



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

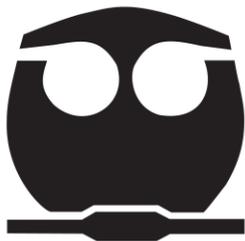
**EVALUACIÓN BROMATOLÓGICA Y DETERMINACIÓN  
DE FACTORES TÓXICOS EN LA SEMILLA ÍNTEGRA Y  
HARINA DESENGRASADA-DESTOXIFICADA DE  
COLORÍN (*Erythrina americana*).**

**T E S I S**

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

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

EMMA CAROLINA VARELA MENDOZA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:** M. en C. Bernardo Lucas Florentino  
**VOCAL:** M. en C. Lucía Cornejo Barrera  
**SECRETARIO:** Q.F.B Juan Diego Ortiz Palma Pérez  
**1ER. SUPLENTE:** Dra. Iliana Elvira González Hernández  
**2DO. SUPLENTE:** M. en C. Argelia Sánchez Chinchilla

### **Sitio donde se realizó el tema:**

Anexos de los Laboratorio 4C, y 4B, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Edificio A. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

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

**Sustentante:** Emma Carolina Varela Mendoza. \_\_\_\_\_.

# Contenido

	<b>Página</b>
1 RESUMEN.....	1
2 INTRODUCCIÓN.....	3
3 OBJETIVOS .....	7
4 ANTECEDENTES .....	8
4.1 Problemas nutricionales en México.....	8
4.1.1 Sobrepeso y obesidad.....	8
4.1.2 Desnutrición.....	9
4.1.3 Anemia .....	9
4.2 Disponibilidad y producción de alimentos en México. ....	10
4.3 Leguminosas .....	11
4.3.1 Inhibidores de proteasas y de amilasas.....	14
4.3.2 Hemaglutininas (lectinas).....	15
4.3.3 Alcaloides.....	16
4.4 Generalidades de <i>Erythrina americana</i> . ....	18
4.4.1 Usos de <i>Erythrina americana</i> .....	20
4.4.2 Toxicidad.....	22
5 METODOLOGÍA.....	24
5.1 Diagrama de flujo.....	24
5.2 Material biológico.....	25
5.3 Fraccionamiento. ....	25
5.4 Análisis bromatológico.....	25
5.4.1 Humedad. ....	26
5.4.2 Cenizas .....	26
5.4.3 Grasa cruda.....	28
5.4.4 Proteína.....	29
5.4.5 Fibra cruda.....	34
5.4.6 Hidratos de carbono asimilables .....	36
5.5 Desengrasado.....	36
5.6 Toxicología analítica .....	39
5.6.1 Fitoheamglutininas .....	39

5.6.2	Inhibidores de tripsina.....	45
5.6.3	Determinación cuantitativa de alcaloides. ....	49
5.7	Destoxificación (extracción de alcaloides con metanol).....	52
5.8	Prueba cualitativa de alcaloides.....	55
5.9	Tamizado. ....	57
5.10	Molienda fina.....	57
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
7	CONCLUSIONES.....	67
8	BIBLIOGRAFÍA.....	68

## 1 RESUMEN

Los problemas de malnutrición es cada vez más frecuente en el mundo en unos casos por la falta de alimentos que ingerir (países subdesarrollados y en vías de desarrollo) y en otros casos por una dieta desbalanceada generalmente en el aporte energético (países desarrollados).

Por lo tanto la búsqueda de material biológico con potencial proteínico-energético, no es nueva ni difícil de implantar como recurso agroalimentario, ya que el territorio mexicano cuenta con una gran biodiversidad. Las leguminosas constituyen una de las familias botánicas más amplias del reino vegetal, donde una característica propia de las semillas de las leguminosas es su alto contenido de proteína, por lo tanto, no es sorprendente que algunas semillas sean utilizadas como fuente de proteína en la alimentación de muchos países en vías de desarrollo.

Recientes investigaciones señalan que las semillas de Colorín (*Erythrina americana*) tiene un alto contenido de proteína y un adecuado contenido de lípidos, por lo cual puede ser considerada una alternativa de recurso fitogenético para la alimentación y la agricultura (RFAA). La semilla ya destoxificada ha manifestado un perfil de aminoácidos muy adecuado para alimentación de animales monogástricos ya que en bioensayos realizados anteriormente se obtuvo una Relación de Eficiencia Proteínica (REP) sin diferencia significativa con respecto al REP del control de referencia (caseína), por lo que dicho resultado fue de gran relevancia, considerando la semilla de Colorín como una buena fuente de proteína para la alimentación de otros animales monogástricos.

No obstante por tratarse de una leguminosa, en esta familia botánica, es común que presente factores tóxicos naturales, por lo que su ingesta directa puede presentar riesgo a la salud. El Colorín se caracteriza por biosintetizar alcaloides, a los que se les atribuyen propiedades paralizantes de los nervios motores similares al curare, además en estudios previos se ha determinado que la semilla cruda

tiene un alto contenido de inhibidores de tripsina por lo que es necesaria su destoxificación para poder proponerla con fines alimenticios.

Con el siguiente proyecto de trabajo se plantea integrar el proceso de la extracción del aceite de ***Erythrina*** (desengrasado) y continuar con la destoxificación de la torta residual de semilla de colorín, para aprovechar este recurso vegetal realizando el análisis bromatológico, pero también considerando la toxicología analítica, esperando obtener una disminución o eliminación de los factores tóxicos, para que finalmente se proponga la harina como concentrado proteínico para alimentación animal, sustituyendo y reduciendo el uso de otras fuentes de proteína convencional.

## 2 INTRODUCCIÓN.

Desde tiempos remotos, el hombre ha buscado en el reino vegetal su alimento y cura. En el pasado, las plantas fueron utilizadas sobre la base de un conocimiento empírico. Conforme fueron pasando los años, los estudios de plantas se caracterizaron dándole identificación a análisis bromatológicos y de los principios activos que las confieren.

La biodiversidad de México es reconocida como una de las más amplias del mundo es por eso que es llamado como un país “megadiverso”, ya que forma parte del selecto grupo de naciones poseedoras de la mayor cantidad y diversidad de animales y plantas, casi el 70% de la diversidad mundial de especies **(Galindo et. al, 2012)**.

En un tiempo relativamente corto la vegetación de México ha sufrido **(Morales, 2013)** extensas alteraciones. Muy pocas áreas del territorio nacional contienen aún comunidades ecológicas inalteradas. La huella de la deforestación, las quemas de monte, el sobrepastoreo y sus consecuencias sobre el suelo fértil están a la vista en casi cualquier paisaje del país. Ante esta situación de tan graves consecuencias sobre la productividad del campo y la conservación de la biodiversidad surge como una prioridad inaplazable comenzar a desarrollar procedimientos para revertir este terrible deterioro de una manera inteligente y sustentable **(Vázquez, 1993)**.

Vivimos tiempos difíciles, la mayor preocupación hoy en día es la subsistencia; aunque la búsqueda de la alimentación suficiente viene siendo un problema desde la prehistoria.

Actualmente, el aumento desmesurado de la población mundial ha correspondido una notoria escasez de alimentos tradicionales, llevando esto a un problema por no tener facilidad de obtención a alimentos de alto valor nutrimental, así mismo se va buscando una alternativa para aminorar el problema dándole uso a alimentos

no convencionales con alto contenido de proteínas, tal es el caso de las proteínas de origen vegetal, así se podría llegar a utilizar como sustituyentes de la proteína animal.

Las semillas de leguminosas junto con los granos de cereales, fueron de los primeros alimentos seleccionados por el hombre; las leguminosas es una familia botánica amplia, con aproximadamente 600 géneros y alrededor de 13,000 especies; esta familia tiene gran importancia en la dieta humana y animal, contiene una amplia variedad de factores tóxicos, por lo que se pueden considerar como plantas de cierto riesgo en su consumo (**Valle et. al, 2000**).

Las proteínas de origen vegetal además de tener un alto valor nutrimental su costo es relativamente bajo, el cual es una ayuda a los grupos de población de escasos recursos económicos que a través de los años siguen siendo los más afectados.

Nutricionalmente las leguminosas de grano aportan cantidades significativas de energía a la dieta de poblaciones de bajos recursos y lo que es más importante aporta la proteína suplementaria a la dieta. Las leguminosas contienen generalmente de 20 a 40% de proteína (base seca), lo que las sitúa entre las fuentes más concentradas respecto a este nutrimento.

Un recurso fundamental para lograr lo anterior lo constituyen las especies de árboles que tengan la potencialidad de crecer en zonas profundamente alteradas y que, con el tiempo, permitan la recuperación de la fertilidad del suelo, un microclima y un ciclo hidrológico, además de que sus subproductos puedan ser aprovechados, tal es el caso del árbol de ***Erythrina americana*** mejor conocido como colorín o árbol de coral desnuda, es un árbol pequeño, armado con aguijones, con follaje deciduo; hojas alternas, 3-folioladas; flores rojas; frutos en legumbres largas, con semillas rojas, florece en primavera y fructifica en verano, el cual puede cumplir con estas características ya que después de su siembre no requiere mucho cuidado y da al suelo una rápida recuperación, sus flores son empleadas para consumo humano después de hervirlas se prepara ricos guisados con huevo, al año se considera que por árbol produce entre 5 a 6 kg de semillas

de características roja parecida al frijol perteneciente a la familia ***Fabacea*** conocida anteriormente como ***Leguminosae***, de especial relevancia por su alto contenido en proteína (aprox. 30%), grasa (aprox. 15%) y alcaloides (aprox. 1%) **(Morales, 2013)**.

La toxicología de los alimentos o también conocida como toxicología bromatológica, es una especialidad de la toxicología ambiental, cuyo interés está creciendo rápidamente; ya que la acción de un agente tóxico sobre un organismo vivo denominado como intoxicación, es un proceso relativamente complejo, en el cual están involucrados muchos factores.

Aunque un agente que produce una intoxicación puede ser químico o físico, en toxicología de alimentos se refiere exclusivamente a sustancias químicas. Un término muy usado en el área farmacológica para definir cualquier sustancia extraña al organismo en cuestión, es de agente xenobiótico.

Es conveniente diferenciar las sustancias xenobóticas 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, ya que muchos autores las engloban en un sólo término, conocido como “factor tóxico”. Sin embargo, se puede distinguir dos tipos de sustancias dañinas que pueden ser ingeridas a través de los alimentos, agente tóxico y agente antinutricional.

Un agente tóxico es cualquier sustancia xenobiótica que es capaz de producir una anomalía 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.; en cambio un agente anti-nutricional es la 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 anomalía 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, existen diferentes agentes antinutricionales como antienzimas, antivitaminas y secuestrantes de minerales.

La toxicidad de la semilla de colorín *Erythrina americana* se debe a diversos compuestos presentes o distribuidos en todo el árbol, (incluida la semilla) como son los inhibidores de tripsina, lectinas y alcaloides, de estos últimos se encuentran la erisodina,  $\alpha$ -eritrodina y  $\beta$ -eritrodina, al no ser inactivados ejercen efectos indeseables a corto y largo plazo; sin embargo al realizar el método adecuado de eliminación de estos factores tóxicos es posible dejarlo libre de alcaloides. En el caso de los inhibidores de tripsina se reporta que parte de ellos presentan termoresistencia. De esta manera la semilla desengrasada y destoxificada es una alternativa de aprovechamiento de la torta residual de *Erythrina*, para que sea una propuesta para alimentación animal específicamente aves, sin embargo, este aprovechamiento no puede hacerse sin el previo desengrasado y destoxificación de las semillas y aún así, solo es recomendable para consumo animal **(Huerta, 2005)**.

### 3 OBJETIVOS

#### Objetivo general.

- Efectuar el desengrasado de la semilla de colorín para realizar posteriormente el proceso de destoxificación de la torta residual de semilla de colorín ***Erythrina americana***, mediante ensayo experimental a escala laboratorio, considerando aspectos nutrimentales y tóxicos, con el fin de valorar su implementación en alimentación animal.

#### Objetivos particulares.

- Documentarse bibliográficamente de la especie vegetal ***Erythrina americana*** y ubicar la distribución geográfica para la adquisición de semilla de colorín.
- Analizar el tipo de factores tóxicos naturales y contenido nutrimental asociado a la especie ***Erythrina americana*** seleccionada, mediante revisión bibliográfica y análisis bromatológico de la harina de la semilla de colorín, y efectuar el método de destoxificación previamente propuesto.
- Evaluar las variables y condiciones del proceso de destoxificación de acuerdo al seguimiento en el contenido de alcaloides, lectinas e inhibidores de tripsina de la torta residual.
- Determinar el contenido de proteína y el grado de destoxificación de la torta residual de la semilla de ***Erythrina americana*** mediante pruebas a nivel laboratorio para la propuesta en alimentación animal.

## 4 ANTECEDENTES

### 4.1 Problemas nutricionales en México.

La situación alimentaria en México, se ha convertido en un problema epidemiológico, caracterizado por un rápido incremento de la prevalencia e incidencia de sobrepeso y obesidad, así como las enfermedades crónicas no transmisibles relacionadas con la nutrición **(Rodríguez, 2011)**.

La nutrición de un país, es la resultante de aciertos y fracasos en la política social de desarrollo de un país, así mismo están involucrados otros factores: químicos, fisiológicos, antropológicos y psicológicos.

La adecuada nutrición en las distintas etapas de la vida de los individuos es uno de los principales determinantes de su salud, de su óptimo desempeño físico e intelectual, y por lo tanto, de sus bienestar (Figura 1).

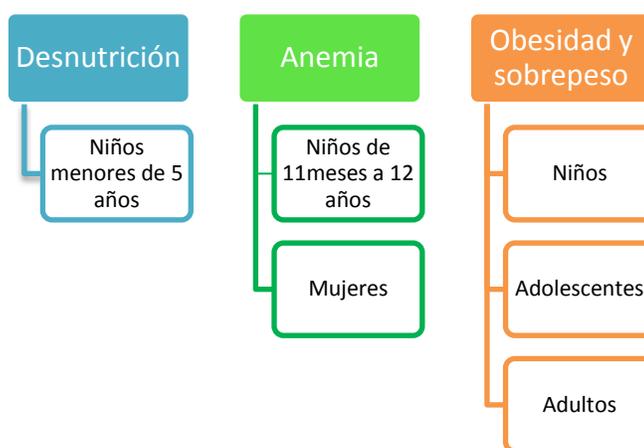


Figura 1. Principales Problemas de Nutrición en México

#### 4.1.1 Sobrepeso y obesidad

El sobrepeso, la obesidad y sus complicaciones son problemas de salud pública importante en el país; Estos factores han aumentado en todas las edades, y grupos socioeconómicos, lo que ha llevado a nuestro país a ocupar el segundo lugar en el mundo en obesidad en adultos y el primer lugar en obesidad infantil **(Secretaría de Salud, 2010)**.

El costo social de la obesidad es muy alto, los sistemas de salud del país, gastan cantidades de dinero cada vez mayor para dar atención a la población obesa. En México el gasto *per\_capita* del tratamiento de la obesidad es de 10 mil a 40 mil pesos anuales (Verduzco et. al, 2013).

#### **4.1.2 Desnutrición**

La desnutrición es un estado de deficiencia en el consumo o biodisponibilidad de energía y/o nutrimentos que repercute negativamente en la salud de quien la padece. La desnutrición es una enfermedad nutricional que prevalece en niños menores de cinco años.

Actualmente, se estimó que 302 279 (2.8%) menores de cinco años de edad presentan bajo peso, 1 467 757 (13.6%) baja talla y 171 982 (1.6%) emaciación, en todo el país.

En el contexto nacional se observa una clara y significativa disminución de las diferentes formas de desnutrición a lo largo de casi un cuarto de siglo de monitoreo de las encuestas de nutrición.

La desnutrición aguda incrementa el riesgo de infección y muerte, en especial entre los niños que no son alimentados al seno materno. La baja talla es reflejo de los efectos negativos acumulados a lo largo del tiempo (Escobar et. al, 2010).

#### **4.1.3 Anemia**

La anemia es todavía altamente prevalente en niños mexicanos, pese a los grandes esfuerzos realizados para disminuirla, como es la distribución de alimentos fortificados con micronutrientes para los niños, mujeres embarazadas y mujeres lactantes. Los preescolares son más propensos a sufrir anemia por diversas causas como son el incremento de requerimientos debido a un rápido crecimiento. La anemia tiene consecuencias graves sobre el desarrollo motor e intelectual de los niños, y si no se corrige antes de dos años, el daño es irreversible. En edades más tardías, la anemia, tiene repercusiones reversibles como baja resistencia a la infección y menor resistencia muscular. La principal causa de anemia es la deficiencia de hierro, sin embargo otras causas de anemia,

tales como las deficiencias de folatos, vitaminas A y B12 pueden verse involucradas.

A pesar de la reducción de la anemia en niños de 1 a 4 años en los últimos 13 años, ésta es aún preocupante. Es necesario concientizar a las comunidades social y médica acerca de ella, así como ampliar la distribución de suplementos de micronutrientes en niños menores de 3 años, además de promover la educación nutrimental e incentivar la ingesta de alimentos ricos en hierro.

La anemia por deficiencia de hierro es responsable de un mal desarrollo intelectual que resulta irreversible si no se trata antes de los dos años de edad. La anemia por deficiencia de hierro en México es la principal causa nutrimental de la anemia y se asocia con la pobre ingesta de tejidos animales, que son fuentes de hierro biodisponible y a la alta ingesta de maíz, con un alto contenido de fitatos que inhiben la absorción de hierro (**Salud, 2012**).

## 4.2 Disponibilidad y producción de alimentos en México.

Disponibilidad.

- Tendencias de las necesidades y de los suministros de energía. Se observa que los suministros de energía alimentaria (SEA) son superiores a las necesidades. Se considera que el problema alimentario de nuestro país no es de disponibilidad sino de acceso físico y económico.
  
- Tendencias de la disponibilidad alimentaria
  - *Cantidad*. En el periodo comprendido de 1998-2000 se observa, que la mayor disponibilidad estuvo dada por los cereales, frutas y hortalizas, lácteos y huevos. El comportamiento de dicha disponibilidad y su tendencia a través del tiempo, muestran ligeras fluctuaciones en la mayoría de los grupos de alimentos, con disposición ascendente en los primeros tres trienios, alcanzando la mayor disponibilidad en el trienio

1979-81 con excepción de los cereales y de las frutas y hortalizas que la consiguieron en el siguiente trienio, a partir de ahí, inició un ligero descenso. Los grupos que mostraron marcadas fluctuaciones ascendentes fueron las frutas y hortalizas, lácteos y huevos. Por su parte las leguminosas revelaron pequeña tendencia descendente.

- En energía. Al observar la tendencia del origen de la energía por grupos de alimentos presentado en trienios a lo largo de 35 años, se observó que los cereales, los edulcorantes y los aceites vegetales eran los que aportaban la mayor cantidad de energía, seguidos por las leguminosas, los productos de origen animal en conjunto incluyendo pescado mostraron tendencia ascendente a través del tiempo, así como las frutas y hortalizas. El trienio que registró los mayores aportes de la mayoría de los grupos de alimentos fue el 1984-86 (FAOSTAT, 2013).

### 4.3 Leguminosas

Las semillas maduras de las plantas de la familia **Fabacea** se utilizan en la alimentación humana bajo el nombre de legumbre o leguminosas. Las leguminosas se caracterizan por presentar vainas o legumbres como fruto y son el tercer grupo más abundantes de todas las angiospermas que se conocen. Las legumbres tienen un contenido relativamente alto en proteínas (Tabla 1). Son por lo tanto imprescindibles en lo que a aporte de éstas se refiere en los países en vías de desarrollo.

**Tabla 1. Composición química<sup>a</sup> de las legumbres (semillas maduras).**

<b>Nombre</b>	<b>Nombre sistemático</b>	<b>Proteína bruta (%)</b>	<b>Lípidos (%)</b>	<b>Hidratos de carbono digeribles (%)</b>	<b>Fibra dietética (%)</b>	<b>Minerales (%)</b>
<b>Soja</b>	Glycine max	39.0	19.6	7.6	16.6	5.5
<b>Cacahuete</b>	Arachis hypogaea	27.4	50.7	9.1	7.5	2.7
<b>Chícharo</b>	Pisum sativum	25.7	1.4	53.7	18.7	2.9
<b>Judía verde</b>	Phaseolus vulgaris	24.1	1.8	54.1	19.2	4.4
<b>Ayocote</b>	Phaseolus coccineus	23.1	2.1	n.a. <sup>b</sup>	n.a. <sup>b</sup>	3.9
<b>Judía mung</b>	Phaseolus mungo	26.9	1.6	46.3	n.a. <sup>b</sup>	3.6
<b>Mungo</b>	Phaseolus aureus	26.7	1.3	51.7	21.7	3.8
<b>Frijol de Lima</b>	Phaseolus lunatus	25.0	1.6	n.a. <sup>b</sup>	n.a. <sup>b</sup>	3.9
<b>Garbanzo</b>	Cicer arietinum	22.7	1.6	54.6	10.7	3.0
<b>Haba</b>	Vicia faba	26.7	2.3	n.a. <sup>b</sup>	n.a. <sup>b</sup>	3.6
<b>Lenteja</b>	Lens culinaris	26.6	1.6	57.6	11.9	3.6

<sup>a</sup>Valores medios (% pesos sobre sustancia seca).

<sup>b</sup>n.a. No analizado (Belitz, 1997).

La principal característica de las semillas es su elevado contenido de proteína, con valores que van según la especie de 17 a 40%, niveles aún mayores de hidratos de carbono y contenido variable de aceite, normalmente de 1 a 6% pero algunas semillas presentan contenidos más elevados como la soja o el cacahuete. Su

contenido de tiamina, riboflavina y niacina es también significativo, conteniendo además las otras vitaminas del complejo B, ácido ascórbico, vitamina K y tocoferoles. Su contenido de aminoácidos también varía con la especie, condiciones de cultivo, entre otros. Las proteínas de las leguminosas son ricas en los aminoácidos indispensables lisina, treonina, isoleucina, fenilalanina y valina; sin embargo, son deficientes en metionina y cisteína; aminoácidos azufrados (Tabla 2), por lo que su combinación con cereales resulta en una mezcla bien balanceada para la alimentación humana o animal.

**Tabla 2. Aminoácidos esenciales en leguminosas (g/16 g N)**

<b>Aminoácido</b>	<b>Soja</b>	<b>Haba</b>
<b>Cistina<sup>a</sup></b>	1.3	0.8
<b>Metionina</b>	1.3	0.7
<b>Lisina</b>	6.4	6.5
<b>Isoleucina</b>	4.5	4.0
<b>Leucina</b>	7.8	7.1
<b>Fenilalanina</b>	4.9	4.3
<b>Tirosina<sup>a</sup></b>	3.1	3.2
<b>Treonina</b>	3.9	3.4
<b>Triptofano</b>	1.3	n.a. <sup>b</sup>
<b>Valina</b>	4.8	4.4

<sup>a</sup>Semiesencial.

<sup>b</sup>n.a. No analizado (**Belitz, 1997**).

La mayoría de las leguminosas contienen compuestos tóxicos naturales (inhibidores de proteasas, lectinas, fitatos, entre otros) que en la mayoría de los casos deben eliminarse, por ejemplo por tratamiento térmico suficiente (**Belitz, 1997**).

### **4.3.1 Inhibidores de proteasas y de amilasas**

#### **4.3.1.1 Distribución y propiedades**

Los inhibidores de las hidrolasas son proteínas que forman complejos estequiométricos inactivos y se encuentran en microorganismos, plantas y animales. Además del grupo ampliamente investigado de los inhibidores de las proteasas, se conocen algunas proteínas con acción inhibidora frente a las amilasas.

La especificidad frente a las proteasas varía considerablemente. Algunos inhibidores inhiben sólo la tripsina y la quimotripsina y otros inhiben además proteasas de origen vegetal o microbiano, como por ejemplo la subtilisina o la papaína. Los inhibidores de las proteasas se localizan con frecuencia en las semillas de las plantas, aunque no se limitan a ellas. Están en cantidades especialmente elevadas en las semillas de las leguminosas (la soja 20 g/kg aprox., las judías blancas 3.6 g/kg aprox., los garbanzos 1.5 g/kg aprox., mungo 0.25 g/kg aprox.) y los granos de cereal (2 a 3 g/kg aprox.). El contenido de inhibidor depende mucho de la variedad de la planta, del grado de maduración y del tiempo de almacenamiento.

En muchos casos, en el material vegetal no existe sólo un inhibidor, sino una serie de ellos que se diferencian en su especificidad frente a las proteasas, en su actividad específica en su estabilidad térmica. Hasta ahora se han encontrado por ejemplo de 30 leguminosas con hasta 9 inhibidores que se han aislado en forma más o menos pura.

El material que contiene el inhibidor puede conducir a trastornos nutritivos. En el caso de ratas y gallinas alimentadas con harina de soya cruda se observó una hipertrofia del páncreas, que no obstante era reversible. La consecuencia del exceso de secreción de jugo pancreático es un aumento de la eliminación de nitrógeno con las heces. Además, aparecen trastornos del crecimiento que se suprimen con metionina, treonina y valina. De todo ello se deduce que cabe

atribuir el retraso en el crecimiento a una diferencia en determinados aminoácidos, que a su vez es consecuencia un balance de nitrógeno negativo.

Se han aislado inhibidores de la tripsina (una proteasa gástrica) a partir de la mayoría de las legumbres y granos, lo mismo que de otros alimentos como patatas, berenjenas y cebollas.

#### **4.3.1.2 Inactivación**

Existen muchos trabajos que se ocupan de la inactivación de los inhibidores de las proteasas en el transcurso del procesado de los alimentos. Por lo general los inhibidores son termolábiles, de manera que resultarán más o menos inactivados por tratamiento térmico, para lo que serán de gran importancia no sólo el material de partida, sino también parámetros del procesado (tiempo, temperatura, presión, contenido acuoso de la muestra). La disminución de la actividad del inhibidor se consigue también por remojo. Puede estar seguido de una etapa de tratamiento térmico adicional en condiciones suaves.

La eliminación selectiva del inhibidor de la tripsina origina una disminución del 40% del efecto hipertrofiante pancreático de las semillas originales crudas. Además la suplementación con ciertos aminoácidos elimina el efecto depresor sobre el crecimiento de la harina cruda pero no influye en la hipertrofia pancreática. Por tanto, la hipersecreción pancreática de proteínas ricas en aminoácidos que son marginales en la ración, se traduce en una deficiencia aminoacídica con la correspondiente detención del crecimiento (**Belitz, 1997**).

#### **4.3.2 Hemaglutininas (lectinas)**

Las lectinas son un grupo importante de proteínas y glucoproteínas que tienen la propiedad de ligar ciertos hidratos de carbono. Cuando estos hidratos de carbono forman parte de las paredes celulares las lectinas causan la aglutinación de las células que las contienen. Esta propiedad de aglutinar los glóbulos rojos que poseen las lectinas se utiliza como base para ensayos de tipificación sanguínea. Cuando las lectinas se unen a los hidratos de carbono de las células epiteliales

intestinales determinan una disminución de la absorción de nutrimentos del tracto digestivo.

Las lectinas están muy difundidas por la naturaleza. Los extractos de unas 800 especies vegetales y de numerosas especies animales presentan actividad aglutinante. Tienen un interés especial las lectinas de diversas leguminosas empleadas como alimento o como forraje. Se han encontrado lectinas en muchas leguminosas utilizadas como alimentos, como frijoles negros, semillas de soja, frijoles de Lima, frijol común, guisantes y lentejas.

Los mecanismos mediante los que las lectinas producen su efecto tóxico son también objetos de controversia. Está perfectamente demostrado que lectinas de diferentes orígenes presentes en el epitelio intestinal ligan nutrimentos disminuyendo de esta forma su absorción intestinal. El ineficiente empleo resultante de los nutrimentos explica por sí mismo el pobre crecimiento promovido por las raciones ricas en leguminosas crudas. Este efecto también aumenta las pérdidas de proteínas inducidas por la hipersecreción pancreática debida a los inhibidores de la tripsina que también forma parte de las leguminosas. No obstante, la flora del intestino desempeña igualmente cierto papel en la toxicidad inducida por las legumbres (y las lectinas). Animales libres de gérmenes (esto es, libres de bacterias intestinales) empleados como animales experimentales presentaron una menor detención del crecimiento cuando se alimentaron con legumbres crudas o lectinas aisladas de los alimentos convencionales; estas observaciones han llevado a ciertos investigadores a sugerir que las lectinas pueden dañar el sistema defensivo del organismo contra las infecciones bacterianas, lo que da lugar a frecuentes y crecientes invasiones de las bacterias intestinales y de otra dependencia (**Shibamoto et. al, 1996**).

#### **4.3.3 Alcaloides.**

Sustancia que forma parte de un grupo químico (aminas) de principios básicos o alcalinos de origen vegetal, que forman sales con los ácidos, por esta propiedad muchos compuestos que contienen grupos aminos se usan como fármacos y se

administran como sales ya que son solubles en aguas, a diferencia de las aminas **(Fessenden, 1982)**.

Estas sustancias pueden ser enérgicos tóxicos o pueden emplearse en medicina, aunque pueden ser nocivas o tóxicas si se consume en dosis altas, el uso abusivo de ellos originan lesiones del sistema nervioso, permanente parálisis de ciertos nervios y hasta la muerte **(Graham, 1980)**.

Los alcaloides de acuerdo a su estructura molecular y ruta de biosíntesis pueden dividirse en:

- ❖ Alcaloides verdaderos. Se definen como aquellos compuestos que tienen nitrógeno fijado heterocíclicamente, tienen naturaleza básica, se encuentran normalmente como sales y proceden de aminoácidos.
- ❖ Protoalcaloides. Son aminas aromáticas, su nitrógeno es extracíclico, de carácter básico, pero pueden ser productos secundarios de los alcaloides verdaderos (como la colchicina).
- ❖ Pseudoalcaloides. Poseen todas las características de los alcaloides, salvo que se forman por posterior incorporación del nitrógeno en compuestos libres de este elemento; aquí se incluyen todos los alcaloides terpénicos, inclusive los alcaloides esteroídicos.
- ❖ Alcaloides imperfectos. Son derivados de bases púricas, no precipitan con los reactivos específicos para alcaloides **(McMurry, 2010)**.

Como ya se menciona, los alcaloides provienen de origen vegetal, el cual tienen cierta función estas sustancias presentes en plantas como:

- ❖ Son productos nitrogenados de excreción de plantas.
- ❖ Actúan como reserva de nitrógeno, pero hay poca evidencia de que sean utilizadas en condiciones de deficiencia de éste.
- ❖ Actúan como reguladores del crecimiento en particular como inhibidores de la germinación.
- ❖ Actúan como sustancias protectoras, evitando ataques de animales o insectos.

- ❖ Ayudan a mantener un balance iónico en virtud de su poder quelante (Moreno, 2001).

#### 4.4 Generalidades de *Erythrina americana*.

El género *Erythrina* pertenece a la familia **Fabacea** y a la subfamilia Papilionoidas. El nombre alude al color prevaeciente de las flores y deriva del griego *ερυθρός* (*erythros*) = rojo. Se le designa también



**Figura 2. Inflorescencia característica del género *Erythrina* (Pérez et. al, 2005 ).**

como “árbol de coral” debido a su color

característico. El género está dividido en 5 subgéneros y 26 secciones con base en las características de sus flores e inflorescencias (Figura 2). Son cerca de 115 especies de éste género, comprendiendo un amplio rango de variaciones morfológicas y diversidad ecológica.

Estas plantas se encuentran distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo además en las zonas templadas de nuestro planeta. Las especies de *Erythrina* se ubican también en algunas zonas no tropicales como en África del sur, al sur de Estados Unidos y en las montañas del Himalaya. *E. americana* es nativa de América tropical, mientras *E. coralloides* es nativa de México (Figura 3) (Fraile Ma. et. al, 2008).

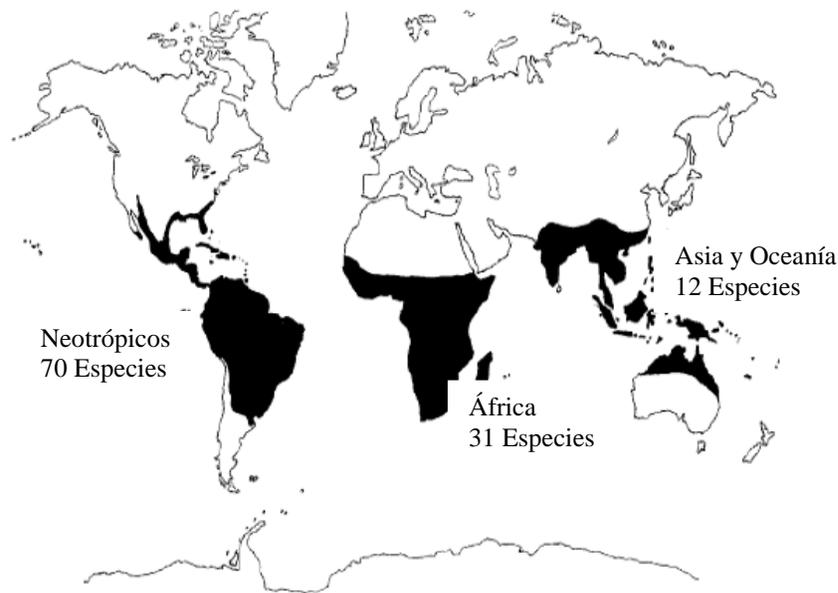


Figura 3. Distribución mundial del género *Erythrina* . (Neill, 1988)

***Erythrina americana*** también conocida como colorín, zompantle, patol, cáscara de chomplantle, chocolín, colorín grande, equimite, pichoco, piñón espinoso, quimite; al igual que se le conoce por sus otros diez sinónimos taxonómicos que enseguida mencionaremos algunos:

- ***Corallodendron americanum*** (Mill.) Kuntze
- ***Erythrina carnea*** Aiton
- ***Erythrina coralloides*** DC.
- ***Erythrina enneandra*** DC.
- ***Erythrina fulgens*** Lois. (Krukoff et. al,1974).

Es un árbol perenne que alcanza un tamaño de 3 a 6 metros de alto, su tallo es amarillento e irregular; copa de ramas abundantes corteza lisa y estaca café; sus hojas son grandes, trifoliadas, con tres puntas, foliolos rómbico-ovalados de 7 a 22 cm de largo y ancho, y con espinas. Su follaje es frondoso y verde claro; en ocasiones se ven ejemplares únicamente con flores, las cuales son de color rojo,

alargadas y distribuidas en racimos piramidales. Su fruto es una legumbre de aproximadamente 20 cm de largo y 2.0 cm de ancho, con estrangulamiento que limita los lóculos donde se alojan las semillas, que son de color rojo vivo, escarlata o naranja (Figura 4). Su floración y fructificación se da de marzo a abril (**Ibarra et. al, 2011**).

***E. americana*** puede ser encontrada en el centro de México (Veracruz, Hidalgo, Estado de México, Morelos, Guerrero, Puebla, Michoacán y Oaxaca) ya que se cultiva en terrenos tropicales medianamente fértiles (**Pérez et. al, 2005**).



**Figura 4. Forma botánica de *Erythrina americana* a. árbol, b. Ejote con semilla madura, c. Flor y d. Semilla madura. (Anónimo, 2012).**

#### **4.4.1 Usos de *Erythrina americana***

En el siglo XVI, el Códice Florentino le atribuye únicamente valor estético. En el mismo siglo, Francisco Hernández de Toledo comenta: "el jugo exprimido de la flor e instilado en la boca de los infantes les produce sueño".

Hasta el siglo XX no se vuelve a registrar más información sobre esta planta, cuando Maximino Martínez señala los usos siguientes: como antídoto, antiinflamatorio, narcótico, contra corea y dermatosis, además de que produce parálisis.

Su uso más popular en los estados de Guerrero, Michoacán, Morelos y Puebla, es para aliviar el dolor de muelas. Se hierva un trozo de la corteza y se aplica en forma de vaporizaciones en la mejilla, o se aplica dos o tres veces la semilla molida, sola o con sebo.

Cuando hay hemorragia vaginal, a la decocción de la corteza se le agrega un trozo de raíz de raspa y se bebe como agua de tiempo.

La cocción de la corteza, junto con las raíces, hojas y flores de otras plantas, se administra vía oral contra el insomnio o la infusión de las ramas se utiliza para bañar a los niños y se tenga un sueño tranquilo.

Todo esto se debe ya que las hojas, corteza, semillas y flores son frecuentemente reportadas por tener efecto sedativo, debido a la presencia de alcaloides que contiene **(Brito, 2006)**.

También se utiliza para cercos vivos, en sistemas agroforestales como sombra para cultivos perennes, fijadora de nitrógeno, tutores vivos de vainilla y pimienta, o como especie ornamental, con la madera se elaboran herramientas, sillas, o con la infusión se tiñen los fustes de las sillas de montar. Así como con las semillas se hacen collares que se utilizan como amuletos para la buena suerte o quemadas para matar cucarachas.

Así como las flores son muy apreciadas en guisados ya sean hervidas o capeadas en salsa; además pueden ser usadas como abono verde y para alimentación animal **(Ibarra et. al, 2011)**.

#### 4.4.2 Toxicidad

Se conoce que esta especie tiene acciones tóxicas, producidas por la presencia de una serie de compuestos tóxicos, en toda la planta y, principalmente en las semillas y luego en la corteza y las hojas. Los principales síntomas tóxicos que se han reportado por el consumo de esta planta son la paralización de los músculos esqueléticos, inhibición en la transmisión de los impulsos nerviosos, dilatación de la pupila, trastornos visuales, hipotensión arterial y parálisis respiratoria.

El árbol de *Erythrina americana* ha sido una de las plantas más estudiadas debido a su alto contenido de alcaloides en las semillas y su actividad farmacológica, ya que en investigaciones y análisis químicos de las inflorescencias del colorín mostraron presencia de 8 alcaloides, los más abundantes, no solo en la inflorescencia sino en las distintas partes de la planta, el cual son alfa y beta eritroidina y pequeñas cantidades de erisodina, erisovina y erisopina, compuestos que si se absorben por vía oral e intravenosa, poseen la propiedad de paralizar los nervios motores debido a su acción narcótica como relajante muscular y en el sistema nervioso central como sedante **(Damdaran, 1988)**.

En 1934, se reporta un porcentaje de alcaloide en semilla de *Erythrina americana* de 1.498 y veinticuatro años después se encontró 1.63% de alcaloides en semillas de esta leguminosa, ambas determinaciones realizadas por gravimetría.

En 1994 se cuantificó alcaloides en la semilla de esta planta por titulación y se encontró 1.243% de alcaloides; así como en 1996, por cromatografía de gases se determinó la concentración de alcaloides en flores, vaina inmadura y madura, tanto a las semillas como a la vaina. Se encontró que las flores tenían 1.10% de alcaloides, entre los cuales se encontraban el N-óxido de eritristemina,  $\alpha$  y  $\beta$ -eritroidina, y en la semilla de la vaina madura se encontró 1.05% de alcaloides **(García-Mateos, 1997)**.

A través de los años, se han dedicado a estudiar con mayor exactitud e interés los alcaloides contenidos en el Colorín el cual nos indican que alcaloides se

encuentran, y dependiendo del estado de maduración de la leguminosa, el tipo y concentración de alcaloides de modifican.

Las acciones tóxicas que ejerce esta planta se deben principalmente a los alcaloides presentes en ella.

Un alcaloide aislado de la semilla tiene la propiedad de paralizar los nervios motores, efecto que se obtiene por vía intravenosa y es poco marcado por vía estomacal, y un alcaloide aislado del tallo, ejerce una acción narcótica. Este principio activo existe también en la corteza y en menor proporción en las flores.

Los efectos del alcaloide de las hojas verdes de esta planta resultaron similares a los de la d-tubocurarina (curare); es por eso que se presentaron en algunos individuos tetanización y semiparálisis bajo los efectos del alcaloide y una sobredosis de éste, producirá una parálisis muscular afectando primero a los músculos más finos como son: los músculos periorbitales y por último a los músculos respiratorios (como el diafragma) provocando muerte por asfixia (**Álvarez, 2009**), como se mencionó anteriormente, los alcaloides identificados en flores, vaina inmadura y madura, tanto a las semillas son N-óxido de eritristenmina,  $\alpha$  y  $\beta$ -eritroidina.

## 5 METODOLOGÍA.

### 5.1 Diagrama de flujo

A continuación se mostrará el diagrama de flujo, en el cual se muestra como se realizó éste trabajo experimental. (Figura 5).

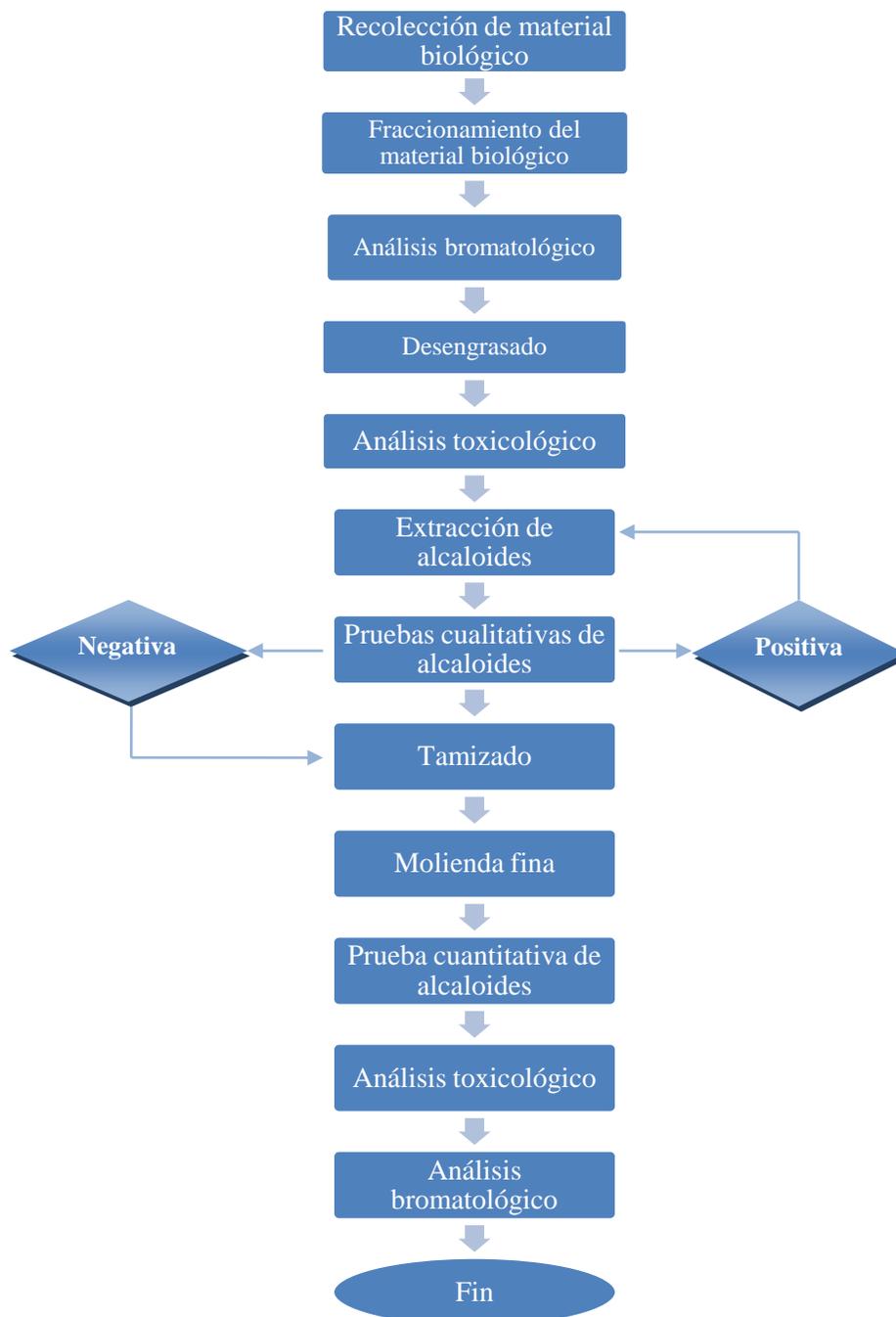


Figura 5. Diagrama flujo del trabajo experimental.

## **5.2 Material biológico.**

Se obtuvo mediante recolección (5 años) la cantidad suficiente de *Erythrina americana*, su periodo cubre los meses de Julio-Octubre, se toma en consideración que no es un árbol ampliamente distribuido y se ha visto que en el campo de ciudad universitaria hay una gran cantidad de este tipo de árboles por lo cual buena parte de la recolección se realizó en este lugar.

## **5.3 Fraccionamiento.**

Las semillas de Colorín tienen un tegumento o epispermo duro e impermeable por lo cual es necesario fragmentar el grano para así facilitar la extracción de la grasa y de los alcaloides (destoxificación) con el disolvente apropiado para cada uno.

### **Material.**

- Molino Thomas Wiley Modelo 4
- Malla de diámetro 4 mm
- Vaso contenedor
- Balanza granataria

### **Procedimiento.**

Se realizó un fraccionamiento, con el Molino Thomas Wiley Modelo 4 utilizando una malla de diámetro 4 mm. Se recolectó el material fragmentado en un recipiente, se pesó y se etiquetó adecuadamente.

## **5.4 Análisis bromatológico.**

El análisis proximal o bromatológico fue desarrollado por Weende hace más de 100 años, en este tipo de análisis se determinan los componentes principales de los alimentos como humedad, proteína, grasa, cenizas, fibra e hidratos de carbono. Los resultados de este análisis son de suma importancia ya que son una guía hacia donde dirigir un estudio posterior. En el presente trabajo se realizó el análisis proximal siguiendo las técnicas descritas y aprobadas por la AOAC, con ligeras modificaciones.

### 5.4.1 Humedad.

**Fundamento.** Determinación de la pérdida de peso de la muestra por evaporación del agua.

#### Material

- Estufa al vacío Lab-line Inc.
- 3 charolas aluminio
- Balanza analítica Sartorius Analytic Extend
- Desecador
- Pinzas

#### Procedimiento

Se pesó de 4 a 5 g de muestra en una charola (previamente pesada después de tenerlo a peso constante). Se secó la muestra por 3 horas en la estufa conectada a vacío una temperatura de 80°C máximo. Se retiró de la estufa usando las pinzas, se tapó, se dejó enfriar en desecador y se pesó tan pronto como se equilibre con la temperatura ambiente. Se repitió la operación hasta peso constante y por triplicado (**Horwitz, 2006**).

#### Cálculos

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

Donde:

P<sub>i</sub> = peso en gramos de la charola con muestra antes de secada

P<sub>f</sub> = peso en gramos de la charola con muestra después de secada

m = peso en gramos de muestra

### 5.4.2 Cenizas

**Fundamento.** Se basa en la descomposición de la materia orgánica por calcinación e incineración quedando solamente materia inorgánica en la muestra.

En este método toda la materia orgánica se oxida en ausencia de flama a una temperatura que fluctúa entre los 500 a 550 °C; el material inorgánico que no se volatiliza a esta temperatura se conoce como ceniza.

### Material

- Mufla THERMOLYNE, mod. 1550
- Mechero Bunsen
- 3 Crisoles de porcelana.
- Desecador de vidrio
- Balanza analítica Sartorius Analytic Extend
- Pinzas para crisol

### Procedimiento

Los crisoles deben ponerse a peso constante, para lo cual se colocaron en la mufla a una temperatura de 550°C, se marcaron con lápiz o cualquier sustancia que no se elimine en el proceso de incineración. Se colocaron de 2 a 3 g de muestra en el crisol y se carbonizó a la flama del mechero y bajo una campana de extracción; cuando ya no haya desprendimiento de humo, se introduce el crisol a la mufla, la cual debe estar a una temperatura de 550°C. El tiempo de permanencia es muy variable y depende del material que se esté trabajando; en cuanto se obtiene a peso constante el crisol con cenizas indica el punto final de esta determinación (**Horwitz, 2006**).

### Cálculos

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

Donde:

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

Po = peso en gramos del crisol a peso constante

m = peso en gramos de la muestra

### **5.4.3 Grasa cruda**

**Fundamento.** Los lípidos se definen como un grupo heterogéneo de compuestos que son insolubles en agua pero solubles en disolventes orgánicos tales como éter etílico, éter de petróleo y hexano, el cual al ponerse en contacto con el alimento, solubiliza la grasa y la arrastra consigo para su posterior cuantificación. El método de Goldfish es una extracción continua con un disolvente orgánico. Éste se calienta, volatiliza para posteriormente condensarse sobre la muestra. El disolvente gotea continuamente a través de la muestra para extraer la grasa.

#### **Material/Reactivos**

- Aparato de extracción Goldfish Labconco Modelo 35001
- Cartuchos de celulosa de 22x80 mm
- Vasos de borde esmerilado para equipo Goldfish
- Estufa de vacío Lab-line Inc.
- Balanza analítica Sartorius Analytic Extend
- Desecador
- Éter de petróleo grado analítico Merck 1017-69.

#### **Procedimiento**

Se colocó un vaso Goldfish en la estufa hasta peso constante.

Se pesó de 4 a 5 g de muestra seca sobre un papel se enrolló y se colocó en un cartucho de celulosa. Se situó el cartucho en un tubo con el fondo perforado y se colocó en el sostenedor del equipo.

Se adicionó en el vaso Goldfish aproximadamente 40 mL del disolvente (éter de petróleo) y se colocó en el equipo mediante un anillo de hierro con empaque de hule y corcho. Se subió la parrilla girando hacia un lado y al contrario. Se calentó hasta la extracción completa de la grasa. Para verificar que se ha extraído toda la grasa, se dejó caer una gota de la descarga sobre papel filtro, al evaporarse el disolvente no debe dejar residuo de grasa.

Al finalizar, se cambió el tubo con el cartucho en el sostenedor por un tubo sin perforación y se calentó de nuevo para recuperar el disolvente del vaso.

Se quitó el vaso del equipo y se seco el extracto en una estufa al vacío hasta que se obtuvo peso constante (**Horwitz, 2006**).

#### **Cálculos.**

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

Donde:

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

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

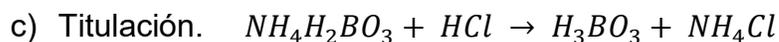
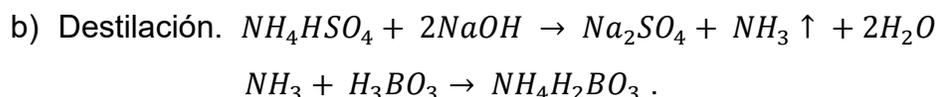
m = peso en gramos de la muestra.

#### **5.4.4 Proteína**

**Fundamento.** El método se basa en la determinación de la cantidad de Nitrógeno contenido en productos alimentarios, compromete tres pasos consecutivos:

- a. La descomposición de la materia orgánica bajo calentamiento en presencia de ácido sulfúrico concentrado.
- b. El registro de la cantidad de amoníaco obtenida de la muestra.
- c. La valoración del borato de amonio con ácido clorhídrico

El método de Kjeldahl consta de las siguientes etapas:



El método Kjeldahl determina la materia nitrogenada total, que incluye tanto el nitrógeno proteínico y no proteínico.

Para convertir el nitrógeno a proteína se emplea el factor de 6.25 el cual proviene de la consideración de que la mayoría de las proteínas tiene una cantidad aproximada de 16% de nitrógeno.

$$factor = \frac{100g \text{ prote na}}{16g \text{ Nitrógeno}} = 6.25$$

#### **Material/Reactivo.**

- Digestor TECATOR mod. Ab-20/40
- Dispositivo de destilación TECATOR, Kjeltex Auto 1030 Analyzer
- Tubos de digestión Tecator de 100 mL.
- Mezcla digestiva (a)
- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Sulfato de potasio
- Solución de NaOH al 40% (m/v)
- Solución de ácido bórico con indicadores (b)
  - Verde de bromocresol al 0.1% en metanol
  - Rojo de metilo al 0.1% en metanol
- Solución de HCl 0.01N valorada.

**(a)** Se disolvió 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 haya estado bien disuelto, se agregó 50 mL de ácido ortofosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ); a continuación se adicionó con precaución 430 mL de ácido sulfúrico concentrado resbalando por la pared del recipiente. Se agitó aproximadamente 30 minutos.

**(b)** Se peso 10 g de ácido bórico y se colocaron en un matraz aforado de 1L; se adicionó agua y se agitó hasta disolverlo, a continuación se adicionó 10 mL de indicador de verde de bromocresol al 0.1% en metanol (199 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 ajustó el color a un tono café rojizo con ácido o álcali según se requiera y se aforó a 1L con agua destilada.

**Ajustar.** 25 mL de ácido bórico con indicadores + 100 mL de agua. La solución da un tono gris, si persiste el color inicial, se ajustó con NaOH 0.1N hasta que se obtuvo un color gris. Se calculó la cantidad del álcali necesario para ajustar el ácido bórico. (regresar la solución al matraz antes de aforar).

$$mL NaOH 0.1N = mL titulo \times 40$$

Nota. Si se pesa bien, no es necesario ajustar.

## **Procedimiento**

### ➤ **Digestión de la muestra**

Se pesó de 10 a 100 mg de muestra de acuerdo al contenido de nitrógeno aproximado y se colocó en el tubo de digestión, se agregó 0.5 g de sulfato de sodio o potasio y 3 mL de mezcla digestiva, se colocó el tubo en el digestor durante 15 minutos a una temperatura de 345°C. Se retiraron los tubos del digestor y se dejaron que se enfriaran y se le adicionó 1.5 mL de peróxido de hidrógeno al 30% y se colocaron en el digestor el cual estaba a una temperatura de 370°C. Se consideró que la digestión esta realizada, cuando el tubo no mostro manchas ni puntos negros y además la mezcla de digestión es translúcida con un ligero tono verde-azulado.

### ➤ **Destilación**

Se comprobó el nivel de los tanques de reactivos (ácido bórico, NaOH al 40% y agua destilada), en caso necesario se rellenaron. Se revisó que las mangueras del drenaje no estén obstruidas.

Se enciendo el equipo y en la pantalla apareció la palabra "Help", se verifico que la puerta lateral estaba cerrada. Se verificó que el primer botón está en posición Kjeldahl y que los números de un lado de la pantalla estuvieran programados así:

A	B	Blank
0000	1215	00

La bureta debe estar llena y libre de burbujas. En caso de ser necesario se eliminó las burbujas como se describe en la sección VII-15 del manual de operación. VER ANEXO.

Se presiono 4 a 5 veces el botón “Rec Sol” para llenar la tubería con ácido bórico y se desplazo el ácido que se había quedado. Este reactivo debe salir rojo.

Se abrió la llave del agua que está en la tubería. Se colocó un tubo sin muestra en el sitio correspondiente y se cerró la puerta de seguridad. Se subió el botón STEAM a la posición “On”. Se espero hasta que el vapor sea generado. Se dejo que se destilara (descargue) dos veces, en seguida se abrió la puerta, se bajo el botón STEAM a la posición “off” y se retiró el tubo.

Se llevó el botón AUTO/RESET a la posición AUTO y se soltó. En la pantalla apareció “0.000”.

Se agregó a los tubos con muestra 25 mL de agua destilada

Se colocó un tubo (blancos primero, después un control interno de caseína y al final las muestras) en posición correcta asegurándose de que la “boca” del tubo entre en el sello, el foco de CYCLE OVER debe estar prendido sin parpadear antes de que se cerrará la puerta.

Se cerró la puerta, la destilación y titulación se llevó a cabo automáticamente. Al terminar se anotó el volumen gastado de HCl que apareció en la pantalla.

Se abrió la puerta y se cambió el tubo.

Después del último tubo con muestra, se introdujo un tubo con agua y se destilo, se sacó el tubo, se apagó el equipo y se lleno el vaso de titulación con agua destilada.

Se limpió el compartimiento de destilación con trapo húmedo. La charola inferior se puede retirar para que se enjuague con agua, se dejó el equipo limpio.

Se cerró la llave del agua, se cerró la puerta.

ANEXO.

Eliminación burbujas de la bureta.

La pantalla debe de decir HELP, se abrió la puerta y se presiono el botón "Titrant" hacia arriba hasta que el pistón se haya movido entre 5 o 6cm. Se cerró la puerta y se presiono el botón "Tritan" hacia abajo hasta que el pistón se detuviera. El aire entró en la bureta y se deshicieron las burbujas.

Se presionó "Tritan" hacia arriba hasta que el ácido empezó a fluir en el vaso de titulación.

Se abrió la puerta y se presiono "Titrant" hacia arriba hasta que el pistón se detuvo. Después se presiono el botón "Tritan" hacia abajo y se verificó que al llenarse la bureta no entraran burbujas a la bureta.

Nota: las pequeñas burbujas adheridas al pistón de teflón no afectan a la determinación.

## Cálculos

Para realizar los cálculos es conveniente correr un blanco, donde se substituye la muestra por el equivalente en peso de glucosa o sacarosa, tratándose en la misma forma que las muestras (**Horwitz, 2006**).

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

$$\%Prote na = \%N * F$$

Dónde

P = mL de la titulación de la muestra.

B = mL de la titulación del blanco

N = normalidad de la solución HCl

meq = miliequivalentes del Nitrógeno (0,014)

F = factor de conversión (6.25) éste factor se debe aclarar que este depende de cada tipo de muestra.

#### **5.4.5 Fibra cruda**

**Fundamento.** Fibra cruda es la pérdida por ignición de residuo seco que queda después de la digestión de la muestra con soluciones de ácido sulfúrico 1.25% (m/v) y hidróxido de sodio 1.25% (m/v) bajo condiciones específicas. El método es aplicable al material libre de grasa para así obtener un residuo funcional.

#### **Material/Reactivo**

- Vaso Berzelius 600 mL KIMAX.
- Aparato de digestión LABCONCO.
- Estufa de vacío Lab-line Inc.
- Mufla Thermolyne 1500
- Crisoles.
- Embudos buchner california
- Desecador
- Balanza analítica Sartorius Analytic Extend
- Perlas de vidrio
- Solución  $H_2SO_4$  al 1.25% (m/v)
- Solución NaOH al 1.25% (m/v)
- Antiespumante (emulsión SIGMA-B)
- Alcohol etílico grado técnico
- Silicato de aluminio

#### **Procedimiento**

En un vaso Berzelius que contenga 0.5 g de Silicato de aluminio (limpio y calcinado) y unas perlas de vidrio se agregó la muestra que previamente se le

determino humedad y contenido de grasa. A continuación se adicionó 200 mL de  $H_2SO_4$  al 1.25% hirviendo, y unas gotas de antiespumante y se colocó inmediatamente en el aparato de digestión Labconco, el cual debe estar previamente caliente, se digirió por 30 minutos exactos. Después de dicho periodo se vació el contenido sobre un embudo buchner california y se realizó la filtración con ayuda de vacío; se lavó el residuo con agua destilada caliente, hasta eliminar el ácido (aproximadamente 500 mL). Una vez lavado el residuo se transfirió nuevamente al vaso Berzelius y se adiciono unas gotas de antiespumante y 200 mL NaOH 1.25% hirviendo y se colocó inmediatamente en el aparato de digestión por exactamente 30 minutos. Transcurrido el tiempo se filtro en el mismo embudo buchner california y se lavó el residuo con agua caliente (aprox. 500 mL), hasta que se eliminó el álcali y se quito las perlas de vidrio lavándolas con agua para recuperar material adherido. Por último se adicionó al residuo 25 mL de alcohol etílico.

El residuo se transfirió de forma cuantitativa en un crisol (a peso constante). Se colocó en la estufa de vacío para su secado (aprox. 4 a 8 horas) y después se pesó. A continuación se carbonizó y se introdujo en la mufla para su incineración, para después de dicha operación volver a pesar el crisol previamente enfriado en un desecador (**Horwitz, 2006**).

### **Cálculos**

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

Donde:

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

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

$m$  = peso en gramos de la muestra seca.

#### 5.4.6 Hidratos de carbono asimilables

**Fundamento.** Se obtiene por diferencia con los datos obtenidos de los parámetros anteriores.

#### Cálculos

$$\%HC = 100 - (\%Humedad + \%Cenizas + \%Grasa + \%Proteína cruda + \%Fibra cruda)$$

#### 5.5 Desengrasado

**Fundamento.** Es una extracción semicontinua con un disolvente orgánico. En este método el disolvente se calienta, se volatiliza y condensa goteando sobre la muestra la cual queda sumergida en el disolvente. Posteriormente éste es sifoneado al matraz de calentamiento para empezar de nuevo el proceso. El contenido de grasa se cuantifica por diferencia de peso entre el matraz contenido el extracto lipídico y el matraz a peso constante.

#### Material/Reactivos.

- Equipo de extracción tipo Soxhlet
  - Capacidad  $2.0 \pm 0.100$  kg
  - Temperatura  $60 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Balanza granataria.
- Matraz bola 3 L
- Refrigerante
- Bomba de recirculación Little Grant pump Modelo 1.
- Baño de agua-hielo
- Rotavapor Buchi 461 modelo RE-111
- Tanque de Nitrógeno
- Hexano

## **Procedimiento**

### **Extracción de la grasa**

Se colocó a peso constante un matraz bola con perlas o piedras de ebullición.

Se pesó aproximadamente  $2.0 \pm 0.1$  kg de semilla fraccionada de colorín y se colocó en bolsas hechas con manta de apertura de 0.5 mm, se colocaron estas bolsas en el dispositivo tipo Soxhlet (extractor).

Se colocó el matraz al extractor y posteriormente se conecta éste al refrigerante. Se agregó hexano como disolvente por el refrigerante y se calentó el matraz con parrilla a ebullición suave (Fig. 6). Para verificar que se ha extraído toda la grasa, se dejó caer una gota de la descarga sobre papel filtro, se evaporó el disolvente y se observó si dejó o no residuo de grasa.

Una vez que se extrajo toda la grasa, se quitó la bolsa de tela con la muestra desengrasada, y se eliminó el disolvente como se explica a continuación (**Horwitz, 2006**).

### **Recuperación de disolvente y obtención de la grasa**

Toda la grasa con disolvente obtenida en las extracciones se mezcló de forma homogénea. El disolvente se recuperó con un rotavapor a presión reducida a  $60^{\circ}\text{C}/500$  mm Hg, obteniendo la grasa cruda. A la grasa se le insufló nitrógeno para eliminar la mayor cantidad de aire y evitar la presencia de oxígeno que pudiese provocar reacciones de oxidación en los lípidos; además se almacenó a temperatura de congelación ( $-15^{\circ}\text{C}$ ) para evitar su degradación.

Por otro lado la semilla fraccionada y desengrasada se colocó en charolas de aluminio para eliminar en su totalidad las trazas de disolvente, para posteriormente ser destoxificada (harina desengrasada).



**Figura 6. Equipo utilizado para la extracción de grasa**

## Cálculos

Para evaluar la correcta extracción y comparar las diferentes extracciones de cada lote, se calculó su porcentaje de extracción de grasa. Para ello el matraz de bola de 3L se pesa antes y después de la extracción, una vez recuperado el disolvente en un rotavapor a presión reducida solo por diferencia de peso se obtiene la grasa extraída.

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

Donde:

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

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

m = peso en gramos de la muestra.

## 5.6 Toxicología analítica

### 5.6.1 Fitohemaglutininas

**Fundamento.** Se basa en la capacidad de aglutinar los eritrocitos por efecto de la cantidad de hemaglutininas presentes. Consiste en hacer diluciones seriadas de las cuales se determina el punto final de la aglutinación de los glóbulos rojos de hámster lavado y sensibilizado con solución de proteasa para mejorar la sensibilidad; se realiza mediante el método de microtitulación que es rápido y requiere una mínima cantidad de muestra.

#### **Material/Reactivo.**

- Solución anticoagulante (a)
- Solución salina al 1% preparada con agua desionizada
- Solución salina al 0.9% preparada con agua desionizada.
- Sangre de Hámster desfibrinada y lavada.

- Solución de lectina de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) faseolotoxina PFA-P, SIGMA L-8754 PHT. (b)
- Proteasa 0.2% en solución salina al 0.9% (SIGMA P-5147)
- Extracto de frijol peruano (muestra de referencia).

(a) Solución de Heparina (5000 UI/mL):

Relación: Sangre : Unidades Internacionales (UI) (15 a 20 UI : 1 mL de sangre).

(b) Pesar con la mayor exactitud posible 1 mg de faseolotoxina y pasarla a un matraz aforado de 10 mL; a continuación aforar con solución isotónica (0.9%). De esta solución (0.1 mg/mL) 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 (L).

- Balanza analítica Sartorius Analytic Extend
- Agitador magnético múltiple Wise Stir
- Centrifuga International Clinical Centrifuge
- Incubadora Gravity convection incubator Model 2EG
- Espectrofotómetro COLEMAN Model 6/20A
- Tubos de centrifuga de 15 mL con graduación.
- Jeringa de 5 o 10 mL calibre 22
- Microtiter kit (Cook Eng-Alexander Virginia USA).
- Matraz Erlenmeyer de 25, 125 y 250 mL.
- Probeta de 100 mL
- Embudo de filtración de talle corto.
- Filtros de vidrio de poro grueso.
- Gasa.

## Procedimiento

### ➤ **Preparación del extracto**

Se molió finamente la muestra vegetal (con un contenido <5% de grasa), se suspendió 0.1g de material en 10 mL de solución salina al 1%, y se efectuó la extracción con agitación mecánica durante 2 horas a 300 rpm a temperatura ambiente. Después del tiempo indicado se centrifugó el extracto a 3000 rpm., durante 10 minutos para eliminar el residuo insoluble; se filtró el sobrenadante a través de un filtro de vidrio de poro grueso y de ser necesario se puede lavar el residuo con más solución salina al 1%, y se llevó finalmente con un matraz volumétrico el extracto filtrado a un volumen de 10 mL.

### ➤ **Preparación de la sangre**

En un matraz de 25 mL con heparina (0.1 mL de heparina de 5000 UI/ para 5 mL de sangre) se colocó de 30 a 50 gotas de sangre de Hámster Sirio (técnica realizada por punción ocular) se agitó suavemente el matraz para la completa homogeneización de la sangre con la solución anticoagulante.

Se trasvasó la sangre con anticoagulante a tubos de centrifuga para lavarla (3 veces) con solución salina al 0.9% a 1500 rpm por 15 min, se decantó el líquido sobrenadante.

Al terminar el tercer lavado se diluyó el paquete de eritrocitos al 4% es decir por cada mL de eritrocitos (paquete), se adicionó 24 mL de solución salina 0.9%, en caso de la presencia de coágulos se filtra a través de una gasa.

### ➤ **Sensibilización de los glóbulos rojos**

A cada 10 mL de suspensión de glóbulos rojos al 4%, se agregó 1 mL de solución de proteasa (SIGMA P-5147) al 0.2% y se colocó en incubadora por espacio de 1 hora a  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Transcurrido el tiempo, se centrifugó para eliminar la enzima sobrenadante y se efectuó 3 lavados con solución salina 0.9% a 1500 rpm por 15 min, se decantó el líquido sobrenadante.

Después del último lavado se midió el paquete de eritrocitos y se resuspendió al 4% por lo que por cada mL de paquete se añade 24 mL de solución salina 0.9%, se colocó la suspensión en un matraz Erlenmeyer de 125 mL previamente se efectuó una filtración con gasa.

➤ **Ajuste de a suspensión de glóbulos rojos.**

Se ajustó el espectrofotómetro COLEMAN al 100% de T con solución salina al 0.9%, a una longitud de onda de 620 nm, en el ajuste de la suspensión de eritrocitos se tomaron 0.5 mL con pipeta volumétrica, se colocaron en una celda y se adicionaron 2 mL de solución salina al 0.9% con pipeta volumétrica, se homogenizó antes de introducir al espectrofotómetro COLEMAN, se diluyó lo necesario, hasta obtener una lectura de  $24 \pm 1\%$  de T.

➤ **Microtitulación.**

La microtitulación se realizó en placa de tipo "V" y en cada pozo se colocaron 100  $\mu$ L de solución salina al 0.9%.

Se llenó el microdilutor con 50  $\mu$ L del extracto problema o del estándar de faseolotoxina y se realizaron las diluciones sucesivas desde el primer pozo y se eliminó el residuo de la última dilución.

Ya realizadas las diluciones pertinentes se colocó con el pipeteador de gota 50  $\mu$ L de la suspensión de eritrocitos ya sensibilizados y ajustados a cada pozo.

En cada placa se realizó el control negativo (solución salina + sangre ajustada) y el control positivo (solución salina 0.9% + estándar de faseolotoxina al 0.2%).

Terminada la placa se rotó en forma circular para homogeneizar, y se colocó en la incubadora por 1 hora a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .

➤ **Lectura.**

Para obtener el título de aglutinación se observó empleando un espejo adaptado al dispositivo y se localizó en la hilera horizontal de la placa, el número que correspondió al último pozo donde se aprecia la aglutinación (**Vasconcelos et al, 2004**).

### **Cálculos.**

#### **Límite de detección del método (L).**

- A. Cantidad de lectina que realmente se colocó en el primer pozo para hacer la dilución seriada (E)

$$E = M(D)$$

M: Concentración de lectina en la solución diluida ( $\mu\text{g/mL}$ )

D: Cantidad de muestra tomada por el microtitulador ( $50\mu\text{L}$ )

$$E = \left(\frac{1 \text{ g}}{\text{mL}}\right) (50 \text{ L}) \left(\frac{1 \text{ mL}}{1000 \text{ L}}\right)$$
$$E = 0.05 \text{ g}$$

- B. Límite de detección del método (L)

$$L = 2 \left(\frac{E}{3^t}\right)$$

#### **Unidades hemaglutinantes.**

- A. Cantidad utilizada de la muestra problema en el primer pozo de la hilera respectiva (e)

$$e = M(D)$$

M: Concentración de lectina en la solución diluida ( $\text{mg/mL}$ )

D: Cantidad de muestra tomada por el microtitulador ( $50 \mu\text{L}$ )

$$M = \left( \frac{g \text{ de muestra}}{10 \text{ mL}} \right) \left( \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \right) F$$

$$F: \text{Factor de dilución} = \frac{\text{aliquota}}{\text{aforo}}$$

- A. Cantidad mínima de muestra que produce prueba positiva de aglutinación (título de la muestra problema) (MA)

$$MA = 2 \left( \frac{e}{3^i} \right)$$

- B. Cantidad de lectina de referencia expresada en µg sobre mg de muestra, que también equivale a 1 mg de lectina sobre 1g de muestra (LE)

$$LE = \frac{L}{MA}$$

- C. Unidades hemaglutinantes (UHG)

UHG = 1mg faseolotoxina

Resultados expresados en UHG/g muestra (**González, 2001**).

$$\left( \frac{g}{mg} \right) \left( \frac{1 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \right) \left( \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \right) = \frac{mg}{g}$$

$$\frac{g}{mg} = \frac{mg}{g}$$

$$\frac{mg}{g \text{ muestra}} = \frac{UHG}{g \text{ muestra}}$$

$$\left( \frac{LEmg}{g \text{ muestra}} \right) \left( \frac{1 \text{ UHG}}{1mg \text{ lectina}} \right) = \frac{UHG}{g \text{ muestra}}$$

### 5.6.2 Inhibidores de tripsina.

**Fundamento.** Se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso (solución de NaOH 0,01N) 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 µg/10 mL), y después de un 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 410 nm. Dicha coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de la muestra.

#### **Material/Reactivo.**

- Balanza analítica Sartorius Analytic Extend
- Potenciómetro Thermo Scientific
- Parrilla múltiple Wise Stir
- Baño de agua Grant ajustado por mantener  $37 \pm 0.5$  °C
- Vortex Lab-line
- Espectrofotómetro Thermo Genesys 10uv
- Vasos de precipitados
- Tubos de ensaye
- NaOH 0.01N
- Solución amortiguadora de TRIS, pH 8.2 y 0.05M (a)
- Solución BAPNA marca SIGMA B4875-5G (b)
- Ácido acético al 30%
- Solución estándar de tripsina (c)
- HCl 0.001N
- Harina de soya desengrasada como control de referencia.

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

- (b) Se pesó 100 mg de benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida-HCl (BAPNA). Se disolvió en 2.5 mL de dimetil-sulfóxido y se diluyó a 250 mL con amortiguador TRIS previamente calentado a 37°C (ésta solución debe ser preparada el mismo día y cuando este en uso debe mantenerse a 37°C).
- (c) Se pesó 4 mg de tripsina bovina y se disolvió en 200 mL de HCl 0.001N. Ésta solución contiene 20 µg de tripsina por mililitro y debe ser almacenada en refrigeración donde puede durar 1 semana sin pérdida apreciable de actividad.

## **Procedimiento.**

### **➤ Preparación del extracto.**

Se pesó 1 g de muestra finamente molida en un vaso de precipitado, se adicionó 45 mL de NaOH 0.01N luego se le ajustó el pH de esta suspensión a  $9.6 \pm 0.2$  y se aforó a 50 mL. A continuación se transvasó a un vaso que contuviera un magneto, se agitó la suspensión mecánicamente por espacio de 2 horas y media a 300 rpm. Transcurrido el tiempo, por simple decantación se obtuvo el sobrenadante eliminando el residuo insoluble.

El sobrenadante debe ser diluido de tal forma que 1 mL produzca una inhibición de 40 a 60%; con esto se logra reducir la desviación estándar.

### **➤ Determinación de la actividad.**

Se prepararon 10 tubos de ensaye como se muestra en la Tabla 3 y se agregó la cantidad especificada del extracto directo o diluido por duplicado y se ajustó el volumen final de cada tubo a 2 mL con agua destilada. Se adicionó a cada tubo 2 mL de solución estándar de tripsina (previamente mantenida a 37°C) agitando cada tubo y se mantuvo en contacto inhibidor-tripsina por espacio de 5 minutos, a los blancos se les adicionó además 1 mL de ácido acético para detener la

reacción. A continuación se adicionó 5 mL de solución BAPNA (37°C) a cada tubo y se volvieron a colocar los tubos en el baño de agua por 10 minutos. Es importante tener control estricto del tiempo sobre todo después de adicionar el BAPNA, por lo cual se debe utilizar un cronómetro.

Pasando el tiempo se detuvo la reacción enzimática por la adición de 1 mL de ácido acético al 30% el cual debe de homogeneizarse inmediatamente, a excepción de los blancos a los cuales ya se les había añadido.

Cuando por la adición del ácido acético el tubo de reacción se enturbe o forme un precipitado se debió decantar durante 15 minutos y de ser necesario centrifugar (15 minutos/ 600rpm). Al finalizar se realiza la lectura de cada tubo en el espectrofotómetro a 410 nm.

**Tabla 3. Adición de los reactivos a cada tubo del método.**

<b>Tubo</b>	<b>mL Extracto</b>	<b>mL agua</b>	<b>mL Sol. De Tripsina</b>	<b>mL BAPNA</b>	<b>mL ácido acético</b>
<b>1B</b>	1.8	0.2	2*	5	----
<b>1</b>	1.8	0.2	2	5	1
<b>2B</b>	1.4	0.6	2*	5	----
<b>2</b>	1.4	0.6	2	5	1
<b>3B</b>	1.0	1.0	2*	5	----
<b>3</b>	1.0	1.0	2	5	1
<b>4B</b>	0.6	1.4	2*	5	----
<b>4</b>	0.6	1.4	2	5	1
<b>RB</b>	0.0	2.0	2*	5	----
<b>R</b>	0.0	2.0	2	5	1

\*Más 1 mL de ácido acético.

B = Blanco.

R = Referencia.

1, 2, 3, 4 = Muestras.

## Cálculos.

La actividad de los inhibidores de tripsina se expresa en términos de UTI (Unidades de Tripsina Inhibida), y se ha definido una unidad de tripsina como el incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm por 10 mL de mezcla de reacciones descritos por Kakade y colaboradores.

De acuerdo a la siguiente relación se obtienen las siguientes unidades de tripsina (U.T.)

$$UT = Absorbancia(100)$$

Ya teniendo las U.T. de cada alícuota del extracto, calculamos las unidades de tripsina inhibidas (U.T.I.)

$$UTI = UT_{referencia} - UT_{muestra}$$

Una vez que se obtuvo U.T.I. de cada alícuota del extracto es conveniente obtener el % de inhibición tomando como referencia el tubo con 1.0 mL de extracto para así conocer si esta en el rango 40 a 60% inhibición ó si es necesario hacer dilución.

$$\%INH = \frac{UTI_{muestra\ de\ 1mL\ de\ extracto} * 100}{UT_{referencia}}$$

Para poder realizar el gráfico U.T.I./mL vs. mL de extracto, es necesario calcular U.T.I./mL, donde la coordenada x =mL de extracto y y= UTI/mL.

$$\frac{UTI}{mL} = \frac{UTI}{mL\ extracto}$$

Sí en el gráfico se obtiene una correlación lineal negativa mayor o igual a 0.9 se refiere que la actividad inhibitoria real es tipo Kunitz que contiene la soya, y se expresa el resultado final en U.T.I./mg de muestra.

$$\frac{UTI}{mg\ muestra} = B \cdot F \cdot \frac{50}{mg\ muestra}$$

F: Factor de dilución  $\frac{Aforo}{alícuota}$

B: Valor de la ordenada en el ajuste de linealidad (  $r = -0.9$ ).

En caso de que no sean inhibidores tipo Kunitz ( $r = -0.9$ ) se utiliza el promedio de UTI/mL de las cuatro alícuotas en lugar de la ordenada de la curva (B) (**Kakade et. al, 1974**).

### 5.6.3 Determinación cuantitativa de alcaloides.

**Fundamento.** Debido a las propiedades ácido-base que presentan los alcaloides, es posible su cuantificación. Para ellos es necesaria la extracción de los alcaloides de la muestra con solventes orgánicos y su acidificación para hacer una microtitulación analítica ácido-base con NaOH (**Moreno, 2001**).

#### Material/Reactivo.

- Matraz bola fondo plano
- Parrilla CIMAREC
- Embudo Buchner
- Papel filtro poro cerrado
- Embudo de separación
- Rotavapor
- Microbureta
- Pipeta volumétrica

- Metanol R.A.
- HCl 1%
- NH<sub>4</sub>OH concentrado
- Cloroformo
- Solución saturada de Sulfato de Sodio
- Mezcla de cloroformo-etanol (3:2 v/v)
- Sulfato de sodio anhidro
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.01N
- Rojo metilo 0.1%
- NaOH 0.1 valorado (a)

(a) Medir 25 mL de solución alcalina y se colocan en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Cada porción se diluye con 50 mL de agua destilada hervida y fría, y se titula con la solución valorada de ácido puesta en bureta. Se emplea el anaranjado de metilo como indicador (2 gotas). La titulación se repite hasta que la diferencia entre las operaciones no sea mayor a 0.1 mL. La normalidad de la solución alcalina se calcula mediante la ecuación:

$$N_1V_1 = N_2V_2.$$

### **Procedimiento.**

Se pesó 5 g de muestra desengrasada y se colocó en un matraz de bola fondo plano de 250 mL, se le añadió 40 mL de metanol y se dejó en agitación 16 horas a temperatura ambiente a 300 rpm. Después de este tiempo, se filtró a vacío con papel filtro poro cerrado y se le añadió 40 mL de metanol, se colocó en un baño de 40 a 50°C (46 ± 2°C) con agitación constante (4 horas/ 400 rpm). Terminado el tiempo de agitación la mezcla se filtró a través de papel filtro poro cerrado y el residuo se lavó con 20 mL de metanol, se evaporó el disolvente en un rotavapor a 60°C a presión reducida.

Se resuspendió el residuo con 2 mL de metanol y se le adicionó 12 mL de HCl al 1%, se colocó en un vaso de precipitados, el matraz de bola se lavo con 8 mL de HCl 1% y se adicionó al resto; si se observa precipitación o partículas suspendidas filtrar en papel filtro poro cerrado. Esta solución se alcalinizó llevando un pH de 9.5  $\pm$  0.2 con NH<sub>4</sub>OH concentrado.

Se pasó a un embudo de separación y se extrajo con tres porciones de cloroformo de 20 mL cada una. Se recuperó la fase orgánica (inferior) (A) y a la fase acuosa se le midió el volumen, y se le agregó el mismo volumen medido de una solución saturada de sulfato de sodio, se extrajo con tres porciones de la mezcla cloroformo-etanol de 20 mL cada una. Se recuperó la fase orgánica (inferior) y se juntó con la anterior (A).

Se pasó a un embudo de separación (las 2 fases orgánicas) y se le adicionó 10 mL de solución saturada de sulfato de sodio. Se recibió la fase orgánica (inferior) en un vaso de precipitados que contuviera 5 g de sulfato de sodio anhidro y por decantación se pasó la fase orgánica a un matraz de bola.

Se evaporó a sequedad el disolvente en el rotavapor y al residuo se le adicionó 10 mL de ácido sulfúrico 0.01N con pipeta volumétrica, se homogeneizó y se lavó con 10 mL de agua desionizada, se adicionó 5 gotas de rojo de metilo al 0.1% y se realizó una microtitulación con NaOH 0.1N valorado.

### **Cálculos.**

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

A: mL de NaOH 0.1N gastados por el blanco

B: mL de NaOH 0.1N gastados por la muestra

N: Normalidad (obtenida por valoración)

meq: 0.293 (Dos moléculas de alcaloide referidas a la  $\beta$ -eritroidina (PM:293) reacciona con una molécula de  $H_2SO_4$  en medio acuoso, formándose la sal correspondiente del alcaloide.

Los resultados se expresarán en g alcaloides/100g muestra.

### 5.7 Destoxificación (extracción de alcaloides con metanol).

**Fundamento.** Las semillas de *Erythrina americana* presentan un alto contenido de alcaloides, aproximadamente 1% (García-Mateo, 1996), por lo cual es necesario su destoxificación; para ello se realizó una extracción de los alcaloides presentes en la muestra con metanol debido a que los alcaloides de *Erythrina* tienen alta solubilidad en este disolvente.

#### Material/Reactivos.

- Rotavapor Büchi modelo R-151
- Dispositivo de enfriamiento y recirculación UNAMEX con agua : anticongelante (2:1).
- Metanol Q.P.
- Mangueras de látex
- Embudo Buchner
- Matraz Kitazato
- Papel filtro

#### Procedimiento

Se colocó la proporción 1:4 de la torta residual: disolvente, es decir 1 kg de harina desengrasada y 4 L de metanol en el matraz del rotavapor inmediatamente después de que se colocó el matraz en el aparato y asegurarlo; se esperó a que el baño del rotavapor alcance las temperatura de 64 a 65°C como se muestra en la Figura 7.



**Figura 7. Equipo utilizado para la extracción de alcaloides**

Para comenzar, se realizó una extracción la cual tuvo una duración de 30 minutos, pasada la media hora, se retiró el matraz del sistema y se vació el disolvente (metanol-alcaloides) en un recipiente adecuado para después con la ayuda de un matraz Kitazato y embudo Buchner se realizó un filtrado a vacío y así se separó la torta residual de Colorín y el disolvente. Ya que se separó, se le adicionó de nuevo otros cuatro litros más de metanol y se volvió a colocar el matraz en el sistema.

Esta operación se repitió dos veces más, en la cuarta extracción se realizó el mismo procedimiento solo que el tiempo cambió a una hora, después de ese tiempo se realizó el filtrado y esta misma operación se llevó a cabo tres veces más.

En total se realizaron siete extracciones, en las primeras tres extracciones la duración es de 30 minutos y a partir de la cuarta, durará 1 hora

Después de la séptima extracción se toma una muestra del matraz y se filtra con papel de filtración lenta para realizar la prueba cualitativa de alcaloides **(Huerta, 2005)**.

En total el tiempo que se lleva en todo el proceso de destoxificación es aproximadamente de 10 horas por kilogramo. En esta etapa de la metodología se obtiene el extracto metanólico residual (donde se encuentran los alcaloides).

En la Figura 8 se observa el sobrenadante del extracto metanólico y cómo va cambiando el color conforme se realizan las extracciones, en la imagen del lado izquierdo es la primera extracción en el cual se nota un color café-amarillo, el cual éste color se debe al contenido alto de alcaloides que se extraen en el metanol; conforme se van realizando las extracciones el color va disminuyendo como se percibe en la imagen del centro (cuarta extracción), hasta llegar a un color casi incoloro, donde se puede asumir por simple observación visual, que ya no hay una concentración alta en el disolvente.



**Figura 8. Sobrenadante del extracto metanólico, imagen de la izquierda es a la primera extracción, la figura central es de la cuarto extracción y la figura de la derecha es de la séptima extracción**

NOTA. Después de cada kg de colorín destoxificado, se coloca en una charola metálica para colocarlo en un área donde se tiene una campana de extracción de gases para la eliminación total del metanol por evaporación.

### **5.8 Prueba cualitativa de alcaloides.**

**Fundamento:** Los alcaloides tienen propiedades básicas por lo que después de la extracción de los mismos con metanol y la posterior acidificación es posible obtener las sales las cuáles al reaccionar con algunos de los reactivos más sensibles para la detección de alcaloides se puede obtener una estimación de la concentración de los mismos.

#### **Material/Reactivos.**

- Rotavapor marca Buchi Mod.R.
- Papel filtro
- Matraz bola 100 mL
- Metanol R.A.
- Ácido clorhídrico 1%
- Reactivo de Mayer (a)
- Reactivo de Wagner (b)
- Reactivo Dragendorff (c)

(a) Se disolvió 1.36 g de  $\text{HgCl}_2$  en 60 mL de agua y 5 g de KI en 10 mL de agua. Se juntaron las dos soluciones y se aforaron a 100 mL con agua destilada.

(b) Se disolvió 1.27 g de yodo (sublimado) y 2 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua, la solución se aforó a 100 mL con agua destilada.

(c) Se disolvió 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 10 mL de ácido nítrico (densidad 1.18 o sea al 30%) y 27 g de KI en 50 mL de agua. Se mezclaron las dos soluciones y se dejaron en reposo durante 24 horas. Se decantó la solución y se aforo con agua a 100 mL.

## Procedimiento

Se obtuvo del matraz en donde se llevo a cabo el proceso de destoxificación una alícuota del sobrenadante del extracto metanólico, aproximadamente 40 mL, se evaporó el disolvente en el rotavapor a una temperatura de  $65^\circ\text{C}$  hasta sequedad, se resuspendió el residuo agregando 2 mL de metanol R.A, y posteriormente se adicionó 12 mL HCl 1%. Si se observa precipitación o partículas suspendidas filtrar en papel de filtración lenta; se tomó 3 alícuotas de 0.5 mL del filtrado y se colocaron en tubos de ensaye, se agregó 2 gotas del reactivo correspondiente y se observó si presenta precipitado (prueba positiva); que en el caso del reactivo de Mayer es un precipitado de color blanco, para el reactivo de Wagner el precipitado es de color marrón y para el reactivo Dragendorff el precipitado es color naranja; y si es negativa la prueba no se observa ningún precipitado (**Huerta, 2005**).

## 5.9 Tamizado.

**Fundamento.** La diferencia en el tamaño de partículas en la harina hace posible su paso por tamices de distinta apertura; quedando en las fracciones más gruesas la mayor cantidad de pericarpio que está constituido principalmente por lo que se denomina fibra cruda.

### Material.

- Tamices No. 10, 14, 20, 25

**Tabla 4. Dimensiones de los tamices utilizados**

No. Tamiz	Abertura en pulgadas	Abertura en milímetros
10	0.0787	2
14	0.0555	1.40
20	0.0331	0.85
25	0.0278	0.710
30	0.0234	0.600

### Procedimiento.

Se colocaron los tamices en forma ascendente y se agregó la muestra sobre el tamiz No. 10, se colocó la tapa sobre este y se colocó la columna de tamices en el tamizador durante 10 minutos. Se colectó las diferentes fracciones, se eliminó la fracción correspondiente a la malla que retiene en su mayoría pericarpio (malla 10 y 14) y las fracciones restantes se mezclaron.

## 5.10 Molienda fina.

**Fundamento.** El tamaño de la partícula en las determinaciones química y analíticas es muy importante, ya que influye directamente sobre la variación y precisión del método, así como en la validez de los resultados; si la muestra no es homogénea ni tiene el tamaño de partícula adecuada se corre el riesgo de no tomar una muestra representativa del lote por lo que los resultados son erróneos.

## **Material**

- Molino Thomas Wiley Modelo 4
- Malla de 1 mm

## **Procedimiento.**

Se tomó una muestra representativa del lote del colorín destoxificado y tamizado, el cual se muestreo de la parte de abajo, central y superior. Después se pasó la muestra obtenida a través del molino y se realizó el análisis proximal y toxicología analítica.

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis proximal de la semilla integral se muestra en la Tabla 5, de donde destaca el contenido de proteína, observando que el valor de proteína cruda, es de aproximadamente 29%.

**Tabla 5. Análisis proximal de la semilla integral de Colorín.  
Base Húmeda<sup>a</sup>.**

<b>Determinación</b>	<b>Resultados<sup>b</sup></b>
<b>Humedad</b>	6.82 ± 0.01
<b>Cenizas</b>	3.79 ± 0.01
<b>Grasa</b>	14.58 ± 0.04
<b>Proteína</b>	28.89 ± 1.99
<b>Fibra Cruda</b>	14.76 ± 0.11
<b>CHO's<sup>c</sup></b>	31.16

<sup>a</sup>Datos representan promedios ± DE por triplicado C.V. < 5%

<sup>b</sup>Expresados en g/100 g muestra (%).

<sup>c</sup>Los CHO's = Hidratos de carbono asimilables calculados por diferencia (método Weende).

Observando la tabla anterior, no solo se ve que tiene un contenido significativo de proteína, sino también de grasa y fibra cruda, es decir que, los nutrimentos son suficientes para ser aprovechados en la industria alimentaria, ya sea como forraje, consumo humano o suplemento alimenticio.

De estudios anteriores se observó que la calificación química (CQ) de la proteína de colorín es de buena calidad dando un valor entre 81 a 83%; no obstante como toda leguminosa es deficiente en aminoácidos azufrados (**Huerta, 2005**); sin embargo el contenido de estos es adecuado, para una proteína de origen vegetal ya que en otras leguminosas el valor es menor (aprox. entre 45 a 76%, dependiendo del tipo de leguminosa, y dónde la soya tiene la calificación mayor (**IMSS, 2014**)).

Como ya se mencionó anteriormente, se sabe que por ser una leguminosa, contiene ciertos tóxicos como lectinas, inhibidores de tripsina y alcaloides (Tabla 6).

**Tabla 6. Factores tóxicos de la semilla integral del colorín**

<b>Determinación</b>	<b>Resultados<sup>a</sup></b>
<b>Lectinas<sup>b</sup></b>	0.034UHG/g <sub>muestra</sub> ± 0.0001
<b>Inhibidores tripsina<sup>c</sup></b>	46.78 UTI/mg <sub>muestra</sub> ± 0.667
<b>Alcaloides</b>	0.323% ± 0.010

<sup>a</sup>Datos obtenidos por triplicado ± DE, con CV< 5%.

<sup>b</sup>UHG = Unidades Hemaglutinates.

<sup>c</sup>UTI/mg = Unidades de tripsina inhibida por miligramo de muestra

Con respecto a la semilla integral y el contenido de lectinas, se observa en la Figura 9 que se muestra la placa utilizada y que en la fila B (muestra de colorín) nos da el número del pozo donde se presenta la máxima dilución que produce prueba positiva de aglutinación.



**Figura 9. Placa tipo "V" del microtiter donde fila A (control de Faseolotoxina positivo); fila C y H (control negativo); fila B y G (extracto de colorín) y fila D, E y F extracto de frijol peruano (muestra de referencia).**

Con respecto al contenido de lectinas que se encuentra en el Colorín, es un contenido bajo debido que se encuentra la aglutinación en el pocillo 6 o 7 sin haber hecho alguna dilución, a diferencia del control positivo (Faseolotoxina) ya

que ésta muestra se hace dilución 1:100 y a pesar de que se tiene en el mismo número de pocillo la aglutinación.

También se encuentra en la figura 9 el frijol peruano, éste solamente se realiza como muestra de referencia de que se está realizando bien el método, ya que como es un procedimiento muy delicado y sensible, se debe estar seguro que se está realizando la metodología correctamente.

Con respecto a los inhibidores de tripsina se encontró que contiene 46.75 UTI/mg de muestra que está arriba del límite máximo permitido de 10 UTI/mg de muestra **(Kakade et al, 1974)** y semejante al grano de soya por lo que se ve que este factor tóxico si es de suma importancia ya que es muy elevado, y como se sabe, causan un retraso en el crecimiento o un índice de la Eficiencia Proteínica (PER) bajo. La inhibición de tripsina se ve reflejada en una hipertrofia pancreática en ratas.

El factor tóxico de mayor importancia en este proyecto son los alcaloides, en la siguiente tabla se muestra una comparación de los resultados reportados en referencias anteriores con los obtenidos en esta investigación.

**Tabla 7. Comparación de resultados obtenidos para la cuantificación de alcaloides de semillas de Erythrina americana**

<b>Referencia</b>	<b>Alcaloides totales. (g alcaloides/ 100g muestra)</b>
<b>(Barrera, 1958)</b>	1.63
<b>(Corona, 1982)</b>	2.08
<b>(Sotelo, 1993)</b>	0.530
<b>(García-Mateo, 1996)</b>	1.050
<b>(Garín-Aguilar, 2000)</b>	0.571
<b>(Moreno, 2001)</b>	1.056
<b>Este trabajo</b>	0.323

El valor de alcaloides en este trabajo, es menor ya que antes de hacer la cuantificación se desengraso la muestra con hexano para poder hacer el análisis toxicológico sin que exista alguna complicación por la presencia de la grasa.

Como se sabe los alcaloides también son solubles en hexano debido a la polaridad, por lo tanto, así que el tiempo que se llevo a cabo en el desengrasado fue suficiente para poder disminuir el valor de alcaloides en la semilla antes de destoxificar (**Garín-Aguilar et al, 1999**).

Para las pruebas cualitativas, se empiezan a realizar a partir de la sexta extracción para ver si llega a existir un precipitado en alguno de los tres reactivos (Mayer, Wagner y Dragendorff). En la Figura 10 se ve precipitado en los tres tubos, por lo cual, nos indica que se debe realizar mínimo otra extracción.

Hasta cuando se realizan las pruebas cualitativas y no se presenta ningún precipitado en cualquiera de los tres reactivos (Figura 11), se puede decir que, ese lote ya no tiene una cantidad significativa de alcaloides y se puede considerar como destoxificado.



**Figura 10. Prueba cualitativa de alcaloides positiva, Reactivo Wagner (precipitado marrón), Reactivo Mayer (precipitado blanco) y Reactivo Dragendorff (precipitado naranja).**



**Figura 11. Prueba cualitativa de alcaloides negativa, sin presencia de precipitado.**

Con respecto a la extracción del contenido de grasa, (como se menciona en el procedimiento para poder destoxificar se debe de desengrasar) en la tabla 8 se presenta el rendimiento de la grasa obtenida por los diferentes lotes de extracción que se realizaron, en el cual se observa que en las primeras extracciones el porcentaje de grasa es relativamente bajo, esto se debió a que el equipo funcionó como un auténtico dispositivo Soxhlet; realizando sifoneos del disolvente en forma discontinua (aprox. cada 20 minutos); sin embargo cuando la bolsa de retención se sobrecarga (> 2 kg), se vio que el dispositivo funcionó en forma de extracción continua y el rendimiento mejoro por lo cual se decidió usarlo de esta manera.

**Tabla 8. Resultados del porcentaje de extracción de grasa de la semilla de Colorín integral.**

Número de lote	% Grasa
1	8.73
2	10.30
3	15.60
4	14.04
5	16.40
6	16.24
7	16.24
8	15.40
9	14.01
10	11.30
X	14.90 ± 1.74

El rendimiento promedio del porcentaje de extracción es de  $14.90 \pm 1.74$ , sin considerar los primero dos lotes de extracción, que fueron con los que trabajo el equipo por sifoneo. Se contrasta que el porcentaje obtenido concuerda con lo reportado en la literatura y con el resultado del análisis proximal que se realizó con la semilla integral que es de aproximadamente de 15% lo que se corrobora que fue una correcta extracción (Díaz, 2005).

Con respecto a la toxicidad de la grasa extraída de la semilla de colorín, se observa en la tabla 9 resultados de trabajo anterior que antes del proceso de refinado, la grasa cruda tuvo un contenido significativo de alcaloides, sin embargo, después del proceso de refinado hubo una reducción de más de 10 veces el contenido por lo que se obtuvo un aceite refinado lo suficientemente bajo en alcaloides como para no ser considerado de riesgo en su ingesta.

**Tabla 9. Alcaloides en grasa y aceite refinado de *Erythrina americana* (Morales, 2013).**

<b>Alcaloides (mg β-eritroidina/100 g muestra)</b>	
<b>Grasa cruda</b>	5.37
<b>Aceite refinado</b>	0.31

Cuando se termina del desengrasado y el destoxificado de la semilla de colorín, se realiza el tamizado, ya que en nuestro análisis bromatológico de la semilla integral presenta un valor alto de fibra entre 14 a 15%, en estudios previos, se ha analizado que la fibra se concentra durante el desengrasado-destoxificación hasta niveles de 38 a 40% (Huerta, 2005), es por ello, que el tamizado es necesario para poder retirar la mayor cantidad de pericarpio para tener una mejor digestibilidad cuando esta harina se utilice para bioensayos.

Al terminar con el tamizado y molienda, se procede con el análisis cuantitativo de alcaloides, se considera como muestra apta para ser empleada con fines alimenticios cuando cumpla el nivel establecido en la bibliografía, el cual es de 0.03 g alcaloides / 100 g muestra (Centurión et. al., 2000).

A pesar de que se tiene un valor relativamente bajo de alcaloides antes de destoxificar, cuando se llevaron las extracciones y se realizó la cuantificación de éstos, se obtuvo  $0.03\% \pm 5.77 \times 10^{-4}$ , aunque esta en el límite, sí se puede llegar a utilizar para alimentación animal.

En la tabla 10, se muestra los resultados de cada tóxico que se analizó después de su desengrasado y destoxificación de la semilla del colorín.

**Tabla 10. Factores tóxicos de la harina desengrasada-destoxificada del colorín**

Determinación	Resultados <sup>a</sup>
<b>Lectinas<sup>b</sup></b>	$3.94 \times 10^{-4} \text{UHG/g}_{\text{muestra}} \pm 4.04 \times 10^{-4}$
<b>Inhibidores tripsina<sup>c</sup></b>	$36.89 \text{UTI/mg}_{\text{muestra}} \pm 0.549$
<b>Alcaloides</b>	$0.03\% \pm 5.77 \times 10^{-4}$

<sup>a</sup>Datos obtenidos por triplicado  $\pm$ DE, con CV < 5%.

<sup>b</sup>UHG = Unidades Hemaglutinates.

<sup>c</sup>UTI/mg = Unidades de tripsina inhibida por miligramo de muestra

Con respecto a las lectinas, el contenido disminuyó ya que, como son de origen proteínico son sensibles al tratamiento térmico, y aunque el tratamiento que se dio en la destoxificación no es un tratamiento de altas temperaturas, se pudo lograr la inactivación adecuada de este factor tóxico.

Con respecto a los inhibidores de tripsina, no se llegó a la eliminación, ya que no fue suficiente la temperatura que se estuvo manejando, para inactivar este factor tóxico se necesita un tratamiento térmico más drástico, donde esté involucrado una temperatura mayor y dependiendo de la leguminosa que se esté trabajando, se tendrá que saber el tratamiento térmico adecuado que se debe de dar, ya que si se da un sobreprocesamiento, se puede disminuir la calidad de la proteína dietética.

En el caso de algunas especies del género *Erythrina* siguen presentando un 80% de actividad antitripsina después de un tratamiento térmico a 121°C/30min, en el caso de *Erythrina americana* en estas condiciones no se llega al nivel para fines alimenticios (< 10 UTI/mg muestra) (García et. al, 2000); por lo tanto, si se desea emplear en alimentación animal se recomienda agregar pancreatina comercial para neutralizar el efecto antinutricional de los inhibidores de tripsina.

Para finalizar este proyecto, se realizó el análisis proximal de la harina desengrasada-destoxificada del Colorín, el cual, uno de los objetivos del tamizado

era reducir el contenido de la fibra cruda, se logró llevar a un porcentaje de 21 a 22% (Tabla 11).

Con respecto al contenido de grasa, se puede decir, que se llevo correctamente el proceso de desengrasado por el método Soxhlet.

Y el valor de proteína se concentro, pasando de un valor de 29% a un 40% que para cualquier alimento esta cantidad es significativa.

**Tabla 11. Análisis proximal de la harina de Colorín desengrasada-destoxificada.  
Base Húmeda<sup>a</sup>.**

<b>Determinación</b>	<b>Resultados<sup>b</sup></b>
<b>Humedad</b>	8.00 ± 0.04
<b>Cenizas</b>	4.94 ± 0.00
<b>Grasa</b>	0.04 ± 0.06
<b>Proteína</b>	40.47 ± 0.62
<b>Fibra Cruda</b>	21.39 ± 0.09
<b>CHO's<sup>c</sup></b>	25.15

<sup>a</sup>Datos representan promedios ± DE por triplicado C.V. < 5%

<sup>b</sup>Expresados en g/100g muestra.

<sup>c</sup>Los CHO's = Hidratos de carbono asimilables calculados por diferencia (método Weende).

## 7 CONCLUSIONES.

- En general, las especies del género *Erythrina* se encuentra distribuido en las regiones tropicales, subtropicales y templadas, y México por su gran biodiversidad, se encuentra en varios estados, principalmente en el centro y sur del país.
- Se obtuvo la suficiente semilla desengrasada de colorín para su posterior destoxificación, resultando el porcentaje de grasa obtenido de  $14.90\% \pm 1.74$ ; valor representativo para ser potencialmente aprovechado en la industria aceitera.
- La toxicidad que presenta *Erythrina americana* es de suma consideración, ya que la ingesta de ésta puede producir la muerte por el alto contenido de alcaloides, el cual llega a producir la asfixia inmediata o parálisis de los músculos que intervienen en la respiración.
- Por el elevado contenido de proteína y una relativa buena calidad nutritiva, es de sumo interés en la industria alimentaria, realizar el proceso de destoxificación para el aprovechamiento de este recurso vegetal.
- El método de destoxificación que se realizó, fue eficiente ya que se pudo disminuir dos de los factores tóxicos, en especial los alcaloides y en el caso de los inhibidores de tripsina, se recomienda agregar un preparado enzimático comercial para contrarrestar los daños que produce este agente antinutricional.
- El contenido de proteína de la harina desengrasada-destoxificada de la semilla fue de un 40%, y la disminución del contenido de alcaloides es apta para proponerla en alimentación animal.

## 8 BIBLIOGRAFÍA.

Álvarez L. H. (2009). *Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana*. de Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Color%C3%ADn&id=7174>. Recuperado el 15 de Junio de 2015.

Anónimo. (2012). *Biodiversidad Mexicana*. de Vecinos verdes: <http://www.biodiversidad.gob.mx/Difusion/cienciaCiudadana/urbanos/ficha.php?item=Erythrina%20americana>. Recuperado el 29 de Junio de 2015.

Barrera, E. M. (1958). *Valoración de alcaloides en colorín*. Tesis de Licenciatura de la Facultad de Química, UNAM, Ciudad de México.

Belitz D., G. W. (1997). *Química de los alimentos*, 2° Edición, Springer-Verlag GmbH & Co., KG, Berlín.

Brito, I. F. (2006). *Zompantle o colorín (Erythrina americana. Miller)*. *Tlahuic-Medic*. 20, 204-207, Morelos.

Centurión H. Dora., E. M. (2000). *Catálogo de plantas de uso alimentario tradicional en la región sierra del Estado de Tabasco*, SIGOLFO, Tabasco.

Corona, P. M. (1982). *Estudio químico y de algunos factores tóxicos de la leguminosa silvestre Erythrina americana*, Tesis de Licenciatura de la Universidad Autónoma de Puebla, Puebla

Damدران, S. V. (1988). Isolation of alkaloids and glycosides from tissue following enzymatic digestion. *Science International*. 37, 243-248.

Díaz A., M. (2005). *Variaciones en la composición bromatológica y contenido de factores antinutricionales y alcaloides durante el proceso de germinación de semillas de Erythrina americana.*, Tesis de Licenciatura de la Facultad de Química, UNAM, Ciudad de México.

Escobar L. Agustín, A. D. (2010). *Coneval*. de Informe de evolución histórica de la situación nutricional de la población y los programas de alimentación, nutrición y

abasto en México. :  
[http://www.coneval.gob.mx/rw/resource/coneval/info\\_public/PDF\\_PUBLICACIONES/Evolucion\\_Historica\\_050411.pdf](http://www.coneval.gob.mx/rw/resource/coneval/info_public/PDF_PUBLICACIONES/Evolucion_Historica_050411.pdf). Recuperado el 05 de Abril de 2015.

FAOSTAT. (2013)., ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA: [http://faostat3.fao.org/browse/R/\\*/S](http://faostat3.fao.org/browse/R/*/S). Recuperado el 13 de Mayo de 2015.

Fessenden J. (1982). *Química Orgánica*, 2° Edición, Grupo Editorial Iberoamérica, Boston.

Fraile Ma., (2008). *Nutritivas y apetecibles: conozca las leguminosas comestibles*. Dpto de Biología, UAM, Ciudad de México.

Galindo Carlos, C. L. (2012). *Biodiversidad Mexicana*, de ¿Qué es un país megadiverso?: <http://www.biodiversidad.gob.mx/pais/quees.html>. Recuperado el 28 de Junio de 2015.

García M. Rosario. (2000). *Toxicidad de los extractos de las semillas de Erythrina americana*. *Ciencia Ergo Sum*, 7 (2), 166-170.

García-Mateo, M., (1996). *Estudio Químico-Biológico de los alcaloides Erythrina*. Tesis del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, Texcoco.

García-Mateos R., Soto M.,. (1997). *Alkaloids from six Erythrina americana species endemic to Mexico*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 20, 545-551.

Garín-Aguilar, Ma., Soto-Hernández M., (1999). *Effect of crude extracts of Erythrina americana Mill. on aggressive behavior in rats*. *Journal of Ethnopharmacology*. 69, 189-196.

González Perla, P. (2001). *Efecto del procesamiento con calor sobre la cuantificación de lectinas de frijol y su toxicidad permanente*, Tesis de Licenciatura de la Facultad de Química, UNAM, Ciudad de México.

Graham, H. B. (1980). *Alcaloides, Enciclopedia Ilustrada Cumbre.*, Cumbre, S.A. Tomo 1.

Horwitz W. L. G. (2006). *OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC INTERNATIONAL*. Publish by association to official Analytical Chemistry International, 01-47, Güithersburg.

Huerta, B. (2005). *Evaluación nutricia de la fracción proteínica de la semilla del Colorín (Erythrina americana) destoxificada.*, Tesis de Licenciatura de la Facultad de Química, UNAM, Ciudad de México.

Ibarra E., Pacheco M., García R., San Miguel R., Ramírez G. y Soto M. (2011). Actividad antioxidante de alcaloides de *Erythrina americana*. *Fitotecnia Mexicana*. 34, 241-246.

IMSS. (2014). *Dirección de Prestaciones Médicas. Unidad de Atención Médica. IMSS. Grupo 5. Leguminosas*: <http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/pdf/cuadros-basicos/Grupo5-Leguminosas.pdf>. Recuperado el 01 de Julio de 2015.

Kakade, M., Rackis J., McGhee J. y Puski G., (1974). *Determination of Trypsin Inhibitor Activity of Soy Products a Collaborative Analysis of an Improved procedure. Cereal Chemistry*. 51, 376-386.

Krukoff, B. A. (1974). *Conspectus of species of the genus Erythrina*. *Lloydia*. 37 (3), 332-459.

McMurry, J. (2010). *Química Orgánica*, 7° Edición, Cengage Learning, Ciudad de México.

Morales, M. (2013). *Obtención, caracterización fisicoquímica y evaluación biológica de la grasa cruda y el aceite refinado de la semilla de colorín (Erythrina americana)*. Tesis de Licenciatura de la Facultad de Química, UNAM, Ciudad de México.

Moreno E, R. (2001). *Estimación de la toxicidad aguda y cuantificación de alcaloides totales en Erythrina americana en diferentes fases de desarrollo*. Tesis de Licenciatura de la Facultad de Química, UNAM, Ciudad de México.

Neill, D. (1988). *Experimental studies on species relationships in Erythrina (Leguminosae: Papilionoideae)*. Annals of the Missouri Botanical Garden., 75 (3), 886-969.

Rodríguez, G. (2011). Situación Nutricional en México. *Tercer foro del grupo de trabajo en Pobreza Alimentaria de la CNDS* . Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México.

Pérez, A., Sousa A., Hanan-Alipi F. Chiang P. y Tenorio L., (2005 ). *Vegetación terrestre*. CONABIO-UNAM, 65-110, Tabasco.

Salud., I. N. (2012). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Resultados Nacionales 2012, Secretaria de Salud y Asistencia, México*.

Secretaria de Salud. (2010). *Acuerdo Nacional para la Salud Alimentaria. Estrategia contra el sobrepeso y la obesidad: [http://www.sep.gob.mx/work/models/sep1/Resource/635/1/images/programadeaccion\\_sept.pdf](http://www.sep.gob.mx/work/models/sep1/Resource/635/1/images/programadeaccion_sept.pdf)*. Recuperado el 30 Mayo de 2015.

Shibamoto T., Bjeldanes L. (1996). *Introducción a la toxicología de los alimentos*, 2° Edición, ACRIBIA S.A., Zaragoza.

Sotelo, A., Giral F., Lucas B. & Soto M., (1993). *Comparative studies of the alkaloidal composition of two mexican Erythrina species and nutritive value of the detoxified seeds*. Journal Agricultural and Food Chemistry. 41, 2340-2343.

Valle, P., Lucas B., (2000), *Toxicología de alimentos*, <http://uniciencia.ambientalex.info/infoCT/Toxicologiaderaliemnatosar.pdf>. Recuperado el 20 de Junió de 2015.

Vasconcelos I., Oliveira. J. (2004). *Antinutritional properties of plant lectins*. *Toxico*. 44, 385-403.

Vázquez, C. (1993). *Árboles y arbustos nativos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación*.  
[http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arboles/doctos/inicio.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/inicio.pdf).  
Recuperado el 18 de Junio de 2015.

Verduzco W. y Morín R. (2013). *Obesidad: epidemia global panorama nacional*.  
*AAPAUNAM* , 179-187, Ciudad de México.