



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

Evaluación bromatológica, determinación de  
factores tóxicos y caracterización de la fracción proteica  
de la almendra de calabaza hedionda  
(*Apodanthera undulata*)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A

YADIRA GEORGINA CARRILLO ANGELES

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. BERNARDO LUCAS FLORENTINO



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: Bernardo Lucas Florentino  
VOCAL: Ortiz Palma Pérez Juan Diego  
SECRETARIO: Sandoval Guillén Bertha Julieta  
1er. SUPLENTE: Miranda Martínez Inés  
2° SUPLENTE: Sánchez Chinchillas Argelia

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Anexos 1 de los laboratorios 4A y 4C, del Departamento de Alimentos y Biotecnología, edificio A. Facultad de Química. Cd. Universitaria, México D.F.

ASESOR:

---

M. en C. Bernardo Lucas Florentino

SUPERVISOR TÉCNICO:

---

Dr. Robert Bye Boettler

SUSTENTANTE:

---

Yadira Georgina Carrillo Angeles

## ÍNDICE.

	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
III. OBJETIVOS	4
IV. ANTECEDENTES	5
1. Generalidades.	5
2. Oleaginosas y su importancia	6
3. Aislados proteicos y su importancia	7
4. Cucurbitáceas	8
4.1 Calabaza hedionda ( <i>Apodanthera undulata</i> A. Gray)	10
5. Composición Química y Toxicológica de alimentos	12
5.1 Análisis Proximal	12
6. Caracterización de la fracción Proteica	12
6.1 Necesidades diarias de proteínas	12
6.2 Proteína verdadera	13
6.3 Digestibilidad <i>in vitro</i>	13
6.4 Punto isoeléctrico de la proteína	16
7. Factores tóxicos naturales en alimentos	17
7.1 Agentes tóxicos	18
7.1.1 Glucósidos cianogénicos	18
7.1.2 Fitohemaglutininas (Lectinas)	20
7.1.3 Saponinas	21
7.2 Agentes Antinutrimientales	23
7.2.1 Inhibidores de proteasas	23
7.2.2 Taninos	24
7.2.3 Ácido oxálico	27
V. METODOLOGÍA	28
1. Análisis proximal	28
2. Caracterización de la Fracción Proteica	28

2.1 Proteína Verdadera (Nitrógeno Proteico)	28
2.2 Digestibilidad " <i>in vitro</i> "	31
2.3 Determinación del punto isoeléctrico de la proteína	33
2.3.1 Determinación de proteína soluble por el Método de Lowry	35
2.3.2 Determinación de proteína soluble en las muestras	37
3. Detección y cuantificación de Factores Tóxicos Naturales	38
3.1 Agentes Antinutrientales	38
3.1.1 Determinación de ácido oxálico	38
3.1.2 Determinación de Taninos	43
3.1.3 Determinación de Inhibidores de Proteasas	45
3.2 Agentes Tóxicos	50
3.2.1 Determinación de Lectinas	50
3.2.2 Determinación de Glucósidos cianogénicos	56
3.2.3 Determinación de Saponinas	62
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
1. Caracterización bromatológica de la fracción proteínica desengrasada de la almendra de ( <i>Apodanthera undulata</i> )	67
2. Caracterización de la fracción proteica	68
2.1 Proteína Verdadera	68
2.2 Digestibilidad <i>in vitro</i> de la fracción proteica de la almendra	69
2.3 Determinación del punto isoeléctrico de la proteína	70
3. Detección y cuantificación de Factores Tóxicos Naturales	72
VII. CONCLUSIONES	75
VIII. BIBLIOGRAFÍA	76
ANEXO	84
1. Parámetros bromatológicos.	83
1.1 Humedad	83
1.2 Proteínas	83
1.3 Grasa cruda o extracto etéreo	84

1.4 Cenizas	84
1.5 Fibra cruda	85
1.6 Carbohidratos	85
2. Metodologías para el análisis bromatológico	86
2.1 Determinación de Humedad en estufa al vacío	86
2.2 Determinación de Cenizas	87
2.3 Determinación de grasa.	89
2.4 Determinación de Proteína Cruda	90
2.5 Determinación de Fibra Cruda	94



## I. RESUMEN.

La comunidad científica busca explorar nuevas alternativas de recursos alimenticios; tal es el caso de los alimentos no convencionales. Una de las características que estos alimentos tienen es, su desconocimiento de manera generalizada en las grandes ciudades (Gutiérrez, 2001).

El presente proyecto es complementación del trabajo de tesis realizado por Hernández (2014), en el cual se le dio prioridad a la grasa obtenida de la almendra; para conocer el potencial de uso del aceite crudo y refinado de la almendra considerada una oleaginosa.

Además, también se observó que la muestra desengrasada de la almendra de *Apodanthera undulata* es un auténtico concentrado proteico, por lo que en el presente trabajo de investigación se analizó el contenido de Nitrógeno Proteico (proteína verdadera), así como la digestibilidad *in vitro* y el punto isoeléctrico de la fracción proteica de la almendra.

Se realizó también la evaluación bromatológica y la determinación de la toxicología analítica de la muestra, con la finalidad de determinar su posible aprovechamiento de este recurso en la alimentación tanto animal como humana. Se determinaron factores tóxicos que pudieran estar presentes de manera natural, tales como: Inhibidores de proteasas, ácido oxálico, taninos, lectinas, glucósidos cianogénicos y saponinas.

Dichos resultados, en complementación con lo obtenido por Hernández (2014), muestran que la almendra de *Apondatera undulata* no representa ningún riesgo para el consumo humano, que no obstante hay que corroborar con un bioensayo.



## II. INTRODUCCIÓN.

La producción de alimentos parece estar detrás del incremento masivo de la población mundial, por esta razón, es necesario explorar nuevas alternativas de recursos alimenticios que complementen a los alimentos tradicionales o convencionales, tal es el caso de los alimentos no convencionales, los cuales se pueden definir como aquellos alimentos que solo se consumen en ciertos lugares y que en otros no se conocen, por lo tanto no se consumen, no se estudian y en algunos casos se pierden. El conocer las características de estos alimentos, sus lugares de producción, su forma de consumo o su preparación y su composición química, permite preservar ese conocimiento en los lugares de consumo y además conocerlos fuera de él.

Gran parte de la superficie terrestre es de clima árido y semi-árido donde los cultivos habituales no se pueden producir económicamente, haciendo complicado el suministro de alimentos en éstas regiones áridas. Sin embargo, existen familias y especies de plantas que requieren bajas cantidades de humedad y de nutrientes, las cuales pueden tener gran potencial como fuentes de alimentos.

El uso de cucurbitáceas como alimentos ha sido documentado desde la civilización temprana en ciertos lugares del Viejo Mundo pero principalmente en América.

México es un territorio amplio, con diferentes regiones, microclimas y expresiones culturales diversas. Los alimentos que se consumen tienen algunas características ubicuas, pero en lo general cada región tiene sus alimentos específicos. Es necesaria la investigación y el desarrollo científico bien planteado en diversos aspectos de la agricultura, para poder con ello hacer más productivas estas plantas, a su vez es necesario garantizar que el consumo de éste tipo de alimentos no represente riesgo alguno para la salud de quienes lo consumen.



En la investigación previa realizada a la muestra de *Apodanthera undulata*, se determinó la presencia de algunos factores tóxicos, así como el análisis proximal de la almendra y el estudio de los parámetros fisicoquímicos de la fracción lipídica (grasa) obtenida de la almendra de calabaza hedionda (*Apodanthera undulata*).

En el presente proyecto se realiza la complementación bromatológica y de factores tóxicos naturales en la fracción proteica de la almendra, con el fin de aprovechar en forma integral éste recurso vegetal en la alimentación, para garantizar que su consumo no representa ningún tipo de riesgo para la salud de quienes lo consumen.



### III. OBJETIVOS.

#### 1. Objetivo general.

Conocer la composición química de la fracción desengrasada de la almendra de calabaza hedionda (*Apodanthera undulata*), así como la determinación de factores tóxicos naturales que pudieran estar presentes, para garantizar que su consumo no represente un riesgo a la salud y realizar la caracterización de la fracción proteica con el fin de obtener el máximo aprovechamiento de éste recurso vegetal.

#### 2. Objetivos particulares.

- Analizar la composición bromatológica de la muestra desengrasada de la almendra de calabaza hedionda (*Apodanthera undulata*), para corroborar que la muestra es un auténtico concentrado proteico además de garantizar ciertos parámetros que son indispensables para la determinación de algunos factores tóxicos.
- Determinar la cantidad de nitrógeno proteico contenido en la muestra (Proteína verdadera), para confirmar que el contenido de proteína cruda sea, en mayor parte, de origen proteico y, en menor parte de origen no proteico.
- Determinar la digestibilidad *in vitro* de la fracción proteica desengrasada para obtener una aproximación sobre la disponibilidad de la proteína de la muestra.
- Obtener el punto isoeléctrico de la proteína presente en la muestra desengrasada de *Apodanthera undulata* para sugerir las condiciones necesarias para la obtención de un aislado proteico.
- Analizar la presencia agentes antinutrimientales (Inhibidores de tripsina, ácido oxálico y taninos) y de agentes tóxicos (Saponinas, lectinas y glucósidos cianogénicos) con el fin de garantizar que el consumo de esta muestra no representa un riesgo a la salud.



#### IV. ANTECEDENTES.

##### 1. Generalidades.

Nuestro país es reconocido mundialmente como un país megadiverso; lo cual se debe por un lado a su gran diversidad biológica (donde ocupa un 4º lugar mundial) y por el otro, a su diversidad cultural (donde se asientan más de 60 grupos étnicos). Esta diversidad biocultural, a su vez, da como resultado una enorme diversidad de cocinas regionales, lo que hace de México una potencia culinaria a nivel internacional. El proceso de concientización para el consumo de plantas comestibles no convencionales ha sido un elemento clave en el quehacer científico frente a una crisis en la producción local de alimentos, producto de la ausencia de políticas públicas de apoyo al sector agrícola mexicano. Esta concientización igualmente ha llevado a reconsiderar el papel, la significancia social y el potencial nutricional de este tipo de alimentos, **donde normalmente son considerados como "alimentos para los pobres o para los animales"** (Ysunza *et al*, 2003).

Es necesaria la investigación y el desarrollo científico bien planteado en diversos aspectos de la agricultura, para poder con ello hacer más productivas estas plantas, a su vez, es necesario garantizar que el consumo de éste tipo de alimentos no represente riesgo alguno para la salud de quienes lo consumen (Al-Kanhal, 1983).

El uso de cucurbitáceas como alimentos ha sido documentado desde la civilización temprana (aproximadamente hace 10000 años) en ciertos lugares del Viejo Mundo pero principalmente en América. En la actualidad, *Cucurbita* se reconoce como un género estrictamente americano, pues todos sus miembros crecen espontáneamente o fueron domesticados en América. México es reconocido como uno de los centros de origen de la agricultura debido a las especies que estuvieron asociadas a los antiguos pobladores del país. Antes que el maíz, en nuestro país, ya se cultivaban



diversas calabazas (*Cucurbita* spp.) así como el guaje (*Leucaena* spp.) (Perales *et al*, 2008; Lira *et al*, 2009).

La domesticación en el Nuevo Mundo pudo deberse a las mismas causas que se cree operaron en el Viejo Mundo: escasez de recursos de recolección, pesca y caza, presión demográfica; cambios ambientales o transformaciones culturales. También se pueden mencionar causas secundarias como la comodidad de tener un recurso más a la mano que irlo a buscar en el bosque, especialmente si sólo requería manejo y propagación fáciles (FAO, 1992).

Las cucurbitáceas son plantas rastreras que de manera general se denominan **“calabazas y chilacayotes”**, y están caracterizadas por tener frutos de tipo baya y pepo, cuyos frutos, flores y semillas son comestible. Las calabazas y chilacayotes forman parte de nuestra Biodiversidad Humanizada, definida como **“todas aquellas plantas y animales que los humanos han alterado en sus características biológicas de abundancia y distribución. La diversidad genética que se mantiene en esta biodiversidad humanizada permite la existencia de variantes con producción satisfactoria y en medios difíciles representa un enorme valor, presente y futuro para los agricultores y para el ambiente”** (Mera *et al.*, 2011).

Por esta razón es importante conocer los factores tanto nutritivos como tóxicos que pueden estar presentes en éstos recursos vegetales.

## 2. Oleaginosas y su importancia.

Las plantas oleaginosas son muy valiosas para el ser humano y se distinguen del resto de las plantas comestibles (cereales, granos y tubérculos), porque sus frutos y semillas contienen un alto porcentaje de aceites o ácidos grasos comestibles, indispensables para la nutrición del ser humano, así como proteínas de alta calidad con la que se elaboran piensos empleados en la alimentación animal (SAGARPA, 2015).



Solamente del 5 al 6 por ciento de la producción mundial de los cultivos oleaginosos se utilizan para la obtención de semillas (semillas oleaginosas) y como alimento para animales, mientras que el 8 por ciento aproximadamente se usa como alimento. El restante 86 por ciento se elabora para convertirlo en aceite. Los hidratos de carbono, en su mayor parte polisacáridos, van del 15 al 30 por ciento en las semillas oleaginosas, pero por lo general son más escasos en otros cultivos utilizados para la extracción de aceite. El contenido en proteínas es muy alto en la soya, alcanzando hasta un 40 por ciento, pero mucho más bajo en muchas otras semillas oleaginosas (del 15 al 25 por ciento) y aún menor en algunos otros cultivos oleaginosos (FAO, 2016).

Antiguamente las porciones restantes del fruto de las cucurbitáceas, en especial la semilla eran desechados. Actualmente se ha demostrado que estos residuos, se pueden utilizar en otras aplicaciones alimentarias, como conservadores o en la alimentación animal, e incluso en países como Rumania, la proteína presente en cucurbitáceas, ha sido empleada como sustituyente de proteína de resinas en la industria del papel y cartón disminuyendo así la eliminación de residuos y el incremento de valor de estas semillas (Jacks *et al.*, 1972; Rayees *et al.*, 2013).

### 3. Aislados proteicos y su importancia.

La extracción del aceite de las semillas de plantas oleaginosas como soya, colza o girasol, entre otros, da lugar a la generación de una gran cantidad, del orden de millones de toneladas al año de harina desengrasada. Como se muestra en la Tabla 1, dicha harina presenta entre sus componentes principales proteínas y fibra las cuales pueden ser aprovechadas. Actualmente, ésta harina desengrasada es utilizada como un subproducto de bajo valor añadido que es usado fundamentalmente para la alimentación del ganado. Sin embargo, los contenidos en proteínas de estos subproductos hacen interesantes el desarrollo de procesos de



extracción de las mismas, para su utilización en otras aplicaciones, como en alimentación humana; incrementándose de esta manera el valor añadido de este subproducto. Pero estas proteínas, debido fundamentalmente al proceso de extracción del aceite, se encuentran fuertemente desnaturalizadas por lo cual es necesario el desarrollo de procesos de extracción y mejora de las mismas (Vioque *et al*, 2001).

Tabla 1. *Composición química de la harina desengrasada y del aislado proteico de girasol y garbanzo*

	Garbanzo		Girasol	
	Harina desengrasada	Aislado proteico	Harina desengrasada	Aislado proteico
Humedad	8.1	5.5	9.7	4.1
Cenizas	3.4	4.1	4.9	1.0
Fibra Total	17.3	3.0	25.1	1.0
Proteína	22.7	83.4	21.2	97.0
Lípidos	1.4	1.0	6.1	0.3
Polifenoles	0.1	0.1	2.1	0.2
Azúcares solubles	2.6	0.2	3.8	0.2
Azúcares insolubles	47.1	3.0	8.0	0.3

Fuente: (Vioque *et al*, 2001).

#### 4. Cucurbitáceas.

La familia Cucurbitaceae está constituida por 118 géneros y poco más de 830 especies, distribuidas principalmente en los trópicos y subtrópicos, con unos cuantos representantes extendiéndose a las regiones templadas de ambos hemisferios. Esta es una familia con varios componentes de gran importancia económica y cultural, pues muchas son plantas domesticadas utilizadas con fines alimenticios o de otro tipo (Lira, 2001).

Las cucurbitáceas son plantas sensibles al frío, pero con diferentes capacidades de resistir al frío y calor. De acuerdo a su distribución



ecológica se encuentran plantas mesofíticas (es decir, que viven en condiciones ambientales cálido-húmedas o sub-húmedas) y xerofíticas (aquellas que se presentan en medios áridos o zonas esteparias). Otra adaptación fisiológica es la concentración de cucurbitacinas que tienen estas plantas en frutos, hojas, tallos y raíces. Las cucurbitacinas son compuestos secundarios formados durante la fotosíntesis que confieren un sabor amargo y cierta toxicidad, aunque su función no ha sido confirmada, la hipótesis más aceptable es que brinda una protección contra herbívoros. Las especies cultivadas contienen una menor concentración de cucurbitacinas a diferencia de las especies silvestres. Algunos insectos que consumen cucurbitacinas, logran evitar el ataque de sus predadores, debido a que contienen en su sistema el sabor amargo de dichos compuestos (Mera *et al.*, 2011).

El género *Cucurbita* (calabazas) ubicado en la tribu Cucurbiteae, subfamilia Cucurbitoideae, es de origen americano y en total comprenden 20 especies, distribuidas desde Estados Unidos de América hasta Argentina (Lira, 2001).

En nuestro país se cultivan varias cucurbitáceas, tanto nativas de México como de otras partes de América, algunas especies nativas como las calabazas (*Cucurbita* spp.), el chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Swartz); la calabaza melona (*Sicana odorifera* (Vell.) Naudin), así como también algunas introducidas del Viejo Mundo, entre las que destacan el melón (*Cucumis melo* L.), el pepino (*C. sativus* L.), la sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsumura & Nakai), entre otras (Lira, 2001).

También se encuentran diversas especies silvestres; una de ellas es la calabaza hedionda o calabaza amarga (*Apodanthera undulata*). Cuyas características genéticas le permiten sobrevivir en ambientes difíciles, además de que sus almendras (o semillas) contienen un alto contenido en grasas y proteínas, reconociendo así, un excelente uso potencial, en la industria semillera, química y nutricional (Mera *et al.*, 2011).



#### 4.1 Calabaza hedionda (*Apodanthera undulata* A. Gray).

La calabaza hedionda, también conocida como calabaza amarga o calabaza loca, es una planta rastrera ampliamente distribuida desde el suroeste de Estados Unidos hasta el centro de México, en los estados de Aguascalientes, Chihuahua, Coahuila, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Nayarit, San Luis Potosí y Zacatecas. Crece en ambientes xerófilos, así como en pastizales, parcelas de cultivo abandonadas y principalmente a orillas de caminos. Es localizada en altitudes de 1800-2100 metros sobre el nivel del mar. Florece y fructifica de abril a octubre, aunque posiblemente este período pudiera extenderse a casi todo el año. Dada su frecuencia y afinidad hacia los ambientes perturbados, la planta no tiene problemas de supervivencia en la actualidad. En Guanajuato la pulpa machacada de sus frutos se emplea en medicina vernácula, mientras que en Jalisco y Zacatecas sus semillas se consumen asadas o tostadas (Lira, 2001).

La calabaza hedionda (*Apodanthera undulata*), posee una raíz engrosada y fuerte, es una planta herbácea, monoica, rastrera, áspera al tacto (Figura 1). Se extiende radialmente para formar matas de 1.5 hasta 2 metros de diámetro, usualmente despiden un olor intenso desagradable, de allí uno de sus nombres. El fruto es carnoso, de sabor amargo, con forma de un pequeño melón, de hasta 9 cm de largo y 5 cm de ancho, inmaduro es de color verde oscuro y al madurar es amarillento a anaranjado pálido (Figura 2) (Heike, 2009).

Cada fruto posee una numerosa cantidad de semillas, ovoides-elípticas, de 7 a 9 mm de largo y 5 a 7 mm de ancho (Figura 3), ápice truncado, base redondeada, lisas, el centro pardo claro a oscuro o rojizo (al menos al secar), los bordes bien definidos, son de color crema (Lira, 2006).



Figura 1. Flor, hojas y fruto de *Apodanthera undulata*.



Figura 2. Fruto seccionado por la mitad (Foto: Heike, 2009; *Apodanthera undulata*).



Figura 3. Semillas de *Apodanthera undulata*.



## 5. Composición química y toxicológica en alimentos.

### 5.1 Análisis proximal.

El análisis proximal o bromatológico está diseñado para simular el proceso de digestión. Este tipo de análisis se emplea en todo el mundo para hacer descripciones de los alimentos; y la mayoría de los requisitos legales para productos alimenticios se basan en el sistema de Weende. Es indispensable, que todo laboratorio que trabaje en experimentos de nutrición, cuente con un equipo para desarrollar el análisis proximal de acuerdo a este sistema, con el cual se obtienen seis componentes bromatológicos: humedad, proteína cruda, extracto etéreo o grasa cruda, cenizas, fibra cruda, y carbohidratos asimilables. Los cinco primeros componentes (humedad, proteína cruda, extracto etéreo, cenizas y fibra cruda) se obtienen a partir de análisis específicos, mientras que el sexto (carbohidratos) es obtenido por diferencia (Helrich, 1990).

En el Anexo se habla un poco más acerca de cada uno de los parámetros del análisis proximal.

## 6. Caracterización de la fracción proteínica.

### 6.1 Necesidades diarias de proteínas

En general, se recomiendan unos 40 a 60 g de proteínas al día para un adulto sano. Según la FAO, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Universidad de las Naciones Unidas (UNU), el nivel adecuado de consumo para un niño de un año de edad se estableció en 1,5 gramos por kilogramo de peso corporal. En los adultos, se considera que el consumo adecuado de proteína es de 0,8 g/kg<sub>pc</sub> para mujeres y de 0,85 g/kg<sub>pc</sub> para varones. Por supuesto, durante el crecimiento, el embarazo o la lactancia estas necesidades aumentan. La FAO ha planteado que la proteína de un alimento es biológicamente completa cuando contiene todos los aminoácidos en una cantidad igual o superior a la establecida para cada aminoácido requerido en una proteína de referencia o patrón, como la del



huevo, que tienen una proporción de aminoácidos esenciales utilizables en un 100% (Latham, 2002).

Para fines prácticos es posible definir a las proteínas alimentarias como las proteínas que son fácilmente digeribles, no tóxicas, nutricionalmente adecuadas, útiles en los alimentos y disponibles en abundancia. Para la nutrición de los niños, se considera que la carne, la leche y el huevo son indispensables en su dieta, pero en otros países, en especial los asiáticos, se consumen proteínas de fuentes anteriormente **consideradas como "no convencionales"**; **proteínas de soya y otras leguminosas** importantes por su balance de aminoácidos indispensables (Badui, 2006).

## 6.2 Proteína verdadera

Las legumbres así como algunas oleaginosas, contienen altas concentraciones de proteína. Sin embargo, es necesario determinar el contenido de proteína verdadera, ya que muchas de ellas contienen concentraciones sustanciales de aminoácidos no proteicos, los cuales contribuyen significativamente en la determinación del nitrógeno total. En algunos casos, más del 33% del nitrógeno total de ciertas leguminosas es nitrógeno no proteico (NNP), que causan efectos fisiológicos indeseables en animales que los consumen (Lucas *et al*, 1988).

Las plantas además de aminoácidos libres pueden contener cantidades apreciables de nitrógeno no proteico en forma de aminas, purinas, pirimidinas, nucleósidos, betaínas, porfirinas y aminoácidos no proteicos (Herrera, 2012).

## 6.3 Digestibilidad *in vitro*.

La digestibilidad de un alimento se define como la proporción del nitrógeno del mismo que es absorbida tras su ingestión (Fennema, 2000).



Los aminoácidos en los alimentos no siempre están disponibles. La degradación de las proteínas, así como su absorción puede ser incompleta. El porcentaje promedio de digestión y absorción en proteínas de origen animal es alrededor de un 90%, siendo el de las proteínas de origen vegetal de sólo un 60 a un 70% aproximadamente. Sin embargo, se ha demostrado que la digestibilidad de algunas proteínas vegetales es superior al 90% en la especie humana como se observa en la Tabla 2 (FAO, 1991; González-Torres, 2007).

La digestibilidad es uno de los indicadores más utilizados para determinar la calidad de las proteínas debido a que no todas son digeridas, absorbidas y utilizadas en la misma medida (Malca, 2004).

Aunque el contenido en aminoácidos sea el principal indicador de la calidad de la proteína, su verdadera calidad depende también de la extensión en que estos aminoácidos sean utilizados por el organismo. Por ello, la digestibilidad puede afectar a la calidad proteica (Fennema, 2000).

Hay varias razones que limitan la digestibilidad de ciertas proteínas:

- Conformación de la proteína: las proteasas intestinales atacan a las proteínas fibrosas insolubles más lentamente que a las proteínas globulares solubles. Pero, la digestibilidad puede ser fácilmente incrementada por la desnaturalización de la proteína, por ejemplo con un tratamiento térmico previo.
- La unión a ciertos metales, lípidos, ácidos nucleicos, celulosa u otros polisacáridos, puede limitar parcialmente su digestibilidad.
- Factores antinutricionales como los inhibidores de tripsina o quimotripsina u otros inhibidores que afecten a la absorción de aminoácidos.
- El tamaño y superficie de la partícula donde se encuentran las proteínas. La digestibilidad de las proteínas de los cereales puede ser incrementada por ejemplo, mediante el molido más fino de la harina (Fennema, 2000).



Tabla 2. Digestibilidad de las proteínas de varios alimentos en la especie humana.

Fuente de proteína	Digestibilidad (%)	Fuente de proteína	Digestibilidad (%)
Huevos	97	Mijo	79
Leche, queso	95	Guisantes	88
Pescado, carne	94	Cacahuates	94
Maíz	85	Harina de soya	86
Arroz (pulido)	88	Refinado de proteína de soya	95
Trigo (entero)	86	Ejotes	78
Harina de trigo (blanca)	96	Maíz, cereal	70
Gluten de trigo	99	Trigo, cereal	77
Harina de avena	86	Arroz, cereal	75

Fuente: FAO/WHO,1991.

Se han desarrollado técnicas para la determinación de la calidad proteica, tales como: los bioensayos, métodos químicos, métodos microbiológicos y métodos enzimáticos. Los bioensayos o métodos *in vivo* se basan ya sea en la determinación del crecimiento o en la retención de nitrógeno, en función del consumo de proteína, en donde las ratas son los animales experimentales más utilizados. Los métodos químicos por su parte, miden el contenido de aminoácidos indispensables y lo comparan con los patrones de referencia establecidos por instituciones internacionales. Los métodos microbiológicos evalúan el crecimiento de microorganismos cuyos requerimientos de aminoácidos indispensables son similares a los del ser humano. Como alternativas más simples que los bioensayos existen distintos métodos enzimáticos para estimar la digestibilidad, los métodos *in vitro* son ejemplos de ello, ya sea por una caída de pH tras la adición de una mezcla enzimática, o según la cantidad de NaOH requerida para mantener constante un cierto valor de pH durante una digestión hecha en laboratorio. Se ha reconocido la utilidad de estas técnicas, pero no se les ha utilizado ampliamente porque no puede asumirse que todos los aminoácidos liberados a partir de la digestión *in*



*in vitro* serán absorbidos y utilizados al ingerir el alimento que contenga la proteína en cuestión (Badui, 2006).

Los métodos *in vitro* tienen la ventaja de determinar la disponibilidad de la proteína en alimentos que han sido sometidos a algún proceso, siendo métodos relativamente rápidos y de mayor precisión y en consecuencia menos costosos que los métodos biológicos (Horwitz, 2005).

#### 6.4 Punto isoeléctrico de la proteína.

Las proteínas son macronutrientes esenciales para la nutrición humana y animal que habitualmente forman parte de los propios alimentos en su forma natural. Además de su papel básico en la nutrición, las proteínas poseen características fisicoquímicas que otorgan propiedades funcionales muy específicas al ser adicionadas a ciertos alimentos. Por esta razón el desarrollo tecnológico de la industria alimentaria ha recurrido en forma habitual a la utilización de productos proteicos con fines funcionales-tecnológicos, encaminados a dotar de propiedades físico-químicas y organolépticas a los alimentos donde son incorporadas. Este hecho ha llevado a las proteínas, más allá de su actividad como macronutriente a ser un producto necesario como ingrediente en la producción tecnológica de alimentos. A partir de esta necesidad, se desarrollaron los procesos necesarios para aislar o extraer las proteínas de sus fuentes orgánicas originales, obteniéndose así los denominados concentrados y aislados proteicos, que constituyen un purificado proteico a partir del alimento o fuente orgánica inicial (Silva, 2006).

Por definición un concentrado proteico contiene de un 50 a un 70% de proteína en base seca, y se preparan de harinas u hojuelas desengrasadas que han sufrido un procedimiento de extracción para remover los azúcares solubles y otros constituyentes menores. El aislado es la proteína más refinada que existe y se caracteriza por un contenido de



proteína mínimo del 90% en base seca. Así como el concentrado, el aislado también se prepara a partir de harinas o de hojuelas desengrasadas. Para la obtención de concentrados y aislados proteicos, es fundamental conocer su punto isoeléctrico, es decir, el valor de pH en el cual la proteína presenta su mínima solubilidad y por tanto precipita (De Luna, 2007).

Aislados proteicos desde fuentes no convencionales podrían tener un alto valor como ingredientes funcionales, en nutrición para fortificación de alimentos o en aplicaciones para cosméticos y farmacéuticos. A pesar de que proteínas vegetales aisladas podrían tener un alto valor como ingredientes funcionales, en la actualidad sólo las de soya son ampliamente utilizadas; la industria alimentaria se encuentra en la búsqueda de proteínas alternativas que puedan competir con las que actualmente dominan el mercado; fracciones proteicas derivadas de semillas de procesadoras de frutas pueden poseer una buena calidad nutricional y características funcionales similares e incluso superiores a las de las proteínas de soya, pero no han sido estudiadas en detalle, entre ellas podemos incluir las proteínas de la semilla de *Apodanthera undulta* (Martínez, 2012).

## 7. Factores tóxicos naturales en alimentos.

El origen de los factores tóxicos en alimentos, se puede considerar de cuatro fuentes principales: naturales, intencionales, accidentales y generadas por el proceso, aunque en algunos casos, los tóxicos pueden pertenecer a más de una categoría. Los tóxicos naturales pueden causar problemas ocasionalmente debido a que pueden encontrarse inesperadamente en alimentos con una concentración mayor a la normal, o pueden confundirse especies tóxicas con inocuas, como sucede frecuentemente con algunos hongos comestibles. Es conveniente diferenciar las sustancias xenobióticas que causan daño cuando son



ingeridas a través de los alimentos (aquellas que producen un daño directo sobre un órgano o tejido), de las que interfieren con la biodisponibilidad de algún nutrimento, clasificando estos xenobióticos, como agentes tóxicos y agente antinutrimientales respectivamente (Valle, 2005).

## 7.1 Agentes tóxicos

Agente o auténtico tóxico se denomina a cualquier sustancia xenobiótica capaz de producir una anomalía fisiológica y/o anatómica a corto plazo (conocida como toxicidad aguda o subaguda), la cual no puede ser atenuada por una simple fortificación o suplementación del alimento (Valle, 2005).

### 7.1.1 Glucósidos cianogénicos

El cianuro en cantidad de trazas, está ampliamente distribuido en las plantas, en donde se encuentra principalmente en forma de glucósidos, ya que son productos intermediarios en la síntesis de algunos aminoácidos (Valle, 2005).

Los glucósidos cianogénicos están formados por un azúcar y una cianohidrina como se muestra en la Figura 4 que, a través de la acción de **una enzima ( $\beta$ -glucosidasa)**, pueden separarse, quedando disponible el HCN (ácido cianhídrico) tal como lo ilustra la Figura 5, ejerciendo su efecto tóxico en el organismo. La  $\beta$ -glicosidasa, que espacialmente está separada del glucósido cianogénico, puede unirse al sustrato (glucósido) durante la masticación, o por efectos de marchitamiento, pisoteo, congelación o sequía. El HCN en la sangre se disocia en  $H^+$  (protones) y en  $CN^-$  (ion cianuro) quien actúa a nivel de la citocromo oxidasa (enzima fundamental en la cadena de transporte de electrones en la respiración celular), disminuyendo severamente la mayoría de funciones metabólicas y hemodinámicas (Arrázola, 2002).

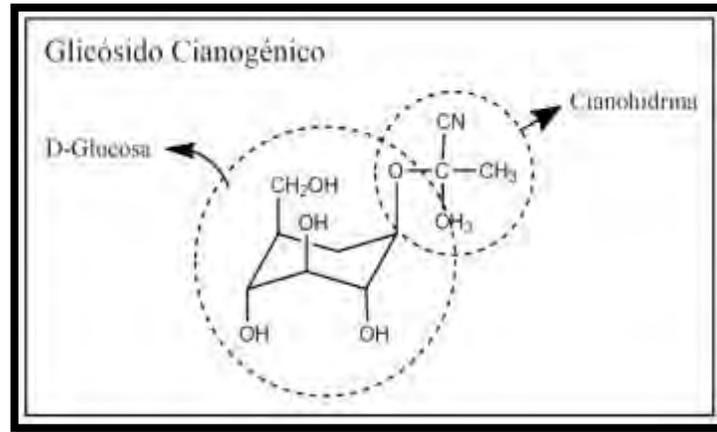


Figura 4. Estructura general de los glucósidos cianogénicos. Fuente: (Arrázola, 2002).

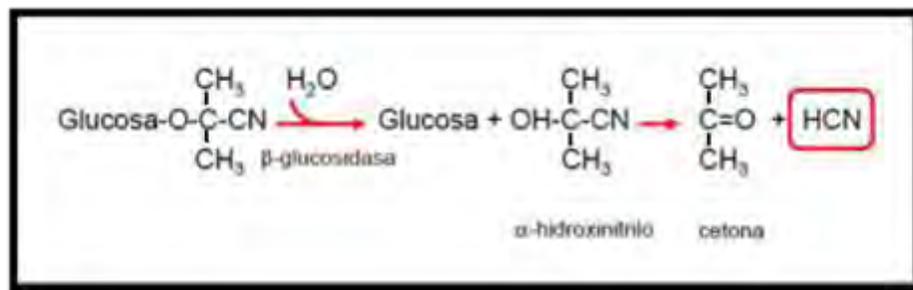


Figura 5. Acción de la  $\beta$ -glucosidasa sobre el glucósido cianogénico. Fuente: (Arrázola, 2002)

En la naturaleza se estima que hay más de 100 especies que contienen glucósidos cianogénicos; presentándose también en algunas plantas comestibles para humanos o ganado. En la Tabla 3 se muestra el contenido de HCN en algunas de estas plantas (Valle, 2005).

El glucósido no es tóxico por sí mismo, pero el  $\text{CN}^-$  generado por la hidrólisis enzimática sí lo es, ya que actúa a nivel de citocromo oxidasa; es decir que es un potente inhibidor de la cadena respiratoria, provocando falta de oxigenación en la célula y por tanto la muerte celular. El cianuro ingerido es rápidamente absorbido por la parte superior del tracto gastrointestinal. Las características clínicas por envenenamiento agudo con HCN son: confusión mental, parálisis muscular generalizada y paro respiratorio (Alvarado, 1999).



Tabla 3. Contenido de HCN en alguna plantas

Vegetal	HCN (mg/100g)
Frijol ( <i>Phaseolus lunatus</i> )	14.4-167.0
En ciertas variedades	210.0-312.0
Sorgo café ( <i>Sorghum bicolor</i> )	250.0
Yuca ( <i>Manihot utilissima</i> )	113.0
Linaza ( <i>Linum usitatissimum</i> )	53.0
Ejotes ( <i>Phaseolus sp.</i> )	2.0
Chícharo ( <i>Pisum sativum</i> )	2.3

Fuente: Valle, 2005.

La DL<sub>50</sub> del HCN, administrada oralmente, es 0,5–3,5 mg/kg. Por lo que, según la Tabla 3, ingerir 100 g de una semilla cruda produciría consecuencias fatales, en especial en niños y ancianos. Otras semillas de fruta que contienen CN<sup>-</sup> son: almendras de duraznos, cerezas, ciruelas, manzanas, capulines entre otros. También se ha reportado que valores por debajo de 10 mg<sub>HCN</sub>/100 g<sub>muestra</sub> no pueden considerarse como de riesgo para la salud de quien lo ingiere (Badui, 2006).

#### 7.1.2 Fitohemaglutininas. (Lectinas)

Las proteínas de las legumbres y de las semillas oleaginosas pueden también contener lectinas, se les denomina también fitohemaglutininas por su propiedad de aglutinar los eritrocitos de la sangre humana o de otros animales. Las lectinas son glicoproteínas y exhiben una alta afinidad por los carbohidratos complejos como los que se muestran en la Tabla 4, algunos de ellos forman parte de la estructura de las membranas celulares de la mucosa intestinal, alterando su morfología y sus propiedades de transporte, dificultando así la digestión de proteínas y la absorción de nutrientes. Debido al daño al tracto gastrointestinal que pueden ocasionar estas proteínas algunos autores las denominan como enterotoxinas (Liener, 1964; Toms, 1971).

Debido a su naturaleza proteica, la actividad biológica de las lectinas puede ser inactivada térmicamente. Por ejemplo, en leguminosas, se ha



demostrado que la actividad aglutinante puede reducirse substancialmente si se realiza un remojo en agua y una cocción a 100°C, con tiempo de cocción que va desde los 30 minutos hasta las 4 horas o más, si el calentamiento es a temperaturas menores de 70 u 80°C, la actividad aglutinante aumenta, en algunos casos en un factor de siete (Flores, 2010).

Tabla 4. Tipo de Lectinas presentes en algunos alimentos.

Carbohidrato específico unido a la lectina	Ejemplo de alimento vegetal que lo contiene
D-manosa, D-glucosa	Haba ( <i>Vicia faba</i> ), Jack-bean ( <i>Canavalia ensiformis</i> ) Lenteja ( <i>Lens culinaris</i> ) y Chícharo ( <i>Pisum sativum</i> ).
D-galactosa	Ricino ( <i>Ricinus communis</i> )
Ácido N-acetilneurámico	Frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )
2, N-Acetilgalactosamina.	Frijol de lima ( <i>Ph. lunatus</i> )
2, N-Acetilglucosamina	Papa ( <i>Solanum tuberosum</i> ), Trigo ( <i>Triticum vulgaris</i> )
2-N-Acetilgalactosamina	Soya ( <i>Glycine max</i> )

Fuente: Valle, 2005.

Independientemente del origen de estas proteínas los efectos tóxicos que producen son los mismos, variando únicamente la intensidad de tal efecto. El efecto dañino es una intensa inflamación de la mucosa intestinal y la destrucción del epitelio intestinal provocando diarreas y edemas, y dependiendo de la especificidad de la hemaglutinina se produce una interferencia en la absorción de aminoácidos, y por lo tanto hipoglicemia y pérdida de peso y en algunos casos la muerte (Zárate, 2003; Valle, 2005).

### 7.1.3 Saponinas.

Las saponinas también pertenecen al grupo de los glucósidos y se encuentran en una gran variedad de plantas, muchas de ellas comestibles. Son del tipo anfifílico, cuya parte polar la constituyen los azúcares (hexosas, pentosas y ácidos urónicos) enlazados a un grupo no polar llamado sapogenina (aglicona) la cual puede ser de naturaleza esteroideal, con 27 átomos de carbono, o de origen triterpenoide de 30 carbonos como



se ilustra en la Figura 6. La composición química de las saponinas depende de la especie y de las variedades vegetales en que se presentan (Valle, 2005).

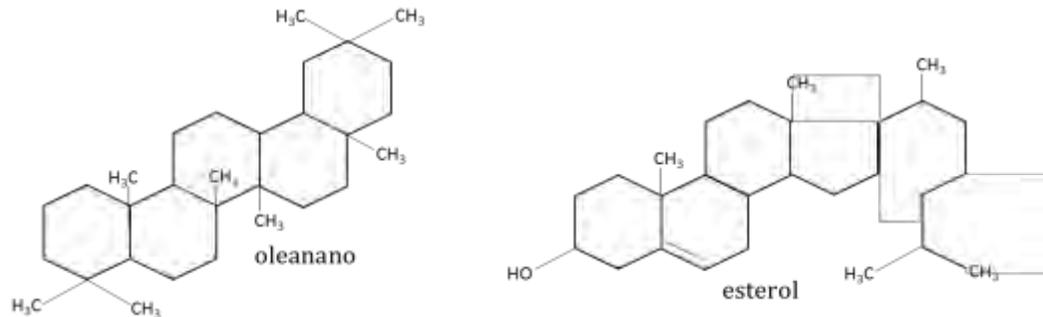


Figura 6. Estructura básica de saponinas esteroidales (oleanano) y triterpenoide (esterol). Fuente: (Badui, 2006) (22)

Son glucósidos amargos que pueden causar hemólisis en eritrocitos. En general son inodoras, de difícil cristalización, sus soluciones coloidales, al producir espuma, reducen fuertemente la tensión superficial por lo que pueden estabilizar las emulsiones de grasas y aceites, tienen propiedades estornutatorias, irritando ojos y piel al frotarlas, son termorresistentes, forman complejos con el colesterol y otros hidroxiesteroles (Zárate, 2003).

Se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal: soya, alfalfa, betabel, espinacas, espárragos, avena y garbanzo; también se encuentran presentes en el veneno de las serpientes y en el de las estrellas marinas (Badui, 2006).

En semillas monocotiledóneas se conocen más de doscientas saponinas esteroidales y en las dicotiledóneas los tipos de saponinas son triterpenoides (Fernández, 1996).

En algunos productos alimenticios, el contenido de saponinas por ingestión oral no es tóxica para el hombre; sin embargo, la dosis letal media (DL<sub>50</sub>), estudiada en perros, conejos, ratas y ratones va desde 25 a 3000 mg/Kg<sub>pc</sub>, dependiendo tanto de la fuente de la saponina, como del animal en estudio. Las saponinas crean lesiones gastrointestinales y si



pasan a la corriente sanguínea pueden hemolizar las células de los glóbulos rojos, pudiendo producir fallas en la respiración, convulsiones y coma; sin embargo también se ha observado que la actividad hemolítica es contrarrestada por el plasma sanguíneo o por el colesterol dejando en duda si son realmente tóxicos *in vivo* (Zárate, 2003; Valle, 2005).

Actualmente, en ciertos países se emplean en cantidades adecuadas y se usan en bebidas por su sabor amargo y su capacidad para formar espumas (Badui, 2006).

## 7.2 Agentes antinutrientales.

Los agentes o factores antinutricionales son sustancia presentes 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 (Valle, 2005).

### 7.2.1 Inhibidores de Proteasas.

Los inhibidores de proteasas son muy frecuentes en los recursos vegetales, inhibiendo los sistemas enzimáticos de organismos vivos, en especial de sus depredadores (microorganismos, insectos, y en monogástricos). Gran parte de los alimentos de origen vegetal, presentan inhibidores de proteasas; sin embargo, cabe destacar que la presencia de los inhibidores de tripsina en alimentos de origen vegetal, se presenta mayormente en la semilla. Los inhibidores de tripsina pueden coexistir en la misma planta con otros inhibidores proteolíticos, tal como se puede observar en la Tabla 5 (Badui, 2006).



Tabla 5. Origen de inhibidores de proteasas y tipo de proteasa inhibida.

Nombre científico	Nombre común	Parte de la planta	Enzima inhibida
<i>Araquis hypogea</i>	Cacahuete, maní	Nuez o semilla	T, Q, PL
<i>Avena sativa</i>	Avena	Endospermo	T
<i>Beta vulgaris</i>	Betabel	Tubérculo	T
<i>Brassica rapa</i>	Colza	Semilla	T
<i>Cicer arietinum</i>	Garbanzo	Semilla	T
<i>Glicine max</i>	Soya	Semilla	T, Q, E, PL
<i>Oryza sativa</i>	Arroz	Semilla	T, S
<i>Phaseolus coccineus</i>	Frijol francés, ayocote	Semilla	T, Q.
<i>Phaseolus lunatus</i>	Frijol de lima	Semilla	T, Q
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Frijol común	Semilla	T, Q, E
<i>Pisum sativum</i>	Chícharo	Semilla	T, PL
<i>Solanum tuberosum</i>	Papa	Tubérculo	T, Q, E, PL
<i>Vicia faba</i>	Haba	Semilla	T, Q, PL
<i>Zea mays</i>	Maíz	Semilla	T

T=tripsina; Q= Quimotripsina; E=elastasa; PL =plasmina.

Fuente: (Badui,2006) (22)

La mayor parte de los refinados de proteínas vegetales y de los concentrados de las mismas contienen inhibidores de proteasas (de tipo Kunitz y Bowman-Birk). Estos inhibidores dificultan la hidrólisis total de las proteínas de leguminosas y de semillas oleaginosas por las proteasas pancreáticas (como la tripsina y la quimotripsina). Los inhibidores de proteasas del tipo Kunitz son termolábiles, en tanto que los inhibidores del tipo Bowman-Birk son estables frente a los tratamientos térmicos normales. Por ello, las proteínas de leguminosas y de las semillas de oleaginosas tratadas por el calor suelen ser más digeribles que los refinados proteicos nativos (Fennema, 2000).

### 7.2.2 Taninos.

Son compuestos fenólicos solubles en agua, que contienen un gran número de grupos hidroxilo y otros grupos funcionales con los que se unen a proteínas y otras macromoléculas de manera inespecífica, poseen una actividad antinutricional, que en altas concentraciones provoca daños en la mucosa gastrointestinal, excreción de cationes y una disminución en la absorción de proteínas; sin embargo, recientemente se le asocian



propiedades positivas para la salud, ya que son moléculas que actúan como agentes anticancerígenos, antimicrobianos, antidiarreicos, antihipertensivos, antiinflamatorios, entre otras propiedades benéficas (Chung *et al*, 1998; Dueñas, 2003; Oña 2010).

Se define a los taninos como compuestos fenólicos de alto peso molecular, y con una cantidad adecuada de grupos hidroxifenólicos y otros grupos sustituibles como grupos carboxilos, para formar complejos resistentes con proteínas y otras macromoléculas (Oña, 2010).

Su capacidad como precipitantes de proteínas se ha utilizado en la curtiduría de pieles, el mecanismo es una interacción de los taninos con las cadenas peptídicas, que establece uniones resistentes al agua y al calor. Esta combinación de los taninos con las proteínas forma precipitados resistentes al ataque microbiano, lo que impide la putrefacción (Badui, 2006).

La principal característica de los taninos es que pueden ligarse a las proteínas. Históricamente se creía que los taninos ligaban y precipitaban todas las proteínas de manera no específica; pero actualmente se sabe que las interacciones tanino-proteína, son específicas y dependen de la estructura de la proteína. Una proteína de cadena más larga es favorable para la formación del complejo; esta interacción se intensifica con la movilidad conformacional y el peso molecular de los taninos (Oña, 2010).

Los taninos se pueden encontrar en las plantas en dos formas principales, taninos hidrolizables (TH) o pirogálicos y taninos no hidrolizables o condensados (TC). Su peso molecular varía normalmente de 500 a 3,000 Dalton; por su estructura presentan propiedades reductoras. Los (TH) son sustancias poliméricas complejas que a su vez se clasifican en galotaninos cuando derivan del ácido gálico, y elagitaninos cuando provienen del ácido elágico, dímero del ácido gálico. Por su parte, los taninos no hidrolizables o condensados son dímeros de la catequina (flavan-3-ol) o de antocianidinas (flavan-3,4-diol); mostrados en la Figura



7, la principal importancia de los taninos es la capacidad que tienen de formar complejos estables con las proteínas, precipitándolas y protegiéndolas de la digestión enzimática, haciendo a la proteína indigerible (Solano, 1997; Badui, 2006).

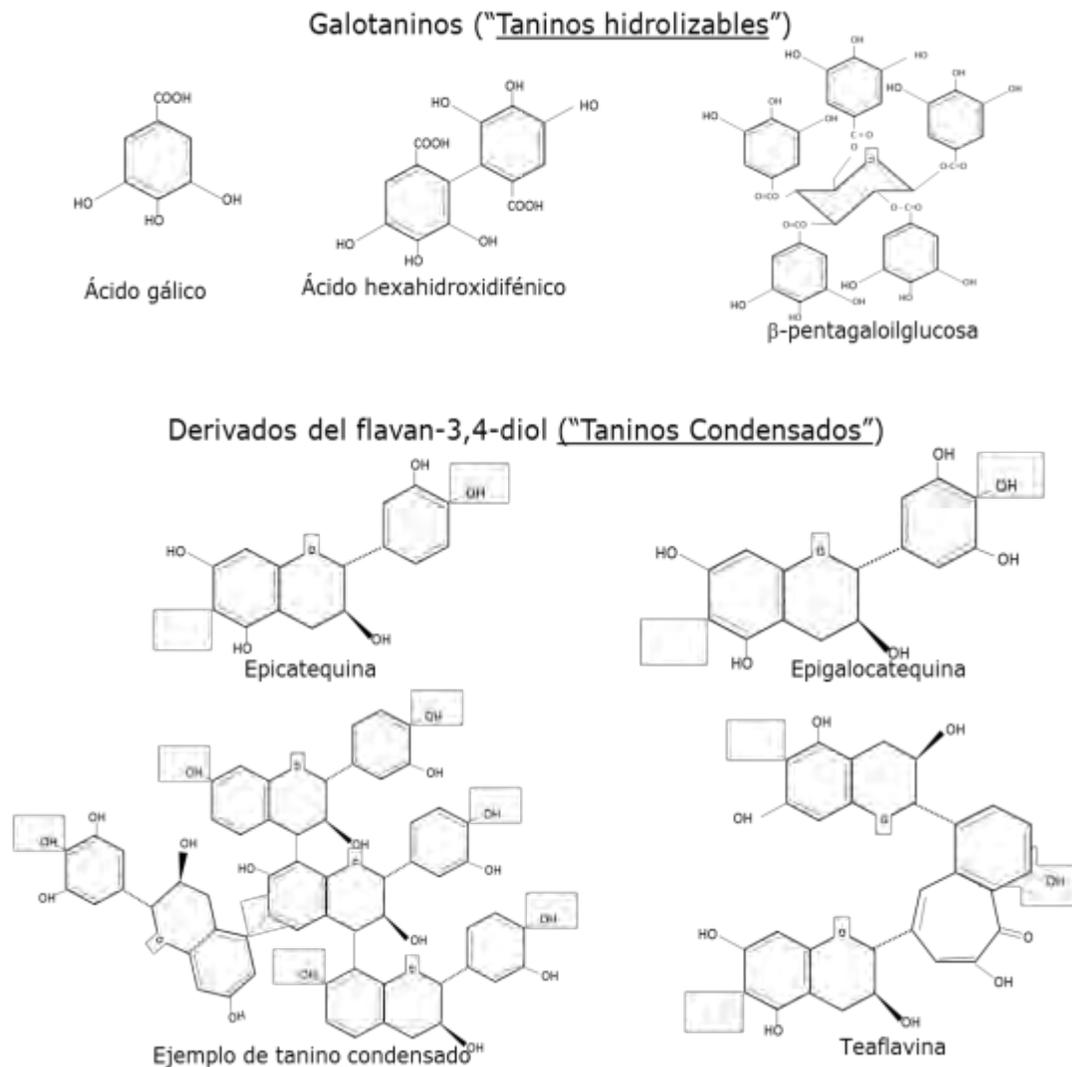


Figura 7. Estructura de los taninos de los tejidos vegetales. Generalmente, los taninos se clasifican en dos grupos "condensados" e hidrolizables. (Fuente: Fennema, 2000).

La mayoría de los animales no metabolizan los complejos que se forman entre proteínas y taninos, lo que hace que se reduzca el valor nutritivo del alimento; las interacciones de estos dos conjuntos se favorecen a temperaturas altas y en ciertas condiciones de pH y de fuerza iónica (Badui, 2006).



### 7.2.3 Ácido oxálico.

Se encuentra de manera natural en algunos alimentos como espinacas, acelgas, etc. El problema principal que determina el oxalato es el de la disponibilidad de calcio en la ración alimentaria, ya que se combina con el calcio presente, formando un complejo insoluble; además de que la ingesta de altos niveles de oxalato puede producir hiperoxaluria, conduciendo a cálculos en el riñón y vejiga, y en el extremo, edema renal y calcificación (Peña, 2007).

El ácido oxálico puede inducir efectos antinutritivos. Para los humanos, puede ser ligeramente tóxico. Sin embargo, se requieren dosis masivas de 4 a 5 g para inducir algún efecto tóxico.

Existe una variedad de vegetales y alimentos que contienen cantidades considerables de oxalato, en la Tabla 6 se presentan algunos de estos alimentos (Peña, 2007).

Tabla 6. *Contenido de oxalato en alimentos*  
(contenido por 100 g de alimento)

>100 mg	70-100 mg	40-70 mg
Betabel Manteca de cacao Perejil Cacahuete Espinaca Ruibarbo Acelga Té Germen de trigo	Col rizada Puerro Quimbombó	Zarzamora Apio Camote

Fuente: Peña (2007).



## V. METODOLOGÍA.

En la Figura 8, se muestra el diagrama general de trabajo para la muestra desengrasada de la almendra de *Apodanthera undulata*.

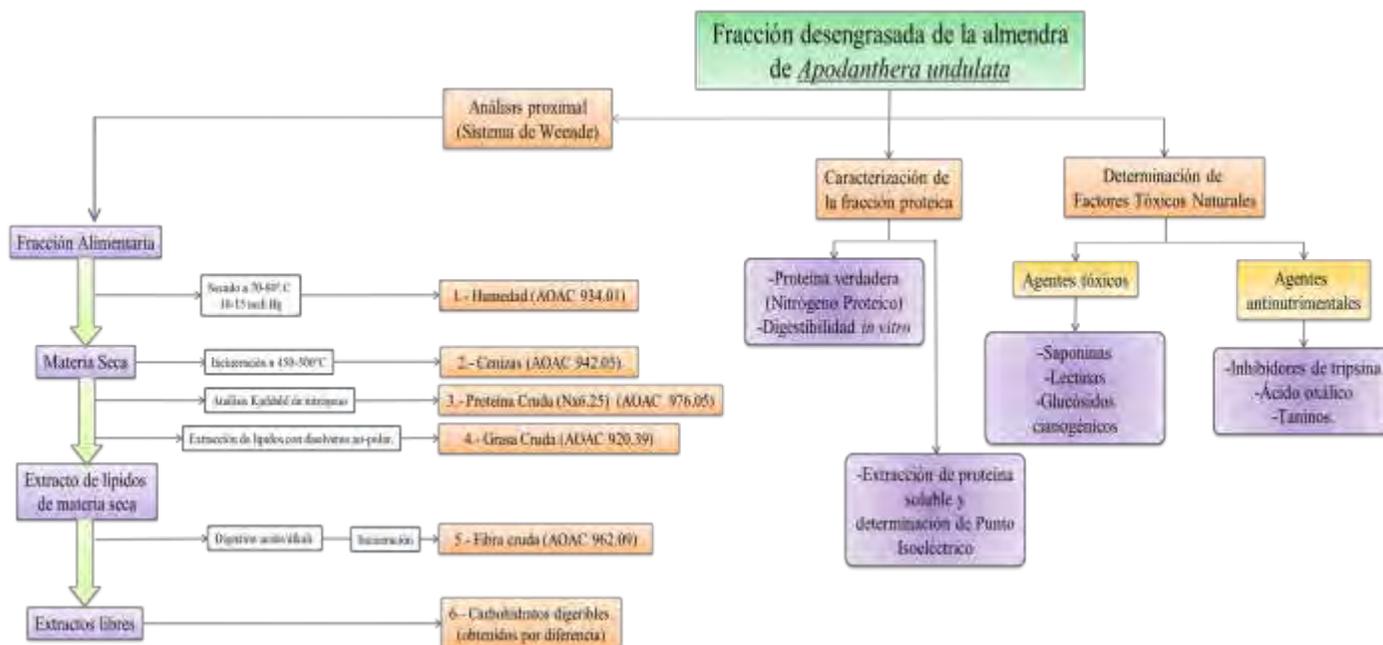


Figura 8. Diagrama general de trabajo

### 1. Análisis Proximal.

La determinación de los parámetros bromatológicos: humedad, cenizas, grasa, fibra, proteína y carbohidratos asimilables (estos últimos obtenidos por diferencia) se basó en el sistema de Weende como se muestra en la Figura 8 y las metodologías están establecidas por la AOAC.

En el Anexo se explica de manera detallada cada una de las metodologías del análisis proximal.

### 2. Caracterización De La Fracción Proteica

#### 2.1 Proteína Verdadera (Nitrógeno Proteico)

Altas concentraciones de aminoácidos no-proteicos, pueden dar resultados falsos del contenido de proteína (reportado comúnmente como proteína cruda). La técnica para la determinación de proteína verdadera se



basa en la solubilización del nitrógeno no proteínico (NNP) y de la proteína soluble, y la posterior precipitación de la dicha proteína con tungstato de sodio, con el fin de eliminar el nitrógeno no proteico que pueda contribuir en la determinación de nitrógeno proteico por medio de un micro-Kjeldahl, obteniendo el contenido real de nitrógeno proteínico presente en la muestra. La determinación fue realizada similarmente a la establecida para proteína cruda, eliminando la fracción de nitrógeno soluble, previa precipitación de la proteína soluble (Lucas *et al.*, 1988).

### Materiales

- Balanza analítica Sartorius extend.
- Microdigestor marca TECATOR mod. Ab-20/40
- Microdestilador marca LABCONCO, Kjeltec Auto 1030 Analyzer.
- Agitador Magnético
- Barras Magnéticas de 12x5 mm
- Papel Whatman #50 de 5 cm diámetro (poro cerrado) o equivalente.
- Tubos de digestión Tecator de 100 mL.

### Reactivos

- Mezcla digestiva (a)
  - Peróxido de hidrógeno al 30%
  - Solución de ácido bórico con indicadores (b)
  - metilo aforados a 100 mL con alcohol etílico
  - Sulfato de potasio (reactivo analítico)
  - Solución de hidróxido de sodio al 40% (p/v)
  - Solución de ácido clorhídrico 0.01N valorada
  - Solución Precipitante (c)
- Indicador A: 100 mg fenofaleína aforados a 100mL con alcohol etílico.
- Indicador B: 33 mg de verde de bromocresol y 66 mg de rojo de



(a) *Mezcla digestiva*: Se preparó disolviendo 3g de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) en 100 mL de ácido ortofosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ); y 300 mL de ácido sulfúrico concentrado resbalando por la pared del recipiente. Agitando por aproximadamente 30 minutos.

(b) *Solución de ácido bórico con indicadores*: Se pesaron 10 g de ácido bórico colocándolos en un matraz aforado de 2 L; se adicionó agua agitando hasta disolverlo, a continuación se agregaron 70 mL del indicador A y 20 mL del indicador B. Se ajustó el color a un tono café rojizo con ácido o álcali según se requería y se aforaron a 2 L con agua destilada.

(c) *Solución Precipitante*: Se preparó disolviendo 5 g de tungstato de sodio y 1.51 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  en 20 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , añadiendo 22 mL de HCl 2N y mezclando, se aforó a 50 mL con agua destilada.

Procedimiento:

*Proceso de Precipitación:*

Se pesaron 50 mg de muestra de harina finamente molida y desengrasada, se agregaron 5 mL de agua caliente y se agitó mecánicamente por 15 minutos, se adicionaron 2 mL de solución precipitante, dejando reposar durante 10 minutos; transfiriendo cuantitativamente para su filtración en papel (Whatman #50 ó 542) utilizando 25 mL de agua destilada caliente y ligera succión.

*Proceso de digestión:*

Se colocó el papel filtro con el precipitado en un tubo de digestión, más 0.5 g de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  y 5 mL de mezcla digestiva, se sometió a digestión durante 15 minutos a una temperatura de  $340^\circ\text{C}$ , se retiraron del digestor dejando enfriar el tubo para adicionarle 3 mL de peróxido de hidrógeno 30% y colocarlo nuevamente en el digestor que se encontraba a una



temperatura de 370°C. Se consideró la digestión realizada cuando el tubo no mostró manchas ni puntos negros y además la mezcla de digestión presentó un ligero tono verde-azuloso.

Una vez efectuada la digestión se dejó enfriar el tubo y se procedió a realizar la destilación en el destilador Kjelttec.

Cálculos:

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

$\%N_2$  = Nitrógeno contenido en la muestra (expresado en g N<sub>2</sub>/100g<sub>muestra</sub>)

P = mL de la titulación de la muestra

B = mL de la titulación del blanco

N = normalidad de la solución de HCl

$m_{eq}$  = miliequivalente de nitrógeno (0.014)

m = peso de la muestra (en gramos)

$$\%Proteína\ verdadera\ (\%Nitrógeno\ proteico) = \%N_2 \times F$$

F = factor de conversión; cuando se considera que la proteína de la muestra contiene un 16% de nitrógeno F=6.25

## 2.2 Digestibilidad *in vitro*

La determinación de la digestibilidad *in vitro* se basa en un sistema enzimático, creando un medio muy similar al del organismo digiriéndose las proteínas, se lleva a cabo dentro de un sistema multienzimático en condiciones estandarizadas, asumiendo que por cada enlace peptídico se produce un protón [H<sup>+</sup>], el cambio del pH está relacionado a la hidrólisis de la proteína, por lo que la medición en el cambio de pH determinará la digestibilidad de la proteína de la muestra (Horwitz, 2005).

## Materiales

- Potenciómetro con una pendiente >95%
- Baños de agua



- Contenedores de vidrio con camisa para recirculación de agua
- Matraz aforado de 10 mL
- Agitadores magnéticos de ½ in (tipo arroz)
- Espátulas
- Naves de vidrio para pesar
- Pipeta volumétrica de 10 mL
- Parrilla de agitación
- Pipeta volumétrica de 1 mL
- Cronómetro digital (triple tiempo)

### Reactivos

- Buffers de referencia (pH=2, 4, 7 y 10)
- *Solución enzimática A* (aforar a 10 mL con agua destilada).
  - Tripsina pancreática porcina (tipo IX) Sigma (T-0134): 227,040 unidades BAEE de tripsina
  - Peptidasa intestinal porcina (Grado I) Sigma (P7000): 2,321 unidades de peptidasa
  - $\alpha$ -quimotripsina pancreática bovina (tipo II) Sigma (C-4129): 1,860 unidades BAEE de  $\alpha$ -quimotripsina.
- *Solución enzimática B* (aforar a 10 mL con agua destilada)
  - Proteasa bacteriana Sigma (P-5147) (65 unidades de caseína de proteasa)
  - Estándar de caseína liofilizada
  - NaOH 2N, 1N, 0.1 N y 0.05N (preparar 10 mL de cada una)
  - HCl 0.1 N y 0.05 N (preparar 10 mL de cada una)

### Procedimiento:

Se pesó la cantidad de caseína (proteína de referencia) o de muestra que contenga 10 mg de nitrógeno, depositándola en un contenedor de vidrio especial junto con una barra magnética de tamaño arroz.

Se adicionaron 10 mL de agua destilada con pipeta volumétrica, haciendo recircular el flujo de agua a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5$  durante una hora.



Transcurrido el tiempo se ajustó el pH de a  $8.00 \pm 0.03$  con HCl y NaOH diluido.

Se adicionó 1 mL de solución A y se dejó en agitación a  $37^{\circ}\text{C}$  exactamente durante 10 minutos.

Transcurrido exactamente ese tiempo se adicionó 1mL de la solución B y realizando el cambio de recirculación de agua a  $55^{\circ}\text{C}$ .

A los 9 minutos exactos después de añadida la solución B, se realizó nuevamente el cambio de recirculación del baño a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Exactamente a los 20 minutos de añadida la solución A, se realizó la lectura del pH introduciendo el electrodo en el vaso especial.

### Cálculos

El porcentaje de digestibilidad se obtiene al sustituir el valor del pH obtenido en la siguiente fórmula:

$$\% \text{Digestibilidad} = 234.84 - 22.56 (\text{Lectura de pH})$$

Se consideraron los resultados confiables cuando la muestra de caseína (proteína de referencia) dio un pH de  $6.42 \pm 0.05$  es decir una digestibilidad de al menos 88.88%

### 2.3 Determinación del punto isoeléctrico de la proteína.

A valores de pH inferiores o superiores a su punto isoeléctrico, las proteínas tienen cargas netas positivas o negativas, respectivamente. Si se representa gráficamente la solubilidad en función del pH, la mayor parte de las proteínas de los alimentos exhiben tendencia en forma de U. La solubilidad mínima se da a un pH aproximadamente idéntico al isoeléctrico, debido a la ausencia de repulsiones electrostáticas, promoviendo la agregación y precipitación de la proteína (Fennema, 2000).



## Materiales

- Bomba de agua
- Vasos de vidrio para digestibilidad y mangueras para recirculación.
- Potenciómetro.
- Parrilla de calentamiento y agitación múltiple
- Centrífuga

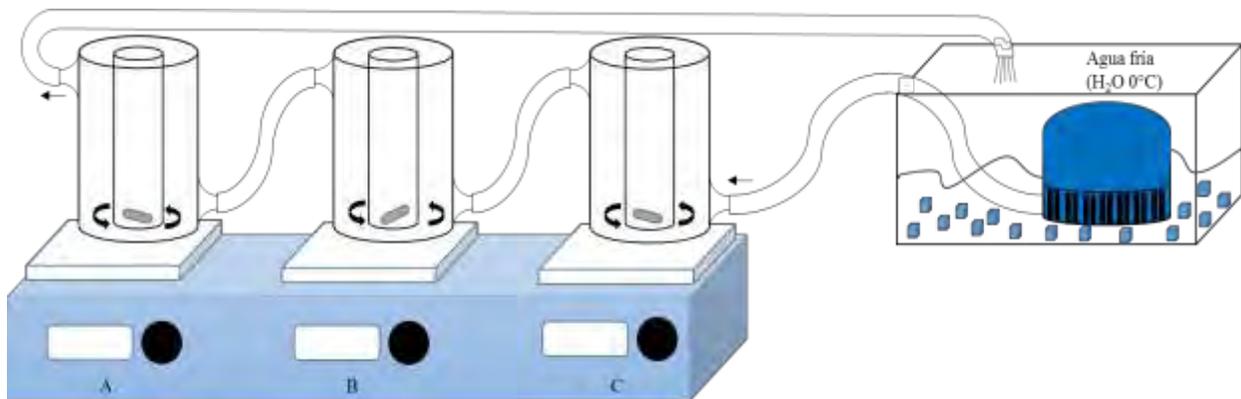
## Reactivos:

- NaCl 0.2 N
- NaOH 2N
- HCl 2 N

## Procedimiento:

Se pesó 1 g de harina y se colocó en un vaso de digestibilidad, se adicionaron 20 mL de solución salina 0.2 N a 0°C.

Con las soluciones de HCl 2N o NaOH 2N, se realizó el ajuste de los pH deseados. (pH= 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11 y 13), manteniendo en agitación constante durante 30 minutos a 0°C como se muestra en la Figura 9.



*Figura 9.* Dispositivo para el ajuste de pH.

Transcurrido el tiempo, se tomó una alícuota de cada solución ajustada y se realizó una dilución 1:10. De dicha dilución se tomaron 1.5 mL y se llevó a tubos Eppendorf, para centrifugarlos durante 5 minutos a 3000 rpm.



Se tomaron alícuotas de 30  $\mu\text{L}$  para cada una de las soluciones ajustadas, colocándolas en diferentes tubos de ensaye.

Por último se realizó la determinación del porcentaje de proteína soluble por el método de Lowry, graficando el % de proteína soluble vs pH, para poder localizar el pH de máxima y mínima solubilidad.

### 2.3.1 Determinación de proteína soluble por el Método de Lowry (Nielsen, 2003).

Se basa en la reacción del fosfomolibdato, en solución alcalina, con los residuos de tirosil de las proteínas, se utiliza  $\text{Cu}^{2+}$  para incrementar la sensibilidad de la reacción. El color azul que se forma es bastante estable y tiene un máximo de absorbancia a 650 nm (Hartree, 1973).

#### Material

- Baño María con termostato y homogenizador
- Pipeta automática de 200-1000  $\mu\text{L}$  y de 50- 100  $\mu\text{L}$
- Espectrofotómetro
- Agitador Mecánico tipo vórtex

#### Reactivos:

- Reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma cat 2790)
- NaOH 1.0 N
- Solución estándar de albúmina bovina 360  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- Solución I: Disolver 0.2g de tartrato de sodio y potasio, y 10 g de carbonato de sodio, en 50 mL de NaOH 1N y aforar a 100 mL con agua destilada.
- Solución II: Disolver 0.5g de tartrato de sodio y potasio y 0.25 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en 22.5 mL de agua destilada y aforar a 25 mL con NaOH 1N.
- Solución III: 1 volumen del reactivo de Folin-Ciocalteu se diluye en 15 volúmenes de agua (se prepara el mismo día de la determinación)



Procedimiento:

*Curva estándar:* La curva de calibración cumple con la Ley Lambert y Beer en el rango de 36-324  $\mu\text{g}$  de proteína, para lo que se realizó una serie de diluciones descrita en la Tabla 7.

Tabla 7. *Serie de diluciones para la realización de curva estándar*

Tubos	$\mu\text{L}$ solución estándar	$\mu\text{L}$ de agua	Concentración de albúmina ( $\mu\text{g}$ )
Blanco	0	1000	0
1	25	975	9
2	50	950	18
3	75	925	27
4	100	900	36
5	200	800	72
6	300	700	108
7	500	500	180
8	700	300	252
9	900	100	324

Una vez ajustada la concentración de los tubos y el volumen a 1 mL, se añadieron 0.9 mL de la Solución I con agitación suave, permitiendo se mezclaran, se colocaron en un baño de agua a 50°C durante 10 minutos.

Después de transcurrido el tiempo se dejaron enfriar a temperatura ambiente (21-25°C). Una vez fríos se les agregó 0.1 mL de la Solución II, conservándolos a temperatura ambiente por otros 10 minutos.

Posteriormente se agregaron 3 mL de la Solución III, adicionándola de manera rápida y con cierta precisión garantizando se mezclaran de 1 a 2 segundos. Se colocaron los tubos en baño de agua a 50°C por otros 10 minutos. Finalmente se dejaron enfriar los tubos para poder realizar la lectura de la densidad óptica a 650 nm.

Se elaboró la curva estándar de absorbancia en función de la concentración de albúmina. Los datos de la curva estándar se muestran en la Tabla 8, mientras que la curva de calibración se muestra en la Figura 11.



Tabla 8. Datos de la curva estándar.

Tubo	Concentración ( $\mu\text{g}$ )	Absorbancia ( $\lambda=650\text{ nm}$ )
Blanco	0	0
1	9	0.034
2	18	0.068
3	27	0.110
4	36	0.122
5	72	0.255
6	108	0.366
7	180	0.565
8	252	0.737
9	324	0.912

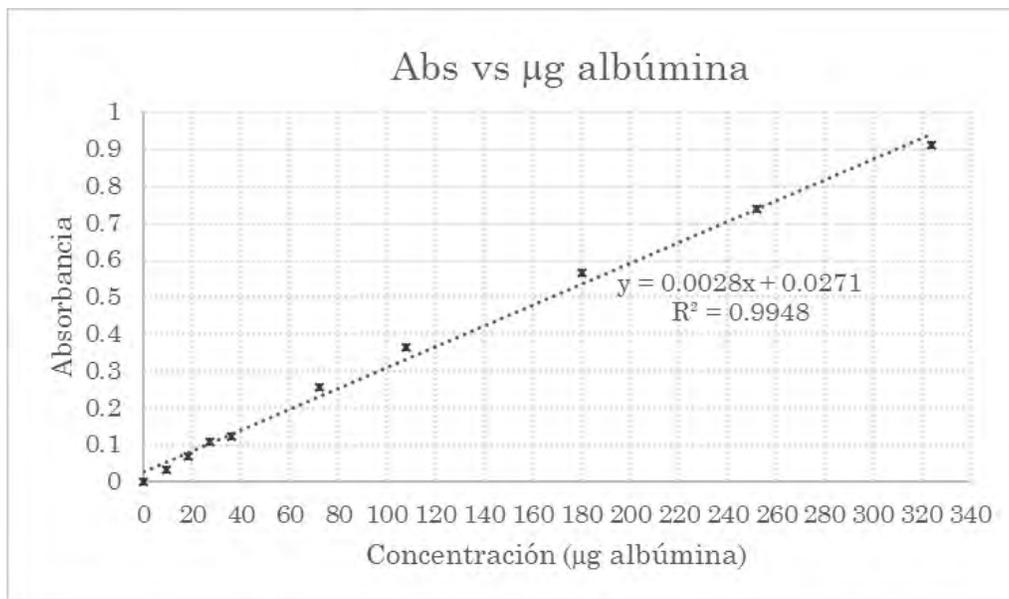


Figura 10. Curva estándar para la determinación de proteína por Lowry.

2.3.2 Determinación del contenido de proteína soluble en las muestras:

Se rotularon los tubos y se ajustó el volumen a 1 mL con agua destilada de acuerdo a la alícuota tomada

Las muestras problema se sometieron al mismo procedimiento de análisis que los estándares.

Utilizando la regresión lineal de la curva estándar (Figura 10), se interpolaron los datos obteniendo la concentración de proteína soluble



presente en **las soluciones a distintos pH's de** la muestra problema, para determinar posteriormente el punto isoeléctrico.

### 3. Detección y cuantificación de Factores Tóxicos Naturales.

#### 3.1 Agentes Antinutrimientales

##### 3.1.1 Determinación de Ácido Oxálico.

Esta determinación está basada en la extracción del ácido oxálico del material biológico en medio ácido por medio de calentamiento y agitación mecánica, seguido de la eliminación de proteína y la posterior precipitación como oxalato de calcio insoluble. Dicho oxalato se disuelve en ácido sulfúrico para hacerlo reaccionar con solución valorada de  $\text{KMnO}_4$  0.01 N (oxidante); donde el oxalato se oxida hasta  $\text{CO}_2$ , mientras que el  $\text{KMnO}_4$  se reduce a  $\text{Mn}^{2+}$ :



El límite de detección de ésta metodología es de 140 – 700 mg de ácido oxálico.

La metodología para la determinación de ácido oxálico, es la oficial de la AOAC (1995) para vegetales enlatados. (Helrich, 1990)

#### Materiales.

- Matraz digestor Berzelius 600 mL
- Potenciómetro, Corning pH meter 430
- Parrilla de calentamiento con agitación
- Bureta de 50 mL
- Papel Whatman #2
- Tubos cónicos para centrífuga de 50 mL
- Centrífuga Eppendorf mod. 5702
- Lana de vidrio muy fina



## Reactivos

- HCl 6N
- Tungstato de sodio\*2H<sub>2</sub>O R.A.
- Ácido fosfórico ACS.
- Cloruro de calcio Anhidro R.a.
- Ácido acético R.A.
- Acetato de sodio\*3H<sub>2</sub>O R.A.
- Oxalato de calcio R.A.
- Permanganato de potasio R.A.
- Hidróxido de amonio R.A.
- Ácido caprílico  
(antiespumante)
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluido (1: 8 v/v),  
y (5: 95 v/v)

*Reactivo de ácido tungstofosfórico:* Se disolvieron 2.5g de Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O en la mezcla de 4 mL de ácido fosfórico y 50 mL de H<sub>2</sub>O, aforando a 100 mL con agua destilada.

*Buffer de acetato:* Se disolvieron 2.5 g de cloruro de calcio anhidro en 50 mL de CH<sub>2</sub>COOH/H<sub>2</sub>O (50: 50 v/v) y se añadieron a la solución 33 g de CH<sub>3</sub>COONa\*3H<sub>2</sub>O diluido a 50 mL con agua destilada.

*Líquido de lavado:* Se tomaron 12.5 mL de ácido acético concentrado y se diluyeron con 250 mL de agua destilada; se añadió polvo de oxalato de calcio agitan y dejando reposar. Se repitió la adición y la agitación hasta saturación de la solución. Se mantuvo en refrigeración a 4°C y antes de su uso se filtró y mantuvo fría durante su uso.

### *Preparación de las soluciones de Permanganato de potasio:*

Para preparar las soluciones de permanganato de potasio se consideró que durante la reacción óxido-reducción, el manganeso cambia su valencia de +7 a +2, por la adición a un átomo, de cinco electrones; por lo que el peso equivalente del manganeso resulta ser igual a su peso atómico dividido entre cinco. De acuerdo con lo anterior el peso equivalente del KMnO<sub>4</sub> es igual a su peso molecular entre cinco (158 g/5).



Antes de comenzar la preparación de los reactivos fue necesario lavar previamente todo el material que sería utilizado para la preparación de las soluciones de permanganato de potasio con mezcla crómica y agua para que esté libre de materia orgánica.

*Solución de  $KMnO_4$  0.1 N:* Se pesaron 3.2 g aproximados de  $KMnO_4$  disolviéndolos en 1 L de agua destilada. Se calentó la solución a ebullición dejando hervir durante 1 hora, evitando que la ebullición fuera tumultuosa, se dejó enfriar y se completó el volumen. Después de reposar toda la noche se filtró la solución por filtros de microfibras de vidrio reteniendo así el  $MnO_2$  (producto de la reducción por la materia orgánica) y recibiendo en frasco ámbar limpio (exento de materia orgánica).

#### *Estandarización de la solución de $KMnO_4$ 0.1 N*

Para titular la solución de permanganato decinormal se utilizó oxalato de sodio, de acuerdo con la reacción de óxido-reducción, el peso equivalente del oxalato de sodio es igual a su peso molecular entre dos (134 g/2).

Se valoró la solución, pesando con exactitud 0.2-0.3 g de  $Na_2C_2O_4$  previamente secado a 100-110°C, colocándolo en un matraz Erlenmeyer de 500 mL y disolviéndolos en agua de 50-70 mL y se agregaron de 15-20 mL de  $H_2SO_4$  diluido 1:8 (v/v). La solución se calentó a 70°C y se tituló con agitación constante, dejando caer la solución de permanganato de potasio lentamente hasta obtener una coloración rosa permanente.

Como blanco, se midió el mismo volumen de  $H_2SO_4$  diluido (5:95 (v/v)) hervido previamente por 15 minutos y después enfriado a  $27 \pm 3^\circ C$  y agregando un volumen de solución de permanganato de potasio hasta obtener el color rosa final.

Restar el volumen del blanco al de la titulación y este valor se utilizara en los cálculos. Se realizan los cálculos correspondientes para verificar la concentración de la solución.



$$N = \left( \frac{\text{g Na}_2\text{C}_2\text{O}_4}{\text{mL KMnO}_4} \right) \left( \frac{1000 \text{ mL}}{67 \text{ g/eq}} \right)$$

Donde:

N=Normalidad de la solución de Permanganato (eq /L)

g= peso de  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  (en gramos)

mL  $\text{KMnO}_4$  = volumen de permanganato utilizados en la valoración de  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  (en mililitro).

*Solución de  $\text{KMnO}_4$  0.01 N:* Se diluyeron 100 mL de la solución de  $\text{KMnO}_4$  0.1 N en 1 L de agua destilada. Esta dilución se realiza previamente antes de su uso.

#### Procedimiento

*Preparación de la muestra:* Se pesaron de 5 a 10 g de harina de la muestra colocándola dentro de un vaso Berzelius de 600 mL, se agregaron 200 mL de agua destilada y se agitaron en la parrilla por 15 min. Se llevó a un volumen de 300 mL enjuagando las paredes, se añadieron 55 mL de HCl 6 N y dos gotas de antiespumante, llevándose a ebullición y reflujo durante 15 min., después de dicho tiempo se dejó enfriar y se aforó a un volumen de 500 mL con agua destilada enjuagando las paredes del vaso, se homogenizó y se dejó reposando toda la noche. Se filtró a través de papel filtro Whatman #4 desechando los primeros 100 mL.

*Precipitación de ácido oxálico:* Se tomó una alícuota de 25 mL del filtrado con pipeta y se colocó en un matraz Erlenmeyer de 50 mL, se agregaron 5 mL de ácido tungstofosfórico, mezclando y dejando reposar como mínimo 5 horas. Se filtró a través de papel Whatman #40, pasando 20 mL del filtrado a un tubo para centrífuga de 50 mL, adicionando hidróxido de amonio gota a gota hasta ajustar a un pH 4-4.5, utilizando un potenciómetro. Se adicionaron 5 mL de la solución amortiguadora buffer



de acetatos mezclando con una varilla de vidrio, enjuagando la misma con un pequeño chorro de agua, se dejó reposar toda la noche.

Se centrifugó durante 15 minutos a 1700 rpm para compactar el precipitado. Se decantó el sobrenadante con una inversión suave del tubo de centrifuga evitando romper el precipitado de oxalato. Se volteó el tubo dejando caer el sobrenadante en un papel filtro limpio. Se lavó el precipitado con 20 mL de líquido de lavado frío con un chorro fino, rompiendo completamente el precipitado. Se repitieron los pasos de centrifugación y decantado desechando el papel filtro. Se añadieron 5 mL de  $H_2SO_4$  (1:9 v/v) al precipitado y se realizó la valoración de éste con el permanganato de potasio 0.01 N (valorado).

*Valoración con permanganato:* Se hirvieron las muestras y el blanco (5 mL  $H_2SO_4$  (1:9) en un baño de agua hirviendo. Se titularon las soluciones calientes con  $KMnO_4$  0.01 N hasta que persistió una coloración rosa durante 30 segundos. Se restó el volumen del blanco al de la titulación de la muestra y con éste valor, se realizaron los cálculos para obtener la concentración de ácido oxálico en la muestra.

Cálculos.

Se determinó el contenido de ácido oxálico para cada volumen de permanganato utilizado por cada repetición, empleando la siguiente ecuación:

$$\frac{g_{\text{ac. oxalico}}}{g_{\text{muestra}}} = \left( \frac{(\text{Vol}_{\text{corregido}})(N)(m_{\text{eq. ác. oxálico}})}{g_{\text{muestra}}} \right)$$

Donde:

$\text{Vol}_{\text{corregido}} = \text{Volumen } KMnO_4 \text{ utilizado en la muestra} - \text{Volumen de } KMnO_4 \text{ del blanco.}$

$N = \text{normalidad del } KMnO_4$

$m_{\text{eq}} = \text{miliequivalentes del ácido oxálico.}$



g= peso de muestra en gramos

El % de ácido oxálico presente en la muestra se determina de la siguiente manera:

$$\% \text{ác. oxálico} = \left( \frac{g_{\text{ác.oxálico}}}{g_{\text{muestra}}} \right) * F * 100$$

Donde:

F= Factor de dilución = (30 mL/20 mL)(500 mL/25 mL) = 30

### 3.1.2 Determinación de Taninos.

Esta metodología corresponde al método de determinación de contenido de taninos en sorgo ISO 9648-1988. La cual está basada en la extracción de los taninos con dimetilformamida y la reducción del ión férrico debido a los polifenoles con la posterior formación de un complejo colorido en condiciones alcalinas el cual es cuantificado espectrofotométricamente a una  $\lambda = 525 \text{ nm}$ . Se determina el contenido de taninos utilizando una curva de calibración preparada con ácido tánico (ISO, 1988).

#### Materiales

- Balanza analítica digital
- Parrilla múltiple con agitación
- Centrífuga IEC Clinical Centrifuge
- Baño de agua a 30°C
- Vortex labline modelo super mixer 1290
- Espectrofotómetro Thermo-Scientific Genesys 10 S
- Vaso de precipitados de 50 mL
- Pipeta graduada de 10 mL
- Pipetas volumétricas de 1 mL y 5 mL
- Tubos de ensaye

#### Reactivos:

- Dimetil-formamida (DMF) al 75%
- Solución estándar de Ácido Tánico al 0.2 %



*Solución Ácido Tánico al 0.2 %:* A partir de ácido tánico (SIGMA T-0125), se pesó la cantidad necesaria para obtener 0.2 gramos de ácido tánico y se disolvieron en 10 mL de agua y se aforó a un volumen de 100 mL.

Procedimiento:

*Elaboración de la curva patrón:* Se prepararon 8 soluciones agregando 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 mL de la solución de ácido tánico y aforando a 25 mL con dimetilformamida al 75%. Se tomó 1 mL de cada extracto y se depositó en un tubo de ensayo. Se adicionaron 5 mL de agua destilada. Y se añadió 1 mL de citrato férrico amoniacal y 1 mL de hidróxido de amonio. Se agitaron y dejaron reposar los tubos durante 10 minutos en un baño a 30°C. Se leyó la absorbancia a 525 nm, utilizando como blanco al tubo con 0 mL de ácido tánico.

*Determinación:* Se pesaron de 500-1000 mg de muestra colocándolos en un vaso de precipitados. Se añadieron 20 mL de dimetilformamida al 75% y se agitó mecánicamente durante una hora a 500 r.p.m., la solución se colocó en un tubo eppendorf de 50 mL llevándolo a centrifugación durante 10 minutos a 3000 g. Se tomó 1 mL del sobrenadante anterior y se depositó en un tubo de ensayo, se añadieron 5 mL de agua destilada, más 1 mL de citrato férrico amoniacal y 1 mL de hidróxido de amonio. Se agitó y se dejó reposar cada tubo durante 10 minutos en un baño a 30 °C. Se leyó la absorbancia a 525 nm. Se elaboró un blanco de la misma manera, pero sustituyendo el mililitro de la solución de citrato férrico amoniacal por agua destilada.

Cálculos:

Se parte de que la solución estándar de ácido tánico se encuentra al 0.2% y se determina la concentración de ácido tánico (mg/mL) para cada



uno de los volúmenes utilizados. Por ejemplo para el matraz que contiene 1 mL de ácido tánico:

$$(2\text{mg}_{\text{ác. tánico}}/\text{mL}_{\text{Soln}})(1\text{mL}_{\text{Soln}}/25\text{mL})=0.0721 \text{ mg/mL,}$$

realizando lo mismo para los demás volúmenes.

Se graficó Absorbancia (Abs) vs concentración de ácido tánico (mg/mL) y con la ecuación de la recta se determinó la concentración de ácido tánico presente en la muestra reportando el valor como % ácido tánico.

### 3.1.3 Determinación de Inhibidores de proteasas.

La técnica es la utilizada por Kakade y colaboradores, la cual 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 puso en contacto con una solución estandarizada de tripsina (40  $\mu\text{g}/10 \text{ ml}$ ), y después de cierto tiempo se determinó la actividad proteolítica remanente, por medio de un substrato sintético (BAPNA), el cual produciría una coloración que se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm. Dicha coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de la muestra. De acuerdo a esta metodología, Kakade y colaboradores, proponen que productos alimenticios (en especial de soya) debajo de 10 UTI/mg<sub>muestra</sub> son aptos para fines alimenticios. (Kakade *et al.*, 1974)

#### Materiales

- Potenciómetro
- Parrilla con agitación magnética
- Baño de agua con control de temperatura y agitación
- Espectrofotómetro
- Mezclador de tubos Vórtex



## Reactivos

- Hidróxido de sodio 0.01N
- Solución amortiguadora de TRIS, pH 8.2, 0.05M (a)
- Solución BAPNA (b)
- Ácido acético al 30%
- Solución estándar de tripsina 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (c)
- Ácido clorhídrico 0.001N

(a) Se pesaron 6.05g de TRIS (hidroximetil-amino-metano P.M. 121.14) y 2.94g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , disolviéndolos en 900mL de agua destilada, ajustando el pH a 8.2 y aforando a un volumen de 1L.

(b) Se pesaron 100mg de  $\alpha$ -N Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida-HCl (BAPNA), y fueron disueltos en 2.5mL de dimetilsulfóxido, aforando a 250mL con amortiguador TRIS previamente calentado a 37° C. ESTA SOLUCION DEBÍA SER PREPARADA EL MISMO DÍA DE SU USO Y MANTENERSE A 37° C MIENTRAS SE UTILIZARA.

(c) Con mucha exactitud se pesaron 4mg de tripsina bovina (SIGMA T-8253) y se disolvieron en 200mL de ácido clorhídrico 0.001N. Esta solución contiene 20 $\mu\text{g}$  de tripsina por mL y debe ser almacenada en refrigeración donde puede durar de 2-3 semanas sin pérdida apreciable de actividad.

*Preparación del extracto:* Se pesó 1g de muestra finamente molida y desengrasada (<5% de grasa) en un vaso de precipitado y se adicionaron 45mL de hidróxido de sodio 0.01N, a esta suspensión se le ajustó el pH a  $9.6 \pm 0.2$  y se llevó a un aforo de 50 mL con agua destilada.

A continuación se colocó en un vaso que contenía un agitador magnético, para agitar la suspensión mecánicamente durante 2 ½ horas a 300 r.p.m. Después de este tiempo se retiró el agitador magnético y se dejó ½ hora en reposo, por simple decantación se separa el sobrenadante eliminando el residuo insoluble.



El sobrenadante fue diluido hasta el punto de que 1mL produjo una inhibición de 40-60%; ya que este requisito es indispensable para reducir la desviación estándar relativa.

*Determinación de la actividad:*

Se pipetearon porciones de 0.0, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8 ml de extracto diluido en tubos de ensaye y ajustando el volumen a 2.0 ml con agua destilada, se introdujeron en un baño de agua a 37° C. Se adicionaron 2.0mL de solución estándar de tripsina a 37° C y se incubaron por periodo de 10 minutos. Debido a que, al trabajar con el extracto directo, es común arrastrar coloraciones indeseables, es conveniente tomar una alícuota más de cada una de las porciones, las cuales servirán como sus respectivos blancos. A estos tubos, una vez adicionados los 2 mL de solución de tripsina, inmediatamente después se les adiciona 1.0 mL de ácido acético al 30% y por último los 5 mL de solución de BAPNA, como se indica en la Tabla 9. En estos tubos, no es necesario llevar un control de tiempo.

A continuación se adicionaron 5mL de solución de BAPNA a 37°C a cada tubo y se mantuvo dicha mezcla de reacción por 10 minutos exactos (con cronómetro). La reacción enzimática se detuvo con la adición de 1mL de ácido acético al 30%; el cual debía homogeneizarse inmediatamente.

Debido a la formación de turbidez al adicionar el ácido acético, se tuvo que realizar la filtración a través de papel filtro Whatman #1, cerciorándose que el filtrado era transparente.

La Tabla 9 muestra en forma esquemática, la serie de tubos que se prepararon para determinar la actividad inhibitoria de la muestra.

Una vez detenida la reacción se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 410 nm para cada una de las alícuotas del extracto, ajustando primero el equipo a 0.000 de absorbancia (100%T) con su respectivo blanco. El tubo con 0.0 ml de extracto fue la referencia (R) ( $40 \mu\text{g}_{\text{tripsina}}/10\text{ml}$ ), sobre el cual se basaron los cálculos.



Cálculos:

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

Tabla 9. *Serie de tubos que deben prepararse para la determinación de actividad inhibitoria.*

Clave del tubo	Vol. de extracto (mL)	Vol. de H <sub>2</sub> O (mL)	Vol. de Std. Tripsina (mL)	Vol. de Ac. acético al 30% (mL)	Tiempo	Vol. de BAPNA a 37°C (mL)	Tiempo	Vol. de Ac. acético al 30% (mL)
Bco.1	1.8	0.2	2.0	1.0	10 min.	5.0	10 min.	-
1	1.8	0.2	2.0	-		5.0		1.0
Bco.2	1.4	0.6	2.0	1.0		5.0		-
2	1.4	0.6	2.0	-		5.0		1.0
Bco.3	1.0	1.0	2.0	1.0		5.0		-
3	1.0	1.0	2.0	-		5.0		1.0
Bco.4	0.6	1.4	2.0	1.0		5.0		-
4	0.6	1.4	2.0	-		5.0		1.0
Bco. R	0	2.0	2.0	1.0		5.0		-
R	0	2.0	2.0	-		5.0		1.0

Por ejemplo si el tubo de referencia (R) tubo una  $A=0.358$ , las unidades de tripsina se determinan de la siguiente manera

$$U.T._{(R)} = 0.358 \times 100 = 35.8$$

Continuando del modo anterior para cada una de las alícuotas del extracto hasta obtener una serie de valores de U.T. que, al restarles el dato obtenido a partir del tubo de referencia (R) se obtuvieron los valores de Unidades de Tripsina Inhibida (U.T.I.); es decir:

$$U.T.I. = U.T._{(R)} - U.T.$$

Donde

U.T.I = Unidades de Tripsina Inhibida

U.T. <sub>(R)</sub> = Unidades de Tripsina en el tubo de referencia

U.T. = Unidades de tripsina en cada alícuota.

Continuando con el ejemplo anterior: el Tubo 1 tiene una  $A=0.043$ , es decir 4.3 U.T. Por lo tanto las U.T.I. para el Tubo 1 se calculan de la siguiente forma:

$$U.T.I. = 35.8 - 4.3 = 31.5 \text{ U.T.I.}$$



Se determinó el % de inhibición de cada una de las diluciones, considerando los tubos que contenían 1 mL del extracto; para identificar la dilución que se encontraba dentro del intervalo 40-60%, ya que este requisito es indispensable para reducir la desviación estándar relativa.

Si se retoma el ejemplo anterior y se considera que el tubo con 1 mL de extracto (Tubo 3) tuvo 19.8 U.I., es posible calcular el % de inhibición con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = [\text{U.T.I.}_{\text{Tubo 3}} / \text{U.T.}_{(R)}] * 100$$

Obteniendo que:

$$\% \text{ Inhibición} = [19.8 / 35.8] * 100 = 55.3 \% \text{ Inhibición}$$

Ya que el % inhibición cae dentro del intervalo 40-60%, esta será la dilución que se considere adecuada para la determinación de la actividad inhibitoria, determinada de la siguiente manera:

$$\text{U.T.I./ml}_{\text{extracto}} = \frac{\text{U.T.I}}{\text{Vol}_{\text{extracto}}(\text{mL})}$$

Por lo que si se utiliza la ecuación anterior para el Tubo 1 del ejemplo antes mencionado se obtiene lo siguiente:

$$\text{U.T.I./ml}_{\text{extracto}} = \frac{31.5}{0.6 \text{ mL}_{\text{extracto}}} = 17.5 \text{ U.T.I./ml}_{\text{extracto}}$$

Una vez obtenido la dilución adecuada del extracto, es necesario determinar la actividad enzimática inhibitoria (U.T.I./mL<sub>extracto</sub>) para cada alícuota de la serie de tubos, graficando así, dicha actividad inhibitoria en función del volumen de extracto, en la cual se observó una correlación lineal negativa, obteniendo el valor extrapolado como lo muestra la Figura 11, correspondiente al valor más cercano a la actividad inhibitoria verdadera.

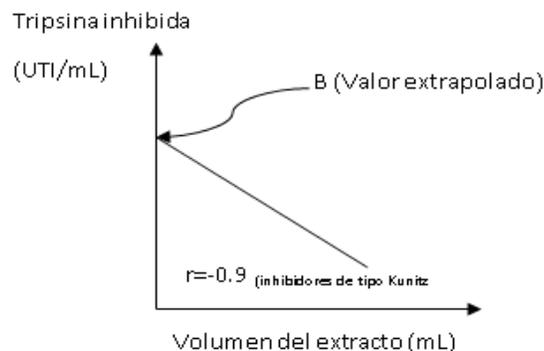


Figura 11. Gráfica de la actividad enzimática inhibitoria (UTI/mL) en función del volumen (mL)



Es conveniente reportar las unidades de inhibición por mg de proteína de la muestra, para lo cual fue necesario determinar el contenido de proteína en el extracto directo.

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

Donde:

B = valor extrapolado en U.T.I./ml

F = Factor de dilución, el cual depende de la dilución realizada.

Cuando se trabaja el extracto directo F=1

$$F = \frac{A_1}{a_1} \times \frac{A_2}{a_2} \times \dots \times \frac{A_n}{a_n} \quad A_1 = \text{aforo (s)} \quad a_1 = \text{alícuota (s)}$$

X= mg de muestra que se pesaron

## 3.2 Agentes Tóxicos.

### 3.2.1 Determinación de Lectinas

Se basa en la capacidad de aglutinar los eritrocitos por efecto de la cantidad de hemaglutininas presentes en una muestra. Se realizan diluciones seriadas de las cuales se determina el punto final de la aglutinación de los glóbulos rojos de hámster previamente lavados y sensibilizados con solución de proteasa, ya que los glóbulos rojos de esta especie son más sensibles a las glucoproteínas; se realiza mediante el método de microtitulación que es rápido, requiere una mínima cantidad de muestra y el punto final de la aglutinación se determina mediante una estimación visual (Vasconcelos *et al*, 2004).

De acuerdo a un trabajo previo, valores arriba de 1 UHG/g<sub>muestra</sub> pueden presentar problemas de toxicidad (González, 2001).

### Materiales

- Balanza analítica Sartorius
- Centrifuga eppendorf para tubos de vidrio
- Agitador magnético múltiple



- Tubos de centrifuga de 15 ml con graduación.
- Jeringa de 5 ó 10 ml con agua #22
- Incubadora Bacteriológica marca Blue-M.
- Espectrofotómetro
- Microtiter Kit (Cook Eng-Alexander Virginia USA).
- Filtro de vidrio (poro grueso).
- Matraz Erlenmeyer de 25, 125 y 250 mL
- Probeta de 25 y 100 mL
- Embudo de filtración de talle corto
- Filtros de vidrio de poro grueso
- Gasa
- Pipetas graduadas de 5 y 10 mL
- Alargadera para embudo
- Pipetas volumétricas de 0.5 y 2 mL
- Agitadores magnéticos de ½ in

#### Reactivos

- 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 red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) (Faseolotoxina PHT) (SIGMA L-8754) (b)
- Solución de proteasa al 0.2% en solución salina al 0.9% (Sigma P-5147). En términos generales se usa tripsina al 0.2% en solución salina, para el proceso de sensibilización; sin embargo, cuando se trabaja con sangre de cualquier roedor (ratón, hamster, etc.), es conveniente trabajar con pronasa al 0.2% en solución salina.

(a) Sol. Heparina: sangre = 15-20 UI: 1ml de sangre.

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

Procedimiento:

*a) Preparación del extracto*

A partir de la muestra vegetal finamente molida y con un contenido <5% de grasa, se suspendió 0.1g de muestra en 10 mL de solución salina al 1%, y se efectuó la extracción con agitación mecánica durante 2 horas a 300 rpm a la temperatura ambiente. Después de este tiempo se centrifugó el extracto durante 10 minutos a 3000 rpm. para eliminar el residuo insoluble; se filtró el sobrenadante a través de un filtro de vidrio de poro grueso y en caso de ser necesario se lavó el residuo con un poco de más solución salina al 1%, para llevar finalmente con un matraz volumétrico el extracto filtrado a un volumen de 10 mL.

*b) 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 colocaron de 30 a 50 gotas de sangre de Hámster Sirio previamente anestesiado (técnica realizada por punción ocular) agitando suavemente el matraz para la completa homogenización de la sangre con la solución anticoagulante. (no se interrumpió la agitación hasta el momento del lavado).

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

Al terminar el último lavado, se determinó el volumen del paquete de eritrocitos, para poder diluirlo al 4%, es decir, por cada 1.0 mL de glóbulos rojos (paquete) se adicionaron 24mL de solución salina al 0.9%.



*c) Sensibilización de los glóbulos rojos.*

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

Después del último lavado se midió el paquete de eritrocitos y se resuspendió al 4%, por lo que por 1mL de paquete de eritrocitos se le añadieron 24 mL de solución salina al 0.9%. Se colocó la sangre en un matraz Erlenmeyer de 125 mL efectuando previamente una filtración con gasa.

*d) Ajuste de la suspensión de glóbulos rojos.*

Se realizó el ajuste del espectrofotómetro COLEMAN al 100% de T con solución salina al 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 (procurando que estuviera lo más homogénea posible), colocándolo en una celda y adicionando 2 mL de solución salina al 9% con pipeta volumétrica, se homogenizó y se introdujo al espectrofotómetro COLEMAN, diluyendo la suspensión de eritrocitos lo necesario hasta obtener una lectura de  $26 \pm 1\%$  de T.

*e) Microtitulación.*

**La microtitulación se llevó a cabo en placas tipo "V" colocando en cada pozo 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 (PHT), realizando las diluciones sucesivas desde el primer pozo (siguiendo la hilera horizontal hasta completar la hilera, eliminando el resto de la última dilución.



Ya realizadas las diluciones pertinentes se colocó con el pipeteador de gota 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión de eritrocitos ya sensibilizados y ajustados, cada placa contó con su hilera de control negativo (solución salina 9%:sangre ajustada) y de control positivo (solución salina 9%:faseolotoxina al 2%: sangre ajustada)

Una vez terminadas las placas se rotaron en forma circular para homogenizar, se colocaron en la incubadora durante 1 hora a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .

*f) Lectura:*

Para obtener el título de hemólisis se observó empleando un espejo adaptado al dispositivo, localizando en la hilera horizontal de la placa, el número correspondiente al último pozo en el que se apreció la hemólisis, y que resulta ser la mínima cantidad de muestra que produce prueba positiva de hemólisis.

Cálculos:

Primero determinamos el límite de detección del método (L), usando como referencia la faseolotoxina (PHT), para lo cual es necesario conocer la cantidad de lectina que realmente se utiliza en el primer pozo (E), determinándolo de la siguiente manera:

$$E = M * D$$

Donde:

E=Cantidad de lectina presente en el primer pozo

M=Concentración de lectina en la solución diluida=  $(1 \text{ mg}_{\text{PHT}}/10 \text{ mL}) * (1/100) = 1 \mu\text{g}_{\text{PHT}}/\text{mL}$

D= Cantidad de solución tomada por el microdilutor (50  $\mu\text{L}$ )

$$E = (1 \mu\text{g}/1000 \mu\text{L}) * (50 \mu\text{L}) = 0.05 \mu\text{g}_{\text{PHT}}$$

Conociendo el valor de E, se procede a calcular el límite de detección de la metodología (L) para lo cual es necesario tener el título (t) de la solución diluida de faseolotoxina, obteniéndolo con la siguiente fórmula:



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

Donde:

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

t=título (promedio de los títulos individuales redondeado al entero inmediato)

Por ejemplo: Si  $t=3$  entonces

$$L = 2(0.05\mu\text{g}/3^3) = 3.7 \times 10^{-3} \mu\text{g}$$

Para el extracto de la muestra, se necesita obtener la máxima dilución que produce prueba positiva de aglutinación, por lo que es necesario calcular la cantidad equivalente de muestra en el primer pozo (e), como se realizó anteriormente para la solución de faseolotoxina, expresando el resultado en miligramos. Esto se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$e = m * D$$

Donde:

e=cantidad equivalente de muestra en el primer pozo (expresado en mg)

m= Concentración equivalente de muestra en el extracto (expresada en mg/mL)

D= Cantidad de extracto tomado por el microdilutor (expresado en mL)

Por ejemplo:

Si  $m = (0.1004 \text{ g}_{\text{muestra}}/10 \text{ mL}) = 0.01004 \text{ g/mL} = 10.04 \text{ mg/mL}$ , entonces:

$$e = (10.04 \text{ mg/mL}) * (0.050 \text{ mL}) = 0.5020 \text{ mg}$$

una vez obtenida la cantidad de muestra en el primer pozo, se determina la cantidad mínima que produce prueba positiva de aglutinación, obteniéndola con la siguiente fórmula:

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

Donde:



$M_a$  = Cantidad mínima de muestra que produce prueba positiva de aglutinación (expresada en mg)

$e$  = Cantidad de muestra presente en el primer pozo (expresada en mg)

$t$  = título (promedio de los títulos individuales redondeado al entero inmediato)

Ejemplo: Si  $t_{\text{muestra}} = 4$  entonces:

$$M_a = 2(0.5020 \text{ mg}/3^4) = 0.0124 \text{ mg}$$

Por último, con los valores anteriores ( $L$ ) y ( $M_a$ ), es posible determinar la concentración equivalente de lectina que contiene la muestra problema, de acuerdo a la siguiente expresión:

$$LE = L/M_a$$

Donde:

$LE$  = Cantidad de lectina de referencia expresada en mg, presente por mg de muestra de material vegetal. Dicho valor equivale también a  $1 \mu\text{g}$  de lectina/ $g_{\text{muestra}}$ .

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

Siguiendo con el ejemplo:

$$LE = 0.0037 \mu\text{g}/0.0124 \text{ mg} = 0.2984 \mu\text{g}/\text{mg}$$

Por definición, se ha establecido que 1 unidad de hemaglutinación (UHG) es equivalente a 1 mg de faseolotoxina, por lo que es posible expresar los resultados como UHG/ $g_{\text{muestra}}$ .

$$LE = 0.2984 \text{ UHG}/g_{\text{mtra}}$$

### 3.2.2 Determinación de Glucósidos cianogénicos.

Se aprovecha la reacción sensible y específica de Guignard, consistente en hacer reaccionar el ácido cianhídrico presente en la muestra, con ácido pícrico en medio alcalino, produciendo isopurpurina (un



compuesto colorido). Para cuantificar el HCN total que potencialmente puede ser liberado se hace uso de una hidrólisis enzimática (por medio de una  $\beta$ -glucosidasa) del glucósido cianogénico presente en la muestra. Se reporta que valores por debajo de  $10 \text{ mg}_{\text{HCN}}/100 \text{ g}_{\text{muestra}}$  no pueden considerarse como de riesgo para la salud de quien ingiere este compuesto. Ésta metodología detecta cantidades del orden de  $5 \mu\text{g}$  de HCN, equivalente a  $46 \mu\text{g}$  de glucósido cianogénico (referido con linamarina).

### Materiales

- Incubadora Blue-M
- Congelador comercial
- Espectrofotómetro Coleman Junio IIA
- Baño de agua con agitación oscilatoria horizontal marca LAB-LINE
- Tubos de cultivo con tapón de rosca Pyrex #9825
- Micro-molino marca TECATOR

### Reactivos

- Solución de picrato sódico alcalinizada (a)
- Papel indicador de HCN (b)
- Buffer de fosfatos  $\text{pH}=7.00$  (c)
- Solución de  $\beta$ -glucosidasa con activador (d)
- Solución de KCN equivalente a  $100 \mu\text{g}_{\text{HCN}}/\text{mL}$  ( $24.1 \text{ mg}_{\text{KCN}}/100\text{mL}$ )
- HCL 0.5 N

(a) Se disolvieron 2.5 g de ácido pícrico en agua destilada y a continuación 12.5 g de carbonato de sodio, llevándolo a un volumen final de 500 mL con agua destilada.

(b) Papel Whatman del #2 se remojó en una solución de picrato de sodio (a), se dejó escurrir y se colocó en una estufa a secar a una temperatura



de 55-60°C por espacio de 30 minutos. A continuación se cortaron tiras lo más exacto posible de 2x10cm.

(c) Se prepararon las siguientes soluciones:

1. Solución de fosfato de sodio monobásico 0.2 M (27.8g en 1L)
2. Solución de fosfato de sodio dibásico 0.2 M (53.65 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  o 71.7 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  en 1L).

Se mezclaron 39 mL de (1) y 61 mL de (2) aforando a 200 mL y ajustando pH a 7.0.

(d) 0.25 g de  $\beta$ -glucosidasa (250 mg) fueron disueltos con buffer de fosfatos pH 7 (c) teniendo la precaución de agitar suavemente (para evitar que se formara gran cantidad de espuma), una vez disuelta la enzima se le adicionó 1.7 g de  $\text{NaNO}_3$ , que actúa como activador de dicha enzima; aforando finalmente a 250 mL con el buffer de fosfatos.

Procedimiento:

*Curva estándar:* Para la elaboración de la curva estándar se usó una solución de cianuro de potasio cuya concentración equivale a 100  $\mu\text{g}_{\text{HCN}}/\text{mL}$ . Además, con el fin de simular la interacción muestra-HCN liberado, se introdujo una matriz alimenticia (Harris y col 1980) basada en fécula de maíz comercial, la curva estándar va de 5-60  $\mu\text{g}$  de HCN ya que fue el rango óptimo encontrado en la respuesta concentración HCN vs D.O. ( $r=0.99$ ) cumpliendo con la ley de Lambert-Beer. En la Tabla 10, se muestra la serie de tubos utilizados para la elaboración de la curva estándar.

*Preparación de la muestra:* Cuando se requiere determinar con suma precisión el contenido de HCN en una muestra, es necesario partir del material íntegro, por lo que la muestra, se sometió previamente a una molienda fina, e inmediatamente se colocó en un frasco de cierre perfecto,



y se colocó en el congelador, para realizar la determinación posteriormente.

Tabla 10. Serie de tubos para la realización de la curva estándar.

mL solución estándar	Matriz alimenticia	Buffer pH 7.0	→	HCl 0.5 N (en frío)	Concentración de HCN (mg)	
0.0	500 mg	5 mL	Baño María a 40°C Durante 4 horas	1 mL	Blanco (0.0 mL)	
0.05	"	"		"	"	5.0
0.10	"	"		"	"	10.0
0.2	"	"		"	"	20.0
0.3	"	"		"	"	30.0
0.4	"	"		"	"	40.0
0.5	"	"		"	"	50.0
0.6	"	"		"	"	60.0

*Liberación de HCN de la muestra:* Se colocaron en un tubo de cultivo Pyrex #9826, 500 mg de muestra, se les adicionaron 5 mL de solución de  $\beta$ -glucosidasa (fría) homogenizando las mezclas, se colocó la tira de papel indicador (humedecida con unas gotas de agua) en la boca de cada tubo y cerrando herméticamente con un tapón de rosca, como se muestra en la Figura 12.

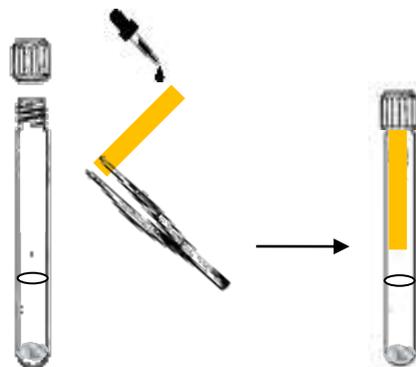


Figura 12. Dispositivo para detectar HCN liberado.

Una vez que se tiene el anterior dispositivo, se colocaron los tubos en un baño María a  $40 \pm 1^\circ\text{C}$  y con el control de velocidad de agitación ajustado a 3.5 por espacio de 4 horas. Transcurrido el tiempo los tubos se introdujeron en el congelador durante 30 minutos, terminado este tiempo se sacaron y se destaparon para adicionarle 1 mL de HCl 0.5 N (frío) a cada repetición.



Una vez adicionado el HCl, se volvieron a cerrar los tubos perfectamente homogenizándolos, teniendo la precaución de no tocar el papel indicador con el líquido. Colocándolos en la incubadora durante 15 minutos a 60 °C. Transcurrido este tiempo se retiraron de la incubadora y se dejaron enfriar para realizar visualmente la determinación cualitativa. Ya que aquellos tubos que no mostraban coloración café-rojiza en el papel indicador, se consideraban negativos, mientras que aquellos que sí mostraban aunque sea una tenue coloración, se consideraron positivos, procediendo a la detección cuantitativa.

*Detección cuantitativa:* Con cuidado se retiró el papel indicador y se colocó en un tubo #9826, se adicionaron 20 mL de agua destilada (medidos con bureta), se tapó y se agitó vigorosamente con el fin de extraer el pigmento de isopurpurina del papel indicador.

Después de 2-5 minutos de la extracción del pigmento, se procedió a recuperar el solvente (agua), eliminando los residuos de papel por medio de una filtración rápida. Como se muestra en la Figura 13.



Figura 13. Extracción de isopurpurina del papel indicador.

La solución filtrada se colocó en la fotocelda para su lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm, previamente ajustado a 100% de transmitancia con el blanco correspondiente (todos los reactivos excepto la muestra).



Cálculos:

Al tener la curva estándar, en la que se encuentra relacionado el contenido de HCN vs Absorbancia, se interpola el valor obtenido de absorbancia y de acuerdo a la ecuación de regresión lineal se obtiene el valor correspondiente de HCN (X) y al sustituir esta cantidad en la fórmula se obtendrán los mg HCN/g<sub>muestra</sub>.

$$(X*100)/m = \text{mg}_{\text{HCN}}/100\text{g}_{\text{muestra}}$$

X= mg de HCN

m=mg de muestra

El límite de detección de la metodología refiere a la cantidad mínima de HCN utilizado para la elaboración de la curva estándar, es decir 5 µg de HCN, por lo que:

$$(5\mu\text{g}_{\text{HCN}}/0.5\text{g}_{\text{muestra}}) * (1\text{mg}_{\text{HCN}}/1 \times 10^3 \mu\text{g}_{\text{HCN}}) = 0.01\text{mg}_{\text{HCN}}/\text{g}_{\text{muestra}}$$

ahora bien

$$(0.01\text{mg}_{\text{HCN}}/1\text{g}_{\text{muestra}}) * 100 = 1\text{mg}_{\text{HCN}}/100\text{g}_{\text{muestra}}$$

es decir el límite de detección de la metodología es de (1mg<sub>HCN</sub>/100g<sub>muestra</sub>) es decir 0.001 g<sub>HCN</sub>/100g<sub>muestra</sub> (0.001%).

### 3.2.3 Determinación de Saponinas

La detección de saponinas en extractos vegetales aprovecha la capacidad hemolítica de las saponinas sobre eritrocitos; se lleva a cabo con una técnica de diluciones seriadas, en la que se determina el punto final por una estimación visual de la hemólisis de los glóbulos rojos de sangre humana.

El método de microtitulación es rápido y requiere una mínima cantidad de muestra, poniendo en contacto un extracto metanólico de la muestra resuspendida en solución salina con los eritrocitos previamente sensibilizados con solución de tripsina.



## Materiales

- Extractor de grasa Goldfish, LABCONCO
- Cartuchos de celulosa Whatman 22x88mm
- Rotavapor Büchi, 461, modelo RE-111
- Centrífuga International Clinical
- Incubadora bacteriológica, Precision Economy mod. 2 EG.
- Espectrofotómetro COLEMAN, Junior II-A
- Tubos de centrifuga de 15 mL con graduación
- Microtiter kit (Cook Eng-Alezander Virginia USA).
- Filtro de vidrio poro grueso

## Reactivos

- Solución de Metanol (R.A.) y agua destilada al 85% (v/v)
- **Sangre humana tipo "O"** (género masculino, desfibrinada y lavada).
- Solución anticoagulante (a)
- Solución salina al 1%
- Solución salina al 0.9%
- Tripsina de páncreas de bovino (SIGMA t-8128 Tipo II) (b)
- Solución estándar de saponinas al 0.5% en solución salina (c)

(a) Cuando la sangre se trabaja inmediatamente se puede utilizar solución de heparina o citrato en las siguientes relaciones:

Sln. Heparina : Sangre = 15 a 20 UI: 1mL sangre

Sln. Citrato : Sangre = 0.1 mL : 1mL sangre

Sin embargo si la sangre no se va a utilizar de inmediato, se puede utilizar como solución anticoagulante solución ELSEVER en proporción 1:1, y mantenerla en refrigeración durante un par de días.

(b) Se utiliza tripsina de páncreas de bovino al 0.1% en solución salina al 0.9% para el proceso de sensibilización.

(c) El estándar de saponinas es una mezcla 1:1 de digitonina (saponina tipo esteroidal) y un extracto de quijalla (saponina tipo titerpenoide).



Procedimiento:

*Preparación del extracto:*

Se pesaron 3.75g de muestra finamente molida y desengrasada, y se colocaron en un cartucho de celulosa, se colocó en los portadedales y en el extractor Goldfish. La extracción se realizó a máxima temperatura del aparato durante 2 horas, con metanol-agua (85:15) como solución extractora de saponinas. Una vez transcurrido el tiempo de extracción, se concentró a sequedad en el rotavapor, a una temperatura aproximada de 65°C, la muestra se pre-disolvió con solución salina 0.9% y se filtró con ayuda de vacío, para aforarla a 50 mL con la misma solución. Dado que no se realizó la determinación de inmediato, el extracto se guardó en congelación para evitar contaminación.

*Preparación de la sangre:*

Se extrajeron aproximadamente 5 mL de sangre humana, empleando un set de extracción de sangre que contenía anticoagulante. Se agitó suavemente hasta el momento de diluirla.

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

Al terminar el último lavado, se determinó el volumen del paquete de eritrocitos, para poder diluirlo al 4%, es decir, por cada 1.0 mL de glóbulos rojos (paquete) se adicionaron 24mL de solución salina al 0.9%.

*Sensibilización de eritrocitos.*

Por cada 10mL de suspensión de eritrocitos al 4% se agregó 1mL de solución de tripsina (SIGMA t-8128) al 0.1% en solución salina y se colocó en incubadora por espacio de 1 hora a 37° C $\pm$ 1°C. Transcurrido este tiempo, se distribuyó nuevamente en tubos graduados y se centrifugó a 1500 rpm durante 15 minutos para eliminar la tripsina. Se efectuaron 3



lavados con sol salina al 0.9% y centrifugando a 1500 rpm por 15 minutos, decantando el líquido sobrenadante.

Después del último lavado se midió el paquete de eritrocitos y se re-suspendió al 4%, por lo que por 1mL de paquete de eritrocitos se le añadieron 24 mL de solución salina al 0.9%. Se colocó la sangre en un matraz Erlenmeyer de 125 mL efectuando previamente una filtración con gasa.

#### *Ajuste de la suspensión de eritrocitos.*

Se realizó el ajuste del espectrofotómetro COLEMAN al 100% de T con solución salina al 0.9%, a una longitud de onda de 620 nm. Para el ajuste de la suspensión de eritrocitos se tomaron 0.5 mL con pipeta volumétrica (procurando que dicha solución estuviera lo más homogénea posible), y se colocaron en una celda, se adicionaron 2 mL de solución salina al 9% con pipeta volumétrica, homogenizando el tubo e introduciéndolo al espectrofotómetro COLEMAN, diluyendo la suspensión de eritrocitos lo necesario hasta obtener una lectura de 25 % de transmitancia, considerándose adecuada para la determinación, ya que el valor de transmitancia de la suspensión debe estar en el rango de 24-26 % T.

#### *Microtitulación.*

**La microtitulación se llevó a cabo en placas tipo "U" colocando en cada pozo 50  $\mu$ L de solución salina al 0.9% con el pipeteador de gota evitando tocar las paredes del pozo.**

Se llenó el microdilutor con 50  $\mu$ L del extracto problema o del estándar de saponinas, realizando las diluciones sucesivas desde el primer pozo hasta completar la hilera (se introdujo el microdilutor, rotándolo sin excesiva presión), eliminando el residuo de la última dilución.



Ya realizadas las diluciones pertinentes se colocó con el pipeteador de gota 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión de eritrocitos sensibilizados y ajustados, cada placa contó con su hilera de control negativo (solución salina 0.9% : sangre ajustada) y de control positivo (solución salina 0.9%: estándar de saponinas al 0.5%: sangre ajustada)

Una vez terminadas las placas se homogenizaron rotándolas de forma circular y se colocaron en la incubadora durante 1 hora a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .

#### *Lectura:*

Para obtener el título de hemólisis se observó empleando un espejo adaptado al dispositivo, localizando en la hilera horizontal de la placa, el número correspondiente al último pozo en el que se apreció la hemólisis, y que resulta ser la mínima cantidad de muestra que produce prueba positiva de hemólisis.

Por definición 1  $\mu\text{g}$  del estándar es equivalente a 10 Unidades Hemolíticas (U.H.) de tal manera que los resultados pueden expresarse en base a U.H dependiendo del título obtenido para la muestra.

#### Cálculos.

Sabemos que la mezcla de saponinas triterpenoide y esteroide (1:1) tiene una concentración de 0.5% en la solución estándar, donde se observa que si se toman 0.05 mL, entonces se tiene una concentración de 0.25 mg saponina en el pozo.

En una dilución seriada se tiene la siguiente fórmula

$$\text{Concentración del extracto}/2^t$$

Donde:

t= título de hemólisis

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



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

y por tanto  $1\mu\text{g}_{\text{std. sap}} = 10 \text{ U.H.}$

*Determinación de saponinas en la muestra:*

En todos los casos, la concentración del extracto de la muestra es de 75mg/mL, por lo que, en 0.05 mL (volumen de dilución) tendremos 3.75 mg muestra, si el título de hemólisis tiene valor de 3, se determina la cantidad de muestra en ese pozo:

$$3.75 \text{ mg} / 2^3 = 0.468 \text{ mg}_{\text{muestra}}$$

Por definición se obtienen las unidades Hemolíticas (U.H.) por miligramo de muestra (U.H./mg<sub>mtra</sub>), es por esto que la cantidad de unidades hemolíticas se determina de la siguiente manera.

$$10 \text{ U.H.} / 0.468 \text{ mg}_{\text{muestra}} = 21.36 \text{ U.H.} / \text{mg}_{\text{muestra}}$$



## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Caracterización bromatológica de la fracción proteínica de la almendra de calabaza hedionda (*Apodanthera undulata*)

Se realizó en análisis proximal de la fracción desengrasada de la almendra de calabaza hedionda (*Apodanthera undulata*). Los resultados obtenidos en base húmeda y base seca, se muestran en la Tabla 11, los valores de hidratos de carbono fueron obtenidos por diferencia.

Tabla 11. Caracterización bromatológica de la almendra de calabaza hedionda (*Apodanthera undulata*) (g/100g de muestra)<sup>a</sup>

	Harina íntegra (base húmeda) <sup>b</sup>	Harina íntegra (base seca) <sup>b</sup>	Harina desengrasada (base húmeda)	Harina desengrasada (base seca)
Humedad	4.94 ± 0.02	--	4.24 ± 0.12	--
Cenizas	3.04 ± 0.04	3.20 ± 0.04	5.31 ± 0.02	5.54 ± 0.02
Proteína	42.72 ± 0.19	44.96 ± 0.26	76.49 ± 0.39	79.88 ± 0.39
Grasa	38.99 ± 1.64	41.02 ± 1.73	0.57 ± 0.02	0.59 ± 0.02
Fibra	2.61 ± 0.13	0.57 ± 0.14	2.21 ± 0.10	2.31 ± 0.11
Hidratos de carbono	7.69	8.07	11.18	11.68

<sup>a</sup> Los valores reportados son el promedio ± desviación estándar de la determinación por triplicado con un C.V. < 5%

<sup>b</sup> Reportado por Hernández, 2014.

El análisis bromatológico muestra que la fracción desengrasada de la almendra de *Apodanthera undulata*, contiene un alto contenido de proteína cruda (>70%), valor que concuerda con lo reportado por Hernández (2014) y por Al-Kanhal (1983) y que es ligeramente mayor comparado con otras especies de la misma familia como se observa en la Tabla 12.

Como puede observarse, la harina íntegra presenta un alto contenido de proteína y grasa, características principales de las oleaginosas. Al desengrasar y secar la harina, la proteína presente se concentra hasta un 79.88% (base seca), pudiendo considerar la muestra como un concentrado proteico, ya que dicho porcentaje es superior al 70% (De Luna, 2007; Hernández, 2014).



Tabla 12. Contenido de proteína en muestras desengrasadas de diferentes especies de la familia de cucurbitáceas (base seca).

Especie	% Proteína
<i>Apodanthera undulata</i>	74.25
<i>Cucurbita digitata</i>	76.93
<i>Cucurbita foetidissima</i>	63.73
<i>Cucurbita moschata</i>	64.41
<i>Cucurbita palmeri</i>	61.71
<i>Cucurbita argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	61.45

Fuente: (Al Kanhal, 1983).

Como se puede apreciar en la Tabla 12, *Apodanthera undulata* es una de las especies que presenta uno de los mayores contenidos de proteína, lo que la hace una fuente importante de proteína con posibles usos en la alimentación animal y humana, e incluso su aprovechamiento como aislado proteico.

## 2. Caracterización de la fracción proteica

### 2.1 Proteína verdadera

Ésta determinación fue realizada con la finalidad de conocer la cantidad de nitrógeno proteico presente en la muestra, ya que al presentar un contenido alto de proteína (76.43%) debe conocerse el contenido de nitrógeno no proteico (NNP) en la muestra. En la Tabla 13 se muestra el valor obtenido de proteína verdadera y de nitrógeno no proteico para la muestra desengrasada de *Apodanthera undulata*.

Tabla 13. Contenido de Nitrógeno No Proteico (NNP) en la fracción desengrasada de la almendra de *Apodanthera undulata*.<sup>a</sup>

	Nitrógeno total (NT)	Nitrógeno proteico (NP)	Nitrógeno no Proteico (NNP) <sup>b</sup>	% NNP	Proteína Verdadera (g <sub>proteína</sub> /100g <sub>muestra</sub> )
Harina desengrasada (base húmeda)	12.24	11.44	0.80	6.54	71.53 ± 0.78

<sup>a</sup> Los valores reportados son el promedio ± desviación estándar de la determinación por triplicado con un C.V. < 5%

<sup>b</sup> % NNP =  $\left( \frac{NT - NP}{NT} \times 100 \right)$

Donde: % NNP = % Nitrógeno no proteico NT = Nitrógeno Total; NP = Nitrógeno Proteico



De los valores reportados en la Tabla 13, es posible decir que la muestra tiene un bajo nivel de nitrógeno no proteico (6.54%) en comparación con la cantidad de nitrógeno proteico presente en la muestra (>70 %), lo cual indica que la cantidad de aminoácidos libres que pudieran estar presentes en la muestra de la fracción desengrasada de la almendra de *Apodanthera undulata*, no es significativa, sin embargo, se sugiere la determinación de aminoácidos libres, para conocer a detalle cuáles aminoácidos están presentes en la muestra. Es importante mencionar esto ya que cantidades elevadas de aminoácidos libres pueden representar cierto riesgo a la salud; por ejemplo la mimosina que, si es consumida en dosis elevadas, es causante de alopecia, anorexia, lesiones a nivel esofágico, entre otros daños (Reyes, 2014).

## 2.2 Digestibilidad *in vitro* de la fracción proteica de la almendra.

La determinación de la digestibilidad *in vitro* para la muestra de *Apodanthera undulata* se muestra en la Tabla 14 junto con los porcentajes de digestibilidad de otras fuentes de proteína.

Tabla 14. Porcentajes de digestibilidad proteínica en la especie humana

Fuente de proteína	% Digestibilidad
<i>Apodanthera undulata</i> <sup>a</sup>	84.06 ± 1.71
Maíz	85
Trigo	86
Arroz	88
Chícharos	88
Harina de Soya	86
Refinado de proteína de soya	95
Ejotes	78

<sup>a</sup> El valor obtenido es el promedio ± desviación estándar de la digestibilidad *in vitro* por triplicado con un C.V. < 5%.

<sup>b</sup> Fuente: (Fennema, 2000)

Como se observa en la Tabla 14, la digestibilidad *in vitro* obtenida para la muestra de *Apodanthera undulata* es muy similar a las digestibilidades reportadas de otras proteínas de origen vegetal, casi tan alta como la del maíz o la soya y superior al de las judías, lo que indica



que un buen porcentaje de los aminoácidos presentes en la muestra están disponibles para su absorción, pudiendo afirmar que la fracción proteica (concentrado proteico) de la almendra posee una buena disponibilidad de este nutrimento; sin embargo, es necesario realizar una digestibilidad *in vivo* para determinar qué porcentaje de aminoácidos son aprovechados fisiológicamente y determinar posteriormente la calidad de la proteína presente en la fracción desengrasada de la almendra.

### 2.3 Determinación del punto isoelectrico de la proteína.

*Curva de solubilidad:*

El contenido de proteína soluble a diferentes pH's se determinó por el método de Lowry, a partir de la curva de calibración (Figura 8). Los datos obtenidos se muestran en la curva de solubilidad en la Figura 14.

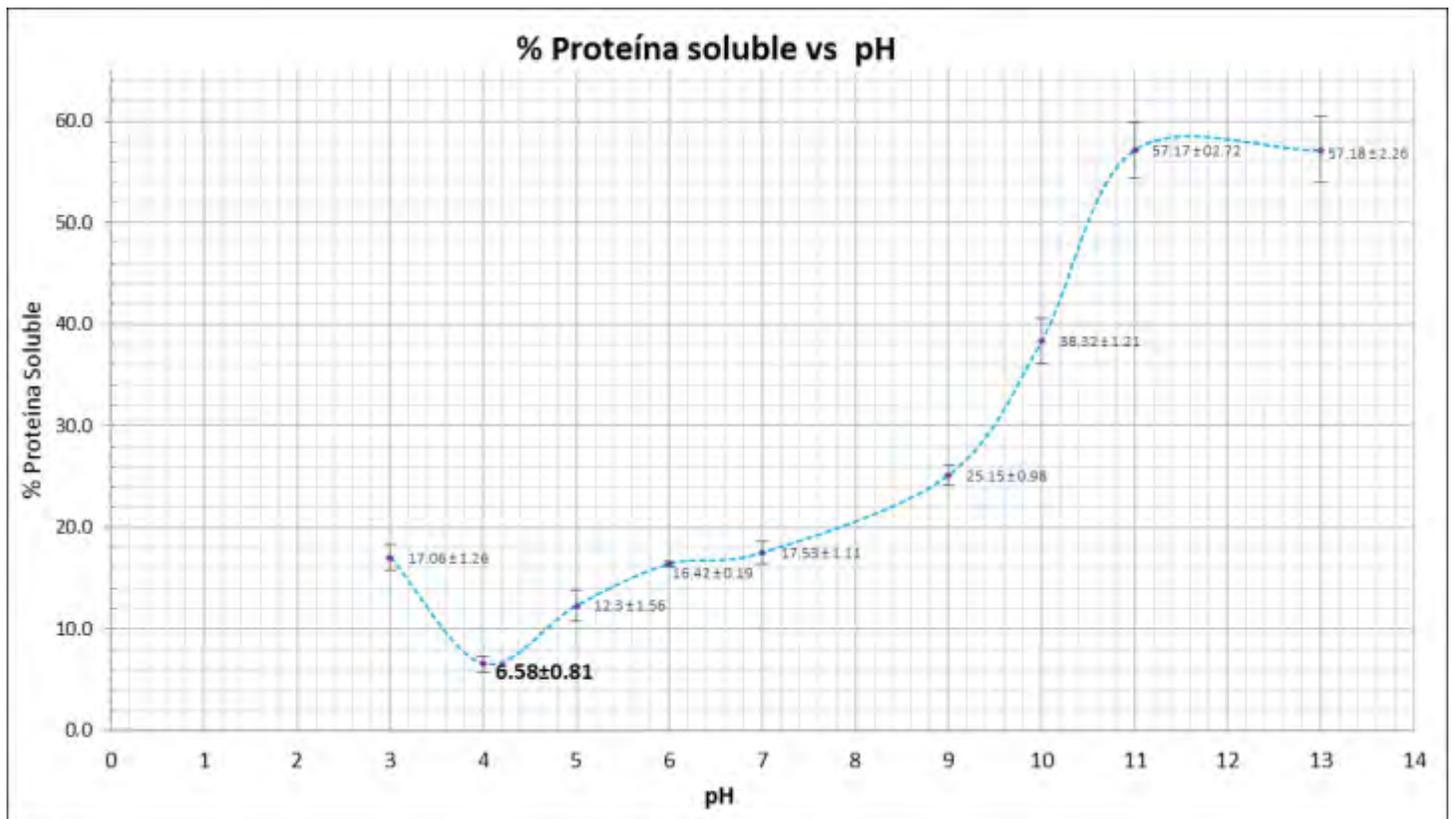


Figura 14. Curva de solubilidad de la proteína a diferentes pH's.



Como se aprecia en la Figura 14, el valor de pH en el que la proteína de *Apodanthera undulata* muestra la mínima solubilidad es a un pH =4, definiéndose así como “el punto isoeléctrico de la proteína” y concordando con lo reportado por Al-Kanhal (1983), donde indica que los puntos isoeléctricos para muestras de cucurbitáceas se encuentran dentro del intervalo de pH de 4-7. También se observa que a valores de pH superiores a 11 se presenta la máxima solubilidad de la proteína de *Apodanthera undulata*, por lo que si se desea obtener el aislado proteico de la fracción desengrasada de *Apodanthera undulata* a mayor escala, se tendrán que considerar las condiciones de pH de 4 y pH>11, correspondientes a la mínima y máxima solubilidad de la fracción proteínica de *Apodanthera undulata*.

La Figura 15, sugiere el diagrama de bloques que podría emplearse para la obtención del aislado proteico en pequeña escala (nivel laboratorio).

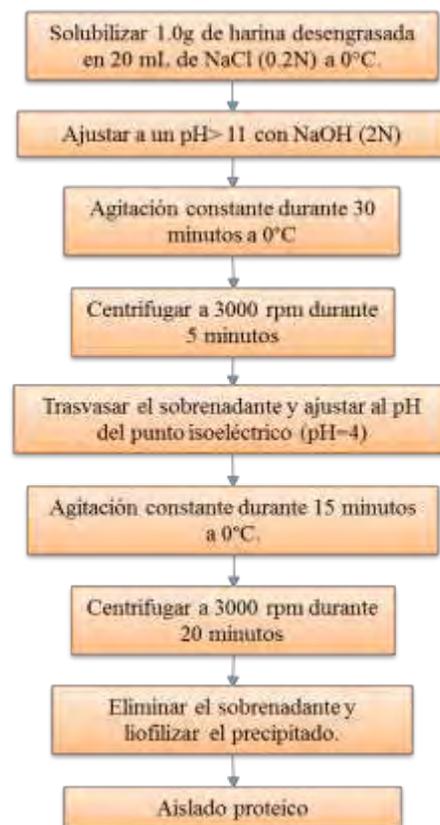


Figura 15. Diagrama general propuesto para la obtención del aislado proteico.



### 3. Detección y cuantificación de Factores Tóxicos Naturales

Se llevaron a cabo las metodologías correspondientes para determinar la presencia de los siguientes factores tóxicos naturales: taninos, inhibidores de tripsina, ácido oxálico, saponinas, glucósidos cianogénicos y lectinas que pudieran estar presentes en la fracción proteica desengrasada de la muestra de *Apodanthera undulata*, los resultados se muestran en la Tabla 15. El valor de ácido fítico es el reportado por Hernández (2014).

Tabla 15. Detección de factores tóxicos naturales en la fracción proteica de *Apodanthera undulata*.

Agente	Unidades	Resultado obtenido en la fracción desengrasada <sup>a</sup>
Inhibidores de Tripsina	UTI/mg muestra	2.44±0.13
Taninos	g ác. tánico/100 g muestra	<0.1 % <sup>b</sup>
Oxalatos	g ác. oxálico/100 g muestra	0.18±0.01
Ácido Fítico	g ác. fítico / 100 g muestra	2.64±0.02
Lectinas	UHG/g muestra	0.022
Saponinas	g <sub>saponinas</sub> /100 g muestra	<0.05 % <sup>c</sup>
Glucósidos Cianogénicos	mg HCN/100 g muestra	<1 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Los valores obtenidos son el promedio ± desviación estándar de la determinación por triplicado con un C.V. < 5%

<sup>b</sup> Donde el límite de detección de la metodología fue de 0.1 g ác. Tánico/100 g muestra (0.1%)

<sup>c</sup> Donde el límite de detección de la metodología fue de 0.1 g saponina/ 100g muestra (0.1 %)

<sup>d</sup> Donde el límite de detección de la metodología fue de 1 mg HCN/100g muestra (0.001%)

El contenido de inhibidores de tripsina de acuerdo a la metodología propuesta por Kakade y colaboradores (1974), para la muestra desengrasada de *Apodanthera undulata* presentó un nivel por debajo del Límite Máximo Permitido (10 UTI/mg muestra) lo que indica, según Kakade y colaboradores, que el material biológico no representa un riesgo a la salud para este agente antinutricional.

Se descarta la presencia de taninos en la muestra de *Apodanthera undulata*, ya que al realizar la determinación, los resultados obtenidos para la muestra se encontraron por debajo del límite de detección de la metodología, obtenida del valor mínimo de concentración de ácido tánico en la elaboración de la curva patrón establecida en la norma ISO



(International Standards Organization) para sorgo (ISO, 1988), el cual fue de 0.1 %, por lo que es posible concluir que la presencia de taninos (si existe) es muy baja. Además de que la ingesta diaria admisible (IDA) para el ácido tánico es de  $500 \text{ mg}_{\text{ác.tánico}}/\text{kg}_{\text{peso corporal}}/\text{día}$ , lo cual corresponde a  $3 \text{ g}_{\text{ácido tánico}}/\text{día}$  para una persona adulta de 60 kg, es decir, suponiendo que el contenido de ácido tánico fuera del 0.1%, entonces se tendrían que consumir 3 kg de muestra de *Apodanthera undulata* al día para sobrepasar la IDA de ácido tánico y con esto provocar una mala absorción de nutrientes.

Dado que los valores obtenidos para oxalatos, son menores al 5 % puede establecerse que la muestra de *Apodanthera undulata* (0.18 %), no representa ningún riesgo toxicológico ya que se ha establecido que las plantas que contengan al menos 5 % ( $\text{g}_{\text{ácido oxálico}}/100 \text{ g}_{\text{muestra}}$ ) pueden ocasionar efectos como una mala absorción de calcio o la presencia de cálculos renales (Peña, 2007).

Con respecto a la determinación de ácido fítico realizada por Hernández (2014), se determinó que no representa ningún riesgo a la salud, ya que el contenido presente de este factor antinutricional en la muestra se encuentran dentro de los valores comunes reportados para cereales y leguminosas convencionales (1 a 6 %) sin que represente riesgo a la salud, es decir que puede descartarse una interferencia de éste factor en la absorción de hierro, calcio, zinc entre otros minerales (Valle, 2005; Sotelo *et al.*, 2002).

Para el caso de las lectinas, podemos decir que el resultado obtenido para la muestra desengrasada de *Apodanthera undulata* no representa un riesgo a la salud, ya que los valores obtenidos de hemaglutininas están por debajo de  $1 \text{ UHG}/\text{g}_{\text{muestra}}$ , valor que, según González (2001), es necesario para producir algún un efecto tóxico.

En lo que refiere a glucósidos cianogénicos, es posible descartar la presencia de los mismos, ya que los resultados obtenidos se encuentran



por debajo del límite de detección de la metodología ( $1 \text{ mg}_{\text{HCN}}/100 \text{ g}_{\text{muestra}}$ ). Se ha reportado que valores menores a  $10 \text{ mg}_{\text{HCN}}/100 \text{ g}_{\text{muestra}}$ , no producen riesgo a la salud de quien lo consume, con lo que es posible asumir que la presencia de estos compuestos para la muestra de *Apodanthera undulata* no es significativa y no representa un riesgo para la salud.

En lo que respecta a las saponinas, la muestra contiene valores por debajo del límite de detección de la metodología, es decir, contiene menos de 0.05 % ( $5.2 \text{ U.H./mg}_{\text{muestra}}$ ) de saponinas. La dosis letal media ( $DL_{50}$ ), estudiada en algunas especies animales va de 25 a 3000 mg/kg de peso corporal, por lo que suponiendo que para producir una hemólisis, un ser humano de 20 Kg, necesitaría consumir al menos 1 Kg de almendra de *Apodanthera undulata*, en la Tabla 16 se muestran valores de algunas muestras que contienen saponinas (Zárate, 2003).

Tabla 16. Contenido de saponinas en muestras vegetales.

Muestra vegetal	U.H. / $\text{mg}_{\text{muestra}}$
Maguey	341.4
Huazontle	332.31
Haba	42.7
Soya	21.3
Calabacita amarga	< 5.2

Fuente: Zárate, 2003

Con los resultados de la Tabla 16 se observa claramente que los valores de saponinas presentes en la muestra de *Apodanthera undulata* no representan un riesgo significativo para salud, ya que el contenido de saponinas se encuentra muy por debajo, en comparación con otras muestras vegetales.



## VII. CONCLUSIONES.

Con la información obtenida durante la realización del proyecto es posible concluir que la harina desengrasada de la almendra de calabaza hedionda (*Apodanthera undulata*), contiene una alta concentración de nitrógeno, gran parte de este es de origen proteico (proteína verdadera), considerándose un auténtico concentrado proteico (>50%<sub>proteína</sub>), del cual una vez determinado el punto isoeléctrico de la mayor fracción proteínica, es posible obtener un aislado de proteína y tener un mayor aprovechamiento de este recurso vegetal.

La muestra desengrasada de *Apodanthera undulata* mostró una buena digestibilidad *in vitro*, tan alta como algunas otras proteínas de origen vegetal. Sin embargo se debe realizar la digestibilidad *in vivo* para obtener un dato más exacto.

En lo referente a los factores tóxicos naturales determinados (Inhibidores de proteasas, ácido oxálico, lectinas, taninos, glucósidos cianogénicos), complementados con la determinación de fitatos (Hernández, 2014), ninguno presentó una concentración que signifique algún riesgo a la salud la ingesta de este concentrado proteínico.

Por lo tanto, la almendra de calabaza hedionda (*Apodanthera undulata*), tanto la fracción proteica como la fracción grasa (Hernández, 2014), pueden ser aprovechadas como concentrados o aislados proteicos así como en la industria de grasas y aceites, y también para su consumo tanto animal como humano. Además se recomienda continuar con la investigación para determinar la digestibilidad *in vivo* así como la calidad proteica.



## VII. BIBLIOGRAFÍA.

- Al-Kanhal, M. A. (1983). *Biochemical Characteristics Cucurbitaceae Salt-Soluble Storage Proteins*. Tesis de Doctorado. Universidad de Arizona. Arizona, pp. 16-20.
- Alvarado H., E. L. (1999). *Evaluación toxicológica de la fracción proteínica de la almendra de capulín (*Prunus serotina*)*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. Cd. de México, pp. 7.
- Arrazóla P., G. (2002). *Análisis de glucósidos cianogénicos en variedades de almendro: implicaciones en la mejora genética*. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante. Alicante, pp. 18-22.
- Arrigoni, E., Caprez, A., Amado, R. y Neukom, H. (1986). Chemical composition and physical properties of modified dietary fibre sources. *Food Hydrocolloids*. 1:57-64.
- Badui, D. S. (2006). *Química de los alimentos*. Cuarta edición. Pearson Educación. Cd. de México, pp. 29, 107, 120, 428, 569-570.
- Chung, K-T., Wong T. Y., Wei, C-I., Huang, Y-W., Lin, Y. (1998). Tannins and human health: a Critical Review. *Food Science and Nutrition*. 38(6): 421-464.
- Committee on Food Chemical Codex. (1996). *Codex Alimentarium, Food Chemicals Codex*. 4<sup>th</sup> Edition, Ed. National Academy Press. Washington, pp. 779-780.
- De Luna J., A., (2007). Composición y Procesamiento de la Soya para consumo humano. *Revista Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. 37: 35-44.
- Dueñas, M., Sun, B., Hernández, T., Estrella, I., Spranger, M.I. (2003). "Proanthocyanidin composition in the seed coat of lentils (*Lens culinaris* L.)". *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51: 7999-8004.
- FAO. (1991) *Dietary protein quality evaluation in human nutrition*. Reporte de Consultoría de expertos de la FAO. Documento recuperado el 12 de Abril de 2016 en:



<http://www.fao.org/documents/card/es/c/ab5c9fca-dd15-58e0-93a8d71e028c8282/>

- FAO. (1992). *Cultivos Marginados: Otra perspectiva de 1492*. Publicación seriada de la FAO. Documento obtenido el 16 de Marzo de 2016 en:  
<http://www.fao.org/publications/card/es/c/f9058fbd-e6d9-5247-a525-ba3cf0d7d6dd/>
- FAO. (2016). *6. Cultivos oleaginosos y productos derivados*. Repositorio de documentos de la FAO. Recuperado el 17 de Octubre de 2015 en:  
<http://www.fao.org/WAICENT/faoinfo/economic/faodef/FAODEFS/H65F.HTM>
- Fennema O., R.; (2000). *Química de los alimentos*. 2ª Ed., Ed. Acribia. S.A., Zaragoza, pp. 270, 475.
- Fernández, V., S.O.; (1996). *Selección de mutantes de Chenopodium quinoa wild. en la generación M2. Cuantificación de saponinas en las variedades isgula y barandales adaptadas al valle de Toluca*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. Cd. de México, pp. 9-10.
- Flores L., C. E.; (2010). *Proceso óptimo de cocción de una variedad de frijol (Phaseolus vulgaris) de amplio consumo con un alto contenido de lectinas*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. Cd. de México, pp. 26-40
- Girón, M., (1992). *Determinación semicuantitativa de saponinas en muestras vegetales aprovechando su capacidad hemolítica*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química UNAM. Cd. de México, pp. 30-50.
- González P., P. (2001). *Efecto del procesamiento con calor sobre la cuantificación de lectinas del frijol y su toxicidad remanente*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. Cd. de México, pp. 116.
- González T. L., Téllez V. A., Sampedro J. y Nájera H., (2007). Las proteínas en la nutrición. *Revista Salud Pública y Nutrición*. 8(2).



Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey. Obtenido el 17 de enero de 2016 de:

<http://www.respyn.uanl.mx/viii/2/ensayos/proteinas.htm7>

- Gutiérrez G., G.; (2011). *Alimentos no convencionales*. Artículo recuperado el 7 de septiembre del 2011 en: <http://laprimeraplana.com.mx/2011/08/11/alimentos-noconvencionales/>
- Hart D., L. (1991). *Análisis moderno de los alimentos*, Ed. Acribia. Zaragoza, p.p. 17-15.
- Hartree, E.F., (1973). Determination of a protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*. 48:422-423
- Heike, Vibrans (Ed). (2009), *Malezas de México, Cucurbitaceae. Apodanthera undulata* A. Gray, Ficha técnica de CONABIO e Imágenes de Pedro Lezama. Obtenidas el 12 septiembre 2015 en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/cucurbitaceae/apodanthera-undulata/fichas/ficha.htm>
- Helrich, K.; (1990). *A.O.A.C. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists* 15 th Edition, Arlington, Vol. I, pp. 17-18,40-62 y 69-83. Vol. II, pp. 1012.
- Hernández, I., (2014). *Caracterización bromatológica, determinación de factores tóxicos de la almendra, y parámetros fisicoquímicos de la grasa de calabaza hedionda (Apodanthera undulata)*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. Cd. de México, pp. 5-16, 65-69.
- **Herrera Z. R.; (2012).** "Composición bromatológica, potencial nutritivo y contenido de factores tóxicos, entre las hojas de diferentes cepas de moringa (*Moringa oleífera*) que se cultivan en el país. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. Cd. de México, pp. 11-12.



- Horwitz, W., Latimer, E., Eds., (2005). Official Methods of Analysis of AOAC International. 18<sup>th</sup> ed. *Published by AOAC International* Gaithersburg, Chapter 42. pp. 8-9.
- ISO (9648-1988). (1988). International Organization of **Standardization**. "*Sorghum-Determination of tannin content*".
- Jacks, T. J., Hensarling T. P., Yatsu L.Y.; (1972). "Cucurbit Seeds: I. Characterization and uses of oils and proteins. A review". *Economic Botany*. 26(2):135-141.
- Kakade, M-L., Rackis J.J., Mcghee, J. E. and Puski, G. (1974). Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. *Cereal Chemistry*, 51:376-382.
- Kirk R., S., Sawyer, R. Egan, H. (1991). ***Pearson's composition and analysis of foods***. 9<sup>th</sup> ed.; Pearson Education. New York, pp. 13.
- Latham, M. C., (2002). Nutrición humana en el mundo en desarrollo. *Colección FAO: Alimentación y Nutrición*. 29:103,106.
- Liener, I. E. (1964). Seed hemagglutinins. *Economic Botany*. 18:27-33.
- Lira, R. (2001). *Curcubitaceae. Flora del Bajío y de regiones adyacentes*. Fascículo 92. Instituto de Ecología, A. A. Xalapa, pp. 1-10.
- Lira, R., Rodríguez-Arévalo, I., (2006). *Catálogo de la familia Cucurbitaceae de México. UNAM. Informe final SNIB-CONABIO proyecto DS002*. Cd. de México, pp. 13-20.
- Lira, R. Rodríguez, C. Alvarado, J. Rodríguez, I Castejón, J & Dominguez, A. (1998). Diversidad e importancia de la familia Cucurbitaceae en México. *Acta Botánica Mexicana*. 42: 43-77.
- Lira, R., Eguiarte, F., L., Montes H.,S.; (2009). *Proyecto Recopilación y análisis de la información existente de las especies de los géneros Cucurbita y Sechium que crecen y/o se cultivan en México*. Informe final. FES Iztacala, UNAM. Cd. de México. Documento disponible en línea. Recuperado el 22 de Abril de 2016 de: <http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/centrosOrigen/Cucurbita%20y%20Sechium>



[20Sechium/Informe\\_Final/Informe%20final%20Cucurbita%20y%20Sechium.pdf](#)

- Lucas, B., Guerrero A., Sigales, L., y Sotelo, A. (1988). True protein content and non-protein amino acids present in legumes seeds. *Nutrition Reports International*. 37(3):545-552.
- Malca O., S. V. (2004). *Comparación de dos técnicas para determinar la digestibilidad proteica de insumos y alimentos comerciales para caninos*. Tesis de licenciatura en Medicina Veterinaria. Universidad Mayor de San Marcos. Lima, p. 3.
- Martínez, José J.; Medina, Oscar J.; Zambrano, R. (2012). Estudio fisicoquímico funcional de los aislados proteicos en semillas de maracuyá (*Passiflora edulis* f). *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad de Pamplona*. Pamplona. 9(1):70-76.
- Mera O., Luz Ma., Bye B., R., Villanueva V., C., Luna M., A. (2011). *Documento de diagnóstico de las especies cultivadas de Cucurbita L.*, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. de México, pp. 8, 12, 24, 32.
- NMX-F-083-1986. *Alimentos. Determinación de humedad en productos alimenticios*. Normas Mexicanas. Dirección general de normas. Cd. de México.
- Nielsen, S. (ed). (2003). *Análisis de los Alimentos*. Tercera edición; An Aspen Publication, Gaithersburg, p. 135
- Oña, N.; Novillo, F., (2010). Determinación de taninos condensados en sorgo y su desactivación utilizando urea. *Revista Química Central de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador, Quito*. 1(01):9-18.
- Perales, H. R., y J. R. Aguirre. (2008). *Biodiversidad humanizada, en Capital Natural de México*, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, Cd. de México, pp. 565-603.



- Peña C., C. (2007). "*Determinación de ácido oxálico en alimentos de origen vegetal crudos y cocidos por el método oficial de la AOAC*". Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. Cd. de México, pp. 5-8, 10-13, 19-31.
- Rayees, B., Dorcus, M., Chitra, S. (2013). Nutritional composition and oil fatty acids of Indian winter melon *Benincasa hispida* (Thunb.) seeds. *International Food Research Journal*. 20(3): 1151-1155
- Reyes O., E. S. (2014). *Estudio etnobotánico, bromatológico y toxicológico en brotes, botones florales y semillas de guaje verde (Leucaena leucocephala)*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. Cd. de México, pp. 12-18.
- SAGARPA (2015). *Comisión Nacional Sistema-Producto: Oleaginosas*. Programa de Fomento a la Agricultura de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural y Pesca. Recuperado el 15 de enero de 2016 de: [http://www.oleaginosas.org/cat\\_57.shtml](http://www.oleaginosas.org/cat_57.shtml)
- Silva, M. J. A.; (2006). *Obtención, caracterización y relación estructura-funcionalidad de un aislado proteico de quinua (Chenopodium quinoa) orgánica proveniente de la VI región de Chile*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química. Santiago de Chile, pp. 1-2.
- Solano V., H. (1997) *Efecto de diferentes concentraciones de taninos sobre la flora microbiana ruminal y en la degradabilidad in vitro del forraje de alfalfa*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, pp. 4-8
- Sotelo, A., Mendoza, J., Argote, R. M. (2002). Contenido de ácido fítico en algunos alimentos crudos y procesados; validación de un método colorimétrico. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 46(4): 301-306.
- Sotheeswaeen, S. (1988). Screening for saponins using the blood hemolysis test. *Journal of Chemical Education*. 65: 161-162.



- Toms, G. (1971). "Phytohaegglutinins. In: *Chemotaxonomy of the Leguminosae. Harborne*". Academic Press Inc., New York, pp. 367-462.
- Valle, P., Lucas, B., (2005). "*Toxicología de Alimentos*". Instituto Nacional de Salud Pública, Centro Nacional de Salud Ambiental, Cd. de México. pp. 69.
- Vasconcelos, I. M., Oliveira, J. T. (2004). Antinutritional properties of plants lectins. *Toxicon*. 44: 385-403.
- Vioque, J. Sánchez-Vioque, R., Pedroche, J., Yust, M. M., Millán, F. (2001). Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados proteicos. *Grasas y Aceites*. 52 (2): 127-131.
- Ysunza O., A; López N., L., Martínez M., M. (2003). "*Plantas comestibles no convencionales: el conocimiento que los campesinos mexicanos tienen, pero que no saben que tienen*" CECIPROC, Cd de Oaxaca, pp. 345-356.
- Zarate M., A. L. (2003). *Caracterización bromatológica y determinación de factores tóxicos de la semilla de Napahuite (Trichilia hirta)*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. Cd. de México, pp. 16-21.



## ANEXO

### 1. Parámetros bromatológicos.

A continuación se describe brevemente cada uno de los parámetros bromatológicos indicados en la sección: 5.1 Análisis Proximal.

#### 1.1 Humedad

Todos los alimentos, contienen agua en mayor o menor proporción. Las cifras varían entre un 60 y un 95% de agua en los alimentos naturales. En los tejidos vegetales y animales, puede decirse que existe en **dos formas generales: "agua libre" y "agua ligada"**. El agua libre es la forma predominante, y se libera fácilmente por secado. El agua ligada se encuentra unida a la matriz del alimento como agua de cristalización o ligada a las proteínas y a las moléculas de sacáridos (Hart, 1991).

La humedad se define como la pérdida en peso que sufre un alimento al someterlo a las condiciones de secado determinadas. (NMX-F-083-1986)

#### 1.2 Proteínas

Las proteínas, como los carbohidratos y las grasas, contienen carbono, hidrógeno y oxígeno, pero también contienen nitrógeno y a menudo azufre. Son muy importantes como sustancias nitrogenadas para el crecimiento y la reparación de tejidos. Las proteínas son el principal componente estructural de las células y los tejidos (Latham, 2002).

En los sistemas alimenticios, las proteínas poseen propiedades nutricionales, y de sus componentes se obtienen moléculas nitrogenadas que permiten conservar la estructura y el crecimiento de quien las consume; asimismo, pueden ser ingredientes de productos alimenticios y, por sus propiedades funcionales, ayudan a establecer la estructura y propiedades finales del alimento (Badui, 2006).



En la dieta de los seres humanos se puede distinguir entre 2 tipos de proteínas, las de origen animal y las de origen vegetal. Dentro de las primeras, las que provienen de huevo, leche y derivados lácteos son consideradas como de excelente calidad. De las proteínas vegetales, la proteína del frijol de soya es considerada de buena calidad, la contenida en cereales, harinas y la mayor parte de tubérculos y raíces vegetales está clasificada como de mediana calidad, y la mayoría de las frutas y verduras contienen proteína de baja calidad. Si bien, las proteínas de origen animal son de mejor calidad, esto no quiere decir que las vegetales no se puedan aprovechar, o que su calidad se vea desmerecida (González-Torres, 2007).

### 1.3 Grasa cruda o extracto etéreo.

Los lípidos, junto con las proteínas y carbohidratos, constituyen los principales componentes estructurales de las células vivas, y por lo tanto de los alimentos (Nielsen, 2003).

Los lípidos de los alimentos se consumen en forma de grasas **“visibles”, que han sido separadas de sus fuentes animales o vegetales**, como la mantequilla, la manteca o como componentes de alimentos básicos, como la leche, el queso y la carne. Las fuentes más importantes cuantitativamente de aceites vegetales son las semillas de: soja, algodón, cacahuate, árboles como la palma, así como la oliva y el coco. Los lípidos de la dieta juegan un importante papel en la nutrición. Suministran calorías y ácidos grasos esenciales, transportan vitaminas y mejoran la sensación bucal de los alimentos, pero durante décadas han venido siendo objeto de controversia con respecto a su toxicidad, su contribución a la obesidad y al riesgo a sufrir ciertas enfermedades (Fennema, 2000).

### 1.4 Cenizas

Las cenizas de un alimento son un término analítico equivalente al residuo inorgánico que queda después de calcinar la materia orgánica. Las



cenizas normalmente, no son las mismas sustancias inorgánicas presentes en el alimento original, debido a las pérdidas por volatilización o a las interacciones químicas entre los constituyentes (Kirk *et al.*, 1991).

### 1.5 Fibra cruda

Con este nombre se designa un grupo muy amplio de polisacáridos que no son aprovechados metabólicamente por los organismos monogástricos, incluyendo al hombre, pero que cumplen una función muy importante en el bienestar del individuo (Arrigoni, 1986).

La fibra está constituida por los componentes estructurales de las paredes celulares de los vegetales, entre los que destacan la celulosa, la hemicelulosa y las pectinas; también se incluye entre estos compuestos la lignina que, aun cuando no es un hidrato de carbono, siempre se encuentra asociada a ellos y es un compuesto no digerible por el tracto digestivo del humano. Estos polímeros no se encuentran de manera natural en los alimentos de origen animal, ya que son exclusivos de los vegetales. La composición de dichas fibras es muy variada en los distintos alimentos y depende de muchos factores, entre los que destaca la madurez del producto (Badui, 2006).

### 1.6 Carbohidratos

Como indica su nombre, los hidratos de carbono —o carbohidratos— son compuestos formados por carbono, hidrógeno y oxígeno (CHO), presentan la fórmula general  $C_x(H_2O)_n$ . Los carbohidratos son los compuestos orgánicos más abundantes en la naturaleza, y también los más consumidos por los seres humanos (en muchos países constituyen entre 50 y 80% de la dieta poblacional). Los hidratos de carbono que provienen del reino vegetal son más variados y abundantes que los del reino animal; se originan como producto de la fotosíntesis y son los



principales compuestos químicos que almacenan la energía radiante del sol (Badui, 2006).

Los carbohidratos constituyen más del 90% de la materia seca de los vegetales. Son por tanto abundantes, de fácil disponibilidad y baratos. Son un componente común en los alimentos, bien como componentes naturales o bien como ingredientes añadidos. Su uso está muy extendido, tanto por las cantidades que se consumen como por la variedad de productos en los que se encuentran. Poseen muchas estructuras moleculares diferentes, tamaños y formas, y exhiben una gran variedad de propiedades físicas y químicas. Por otra parte, son susceptibles de modificación química y bioquímica, y ambos tipos de modificaciones se utilizan comercialmente para mejorar sus propiedades y para ampliar su uso (Fennema, 2000).

## 2. Metodologías para el análisis bromatológico.

La determinación de los parámetros bromatológicos se basó en las metodologías establecidas por la AOAC. (Helrich, 1990)

### 2.1 Determinación de Humedad en estufa al vacío.

*Fundamento:* El método de secado en estufa al vacío se basa en la eliminación de agua libre en el alimento a temperaturas de 70-80°C, al determinación se realiza en una estufa de vacío, con el fin de abatir la temperatura de ebullición del agua.

#### Material

- Estufa con vacío (entre 70-80°C y 250 mmHg por lo menos) LAB-LINE mod. 3620.
- Balanza analítica Santorious
- Desecador de vidrio
- Charolas de aluminio



## Procedimiento

Se colocaron las charolas de aluminio en la estufa al vacío durante al menos 2 horas, se sacaron de la estufa y se colocaron inmediatamente en un desecador, para enfriarlas y posteriormente pesarlas en la balanza analítica, esta acción se repetirá hasta obtener peso constante, es decir, cuando al pesarla en la balanza analítica, sólo se presente variación en la cuarta cifra decimal con respecto al valor anterior.

Una vez a peso constante las charolas de aluminio se pesaron 5 g de muestra en cada una de ellas, distribuyendo la muestra tratando de que presentara la mayor superficie de evaporación, se introdujeron las charolas en la estufa que se encontraba entre 60 y 65°

Se realizaron pesadas periódicas de las muestras, sacándolas de la estufa y colocándolas inmediatamente en un desecador donde permanecieron durante 15 minutos; para su posterior pesado en la balanza analítica; hasta obtener peso constante.

## Cálculos

Teniendo el peso de la charola con muestra antes y después de secada, y con el peso de la charola sola, la determinación de la humedad se realiza del siguiente modo:

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

Donde:

P<sub>i</sub> = Peso de charola con muestra antes de secada (expresada en gramos)

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

m = peso de la muestra (en gramos)

### 2.2 Determinación de cenizas.

*Fundamento:* Las cenizas son el producto de la eliminación del material orgánico a altas temperaturas (500° C) este residuo contiene el material inorgánico en forma de óxidos y sales.



## Materiales

- Mufla a 550°C THERMOLYNE, mod 1500.
- Balanza analítica Santorious
- Mechero Bunsen
- Crisoles de porcelana tipo Gooch
- Desecador de vidrio

## Procedimiento:

Se colocaron los crisoles en la mufla a una temperatura de 550°C, marcándolos con lápiz. Se retiraron de la mufla y se dejaron enfriar un poco y colocándolos en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se repitió la operación hasta alcanzar peso constante de los crisoles.

A continuación se pesó en cada crisol (ya a peso constante) de 3 a 5 g de muestra y se carbonizó en una campana de extracción, a la flama de un mechero, hasta que no despendía humo y se introdujo el crisol a la mufla, la cual se encontraba a 500°C.

A aquellas cenizas que se mostraban manchas negras después de la incineración se le adicionaron unas gotitas de agua destilada una vez que estaban frías y se volvieron a introducir a la mufla con el fin de obtener cenizas grisáceas o blancas homogéneas; lo que nos indicó el punto final de esta determinación. El tiempo de permanencia es muy variable, y depende del material que se esté trabajando.

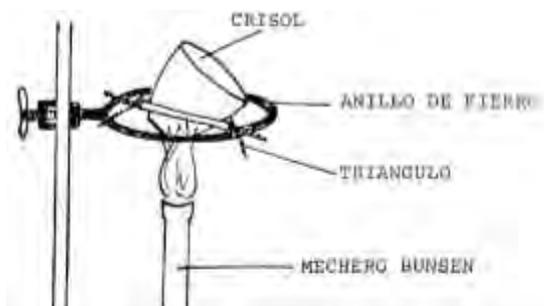


Figura 16. Dispositivo para carbonización.



## Cálculos

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

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

Donde:

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

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

$m$  = peso en gramos de la muestra

### 2.3 Determinación de grasa.

#### *Extracción con equipo Goldfish*

*Fundamento:* La determinación del extracto etéreo, incluye una gran variedad de compuestos orgánicos, únicamente unos pocos de ellos tienen interés nutricional, aquellos que se encuentran en gran cantidad incluyen grasa verdadera, ácidos grasos y sus ésteres, vitaminas liposolubles y polivitaminas tales como los carotenoides.

Se empleó éter de petróleo como disolvente con punto de ebullición de 30-60°C.

#### Materiales y reactivos

- Aparato de extracción Goldfish, LABCONCO
- Balanza analítica Santorius
- Cartuchos de celulosa de 22x80 mm
- Estufa de vacío LAB-LINE, mod 3620
- Éter de petróleo p. eb. 30 a 60 °C
- Vasos de borde esmerilado, LABCONCO

Se trabajó con la muestra a la que se le determinó humedad previamente. Dentro de un cartucho de celulosa se colocaron 5 g de muestra, se tapó con un pedazo de algodón y se colocó en el portadetal y



éste a su vez en el seguro metálico del aparato Goldfish). Se adicionaron aproximadamente 50 mL de disolvente (éter de petróleo) sobre el vaso de borde esmerilado (puesto previamente a peso constante), y se aseguró al aparato de extracción con la ayuda del anillo metálico con rosca.

Se abrió la llave del agua para que ésta circulara dentro de los refrigerantes. Se subió la parrilla del equipo hasta que estuvo en contacto con el vaso y se dejó el tiempo necesario para la extracción de la fracción lipídica.

Transcurrido dicho tiempo y siguiendo las condiciones adecuadas se sacó el portadedal con el cartucho, sustituyéndose por el tubo recuperador y colocando nuevamente el vaso para volver a calentar, pero en este caso el disolvente quedó retenido en el tubo recuperador.

Una vez que el vaso estuvo libre de disolvente, se colocó en la estufa de vacío para la completa eliminación de solvente y humedad, con el fin de obtener únicamente el peso de la fracción lipídica.

### Cálculos

Son necesarios los pesos del recipiente colector tanto antes como después del procedimiento de extracción, obteniendo así el extracto etéreo.

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

Donde:

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

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

$m$  = peso en gramos de la muestra

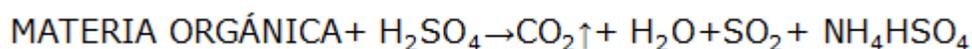
### 2.4 Determinación de proteína cruda.

*Fundamento:* El método empleado usualmente para la determinación de nitrógeno en alimentos, es el método Kjeldahl y varias modificaciones se

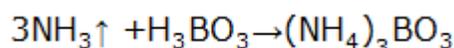
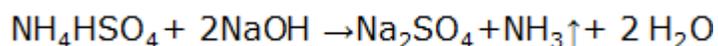


han desarrollado en la actualidad. El procedimiento consiste en una oxidación de la materia orgánica por acción del ácido sulfúrico para formar dióxido de carbono, agua y liberar el nitrógeno como amoníaco; este se encuentra en la solución ácida como sulfato ácido de amonio, y en la destilación por la adición de lejía liberado como nitrógeno amoniacal y la titulación de este con ácido como se observa en las siguientes reacciones:

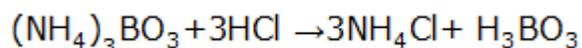
Digestión:



Destilación:



Titulación:



La digestión de la muestra para formar el sulfato ácido de amonio, es la parte más difícil de la operación. Muchos agentes catalizadores han sido usados para aumentar la velocidad de digestión de la muestra; como son el cobre, mercurio y el selenio entre otros. Se han usado con mucha efectividad la combinación de catalizadores como es el uso de cobre-mercurio, cobre-selenio y mercurio-selenio.

Numerosos agentes oxidantes han sido adicionados al final del periodo de digestión para obtener una completa oxidación; en varios tipos de muestras la pérdida de nitrógeno a través de la formación de aminas o de nitrógeno libre se ha presentado por el uso de estos agentes a excepción del uso del peróxido de hidrógeno.

Sales como sulfato de potasio o de sodio son comúnmente adicionadas para aumentar el punto de ebullición de la mezcla de digestión, sin embargo la relación sal/ácido no debe ser muy alta, ya que se podría presentar la pérdida de amoníaco de la sal de amonio.



El amoniaco obtenido después de la digestión, es liberado por una gran variedad de métodos; siendo el más usado por acción de un alcali y atrapado el amoníaco liberado en una cantidad conocida de ácido valorado.

#### Material y reactivos.

- Balanza analítica
- Microdigestor marca TECATOR mod. Ab-20/40
- Microdestilador marca LABCONCO, Kjeltec Auto 1030 Analyzer.
- Tubos de digestión Tecator de 100 mL.
- Mezcla digestiva (a)
- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Sulfato de potasio (reactivo analítico)
- Solución de ácido bórico con indicadores (b)

Indicador A: 100 mg fenoftaleína aforados a 100mL con alcohol etílico.

Indicador B: 33 mg de verde de bromocresol al y 66 mg de rojo de metilo aforados a 100 mL con alcohol etílico

- Solución de hidróxido de sodio al 40% (p/v)
- Solución de ácido clorhídrico 0.01N valorada

(a).Mezcla digestiva: Se preparó disolviendo 3g de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ) en 100 mL de ácido ortofosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ); y 300 mL de ácido sulfúrico concentrado resbalando por la pared del recipiente. Agitando por aproximadamente 30 minutos

(b). Solución de ácido bórico con indicadores: Se pesaron 10 g de ácido bórico colocándolos en un matraz aforado de 2 L; se adicionó agua agitando hasta disolverlo, a continuación se agregaron 70 mL del indicador A y 20 mL del indicador B. Se ajustó el color a un tono café rojizo con ácido o alcali según se requería y se aforaron a 2 L con agua destilada.



*Digestión de la muestra.* Se pesaron de 10 a 100 mg de muestra y se colocaron en el tubo de digestión (se realizó también un blanco de glucosa y un control interno de caseína), se agregó aproximadamente 0.5 g de sulfato de sodio y 3 mL de mezcla digestiva; se colocaron los tubos en el digestor durante 15 minutos a una temperatura aproximadamente de 280°C, se retiraron los tubos del digestor y se dejaron enfriar para adicionarle 1.5 mL de peróxido de hidrógeno al 30%, para colocarlos nuevamente en el digestor el cual se encontraba a una temperatura de 370°C. Una vez efectuada la digestión se enfriaron los tubos y se procedió a realizar la destilación en el destilador Kjeltex.

#### *Destilación.*

Se adicionaron 25 mL de agua destilada a cada tubo.

Se colocó un tubo en posición correcta en el destilador, **asegurándose que la "boca" del tubo embonara perfectamente con el sello.** Los tubos se colocaron en el siguiente orden: blancos primero, después un control interno de caseína y al final las muestras.

La destilación y titulación se llevó a cabo automáticamente en el microdestilador. Al terminar se anotó el volumen gastado de HCl que aparecía en la pantalla. Y se calculó el contenido de nitrógeno total ( $N \times 6.25$ ) presente en la muestra.

Cálculos:

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

$$\%Proteína = \%N_2 \times F$$

$\%N_2$  = Nitrógeno contenido en la muestra (expresado en g  $N_2/100g_{muestra}$ )

P = mL de la titulación de la muestra

B = mL de la titulación del blanco

N = normalidad de la solución de HCl



$m_{eq}$  = milliequivalente de nitrógeno (0.014)

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

$F$  = factor de conversión (6.25) Con respecto al factor de conversión se debe aclarar que este depende de cada tipo de muestra, el cual esta relacionado al contenido de nitrógeno de la proteína en estudio.

## 2.5 Determinación de Fibra Cruda.

*Fundamento:* La determinación popular de fibra o fibra cruda, se refiere a las partes de la pared celular de los tejidos vegetales las cuales no pueden ser digeridas por las enzimas del intestino. Durante el paso a través del tracto digestivo, la fibra se hincha y forma una masa gelatinosa, con una muy alta capacidad de retención de agua; con lo cual se facilita el transporte del bolo alimenticio en el tracto digestivo.

Dentro del interés analítico de un alimento, podemos dividir los carbohidratos de origen vegetal en dos partes: por un lado los carbohidratos no estructurales como son los almidones, azúcares y fructosanos; y por otro lado los carbohidratos estructurales, tales como la celulosa y hemicelulosa, que viene a corresponder a lo que se denomina fibra cruda.

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

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



### Procedimiento:

Se pesaron de 3 a 5 g de muestra desengrasada sobre un vaso de Berzelius que contenía 0.5 g de Silicato de aluminio (limpio y calcinado) y unas perlas de vidrio. Se adicionaron 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 se calentó previamente; se pusieron a digerir por espacio de 30 minutos exactos. Se vació el contenido sobre un Buchner con malla metálica (embudo California) para realizar la filtración con ayuda de vacío; se lavó el residuo con agua destilada caliente hasta eliminar el ácido (aproximadamente 500 mL). Se transfirió nuevamente el residuo lavado al vaso Berzelius para adicionarle unas gotas de antiespumante y 200 mL de NaOH 1.25% hirviendo y colocar inmediatamente en el aparato de digestión por exactamente 30 minutos. Transcurrido el tiempo se filtró en el mismo embudo y se lavó el residuo con agua caliente (aproximadamente 500 mL), hasta eliminar el álcali; se quitaron las perlas de vidrio lavándolas con agua para recuperar el material adherido y se adicionaron al residuo 25 mL de alcohol etílico.

El residuo se transfirió de forma cuantitativa a un crisol de porcelana (puesto previamente a peso constante) y se colocó en la estufa de vacío para su secado (aprox. 4 a 8 horas) y después pesarlo. Posteriormente se carbonizó y se introdujo en la mufla para su incineración, realizando pesadas periódicas hasta obtener peso constante.

### Cálculos

Ya que se requiere trabajar con muestras previamente desengrasadas es recomendable utilizar la muestra a la que se le determinó humedad y grasa, por lo cual el peso de la muestra, será el referido al peso inicial de las anteriores determinaciones.



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

Donde:

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

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

$m$  = peso de muestra (en gramos)