diagrama de bloques que ilustra el acondicionamiento del material biológico de estudio.

4.1. ACONDICIONAMIENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO.

1. El material biológico fue proporcionado por el Dr. Robert Bye Boettler. Instituto de Biología. UNAM. Se recibieron dos lotes de papitas de monte el primer lote Robert Bye 36546 & Edelmira Linares procedente de milpas alrededor del estado de Aguascalientes, se recibió el día 06 de Diciembre del 2011 (**ANEXO I**). Esta muestra cruda se cortó en rebanadas delgadas. Se tomaron 14 g de papa cruda, se peló y la cáscara fue liofilizada en un equipo Labconco Mod. Freezone 4.5 a 0.1Torr. y -49°C.
2. El segundo lote originario del estado de Guanajuato, recibido el día 06 de febrero del 2012, se sometió a tratamiento térmico con proporción de agua 1:1, es decir, por cada kg de papa 1 litro de agua, 3.75 g de NaCl / kg, a 90°C durante 20 min, se separó del agua de cocción se cortó en rebanadas delgadas.
3. La mitad de ambos lotes (papa cruda y cocida) fue pelada y se trabajó sólo con la cáscara de la papita de monte. Se llevó a cabo la determinación de la humedad original o gruesa en papa cruda y cocida en estufa de circulación forzada Felisa/Horno a 55°C durante 18 a 24 horas.
4. Se molieron ambas muestras para obtener tanto la la harina de papa integral (cáscara y pulpa) y la harina de cáscara de papa para las siguientes determinaciones.

## 4.2. DIAGRAMA DE FLUJO.

A continuación se presenta el diagrama del trabajo analítico que se realizó en la papa cruda y cocida integral; así como las determinaciones realizadas en cáscara de papa cruda y cocida.



**Figura 4.** Diagrama de bloques que ilustra el análisis bromatológico y toxicológico del material biológico de estudio.

### 4.3. ANÁLISIS BROMATOLÓGICO (26).

El análisis bromatológico se realizó de acuerdo a los métodos establecidos por la AOAC, basándose en el esquema de Weende, el cual consta de las siguientes determinaciones (todas las determinaciones se realizaron por triplicado):

- Humedad.
- Proteína cruda.
- Grasa cruda.
- Fibra cruda.
- Cenizas.
- Hidratos de carbono asimilables (obtenidos por diferencia).

#### 4.3.1. HUMEDAD POR SECADO AL VACÍO.

**Fundamento.** Método de determinación directa por gravimetría. Mide la diferencia de masa, al pesar la muestra después de retirada el agua mediante evaporación de agua. La proporción de agua perdida aumenta al elevar la temperatura; por lo tanto es importante comparar sólo los resultados obtenidos usando las mismas condiciones de secado.

#### **Material/Reactivos:**

- ✓ Charolas de aluminio.
- ✓ Estufa con vacío (LAB-LINE DUO-VAC OVEN), 20 in Hg, 70 °C.
- ✓ Balanza analítica (Sartorius Extend).
- ✓ Desecador de vidrio.

**Procedimiento**

- 1) Poner a peso constante en la estufa al vacío la charola de aluminio en donde se efectuara la determinación. Es suficiente colocarlas de 2 a 4 horas. Anotar este peso.
- 2) Pesar la charola de aluminio a peso constante de 2 a 5 g de muestra y distribuirla tratando de que presente la mayor superficie de evaporación e introducirla en la estufa que se encuentre a 70 °C.
- 3) Realizar pesadas periódicas de las muestras, sacándolas de la estufa y colocándolas inmediatamente en un desecador donde permanecerán durante 20 minutos; para su posterior pesado en la balanza analítica; este último paso se repetirá hasta peso constante.
- 4) Se considera a peso constante una muestra cuando al pesarla en la balanza analítica solo se presente variación en la cuarta cifra decimal con respecto al valor anterior.

**Cálculos**

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

Dónde:

$P_i$  = peso en gramos de la charola con muestra antes de secada

$P_f$  = peso en gramos de la charola con muestra después de secada

$m$  = peso en gramos de muestra

#### 4.3.2. CENIZAS TOTALES.

**Fundamento.** La determinación de cenizas se basa en la destrucción de la materia orgánica contenida en una matriz alimentaria considerándose a las cenizas como el residuo inorgánico que queda después de incinerar dicha materia orgánica en una mufla.

**Material/Reactivos:**

- ✓ Mufla 450 °C.
- ✓ Balanza analítica (Sartorius Extend).
- ✓ Desecador de vidrio.
- ✓ Crisoles de porcelana tipo Gooch.
- ✓ Mechero Bunsen.
- ✓ Tripié, anillo de fierro, triángulo de porcelana o tela de asbesto.

**Procedimiento:**

- 1) Poner a peso constante los crisoles en la mufla a una temperatura de 450°C, marcándolos con lápiz o cualquier sustancia (sol. de cloruro férrico) que no se elimine en el proceso de incineración. Para pesar el crisol, una vez que se retira de la mufla dejarlo enfriar aproximadamente 10 minutos y colocarlo en un desecador hasta que alcance la temperatura ambiente (aproximadamente 20 minutos.)
- 2) Se considera a peso constante cuando la última pesada en la balanza analítica solo se presente variación en la cuarta cifra decimal con respecto al valor anterior.

- 3) Pesar en el crisol a peso constante de 2 a 3 g de muestra y carbonizarla en una campana de extracción, a la flama de un mechero, hasta que no desprenda humo. Introducir el crisol a la mufla, la cual debe encontrarse entre 450 y 500 °C.
- 4) Si después de la incineración se obtienen cenizas con manchas negras, es conveniente adicionarle unas gotitas de agua destilada a estas cenizas una vez que estén frías, con el fin de obtener cenizas grisáceas o blancas homogéneas; lo que nos indica el punto final de esta determinación. El tiempo de permanencia es muy variable, y depende del material que se esté trabajando.

### **Cálculos**

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

$$\%Cenizas = (P_f - P_o / m) * 100$$

Dónde:

$P_f$  = peso en gramos del crisol con la muestra después de incinerada

$P_o$  = peso en gramos del crisol a peso constante

$m$  = peso en gramos de la muestra

## 4.3.3. PROTEÍNA CRUDA.

**Fundamento.** El método empleado para la determinación de nitrógeno en alimentos, es el método de Kjeldahl. Este método se basa en la digestión completa de la materia orgánica (por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado y catalizadores) y de peróxido de hidrógeno para reducir el nitrógeno orgánico de la muestra hasta nitrógeno inorgánico en forma de amoníaco, el cual queda en solución en forma de sulfato ácido de amonio. El digerido, 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 y posteriormente titulado. El contenido de proteína es 6.25 veces el contenido de nitrógeno, pues, por lo general, las proteínas tienen 16 % de nitrógeno (**26**). A continuación se muestran las reacciones involucradas:

Digestión:



Liberación de  $\text{NH}_3$ :



Arrastre con vapor:



Recolección:



Titulación:



**Material/Reactivos:**

- ✓ Digestor TECATOR.
- ✓ Dispositivo de destilación TECATOR (Kjeltec Auto 1030 Analyzer).
- ✓ Tubos de digestión TECATOR 100mL.
- ✓ Mezcla digestiva **(a)**
- ✓ Peróxido de hidrógeno 30 %.
- ✓ Sulfato de potasio.
- ✓ Solución hidróxido de sodio 40 % (p/v).
- ✓ Solución de ácido bórico con indicadores **(b)**
  - Rojo de metilo 0.1 % en metanol
  - Verde de bromocresol 0.1 % en metanol
- ✓ Solución de ácido clorhídrico 0.01 N valorada.

**(a)** Disolver 3 g de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ) en 20 mL de agua destilada y una vez que esté bien disuelto, agregar 50 mL de ácido ortofosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ); a continuación adicionar -con precaución- 430 mL de ácido sulfúrico concentrado resbalando por la pared del recipiente. Agitar por aproximadamente 30 minutos.

**(b)** Pesar 10 g de ácido bórico y colocarlo en un matraz aforado de 1 L; se adiciona agua y agitar hasta disolverlo, a continuación se adicionan 10 mL del indicador de verde de bromocresol al 0.1 % en metanol (100 mg de verde de bromocresol en 100 mL de metanol) y 7 mL del indicador de rojo de metilo al 0.1% en metanol (100 mg de rojo de metilo en 100 mL de metanol). **Se ajusta el color a**

un tono café rojizo con ácido o alcali según se requiera y se afora a 1 L con agua destilada.

**Procedimiento:**

- 1) Pesar 0.1 g de muestra y colocarla en el tubo de digestión, agregar 0.5 g de sulfato de sodio y 3 mL de mezcla digestiva. Los tubos con muestra y los usados como blancos (glucosa o sacarosa) se colocan en el digestor por 15 minutos a 370 °C.
- 2) Retirar del digestor y dejar enfriar, para adicionar 1.5 mL peróxido de hidrógeno. Colocarlos nuevamente en el digestor a 370 °C aproximadamente hora y media. Se dejaron enfriar los tubos.
- 3) La titulación se realiza en el equipo KJELTEC AUTO 1030 Analyzer, se utiliza HCl 0.01 N y NaOH al 40 % y como indicador ácido bórico con indicadores verde de bromocresol y rojo de metilo.

**Cálculos:**

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

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

Dónde:

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 (en gramos)

F = factor de conversión (6.25). Este factor depende del tipo de muestra, el cual está relacionado al contenido de nitrógeno de la proteína en estudio.

#### 4.3.4. GRASA CRUDA.

**Fundamento.** La determinación del extracto etéreo, incluye una gran variedad de compuestos que pueden ser extraídos por disolventes no polares como lo son el éter de petróleo y éter etílico. El método usado para esta determinación, es el método de Goldfish, el cual se basa, en la extracción continua por disolvente donde a la muestra se le hace pasar vapor de disolvente y la grasa se cuantifica por pérdida de peso en la muestra o por grasa removida.

#### **Material/Reactivos:**

- ✓ Aparato de extracción Goldfish LABCONCO.
- ✓ Cartuchos de celulosa 22 x 80 mm.
- ✓ Estufa Blue M a 100 °C.
- ✓ Vasos de borde esmerilado LABCONCO.
- ✓ Balanza analítica (Sartorius Extend).
- ✓ Éter etílico.

#### **Procedimiento:**

- 1) Se lleva a peso constante un vaso esmerilado en la estufa Blue M. a 100 °C 2 horas.
- 2) Pesar de 2 a 5 g de muestra colocándolos envueltos en papel dentro del tubo de celulosa tapado con algodón.
- 3) Se coloca en el portadetal y este en el sostenedor del aparato de extracción, en un vaso esmerilado se colocan 50 mL de éter etílico asegurándolo con un anillo metálico, se comienza la extracción con

circulación de agua. El período de extracción es de 4 horas aproximadamente. Para verificar la extracción de toda la grasa, se deja caer una gota de la descarga sobre papel filtro, al evaporarse el disolvente no debe dejar residuo de grasa.

- 4) Al finalizar la extracción se recupera el solvente y el vaso esmerilado con grasa restante. Se introduce a la estufa Blue M. a 100 °C durante 1 hora. Se pesa periódicamente hasta obtener peso constante.

**Cálculos:**

$$\%Grasa = (P_f - P_o/m) * 100$$

Dónde:

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

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

$m$  = peso de la muestra seca (en gramos)

## 4.3.5. FIBRA CRUDA.

**Fundamento.** La fibra cruda es el residuo orgánico insoluble y no digerible que queda después de tratar la muestra desengrasada en las condiciones descritas a continuación; hidrólisis ácida con ácido sulfúrico, seguido de una hidrólisis alcalina, lavado con alcohol con una posterior incineración del material insoluble, de tal modo que por diferencia es posible obtener el contenido de hidratos de carbono no degradables. Este tratamiento empírico proporciona la fibra cruda, que consiste principalmente de celulosa y cierta proporción de lignina y hemicelulosa contenidas en la muestra original (27).

**Material/Reactivos:**

- ✓ Aparato digestor LABCONCO.
- ✓ Embudo Büchner con malla metálica tipo California.
- ✓ Vasos Berzelius 600 mL.
- ✓ Estufa de vacío LAB-LINE DUO-VAC OVEN.
- ✓ Mufla 550 °C.
- ✓ Crisoles de porcelana a peso contante.
- ✓ Solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.25 % (m/v).
- ✓ Solución NaOH 1.25 % (m/v).
- ✓ Antiespumante.
- ✓ Alcohol etílico.
- ✓ Silicato de aluminio (limpio y calcinado).

**Procedimiento:**

- 1) Se coloca en un vaso de Berzelius: 0.5 g de silicato de aluminio, perlas de ebullición, 3 a 5 g muestra desengrasada, 200 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1.25% hirviendo y 4 gotas de antiespumante.
- 2) Se coloca en el equipo LABCONCO para digestión de fibra, la mezcla se deja digerir durante 30 min. Filtrar al vacío con embudo Büchner tipo California, lavando con 500 mL de agua hirviendo.
- 3) La muestra se regresa al vaso Berzelius con 200 mL de NaOH hirviendo al 1.25 % y 4 gotas de la solución antiespumante. Se vuelve a colocar en el equipo LABCONCO para una segunda digestión de 30 min. Se repite el tipo de filtrado y lavado.
- 4) Se retiran las perlas de ebullición y se lava el residuo con 25 mL de alcohol etílico, el residuo se pasa cuantitativamente a un crisol de porcelana a peso constante. Se coloca en la estufa de vacío LAB-LINE DUO-VAC OVEN aproximadamente por 4- a 8 horas.
- 5) Se pesa y carboniza el crisol con la fibra en una mufla. Pesar la muestra periódicamente hasta obtener peso constante.

**Cálculos:**

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

Dónde:

Ps= peso crisol con residuo después de secado (en gramos).

Pc= peso crisol con residuo después de calcinado (en gramos).

m= peso de muestra (en gramos).

#### 4.3.6. HIDRATOS DE CARBONO.

El porcentaje de hidratos de carbono (HC) se obtienen por diferencia.

$$\%HC = 100 - (\%H + \% C + \% PC + \% GC + \% FC)$$

Dónde:

*H = Humedad.*

*C = Cenizas.*

*P = Proteína cruda.*

*GC = Grasa cruda.*

*FC = Fibra cruda.*

### 4.4. COMPLEMENTACIÓN BROMATOLÓGICA.

#### 4.4.1. DENSIDAD CALÓRICA.

**Fundamento.** Una forma práctica de obtener el contenido energético o densidad calórica de un alimento o dieta es utilizando el método directo con una bomba calorimétrica. El instrumento que se utilizará para determinar la densidad calórica será una bomba balística. El método consiste en la combustión por ignición eléctrica de una muestra de peso conocido en una atmósfera de oxígeno y la energía producida en forma de calor, se transmite al cilindro de la bomba, el cual a su vez se conecta a un detector del cambio de temperatura. El aumento producido en la temperatura después de la combustión de la muestra se comprara con el cambio de temperatura que se produce con una cantidad conocida de ácido benzoico que es el estándar de referencia con contenido calórico certificado.

**Material/Reactivos:**

- ✓ Ácido benzoico (valor calórico certificado).
- ✓ Balanza analítica (Sartorius Extend).
- ✓ Desecador de vidrio.
- ✓ Estufa de secado a presión reducida (Blue M).
- ✓ Mechass de algodón de 75 mm de longitud.
- ✓ Crisol de acero inoxidable de 25.4 mm de diámetro (1 pulgada).
- ✓ Mango metálico compactador.
- ✓ Bomba calorimétrica balística GALLENKAMP, mod. CBB-330-010L.

**Procedimiento:**

- 1) Pesar 1.0 g de muestra en forma de harina seca y bien homogénea. Colocarla en un crisol metálico, previamente tarado junto con la mecha de algodón, de tal manera que un extremo del hilo quede introducido dentro de la muestra. Y se procede a pesar en una balanza analítica lo que corresponde al peso preliminar (**Pp**). Se compacta la muestra con el mango metálico, lo más uniforme posible y un extremo de la mecha introducido en la muestra, el extremo libre servirá para insertarla en el alambre de ignición de la bomba. El crisol con la muestra compactada se pesa nuevamente para tener el peso fina (**Pf**).

- 2) Combustión de la muestra: se coloca el crisol en la base superior del pilar central de la bomba, con mucho cuidado introducir la punta suelta de la mecha de algodón en el alambre de ignición.
- 3) Cerrar herméticamente el capuchón de la bomba de combustión con ayuda del anillo metálico. Colocar el sensor termopar e el orificio del capuchón. Abrir cilindro de oxígeno con una presión mínima de 50 bars.
- 4) La bomba balística debe alcanzar una presión de 25 bars (1 bar = 0.987 atmósferas) en aproximadamente 20 a 30 segundos. Alcanzada la presión, se cierra la válvula de paso y se ajusta el indicador del galvanómetro a cero. Si las condiciones anteriores se mantiene aproximadamente por 10 segundos, se oprime el botón de ignición.
- 5) Durante 10 a 15 segundos se lleva a cabo la combustión, notándose por un aumento en la presión del manómetro de la bomba, que a su vez se traduce en una señal en la escala del galvanómetro. La lectura máxima obtenida en el galvanómetro, es directamente proporcional al calor liberado en la combustión.
- 6) Tomada la lectura, se abre la válvula de salida de los gases de combustión, desconectar el sensor termopar y una vez liberados los gases de combustión, se quita el capuchón.
- 7) Por último se cierra la válvula de liberación de gases y se atempera el capuchón de la bomba en un baño de agua fría hasta temperatura ambiente. Es necesario realizar la determinación por triplicado.

**Cálculos:**

Para calcular la densidad calórica de la muestra, es necesario contar con una curva de calibración, para la cual se debe realizar la combustión de diferentes pesos de ácido benzoico, los cuales van de 0.1 a 0.8 g. Una vez obtenidas las lecturas, se debe convertir los gramos de ácido benzoico en kJ y kcal.

$$1g \text{ de ácido benzoico} = 26,454.3 \text{ Joules} = 26.45 \text{ kJ}$$

$$4.1868 \text{ kJ} = 1 \text{ kcal}$$

Con los datos anteriores se traza la curva de calibración de contenido calórico en kJ (abscisas) vs lectura del galvanómetro (ordenadas), y se podrá obtener por interpolación la densidad calórica de la muestra en el crisol. La densidad calórica de la muestra se calcula:

$$\frac{\text{kJ}}{100g \text{ de muestra}} = \frac{\text{Lectura (kJ)} \times 100}{\text{Peso muestra (g)}}$$

#### 4.4.2. FIBRA DIETARÍA TOTAL (28).

**Fundamento.** En este ensayo se mide el contenido de fibra dietaría total de los alimentos usando una combinación de métodos enzimáticos y gravimétricos. Las muestras de alimentos secas y libres de grasa son gelatinizadas con  $\alpha$ -amilasa, estable al calor, posteriormente digeridas enzimáticamente con proteasa y amiloglucosidasa para eliminar la proteína y almidón presente en la muestra.

Para precipitar la fibra dietaría soluble se adiciona etanol. Los residuos obtenidos son filtrados y lavados con etanol y acetona. Después de secarlos, los residuos se pesan, en la mitad de las muestras se mide la proteína y las otras son calcinadas a cenizas. La fibra dietaría total se mide restando al peso del residuo, el peso de la proteína y el de la ceniza.

#### **Material/Reactivos:**

- ✓ Crisol Gooch, porosidad #2 (grueso de 40 a 602 micrones)
- ✓ Alargadera de hule para crisol Gooch.
- ✓ Fuente de vacío, con trampa para prevenir contaminación en caso de que pase líquido.
- ✓ Mufla 450 °C.
- ✓ Estufa Blue M.
- ✓ Balanza analítica (Sartorius Extend).
- ✓ Desecador de vidrio.
- ✓ Baño de aceite.

- ✓ Baño de agua a 60 °C con agitación constante.
- ✓ Vaso de precipitados de 100, 400 y 600 mL de forma alta.
- ✓ Potenciómetro (Thermo Scientific Orion 3 star).
- ✓ Matraces Kitasato 100 mL.
- ✓ Barras magnéticas 22 x 8 mm.
- ✓ Pipeta automática de 50 a 200 µL (Eppendorf research).
- ✓ Termómetro (-10 a 100 °C).
- ✓ Kit Total Dietary Fiber Assay (SIGMA TDF-100A). Este equipo contiene:
  - α-amilasa, estable al calor (SIGMA A 3306)
  - Proteasa de *Bacillus licheniformis* (SIGMA P 3910).
  - Amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (SIGMA A 9913).
  - Celita <sup>TM</sup>, lavada con ácido (SIGMA C 86856).
- ✓ Kit Total Dietary Fiber Assay Control (SIGMA TDF-C10). Este equipo contiene:
  - Almidón de maíz (SIGMA S 2388).
  - Almidón de trigo (SIGMA S 1514).
- ✓ Éter de petróleo, reactivo analítico.
- ✓ Etanol al 78 %. **(a)**
- ✓ Acetona, reactivo analítico.
- ✓ Amortiguador de fosfatos 0.08 M, pH 6.0. **(b)**
- ✓ Solución de hidróxido de sodio 0.275 N. **(c)**
- ✓ Solución de ácido clorhídrico 0.325 N. **(d)**

(a) Etanol al 78 %: medir 207 mL de agua destilada en matraz aforado de un litro, llevar al aforo con etanol 95 %.

(b) Amortiguador de fosfatos 0.08 M, pH 6.0: disolver 1.4 g de fosfato monobásico de sodio anhidro y 8.4 g de fosfato dibásico de sodio anhidro, en aproximadamente 700 mL de agua destilada. Diluir sin llevar al aforo. Ajustar pH a 6.0, aforar a un litro y mezclar.

(c) Solución de hidróxido de sodio 0.275 N: diluir 275 mL de solución de NaOH 1.0 N en un litro de agua destilada.

(d) Solución de ácido clorhídrico 0.325 N: diluir 325 mL de solución de HCl 1.0 N en un litro de agua destilada.

### **Procedimiento:**

#### Preparación de crisoles.

1. Lavar los crisoles, secarlos y calentarlos una hora a 450 °C en la mufla. Dejarlos enfriar y enjuagar los crisoles con agua y secarlos.
2. Agregar a cada crisol, exactamente 0.5 g de celita y secar a 130 °C, hasta peso constante. Enfriar en desecador y pesar hasta obtener 0.1 mg de diferencia.
3. Registrar este peso como “celita + peso del crisol o **P1**”. Conservar en desecador. A las muestras y blancos (celita) que se determinará fibra dietaría total (FDT) se les debe realizar, al menos, por cuadruplicado, de esta manera se tendrá duplicados de proteína y cenizas.

Determinación de FDT.

## Hidrólisis enzimática.

1. Pesar por cuadruplicado 0.5 g de muestra, colocarla en vasos de precipitados de 100 mL. los pesos de las muestras no deben tener una diferencia de 20 mg. Registrar pesos.
2. Agregar a cada vaso 25 mL de amortiguador de fosfatos, 0.05 mL de  $\alpha$ -amilasa y mezclar muy bien. Cubrir cada vaso con papel aluminio y poner en un baño de aceite. Después de que la temperatura al interior de los vaso alcance 95 °C, Incubar por 15 minutos. Agitar suavemente los vasos por intervalos de 5 minutos.
3. Dejar enfriar las soluciones a temperatura ambiente o en baño de hielo. Ajustar las soluciones a pH  $7.5 \pm 0.2$ , agregando 5 mL de solución de NaOH 0.275 N a cada vaso.
4. Prepara una solución de proteasa de *Bacillus licheniformis* (SIGMA P 3910) de 25 mg/mL en amortiguado de fosfatos pH 6.0. Nota: esta solución se prepara inmediatamente antes de utilizarse.
5. Pipetear a cada vaso 0.1 mL de la solución de proteasa (2.5 mg de proteasa)
6. Cubrir nuevamente los vasos con papel aluminio y poner en un abañño de agua con agitación. Después de que la solución al interior del vaso alcanza 60 °C. incubar durante 30 minutos a esta misma temperatura.
7. Dejar enfriar las soluciones, ajustar el pH de 4.0 a 4.6, agregando 5 mL de HCl 0.325 N a cada vaso.

8. Agregar 0.5 mL de amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (SIGMA A 9913) a cada vaso, cubrir con papel aluminio e incubar a 60 °C, 30 minutos.
9. Después de este tiempo, sacar del baño y agregar etanol al 95 % a cada vaso. Dejar la solución durante toda la noche a temperatura ambiente, para permitir la precipitación completa de la fibra soluble.

#### Filtración.

1. Montar un sistema de filtración al vacío para cada crisol Gooch. Humedecer y redistribuir la cama de celita usando etanol al 78 %. Aplicar succión suave para formar una superficie lisa. Mantener la succión suave y pasar cuantitativamente el precipitado y suspensión de cada uno de los vasos de precipitados.
2. Lavar el residuo con tres porciones de 10 mL de etano 78 %, dos porciones de 5 mL de etanol 95 % y dos porciones de 5 mL de acetona. En caso de formarse una nata, romper con una espátula la película superficial.
3. Al término de la filtración, los crisoles que contiene los residuos, se secan durante una noche en estufa Blue M a 105 °C.
4. Al día siguiente, enfriar los crisoles en un desecador, pesar hasta la cuarta cifra decimal (0.1 mg) y registrar los pesos como “residuos + celita + peso del crisol o **P2**”.

#### Determinación de cenizas.

1. Se toman dos crisoles de la muestra y dos del blanco de celita. Se calcinan 5 horas a 450 °C hasta peso constante. Enfriar en un desecador y pesar

hasta la cuarta cifra decimal (0.1 mg) y registrar este peso como “cenizas + peso del crisol o **P3**”.

2. Si los residuos contienen cenizas, calcular el peso promedio y con este dato corregir el peso del residuo.

#### Determinación de proteína.

1. Se analizan dos residuos de la muestra y dos del blanco de celita.
2. Con ayuda de una espátula sacar el residuo + celita de cada crisol y pesarlos, registrar este peso como “residuo + celita o P4”, moler en un mortero y pesar de este polvo por triplicado por cada crisol 100 mg, para hacer la determinación de proteína.
3. Analizar el contenido de proteína por el método de Kjeldahl, como se especifica en el procedimiento del AOAC (**26**).
4. Si los residuos contienen proteína, calcular el peso promedio y con este dato corregir el peso del residuo.

#### **Cálculos:**

##### ***Contenido de cenizas en el residuo de cada crisol.***

$$C = P3 - P1$$

Dónde:

C = peso de las cenizas en el crisol (en gramos).

P1 = celita + peso del crisol.

P3 = cenizas + celita + peso del crisol.

**Contenido de proteína en el residuo de cada crisol.**

$$N = \frac{(Vm - Vb) \times meq \times N_{HCl} \times M}{m}$$

Dónde:

N = peso en gramos de nitrógeno en el residuo + celita o **P4**

Vm = volumen de HCl gastado en la titulación de la muestra.

Vb = volumen de HCl gastado en la titulación del blanco de reactivos.

meq = miliequivalentes del nitrógeno (peso molecular/1000 = 0.014)

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

M = peso de residuo + celita o **P4** (en gramos).

m = peso en gramos de la muestra (residuo + celita), utilizada en la determinación.

$$P = N \times F$$

Dónde:

P = peso en gramos de proteína en el residuo + celita o **P4**

N = peso en gramos de nitrógeno en el residuo + celita o **P4**

F = factor a conversión de proteína 6.25

**Contenido de fibra dietaria total (FDT).**

$$\%FDT = \frac{(R - P - C - B) \times 100}{pm}$$

Dónde:

R = peso del residuo que corresponde a la definición de **P2 - P1** (en gramos).

P = peso promedio de proteína en el crisol (en gramos)

C = peso promedio de cenizas en el crisol o **P1 - P3** (en gramos).

B = R<sub>blanco</sub> - P<sub>blanco</sub> - C<sub>blanco</sub>

pm = peso de la muestra (en gramos).

## 4.4.3. VITAMINA C.

**Fundamento.** Este método se fundamenta en la reducción de una solución de sal sódica del 2,6-diclorofenol-indofenol (DFI) por el ácido ascórbico. Este se oxida y pasa de ácido deshidroascórbico, reacción que ocurre a medida que se añade solución titulante (DFI) sobre la solución que contiene el ácido ascórbico. El punto final está determinado por la aparición de una coloración rosada debida a la presencia de DFI sin reducir, en medio ácido.

**Material/Reactivos:**

- ✓ Balanza analítica (Sartorius Extend).
- ✓ Matraz aforado de 100 mL
- ✓ Papel filtro de poro grueso.
- ✓ Pipetas volumétricas de 1 y 10 mL.
- ✓ Bureta 50 mL.
- ✓ Matraz Erlenmeyer.
- ✓ Solución de ácido acético al 5 %.
- ✓ Solución estándar de vitamina C. **(a)**
- ✓ Solución indicadora de 2,6-diclorofenol-indofenol. **(b)**

**(a)** Solución estándar de vitamina C: pesar con exactitud 100 mg de ácido ascórbico anhidro y colocarlo en un matraz aforado de 100 mL y llevar al aforo con ácido acético al 5 %. La concentración del estándar es de 1 mg/mL.

**(b)** Solución indicadora de 2,6-diclorofenol-indofenol: pesar 100 mg de 2,6-diclorofenol-indofenol y 50 mg de bicarbonato de sodio, disolverlos y llevar con agua destilada a 1000 mL. Valorar esta solución, colocando 1 mL de solución estándar de vitamina C con 9 mL de ácido acético al 5 % en un matraz Erlenmeyer y titular con la solución indicadora hasta que persista el color rosado, por lo menos 10 segundos [V].

La cantidad consumida en mililitros se considera como el título que equivale a 1 mg de vitamina C.

**Procedimiento:**

- 1) Pesar de 5 a 10 g de la muestra, inmediatamente homogeneizar con 50 mL de ácido acético al 5 %, con el fin de inactivar a la ascorbato oxidasa endógena.
- 2) Llevar a 100 mL con agua destilada, dejar sedimentar el material soluble. Para eliminar la mayor cantidad de material insoluble del sobrenadante, filtrar a través de papel filtro de poro grueso.
- 3) Del anterior filtrado tomar 3 alícuotas de 10 mL, colocar cada alícuota en un matraz Erlenmeyer.
- 4) Titular con la solución indicadora de 2,6-diclorofenol-indofenol, hasta que persista el color rosado por lo menos 10 segundos [T].

**Cálculos:** 1 mL de solución estándar de vitamina C llevado a 10 mL con ácido acético al 5 %, se valora con la solución indicadora. La cantidad consumida en mililitros se considera como el título equivalente a 1 mg de vitamina C; es decir, 20 mL consumidos = 1 mg de vitamina C.

$$\frac{mg}{g} \text{ vitamina C} = \frac{T \times 1mg \text{ vitamina C} \times A \times 100}{V \times Y \times W}$$

Dónde:

T= Volumen de titulación de la muestra

A = Aforo del extracto de la muestra problema (100 mL)

V= Volumen gastado de la solución indicadora, en la valoración de la solución estándar de vitamina C.

Y= Alícuota tomada del extracto de la muestra problema (10 mL).

W= Peso de la muestra problema (en gramos).

#### 4.5. DETERMINACIÓN DE FACTORES TÓXICOS Y ANTINUTRIMENTALES.

##### 4.5.1. LECTINAS (29).

**Fundamento.** La determinación de hemaglutininas o lectinas en extractos de plantas se lleva a cabo con una técnica de diluciones seriadas en la cual se determina el punto final por una estimación visual de la aglutinación de los glóbulos rojos en estudio.

El método de micro titulación es rápido y requiere una mínima cantidad de muestra. Se necesita trabajar con glóbulos rojos lavados y activados con una solución de proteasa disponible (como pronasa, tripsina o papaína), ya que la sensibilidad de la aglutinación se mejora considerablemente con este tratamiento.

#### **Material/Reactivos:**

- ✓ Centrífuga (Dynac).
- ✓ Incubadora bacteriológica (BLUE M).
- ✓ Espectrofotómetro (COLEMAN, Junior II-A)
- ✓ Balanza analítica (Sartorius Extend).
- ✓ Tubos de vidrio de para centrifuga 15 mL con graduación.
- ✓ Parrilla de agitación (Wisestir).
- ✓ Matraces Erlenmeyer de 25, 125 y 250 mL.
- ✓ Probeta de 100 mL.
- ✓ Embudo de filtración de tallo corto.
- ✓ Filtros de vidrio de poro grueso.

- ✓ Gasa.
  - ✓ Pipetas graduadas de 0.5 y 2 mL.
  - ✓ Jeringas (BDPlastipack® 5 a 10 mL, calibre 22).
  - ✓ Microtiter kit (Cook Eng-Alexander Virginia USA).
  - ✓ Placas de microdilución tipo “V”
  - ✓ Solución salina al 0.9 % preparado con agua desionizada.
  - ✓ Solución salina al 1 % preparado con agua desionizada.
  - ✓ Sangre de hámster joven-adulto Sirio macho desfibrinada y lavada.
  - ✓ Solución anticoagulante. **(a)**
  - ✓ Proteasa de (*Bacillus polymyx*) al 0.2 % en solución salina 0.9 % (Sigma P-5647).
  - ✓ Solución de lectinas purificada de frijol red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) (PHT) (SIGMA L-8754) **(b)**
  - ✓ Extracto de frijol peruano (prepararlo como extracto de muestra).
- (a)** Solución anticoagulante: cuando la sangre se va a trabajar inmediatamente se puede usar heparina (solución de heparina: sangre = 15 a 20 UI: 1 mL de sangre). Si la sangre no se va a trabajar de inmediato y se desea conservar en refrigeración, se debe usar solución ALSEVER (glucosa 0.6833 g, citrato de sodio 0.8080 g, ácido cítrico 0.0550 g, cloruro de sodio 0.4200 g, agua destilada 100 mL).
- (b)** Pesar con la mayor exactitud posible 1 mg de faseolotoxina (SIGMA L8754) y pasarla a un matraz aforado de 10 mL, aforar con solución salina 0.9 %. de esta solución, se realiza una dilución 1:100 para ocuparla en la placa de

microdilución tipo “V”, con la finalidad de definir la cantidad mínima de faseolotoxina que produce prueba positiva de aglutinación.

**Procedimiento:**

Preparación del extracto.

- 1) Pesar 0.1 g de muestra finamente molida y desengrasada (menor 5 %), suspender en 10 mL de solución salina 1 % y efectuar extracción con agitación mecánica durante 2 horas a 300 rpm a temperatura ambiente.
- 2) Posteriormente se centrifuga el extracto a 1500 rpm durante 10 minutos, se elimina el residuo insoluble y el sobrenadante se filtra a través de un filtro de vidrio de poro grueso. Finalmente se afora a 10 mL con solución salina 1%.

Preparación de la sangre.

- 1) En un matraz de 25 mL con anticoagulante (0.1 mL de heparina de 5000 UI/5mL de sangre), obtener 30 a 50 gotas de sangre de hámster (técnica realiza por punción ocular). Agitar suavemente para lograr la homogeneización.
- 2) La sangre con anticoagulante se transfiere a tubos de centrifuga para su lavado (3 veces) con solución salina 0.9 %. Se centrifuga a 1500 rpm, 10 minutos decantar el líquido sobrenadante.
- 3) Al terminar el tercer lavado, quedando el paquete de eritrocitos en el fondo, a este paquete se le agregó 24 mL de sol. Salina 0.9 %, por cada 1 mL de

glóbulos rojos (suspensión al 4 %). En caso de la presencia de coágulos, filtrar a través de una gasa.

#### Sensibilización de glóbulos rojos.

- 1) A cada 10 mL de suspensión de glóbulos rojos al 4 % de eritrocitos, se agrega 1 mL de solución de proteasa al 0.2 %. Se incubaron 1 hora 37 °C.
- 2) Posteriormente se distribuye en tubos graduados para centrífuga, se centrifugaron a 1500 rpm, 10 minutos. Finalmente se realizaron 3 lavados con solución salina, para eliminar la enzima.
- 3) Después del último lavado se mide el paquete de eritrocitos y se re suspende al 4 %. Por lo que, por cada mL de paquete se añade 24 mL de solución salina 0.9 %, filtrar a través de una gasa y colocar la suspensión en un matraz Erlenmeyer de 125 mL.

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

- 1) Se ajusta el espectrofotómetro al 100 % de transmitancia (T) con solución salina 0.9 % a una longitud de onda de 620 nm.
- 2) Para ajustar la suspensión de eritrocitos (procurando que este lo más homogénea posible), se toman 0.5 mL con pipeta volumétrica, colocarlas en una celda y adicionar 2 mL de solución salina 0.9 %, homogeneizar e introducir al espectrofotómetro. Se diluye lo necesario, hasta obtener una lectura de  $26 \pm 1$  % T.

Microtitulación.

- 1) Se realiza en placas tipo "V", en cada pozo se colocan 100  $\mu$ L de solución salina 0.9 %.
- 2) Con un microdilutor se toman 50  $\mu$ L de extracto obtenido o del estándar de faseolotoxina y se realizan diluciones (desde el primer pozo, siguiendo la hilera horizontal), eliminando el residuo de la última dilución.
- 3) Una hilera control negativo (sin muestra) un control positivo (50  $\mu$ L extracto de referencia) y las hileras restantes de la muestra.
- 4) Realizadas las diluciones se agregan una vez con el pipeteador de gota 50  $\mu$ L de la suspensión de eritrocitos sensibilizados y ajustados (cada que se adiciona, se homogeneiza suavemente la suspensión).
- 5) Las placas se rotan en forma circular e incuban 1 hora a 37 °C. La lectura de las placas se lleva a cabo en el dispositivo de lectura. Se reporta la máxima dilución que presenta aglutinación.

**Cálculos:**

A continuación, se explica la definición de las unidades del método las cuales se definieron como unidades de hemaglutinación por gramo de muestra (UHG/g muestra). La solución estándar de lectinas (faseolotoxina) tiene una concentración de 0.001  $\mu$ g/ $\mu$ L en la solución estándar, si en la microtitulación se toman 50  $\mu$ L, entonces se tiene una concentración de 0.05  $\mu$ g de faseolotoxina en dicho volumen. En una dilución seriada, se tiene la siguiente fórmula:

$$L = 2 \times e / 3^t$$

Dónde:

L= mínima aglutinación para producir una prueba positiva.

e= concentración del extracto

t = título de la aglutinación.

Por ejemplo, si la solución estándar de saponinas tiene un valor promedio de 2 para el título de hemólisis, entonces, en este pozo se tiene la siguiente concentración:

$$2 \times 0.05 \mu\text{g} / 3^2 = 0.011 \mu\text{g} = 0.000011 \text{ mg de faseolotoxina}$$

El cálculo para la muestra es el siguiente:

La concentración del extracto de la muestra es de 70 mg/mL (0.1 g de muestra en 10 mL de sol.salina 1 %), por lo tanto, en 50  $\mu\text{L}$  tenemos 0.5 mg. A continuación se presenta un ejemplo de cálculo para un título de aglutinación con valor de 3, se tiene la siguiente concentración:

$$2 \times 0.5 \text{ mg} / 3^3 = 0.037 \text{ mg de muestra} = 0.000037 \text{ g muestra}$$

Por definición: 1 mg del estándar de lectinas (faseolotoxina) es equivalente a 1 Unidad de Hemaglutinación (UHG). El resultado se reporta como Unidades de Hemaglutinación por g de muestra (UH/g de muestra).

$$\frac{0.000011 \text{ mg faseolotoxina}}{0.000037 \text{ g de muestra}} \times \frac{1 \text{ UHG}}{1 \text{ mg de faseolotoxina}} = 0.30 \frac{\text{UHG}}{\text{g de muestra}}$$

#### 4.5.2. INHIBIDORES DE TRIPSINA (31).

**Fundamento.** La técnica de Kakade y colaboradores, se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso (solución de NaOH 0.01 N) de la muestra sobre una solución estándar de tripsina. 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 sustrato sintético (BAPNA), el cual producirá una coloración que se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm.

Dicha coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de la muestra. Una unidad de tripsina (UT) es arbitrariamente definida como un incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm por 10 mL de mezcla de reacción. La actividad de inhibidores de tripsina se expresa en términos de unidades de tripsina inhibidas (UTI).

#### **Material/Reactivos:**

- ✓ Parrilla de agitación Wisestir.
- ✓ Pipeta automática de 100 a 1000  $\mu\text{L}$  (Eppendorf research).
- ✓ Pipeta automática de 1 a 5 mL (Finnpipette).
- ✓ Matraz aforado 50, 200, 250 mL y 1 L.
- ✓ Vasos de precipitados 50 mL.
- ✓ Probeta 50 mL.
- ✓ Espectrofotómetro (Thermo Scientific Genesys 10 UV).
- ✓ Fibra de vidrio.

- ✓ Vortex (MISTRAL mixer LAB-LINE).
  - ✓ Baño María con control de temperatura y agitación.
  - ✓ Tubos de ensayo.
  - ✓ 3 buretas de vidrio 25 mL.
  - ✓ Cronómetro.
  - ✓ Solución de NaOH 0.01 N.
  - ✓ Ácido acético 30 %.
  - ✓ HCl 0.001 N.
  - ✓ Solución amortiguadora de TRIS, pH 8.2. **(a)**
  - ✓ Solución BAPNA. **(b)**
  - ✓ Solución estándar de tripsina. **(c)**
  - ✓ Soya liofilizada.
- (a)** Pesar 6.05 g hidroximetil-amino-metano y 2.94 g CaCl<sub>2</sub>, disolver en 900 mL de agua destilada, ajustar pH a 8.2 y aforar a 1 L.
- (b)** Pesar 100 mg  $\alpha$ -N Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida-HCl (BAPNA) disolver en 2.5 mL dimetilsulfóxido, aforar a 250 mL con solución TRIS a 37 °C.
- NOTA: prepararse el mismo día de la determinación.
- (c)** Pesar 4 mg tripsina de páncreas bovino disolver y aforar a 200 mL con HCl 0.001 N.

**Procedimiento:**Preparación de extracto.

- 1) Pesar 1 g de muestra molida y desengrasada en un vaso de precipitados con 45 mL de NaOH 0.01 N, ajustar el pH a  $9.6 \pm 0.2$  y aforar a 50 mL con agua.
- 2) Se transvasa y se somete a agitación a 300 rpm, 2.5 horas en parrilla de agitación. Transcurrido este tiempo se deja reposar 30 minutos y se decanta, eliminando el residuo insoluble. El sobrenadante debe de ser diluido hasta que 1 mL produzca una inhibición de 40 a 60 %, indispensable para reducir la desviación estándar relativa. Este procedimiento se realizó con la soya liofilizada y las muestras.

Determinación de la actividad.

- 1) Porciones de 0.0, 0.6, 1.0, 1.4 y 1.8 mL del extracto directo o diluido se pipetea en tubos de ensayo por triplicado, ajustando el volumen a 2.0 mL con agua destilada se introducen al baño María a 37 °C.
- 2) Se adicionan 2.0 mL de solución estándar de tripsina a 37 °C y se incuba por espacio de 10 minutos. Homogeneizar en vortex.
- 3) A continuación, se adicionan 5 mL de solución de BAPNA a 37 °C a cada tubo, homogeneizar en vortex y se mantiene dicha mezcla de reacción por 10 minutos exactos (con cronómetro).
- 4) La reacción enzimática se detiene con la adición de 1 mL de ácido acético al 30 %; el cual debe homogeneizarse inmediatamente. NOTA: cuando por

la adición del ácido acético la mezcla se enturbie o forme precipitado será necesario filtrar el contenido a través de papel filtro (Whatman No.1).

NOTA: cuando se trabaja con el extracto directo, es común que se arrastren coloraciones indeseables que pueden interferir en la determinación. Por lo que se considera conveniente tomar una alícuota más de cada una de las porciones, las cuales servirán como sus respectivos blancos. A estos tubos, una vez adicionados los 2 mL de solución de tripsina, inmediatamente se les adiciona 1.0 mL de ácido acético al 30 % y por último 5.0 mL de solución de BAPNA, en estos tubos no es necesario llevar control de tiempo.

A continuación se presenta la siguiente tabla, que muestra en forma esquemática la serie de tubos que se deben preparar para determinar la actividad inhibitoria de la muestra.

**Tabla 3.** Serie de tubos para determinar actividad inhibitoria.

Clave	mL. Extracto	mL. H <sub>2</sub> O	mL.Std Tripsina	mL.Ácido acético 30%	10 min.	mL.BAPNA a 37°C	10 min	mL.Ácido acético 30%
<b>Bco.1</b>	1.8	0.2	2.0	1.0		5.0		-
<b>1</b>	1.8	0.2	2.0	-		5.0		1.0
<b>Bco.2</b>	1.4	0.6	2.0	1.0		5.0		-
<b>2</b>	1.4	0.6	2.0	-		5.0		1.0
<b>Bco.3</b>	1.0	1.0	2.0	1.0		5.0		-
<b>3</b>	1.0	1.0	2.0	-		5.0		1.0
<b>Bco.4</b>	0.6	1.4	2.0	1.0		5.0		-
<b>4</b>	0.6	1.4	2.0	-		5.0		1.0
<b>Bco.R</b>	0.0	2.0	2.0	1.0		5.0		-
<b>R</b>	0.0	2.0	2.0	-		5.0		1.0

Lectura en el espectrofotómetro.

Se realiza a 410 nm, es necesario que para cada una de las alícuotas ajustar a 0.0 de absorbancia con su respectivo blanco. El tubo 0.0 mL de extracto es la referencia (40 µg de tripsina/10 mL).

**Cálculos:**

a)

$$\text{Unidades de tripsina (UT)} = A \times 100$$

Dónde: A=lectura de absorbancia a 410 nm.

b) *Unidades de tripsina inhibidas (UTI) = [UT (referencia) – UT (alícuota)]*

c)

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{UTI(1 \text{ mL})}{UT(\text{referencia})} \times 100$$

Se debe producir una inhibición entre 40 a 60 %, para que los datos sean confiables.

d) Se grafica la actividad enzimática inhibitoria (UTI/mL vs mL de extracto).

$$\frac{UTI}{\text{mL}} = \frac{UTI}{\text{Vol de extracto (mL)}}$$

Si se obtiene una correlación lineal negativa satisfactoria (cuando  $r \leq -0.9$ ).

e) Se debe obtener el valor extrapolando, cuando el volumen del extracto es cero o sea el intercepto en el eje de las ordenadas. (Valor de y cuando  $x = 0$ )

f) Resultados expresados.

$$\frac{UTI}{\text{mg muestra}} = B \times F \times \frac{50}{1000 \text{ mg}}$$

Dónde:

B= valor extrapolado (b) o promedio en UTI/mL; en  $y = m x - b$

F= factor de dilución

#### 4.5.3. ÁCIDO OXÁLICO (32).

**Fundamento.** La determinación de oxalatos se basa en la extracción de ácido oxálico por medio de calentamiento y agitación mecánica en medio ácido del material vegetal en estudio, después precipitando el oxalato como oxalato de calcio y cuantificándolo por medio de una titulación del ácido oxálico con una solución valorada de permanganato de potasio ( $\text{KMnO}_4$ ); en donde el ácido oxálico se oxida hasta  $\text{CO}_2$ .

#### **Material/Reactivos:**

- ✓ Parrilla con agitación magnética.
- ✓ Matraz digestor Berzelius de 600 mL.
- ✓ Digestor LABCONCO.
- ✓ Tubos cónicos para centrifuga de 50 mL.
- ✓ Centrífuga (Eppendorf Centrifuge 5702).
- ✓ Papel Whatman No.50 y No.4
- ✓ Matraz Erlenmeyer 50mL y 250 mL.
- ✓ Potenciómetro Thermo Scientific Orion 3star).
- ✓ Matraz aforado 100 mL.
- ✓ Alcohol caprílico (1-octanol).
- ✓  $\text{NH}_4\text{OH}$ .
- ✓  $\text{HCl}$  6 N.
- ✓  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado: agua destilada 1: 9 (v/v).
- ✓  $\text{KMnO}_4$  0.042 N valorado.

- ✓ Reactivo de ácido tungstofosfórico (solución precipitante) **(a)**
- ✓ Buffer de acetato pH=4.5. **(b)**
- ✓ Líquido de lavado. **(c)**

**(a)** Disolver 2.5 g de  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en la mezcla de 4 mL  $\text{H}_3\text{PO}_4$  y 50 mL agua destilada aforar a 100 mL con agua destilada.

**(b)** (Solución a) Disolver 2.5 g  $\text{CaCl}_2$  anhidro en 50 mL  $\text{CH}_3\text{COOH}:\text{H}_2\text{O}$  (1:1).  
Solución b) Disolver 33 g  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  aforar a 50 mL con agua destilada. Mezclar ambas soluciones y ajustar a  $\text{pH} = 4.5 \pm 0.1$

**(c)** Diluir 12.5 mL ácido acético concentrado a 250 mL con agua destilada, saturar con polvo de oxalato de calcio, mezclar y dejar reposar. Enfriar a  $4^\circ\text{C}$ . Filtrar la cantidad necesaria antes de su uso.

### Procedimiento:

- 1) Pesar 5 g de muestra colocarla en un vaso Berzelius graduado, adicionar 200 mL de agua destilada agitando en parrilla de 15 a 20 minutos. Llevar a 300 mL con agua destilada y añadir 55 mL HCl 6 N y 2 gotas de 1-octanol
- 2) Colocar en el digestor y llevar a ebullición durante 15 minutos con reflujo, dejar enfriar.
- 3) Aforar a 500 mL con agua destilada enjuagando las paredes del vaso, dejar reposar una noche. Al día siguiente, filtrar a través de papel de filtración Whatman No.4 y desechar los primeros 100 mL (con la finalidad de acondicionar el sistema).

- 4) Se toma una alícuota de 25 mL en un matraz Erlenmeyer con 5 mL de reactivo de ácido tungstofosfórico, dejar reposar durante 5 horas mínimo. Filtrar a través de papel Whatman No.50.
- 5) Tomar una alícuota de 20 mL del filtrado en tubo para centrífuga con  $\text{NH}_4\text{OH}$  hasta obtener pH de 4 a 4.5 (utilizando potenciómetro), una vez logrado el valor de pH se añaden 5 mL de solución precipitante (reactivo de ácido tungstofosfórico) y buffer de acetato, se mezcla y se deja reposar una noche.
- 6) Al día siguiente se centrifuga a 1700 rpm. 15 minutos. Se decanta conservando el precipitado de oxalato de calcio. Se lava con 20 mL de líquido de lavado frío rompiendo el precipitado, se disuelve el precipitado con 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Se homogeneiza y enjuaga el tubo se homogeneiza en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 20 mL de agua destilada y 2 veces más con 5 mL agua destilada.
- 7) Se calienta la muestra y el blanco (5 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) en una parrilla con calentamiento a temperatura baja y agitación.
- 8) Se titulan las soluciones a 60 °C con  $\text{KMnO}_4$  0.042 N hasta obtener una coloración rosa por 30 segundos.

#### Cálculo

$$mg \text{ác. oxálico} = (ml \text{KMnO}_4 \text{ de titulación})(N \text{ del KMnO}_4)(meq)(100)(30)$$

Donde, meq: = 0.45 para ácido oxálico

$$\% \text{ácido oxálico} = \frac{mg \text{ác. oxálico} \times (100 - \% \text{humedad muestra})}{1000 \times g \text{ muestra}}$$

## 4.5.4. ÁCIDO FÍTICO (33).

**Fundamento.** Este método emplea una columna de intercambio iónico con el fin de purificar los extractos del ácido fítico, eliminando las fracciones menores de fosfatos de inositol que comúnmente se incluyen en otros métodos, permitiendo una cuantificación real del ácido fítico. La determinación colorimétrica, se basa en la medida de la disminución de la absorbancia del complejo  $\text{FeCl}_3$  – ácido sulfosalicílico o reactivo de Wade ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_6\text{S}$ ), debido al enlace del Fe (III) con el ácido fítico.

**Material/Reactivos:**

- ✓ Jeringas (BDPlastipack® 3 mL).
- ✓ Tubos cónicos para centrifuga 45 mL.
- ✓ Potenciómetro (Thermo Scientific Orion 3 star).
- ✓ Centrifuga (SORVALL RC5C PLUS)
- ✓ Parrilla de agitación (Wisestir).
- ✓ Recipientes de plástico 20 mL.
- ✓ Pipeta automática de 100 a 1000  $\mu\text{L}$  (Eppendorf research).
- ✓ Pipeta automática de 1 a 5 mL (Finnpipette)
- ✓ Matraz aforado 25, 50, 100 mL.
- ✓ Vasos de precipitados 50 mL.
- ✓ Probeta 50 mL.
- ✓ Espectrofotómetro (Thermo Scientific Genesys 10 UV)
- ✓ Fibra de vidrio.

- ✓ Vortex (MISTRAL mixer LAB-LINE)
- ✓ Soporte para columnas.
- ✓ Estufa con vacío (LAB-LINE DUO-VAC OVEN)
- ✓ Tubos de ensayo.
- ✓ Reactivo de Wade **(a)**
- ✓ Agua desionizada
- ✓ Ácido fítico
- ✓ Resina de intercambio aniónico de grado analítico
- ✓ NaCl 0.7 N
- ✓ NaCl 0.1 N
- ✓ NaOH 1.0 N
- ✓ HCl 0.65 N

**(a)** Pesar 0.03 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  + 0.3 g de ácido sulfosalicílico aforado a 100 mL con agua desionizada. NOTA: preparar en el momento de la determinación, vida media de 30 min.

### **Procedimiento:**

#### Preparación de columnas de intercambio

- 1) Pesar 0.5 g de resina de intercambio aniónico.
- 2) Preparar las columnas utilizando jeringas de 3 mL e introduciéndole en el fondo de la misma un tapón de fibra de vidrio (cuidando de no poner en exceso y usar guantes) y colocarla sobre el soporte.

- 3) Agregar a la columna la resina hidratada con 3 mL de agua desionizada cuidando que quede asentada uniformemente, enjuagar el recipiente en donde se pesó la resina con 5 mL de agua desionizada.
- 4) Una vez empacada la resina se adicionaron 15 mL NaCl 0.7 N.
- 5) Posteriormente lavar con 30 mL de agua desionizada, dejando aproximadamente 0.5 cm arriba de la resina empacada. Colocar el tapón a la jeringa.

#### Preparación de estándares.

- 1) Se pesaron 0.064 g de ácido fítico secado en estufa de vacío (20 inHg/65 °C), aforando a 50 mL con agua desionizada (esta solución contiene 1 mg de ácido por mililitro). A partir de esta solución se prepararon las soluciones estándar de 5, 10, 20, 40 y 50 µg/mL.

#### Extracción de ácido fítico.

- 1) Pesar 1 g de muestra en un vaso de precipitados de 50 mL y adicionarle 20 mL HCl 0.65 N, ajustar pH entre 0 y 1 (necesario para disociar al fitato de complejos minerales y proteínas).
- 2) Someter a agitación vigorosa 2 horas a temperatura ambiente. Transferir el extracto a tubos para centrifuga, centrifugación 12000 rpm, 30 minutos, 20-27 °C.
- 3) Colectar el sobrenadante. Se recomienda realizar una dilución 1:25 del sobrenadante aforando con agua desionizada (ajustar la alícuota a pH 6.00 con NaOH 3 %).

Purificación por columna de intercambio iónico.

- 1) Se toma una alícuota de 10 mL de la dilución y transferir cuantitativamente a la columna de intercambio.
- 2) Lavar la columna con 15 mL de NaCl 0.1 N (para eliminar fosfato inorgánico y fracciones menores de inositol). Desechar el agua de lavado.
- 3) Adicionar 15 mL NaCl 0.7 N, y colectar el extracto purificado
- 4) Ajusta el valor de pH del extracto a 3.00 con HCl.

Determinación espectrofotométrica.

- 1) Tomar por triplicado 3 mL de agua desionizada (utilizada como blanco), y 3 mL de los estándares (soluciones de fitato de sodio conteniendo de 5 a 50 µg/mL en agua desionizada) y 3 mL de los extractos purificados. Transferidos a tubos de ensayo.
- 2) Adicionar 1 mL de reactivo de Wade (preparar en el momento de la determinación espectrofotométrica).
- 3) Agitar en vortex.
- 4) Leer la absorbancia a 500 nm.
- 5) Utilizar una celda con agua desionizada para calibrar el espectrofotómetro en cero, se lee la absorbancia del blanco, para así obtener la absorbancia corregida respectiva\*.
- 6) Realizar la curva patrón con regresión lineal (absorbancia corregida (nm) vs µg de ácido fítico/mL).

**Cálculos:**

Con la la curva patrón con regresión lineal (absorbancia corregida (nm) vs  $\mu\text{g}$  de ácido fítico/mL) interpolar los datos y obtener la concentración de ácido fítico en las muestras.

$$\text{*Absorbancia corregida (nm)} = \text{absorbancia de agua (nm)} - \text{absorbancia de extracto o estándar(nm)}$$

a)

$$\frac{g \text{ muestra}}{mL \text{ NaCl}} = \left( \frac{g \text{ muestra}}{mL \text{ HCl } 0.65 \text{ N}} \right) (F)(L)$$

Dónde:

F= factor de dilución 1:25

$$L = \text{lavados} \quad \frac{10 \text{ mL agua desionizada}}{15 \text{ mL NaCl } 0.7 \text{ N}}$$

b)

$$\frac{\mu\text{g ácido fítico}}{mL \text{ NaCl}} = \frac{\text{Abs. corregida} - b}{m}$$

Ecuación de la recta  $y = m x + b$ 

c)

$$\% \text{ ácido fítico} = \frac{\mu\text{g ácido fítico}}{mL \text{ NaCl}} \times \frac{1g}{1000 \ 000 \ \mu\text{g}} \times \frac{mL \text{ NaCl}}{g \text{ muestra}} \times 100$$

#### 4.5.5. SAPONINAS (34).

**Fundamento.** En el método una suspensión de glóbulos rojos se presenta una visual hemólisis por acción de las saponinas disueltas en un extracto salino de la muestra. El método de micro titulación es rápido y requiere de una mínima cantidad de muestra. Se necesita sensibilizar los glóbulos rojos mediante lavados con una solución de tripsina, ya que la sensibilidad de los eritrocitos se mejora considerablemente con este tratamiento.

La hemoglobina pasa de los glóbulos rojos a la solución, transformándola en una suspensión turbia a una roja translúcida, luego de dejarla en reposo, la parte que no presenta hemólisis se sedimenta. Después de una hemólisis total, se encontrará en el fondo del pozo de la placa de micro titulación, una placa tenue de estromas de glóbulos rojos.

#### **Material/Reactivos:**

- ✓ Aparato de extracción Goldfish LABCONCO.
- ✓ Cartuchos de celulosa 22 x 80 mm.
- ✓ Rotavapor Büchi 461, mod. RE-111.
- ✓ Centrífuga (Dynac).
- ✓ Incubadora bacteriológica (BLUE M).
- ✓ Espectrofotómetro (COLEMAN, Junior II-A)
- ✓ Balanza analítica (Sartorius Extend).
- ✓ Tubos de vidrio de para centrifuga 15 mL con graduación.
- ✓ Parrilla de agitación (Wisestir).

- ✓ Matraces Erlenmeyer de 25, 125 y 250 mL.
  - ✓ Probeta de 100 mL.
  - ✓ Embudo de filtración de tallo corto.
  - ✓ Filtros de vidrio de poro grueso.
  - ✓ Gasa.
  - ✓ Pipetas graduadas de 0.5 y 2 mL.
  - ✓ Jeringas (BDPlastipack® de 5 a 10 mL, calibre 22).
  - ✓ Microtiter kit (Cook Eng-Alexander Virginia USA).
  - ✓ Placas de microdilución tipo "U"
  - ✓ Solución salina al 0.9 % preparado con agua desionizada.
  - ✓ Solución salina al 1 % preparado con agua desionizada.
  - ✓ Solución de metanol (RA): agua al 85:15 (v/v).
  - ✓ Sangre de conejo macho raza Nueva Zelanda desfibrinada y lavada.
  - ✓ Solución anticoagulante. **(a)**
  - ✓ Tripsina de páncreas bovino (Sigma T-8128 Tipo II). **(b)**
  - ✓ Solución estándar de saponinas al 0.5 % en solución salina. **(c)**
- (a)** Solución anticoagulante: cuando la sangre se va a trabajar inmediatamente se puede usar heparina (solución de heparina: sangre = 15 a 20 UI: 1 mL de sangre). Si la sangre no se va a trabajar de inmediato y se desea conservar en refrigeración, se debe usar como solución ALSEVER (glucosa 0.6833 g, citrato de sodio 0.8080 g, ácido cítrico 0.0550 g, cloruro de sodio 0.4200 g, agua destilada 100 mL), para conservar las células.
- (b)** Tripsina de páncreas bovino (Sigma T-8128 Tipo II) al 0.1 % en solución salina 0.9 %.

- (c) Solución estándar de saponinas: el estándar es una mezcla 1:1 de digitonina (saponina esteroideal) y un extracto de quijalla (saponina tipo triperpenoide), al 0.5 % en solución salina 0.9 %.

**Procedimiento:**

Preparación del extracto.

- 1) Pesar 3.5 g de muestra finamente molida y desengrasada (menor 5 %), se coloca un cartucho de celulosa dentro de un portadedales del extractor de Goldfish, se realiza la extracción durante 2 horas con 50 mL de metanol: agua (85:15).
- 2) Se concentra a sequedad en rotavapor Büchi a 65 °C, la muestra se re-disuelve con solución salina 0.9 %, se filtra y aforo a 50 mL con la misma solución. El extracto puede ser guardado en refrigeración, con una duración de 2 semanas y/o en congelación con una duración de 1 mes aproximadamente.

Preparación de la sangre.

- 1) En un matraz de 25 mL con anticoagulante (0.1 mL de heparina de 5000 UI/5mL de sangre), obtener de 5 a 10 mL de sangre de conejo. Agitar suavemente para lograr la homogeneización.
- 2) La sangre con anticoagulante se transfiere a tubos de centrifuga para su lavado (3 veces) con solución salina 0.9 %. Se centrifuga a 1500 rpm, 10 minutos decantar el líquido sobrenadante.

- 3) Al terminar el tercer lavado, quedando el paquete de eritrocitos en el fondo, a este paquete se le agregó 24 mL de sol. Salina 0.9 %, por cada 1 mL de glóbulos rojos (suspensión 4 %). En caso de la presencia de coágulos, filtrar a través de una gasa.

#### Sensibilización de glóbulos rojos.

- 1) A cada 10 mL de suspensión de glóbulos rojos al 4 % de eritrocitos, se agrega 1 mL de solución de tripsina 0.1 %. Se incubaron 1 hora 37 °C.
- 2) Posteriormente se distribuye en tubos graduados para centrífuga, se centrifugaron a 1500 rpm, 10 minutos. Finalmente se realizaron 3 lavados con solución salina, para eliminar la enzima.
- 3) Después del último lavado se mide el paquete de eritrocitos y se re suspende al 5 %. Por lo que, por cada mL de paquete se añade 19 mL de solución salina 0.9 %, filtrar a través de una gasa y colocar la suspensión en un matraz Erlenmeyer de 125 mL.

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

- 1) Se ajusta el espectrofotómetro al 100 % de transmitancia (T) con solución salina 0.9 % a una longitud de onda de 620 nm.
- 2) Para ajustar la suspensión de eritrocitos (procurando que este lo más homogénea posible), se toman 0.5 mL con pipeta volumétrica, colocarlas en una celda y adicionar 2 mL de solución salina 0.9 %, homogeneizar e introducir al espectrofotómetro. Se diluye lo necesario, hasta obtener una lectura de 24 a 29 % T.

Microtitulación.

- 1) Se realiza en placas tipo "U", en cada pozo se colocan 50  $\mu$ L de solución salina 0.9 %.
- 2) Con un microdilutor se toman 50  $\mu$ L de extracto realizando o del estándar de saponinas y se realizan diluciones (desde el primer pozo, siguiendo la hilera horizontal), eliminando el residuo de la última dilución.
- 3) Una hilera control negativo (sin muestra) un control positivo (50  $\mu$ L extracto de referencia) y las hileras restantes de la muestra.
- 4) Realizadas las diluciones se agregan con el pipeteador de gota 50  $\mu$ L de la suspensión de eritrocitos sensibilizados y ajustados.
- 5) Las placas se rotan en forma circular e incuban 1 hora a 37 °C. La lectura de las placas se lleva a cabo en el dispositivo de lectura. Se reporta la máxima dilución que presento hemólisis.

**Cálculos:**

A continuación, se explica la definición de las unidades del método las cuales se definieron como unidades hemolíticas por mg de muestra (UH/mg muestra). La mezcla de saponinas triterpenoide y esteroideal (1:1) tiene una concentración de 0.5 % en la solución estándar, si en la microtitulación se toman 0.05 mL, entonces se tiene una concentración de 0.25 mg de saponina en dicho volumen. En una dilución seriada, se tiene la siguiente fórmula:

***Concentración del extracto /2<sup>t</sup>***

Dónde:

t = título de la hemólisis.

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

$$0.25 \text{ mg} / 2^8 = 0.001 \text{ mg} = 1 \mu\text{g de saponinas}$$

El cálculo para la muestra es el siguiente:

La concentración del extracto de la muestra es de 70 mg/mL (3.5 g de muestra en 50 mL de etanol), por lo tanto, en 0.05 mL tenemos 3.5 mg. A continuación se presenta un ejemplo de cálculo para un título de hemólisis con valor de 1, se tiene la siguiente concentración:

$$3.5 \text{ mg} / 2^1 = 1.75 \text{ mg de muestra}$$

Por definición: 1  $\mu\text{g}$  del estándar de saponinas es equivalente a 10 Unidades Hemolíticas (UH). El resultado se reporta como Unidades Hemolíticas por mg de muestra (UH/mg de muestra).

$$\frac{1 \mu\text{g de saponinas}}{1.75 \text{ mg de muestra}} \times \frac{10 \text{ UH}}{1 \mu\text{g de estándar saponinas}} = 5.71 \frac{\text{UH}}{\text{mg de muestra}}$$

4.5.6. DETERMINACIÓN DE  $\alpha$ -SOLANINA Y  $\alpha$ -CHACONINA, MEDIANTE  
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) (35,36).

**Material/Reactivos:**

- ✓ Balanza analítica (Sartorius Extend).
- ✓ Parrilla de agitación (Wisestir).
- ✓ Tubos cónicos para centrifuga de 45 mL.
- ✓ Potenciómetro (Thermo Scientific Orion 3 star).
- ✓ Centrifuga (SORVALL RC5C PLUS)
- ✓ Embudos de separación.
- ✓ Vasos de precipitados de 50 mL
- ✓ Agitadores magnéticos.
- ✓ Probetas de 25 y 10 mL
- ✓ Matraces Kitasato 150 mL.
- ✓ Embudos de filtración
- ✓ Papel filtro Whatman #1.
- ✓ Matraces de bola
- ✓ Rotavapor Büchi 461, mod. RE-111.
- ✓ HPLC Waters mod. 2695. Separation Module Alliance.
- ✓ Detector UV a 200 nm. Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector.
- ✓ Columna de fase inversa Waters 10  $\mu$ m Bonda- Pack C<sub>18</sub>, 3.9 x 300 mm
- ✓ Microjeringas de 100  $\mu$ L
- ✓ Jeringas 1 mL.
- ✓ Membranas de filtración PTFE, tamaño de poro 0.45  $\mu$ m. Sartorius.

- ✓ Viales
- ✓ Pipeta automática.
- ✓ Estándar de  $\alpha$ -solanina (SIGMA S-3757).
- ✓ Estándar  $\alpha$ -chaconina (SIGMA C-3768).
- ✓ Agua grado HPLC.
- ✓ n-butanol.
- ✓ Fosfato de amonio monobásico 0.05 M, ajustado a pH 6.5 (buffer de fosfatos)
- ✓ Acetonitrilo grado HPLC.
- ✓ Metanol grado HPLC.

**Procedimiento:**

Extracción.

1. Pesar 0.5 g de muestra en un vaso de precipitados con 20 mL de ácido acético 0.5 %. Agitar durante 3 horas a 700 rpm.
2. Centrifugar el extracto durante 30 minutos a 400 rpm.
3. Filtrar con ayuda de vacío a través de papel filtro Whatman #1
4. Re-extraer con 15 mL más ácido acético 5 %, durante 2 horas a 700 rpm.
5. Repetir pasos 2 y 3. Juntar ambos filtrados.
6. Ajustar a pH 10 con  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

### Separación.

1. Transferir el filtrado a un embudo de separación con 20 mL de n-butanol. realizar 3 extracciones más con 10 mL de n-butanol. Descartar la parte inferior. NOTA: Se recomienda realizar dos extracciones por día, dejando extraer por una noche.

### Concentración.

1. El extracto combinado con n-butanol. es llevado a sequedad en el rotavapor Büchi, con la ayuda de una bomba de vacío, para evitar el sobrecalentamiento de la muestra.

### Determinación en HPLC.

1. Se re disuelve el concentrado con 1 mL de la solución (10:55:35 v/v) de metanol-acetonitrilo-agua, para su análisis directo en HPLC.
2. La fase móvil para esta determinación es buffer de fosfatos pH 6.5 y acetonitrilo grado HPLC (70:30 v/v).
3. Se lleva a cabo la lectura por triplicado de 100  $\mu$ L de la muestra en 18 minutos.

## 5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

### 5.1. ANÁLISIS BROMATOLÓGICO.

La mayoría de los alimentos de origen vegetal presentan un alto contenido de agua, esto es de gran beneficio para el consumidor ya que se trata de alimentos en forma fresca. La papita de monte (*Solanum cardiophyllum*) no es la excepción y para corroborarlo se determinó la humedad original de las muestras. Obteniendo como resultado lo que se muestra en la Tabla 4.

**Tabla 4. Determinación de humedad original de papita de monte. <sup>a</sup>**

DETERMINACION	MUESTRA CRUDA		MUESTRA COCIDA	
	HO <sup>b</sup>	CV <sup>c</sup>	HO <sup>b</sup>	CV <sup>c</sup>
HUMEDAD ORIGINAL (HO)	71.42 ± 0.26	0.36	73.67 ± 0.16	0.22

<sup>a</sup> Se muestran valores promedio, ± desviación estándar (n=3)

<sup>b</sup> Resultados expresados en gramos por 100 gramos de muestra fresca (%)

<sup>c</sup> Coeficiente de variación expresado como (%).

La humedad original de la papita de monte cocida es mayor comparada con la cruda, debido a la absorción de agua durante la cocción. Por lo tanto para facilitar tanto el análisis proximal como de factores tóxicos, se llevó a cabo el secado de la muestra en estufa de circulación forzada a  $55 \pm 3$  °C, durante de 18 a 24 horas, y poder obtener las harinas respectivas del material biológico.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en el análisis bromatológico y toxicológico de la papita de monte cruda y cocida (**Tabla 5**). Reportado en las harinas que corresponde a base húmeda (BH) y en la muestra original (BO).

Todas las determinaciones analíticas (bromatológicas y toxicológicas) se realizaron en el material biológico en forma de harinas, en la cual se equilibró el contenido de agua con la humedad relativa del ambiente, cuando se lleva a cabo en este material el análisis bromatológico su contenido de agua está representado en % de humedad (o base húmeda). El anterior valor es importante porque se puede obtener en la harina lo que se denomina Sólidos Totales (ST) de acuerdo a la siguiente expresión:

$$ST = 100 - \% \text{ Humedad de la muestra}$$

Si en el material biológico original (fresco) se determina su humedad, también es factible expresar su contenido de ST y de esta manera se pueden expresar los analitos determinados en esta forma y a continuación se presenta un ejemplo:

*Se tiene un valor de 8.76 % de proteína determinada en la harina de papa cruda, con un 8.49 % de humedad.*

$$ST (\text{harina de papa}) = 100 - 8.49 = 91.51 \text{ ST}$$

*Si el contenido de humedad en el material fresco es de 71.90 % (humedad original).*

$$ST (\text{material fresco}) = 100 - 71.90 = 28.10 \text{ ST}$$

*Por lo tanto, para obtener el contenido de proteína en la muestra original (fresca), se utiliza el siguiente cálculo:*

$$\frac{8.76 \text{ g proteína}}{100 \text{ g harina de papa}} \times \frac{28.10 \text{ ST}}{100 \text{ g material fresco}} \times \frac{100 \text{ g harina de papa}}{91.51 \text{ ST}} = \frac{2.69 \text{ g proteína}}{100 \text{ g material fresco}}$$

(Ver tabla 2)

**Tabla 5. Análisis bromatológico de la harina de papita de monte. <sup>a</sup>**

DETERMINACIONES	MUESTRA CRUDA		MUESTRA COCIDA	
	BH <sup>b</sup>	BO <sup>c</sup>	BH <sup>b</sup>	BO <sup>c</sup>
HUMEDAD	8.49 ± 0.08	71.90 ± 3.70	7.14 ± 0.17	73.67 ±
CENIZAS	3.91 ± 0.04	1.20 ± 0.05	3.95 ± 0.08	1.12 ± 0.09
PROTEÍNA CRUDA	8.76 ± 0.28	2.69 ± 0.31	8.31 ± 0.24	2.36 ± 0.26
GRASA	0.26 ± 0.04	0.08 ± 0.04	0.27 ± 0.01	0.08 ± 0.01
FIBRA CRUDA	1.32 ± 0.05	0.40 ± 0.05	1.84 ± 0.08	0.52 ± 0.09
HIDRATOS DE CARBONO <sup>d</sup>	77.27	23.73	78.49	22.25

<sup>a</sup> Se muestran valores promedio, ± desviación estándar (n=3)

<sup>b</sup> Resultados expresados en gramos por 100 gramos de muestra en la harina (%)

<sup>c</sup> Resultados expresados en gramos por 100 gramos de muestra fresca (%)

<sup>d</sup> Hidratos de carbono calculados por diferencia de acuerdo al esquema de Weende.

En los resultados obtenidos (Tabla 5) se observa que el tratamiento térmico casi no afecta la composición bromatológica de la papita de monte. El porcentaje de cenizas es casi la mitad del de proteína cruda; esto se debe a que las papas son una fuente importante de magnesio, calcio y potasio. Es importante recalcar que la papita de monte presenta un % grasa muy bajo. Esto es de suma importancia para el consumidor de este tubérculo, ya que hoy en día el consumidor busca alimentos frescos con el menor contenido de grasas presentes y disminuir la ingesta calórica dietética (11).

## 5.2. COMPLEMENTACIÓN BROMATOLÓGICA.

**Tabla 6. Complementación bromatológica de la harina de papita de monte.<sup>a</sup>**

DETERMINACIONES	MUESTRA CRUDA		MUESTRA COCIDA	
	BH	BO	BH	BO
DENSIDAD ENERGETICA (kJ/100 g muestra)	1657.65 ± 36.09	509.01 ± 39.43	1543.63 ± 42.95	444.14 ± 46.93
FIBRA DIETARÍA TOTAL (FDT) <sup>b,c</sup>	9.26 ± 0.99	2.84 ± 0.99	10.20 ± 1.05	11.15 ± 1.15

<sup>a</sup> Se muestran valores promedio, ± desviación estándar (n=3)

<sup>b</sup> Resultados expresados en miligramos por 100 gramos de muestra en la harina(%).

<sup>c</sup> Resultados expresados en gramos por 100 gramos de muestra fresca (%)

El aumento ligero de la fibra cruda en la papita de monte cocida se debe a que entre las principales funciones biológicas del agua está la capacidad de disolver sustancias y mantenerlas tanto en solución como en suspensión coloidal, este es el caso de la fibra soluble, siendo así mayor el contenido de fibra en la papita de monte cocida. De acuerdo a lo reportado, se menciona que el contenido de fibra dietaría total se encuentra entre el 1 y 2 % en la papa común. En este caso se obtuvo un valor aproximado al mencionado de fibra cruda, sin embargo, el contenido de fibra dietaría total (FDT), es mayor comparada con lo reportado, ya que este valor incluye todos los compuestos fibrosos o no (**12,10**).

En esta determinación experimental en la cual se obtiene la densidad energética total del alimento donde se incluye la fibra cruda. Los hidratos de carbono digeribles proporcionan alrededor de 4 kcal (16.75 kJ) por gramo, energía equivalente a la proporcionada por un gramo de proteína e inferior a las 9 kcal de

un gramo de grasa. Sin embargo, la utilización de los hidratos de carbono como fuente de energía presenta una ventaja significativa, desde el momento en que promueve la utilización de la grasa (11).

En la papa los hidratos de carbono constituyen alrededor del 80 % de los sólidos totales, principalmente almidón. Aunque la papa es una importante fuente de energía, la gran desventaja es el volumen necesario que necesita ser consumido para cubrir los requerimientos diarios de energía, ya que se necesitan ingerir aproximadamente 3.5 kg. Una papa mediana contiene alrededor de 100 cal. La contribución de la papa a la ingesta de energía, varía notablemente, dependiendo de cómo se cocina. Si es hervida proporciona alrededor de 300 kJ/100 g de papa fresca y si son freídas en aceite proporcionan alrededor de 600 kJ/100 g de papa fresca (10).

En este caso, las muestras analizadas son harinas, pero es posible obtener el contenido energético en papa fresca usando la humedad original. Además, teniendo el análisis proximal es posible calcular el contenido energético y más si se toma en cuenta la fibra dietética, que no reduce el contenido de hidratos de carbono digeribles.

- **Determinación de vitamina C.**

**Tabla 7. Determinación de vitamina C de harina de papita de monte. <sup>a</sup>**

DETERMINACIÓN	MUESTRA CRUDA		MUESTRA COCIDA	
	BH <sup>b</sup>	BO <sup>c</sup>	BH <sup>b</sup>	BO <sup>c</sup>
VITAMINA C	3.77 ± 0.001	1.16 ± 0.001	2.83 ± 0.001	0.81 ± 0.001

<sup>a</sup> Se muestran valores promedio, ± desviación estándar (n=3)

<sup>b</sup> Resultados expresados en miligramos por 100 gramos de muestra en la harina

<sup>c</sup> Resultados expresados en miligramos por 100 gramos de muestra fresca

El contenido de ácido ascórbico de las papas es mucho mayor cuando se acaban de coleccionar; tienen un promedio de 30 mg/100 g de papa (*S. tuberosum*). Durante el almacenamiento, el contenido de ácido ascórbico baja continuamente hasta que, al fin del invierno, pueden ser solamente de 4 a 7 mg/100 g de papa (15).

En las determinaciones realizadas en este estudio, los valores obtenidos fueron relativamente bajos. Esto se debe principalmente al tratamiento térmico, principalmente, al que fueron sometidas las muestras. Este tratamiento afecta de forma directa a la Vitamina C, la cual se sabe que es una vitamina termolábil, hidrosoluble y fácil de oxidar.

## 5.3. ANÁLISIS TOXICOLÓGICO Y ANTINUTRICIONAL.

Tabla 8. Análisis toxicológico de harina de papita de monte.<sup>a</sup>

DETERMINACIONES	MUESTRA CRUDA		MUESTRA COCIDA	
	BH	BO <sup>f</sup>	BH	BO <sup>f</sup>
Ácido fítico <sup>b</sup>	0.54 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.48 ± 0.02	0.14 ± 0.03
Ácido oxálico <sup>b</sup>	0.45 ± 0.06	0.14 ± 0.07	0.88 ± 0.06	0.25 ± 0.07
Inhibidores de tripsina (UTI/mg muestra) <sup>d</sup>	19.53 ± 0.77	6.00 ± 0.84	5.86 ± 0.39	1.70 ± 0.42
Lectinas (UHG /g muestra) <sup>e</sup>	0.37 ± 0.0	0.11 ± 0.0	NEGATIVO	NEGATIVO
Saponinas (UH/mg muestra) <sup>c</sup>	10.67 ± 0	3.28 ± 0	NEGATIVO	NEGATIVO

<sup>a</sup> Se muestran valores promedio, ± desviación estándar (n=3)

<sup>b</sup> Resultados expresados en gramos por 100 gramos de muestra(%)

<sup>c</sup> Unidades de hemólisis/mg muestra; donde 10 UH = 1µg estándar de saponinas

<sup>d</sup> Unidades de tripsina inhibida/mg muestra.

<sup>e</sup> Unidades de hemaglutinación/g muestra; donde 1UHG = 1mg lectinas de referencia.

<sup>f</sup> Resultados expresado en muestra fresca, con unidades correspondientes.

Se encontró que algunos factores tóxicos se encuentran en bajas concentraciones o por debajo del límite de detección del método y en la mayoría de las determinaciones se observa una disminución de estos por el efecto térmico (que consistió en cocimiento y eliminación de agua de cocción) al que fue sometido el material biológico.

El ácido fítico se considera un factor antinutricional debido a que reduce la biodisponibilidad de proteínas y minerales. La molécula de ácido fítico contiene seis grupos fosfatos con carga, por lo tanto es un excelente agente quelante que forma complejos con cationes minerales y proteínas. Muchos de estos complejos

son insolubles. En los resultados se observa que el contenido de ácido fítico no fue afectado en la cocción posiblemente por la adición de NaCl y formación de un complejo con  $\text{Na}^+$  (37).

El contenido de oxalatos en la papita de monte, tanto cruda como cocida, es relativamente bajo. Por otro lado, la muestra cocida presentó mayor cantidad de oxalatos comparada con la muestra cruda, este resultado probablemente se debe a que los iones metálicos (en este caso  $\text{Na}^+$ , presente en el agua de cocción como NaCl) forman precipitados insolubles con el oxalato los cuales fueron posiblemente cuantificados indirectamente. De tal manera que el umbral de toxicidad de ácido oxálico es de 5 g de ácido oxálico para un adulto de 68 kg de peso. Por lo tanto, el consumo no causaría ningún problema nutricional, ya que como se menciona en la literatura, se ha establecido que las plantas que contengan más del 10% de oxalatos en base seca pueden ocasionar efectos tóxicos (38, 39, 40).

En el caso de los inhibidores de tripsina, la concentración obtenida fue alta en la papa cruda, ya que el Límite Máximo Permicible, para que un alimento no presente riesgo por este factor antinutricional, es de 10 UTI/mg muestra. Se consideran que los inhibidores presentes en la papita de monte son de tipo Kunitz, esto se refleja al obtener una correlación lineal negativa de acuerdo a la metodología aplicada ( $r \leq -0.9$ ); aunque debido a los resultados obtenidos en la muestra cocida no se descarta la presencia de inhibidores tipo Browman-Birk. Los inhibidores de Browman-Birk son de gran actividad antitripsina, los cuales son resistentes al calor, ácidos, álcalis. Cabe señalar que un alimento no presenta

riesgo por este factor antinutricional, ya que mediante el calentamiento apropiado puede destruirse el efecto de los principales inhibidores de las proteasas o al menos disminuirlo en gran parte, aunque esta destrucción depende de la temperatura, duración y tipo de calentamiento, como se puede observar en la **Tabla 8. (20, 31, 41).**

En la determinación de lectinas en la papita de monte cocida el resultado obtenido fue el esperado ya que estas proteínas son lábiles a la temperatura. Por lo tanto, la adecuada inactivación de estas proteínas tóxicas es por medio de tratamiento térmico ya que son de origen proteínico, un método efectivo es el cocimiento casero **(11,19).**

El resultado obtenido en la determinación de saponinas, los cuales son glucósidos amargos que pueden causar hemólisis en eritrocitos, en la papa cocida es lo esperado ya que estos glucósidos son altamente hidrosolubles. Por lo tanto, se espera que el contenido de saponinas que pudiese tener la muestra se eliminará en el agua de cocción, como así sucedió (ver **Tabla 8) (19).**

- **Humedad original de cáscara de papita de monte cruda y cocida.**

Se realizaron determinaciones complementarias de compuestos tóxicos y/o antinutricionales ya que como se menciona en **(10)**, el contenido de estos se encuentra en mayor concentración en la cáscara de las papas que en la pulpa.

**Tabla 9. Determinación de humedad original de cáscara de papita de monte.<sup>a</sup>**

DETERMINACION	MUESTRA CRUDA		MUESTRA COCIDA	
	HO <sup>b</sup>	CV <sup>c</sup>	HO <sup>b</sup>	CV <sup>c</sup>
HUMEDAD ORIGINAL (HO)	74.45 ± 0.13	0.17	75.53 ± 0.03	0.04

<sup>a</sup> Se muestran valores promedio, ± desviación estándar (n=3)

<sup>b</sup> Resultados expresados en gramos por 100 gramos de muestra fresca (%)

<sup>c</sup> Coeficiente de variación expresado como (%).

A continuación se presentan los resultados de humedad y análisis toxicológico obtenidos en la harina de la cáscara de papita de monte cruda y cocida. Reportado en la harina de papita de monte (BH) y en la muestra original (BO).

**Tabla 10. Análisis toxicológico de cáscara de papita de monte.<sup>a</sup>**

DETERMINACIONES	MUESTRA CRUDA		MUESTRA COCIDA	
	BH <sup>e</sup>	BO <sup>f</sup>	BH <sup>d</sup>	BO <sup>e</sup>
Humedad <sup>b</sup>	5.46 ± 0.90	74.45 ± 0.13	5.10 ± 0.67	75.53 ± 0.03
Saponinas (UH/mg muestra) <sup>c</sup>	42.66 ± 0	11.52 ± 0	21.33 ± 0	5.49 ± 0
Lectinas (UHG /g muestra) <sup>d</sup>	0.30 ± 0	0.08 ± 0	0.11 ± 0	0.03 ± 0
α-Solanina (mg/100g)	NO DETECTADO	NO DETECTADO	NO DETECTADO	NO DETECTADO
α-Chaconina (mg/100g)	NO DETECTADO	NO DETECTADO	NO DETECTADO	NO DETECTADO

<sup>a</sup> Se muestran valores promedio, ± desviación estándar (n=3)

<sup>b</sup> Resultados expresados en gramos por 100 gramos de muestra en la harina (%)

<sup>c</sup> Unidades de hemólisis/mg muestra; donde 10 UH = 1µg estándar de saponinas

<sup>d</sup> Unidades de hemaglutinación/g muestra; donde 1UHG = 1mg lectinas de referencia.

<sup>e</sup> Resultados expresado en muestra en harina, con unidades correspondientes.

<sup>f</sup> Resultados expresado en muestra fresca, con unidades correspondientes

La concentración de saponinas en la cáscara de papita de monte cruda es aproximadamente 3 veces mayor, comparada con la harina de papita de monte cruda integra (cáscara y pulpa). También se pudo observar la presencia de estos glucósidos en la cáscara de papita de monte cocida, sin embargo esta concentración no representa ningún peligro en su consumo de la papita de monte en la mayoría de las ocasiones se consume pelada y la ingesta tendría que ser excesiva para poder causar algún daño.

La concentración de lectinas en la cáscara de papita de monte, tanto cruda como cocida es baja. Sin embargo, se puede observar la presencia de estas en la muestra cocida, esto puede deberse a que el proceso de inactivación por calor de las hemaglutininas, no fue llevado a cabo en su totalidad, esto se debe a fenómenos de transmisión de calor **(19)**.

Los glicoalcaloides a analizar  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -chaconina, en la cáscara de la papita de monte cruda y cocida, no pudieron ser detectados por la técnica utilizada **(ANEXO II)**. Sin embargo, aunque su concentración sea por debajo del valor detectable, no implica su ausencia. Los niveles de glicoalcaloides en la papa van a depender de la forma de variedad, cultivo, almacenamiento y temperatura, además se pueden ver afectados por el tratamiento térmico al que sea sometida **(43)**. Los glicoalcaloides son metabolitos secundarios que la propia planta produce en respuesta a situaciones de estrés, como puede ser la temperatura o ataque de insectos u hongos, actuando como un insecticida sobre ellos **(44)**.

Finalmente se presenta una tablas comparativas del análisis bromatológico, complementación del mismo y análisis toxicológico de la papita de monte (*Solanum cardiophyllum*) y los resultados reportados en la bibliografía de la papa convencional (*Solanum tuberosum*).

**Tabla 11. Comparación de la composición bromatológica de papita de monte (*S. cardiophyllum*) y papa convencional (*S. tuberosum*).<sup>a</sup>**

DETERMINACIONES	<i>S. cardiophyllum</i> <sup>b</sup>	<i>S. tuberosum</i> <sup>b</sup>
HUMEDAD	71.90	63 a 86
CENIZAS	1.20	0.44 a 1.9
PROTEÍNA CRUDA	2.69	0.7 a 4.6
GRASA	0.08	0.02 a 0.96
FIBRA CRUDA	0.40	0.17 a 3.48
HIDRATOS DE CARBONO	23.73 <sup>d</sup>	22.25

<sup>a</sup> Se muestran valores promedio, ± desviación estándar (n=3)

<sup>b</sup> Resultados expresados en gramos por 100 gramos de muestra fresca (%)

<sup>d</sup> Hidratos de carbono calculados por diferencia de acuerdo al esquema de Weende.

Fuente: Salunkhe, D.K., Kadam S., Jadhav S., 1991. (10)

**Tabla 12. Comparación de la complementación bromatológica de papita de monte (*S. cardiophyllum*) y papa convencional (*S. tuberosum*).<sup>a</sup>**

DETERMINACIONES	<i>S. cardiophyllum.</i>	<i>S. tuberosum.</i>
DENSIDAD ENERGETICA (kJ/100 g muestra)	509.01	364 a 419
FIBRA DIETARÍA TOTAL (FDT) <sup>b</sup>	2.84	3 a 8
VITAMINA C <sup>c</sup>	1.16	13

<sup>a</sup> Se muestran valores promedio, ± desviación estándar (n=3)

<sup>b</sup> Resultados expresados en gramos por 100 gramos de muestra fresca (%)

<sup>c</sup> Resultados expresados en miligramos por 100 gramos de muestra fresca

Fuente: Salunkhe, D.K., Kadam S., Jadhav S., 1991. (10)

**Tabla 13. Comparación de la composición toxicológica de papita de monte (*S. cardiophyllum*) y papa convencional (*S. tuberosum*).<sup>a</sup>**

DETERMINACIONES	<i>S. cardiophyllum</i>	<i>S. tuberosum</i>
Inhibidores de tripsina (UTI/mg muestra) <sup>c</sup>	6.00 ± 0.84	16.10 ± 1.40
Lectinas <sup>c</sup>	3	8
Glicoalcaloides (mg TGA /g muestra) <sup>d</sup>	NEGATIVO	0.2-0.6

<sup>a</sup> Se muestran valores promedio, ± desviación estándar (n=3)

<sup>b</sup> Unidades de tripsina inhibida/mg muestra.

<sup>c</sup> Máxima dilución que presenta aglutinación.

<sup>d</sup> Resultados expresado en miligramos de glicoalcaloides totales por 100 gramos de muestra.

Fuentes: Salunkhe, D.K., Kadam S., Jadhav S., 1991. (10)

Sotelo, A., Contreras E., Sousa, H., Hernández, V., 1998. (8)

Serrano, B., 2000. (36)

La papita de monte analizada, es una especie arvense, estas especies sobreviven en hábitats con frecuentes perturbaciones, producto de las actividades del hombre, a pesar de que su ciclo reproductivo tiene éxito sin la intervención de éste. Son derivadas de híbridos entre plantas silvestres y domesticadas. Las plantas arvenses pueden distinguirse por sus preferencias ecológicas en campos de cultivo y ruderales a lo largo del camino y otras vías de comunicación y cerca de asentamientos humanos. Estas condiciones de crecimiento hacen que haya algunos cambios al comparar las especies arvenses con las silvestres y/o las domesticadas, algunos de los cambios son: incremento de tamaño, tipo de germinación, pérdida o reducción de mecanismos de defensa contra enemigos naturales, entre otros (45, 46, 44).

## 6. CONCLUSIONES.

- ❖ La papita de monte (*Solanum cardiophyllum*), presenta un elevado contenido de hidratos de carbono, componente químico característico del género *Solanum*. También se encontró un contenido mayor al reportado en la papa común de fibra dietaria total (FDT). Es muy importante señalar que el valor nutrimental no se ve afectado por el tratamiento térmico.
  
- ❖ El tratamiento térmico al que fue sometida la papita de monte (*S. cardiophyllum*), presentó efectos destoxificantes sobre algunas sustancias, como en el caso de las lectinas, saponinas e inhibidores de tripsina en las cuales se observó su eliminación o disminución en la muestra procesada.
  
- ❖ Los factores antinutrimientales y tóxicos se encuentran en un contenido bajo, por lo tanto, no presentan ningún riesgo para la salud. De acuerdo a estos resultados y al no encontrarse un valor detectable de glicoalcaloides. Se concluye que puede tratarse de una especie arvense y no silvestre. Ya que al ser una planta tolerada sus condiciones de crecimiento hacen que haya algunos cambios al compararla con las silvestres y/o domesticadas, por ejemplo la pérdida o reducción de mecanismos de defensa contra enemigos naturales, entre otros.

- ❖ Finalmente, se concluye que el consumo de este tubérculo no representa ningún riesgo a la salud. Sin embargo, se recomienda ser procesado antes de ingerirse. Basta con hervir las papas y retirar la cáscara, asegurarse que al comprarlas no presente algún tipo de pigmentación verdosa o heridas ya que estas características pueden indicar presencia de glicoalcaloides, los cuales no son eliminados completamente en la cocción.

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

- 1) Hawkes, J.G., 1990. *The Potato: Evolution, Biodiversity and genetic Resources*: Belhaven Press. London, p.259.
- 2) Horst-Dieter, T., 2001. *Fundamentos de tecnología de los alimentos*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. pp. 40-43.
- 3) Luna, M., García, E., 2007. Distribución geográfica y ecológica de papas silvestres (***Solanum L.***), del altiplano potosino-zacatecano, Revista Chapingo. *Serie Horticultura* 13 (1): 35-41
- 4) Reyes, A., Sánchez, J., Cortés, C., Alvarado, M., 2006. Microtuberización *in vitro* de la papita de monte (***Solanum cardiophyllum***). Revista Digital de la Universidad Autónoma de Zacatecas 2 (3): 1-3.
- 5) Instituto de Biología. "***Solanum cardiophyllum*** IBIUNAM:MEXUOAX10"938" UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2011-08-12.Universidad Nacional Autónoma de México. Consultada en: 2013-7-10. Disponible en: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:OAX10398>
- 6) Spooner, D., Van den Berg, R., Rodríguez, A., Bamberg, J., Hijmans, R., and Lara, S., 2004. Wild potatoes (***Solanum*** section ***Petota***; Solanaceae) of North and Central America. *Systematic Botany Monographs* 68: 1-209.

- 7) Villa, J., Rodríguez, A., 2010. Hallazgo de papas silvestres [***Solanum cardiophyllum*** Lindl., ***S. ehrenbergii*** (Bitter) Rydb. Y ***S. stoloniferum*** Schltld.] Cultivadas en Jalisco, México: *Revista Fitotecnia Mexicana* 33: 85-88.
- 8) Sotelo, A., Contreras E., Sousa, H., Hernández, V., 1998. Nutrient Composition and Toxic Factor Content of Four Wild Species of Mexican Potato: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 1355-1358.
- 9) Fennema, O., 1993. *Componentes perjudiciales o potencialmente perjudiciales de los alimentos*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. pp. 21, 188, 267, 376, 471-479.
- 10) Salunkhe, D.K., Kadam S., Jadhav S., 1991. *Potato: production, processing, and products*. CRC Press. Boca Ratón, Florida. pp. 1-31, 204-206.
- 11) Repetto, M., 1995. *Toxicología avanzada*. Editorial Díaz de Santos, S.A. Madrid, España. pp. 205-206.
- 12) Badui, S., 1993. *Química de los alimentos*. 3era edición. Editorial Alhambra Mexicana, S.A de C.V. México, D.F. pp.15, 357.
- 13) Hart, F., 1991. *Análisis moderno de los alimentos*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. pp.1, 13-15.
- 14) Vaclavik, V., 2002. *Fundamentos de ciencia de los alimentos*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. p. 64.

- 15) Fisher, P., Bender, A., 1993. *Valor nutritivo de los alimentos*. Limusa Norega Editores. México, D.F. pp. 58-65
- 16) Pearson, D., 1993. *Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. p.30.
- 17) Bowman, B.A., Russell, R.M., 2003. Conocimientos actuales sobre nutrición 8ª edición.: *OPS e Instituto Internacional de Ciencias de la Vida* 592: 7-11.
- 18) Laider, K., Meiser, J., 1997. *Fisicoquímica*. 2da edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. pp. 45-87.
- 19) Valle, P., Lucas, B., 2000. *Toxicología de alimentos*. México. ISBN 927537004 4. Disponible en:  
<<http://www.bvsde.paho.org/eswww/fulltext/toxicolo/toxico/toxico.pdf>>
- 20) Lindner, E., 1995. *Toxicología de los alimentos*. 2da edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. pp. 4-10.
- 21) De Muelenaere, H. 1965. Toxicity and hemagglutinating activity of legumes: *Nature* 206: 827-828.
- 22) Asberg, K., Holmen, H., 1968. A nonspecific phytohemagglutinin found in ***Vicia cracca***: *Biochemistry and Biophysics* 160: 116.
- 23) Sotelo, A., Mendoza, J., Argote, R., 2002. Contenido de ácido fítico en algunos alimentos crudos y procesados. Validación de un método colorimétrico: *Journal of the Mexican Chemical Society* 46: 301-306.

- 24) Martínez, J., De Arpe, C., Villarino, A., 2012. *Avances en alimentación, nutrición y dietética*. Editorial Nemira. Madrid, España. p. 206.
- 25) M. Friedman., 2008. Potato Glycoalkaloids and Metabolites: Roles in the plant and in the diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 8655-8681
- 26) Helrich, K., 1990. Official methods of analysis of the Association Official Analytical Chemists. Published of AOAC, 15<sup>th</sup> edition, Vol. II, Arlington, pp. 778-779, 1058-1059.
- 27) Kirk, R.S., Sawyer, R., Egan, H., 1996. *Composición y análisis de alimentos de Pearson*. 2da edición. Editorial CECSA. México, D.F. pp. 12-29, 36-37, 199-250.
- 28) Helrich, K., 1995. Official methods of analysis of the Association Official Analytical Chemists. Published of AOAC, 16<sup>th</sup> edition, Vol. I, Arlington, pp.7.
- 29) Vasconcelos, I.M., Oliveira, J.T.A., 2004. Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon* 44: 385-403.
- 30) Concon, J. M., Newberg, S., Eades, N., 1983. Lectins in wheat gluten proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31: 939-941.
- 31) Kakade, M.L., Rackis J.J., Mcghee, J.E., 1974. Determination of Trypsin Inhibitor Activity of Soy Products. A collaborative Analysis of an improved procedure. *Cereal Chemistry* 51: 376-382.

- 32) Herrera, B., 1998. *Desarrollo de métodos para determinar fitatos y oxalatos y su aplicación en semillas silvestres de interés*. Tesis, Facultad de Química, UNAM, México, D.F., pp.33-41.
- 33) Fruhbeck, G., Alonso, R., Marzo, F., and Santidrian, S., 1995. A modified method for the indirect quantitative analysis of phytate in foodstuffs. *Analytical Biochemistry* 225: 206–212.
- 34) Sotheeswaran, S., 1988. Screening for saponins using the blood hemolysis test. *Journal of Chemical Education* 65: 161-162.
- 35) Dan, L., Friedman, M., 1996. Comparison of Glycoalkaloid Content of Fresh and Freeze-Dried Potato Leaves Determined by HPLC and Colorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 2287-2291.
- 36) Serrano, B., 2000. *Cuantificación de glicoalcaloides en 12 variedades comerciales de papa mexicana (**Solanum tuberosum**) por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)*. Tesis, Facultad de Química, UNAM, México, D.F. pp. 38-47.
- 37) Castillo, J., 2007. *Variación en el contenido de ácido fítico debido al progreso de germinación en cereales*. Tesis, Facultad de Química, UNAM, México, D.F, pp. 1-40.
- 38) Watson, D., 1987. *Natural Toxicants in Food*. Inglaterra. VHC Wenheim. pp. 120,121.

- 39) Derache, R., 1990. *Toxicología y seguridad de los alimentos*. Ediciones Omega. Zaragoza, España. pp. 109-132.
- 40) Klingman, G., 1980. Estudio de las plantas nocivas: principios y prácticas. Limusa. México, D.F. pp. 311-318.
- 41) Pérez, M.F., 2004. *Evaluación nutricional de tres diferentes raíces comestibles*. Tesis, Facultad de Química, UNAM, México, D.F. pp.16-17.
- 42) Bushway, J. R., Ponnampalam, R., 1981.  $\alpha$ - Chaconine and  $\alpha$ - Solanine content of potato products and their stability during several modes of cooking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 29: 814-817.
- 43) Jadhav, S. J., Sharma, R. P., Salunkle, D. K., 1981. Naturally occurring toxic alkaloids in foods. *Critical Reviews in Toxicology* 9: 21-101.
- 44) Bye, R. 1998. *La intervención del hombre en la diversificación de las plantas en México* 689-700. En: Ramamoorthy, T. P., R. Bye, A. Lot, J. Fa (eds.). *Diversidad biológica de México: orígenes y distribución*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal, México.
- 45) Luna, M., García, E., 1989. Recopilación del conocimiento empírico de papas arvenses (***Solanum L.***) del Altiplano Potosino-Zacatecano. *Acta botánica Mexicana* 8: 1-13.
- 46) Díaz, F., 2010. El proceso de domesticación en las plantas. *Casa del Tiempo* 3(28): 66-69.

ANEXO I.



Figura 1. Papita de monte (*Solanum cardiophyllum*), procedente del estado de Aguascalientes.



Figura 2. Papita de monte (*Solanum cardiophyllum*), procedente del estado de Guanajuato.



Figura 3. Cáscara de papita de monte (*Solanum cardiophyllum*).

## ANEXO II.

A continuación se presentan los cromatogramas correspondientes a la Determinación de  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -chaconina, mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

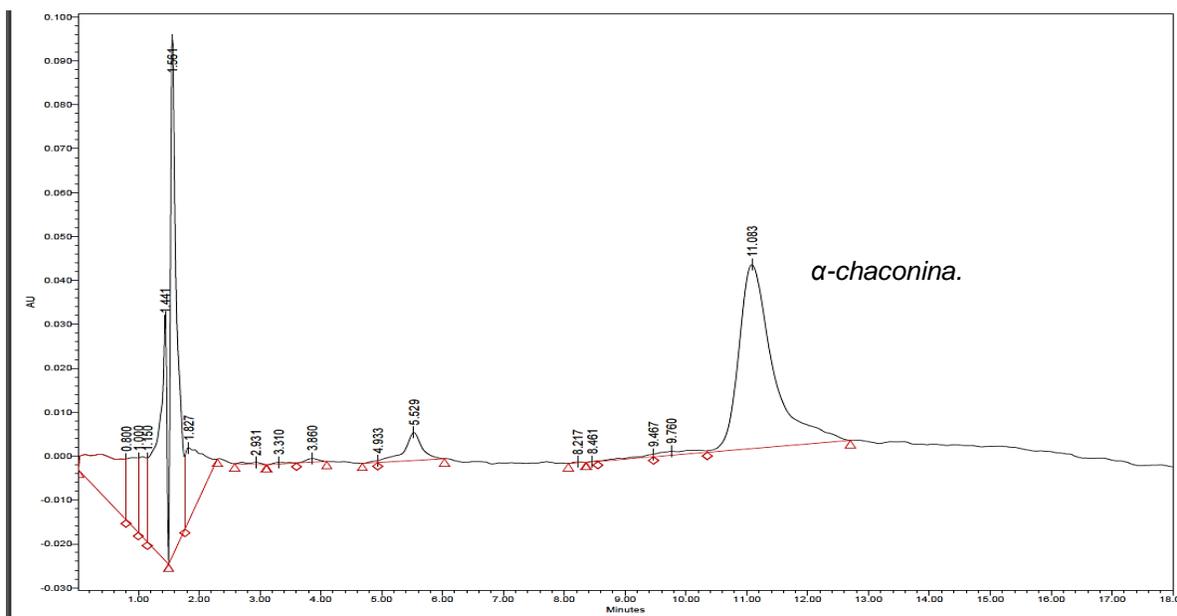


Figura 4. Cromatograma de solución estándar de  $\alpha$ -chaconina.

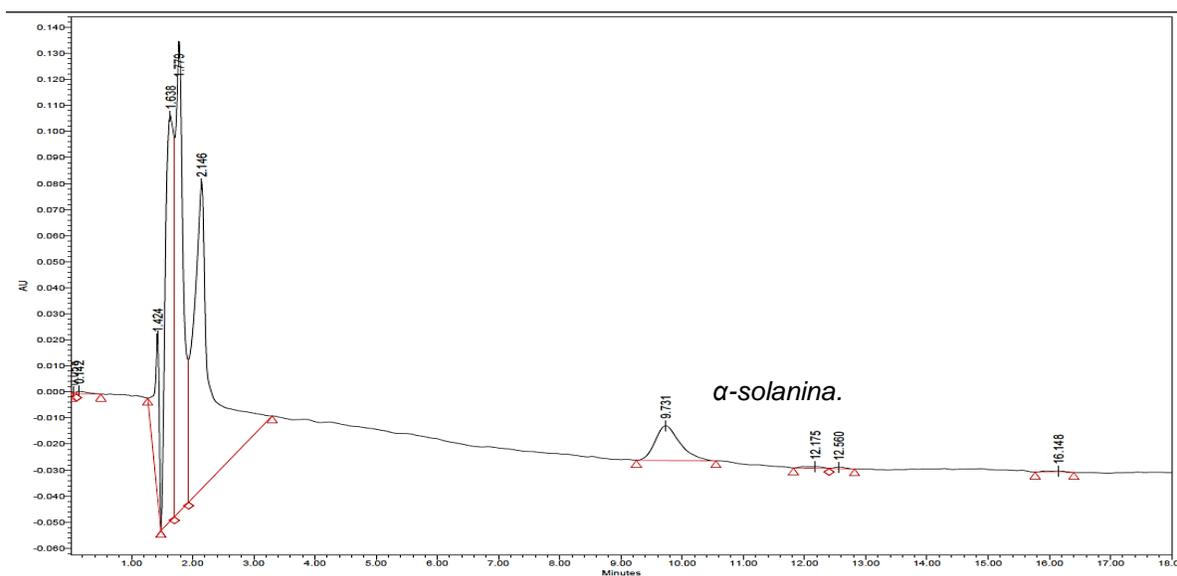


Figura 5. Cromatograma de solución estándar de  $\alpha$ -solanina.

A continuación se presentan los cromatogramas correspondientes a la Determinación de  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -chaconina en la cáscara de papita de monte cruda y cocida, mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

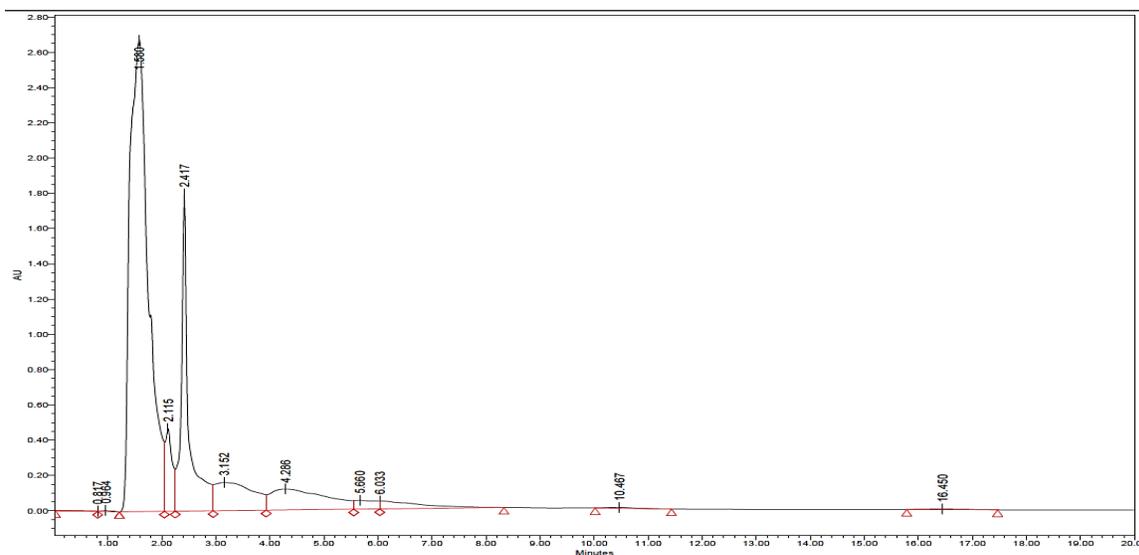


Figura 6. Cromatograma de cáscara de papa cruda.

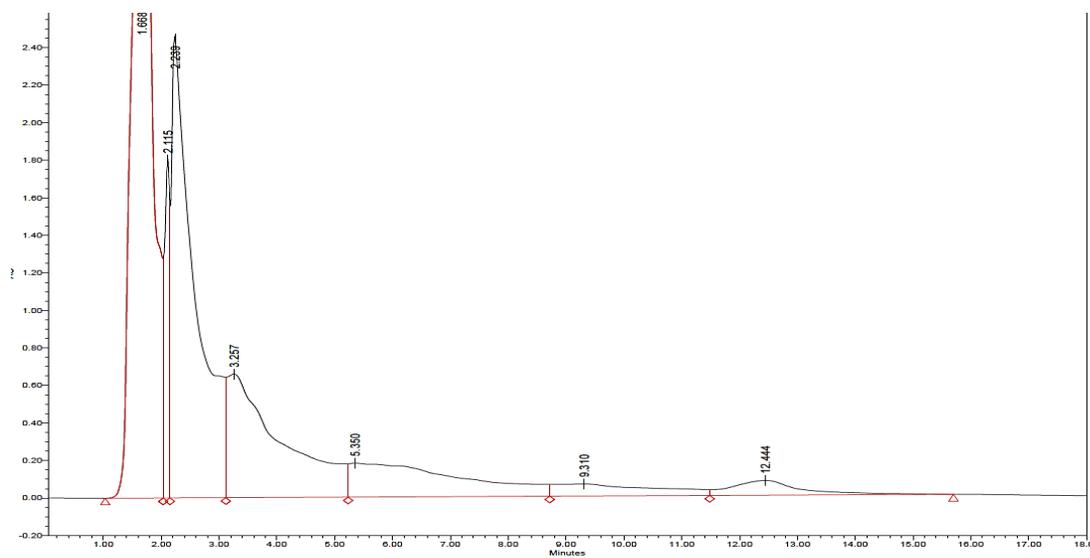


Figura 7. Cromatograma de cáscara de papa cocida.