



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

*Caracterización bromatológica y determinación de factores tóxicos naturales en los hongos: Juan Dieguitos (*Amanita rubescens*) y yemitas (*Amanita caesarea*) colectados en Ozumba, Estado de México.*

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA
IRMA IRENE MORALES CAMACHO



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Pedro Valle Vega

VOCAL: M. en C. Bernardo Lucas Florentino

SECRETARIO: M. en C. Lucia Cornejo Barrera

2° SUPLENTE: Dra. Iliana Elvira González Hernández

1er. SUPLENTE: Q.F.B. Juan Diego Ortiz Palma Pérez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

ANEXO 1 DEL LABORATORIO 4A Y 4C, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, EDIFICIO A, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA _____
M. EN C. BERNARDO LUCAS FLORENTINO

SUPERVISOR TÉCNICO _____
M EN C MARÍA EDELMIRA LINARES MAZARÍ

SUSTENTANTE: _____
IRMA IRENE MORALES CAMACHO

Índice

	página
1.-Resumen	4
2.-Introducción	5
3.-Objetivos	8
4.- Marco teórico	9
4.1 Producción, comercialización y consumo de hongos del género <i>Amanita</i>	9
4.2 Características bioclimáticas del estado de México	10
4.3 Características morfológicas de Hongos del género <i>Amanita</i>	11
4.4 Principales características morfológicas de la especies estudiadas	13
4.5 Importancia de la determinaciones en la composición química de los Hongos	15
4.6 Metodologías bromatológicas realizadas a los macromicetos	16
4.7.-Factores anti nutrimentales y tóxicos naturales	22
5.-Metodología (Diagrama General)	31
5.1 Acondicionamiento de las muestras	32
5.2 Metodología de Cocción de muestras	32
5.3 Análisis proximal	33
5.4 Determinación de Fibra dietética	41
5.5 Determinación de Digestibilidad de la proteína <i>in vitro</i>	46
5.6 Determinación proteínica verdadera	48
5.7 Determinación de inhibidores de tripsina	50
5.8 Determinación de lectinas	52
5.9 Determinación cualitativa de alcaloides	56
5.10 Determinación de Amanitina	57
6.-Resultados y discusión	59
7.-Conclusiones	73
8.- Bibliografía	74

1.- RESUMEN

En el Estado de México, hay una acentuada tradición por el consumo de hongos silvestres comestibles, dentro de los hongos que tienen mayor demanda, están el Juan Dieguito (*Amanita rubescens*) y las yemitas (*Amanita caesarea*).

Es por eso que para el hombre, algunos hongos tienen un gran valor culinario y medicinal, mientras que otros son dañinos; por lo que existe una intoxicación frecuente por el consumo de hongos tóxicos que se presenta por ignorancia en la mayoría de los casos, y para evitarlo es necesario llevar a cabo una estricta clasificación taxonómica y complementarla con su composición química.

Debido a esto, el objetivo principal de este trabajo se enfocó en realizar la determinación de macronutrientes así como la cuantificación de los tóxicos naturales de los hongos Juan Dieguito (*Amanita rubescens*) y yemitas (*Amanita caesarea*) adquiridos en el tianguis de Ozumba, Estado de México y consumidos en dicha región, con la finalidad de establecer su seguridad alimenticia.

El estudio bromatológico consistió en el análisis proximal que nos permitió conocer el contenido de macronutrientes, se encontró una cantidad significativa de grasa en ambas especies, también se determinó la fibra dietética total y la digestibilidad *in vitro*.

Dentro del estudio de tóxicos naturales se realizó la determinación de inhibidores de tripsina, determinación cualitativa de alcaloides y amanitina, así como el contenido de lectinas, se evaluó el contenido residual de los factores tóxicos naturales, de los hongos preparados de acuerdo a como se consumen tradicionalmente en el Estado de México; esto debido a que existe un antecedente de las especies de hongos del género *Amanita spp.* que se colectaron en la sierra Tarahumara de Chihuahua, donde se reportó un contenido significativo de inhibidores de tripsina; sin embargo, estos factores antinutricionales son termolábiles, por lo que este estudio demostró una disminución de estos factores en los hongos cocidos en comparación con las especies crudas.

2.-INTRODUCCIÓN:

El Estado de México se caracteriza por tener tianguis tradicionales muy grandes en la Región de los Volcanes, entre los cuales uno de los más importantes es el Tianguis de Ozumba; en ellos se pueden adquirir en temporada de lluvias infinidad de hongos silvestres comestibles, los cuales son recolectados para autoconsumo o venta en los mercados semanales o tianguis. El municipio de Ozumba se encuentra sobre el Sistema Volcánico Transversal, separándole al oriente las laderas de la Sierra Nevada y al poniente el Volcán Popocatepetl; cuenta con un clima templado con temperatura media anual entre 12°C y 18°C.(1)

El hombre, en su afán de buscar alternativas que permitan subsanar sus necesidades alimentarias, ha vuelto su atención hacia el aprovechamiento integral de los recursos naturales, al respecto, los hongos comestibles representan una fuente potencial de nutrimentos, sobre todo de aminoácidos indispensables, fibra, vitaminas y minerales, además que la recolecta de hongos silvestres genera ingresos para los habitantes de las zonas boscosas del país y su consumo forma parte del acervo cultural de la población.(2)

Los hongos pertenecen a un extenso grupo de organismos y microorganismos que forman el Reino Fungi, a diferencia de las plantas que realizan la fotosíntesis, numerosos hongos se nutren de materia orgánica en descomposición (hongos saprofitos) o a partir de plantas y animales vivos (hongos parásitos). Muchos de ellos desempeñan un importante papel en el ciclo vital como agentes de descomposición al devolver los nutrimentos al suelo; en la nutrición de algunas especies vegetales; para el hombre, algunos hongos tienen un gran valor medicinal y culinario, mientras que otros son descomponedores de materia orgánica; en realidad la intoxicación frecuente por el consumo de hongos se presenta por ignorancia, para evitarlo es necesario llevar a cabo una estricta clasificación taxonómica y complementarla con su composición química.(3)

Debido a que los hongos son vegetales que no tienen clorofila ni poseen flores, su hábitat natural, generalmente, está relacionado con sitios frescos y húmedos; por lo que los hongos son ricos en nitrógeno, potasio, calcio y vitaminas del complejo B.

Algunos estudios han determinado que al consumir 100 g de hongos se suministran 28 calorías, 4 gramos de hidratos de carbono y 3 g proteínas al organismo, debido a que la mayoría de ellos no contienen o son bajos en grasa. (1)

En México se conocen actualmente más de 6,000 especies, aproximadamente 2,000 micromicetos y 4,000 macromicetos incluyendo estos últimos los líquenes y los mixomicetos. (4)

El Parque Nacional Izta-Popo, Zoquiapan y anexos se encuentran ubicados en la parte Sierra Nevada, contiene áreas boscosas de gran relevancia para el abastecimiento de agua a las ciudades aledañas del país, principalmente en el Edo. De México, Puebla, Morelos, también se encuentran dentro de sus límites el Iztaccíhuatl y Popocatepétl, en esta área se encuentran bosques de latifoliadas y pináceas, principalmente bosques de pinos, encinos y oyameles, lo que favorece el desarrollo de una gran cantidad de especies de hongos silvestres comestibles. (2,5)

Tomando en consideración el escenario anterior, se planteó el desarrollo de un proyecto con los hongos silvestres comestibles, escogiendo a los hongos que tienen mayor demanda, los que fueron proporcionados por la M. en c. Edelmira Linares del Instituto de Biología de la UNAM. tales como los Juan Dieguitos (*Amanita rubescens*) Número de colecta E. Linares 2702 y R. Bye y las yemitas (*Amanita caesarea*). (6) Número de colecta: E. Linares 2700 y R. Bye., mismos especímenes que fueron depositados en la Colección Micológica del Herbario Nacional MEXU.

El nombre *Amanita* puede proceder del monte Amanon o bien de la palabra griega “*Amanita*” que significa locura debido a que varias especies son venenosas y ocasionalmente, alucinógenas; los primeros que utilizaron el nombre *Amanita* fueron Tournefort y Dileno desde fines del siglo XVII, pero no fue hasta el año de 1797 que Person aplicó dicho nombre a las especies con velo universal o volva, ya en 1995 Singer reportó 104 especies de *Amanita*, mientras que Pascoe en 1970 describió a 20 especies mexicanas en tanto que investigadores mexicanos han descrito 50 especies del género *Amanita*. (1)

La especies de *Amanita* han sido encontradas a nivel mundial en bosques de *Pinus spp.*, *Abies spp.*, *Quercus spp.*, *Castanea spp.*, y *Eucalyptus spp.* En el territorio

nacional predominan en bosques de oyamel, encino y de encino-pino, la mayoría de las especies tienen un crecimiento solitario y algunas pueden ser gregarias. (6)

Este género incluye especies comestibles como *A. caesarea* (que actualmente se considera que es un complejo de especies) y *A. rubescens* pero también contiene las especies más tóxicas y más peligrosas como *A. phalloides*, *A. virosa* entre otras especies incluso se les encontró un uso como es el caso de *A. muscaria* que durante el siglo VII se le dio un uso de insecticida, por lo que se le conoce como el hongo de las moscas. En nuestro país el género *Amanita* ha sido estudiado por varios autores; en 1970 se reportaron 12 especies tóxicas, se señala que tanto *A. caesarea* y *A. rubescens* son los hongos más importantes por su consumo en el valle de México, esto es importante debido a que en la mayoría de los casos, el hombre se aventura a consumir hongos silvestres en forma discriminada, ya que se tiene desconfianza de adquirir hongos silvestres por miedo a una intoxicación, esta puede ser grave debido a las toxinas o venenos que desarrollan algunos hongos, que al consumirlos, ocasionan trastornos, que pueden llevar hasta la muerte. El presente proyecto pretende contribuir con el conocimiento regional de estas dos especies del género *Amanita* de gran demanda en el mercado nacional como Internacional, a través de documentar información sobre el análisis bromatológico y toxicológico de estas especies. (7)

3. OBJETIVOS

General:

- Realizar la caracterización en particular de la fracción proteínica y de la fibra, así como la cuantificación de los factores tóxicos naturales termolábiles (lectinas e inhibidores de tripsina), alcaloides y amanitinas en dos ejemplares de hongos comestibles colectados en el tianguis de Ozumba, Edo. de México, en muestras tanto cruda como cocida

Particulares:

- Realizar el análisis proximal en la harina de las especies ***Amanita caesarea*** y ***Amanita rubescens***, antes y después de su cocción.
- Realizar la determinación proteínica verdadera, fibra dietética total y digestibilidad *in vitro*. de ambas especies de *Amanitas* tanto crudas como cocidas.
- Determinar los factores tóxicos naturales de las especies ***Amanita caesarea*** y ***Amanita rubescens*** en su forma cruda y cocida.
- Realizar una comparación de la misma especie ante y después de la cocción, con la finalidad de observar si se presentan cambios en el aspecto bromatológico.
- Realizar una comparación con la misma especie que crece en el estado de Chihuahua, con la finalidad de obtener una visión general de ambas especies en condiciones de hábitat diferente.

4.-MARCO TEÓRICO

4.1 Producción, comercialización y consumo de hongos del género *Amanita*

Los hongos silvestres comestibles son un recurso de gran importancia en México se reconocen aproximadamente 200 especies distribuidas prácticamente en todo el país. Del total de especies, 112 se comercializan a baja escala en los mercados populares desde el comienzo de la época de lluvias, también forman parte de la diversidad biológica, ecológica y cultural de México y han contribuido en la conformación del conocimiento tradicional, el cual data desde la época prehispánica y que se basa en el uso múltiple de los recursos naturales, existen algunos géneros cuyas especies comestibles tiene mayor demanda dentro de los tianguis o mercados en el centro del país, es *Amanita spp.*, ya que se considera que dentro de éste, se encuentran las especies de hongos comestibles más suculentas también constituyen un recurso, forestal no maderable cuya recolecta forma parte de los patrones de subsistencia de las poblaciones rurales que viven cercanas a las zonas boscosas; ya que durante primer periodo de lluvias dicha actividad, representa una fuente alternativa de ingresos; aunque, la mayor parte del producto recolectado es para autoconsumo; la mayor comercialización se lleva a cabo a nivel local, regional y estatal (5)

La comercialización de hongos silvestres con mucha frecuencia es efectuada por personas indígenas o por mestizos dependiendo de la ubicación de la región del país, es frecuente que esta comercialización se lleve a cabo junto con otros productos forestales no maderable de cierto valor comercial como plantas medicinales, resinas y frutos locales; en estos mercados es frecuente que los precios no sean fijos (8)

En caso de las ciudades grandes como la ciudad de México la venta se lleva a cabo por medio de intermediarios, que por lo regular van de tres a cuatro intermediarios, sólo un número reducido de especies de hongos silvestres comestibles de México es exportado a mercados internacionales, principalmente a Estados Unidos, diversos países Europeos y Japón, dentro las especies más comercializadas se incluyen *Boletus edulis*, *Amanita caesarea*, *Morchella spp.* *Cantharellus cibarius* y *Tricholomama tsutake* (8)

Es importante mencionar que los precios pagados a los recolectores locales tienen grandes variaciones de acuerdo a la región del país y a la poca información de los recolectores; por lo que hace falta una regulación legal estricta para su comercialización; así esto a su vez puede originar una producción sostenida de hongos silvestres comestibles y simultáneamente constituir una fuente importante de ingresos para los recolectores. (6)

A. caesarea es la especie más vendida en México, particularmente en la región central del país; así como en los mercados locales de su área de distribución, su precio de venta oscila entre \$ 200 a \$ 300 el kilogramo, aunque por lo regular se venden en "montones" de 2 a 3 hongos. (2)

Es una especie susceptible de exportarse a Europa, a partir del año 2002 inició la deshidratación de los carpófagos de hongos yemitas, con lo que se abrió un nuevo canal de comercialización que permite garantizar la disponibilidad del producto a lo largo del año; dicha presentación se distribuye en las principales tiendas de productos gourmet y naturistas de Guadalajara, Monterrey, Distrito Federal, Puebla y Oaxaca y finalmente, es conveniente considerar que la creciente demanda en el consumo, así como en la comercialización de los hongos a nivel mundial representa amplias expectativas para México, ya que cuenta con condiciones climáticas favorables y existe una basta tradición en el conocimiento y uso de especies silvestres. (8)

4.2 Características bioclimáticas del Estado de México

En México, los estudios ecológicos de los hongos son escasos, desconociéndose la potencialidad de las poblaciones silvestres y sus posibilidades de uso sustentable, tomando en cuenta que los hongos son un componente de la biodiversidad microbiana y un elemento estructural y funcional de los ecosistemas forestales y que además constituyen un recurso potencial para el descubrimiento de nuevos procesos y productos biotecnológicos, es necesario iniciar investigaciones en México sobre sus patrones de diversidad, abundancia, el conocimiento y usos tradicionales de sus etnias, además, es conveniente el monitoreo ecológico de los aprovechamientos comerciales sobre las poblaciones silvestres y determinar la factibilidad de establecer programas de uso sustentable, para la comercialización de este recurso, en beneficio de las

comunidades indígenas marginadas que habitan las regiones boscosas templadas y frías del país (9)

En el cuadro 1, se presenta la descripción de sus principales características ambientales, del estado donde se obtuvieron ambas variedades de *Amanitas*.(10)

CUADRO 1: CARACTERÍSTICAS GEOGRÁFICAS DE AMBAS VARIEDADES DE AMANITAS ESTADO DE MÉXICO

Clima y Tipo de Suelo	El 73% del estado presenta clima templado subhúmedo. La temperatura media anual es de 14.7°C, las temperaturas más bajas se presentan en los meses de enero y febrero son alrededor de 3.0°C. La temperatura máxima promedio se presentan en abril y mayo es alrededor de 25°C. Las lluvias se presentan durante el verano en los meses de junio a septiembre, la precipitación media del estado es de 900 mm anuales.
------------------------------	--

FUENTE: Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 2012 (10)

4.3. Características morfológicas de hongos del género *Amanita*

Los hongos son un grupo de organismos eucariontes, portadores de esporas, con nutrición heterótrofa por absorción, carente de clorofila, crecen preferentemente en sitios oscuros y húmedos, varían de tamaño desde levaduras microscópicas unicelulares hasta grandes setas de 25 cm de diámetro o más, su reproducción es sexual o asexual, se ven crecer en los bosques constituyen sólo los cuerpos fructíferos o carpóforos de hongos superiores también denominados macromicetos estos constan de dos partes aparentemente bien diferenciadas una difusa, subterránea y vegetativa, que se denomina micelio, y otra visible, de aparición esporádica y con función reproductora que es el carpóforo o seta. La humedad y la temperatura son factores que influyen decisivamente en el desarrollo de los hongos, para la producción de carpóforos (setas) el micelio requiere normalmente humedades ambientales altas, lo que suele ocurrir en épocas lluviosas mientras que la temperatura ideal para la producción de setas por la mayor parte de los hongos se sitúa entre los 10 a 25° C. (9)

Dentro de los principales componentes morfológicos de los hongos se describen en la FIGURA 1.



FIGURA 1: Principales componentes de un hongo

- Cutícula: La membrana exterior que recubre el sombrero y el pie, fundamental para determinar la especie, tanto por su estructura como por su color, puede ser lisa, rugosa, seca, viscosa, presentar restos en forma de escama, verrugas, estrías. y también puede estar fuertemente adherida al sombrero, o ser fácilmente separable.
- Sombrero: También llamado píleo es la parte más ancha del hongo, situado encima del pie, puede presentar una amplia gama de colores y tiene la forma de un paraguas, aunque con muy diferentes diseños: esféricos
- Himenóforo: Parte inferior del sombrero, sostiene al himenio, donde se encuentran las esporas de origen sexual. La forma y el color son caracteres de suma importancia en la identificación de un hongo: puede ser liso, o tener pliegues o láminas.
- Pie: Sostiene el sombrero, y puede ser recto o curvado y muy comúnmente, cilíndrico. También se encuentra bulboso, barrigudo, claviforme.
- Anillo: Parte residual procedente del velo y situado bajo el sombrero cuando éste se expande, tiene como misión proteger el himenio y facilitar la maduración de las esporas. Sus formas: anillo doble, rueda de carro, faldita.
- Volva: Parte subterránea y membranosa que rodea la base del pie de algunas especies en forma de círculos, cónica o libres, de pie esférico, es vital a la hora de reconocer entre *Amanitas* comestibles y venenos
- Estípite: Pie que sostiene el píleo (o sombrero) de las fructificaciones de los hongos.

- Láminas: Estructuras en forma de placa que se encuentra en la parte inferior del sombrero (o píleo) de los hongos.
- Estriada: Superficie que presenta surcos o hendiduras
- Esporada: Conjunto o masa de esporas de hongo desprendidas del esporóforo. (9)

4.4 Principales Características Morfológicas de las Especies Estudiadas

Amanita rubescens es un hongo ectomicorrizico; su consumo en crudo es peligroso por la presencia de termolisinas, al recolectarlo se puede confundir con *A. pantherina*, un hongo tóxico, la cual se diferencia porque esta última no se mancha de color rojo vino y el margen del píleo presenta estrías (6)

El CUADRO 2 muestra detalladamente las características principales de *Amanita rubescens*

CUADRO 2: PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE *Amanita rubescens*



- Nombres comunes: Juan dieguito, Dieguito, cuase
- Desarrolla cuerpos fructíferos que primero son globosos y luego convexos y plano de 5 a 15 cm de diámetro con cutícula separable, lisa y brillante, de color rojizo vinoso, y con tonalidades y claras, casi blanquecinas.
- En su superficie tiene numerosos restos de velo a modo de escamas algodonosas y de color blanco rosacéo o amarillo sucio y con reflejos dorados. Su carne es consistente, frágil y el margen es delgado incurvado a plano y no estriado.
- Las láminas blancas son apretadas, libres numerosas y entre ellas existen lamélulas. En ellas hay basidios donde se forman en cada uno 4 esporas ovoides, anchas hialinas lisas, carentes de ornamentación: miden 8 a 11 x 6 a 8 μm , forman una esporada blanca.
- El pie es cilíndrico de 10 a 15 con la base más gruesa que se hace claviforme, de color blanco a rosa-rojizo o vinoso claro, tiene la base provista de una volva ovoide, flucosa del mismo color rosa pero algo más acentuado.
- Tiene un anillo amplio, membranoso, blanco y con el borde festoneado.

FUENTE: Flora Micológica Ibérica 2009 (7)

En el caso de **A. caesarea** se consume en guisados y asados, se recomienda que en su fase juvenil (huevo) se abra a la mitad para observar su color amarillo, las especies tóxicas con las que se puede confundirse son de color blanco. Este hongo establece una relación de ayuda mutua con las raicillas de los árboles (micorriza), es muy apreciado por su sabor en toda la región central de México, además de tener gran potencial de exportación a Europa. (6)

En el CUADRO 3 Se muestra detalladamente las características principales de **A. Caesarea**

CUADRO 3: PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE *Amanita caesarea*



- Nombres comunes: Yema, yemita, totoltete, ahuevado.
- Píleo en ejemplares maduros, de color naranja, amarillo anaranjado o naranja - rojizo, en algunas ocasiones más oscuro en el centro.
- Margen estriado, levantado en ejemplares adultos y curvado en ejemplares jóvenes.
- Superficie lisa, contexto carnoso, en algunas ocasiones sólido esponjoso amarillento,
- Himenóforo, laminado, láminas libres a sub adheridas, de color amarillo, a amarillo naranja pálido borde liso crenulado.
- Estípite de 9 a 13x 13 a 29 cm cilíndrico o sub-bulboso, central, de color amarillento, superficie fribilosa, fistuloso.
- Anillo membranoso, colgante, con color con el estípite.
- Volva carnosa, semilibre, blanca a blanquecina. contexto de color blanco, sólido - esponjoso.
- Consistencia carnosa-fibrosa, Olor inapreciable, sabor dulce, esporas de 9.0 a 10.5x7.0 μm , subglobosas lisas hialinas.
- Esporada de color crema.

4.5-Importancia de la determinación en la composición química de los hongos

El análisis de la composición química (análisis bromatológico) de los hongos indican que los hongos comestibles tienen un gran contenido de agua, por lo que son productos muy perecederos, también son ricos en proteínas e hidratos de carbono, moderados en fibra y cenizas y bajos en lípidos, teniendo estos últimos una buena relación insaturados-saturados. Son una buena fuente de aminoácidos indispensables, sobre todo lisina, ciertas vitaminas (tiamina, riboflavina, niacina y vitamina B2) y minerales, como el magnesio, potasio y fósforo. Varias medidas basadas en el contenido de aminoácidos han sido utilizadas para comparar el valor nutricional de los hongos silvestres con otros alimentos. En el caso de las grasas y los azúcares no presentan el mismo interés debido a que no se consideran factores limitantes en la dieta, mientras que las fuentes proteínicas son escasas en las comunidades rurales de países en desarrollo dada la variedad y abundancia de los hongos y además las ventajas que presentan las especies comestibles es primordial obtener un aprovechamiento integral de cada especie comestible; debido a que los hongos son un alimento con pocas calorías debido a su bajo contenido de grasas, el alto contenido proteínico de los hongos es igualado por las leguminosas, ya que los hongos poseen un contenido proteínico que van de un 20 % a 40% en base seca. (7)

La proteína contenida en los hongos es digestible desde 60 a 70 % y posee un elevado valor nutrimental. Por lo que uno de los objetivos es conocer los principales nutrimentos de los hongos comestibles en el Estado de México, en particular en el género *Amanita* ya que se reporta un contenido de grasa de aproximadamente 10% en base seca (11).

Por otro lado los hongos en general contienen: gran cantidad de hidratos de carbono que no son del tipo de los almidones, alto contenido de fibra dietética, gran cantidad de quitina un polisacárido que puede absorber fácilmente las grasas en el tracto digestivo, las proteínas de los hongos poseen los nueve aminoácidos esenciales en la dieta para el ser humano; así las setas, son una buena fuente proteínicas, ya que contiene todos los aminoácidos indispensables, también presentan una cantidad moderada de hidratos de carbono, de los cuales hasta el 47% puede ser fibra dietética.(12)

4.6.-Metodologías bromatológicas realizadas a los macromicetos:

4.6.1 Aporte Nutricional:

El análisis comprendido dentro de este grupo, también conocido como análisis proximal de Weende, se aplican en primer lugar a los materiales que se usarán para formular una dieta como fuente proteínica o de energía y a los alimentos terminados, como un control para verificar que cumplan con las especificaciones o requerimientos establecidos durante la formulación; este análisis nos indica el contenido de humedad, proteína cruda (nitrógeno total), fibra cruda, grasa, ceniza y extracto libre de nitrógeno en la muestra. (13)

4.6.2 Humedad:

Durante el balanceo de la ración, es fundamental conocer el contenido de agua en cada uno de los elementos que lo componen; así mismo, es necesario vigilar la humedad en el alimento preparado, ya que niveles superiores al 8% favorecen la presencia de insectos y arriba del 14%, existe el riesgo de contaminación por hongos y bacterias (13)

4.6.3 Proteína Cruda:

Por su costo es el nutrimento más importante en la dieta en una operación comercial; su adecuada evaluación permite controlar la calidad de los insumos proteínicos que están siendo adquiridos o del alimento que se está suministrando. Su análisis se efectúa mediante el método de Kjeldahl.(13)

4.6.4 Grasa Cruda o Extracto Etéreo:

En este método, las grasas de la muestra son extraídas con éter de petróleo y evaluadas como porcentaje del peso después de evaporar el solvente. (11)

4.6.5 Fibra Cruda

Este método permite determinar el contenido de fibra en la muestra, después de ser digerida con soluciones de ácido sulfúrico e hidróxido de sodio y calcinado el residuo. La diferencia de pesos después de la calcinación nos indica la cantidad de fibra cruda presente. (13)

4.6.6 Cenizas:

El método aquí presentado se emplea para determinar el contenido de ceniza en los alimentos o sus ingredientes mediante la calcinación. Se considera como el contenido de minerales totales o material inorgánico en la muestra (13)

4.6.7 Extracto Libre de Nitrógeno (ELN):

Dentro de este concepto se agrupan todos los nutrimentos no evaluados con los métodos señalados anteriormente dentro del análisis proximal, constituido principalmente por hidratos de carbono digeribles, así como también vitaminas y demás compuestos orgánicos solubles no nitrogenados; debido a que se obtiene como la resultante de restar a 100 los porcentajes calculados para cada nutriente, los errores cometidos en su respectiva evaluación repercutirán en el cómputo final.(13)

4.6.8 Fibra Dietética:

El interés por consumo de fibra dietética (FD) ha sido estimulado por numerosos investigadores, relacionando la ausencia de fibra en la dieta con las enfermedades crónicas como son: estreñimiento, diverticulitis y cáncer de colon. La fibra dietética induce efectos fisiológicos que dependen las propiedades físicas y químicas de sus componentes individuales, estos efectos inducen el aumento de la masa fecal, el descenso de los niveles de colesterol del plasma y el descenso de la respuesta glicémica de ahí la importancia de reconocer a la fibra como un componente principal de la dieta y de su función en diversas matrices alimenticias. El concepto actual de FD se define como los componentes de la dieta de origen vegetal, que son resistentes a las enzimas digestivas del hombre y químicamente estaría representado por la suma de los polisacáridos que no son almidones ni lignina (11).

Forman parte de la FD convencional componentes estructurales de la pared de las células vegetales como: celulosa, hemicelulosa, sustancias pécticas y lignina no estructurales, como gomas, mucílagos, polisacáridos de algas y celulosa modificada. Podemos clasificar a la fibra de acuerdo a su solubilidad en agua en fibra insoluble (FI) (celulosa, gran parte de las hemicelulosas y lignina) y soluble (FS) (pectinas, gomas, mucílagos, ciertas hemicelulosas, polisacáridos de algas y celulosa modificada); las gomas constituyen un grupo complejo de polisacáridos que contienen ácido glucorónico y galacturónico así como xilosa, galactosa y manosa. Típicas gomas en este grupo son la goma arábiga, gatti, karaya y tragacanto. Los mucílagos están

generalmente dispersos en el endosperma y se mezclan con los polisacáridos digeribles, la utilidad que le prestan a la planta es de reserva energética y para darles humedad a la semilla. Son generalmente polisacáridos neutros, por ejemplo la goma guar es un galactomanano de alto peso molecular derivado de la semilla del ***Cyamopsis tetragonolobus***, una leguminosa que crece en la India y Pakistán. Los polisacáridos que conforman la FD difieren en sus componentes químicos. Así, la celulosa es un polímero de glucosa unida en posición β 1-4, sin cadenas laterales; las hemicelulosas son polímeros de pentosas y hexosas, con cadenas laterales en las que se presentan diferentes azúcares y ácidos glucorónicos (existen alrededor de 250 diferentes tipos de hemicelulosas); las pectinas son polímeros de ácido galacturónico con cadenas laterales con diferentes azúcares. La lignina es un polímero no polisacárido que contiene unidades de fenilpropano derivados de los alcoholes sinapílico, coniferílico y cumarílico. (14)

Entre los polisacáridos de algas se tiene a los carragenanos que se obtienen de las paredes celulares de ciertas algas rojas. Hay varios tipos de carragenanos compuestos de residuos de galactosa unidos alternativamente en posición 1,3 y 1,4 sulfatados en grados variables; los alginatos, obtenidos de las paredes celulares de algas pardas que se describen químicamente como un copolímero lineal de ácidos manurónico y gularónico, la metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, son gomas semisintéticas porque se sintetizan a partir de un producto natural como lo es la celulosa.(15)

Las gomas, mucílagos, polisacáridos de algas y celulosas modificadas se utilizan como aditivos en la industria alimentaria, como emulsificante y estabilizante en pequeñas cantidades.(14)

Por otra parte, existe una gran variedad de componentes no convencionales asociados con la FD que van desde ceras a minerales y que por su baja digestibilidad pueden conducir a propiedades semejantes a la FD y que son motivos de controversia en el sentido de si deben o no incluirse dentro de la FC. Entre estos podemos mencionar los compuestos fenólicos (taninos), ceras, glicoproteínas (extensina), minerales, ácido fítico, compuestos de Maillard, almidón resistente, quitina y quitosanos y formas confeccionadas por el hombre (polidextrosa, lactulosa, etc). Lo que hace difícil incluirlos

como una parte constitutiva de la FD, es que algunos de ellos son altamente variables e impredecibles aunque la indigestibilidad que presentan parece compatible con los principios de la FD, está juega un papel en todas las funciones del sistema digestivo desde la masticación hasta la evacuación de las heces. Las dietas con un contenido en fibra elevado requieren más tiempo de masticación por lo que retardan la velocidad de deglución y esto implica una mayor salivación que va a repercutir en la mejora de la higiene bucal; a nivel del estómago las fibras solubles, como consecuencia de su viscosidad, retardan el vaciamiento gástrico y aumentan su distensión prolongando la sensación de saciedad. En el intestino delgado la fibra soluble, nuevamente por la formación de soluciones viscosas, retardan el tiempo de tránsito. También aumenta el espesor de la capa de agua que han de traspasar los solutos para alcanzar la membrana del enterocito, lo que provoca una disminución en la absorción de glucosa, lípidos y aminoácidos asimismo, se producirá una disminución en la absorción de los ácidos biliares ya que estos se unen a los residuos fenólicos y urónicos en la matriz de los polisacáridos; esto puede alterar la formación de micelas y la absorción de las grasas como consecuencia de la depleción de ácidos biliares pueden disminuir los niveles de colesterol, al utilizarse éste en la síntesis de nuevos ácidos biliares; para la absorción de determinados minerales como el calcio, hierro, cobre y zinc pueden disminuir si se ingieren dietas muy ricas en fibra. Algunos minerales pueden formar compuestos insolubles con elementos constitutivos de la fibra, como los fitatos de los cereales, los tanatos presentes en las espinacas, habas, lentejas y plátanos o los oxalatos de la coliflor y las espinacas pero los minerales pueden ser liberados por el metabolismo bacteriano de estos compuestos en el colon aunque la absorción de los minerales es más lenta en el colon que en el intestino delgado, sin embargo se pueden llegar absorber cantidades importantes. La absorción del calcio ha sido ampliamente estudiada viéndose que el calcio atrapado y transportado hasta el colon se libera al hidrolizarse la fibra por efecto de las bacterias colónicas. Los ácidos grasos de cadena corta producidos facilitan la absorción de este calcio a través de las paredes del colon e incluso de las del recto.(16)

4.6.9 Nitrógeno No Proteínico (NNP):

Esta técnica permite reconocer la porción de nitrógeno de origen proteínico del no proteínico de los materiales analizados. Puede aplicarse a todo tipo de materiales. Las fuentes de NNP, como la urea, son usadas frecuentemente en dietas para cubrir los requerimientos de nitrógeno a nivel ruminal. Sin embargo, su uso tiene límites, debido

a que los excesos pueden afectar el consumo voluntario de alimentos y causar daños irreversibles, e incluso la muerte del animal (13)

El uso del NNP debe ir aparejado con el consumo de hidratos de carbono de cierto grado de fermentabilidad ruminal se ha observado que cuando las raciones son bajas en hidratos de carbono pueden ocurrir, con más frecuencias, síntomas de toxicidad con cantidades de urea tan bajas como 0.3 g/kg proteína verdadera, por lo que los requerimientos nitrogenados están íntimamente relacionados a la disponibilidad energética, por lo que puede adoptarse un valor de 32 g de N/kg de materia orgánica digerida en el rumen, aunque al aumentar la digestibilidad los requerimientos de N tienden a reducirse y con la inclusión de urea en las dietas de los rumiantes se ha logrado regularizar así mantener niveles altos de amoníaco (200 mg/L de amoníaco) que han mostrado ser favorables a un buen desarrollo de la flora ruminal, la mejora en la función ruminal, permite balancear el déficit proteínico e incrementar la eficiencia de utilización a nivel ruminal de los hidratos de carbono fermentables . (9)

La relación que existe entre la disponibilidad de hidratos de carbono fermentables y las fuentes proteínicas (o nitrógeno), ejerce un fuerte impacto sobre la producción de células microbianas, y finalmente sobre la nutrición. (17)

Lo anterior se explica porque la mayoría de los microorganismos ruminales sintetizan proteína a partir del amoníaco proveniente de fuentes no Proteínicas (NNP) de origen alimenticio y de origen endógeno a través del reciclaje de urea vía la saliva o a través del epitelio del rumen en forma de amonio y mucoproteínas salivales así como de la acción de bacterias proteolíticas presentes en el rumen. (17)

4.6.10 Digestibilidad

Hoy en día es necesario determinar el sitio y los productos finales de los componentes durante el proceso de digestión este se define, como el proceso de reducción del tamaño de una molécula orgánica por hidrólisis, ella precede a la absorción que es la entrada de nutrimentos, iones y moléculas de las células de la mucosa intestinal, sin embargo los dos fenómenos se miden combinados y al valor obtenido se le llama

digestibilidad de un nutrimento. El análisis de la digestibilidad de un alimento es muy importante ya que este marca la diferencia entre la alimentación cuantitativa de la cualitativa, las pruebas de digestibilidad o de balance cuantifican los nutrimentos que se ingieren y se absorben en el tubo digestivo y las cantidades que se eliminan en las heces, la utilización biológica de una proteína es principalmente dependiente de la digestibilidad del alimento, entre ellos se encuentra la digestibilidad *in vivo* e *in situ*. El valor nutrimental potencial de una alimento puede ser determinado en primera instancia por el análisis químico proximal, pero el valor real del mismo para el animal solo se puede lograr a través de un análisis de las pérdidas inevitables que ocurren en la digestión, absorción y metabolismo, esto obedece que después de consumir un alimento, hay residuos no digeridos que ya son excretados en las heces, lo cual significa una merma en términos de la utilización del alimento por lo que existe una pérdida de la porción que no es digerida ni absorbida.(19)

El análisis de la digestibilidad de un alimento es muy importante ya que existen diferentes moléculas de fácil absorción y otras que son resistentes a la degradación enzimática en el caso de los animales mono gástricos y por ende excretadas en las heces, es precisamente este tipo de análisis que marcan la diferencia entre la alimentación cuantitativa a la cualitativa de una alimento. (14)

Los estudios *in vitro* se han desarrollado como alternativa a las técnicas de digestibilidad *in vivo*, en condiciones de laboratorio, los métodos *in vitro* se basan en el uso de enzimas proteolíticas para correlacionarse con la digestión de la proteína *in vivo* está imita la digestión humana, debido a que se utilizan enzimas gástricas, pancreáticas y enzimas intestinales en el ensayo, la principal ventaja de este método es la rapidez de este y la poca cantidad de muestra que se requiere para el ensayo.(20)

4.7. Factores antinutrimientales y tóxicos naturales

4.7.1 Inhibidores de Tripsina

Los inhibidores de proteasas son muy frecuentes en la alimentación humana, (los cuales inhiben los sistemas enzimáticos de sus depredadores microorganismos o insectos) tienen una función reguladora, interviniendo en el proceso de autorregulación proteolítica o de almacenamiento en el organismo que los contiene.

La primera sustancia de este tipo, fue un inhibidor de la tripsina aislado del páncreas de un ternero esta sustancia protege a dicho órgano de sus propias enzimas proteolíticas. Gran parte de los alimentos de origen vegetal, presentan inhibidores de proteasas; sin embargo, es de destacar la amplia presencia de los inhibidores de tripsina en alimentos de origen vegetal, en donde la mayor proporción se manifiesta en la semilla, estos pueden coexistir en la misma planta con otros inhibidores proteolíticos cabe mencionar que los inhibidores de proteasas más estudiados son los que actúan sobre la tripsina, ya que es una enzima digestiva de gran importancia en la digestión de los monogástricos como el hombre estas proteínas han sido aisladas de diferentes plantas o animales entre las más importantes están la de la soya, del frijol, papa y del ovomucoide de los huevos de aves.(21)

Nutritionalmente causan un retraso en el crecimiento o un índice bajo de la Eficiencia Proteínica (PER). Este inhibidor al ser inactivado por tratamientos térmicos hace que el (PER) aumente. (22)

Tienen la propiedad de inhibir las enzimas respectivas *in vitro*, generalmente en una relación 1:1 molar, por lo cual esta propiedad se aprovecha para poder identificarlos, una vez que son extraídos del material biológico. La enzima que más se ha utilizado para la identificación corresponde a la extraída del páncreas de bovino y porcino, los investigadores que más han trabajado al respecto, quienes incluso han propuesto una metodología estandarizada, usando un sustrato sintético, para que los datos obtenidos en diferentes laboratorios puedan ser equiparables, se puede determinar el efecto de inhibición usando una solución de caseína como sustrato para la tripsina, midiéndose el cambio en absorbancia a 280 nm de acuerdo a estudios relacionados con la inactivación del inhibidor de soya fueron realizados en los años de 1980 y 1981, indicaron que es suficiente un tratamiento con agua hirviendo por tres minutos para inactivar el 90% de inhibidor, lo cual es equivalente al escaldado que se realiza en varios vegetales, la mayoría de los inhibidores de proteasas son inactivados por la acción del calor, por lo que en el cocimiento de los alimentos que contienen este tipo de compuestos, generalmente va acompañado de un incremento en la calidad nutritiva. La inhibición de tripsina se ve reflejada en una hipertrofia pancreática en ratas; a este inhibidor (aislado de soya) se le ha atribuido una disminución en el crecimiento del 30

al 40% estos mismos efectos se han observado, purificados tanto los inhibidores enzimáticos de “Kunitz” como los de “Bowman-Birk”. (23)

Sin embargo, no hay que olvidar que un tratamiento térmico severo, puede disminuir la calidad de la proteína dietética; por lo anterior, es de suma importancia tener un control sobre el tiempo y temperatura de cocimiento. (22)

También se ha establecido que el contenido de humedad del grano es de suma importancia, ya que un previo remojo disminuye substancialmente tanto el tiempo como la temperatura del proceso estos tipos de factores antinutricionales, ha hecho que se busque su presencia en otros alimentos como en el amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) encontrándose que el inhibidor es relativamente termoestable, ya que retuvo 20% de su poder inhibitorio, después de habersele calentado durante 7 horas a 100°C. Otro ejemplo de inhibidores de tripsina termoestables, serían algunas especies del género *Erythrina*, donde se reporta hasta un 80% de actividad antitripsina, después de un tratamiento térmico. Sin embargo, si se tratara de destruir completamente los inhibidores de tripsina, las condiciones para esto son bastante drásticas, ocasionando la degradación de nutrimentos (23)

4.7.2 Lectinas:

Las hemaglutininas son proteínas, específicamente glicoproteínas, que tienen la capacidad de aglutinar los eritrocitos en una forma similar a los anticuerpos, e incluso manifiestan una marcada especificidad, además de una alta sensibilidad hacia ciertos glóbulos rojos. Debido a la especificidad de ciertas hemaglutininas hacia determinados eritrocitos, en 1839 Boyd y Shapleigh las denominaron “lectinas”(del latín *legere*=elegir/preferir), el cual es usado por algunos autores como sinónimo de este tipo de compuestos, se encuentran en una amplia variedad de plantas y en diferentes órganos como raíces, tallos y semillas, siendo especialmente abundantes en estas últimas donde pueden llegar a constituir hasta 20% de la proteína; son sintetizadas como prolectinas en el retículo endoplasmático para después pasar al aparato de Golgi donde finalmente son liberadas. Durante ese viaje sufrirá modificaciones como la mayor parte de las proteínas, para posteriormente ocupar su sitio en los tejidos donde la distribución varía dentro de representantes de varias familias de plantas. La actividad hemaglutinante de las lectinas puede ser inhibida mediante la acción de azúcares; de

manera simple, si una lectina reacciona con un monosacárido en particular, ésta puede ser fuertemente inhibida por concentraciones bajas del azúcar libre. De manera más compleja, la lectina reacciona solo con una secuencia específica de hidratos de carbono y ningún azúcar individual juega un papel predominante en el proceso de unión. Para inhibir estas lectinas se requieren de polisacáridos con una secuencia similar o idéntica de hidratos de carbono. La fracción de hidratos de carbono de las lectinas tiene afinidad por receptores específicos que se localizan en la membrana celular, como la membrana de los eritrocitos, por lo que algunos autores los clasifican con base en el residuo glucosídico. (24)

En el CUADRO 4 se presentan algunos ejemplos del tipo de lectinas en determinados alimentos, con excepción de la semilla de ricino, de la cual se usa su aceite como purgante suave. (25)

CUADRO 4: TIPO DE LECTINA QUE SE PRESENTA EN ALGUNOS ALIMENTOS

Hidrato de carbono unido a la Lectina	Específico	Ejemplo de alimento vegetal que lo contiene	Actividad mitogénica
D-manosa, D-glucosa		Haba (<i>Vicia faba</i>) Lenteja (<i>Lens culinaris</i>) Chicharo (<i>Psiumsativum</i>)	+
D-galactosa		Ricino (<i>Ricinuscommunis</i>)	+
Acido N-acetilneurámico		Frijol (<i>Phaseolusvulgaris</i>)	+
2, N-Acetilgalactosamina		Frijol de lima (<i>Ph. Lunatus</i>)	+
2, N-Acetilglucosamina		Papa (<i>Solanumtuberosum</i>), Trigo (<i>Triticumvulgaris</i>)	-
2-N-Acetilgalactosamina		Soya (<i>Glycinemax</i>)	-

FUENTE: Valle, Lucas, 15/12/08. (23)

La presencia de las lectinas en varios tejidos de un número amplio de plantas, las diferencias en su localización subcelular y sus propiedades sugieren que estas proteínas pueden estar implicadas en muchas diferentes funciones de diversos tejidos. Los avances en el aislamiento e identificación de lectinas en suficientes cantidades a partir de diversos tejidos permiten la comparación de sus propiedades y su estudio; algunas de las funciones en las que podrían estar involucradas las lectinas son las siguientes:

- Como sustancia de defensa contra depredadores naturales.

- Inhibición de crecimiento de hongos, como las lectinas de la papa ***Solanum tuberosum*** y el hongo ***Botrytis cinérea***.
- Protección contra hongos patógenos durante las primeras etapas de germinación, en trigo la lectina inhibe el crecimiento de las hifas de ***Aspergillus niger*** y ***Stemphylium botryosum***. (25)

La lectina semi-purificada de ***Vicia cracca*** inhibe el crecimiento de bacterias.

Estas evidencias muestran el papel de las lectinas en la defensa de las plantas contra patógenos estas tienen alta toxicidad para humanos, insectos, puercos, pollos y ratas, en las dietas con menos de 0.5% de lectinas disminuyen y detienen el crecimiento, y dosis mayores causan la muerte en un periodo de 2 semanas. (26)

Adicionalmente, cabe la posibilidad de que las lectinas puedan inhibir la actividad de ciertas enzimas intestinales que participan en la degradación proteínica como la enteroquinasa no obstante, la interferencia de la lectina en el sistema intestinal, la respuesta tóxica (pérdida de peso y alta mortalidad) es debida principalmente a los cambios estimulados por esta proteína en el sistema metabólico. (25)

La ingesta de altas dosis de lectina en la dieta produce un incremento en el recambio de las células epiteliales (debido a una posible activación hormonal), lo que produce un crecimiento del intestino delgado, así como también en el páncreas lo que puede llevar a que dupliquen su tamaño en un periodo de 10 días. Este desarrollo produce un desajuste entre las síntesis y el consumo proteínicas el cuál se ve reflejado en un alta excreción de urea por la orina. Las lectinas también interfieren en la secreción pancreática de insulina, resultando en una pérdida rápida en las reservas del cuerpo, a pesar de los bajos niveles de insulina en el cuerpo no se genera diabetes. (26)

Los cambios que siguen a la ingesta más prolongada sugieren la pérdida de hasta 25% del músculo esquelético debido a la activación del sistema catabólico, lo que lleva a la pérdida total de las reservas y por lo tanto los niveles de glucosa caen vertiginosamente, produciendo una hipoglucemia y, posteriormente, la muerte del animal. (26)

La mayor parte de las poblaciones humanas que consumen leguminosas han aprendido de manera empírica que su consumo requiere de un tratamiento térmico

para la inactivación de los factores anti nutrimentales y tóxicos de origen proteínico. Esta proteína dañina es parte de los denominados factores tóxicos termolábiles. Sobre esta última denominación, hay que tener suma precaución, ya que se debe aplicar el tratamiento adecuado; además, si el material se somete a un calentamiento severo, se puede dañar la calidad nutritiva de la proteína. Por esta razón se recomienda remojar en agua durante la noche para reducir el tiempo de cocción y evitar la disminución del valor proteínico y vitamínico.(26)

4.7.3 Alcaloides

Los alcaloides son una clase heterogénea de productos naturales de las plantas. La palabra alcaloide es derivada del término “álcali”, usado originalmente para describir un grupo de bases de origen botánico, lo cual nos indica que estas sustancias se comportan como álcali químico, estos contienen nitrógeno en su molécula, frecuentemente en un anillo heterocíclico, todos son ópticamente activos, en general son insolubles en agua como base y solubles en disolventes orgánicos; sus sales son solubles en agua, en estas propiedades se fundamentan los procedimientos para su extracción en plantas, así como para su purificación. Son de naturaleza básica, generalmente se encuentran como sales de ácidos orgánicos por lo que la mayoría poseen importantes propiedades farmacológicas, es interesante que algunos compuestos han sido considerados como alcaloides como excepciones la colchicina, y recina ya que no son básicos o la efedrina, muscarina y mezcalina que son compuestos heterocíclicos nitrogenados sin embargo algunos alcaloides con anillos heterocíclicos son llamados alcaloides verdaderos y son clasificados de acuerdo al sistema anular presente en la moléculas debido a que poseen las siguientes características:

- El átomo de nitrógeno es parte del sistema heterocíclico
- El compuesto tiene una estructura molecular compleja
- El compuesto posee importante actividad farmacológica
- El compuesto pertenece al reino vegetal.

Aquellos que no tienen anillos heterocíclicos son conocidos como proto alcaloides y son aminas, los proto alcaloides y los alcaloides verdaderos son generalmente derivados de aminoácidos El nitrógeno de los alcaloides puede ser primario, secundario, terciario o cuaternario, o puede estar presente como óxido de amina, se

encuentra principalmente en algunas especies como, (***Centrospermae, Magnoliales, Renunculales, Papaveraceae, Leguminosae, pilioaceae y Rutaceae.***) (27)

Los alcaloides tienden a acumularse en cuatro tipos de tejido:

- Tejido que activamente está creciendo
- Células epidérmicas e hipodérmicas
- Cubiertas vasculares
- Vasos

Algunos alcaloides se relacionan como precursores de aminoácidos, la amplia distribución de alcaloides en hojas y raíces indica una función de estos compuestos en el metabolismo general de plantas como efecto biológico de protección contra depredadores existen otras funciones que han sido propuestas y se describen a continuación:

- Los alcaloides son productos finales del metabolismo del nitrógeno así como son la urea y ácido úrico en animales.
- Es una reserva de nitrógeno que es utilizado bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno
- Actúan como reguladores del crecimiento, posiblemente como inhibidores de la germinación, ya que son agentes quelantes.
- Ayudan a mantener el balance iónico
- Los alcaloides y sus preparados constituyen una importante proporción de las sustancias empleadas frecuentemente en la moderna terapéutica. Como medicamentos se caracterizan por su gran potencia. Las cantidades de alcaloides que se hallan presentes varían considerablemente en las muestras debido a la edad de la planta en el momento de recolección
- Estación del año en que se efectúa la colecta, clima y suelo en que se desarrolla la planta, también al tipo de variedad de misma especie (27)

4.7.4 Amanitina

Existe una gran número de personas que consumen hongos venenosos confundiéndolos por hongos comestibles esto puede ocasionar trastornos digestivos en el menor de los casos y confundirlo con un verdadero micetismo. Debido a que es muy difícil distinguir entre especies comestibles y tóxicas, por lo que se ha hecho tradición el

aprender a conocer sus características morfológicas; ya que para la detección de especies tóxicas se necesitarían tanto datos químicos, taxonómicos y análisis cromatográficos de las toxinas, sin tomar en cuenta que la concentración de estas sustancias, cambia dependiendo las diferentes estructuras del hongo, del tipo de variedades del hongo, y de su distribución geográfica, entre otras. Dentro de los micetismos más importantes se menciona al mimetismo faloideano, el cual es mortal, su nombre es debido al hongo responsable que es *Amanita phalloides*, que no ha sido encontrada en la microbiota mexicana, existen otra especies de la sección *Phalloides* como *Amanita virosa*, en la que se comprobado su toxicidad y presencia en la microbiota de nuestro país, el compuesto o sustancia activa en este es la alfa-amanitina o α -amanitina que es un péptido no ribosomal cíclico de ocho aminoácidos, probablemente una de las toxinas del grupo amatoxinas más letales, encontradas en varias especies del género de hongos *Amanitas*, la dosis mortal para el 50% de los individuos de prueba es aproximadamente 0.1 mg / kg. La α -amanitina es un inhibidor de la ARN polimerasa II, lo que hace que sea tan letal algunas de las toxinas presentes en estas especies son: las falotoxinas, de las cuales se han descubierto siete: faloidina, faloína, pro-faloína, falisina, falacina, falacidina y falisacina están presentan propiedades de solubilidad y estabilidad como la amanitinas. En el grupo de las amanotóxicas se han descubierto nueve, denominadas α , β , γ , ϵ amanitinas, amanina, amaninamida, amanulina, ácido amanulínico y proamanulina estos son compuestos cristalinos, solubles en disolventes polares como el agua y el metanol muy estables, no se descomponen a altas temperaturas ni por los ácidos del estómago, intestino y enzimas digestivas. En la FIGURA 2 se observa la estructura química de la α - amanitina, se describe como un octapéptido cíclico con un puente tioéster entre los aminoácidos cistina y el triptófano, lo que inhibe la RNA polimerasa II responsable de la realización del programa genético, pues dirige el transporte de la información de los genes sobre los mensajeros del ácido ribonucleico (RNA), este bloqueo de la información inhibe a su vez la síntesis de las proteínas de vital importancia en el plasma celular; la muerte se produce cuando la desnutrición celular llega a la desintegración del órgano, especialmente del hígado.(28)

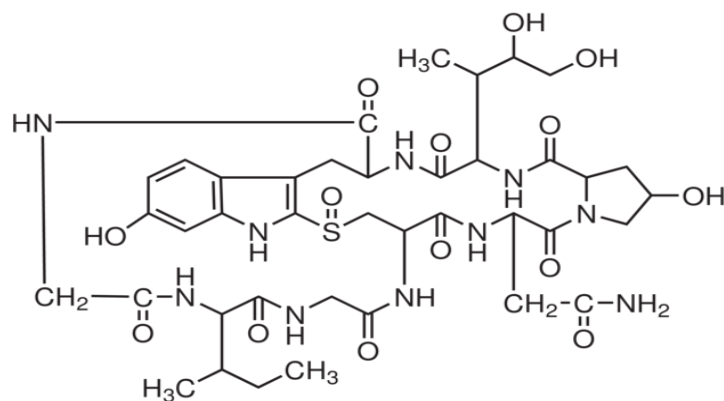


FIGURA. 2 Estructura química de Amanitina

Su peso molecular es de algo más de 900 daltons y las que se encuentran en su mayor proporción son el alfa y las betas amanitina en una muestra de *A. phalloides* de aproximadamente de 25 g existen entre 5 y 11 mg de amatoxinas, lo que supone de 200 a 400 µg por gramo de seta fresca, esta cantidad varía según el grado de maduración y es máxima en el ejemplar totalmente desarrollado. Debido a las intoxicaciones obedecen a una confusión de especies comestibles ya que la recolección realizada por personas con tradición familiar en el reconocimiento de las setas, se han descrito cuadros mixtos de intoxicaciones dependiendo el tipo de hongo. Existe una prueba sencilla y rápida en la que se indica que si existe alguna toxina de la *Amanita* se llama Prueba Wieland o Meixer.(28)

El Dr. Theodor Wieland estudió por primera vez la prueba en papel de alta lignina la cuál es una prueba cualitativa para amatoxinas, aunque es simple también es bastante exacta en la detección de la presencia de amatoxinas si se hace correctamente debido a que se puede obtener falsos negativos si se utiliza un papel que por su tratamiento contenga baja lignina; la reacción es catalizada mediante un ácido (se recomienda ácido HCl concentrado) que junto con la lignina presente en papel de baja calidad, tales como el periódico, presentará un color azul verdoso gris en presencia de Amatoxina seca, que se puede observar en la FIGURA 3, durante la prueba se debe evitar temperaturas altas o exposición a luz solar durante un período de 20 a 30 minutos. (28)

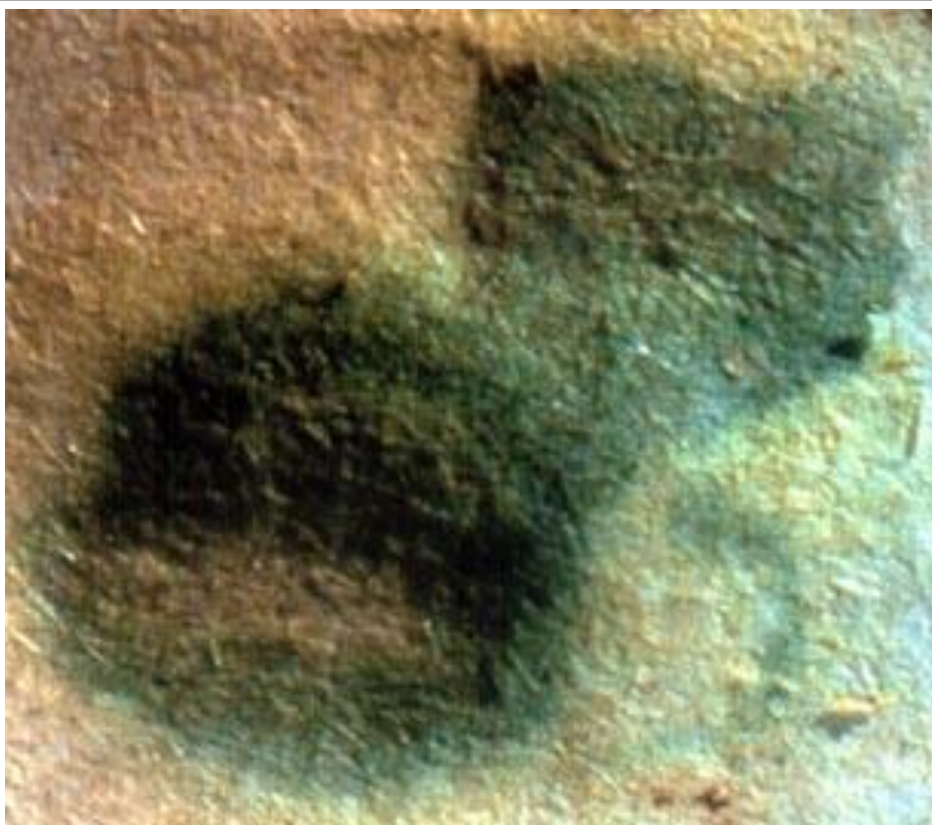
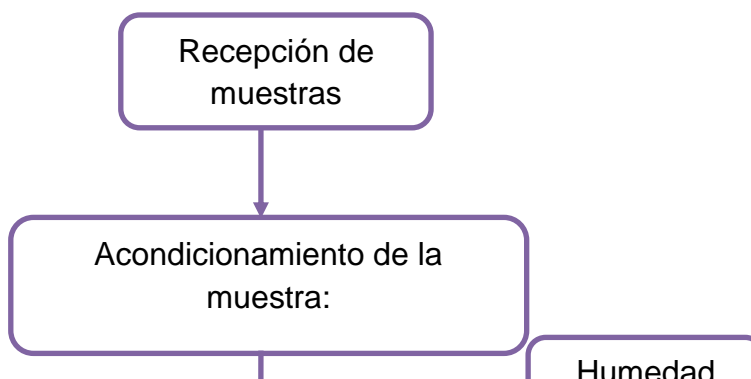


FIGURA 3: Test Wieland Positivo de amanitinas en *Amanita bisporigera*. (28)

El “test del papel de periódico” o test de Wieland o Meixner, desarrolla una mancha de color azul turquesa que demuestra la presencia de anatoxinas no es fiable al 100 % pues la *Amanita virosa* da falsos negativos y algunas especies inofensivas dan falsos positivos, pero constituye un elemento más de valoración. El síndrome faloidiano, ciclopeptídico o hepatotóxico es responsable de más del 90 % de las muertes por consumo de setas se ha asociado clásicamente a la *Amanita phalloides* (oronja verde) pero también lo producen la *Amanita virosa* las setas del género *Amanita* son las responsables de las intoxicaciones en humanos. (28)

5.-METODOLOGÍA:



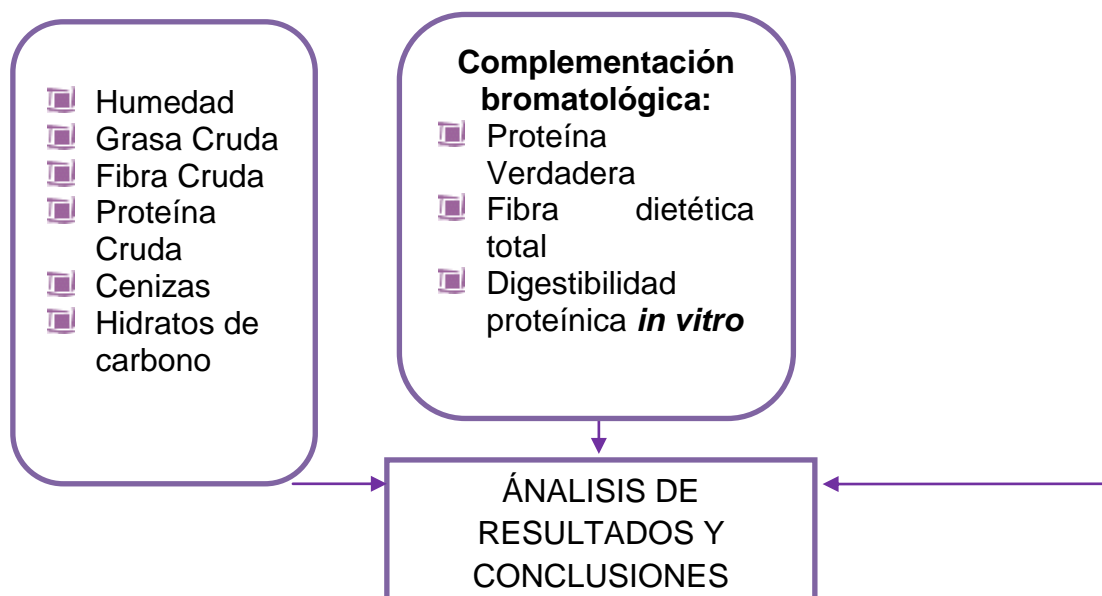


FIGURA 4: Diagrama general de trabajo

El diagrama de trabajo anterior (FIGURA 4), se aplicó tanto a las muestras crudas como cocidas; a continuación se describen con más detalles los diferentes bloques

5.1 Acondicionamiento de las Muestras:

De acuerdo a lo reportado los hongos son muestras perecederas, por lo que contiene un elevado contenido de agua, y fue fundamental para los análisis, someter en cuanto se recibieron las muestras a un secado en estufa a una temperatura de 50 a 55°C por 18 a 24 horas. (30)

Equipo, Material y Reactivos:

- -Estufa con temperatura controlada y circulación forzada Lab-line
- -Balanza analítica Sartorius Extend
- -Balanza granataria Sauter
- -Molino de acero inoxidable Thomas-While Modelo 4

Procedimiento:

- 1.-Se pesó la muestra en charolas de aluminio y colocarla en la estufa a temperatura de 55°C y se mantuvo bajo esas condiciones hasta un peso constante, para obtener la humedad original.
- 2.-La muestra seca se molió en un molino de acero inoxidable y se pasó por una malla de 1.0 mm de diámetro.
- 3.-La harina se homogeneizó y se colocó en recipientes de plástico, se almaceno en un lugar fresco y seco a temperatura ambiente.

5.2 Método de Cocción de las Muestras.

Procedimiento:

- 1.-Las setas se limpiaron cuidadosamente con una tela de manta de cielo y se rebanaron los hongos poniendo mayor cuidado en el pie del hongo que es la parte más dura del hongo.
- 2.-Se pesó un cuadro de 30 cm x 30 cm de papel aluminio, en el cual se utilizó para empapelar las rebanadas de hongos.
- 3.-Se envolvieron en papel aluminio y se colocaron en una parrilla thermolyne a una temperatura aproximada de 100 a 120°C
- 4.-Se voltearon los sobres a los 15 min. para que se cocieran ambos lados, el tiempo de cocción fue de 30 min.
- 5.-Después se colocaron en una charola y se pusieron a secar las muestras en la estufa Felisa a 54°C hasta peso constante
- 6.-Se tomaron 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 granataria Sauter; este último paso se repetirá hasta peso constante, esta variación en las décimas de gramos es para obtener la humedad original, expresada en porcentaje.
- 7.- La muestra se lleva a molienda en un molino Thomas While con malla de 1.0 mm, después es etiquetada y almacenada para llevar a cabo todas las determinaciones, posteriores.

5.3. Análisis Bromatológico:

El análisis proximal de acuerdo a el esquema de Weende, se aplican en primer lugar a los materiales que se usarán para formular una dieta como fuente proteínica o de energía es un control para verificar que cumplan con las especificaciones o requerimientos establecidos durante la formulación. Estos análisis nos indicarán el contenido de humedad, proteína cruda (nitrógeno total), fibra cruda, lípidos crudos, ceniza e hidratos de carbono digeribles por diferencia en la muestra. (13,29)

5.3.1. Determinación de Humedad:

Fundamento:

El agua en los alimentos se encuentra en dos formas como “agua libre” o “agua ligada”, el agua es la forma predominante y es la que está físicamente unida a la matriz del alimento y se puede perder con facilidad por secado, mientras que el agua ligada se halla combinada o absorbida, se encuentra en los alimentos como agua de cristalización o ligada a las proteínas y las moléculas de sacáridos. (13,29)

Procedimiento:

Eliminar el agua contenida en la muestra, mediante una estufa conectada a vacío a 60 a 65 °C, con el fin de abatir la temperatura de ebullición.

Equipo, Material y Reactivos:

- Charolas de aluminio
- Balanza analítica Sartorius Analytic
- Estufa de vacío LAB_LINE mod. 3620
- Desecador de vidrio
- Trampa de Cloruro de calcio

Procedimiento:

- 1.-Se colocó a peso constante las charolas de aluminio en la estufa de vacío LAB_LINE mod. 3620 a 65 °C, se pesó en balanza analítica Sartorius Analytic 4.5 g aproximadamente de cada muestra
- 2.-Se colocaron todas las charolas en la estufa y se realizaron pesadas cada 2 horas, dejando enfriar por un periodo de 20 min. en el desecador y se registraron los datos hasta obtener 0.1 mg de diferencia entre los pesos.
- 3.-Se determinó el % de humedad en las muestras por diferencia, así como la media, desviación estándar y el coeficiente de variación.

Cálculos

Teniendo el peso de charola con muestra antes y después de ser secada, y con el peso de la charola sola, se puede hacer la determinación. Generalmente la pérdida del material que se volatiliza bajo estas condiciones, se le acostumbra denominar como humedad.

$$\% \text{Humedad} = \left(\frac{P_i - P_f}{m} \right) \times 100$$

Donde:

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

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

m = peso en gramos de muestra

5.3.2 Determinación de Cenizas Totales:

Fundamento:

Cenizas totales se refiere al material inorgánico, la materia orgánica se carboniza directamente con flama de mechero, para convertirse en CO₂ y vapor de agua, para obtener el material inorgánico con una incineración en la mufla. (13,29)

Equipo, Material y Reactivos:

■ Mufla THERMOLYNE mod 1500

■ Mechero Fisher

■ Triángulo de porcelana

■ Anillo de fierro o tripié

■ Crisoles de porcelana

■ Desecador

■ Balanza analítica Sartorius Analytic

Procedimiento:

1. Se colocaron los crisoles en la mufla THERMOLYNE mod 1500 a temperatura de 450°C y se pesaron hasta peso constante.
2. Se pesó 2 g de la muestra en el crisol que se colocó sobre la tela de asbesto y tripié, se carbonizó a la flama con mechero, bajo la campana de extracción.
3. Cuando ya no desprendió humo, se colocaron en la mufla a 550°C y se realizaron pesadas de los crisoles más cenizas, después de enfriar en el desecador por 30 min. se registraron los pesos, hasta llegar a peso constante.
4. Se determinó el % de cenizas en las muestras por diferencia, así como la media, desviación estándar y el coeficiente de variación.

Cálculos

$$\% \text{Cenizas} = \frac{(P_f - P_i)}{m} \times 100$$

Dónde:

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

Pi = peso en gramos del crisol a peso constante

m = peso en gramos de la muestra.

5.3.3 Determinación de proteína cruda:

Fundamento:

La determinación se realiza según el método Kjeldahl, el cual se basa en la oxidación de la materia orgánica mediante una mezcla digestiva (H_2SO_4 , H_3PO_4 y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) formándose una sal fija de sulfato ácido de amonio (NH_4HSO_4) que posteriormente se destila durante la cual se libera amoníaco de dicha sal, mediante la adición de NaOH al 40%, el amoníaco se recibe en el ácido bórico (H_3BO_4) para formar borato de amonio el cual se titula con HCl 0.01N, de esta forma se obtiene el porcentaje de nitrógeno de la muestra, el cual al multiplicarlo por el factor 6.25, para obtener el porcentaje proteínica cruda. (13,29)

Equipo, Material y Reactivos:

- Digestor TECATOR, Mod. Ab20/40
- Microdestilador TECATOR AUTO KJELTEC, No. 1030
- Tubos de digestión de 75 mL
- Mezcla digestiva (a)
- Peróxido de hidrógeno al 30 % (m / v)
- Sulfato de potasio RA
- Solución de NaOH al 40% (m / v)
- Solución de ácido bórico con indicadores (b)
- Solución de HCl 0.01N valorada

a) Mezcla digestiva: Se disuelve 3 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 20 mL de agua destilada, se agrega 50 mL de ácido ortofosfórico (H_3PO_4), y se

adiciona con cuidado, resbalando por las paredes 430 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), se deja agitando la muestra durante 30 minutos aproximadamente.

- b) Solución de ácido bórico con indicadores: Se pesa 20 g de ácido bórico y se coloca en un matraz aforado de 2 L, se adiciona agua destilada hasta disolver y se agrega 20 mL de verde de bromocresol (100 mg en 100 mL de CH_3OH) y 14 mL de rojo de metilo (10 mg en 100 mL de CH_3OH), y se mezcla vigorosamente.

Procedimiento:

- 1.-Se pesó 0.1 g de muestra y se colocaron en tubo de digestión, se le agregó 0.5 g de sulfato de sodio y 3 mL de mezcla digestiva (a).
- 2.-Tanto los tubos de muestra como los tubos del blanco se colocaron en el digestor por espacio de 15 min. a $370^\circ C$, se dejó enfriar y se adiciona 1.5 mL H_2O_2 , y se volvieron a colocar en el digestor a $370^\circ C$ por espacio de una hora y media.
- 3.-Después de este tiempo se dejaron enfriar los tubos para poder titularlos.
- 4.-La titulación se realizó en el equipo KJELTEC AUTO 1030 Analyzer, se utiliza HCl 0.01 N y NaOH al 40% y como indicador ácido bórico con indicadores verde de bromocresol y rojo de metilo.
- 5.-Se realizaron los cálculos obteniendo los mL de HCl gastados por muestra y blancos, para así determinar el % de nitrógeno en la muestra para después convertir este valor en proteína multiplicándolo por el factor de conversión que en general es de 6.25 y así obtener el % proteínica cruda, así como la media, desviación estándar y el coeficiente de variación.

Cálculos

Para realizar los cálculos es conveniente correr un blanco, donde se sustituye la muestra por el equivalente en peso de glucosa o sacarosa; tratándose en la misma forma que las muestras.

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

$$\%Proteína = \%N_2 \times F$$

Donde:

P= mL de la titulación de la muestra

m = peso de la muestra (en gramos)

B= mL de la titulación del blanco

F = Factor de conversión (6.25)

N= normalidad

meq = miliequivalentes de nitrógeno

(0.014)

5.3.4 Determinación de Grasa:

Fundamento:

La determinación de extracto etéreo, incluye a los compuestos orgánicos, que son extraídos con éter de petróleo ó etílico por ser un disolvente con bajo punto de ebullición (30° a 60°C), debido a que el éter húmedo disuelve hidratos de carbono es necesario que la muestra esté libre de agua.(13,29)

Equipo, Material y Reactivos:

- ▣ Aparato de extracción Golfish, LABCONCO
- ▣ Cartuchos de celulosa
- ▣ Estufa de vacío LAB.LINE MOD 3620
- ▣ Vasos de borde esmerilado LABCONCO
- ▣ Desecador
- ▣ Balanza analítica Sartorius Analytic
- ▣ Éter de petróleo R.A.

Procedimiento:

1.-Se colocó un vaso Goldfish (LABCONCO) en la estufa a 100°C hasta peso constante, aproximadamente 2 h.

2.-Se pesó de 4.5 g de la muestra que con anterioridad se le determinó la humedad y se trasvasó cuantitativamente a un cartucho de celulosa, este se tapó con algodón; y se colocó en el porta dedal. En el vaso Goldfish (LABCONCO) se adicionó aproximadamente 50 mL del disolvente éter de petróleo y se colocó en el aparato con ayuda del anillo metálico con rosca, después se subió la parrilla de calentamiento,

hasta que tuvo contacto con el vaso, para la extracción el aparato se mantiene con una entrada de agua fría, la cual sirve como refrigerante.

3.-Para verificar que se ha extraído toda la grasa, se dejó caer una gota de la descarga sobre papel filtro, al evaporarse el disolvente no debe dejar residuo de grasa.

4.-Al finalizar, cambiar el portadetal del cartucho por un tubo recuperador y se calentó de nuevo para recuperar el disolvente del vaso. Se quitó el vaso del equipo y se secó el extracto en una estufa a 100°C por 30 min., se dejó enfriar y se pesó.

5.-Se determinó el % de grasa en las muestras por diferencia de peso, así como la media, desviación estándar y el coeficiente de variación.

Cálculos

Para ambos procedimientos se debe de tener los pesos del recipiente colector tanto antes como después del procedimiento de extracción. A esta determinación se le conoce como extracto etéreo.

$$\% \text{ Grasa} = \left(\frac{P_f - P_0}{m} \right) \times 100$$

Dónde:

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

P0 = peso del recipiente antes de la extracción (en gramos)

m = peso de la muestra seca (en gramos)

5.3.5. Determinación de Fibra Cruda:

Fundamento:

Dentro del interés analítico de un alimento, se divide a los hidratos de carbono de origen vegetal en dos parte: por un lado los hidratos de carbono no estructurales como son los almidones, azúcares y fructosanas y por otro a los hidratos de carbono estructurales, tales como la celulosa y hemicelulosa que es lo que se llama fibra cruda. Para la determinación de fibra es necesario trabajar con una muestra desengrasada y someterla a una hidrólisis ácida seguida de una hidrólisis alcalina con

una posterior incineración de material insoluble para así obtener por diferencia de peso el contenido de hidratos de carbono no degradables. (13,29)

Equipo, Material y Reactivos:

▣ Aparato de digestión, LABCONCO	▣ Crisoles
▣ Vasos digestores Berzelius	▣ Mufla THERMOLYNE 1500
▣ Estufa de vacío LAB.LINE MOD 3620	▣ H ₂ SO ₄ 1.25%
▣ Desecador	▣ NaOH 1.25 %
▣ Balanza analítica Sartorius Analytic	▣ Silicato de Aluminio
	▣ Alcohol etílico
	▣ Solución antiespumante

Procedimiento:

1. Se pesó de 4.5 g del residuo de la muestra a la que previamente se le determino la humedad y la grasa cruda, se colocó en un vaso Berzelius el cual contiene 0.5 g de silicato de aluminio (limpio y calcinado), se colocaron perlas de ebullición, más 200 mL de H₂SO₄ al 1.25% que estuviera hirviendo así 4 gotas de solución antiespumante.
2. Se colocó en el equipo LABCONCO para digestión de fibra, la mezcla se deja digerir por espacio de 30 min. Exactos
3. El contenido se vierte sobre un Buchner tipo "California" y se filtró con ayuda de vacío, el residuo se lavó con 500 mL de agua hirviendo y se volvió a colocar en el vaso Berzelius más 200 mL de NaOH hirviendo al 1.25% más 4 gotas de la solución antiespumante.
4. Se volvió a colocar en el equipo LABCONCO para otra digestión de 30 min. y otra filtración en el Buchner de malla metálica, así como los lavados de 500 mL agua hirviendo hasta eliminar el álcali presente en el residuo.
5. Se quitaron las perlas de ebullición y se lava el residuo con 25 mL de alcohol etílico, el residuo se pasa cuantitativamente a un crisol de porcelana previamente puesto a peso cte. y se coloca en estufa de vacío LAB-LINE intruments, aproximadamente por 4 a 8 h. Después se pesó, se carbonizó y se colocó en una mufla HARA EW y después de la incineración se pesó las cenizas. Por diferencia se obtuvo el porcentaje de fibra cruda.

6. Se determinó el % de fibra cruda en las muestras por diferencia, así como la media, desviación estándar y el coeficiente de variación.

Cálculos

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

$$\% \text{ Fibra} = \left(\frac{P_s - P_c}{m} \right) \times 100$$

Dónde:

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

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

m = peso de muestra inicial (en gramos)

5.3.6 Determinación de Hidratos de Carbono

Los Hidratos de Carbono se calculan por diferencia, es decir, la suma de los porcentajes obtenidos de los componentes principales menos 100%.

$$CH = 100 - (\% \text{ HUMEDAD} + \% \text{ CENIZAS} + \% \text{ EXTRACTO ETÉREO} + \% \text{ PROTEÍNA} + \% \text{ FIBRA CRUDA})$$

5.4 Determinación de Fibra Dietética

Fundamento:

Se mide el contenido de fibra dietética de los alimentos usando una combinación de métodos enzimáticos y gravimétricos. Las muestras de alimentos secas y libres de grasa son gelatinizadas con α -amilasa, estable al calor, posteriormente digeridas enzimáticamente por la proteasa y amiloglucosidasa, con el objetivo de eliminar la proteína y el almidón presente en la muestra. Para precipitar la fibra dietética soluble se añade etanol los residuos son filtrados y lavados con etanol y acetona, para después pesarlos, en la mitad de las muestra se mide la cantidad proteínica y en la

otra mitad se determina cenizas, la fibra dietética se obtiene por diferencia de peso.(30,31)

Equipo, Material y Reactivos:

- Crisol Gooch: porosidad #2 (grueso 40 a 60 micrones)
- Vasos de precipitados 100, 400, 600 mL
- Estufa de vacío LAB.LINE MOD 3620
- Desecador
- Balanza analítica Sartorius Analytic
- Horno a 105°C
- Mufla THERMOLYNE 1500
- Baño agua hirviendo
- Baño con temperatura cte. a 60°C con agitación
- Potenciómetro estandarizado a pH4 y 7
- Matraces Kitasato de 1000 mL
- Alargadera para crisol Gooch
- Barras magnéticas 22x8 mm
- Pipeta automática 50 a 200 μ L
- Termómetro -10 a 100°C
- Kit total Dietary Fiber Assay (SIGMA TDF-100A).(α -amilasa (SIGMA A 3306), PROTEASA DE ***Bacillus licheniformis*** (500 mg) (SIGMA P3910), Amiloglicosidasa de ***Aspergillus Níger*** (10 mL) (SIGMA A9913), celita lavada con ácido (50 g) (SIGMA C8656)
- Éter de petróleo R.A.
- Alcohol etílico R.A.
- Acetona R.A
- Fosfato de sodio di-básico anhidro, R.A
- Fosfato de sodio monobásico anhidro, R.A
- Hidróxido de sodio 1.0 N
- Ácido clorhídrico 1.0 N

Se usó agua destilada o desionizada para hacer las soluciones.

- a) Etanol al 78%. Se midieron 207 mL de agua en un matraz volumétrico de un litro. Se agregó etanol al 95%. Se mezcló y llevó al volumen con etanol al 95% y se mezcló nuevamente.
- b) Amortiguador de fosfatos, 0.08M, pH 6.0. Se disolvieron 1.4 g de Na_2HPO_4 anhidro y 8.4 g de Na_2HPO_4 anhidro en aproximadamente 700 mL de agua. Se diluyó sin llevar al aforo con agua. Se verificó el pH y se ajustó con NaOH o

H₃PO₄, se aforó a un litro y se mezcló. Se guardó en frascos bien tapados a temperatura ambiente.

c) Solución de hidróxido de sodio, 0.275 N. Se diluyeron 275 mL de solución de NaOH 1.0 N a 1 litro con agua en un matraz volumétrico. Se guardó en un frasco bien tapado a temperatura ambiente.

d) Solución de Ácido clorhídrico, 0.325 N. Se diluyeron 325 mL de solución de HCl 0.1N a 1 litro de agua en un matraz volumétrico. Se guardó en un frasco bien tapado a temperatura ambiente.

Procedimiento:

Se corrió un blanco con las muestras a lo largo de todo el procedimiento para corregir cualquier contribución de los reactivos al residuo. A las muestras y el blanco que se les midió el contenido de fibra dietética y se les realizó al menos por cuadruplicado para tener duplicados de la determinación de proteína y cenizas para corregir el peso del residuo en caso necesario.

a) Preparación de los crisoles

Se lavaron los crisoles, se secaron y se calentaron una hora a 450°C; se enfriaron; posteriormente se remojaron y enjuagaron con agua; finalmente se secaron. Se les agregó 0.5 g de Celita a cada crisol y se secaron a 130°C hasta peso constante. Se enfriaron en el desecador y pesaron hasta tener 0.1 mg de diferencia. Se registró este peso como "Celita + Peso del crisol o P1". Se conservaron en el desecador hasta que se utilizaron.

b) Preparación de la muestra

Debido a que el contenido de grasa en las muestras fue menor al 10%, no fue necesario desengrasar y se trabajó directamente con ellas.

c) Realización de la determinación.

1.-Hidrólisis enzimática

Se pesaron por cuadruplicado muestras de 0.5 g de cada muestra que se analizó y se le colocó en vasos de precipitado de 100 mL de forma alta. Los pesos

de las muestras no deben tener una diferencia mayor de 20 mg. Se registraron los pesos.

Se agregó, a cada vaso, 25 mL de amortiguador de fosfatos pH 6.0, 0.05 mL de α -amilasa estable al calor (Sigma A 3306) y se mezcló muy bien. Se cubrió cada vaso con papel aluminio y puso en un baño de agua hirviendo. Se agitaron suavemente los vasos a intervalos de 5 minutos. Se incubaron por 15 minutos después de que la temperatura dentro de los vasos alcanzó 95°C.

Se dejaron enfriar las soluciones a temperatura ambiente y se ajustó el pH de las soluciones a 7.5 ± 0.2 agregando 5 mL de solución de hidróxido de sodio 0.275 N a cada vaso. Se verificó el pH y se ajustó en cada caso que fue necesario, ya sea con NaOH o HCl.

Se preparó una solución de proteasa (Sigma P3910) de 25 mg/mL en amortiguador de fosfatos pH 6.0, inmediatamente antes de que se utilizara. Se pipetearon 0.1 mL (2.5 mg de proteasa) dentro de cada vaso.

Se cubrió cada vaso con papel aluminio y se pusieron en un baño de agua con agitación continua a 60°C, se incubaron por 30 minutos después de que la temperatura en las soluciones alcanzó 60°C.

Se enfriaron las soluciones a temperatura ambiente. Se ajustó el pH de las soluciones a un pH de 4.0-4.6 agregando 5 mL de HCl 0.325 N a cada vaso. Se verificó el pH y se ajustó con NaOH o HCl, según fue el caso de cada muestra.

Se agregaron 0.05 mL de amiloglucosidasa (Sigma A9913) a cada vaso. Se cubrió cada vaso con papel aluminio, se pusieron en un baño de agua con agitación continua a 60°C y se incubaron por 30 minutos después de que la temperatura en las soluciones alcanzó los 60°C.

Se transvaso el contenido del vaso a un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se adicionaron 125 mL de etanol al 95% a cada vaso. Se dejó la solución durante toda la noche a temperatura ambiente para que se precipitara completamente la fibra dietética soluble.

2.-Filtración

Se montó un sistema de filtración al vacío para cada crisol Gooch. Se humedeció y se redistribuyó la cama de celita en cada crisol usando etanol al 78%. Se aplicó succión suave para que se atrajera la celita al filtro y se formó una superficie lisa. Se mantuvo la succión suave y se dejó pasar cuantitativamente el precipitado y la suspensión de cada uno de los vasos a sus respectivos crisoles.

Se lavó el residuo con tres porciones de 10 mL de etanol al 78 %, dos porciones de 5 mL de etanol al 95% y dos porciones de 5 mL de acetona.

Se secaron durante la noche los crisoles que contenían los residuos en una estufa con aeración y temperatura controlada (105°C).

Se enfriaron todos los crisoles en un desecador, y se pesaron hasta que la cuarta cifra decimal (0.1 mg) no varió, y se registraron estos pesos como “residuo + celita+ peso del crisol” o P2.

3.-Determinación de Proteína

Con ayuda de una espátula se obtuvo el residuo + celita de cada crisol (por duplicado), se pesó y se registró este dato como Residuo + Celita o P₄. Posteriormente se molió en un mortero y de este polvo se pesaron 100 mg por duplicado el cual se le realizó la determinación de proteína. Con este dato, se calculó el contenido de proteína en el residuo de cada crisol.

Se analizaron en los duplicados de los residuos de las muestras y blancos el contenido de proteína por el método de Kjeldahl, como se especifica en el procedimiento del AOAC.

4.-Determinación de cenizas

De los dos crisoles restantes de las muestras y de los blancos se calcinó el residuo a 450°C hasta peso constante, y se registró este peso como “cenizas+ celita + peso del crisol o P3.

Cálculos

Contenido de cenizas en el residuo de cada crisol.

$$C = P_3 - P_1$$

Dónde:

C= g de cenizas en el crisol de muestra y blanco

P₁= Celita + peso del crisol

P₃= Cenizas + Celita + peso del crisol

Contenido de proteína en el residuo de cada crisol

$$\% N = \frac{(V_m - V_b)(\text{meq})(N_{\text{HCL}})(M)}{M}$$

$$\% P = N \times F$$

Dónde:

%N= g de nitrógeno en el residuo + celita /100 g de muestra (lo mismo para el blanco)

%P= g de proteína en el residuo + celita / 100 g de muestra y en el blanco

V_m= Volumen de HCl gastado en la titulación de la muestra de microkjeldahl

V_b= Volumen de HCl gastado en la titulación del blanco

Meq =miliequivalentes del N (Peso molecular/1000 = 0.014)

N_{HCl} = Normalidad de la solución valorada de HCl

m=g de muestra utilizada en la determinación (aprox. 100mg)

F= factor de conversión a proteína 6.25

M= g de residuo + celita = (P 4)

$$P' = P_4 \times \%P / 100$$

Dónde:

P´= Proteína en residuo de la muestra y blanco

%P= g de proteína en el residuo + celita / 100 g de muestra y en el blanco

M= g de residuo + celita = (P 4)

Contenido de fibra dietética total

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

Dónde:

FDT= fibra dietética total

B= R_{blanco} - P_{blanco} - C_{blanco}

R= peso del residuo que corresponde a la definición de P2-P1
(mg)

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

C= peso promedio de cenizas en el crisol (mg) o P3-P1

pm= peso de la muestra (mg)

5.5-Determinación de Digestibilidad proteínica *in vitro*

Fundamento:

La digestibilidad es una forma de medir el aprovechamiento de un alimento, es decir, la facilidad con que es convertido en el aparato digestivo en sustancias útiles para la nutrición, comprende dos procesos, la digestión que corresponde a la hidrólisis de las moléculas complejas de los alimentos, y la absorción de pequeñas moléculas en el intestino. (30)

La AOAC lo describe como un método que utiliza enzimas proteolíticas; tripsina, quimiotripsina, peptidasa y proteasa bacteriana, donde se mide el pH al final del experimento y se determina el porcentaje de digestibilidad con el dato proporcionado por el potenciómetro.

Equipo, Material y Reactivos:

- | | |
|---|--------------------------------------|
| ❑ Potenciómetro CORNING mod. 10 | ❑ Vasos de precipitados de 15 mL |
| ❑ Balanza analítica Sartorius Analytic | ❑ Matraces de recirculación |
| ❑ Baño LAB-LINE INSTRUMENT con temperatura cte. a 37°C y 55°C | ❑ Mangueras de plástico |
| | ❑ Barras magnéticas 22x8 mm |
| | ❑ Pipeta volumétrica aforada de 1 mL |
| | ❑ Termómetro 10 °C a 100 °C |

- Parrilla de agitación
- Cronómetro
- Proteasa Bacterial (P5147-1G SIGMA ALDRICH)
- α -Quimiotripsina: 40 unidades/ mg proteína (C4129 SIGMA ALDRICH)
- Tripsina 16700 unidades/mg proteína TIPO IX Porcine pancreas
- Pepsina proveniente de la mucosa gástrica de puerco 924 unidades/mg proteínica. P7000-100G (077KOGG1 SIGMA ALDRICH)
- Hidróxido de sodio 1.0 N
- Ácido clorhídrico 1.0 N
- Solución enzimática A. Disolver 227,040 BAEE unidades de tripsina pancreática porcina (SIGMA T-0134), 1,860 unidades de α -quimotripsina pancreática bovina (SIGMA C-4129) y 2,321 unidades de peptidasa intestinal porcina (SIGMA P-7000) en 10 mL de agua destilada.
- Solución enzimática B. Disolver 65 unidades de caseína de proteasa bacteriana (SIGMA P-5147) en 10 mL de agua destilada.

Procedimiento:

Preparación del extracto:

1. Se parte de 10 mg de nitrógeno de la proteína (caseína) ó muestra, se le adicionó 10 mL de agua destilada y se deja en agitación a una temperatura de 37 °C en un baño de circulación LAB-LINE INSTRUMENT, por un período de 1 h
2. Después se midió el pH en un potenciómetro CORNING mod.10; y se ajustó el pH a 8.0 ± 0.03 con HCl o NaOH 0.1 N, inmediatamente se le adiciona 1 mL de la solución A y se mantuvo a 37 °C por 10 min.
3. Se le adicionó 1 mL de la solución B y se mantuvo en agitación a una temperatura de 55 °C en un baño de circulación LAB-LINE INSTRUMENT por 9 minutos.
4. Al término de este tiempo se colocó otra vez a la temperatura de 37°C por 1 minuto, así al finalizar 20 minutos de haber adicionado la solución A, se mide el pH. El pH para caseína de referencia es de 6.42 ± 0.05 y sólo hasta que se obtiene este pH en la serie de referencia, se podrá realizar la determinación de las muestra.
5. El porciento de digestibilidad se obtiene al sustituir el pH en la siguiente fórmula:

Cálculos

El por ciento de digestibilidad se obtiene al sustituir el pH en la siguiente fórmula:

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

Para poder aplicar la fórmula anterior, se debe reunir la condición de que al trabajar la proteína de referencia (caseína) debe proporcionar un pH de: 6.42 ± 0.05 .

5.6 -Determinación de proteína verdadera:

Fundamento:

La técnica se basa en la solubilización del nitrógeno no proteínico así como de la proteína soluble (así que la muestra deba estar finamente molida) y la posterior precipitación de dicha proteína con tungstato de sodio; con el fin de eliminar el nitrógeno no proteínico que puede interferir en la determinación del nitrógeno por medio de un micro-Kjeldahl.

Con este método la proteína no soluble también es tomada en cuenta ya que en la etapa de filtración ésta es incluida junto con la proteína soluble precipitada

Equipo, Material y Reactivos:

- Balanza analítica Sartorius Analytic
- Vaso de precipitados de 50 mL vaso de precipitados de 50 mL
- Digestor TECATOR, Mod. Ab20/40
- Microdestilador TECATOR AUTO KJELTEC, No. 1030
- Tubos de digestión de 75 mL
- Papel Whatman #50
- Matraz Kitasato
- Embudo con alargadera
- solución precipitante (5 g de tungstato de sodio + 1.51 g $\text{Na H}_2\text{PO}_4$ + 20 mL H_2O y 22 mL HCl , H_2O)
- Matraz aforados en 50 mL con agua destilada
- Mezcla digestiva (3 g de $\text{Cu SO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ + 100 mL H_3PO_4 + 300 mL de H_2SO_4 concentrado),
- Peróxido de hidrogeno al 30 % (v/m)
- Sulfato de potasio RA
- Solución de NaOH al 60% (m/v)
- Solución de ácido bórico con indicador
- Solución de HCl 0.01N valorada

Procedimiento:

(a) Proceso de precipitación

Se pesó de 50 a 100 mg de muestra finamente molida y colocarla en un vaso de precipitados de 50 mL. Agregar 5 mL de H₂O caliente y agitar mecánicamente por 15 minutos, agregar 2 mL de solución precipitante y se dejar que repose durante 10 min.; transferir cuantitativamente y filtrar en papel (Whatman # 50 o 542) utilizando 25 mL de agua destilada caliente.

(b) Proceso de digestión

Colocar el papel filtro con el precipitado en un tubo de digestión y agregar 0.5 g de K₂SO₄ 5 mL de mezcla digestiva, colocar el tubo durante 15 minutos en el digestor a una temperatura de 340 °C, retirar los tubos del digestor y esperar que se enfríen para añadirle 3 mL de H₂O₂ al 30 % y colocarlos nuevamente en el digestor el cual debe estar a una temperatura de 370 °C. Se considera que la digestión está realizada, cuando el tubo no muestra manchas ni puntos negros y además la mezcla de digestión es translúcida con un ligero tono verde-azuloso.

(c) Destilación y titulación

Una vez efectuada la digestión se deja enfriar el tubo digestor y se procede a la destilación, para la cual se le agrega agua destilada (aproximadamente 10 mL) para trasvasar cuantitativamente la mezcla digerida a la copa de adición al microdestilador enjuagando esta con 1 a 2 mL de agua destilada dos o tres veces. Después añadir al aparato de destilación por medio de la copa de adición, lenta pero en forma continua 15 mL de NaOH 60 %. El destilado se recibe en un matraz Erlenmeyer que contenga 50 mL de solución de ácido bórico. Se lava la copa de adición con 15 mL de agua destilada y se procede a la destilación, continuar hasta completar un volumen de 150 mL aprox. Al recibirse el nitrógeno amoniacal sobre ácido bórico, el indicador que éste contiene vira del café rojizo al verde esmeralda. Finalmente el complejo nitrogenado formado se titula con el HCl 0.01 N, hasta el vire del indicador, del verde esmeralda a rosa claro.

Nota: Es conveniente correr un blanco en donde se incluya el papel filtro, junto con aproximadamente 50 a 100 mg de glucosa, cada vez que se prepara nuevamente algún reactivo.

Cálculos:

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

Dónde:

B= mL de la titulación del blanco

P= mL de la titulación de la muestra

N= normalidad del HCl

Meq = miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m = peso de la muestra (en gramos)

$$\% \text{Proteína verdadera} = \% N \times F = \text{g proteína/100 g de muestra}$$

F = Factor de conversión (6.25) cuando se considera que la proteína de la muestra contiene un 16% de nitrógeno.

5.7-Determinación de Inhibidores de Tripsina:

Fundamento:

La técnica de Kakade y colaboradores se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso (solución de NaOH).

El extracto directo o dilución se pone en contacto con una solución estandarizada de tripsina (40 µg/10 mL), y después de cierto tiempo se determinó la actividad proteolítica remanente, por medio de un substrato sintético (BAPNA), el cual producirá una coloración que se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm. Dicha coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibición de la muestra.(19,20)

Equipo, Material y Reactivos

- ▣ Balanza analítica Sartorius Analytic
- ▣ Muestra desengrasada
- ▣ Espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10 uv
- ▣ Parrilla con agitación magnética

- ▣ Pipetas volumétricas de 5 mL y 1 mL
- ▣ Ácido acético 30%
- ▣ Solución amortiguadora TRIS a pH8.2, 0.05M

- Solución BAPNA (N-bezoil-DL-Arginina-p-nitroanilida-HCl)
- Solución estándar de Tripsina

- Solución de NaOH al 0.01 N
- Solución de HCl 0.001 N

Procedimiento:

1.-Preparación del extracto:

Se pesó 1 g de muestra finamente molida y desengrasada (< 5 % de grasa) en un vaso de precipitado se le adiciona 45 mL de NaOH 0.01 N y se ajustó el pH a 9.6 ± 0.2 y se aforó con agua destilada a 50 mL, se trasvasó a un vaso que contenga un magneto para agitar la suspensión por 2:30 h, a 300 rpm, después de este tiempo se dejó reposar por 30 min. y por decantación se obtiene el sobrenadante desechando el residuo insoluble.

2.-Determinación de la actividad:

- a) Se tomaron porciones de 0.0, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8 mL de extracto directo o diluido y se pipetearon a tubos de ensaye por duplicado (2 series de 5 tubos) ajustando el volumen a 2 mL con agua destilada. Se introducen a un baño maría a 37°C.
- b) A una serie de los 5 tubos se les adiciona 2 mL de solución estándar de tripsina (a 37 °C) a cada tubo, se agita y mantiene el contacto inhibidor-tripsina por espacio de 10 min. en baño a 37 °C.
- c) A continuación se adicionan 5 mL de solución de BAPNA (a 37°C) se agita y se mantiene dicha mezcla de reacción por 10 min. exactos (con cronómetro) en el baño de 37 °C. La reacción enzimática se detiene por la adición de 1 mL de ácido acético al 30 % agitándose inmediatamente.

3.- La segunda serie de tubos llevan el mismo tratamiento, sólo que, en este caso los reactivos (estándar de tripsina, ácido acético al 30% y BAPNA) se adicionan sucesivamente terminada la adición del BAPNA, cada tubo de esta serie es el blanco respectivo de la primera serie.

4.-La lectura en el espectrofotómetro se realiza a 410 nm y es necesario para cada una de las alícuotas del extracto, primero ajustar el equipo a 0.000 Absorbancia con

su respectivo blanco, el tubo que no lleva extracto es la referencia (40 µg de tripsina / 10 mL)

5.- Se calcula el valor de U.T.I / mL de cada una de las alícuotas tomadas del extracto y se calculó el promedio de U.T.I / mL, la actividad de inhibidores de tripsina se expresa en términos de U.T.I / g de muestra.

Cálculos

Una unidad de tripsina (U. T.) es arbitrariamente definida como un incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm por 10 mL de mezcla de reacción. De este modo, la lectura de absorbancia (A) se puede pasar directamente a U. T.

$$U.T.=A \times 100$$

Como se tiene una serie de alícuotas del extracto, se tiene a su vez una serie de valores de U.T., los cuales al restar este valor al dato de referencia (0 mL de extracto, 40 µg de tripsina), se obtienen los respectivos valores de unidades de tripsina inhibida (U. T. I.). Posteriormente se calcula el valor de U.T.I / mL de cada una de las alícuotas tomadas del extracto y calcular el promedio de U.T.I / mL. La actividad de inhibidores de tripsina se expresa en términos de U.T.I / mg de muestra, tomando en cuenta para el cálculo el volumen inicial del extracto, las diluciones realizadas y el peso de muestra empleada.

$$\frac{U.T.I}{mg} \text{ muestra} = B \times F \times \left(\frac{50}{1000 mg} \right)$$

5.8.-Determinación de Lectinas

Fundamento:

La detección de hemaglutininas o lectinas se lleva a cabo por una técnica de microdilución seriada, en la cual se determina la cantidad mínima de faseolotoxina que produce prueba positiva de aglutinación, definiéndose como 1 unidad hemaglutinante (UHG) el equivalente a 1 mg de dicha lectina. (25,30)

Equipo, Material y Reactivos:

■ Sangre lavada de hámster (machos de 3 meses de edad)

■ Solución anticoagulante (a) (Heparina 1000UI)

- ▣ Solución de proteasa al 0.2% en solución salina 0.9 %
- ▣ Solución salina 0.9 %
- ▣ Solución salina 1%
- ▣ Proteasa (SIGMA P-5147, de ***Streptomyces griseus*** (3.9 units/mg sólido))
- ▣ Capilares con Heparina
- ▣ Embudos pequeños
- ▣ Éter etílico
- ▣ Fibra de vidrio
- ▣ Algodón
- ▣ Jeringa de 1 mL
- ▣ Matraz Erlenmeyer de 50 mL y 150 mL
- ▣ Microdilutores
- ▣ Micropipeta de 1 a 5 mL
- ▣ Tubos de centrifuga de 15 mL con graduación
- ▣ Pipetas pasteur
- ▣ Micropipeta multicanales
- ▣ Adaptador para celdas de 12 × 80 mm (acondicionado a una abertura de 1 cm²)
- ▣ Agitador magnético con tacómetro marca THERMOLINE
- ▣ Centrifuga EPPENDORF 5702
- ▣ Espectrofotómetro COLEMAN
- ▣ Incubadora marca BUE-M
- ▣ Microtiter Kit (Cook Eng-Alexander Virginia USA)
- ▣ Parrilla de agitación múltiple marca CORNING

Procedimiento:

1.-Preparación de extracto

Se pesó 0.1 g de muestra y añadió 10 mL de solución salina al 1% y se agitó en un dispositivo magnético por 2 h a 300 rpm, se centrifugó la solución homogénea anterior a 1500 rpm por 15 min. y se filtró utilizando fibra de vidrio y aforar a 10 mL con solución salina al 1%.

2.-Preparación de sangre

a) Una vez que se sangró al hámster (anestesiado) por vía ocular, se colocó la sangre en un matraz erlenmeyer que contenga 0.15 mL de heparina + Aprox. 5 mL de solución salina al 0.9 % y homogeneizar, se trasvasó la sangre con anticoagulante en partes iguales en tubos de centrifuga para lavarla (3 veces) con solución salina al 0.9%. La relación "sangre: solución salina" es aprox.1:13 y se centrifuga a 1500 rpm durante 10 min. Después del último lavado, medir en el tubo de centrifuga la cantidad de paquete de eritrocitos y diluir al 4% para lo cual se agrega por cada 1 mL de glóbulos rojos 24 mL de solución salina al 9%.

3.-Sensibilización de glóbulos rojos:

- a) A cada 10 mL de suspensión de glóbulos rojos al 4% se agregaron 1mL de proteasa al 2% y se incubó la suspensión por 1h a 36 ± 1 °C; resuspender cada 15 min., después de centrifugó para eliminar la enzima sobrenadante y dar 3 lavados con solución salina al 0.9 % en el último lavado resuspender el paquete de glóbulos rojos al 5%, para lo cual, por cada mililitro del paquete de eritrocitos se adiciona 19 mL de solución salina al 0.9%.

4.-Ajustar a la suspensión de glóbulos rojos

Se tomó 0.5 mL de la suspensión de glóbulos rojos ya sensibilizados y se añadió 2 mL de solución salina al 0.9 % a una celda y se leyó en el espectrofotómetro COLEMAN a 620 nm, utilizando como blanco solución salina al 0.9%. la lectura que debe obtener es de 25 ± 1 % de transmitancia, en caso contrario se realizó la dilución necesaria para que la suspensión de glóbulos rojos quede dentro de dicho rango.

5.-Microtitulación

- a) En placas tipo “V” del microtiter colocó en cada pozo de las hileras que se van a usar y llenar con 100 μ L de solución salina al 0.9% usando la pipeta automática multicanales se llenó el microdilutor con 50 μ L. del extracto problema y al sacarlo limpiar el vástago del microtitulador, después se introdujo el microtitulador con muestra en el primer pozo y girarlo sin excesiva presión se pasó sucesivamente a los siguientes pozos hasta terminar la hilera, para obtener diluciones seriadas.
- b) Por cada placa debe tener una hilera de solo sol. Salina al 0.9 % y una de faseolotoxina con una pipeta de gota colocar en cada pozo 50 μ L de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizada y ajustados y girar la placa en forma circular y colocarla en incubación por 1h a 36.5 ± 0.5 °C

Lectura

- a) Se colocó la placa sobre el dispositivo de lectura y se observó a través del espejo el fondo de los pozos de cada hilera de prueba. Se reporta la cantidad equivalente de lectinas por g de muestra.

Cálculos

Cantidad de lectina que realmente se coloca en el primer pozo para hacer la dilución seriada (E)

$$E = M \cdot D$$

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

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

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

$$E = 0.05 \mu\text{g}$$

Límite de detección del método (L)

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

t = título de la lectina de referencia

Unidades Hemaglutinantes

Cantidad utilizada realmente de la muestra problema en el primer pozo de la hilera respectiva (e)

$$e = M \cdot D$$

M: concentración de muestra en la solución diluida (mg / mL)

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

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

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

F = factor de dilución = aforo/aliquota

Cantidad mínima de muestra que produce prueba positiva de aglutinación (MA)

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

Dónde:

t = título de la muestra problema

Cantidad de lectina de referencias expresarla en μg de muestra, que también equivale a 1mg de lectina sobre 1g de muestra (LE)

$$LE = L/MA$$

Unidades hemaglutinantes (UHG)

UHG = 1 mg faseolotoxina

Resultados expresados en UHG/g muestra

$$\begin{aligned} & \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}\right) \left(\frac{1 \text{ mg}}{1000 \mu\text{g}}\right) \left(\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}\right) = \frac{\text{mg}}{\text{g}} \\ & \frac{\mu\text{g}}{\text{mg}} = \frac{\text{mg}}{\text{g}} \\ & \frac{\text{mg}}{\text{g muestra}} = \frac{\text{UHG}}{\text{g muestra}} \\ & \left(\frac{\text{LEmg}}{\text{g muestra}}\right) \left(\frac{1 \text{ UHG}}{1 \text{ mg lectina}}\right) = \frac{\text{UHG}}{\text{g Muestra}} \end{aligned}$$

5.9 Determinación Cualitativa de Alcaloides

Fundamento:

No existe una definición exacta para los alcaloides, pero se puede considerar como compuestos orgánico de origen natural (generalmente vegetal), nitrogenado, derivados generalmente de aminoácidos, de carácter básico, con propiedades que responden a reacciones comunes de precipitación (27)

Equipo, Material y Reactivos:

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Embudo de separación 125 mL | <input type="checkbox"/> Cloroformo R.A. |
| <input type="checkbox"/> Parrilla de agitación CORNING MOD.10 | <input type="checkbox"/> Etanol R.A |
| <input type="checkbox"/> Estufa de vacío LAB_LINE | <input type="checkbox"/> Sulfato de sodio anhidro R. A. |
| <input type="checkbox"/> Papel filtro whatman # 1 | <input type="checkbox"/> Reactivo Mayer |
| <input type="checkbox"/> Rota vapor BUCHI | <input type="checkbox"/> Reactivo Wagner |
| <input type="checkbox"/> Ácido Nítrico 30% | <input type="checkbox"/> Reactivo Dragendorff |
| <input type="checkbox"/> Ácido sulfúrico 1% | <input type="checkbox"/> Reactivo Sonnenschein |
| <input type="checkbox"/> Ácido silicotugstico | <input type="checkbox"/> Reactivo Hager |
| <input type="checkbox"/> Metanol R.A. | <input type="checkbox"/> Reactivo Scheibler |
| <input type="checkbox"/> Amoniaco concentrado 25% | <input type="checkbox"/> Reactivo de Ácido silicotugstenico |

Procedimiento:

- 1.-Preparación del extracto:
 - a. Se pesó 2.4 g de muestra seca y molida en un vaso de precipitados y se mantiene por 12 h con 40 mL de metanol a temperatura ambiente.
 - b. Después se mantuvo a una temperatura de 50°C con agitación constante por 4 h, la mezcla se filtro, y el residuo es lavado con 20 mL de metanol.
 - c. Se evaporó el metanol en un rota vapor y el residuo se volvió a re suspender con 2 mL de metanol más 12 mL de HCl al 1%, se mezcló y se filtró.
 - d. Después se le adicionó amoniaco concentrado (25%), para llevarlo a un pH alcalino (8 a 10) y se colocaron en un embudo de separación, a esta mezcla se

extrajo con 3 porciones de cloroformo de 20 mL, separando la fase orgánica de cada una y etiquetándola como la FRACCIÓN A. A la solución acuosa residual se volvió extraer con 3 porciones de la solución cloroformo-etanol (3:2 v/v) de 20 ml y separando cada vez la fase orgánica, para así obtener la FRACCIÓN B.

- e. Ambas fracciones se secaron con sulfato de sodio anhidro y se evaporaron en un rota vapor, el residuo es nuevamente re suspendido con 1.5 mL de HCl al 1% y 1.5mL de cloroformo, se agitaron y la fase acuosa de cada fracción se pipeteo y se filtró a través de un tapón de algodón. Esta nueva porción se divide en 7 porciones (50 a 100 μ L) en tubos de ensaye; a los cuales se les añadió 2 gotas de los siguientes reactivos: Mayer, Wagner, Dragendorff, Sonnenchein, Hager, Scheibler y Ácido silicotugstenico.
- f. Debido a que esta prueba puede dar falsos positivos, se considera prueba positiva cuando las siete porciones de ambas fracciones (A y B) presentan un precipitado con cada uno de los reactivos.

5.10- Determinación de Amanitina:

Fundamento:

Las amanitina se detectan mediante el test de Meixner, basado en una reacción producida por el hidroxilo del grupo indólico de las amanotoxinas y la lignina presente en el papel periódico, en presencia de ácido clorhídrico concentrado, que produce una intensa coloración azul., es una prueba muy sensible aunque si resulta negativa no excluye intoxicación.(3,28)

Equipo, Material y Reactivos:

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Embudo de separación | <input type="checkbox"/> Papel periódico |
| <input type="checkbox"/> Parrilla de agitación CORNING | <input type="checkbox"/> Agua destilada |
| <input type="checkbox"/> Vaso de precipitado 50 mL | <input type="checkbox"/> Metanol R.A. |
| <input type="checkbox"/> Papel filtro WHATMAN #50 | <input type="checkbox"/> Ácido clorhídrico |

Procedimiento:

- 1.-Preparación del extracto;

- a) Se pesó 25 mg, 50 mg y 100 mg de muestra seca y molida en un vaso de precipitados y se mantiene por 12 h con una mezcla de 0.5 mL de metanol y 0.5 mL agua destilada a temperatura ambiente.
- b) Después se mantuvo a temperatura ambiente con agitación constante por 2 h y la mezcla se filtró.
- c) Del filtrado se toma una gota de cada extracto y se adiciona a un cuadro 5x5 cm de papel periódico, previamente identificado con cada concentración del extracto (hacer lo mismo con un cuadro control) y se deja secar.
- d) A cada cuadro identificado, con cada concentración del extracto se añaden dos gotas de ácido clorhídrico concentrado, la reacción puede tomar 20 min. en aparecer.
- e) La prueba es positiva si el papel se tiñe de color azul, y se comienza a decolorar nuevamente entre 2 a 8 horas

6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Análisis Bromatológico:

A continuación se presentan los resultados obtenidos en los análisis realizados en las harinas de cada especie de hongo correspondiente ***A. rubescens*** y ***A. caesarea***.

Como ya se describió anteriormente el material biológico fresco se sometió a secado para su conservación en el laboratorio. A continuación se molió, para obtener las harinas respectivas de cada muestra de hongos los cuales se guardaron en envases con lo cual se permitió que se equilibrara su contenido de agua con la humedad relativa del laboratorio, para poder realizar las determinaciones analíticas que se describen.

En la TABLA 1 se pueden observar el valor del contenido de humedad gruesa en la muestra original de cada una de las especies, tanto cruda y cocida notándose una mayor diferencia en las ***Amanitas rubescens*** cruda y cocida, lo cual en cierta forma está relacionado a la composición química de las especies.

TABLA 1. Humedad en muestra original para las especies *A. rubescens*^a y *A. caesarea*^a

ESPECIE	<i>A. rubescens</i> CRUDA	<i>A. rubescens</i> COCIDA	<i>A. caesarea</i> CRUDA	<i>A. caesarea</i> COCIDA
^a HUMEDAD ORIGINAL	93.87%	98.75%	92.79 %	91.40%

^aSe presenta el valor promedio \pm D.E., (n=3), CV<5%

La TABLA 2 describe los resultados obtenidos del análisis proximal en base húmeda (BH) de la harina obtenida de ambas muestras, con la finalidad de poder realizar una adecuada comparación de los macro nutrientes.

En base a los resultados reportados en un trabajo previo de estas mismas especies provenientes de la Sierra tarahumara de Chihuahua, la cual se muestra a detalle en la tabla 3, es interesante comparar los resultados obtenidos de las especies que crecen en el Edo. de México, con la finalidad de ver si hay diferencia o similitud en los parámetros donde sea factible su comparación (31).

TABLA 2. Análisis proximal de la harina de los hongos del Edo. de México (BH)

^aDatos expresados en g nutrimento/100 g harina (%), los valores se expresan promedio \pm D.E., (n=3), CV<5%

NUTRIMENTO ^a	<i>A. rubescens</i> CRUDA	<i>A. caesarea</i> CRUDA	<i>A. rubescens</i> COCIDA	<i>A. caesarea</i> COCIDA
HUMEDAD	9.70 \pm 0.03	10.23 \pm 0.07	5.41 \pm 0.15	5.26 \pm 0.09
PROTEÍNA	30.51 \pm 0.09	31.31 \pm 0.54	31.28 \pm 0.18	26.02 \pm 0.08
CENIZAS	13.42 \pm 0.05	10.70 \pm 0.14	11.34 \pm 0.10	9.79 \pm 0.28
FIBRA	12.09 \pm 0.71	10.91 \pm 0.48	10.18 \pm 0.49	15.67 \pm 1.19
GRASA	8.50 \pm 0.04	7.19 \pm 0.12	7.83 \pm 0.03	8.38 \pm 0.24
HIDRATOS DE CARBONO ^c	25.78	29.66	33.96	34.88

^bDeterminación N% x 6.25

^cHidratos de Carbono calculados por diferencia de acuerdo al esquema Weende.

TABLA 3. Análisis proximal de la harina CRUDA Y COCIDA de los dos hongos (BH) del Estado de CHIHUAHUA (31)

NUTRIMENTO ^a	<i>A. rubescens</i> CRUDA	<i>A. caesarea</i> CRUDA	<i>A. rubescens</i> COCIDA	<i>A. caesarea</i> COCIDA
Humedad	6.86 \pm 0.02	5.18 \pm 0.15	6.37 \pm 0.11	6.87 \pm 0.04
Proteína	35.62 \pm 0.37	26.28 \pm 0.51	35.57 \pm 0.17	26.47 \pm 0.87
Cenizas	12.35 \pm 0.02	12.28 \pm 0.14	12.26 \pm 0.25	11.80 \pm 0.11
Fibra cruda	6.95 \pm 0.56	7.28 \pm 0.67	6.64 \pm 0.35	5.48 \pm 0.31
Grasa	12.31 \pm 0.44	14.16 \pm 0.47	10.99 \pm 0.49	12.40 \pm 0.32
Hidratos de Carbono ^b	25.91	34.82	28.17	36.98

^a Expresado en g/100 g de muestra (%). Los valores se expresan como valor promedio \pm desviación estándar, n=3 (CV \leq 5%).

^b Calculados por diferencia según el esquema de Weende.

En los resultados que se muestran en la TABLA 2 y 3 se puede observar un alto contenido de fibra en las muestras crudas de ambas especies del Edo. De México, mientras que las especies de Chihuahua presentan un valor mucho menor, lo que es interesante es el porcentaje de grasa en las especies de Edo. de México es bajo en comparación con las especies de Chihuahua.

Debido a que el agua presente en cada muestra interfiere en la comparación los valores de cada uno de los nutrimentos, se presenta la TABLA 4 y 5; donde se presentan los datos obtenidos en base seca (BS) para una equitativa comparación.

TABLA 4.-Análisis Proximal de la harina de dos hongos del Edo. De México (BS)

NUTRIMENTO ^a	<i>A.rubescens</i> CRUDA	<i>A. caesarea</i> CRUDA	<i>A.rubescens</i> COCIDA	<i>A. caesarea</i> COCIDA
Proteína ^b	33.79 ± 0.10	34.88 ± 0.60	33.08 ± 0.19	27.46 ± 0.08
Cenizas	14.86 ± 0.05	11.92 ± 0.16	11.98 ± 0.11	10.34 ± 0.29
Fibra	13.39 ± 0.79	12.15 ± 0.54	10.76 ± 0.52	16.55 ± 2.02
Grasa	9.42 ± 0.05	8.01 ± 0.14	8.28 ± 0.03	8.85 ± 0.25
Hidratos de carbono ^c	28.54	33.04	35.90	36.08

^aDatos expresados en g nutrimento/100 g harina (%), se presenta el valor promedio ± D.E., (n=3), CV<5%

^bDeterminación N% x 6.25

^cHidratos de Carbono calculados por diferencia de acuerdo al esquema Weende

TABLA 5. Análisis proximal determinado en la harina CRUDA Y COCIDA de los dos hongos del Edo. CHIHUAHUA (31) (BS)

NUTRIMENTO ^a	<i>A. rubescens</i> CRUDA	<i>A.caesarea</i> CRUDA	<i>A. rubescens</i> COCIDA	<i>A.caesarea</i> COCIDA
Proteína	38.12 ± 0.40	27.73 ± 0.54	37.99 ± 0.18	28.32 ± 0.93
Cenizas	13.22 ± 0.02	12.95 ± 0.15	13.10 ± 0.27	12.52 ± 0.12
Fibra cruda	6.95 ± 0.56	7.68 ± 0.67	6.54 ± 0.35	5.48 ± 0.31
Grasa	13.17 ± 0.47	14.74 ± 0.49	11.74 ± 0.52	13.27 ± 0.35
Hidratos de Carbono ^b	28.54	36.90	30.64	40.41

^a Expresado en g/100 g de muestra (%). Los valores se expresan como valor promedio ± desviación estándar, n=3 (CV≤5%).

^b Calculados por diferencia según el esquema de Weende.

Entonces teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Morales M.(31) tenemos que de las dos especies de hongos analizados muestra el contenido de proteína relativamente alto (aprox.30%).

En el estado de México *Amanita rubescens*, presenta un porcentaje de (34.88%) en la muestra cruda mientras que *Amanita caesarea* tiene (33.79%) para la muestra cruda. En ambas muestras disminuye el contenido de proteína después de la cocción teniendo como resultados valores de (33.08%) para *Amanita rubescens* cocida y (27.46 %) *Amanita caesarea* cocida, cabe destacar que ambas muestras son ricas en proteína.

Comparando los resultados de las muestras con las del Estado de Chihuahua, se observa que las dos especies disminuye el contenido de proteína después de la cocción sin embargo la muestra que presento mayor disminución en el porcentaje fue ***Amanita caesarea*** correspondiente al Estado de México, mientras que en las otras muestras, no se encuentra una diferencia en el contenido de proteína.

Se observa una notable diferencia entre el contenido de cenizas que presentaron las muestras crudas, con respecto al contenido de cenizas que se obtuvo de las muestras que se sometieron a cocción, por ejemplo en caso de ***Amanita rubescens*** cruda que presentó un valor de 14.86% mientras que la muestra cocida tuvo un valor de 11.98%, mientras que las muestras provenientes de Chihuahua presentan muy poca variación entre las muestras cocidas y crudas después de la cocción con respecto a cenizas.

El contenido de grasa en las muestras crudas en general se observa es ligeramente mayor que en las muestra cocida así en ***Amanita rubescens***, y con el calor de la cocción afectó el valor de este nutrimento, ya que al someter las muestras a un tratamiento térmico, las grasas se funden y puede haber pérdida después de la cocción lo que provocando una ligera disminución en el porcentaje de este nutrimento. Es interesante notar que las muestras de *Amanitas* estudiadas presentan un porcentaje de grasa elevado de acuerdo a lo que se reporta en la literatura ya que el porcentaje de grasa para setas y hongos comestibles se encuentra entre 0.05% a 2% (32).

En comparación con la especies del Edo. de Chihuahua, las cuales presentan un mayor contenido de grasa que las especies de Edo. de México, lo que de cierta manera puede influir el tipo de hábitat de las especies estudiadas.

Los hidratos de carbono de acuerdo a el esquema de Weende se calcula restando al 100% de la muestra, la sumatoria de las determinaciones efectuadas las cuáles son el porcentaje de humedad, grasa, cenizas, proteína y fibra cruda, de acuerdo a esto encontramos que ***Amanita caesarea*** cocida tiene un mayor contenido de hidratos de carbono (35.90 %), superando por alrededor de seis

unidades, a los calculados en la otra especie del hongo *Amanita rubescens.*, si comparamos los valores de las especies de Chihuahua, encontramos que de igual manera *Amanita Caesarea* cocida es la de mayor contenido de hidratos de carbono, con respecto a *Amanita rubescens.*

6.2 Caracterización Bromatológica complementaria

En la TABLA 6 se muestran los resultados obtenidos de las determinaciones que complementan el estudio bromatológico realizado a la harina de las dos especies de hongos los cuales también fueron sometidos a tratamientos de cocción tanto del Edo. México como de Chihuahua, aclarando que solo se presentan dos parámetros estos son la fibra dietética total (FDT) y la digestibilidad proteica *in vitro* debido a que son los únicos parámetros determinados en un trabajo anterior (31).

TABLA 6 Resultados de %FDT y % de Digestibilidad de los hongos del Edo. de México y Chihuahua

DETERMINACIÓN ^a					
ESPECIE	TRATAMIENTO	%Fibra Dietética Total		% Digestibilidad <i>in vitro</i>	
		Edo.de México	Chihuahua	Edo.de México	Chihuahua
<i>A. rubescens</i>	CRUDA	35.32 ± 0.47	28.55 ± 1.41	62.71 ± 2.39	59.62 ± 0.35
	COCIDA	31.86 ± 0.41	21.99 ± 1.05	65.79 ± 2.30	63.22 ± 0.73
<i>A. caesarea</i>	CRUDA	32.39 ± 0.99	30.68 ± 1.97	62.41 ± 2.22	61.88 ± 0.57
	COCIDA	39.34 ± 0.57	18.69 ± 0.62	68.42 ± 0.26	62.48 ± 0.81

^a Promedio ± D.E., (n=3), CV<5%

En ambas muestras se observó que el contenido de fibra cruda (esquema de Weende) es menor de la mitad con respecto al valor obtenido para fibra dietética total, lo que era de esperarse, ya que el método de fibra cruda es un tratamiento más drástico, mientras que la fibra dietética total contempla más componentes no digeribles como son, peptinas, oligosacáridos, fructooligosacáridos, entre otros que no se contemplan en fibra cruda. y por lo tanto hay una sobrestimación de los hidratos de carbono asimilables que se obtienen por el esquema de Weende.

Por lo general, el contenido de fibra cruda no constituye un índice absoluto; sirve más bien como medida de los compuestos de origen vegetal no aprovechables por el organismo que existen en un alimento (22).

Se muestra una diferencia significativa en los valores obtenidos entre los hongos del Edo. de México con los reportados en el Estado de Chihuahua por aproximadamente un mínimo 10 de unidades, por lo que es importante comentar que el alto contenido de fibra dietética total (aproximadamente 30%), incluye la fibra dietética soluble que a su vez contiene componentes denominados nutracéuticos y sería importante realizar este desglose de componentes en esta fracción.

En cuanto al contenido de fibra dietética total, se puede apreciar que hay diferencia en las muestras, el mayor valor fue de la **A. caesarea** cocida, con respecto a la cruda y la que menos porcentaje mostro fue la **A. rubescens** cocida, con respecto a cruda, con un porcentaje de 31.86%, las células de los hongos son ricas en polisacáridos, los β -glucanos y los mananos, compuestos importantes en la fibra dietética de los alimentos. La fibra cruda, normalmente subestima el valor total de la fibra dietética, porque los componentes solubles de la fibra no se miden en la fibra cruda, por cuestiones de metodología, sería importante analizar las fracciones solubles de la fibra dietética de los hongos.

Con lo que respecta al resultado del porcentaje de digestibilidad se tiene que para estas especies de *Amanita* oscila entre un 62% a un 68%, para las especies del Edo. de México mientras que para las especies de Chihuahua el porcentaje se encuentra en un mínimo de 59.62% y máximo de 63.22% esto nos indica que se encuentra en el valor promedio de las proteínas vegetales.

Una alta digestibilidad en un alimento debe ser mayor al 80% en el caso de las proteínas de origen animal, sin embargo para las proteínas de origen vegetal se considera que deben de estar en el rango de 60% a 70 %, esta característica se cumple en las muestras de hongos, proporcionando una disponibilidad de proteína aceptable.

La digestibilidad proteínica indica la biodisponibilidad (absorción) de este nutriente pero no indica la calidad de la proteína, es posible que debido a la presencia de algunos factores tóxicos como los inhibidores de tripsina, los cuales inhiben la actividad de la proteasas digestivas y el contenido de fibra, ocasionen una menor absorción de nutrimentos, dando como resultado una baja digestibilidad. (6).

La TABLA 7, muestra el porcentaje de Nitrógeno No Proteínico (NNP) contenido de las especies del Edo. de México con la finalidad de tener una perspectiva más real del contenido de la proteína.

Los organismos que pueden utilizar el NNP son los hongos, las plantas y algas, bacterias y organismos que viven en simbiosis con ellos, es importante debido a que muchos organismos superiores no pueden obtener aminoácidos de otras formas, más que absorbiéndolos de la dieta. Algunos de los compuestos que forman el NNP son los que contienen amoníaco, nitritos, nitratos y otros como la urea

TABLA No. 7 Resultado de Nitrógeno No Proteínico de los Hongos del Edo. de México^a

ESPECIE	TRATAMIENTO	%NNP
<i>A. rubescens</i>	CRUDA	1.93 ± 0.24
	COCIDA	8.02 ± 0.18
<i>A. Caesarea</i>	CRUDA	3.59 ± 0.72
	COCIDA	4.44 ± 0.09

^aPromedio ± D.E., (n=3), CV<5%

Con respecto a los valores obtenidos en las muestras del edo. México se observa que *A. rubescens* cocida, es la que tuvo mayor porcentaje de nitrógeno no proteico con un 8.02% mientras que la misma especie pero cruda obtuvo un porcentaje de 1.93% la cual también fue la más baja de contenido de Nitrógeno no proteínico. De este modo se puede apreciar que no todo el contenido de nitrógeno total es proteína, la fracción restante indican la presencia de otros compuestos nitrogenados que pueden pertenecer a factores tóxicos como alcaloides.

6.3 Análisis de Factores Tóxicos Naturales

En la TABLA 8 se puede observar el contenido de inhibidores de tripsina para ambas muestras en crudo, rebasan el límite máximo permisible que de acuerdo a Kakade (33) se reporta como 10 UTI/mg de muestra, sin embargo, se demuestra que con un tratamiento con calor, en el caso de las muestras cocidas el valor de los inhibidores de tripsina se encontró dentro del límite permisible de acuerdo a lo que marca la bibliografía lo cual significa que no representan un riesgo para la salud.

Es importante mencionar que la presencia de inhibidores de tripsina, las cuales inhiben la actividad de las proteasas digestivas, y el contenido de fibra, puede ocasionar que haya menor absorción de nutrimentos por lo que puede causar un riesgo a la salud si se consumen en fresco y en una gran cantidad de estos hongos.

Ambas especies de los dos estados tanto para el estado de México y para Chihuahua, presentan alto contenido de inhibidores de tripsina, siendo la de mayor valor las muestras procedentes de Chihuahua, las cuáles después de la cocción, presentan valores si acaso solo en el límite máximo permisible, mientras que las muestras del edo. de México muestran una diferencia significativa en la disminución después del proceso de cocción.

TABLA 8: Resultado de Inhibidores de Tripsina de los hongos del Edo. de México y Chihuahua^a

ESPECIE	TRATAMIENTO	INHIBIDORES DE TRIPSINA (UTI/mg) ^b	
		Edo.México	Chihuahua
<i>A. rubescens</i>	CRUDA	12.08 ± 0.48	16.87 ± 3.39
	COCIDA	8.59 ± 0.81	11.42 ± 0.28
<i>A. Caesarea</i>	CRUDA	10.46 ± 0.16	10.44 ± 2.80
	COCIDA	1.65 ± 0.19	10.05 ± 3.85

^aSe presenta el valor promedio ± D.E., (n=3), CV <5%

^bUnidades de tripsina inhibida/mg de muestra

Por ejemplo, *A. rubescens*, en la muestra cruda tiene un valor de 12.08 UTI/mg está por arriba del valor considerado como riesgo al ser ingerido; sin embargo, en la muestra cocida presenta 8.59 UTI/mg, se encuentra por debajo del valor considerado como riesgo a la salud por vía oral

En la TABLA 9 se observan los resultados del contenido de lectinas obtenidos en las muestras de ambos estados, donde se observa la disminución del contenido de lectinas en las muestras cocidas.

TABLA 9: Resultado de lectinas de los hongos del Edo. de México y Chihuahua^a

ESPECIE	TRATAMIENTO	LECTINAS (ENTEROTOXINA) (UHG/g mta.) ^b	
		Edo. México	Chihuahua
<i>A. rubescens</i>	CRUDA	0.31	0.9
	COCIDA	0.29	0.03
<i>A. Caesarea</i>	CRUDA	217.88	0.9
	COCIDA	0.11	0.1

^aSe presenta el valor promedio \pm D.E., (n=3), CV <5%

^bUnidades hemaglutinantes/ g de muestra

El contenido de lectinas, que tienen la propiedad de aglutinar los glóbulos rojos sanguíneos, tuvo un valor bajo para especies cocidas que se observa en las tablas 9 en el caso de la *A. rubescens*, tanto en la muestra cruda como en la cocida, se encuentran por debajo del valor considerado como riesgo a la ser ingerido.

Se observa que existe una gran diferencia en el contenido de lectinas de la muestra cruda de *A. Caesarea* del Edo. de México la cual se obtuvo 217.88 UHG / g de muestra con respecto a la muestra de Chihuahua, que tuvo un valor de 0.9 UHG / g de muestra, sin embargo ambas muestras después del tratamiento con calor disminuye su contenido.

Aunque la concentración de las lectinas se ven afectadas térmicamente, puesto que se encuentra por debajo del nivel dañino para la salud es decir por debajo de <1 UHG/g en las muestras cocidas, de ambas especies tanto en el Edo. de México como el Chihuahua.

A continuación en la TABLA 10 se describe el resultado de la prueba cualitativa para la determinación de alcaloides en ambas muestras del Estado de México, en la cual se puede observar que no hay presencia de estos.

TABLA 10: Resultado de Alcaloides de las especie del Edo. de México

ESPECIE	TRATAMIENTO	ALCALOIDES
<i>A. rubescens</i>	CRUDA	NEGATIVO
	COCIDA	NEGATIVO
<i>A. Caesarea</i>	CRUDA	NEGATIVO
	COCIDA	NEGATIVO

Para la prueba cualitativa de alcaloides, como ya se mencionó ninguna de las muestras presentó prueba positiva, para ninguno de los siete reactivos propuestos en la metodología, los cuales se pueden observar en la FIGURAS ,9,10,11 y 13.

Es importante mencionar que las siete alícuotas deben dar positivo es decir presentar una precipitado con cada uno de los reactivos, para así poder considerar cualitativamente la presencia de alcaloides en las muestras; es por esto que durante la prueba se debe tener cuidado debido a que es una prueba que puede presentar falsos positivos.

La FIGURA 5 que se muestra a continuación se puede observar cada uno de los precipitados para cada reactivo que indica esta prueba cualitativa, para poder determinar la presencia de alcaloides en una muestra.



FIGURA 5 Determinación de alcaloides cualitativa, se muestra una prueba positiva con cada reactivo .



FIGURA 6: Prueba cualitativa de alcaloides perteneciente al extracto de *A. rubescens* CRUDA

Sin presencia de precipitación para ningún reactivo por lo que es una prueba negativa, sin presencia de alcaloides.



FIGURA 7: Prueba cualitativa de alcaloides perteneciente al extracto de *A. rubescens* COCIDA

Sin presencia de precipitación por lo que se considera prueba negativa, para la presencia de alcaloides.



FIGURA 8: Prueba cualitativa de alcaloides perteneciente al extracto de *A. caesarea* CRUDA

Prueba negativa, no se observa la precipitación con ninguno de los reactivos, por lo tanto no hay presencia de alcaloides, para esta muestra.



FIGURA 9: Prueba cualitativa de alcaloides perteneciente al extracto de *A. caesarea* COCIDA

Sin presencia de precipitación prueba negativa, por lo tanto no hay presencia de alcaloides.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para la prueba de Meixner de ambas especies del Estado de México, esta prueba al igual que la anterior es una prueba cualitativa. Para constatar la presencia de amanitinas, que causan una grave intoxicación, estas toxinas son producidas por algunas especies entre ellas ***A. phalloides***, la cual causa una afección hepática, náuseas, vómito, diarrea y en el peor de los casos insuficiencia hepáticas esto último son síntomas después de una recuperación aparente. Debido a que las personas buscan hongos comestibles por tradición, pueden correr el riesgo de encontrarse con *Amanitas* muy peligrosas

La TABLA 11 muestra los resultados obtenidos para la especie de ***A. rubescens***, en la cual se consideraron tres diferentes concentraciones de las muestras

TABLA 11: Resultado cualitativo de Amanitina para *A. rubescens* del Edo. de México

	CONCENTRACIÓN (mg/mL)	INTENSIDAD DE COLOR	PRUEBA MEIXNER
<i>A. rubescens</i> CRUDA	0.05	Color azul medio	POSITIVO
	0.1	Color azul fuerte	POSITIVO
	0.2	Color azul muy fuerte	POSITIVO
<i>A. rubescens</i> COCIDA	0.05	Color azul bajo	NEGATIVO
	0.1	Color azul bajo	NEGATIVO
	0.2	Color azul bajo	NEGATIVO

La TABLA 12 muestra los resultados obtenidos correspondiente a la especie de *A. caesarea*, en la cual para una comparación equitativa también se consideraron tres diferentes concentraciones de ambas muestras.

TABLA 12 Resultado cualitativo de Amanitina para *A. caesarea* del Edo. de México

	CONCENTRACIÓN (mg/mL)	INTENSIDAD DE COLOR	TEST MEIXNER
<i>A. caesarea</i>	0.05	Color azul medio	POSITIVO
Cruda	0.1	Color azul fuerte	POSITIVO
	0.2	Color azul muy fuerte	POSITIVO
<i>A.caesarea</i> Cocida	0.05	Sin color azul	NEGATIVO
	0.1	Sin color azul	NEGATIVO
	0.2	Sin color azul	NEGATIVO

El test ó prueba Meixner da la ventaja de determinar cualitativamente y en poco tiempo si el hongo contiene la toxina.

Los resultados que muestran las TABLAS 11 y 12, son los correspondientes a la prueba Meixner, y en ambas especies crudas dio como resultado positivo a la presencia de la toxina, pero en la muestras con tratamiento térmico resulto negativo, llegando a la conclusión que las amanitinas puedan ser termolábiles, y aunque están presentes en la muestra cruda al someterlos a un tratamiento con calor se puede inactivar a estos factores tóxicos.

Es importante que no exista el riesgo de la presencia de Amanitina en las muestras provenientes del Edo. de México, debido a que son de las especies que mayor auge y consumo tienen entre los pobladores de las áreas circundantes al Estado de México.

7.-CONCLUSIONES

- Los hongos frescos son alimentos perecederos por su alto contenido de agua como se observó en la muestra estudiadas (89 a 94% de humedad original)
- Es interesante que ambas especies de dos ambientes ecológicos diferentes, muestren alto contenido del extracto etéreo, lo cual, es una propiedad favorable ya que le da palatabilidad y hace de estas especies estar entre las predilectas para el consumo humano.
- Con respecto al estudio bromatológico en las harinas de los hongos muestran un alto contenido de proteínas tanto en la muestra proveniente del Edo. de México como en las del Chihuahua, además la digestibilidad de las proteínas se encuentra en niveles aceptables similares a las proteínas vegetales.
- La muestra del Edo. de México presenta mayor contenido de Fibra dietética total con respecto a las muestras del estado de Chihuahua, será interesante estudiar el contenido de los nutraceuticos que compone la fibra dietética de estas especies.
- Se encontró una disminución del contenido de inhibidores de tripsina en las muestras cocidas del Edo. de México con respecto a las muestras crudas, por ejemplo de **A. rubescens** cocida obtuvo un valor 8 UTI / mg, mientras que **A. caesarea** bajo a un valor de 2 UTI / mg ambas se encuentran dentro del límite permisible el cual es de < 10 UTI / mg, lo cual indica que no presentan un riesgo para la salud, con respecto a este agente antinutritivo.
- El contenido de lectinas fue bajo para todos los hongos tanto del Estado de México como de Chihuahua, con excepción de **A. rubescens** del Estado de México sin embargo en forma cocida, el hongo no representa un riesgo para este factor tóxico.
- Las amanitinas se inactivan después de un tratamiento térmico, sería interesante hacer un análisis cuantitativo del contenido de amanitinas en las muestras.

8.0 BIBLIOGRAFÍA

- 1 Barbado J.L. 2003. Hongos comestibles 1° edición, editorial Albatros, Buenos Aires, pág. 103-102
- 2 Guzmán, G. 1997. Los nombres de los hongos y lo relacionado con ellos en América Latina Introducción a la etnomicrobiota y micología aplicada de la región. Sinonimia vulgar y científica. CONABIO. Instituto de Ecología A. C. Ciudad de México, pág. 356
- 3 Talamoni. A. 2006, Cabrerizo Intoxicación por *Amanita phalloides*, diagnóstico y tratamiento, Buenos Aires, Editorial SACI, pág. 373-374
- 4 Guzmán, G. 1995. La diversidad de hongos en México. Revista Mexicana Ciencias, México, pág. 52-57
- 5 Guzmán G. 1999 , Contribución al conocimiento etnomicológico de los hongos comestibles silvestres de mercados regionales y comunidades de la Sierra Nevada, Estado de México. Revista de Micología. Caracas, pág. 328-230
- 6 Página Web: Informe Nacional Para La Conferencia Técnica Internacional de la FAO Sobre Los Recursos Filogenéticos
Disponible: www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/PGR/SoW1/americas/MEXICO.PDF. Consultada (13 abril 2012)
- 7 Pagina web: Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 2012.
Disponible: www.inegi.gob.mx. Consultada (12 abril 2012)
- 8 Vidal Z., 1976, Estudio geográfico del municipio de Ozumba y de la Villa de Ozumba de Alzate, Estado de México, UNAM/Instituto de Geografía, Cd. de México, pág. 39-65
- 9 Guzmán, G. 1979. Identificación de los hongos comestibles, venenosos, alucinantes y destructores de la madera. Ed. Limusa. Ciudad de México, pág. 452
- 10 Página Web: Referencias geográficas y extensión territorial de México. Explorando la Geografía de México. Disponible: www.inegi.org.mx. Consultada (19 de mayo del 2012)
- 11 Martínez, B. Rincón, F. 1997. Trypsin inhibitors, 2: Effects of processing and determination methods. Alimentaria, Vol. 279, 33-38.
- 12 Cameán, A. y Repetto, M. 2006. Toxicología alimentaria. Días Santos. Madrid, pág.193-245
- 13 Helrich, K., 1997 (Ed.) Official methods of analysis of the Association Official Analytical Chemists. Published of AOAC, 16th edition, Arlington. Vol. II, section 45.4.07 method 960,52.

- 14 Kakade, M., Rackis, J., Maghee, J. and Puski, G., 1974. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. *Cereal Chem.* pág. 376-382.
- 15 Escudero, Álvarez. 2006. Unidad de Dietética y Nutrición. Primera edición, La fibra dietética Nutrición y Hospital. Madrid. *Nutrición Clínica*, 2(21) 61-72
- 16 Gil, A. 2010. Tratado de nutrición, Tomo II; Composición y Calidad de los alimentos. 2a edición. Médica Panamericana. Madrid, pág. 156 - 158,
- 17 Shaidi, F. 1997. Antinutrients and phytochemicals in food. American Chemical Society, Washington, D.C. pág. 31-43.
- 18 Lucas, B. and Sotelo, A. 1993. A useful modification of the hemagglutination method for screening of lectins in legume seeds. 2th International Workshop on ANFs. In legume seeds. EAAP Publication No. 70. Wageningen, pág. 71-74.
- 19 Manríquez A. 2010 La digestibilidad como criterio de evaluación de alimentos -Su aplicación en peces y en la conservación del medio ambiente .Fundación Chile. Seminario Internacional Acuicultura y Medio Ambiente. Santiago. pág. 38-68
- 20 Lachmann, G. 2006. La estimación de la digestibilidad en ensayos con rumiantes Facultad de Ciencias Veterinarias. *Revista Científica*, pág.18-319
- 21 Jaffé, G. y Brucher, O. 2008. Toxicidad y especificidad de diferentes fitohemaglutininas de frijoles. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición (SLAN)*, Vol.1 851-853
- 22 Piqueras J. 1996. Intoxicaciones por plantas y Hongos. Editorial Días Santos Barcelona, pág. 205-292
- 23 Página Web: Toxicología de los alimentos 2000 Pedro valle, Bernardo Lucas Disponible en : <http://www.cepis.org.pe/eswww/fulltext/toxicolo/toxico.pdf> Consultada, (18 mayo 2012)
- 24 Rocandio, R. M. 2008. Diversidad morfológica y agronómica de poblaciones nativas de frijol común cultivadas en asociación con maíz. Tesis de Posgrado, Colegio de Postgraduados de Chapingo. Texcoco. pág. 1-20
- 25 García, F. D. 1998. Desarrollo de una metodología cuantitativa en la determinación de lectinas en frijoles y su correlación con su toxicidad subaguda. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, Cd de México, pág. 5-20.
- 26 Herman, S. 1986. Químicos Tóxicos en Alimentos avances en su Identificación, Previsión y desintoxicación, Editorial Universitaria, 1º Edición, Santiago de Chile, pág. 21-22

- 27 Abish, E. and Reichstein, T. 1960 Alkaloid-screening., (Micromethod).Journal of AOAC International. 86(6), 1844-1861
- 28 Página Web: Modelos Predictivos de la Producción de hongos Silvestres Comestibles en Bosques de Coníferas. Disponible en: revistascientificas.inafap.gob.mx/journal/index. Consultada: (18 mayo 2012)
- 29 Horwitz, W. and Latimer, G. (Editors), 2006. Official methods of analysis of the Association Official Analytical Chemists. Published of AOAC International, 18th edition, Gaithersburg. Chapter 4, pag. 1-2, 8, 3-36, 40-42, 44-47; Chapter 45, pag. 77-78
- 30 Martínez, Y. 2008. Determinación de macronutrientos, inulina e inhibidores de tripsina en 12 especies de hongos comestibles. Tesis de licenciatura, UNAM, Cd. de México, pag.45
- 31 Morales M. 2016. Análisis bromatológico y determinación de factores tóxicos naturales de los hongos silvestres Morochoke (*Amanita caesarea*) y Sojachi (*Amanita rubescens*) en forma natural y cocidos, consumidos en la sierra Tarahumara de Chihuahua Tesis de licenciatura, UNAM, Cd. de México, pag.62-70
- 32 Becker, G. 1989. El libro de las setas de Europa. Editorial Susaeta. Madrid, pág.78-130
- 33 Kakade, M., Rackis, J., Mcghee, J. and Puski, G. 1974. Determination of tripsin inhibitor activity of soy products. Cereal Chemistry, Vol. 2, 376- 382