



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

DETERMINACIÓN DE FACTORES TÓXICOS NATURALES EN
TRES HONGOS SILVESTRES COLECTADOS EN LA REGIÓN DE
LOS VOLCANES IZTA-POPO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

NÉSTOR DANIEL DOMÍNGUEZ GAMBOA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2018



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: M. EN C. BERNARDO LUCAS FLORENTINO
VOCAL: M. EN C. LUCÍA CORNEJO BARRERA
SECRETARIO: Q.F.B. JUAN DIEGO ORTIZ PALMA
1er. SUPLENTE: DRA. ILIANA ELVIRA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ
2° SUPLENTE: M. EN C. TANIA GÓMEZ SIERRA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

SE DESARROLLÓ EN EL ANEXO DE LOS LABORATORIOS 4B Y 4C DEL EDIFICIO A.
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, FACULTAD DE QUÍMICA,
UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

M. EN C. BERNARDO LUCAS FLORENTINO

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. EN C. EDELMIRA LINARES MAZARI

SUSTENTANTE:

NÉSTOR DANIEL DOMÍNGUEZ GAMBOA

Índice	Página
1.INTRODUCCION	1
2. OBJETIVOS	2
2.1 Objetivo general	2
2.2 Objetivos particulares	2
3. ANTECEDENTES	3
3.1 La Etnomicología en México.....	3
3.2 Diversidad de los hongos	3
3.3 Biología de los hongos	4
3.4 importancia biológica y función ecológica.....	4
3.5 Hongos silvestres comestibles	5
3.6 Género <i>Helvella</i>	6
3.7 Género <i>Ramaria</i>	7
3.8 Análisis proximal	8
3.8.1 Agua.....	8
3.8.2 Proteína.....	9
3.8.3 Lípidos.....	9
3.8.4 Hidratos de carbono	10
3.8.5 Fibra cruda	10
3.8.6 Cenizas	11
3.9 Digestibilidad <i>in vitro</i>	11
3.10 Densidad calórica.....	12
3.11 Factores tóxicos y antinutricionales	12
3.11.1 Inhibidores de tripsina	13
3.11.2 Lectinas o Fitohemaglutininas	14
3.11.3 Saponinas	15
3.11.4 Nitratos.....	16
3.11.5 Alcaloides.....	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS	18
4.1 Método	18
4.2 Obtención del material biológico.....	18
4.3 Acondicionamiento del material biológico	19
4.4 Análisis Bromatológico	19

4.4.1 Determinación de humedad en estufa al vacío	19
4.4.2 Determinación de Grasa cruda	21
4.4.3 Determinación de Fibra cruda	22
4.4.4 Determinación de proteína	24
4.4.5 Determinación de cenizas totales	27
4.4.6 Determinación de hidratos de carbono	28
4.5 Complementación bromatológica	28
4.5.1 Determinación de proteína verdadera	28
4.5.2 Digestibilidad <i>in vitro</i>	30
4.5.3 Densidad calórica	33
4.6 Determinación de factores tóxicos y antinutrimientales	35
4.6.1 Inhibidores de tripsina	35
4.6.2 Lectinas.....	39
4.6.3 Saponinas	41
4.6.4 Nitratos.....	46
4.6.5 Determinación semicuantitativa de Alcaloides	51
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
6. CONCLUSIONES	68
7. BIBLIOGRAFÍA	69
ANEXOS	77

1. INTRODUCCION

México es un país megadiverso, en virtud de que en su territorio se localiza un alto número de especies de plantas, animales, hongos y otros organismos, que forman parte del patrimonio natural del país. Aproximadamente en México existe más del 12% de la biota mundial. Esta alta diversidad se debe a las variaciones topográficas y climáticas del país, además de la confluencia de dos regiones biogeográficas, la Neártica y la Neotropical, lo que genera una gran variedad de nichos ecológicos. En el país se cuenta a nivel mundial con el 10 a 12% de plantas, el 10.64% de hongos, el 6.64% de algas y el 9.60% de vertebrados (Villareal, 1997).

Se estima que en el mundo existen alrededor de 1.5 millones de especies de hongos, de las cuales solo se han llegado a describir 4.5%. De este millón y medio de especies aproximadamente 200 mil se encuentran en México y solo se han llegado a describir 7 000 especies, lo que indica que se requiere un mayor esfuerzo en trabajos de investigación de este tipo de organismos. (Fernández, 2005)

En el México actual, el uso de los hongos es amplio, se utilizan como ceremoniales, insecticidas, lúdicos, medicinales, ornamentales, recreativos y comestibles. Los hongos comestibles son muy importantes para la alimentación humana en zonas rurales. Esto debido a que proporcionan una buena fuente de proteínas, hidratos de carbono, fibra así como minerales, vitaminas, algunos aportan cantidades considerables de calcio, fósforo, hierro, sodio y potasio y proveen un valor nutritivo comparable al de algunos alimentos ricos en proteínas y ricos en fibra. Estos hongos se consideran alimentos de alto valor nutrimental, además de ser muy accesibles económicamente a comparación de otros tipos de alimentos. (Guzmán- Dávalos, 1984)

Este trabajo tiene el fin de proporcionar información sobre tres especies de hongos: *Helvella elastica*, *Ramaria* spp y *Helvella lacunosa*, las cuales crecen en la región de los volcanes Izta-Popo y determinar su potencial como alimento así como evaluar su posible toxicidad con ciertos metabolitos intrínsecos en los hongos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Determinar el análisis químico proximal, así como el contenido de proteína y su disponibilidad, también determinar algunos factores tóxicos presentes en tres variedades de hongos (*Helvella elastica*, *Helvella lacunosa* y *Ramaria* spp) procedentes de la región de los volcanes izta-popo con la finalidad de evaluar su potencial nutritivo y relativa inocuidad.

2.2 Objetivos particulares

- Determinar el contenido de proteína cruda y proteína verdadera de *Helvella elastica*, *Helvella lacunosa* y *Ramaria* spp.
- Determinar la digestibilidad proteínica *in vitro*, así como el contenido calórico de las tres variedades de hongos.
- Determinar el contenido de los siguientes factores tóxicos: Inhibidores de tripsina, lectinas, saponinas, nitratos y alcaloides, a las tres variedades de hongos.
- Realizar el análisis estadístico de los diferentes parámetros, para conocer si hay diferencia significativa entre las tres variedades de hongos.

3. ANTECEDENTES

3.1 La Etnomicología en México

La etnomicología, es un área de la etnobiología que estudia las interacciones del hombre con los hongos, haciendo referencia a la influencia que estos organismos han tenido en las expresiones culturales del hombre a través de tiempo y en diferentes regiones. (Estrada-Torres, 1994)

La investigación etnomicológica en México comenzó formalmente en la década de los cincuenta con los trabajos realizados por Heim (1956), Wasson y Wasson (1957) y Heim y Wasson (1958), en los cuales cobra un auge inusitado el conocimiento que los hongos en ciertos grupos indígenas de México, principalmente los hongos psicotrópicos empleados en ceremonias y rituales mágico-religiosos que son de suma importancia (Ruán, 2005).

En los últimos años, la Etnomicología en México ha tenido un gran impulso en el campo científico, debido en parte a que se trata de un país pluricultural, en el cual conviven muchos grupos étnicos que conservan una gran tradición (Gómez-pompa, 1982) y al vasto tesoro Etnomicológico del país (Palomino-Naranjo, 1990), actualmente se realizan investigaciones de carácter diverso: generales, analíticos, históricos, de manejo y metodológicos (Moreno-Fuentes *et al.*, 2001).

En México se han realizado estudios Etnomicológicos con diversos grupos étnicos como son los Chinantecos, Chontales, Chóles, Mayas, Matlatzincas, Mazahuas, Mazatecos, Mixtecos, Nahuas, Otomíes, Purépechas, Rarámuris, Tepehuanes, Totonacos, Wirrárika, Zapotecos, Zoques y varios grupos mestizos en los estados de Chihuahua, Distrito Federal, Durango, Estado de México, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Tabasco, Tlaxcala, Veracruz y Yucatán, entre otros (Garibay-Orijel *et al.*, 2006; Montoya-Estrada *et al.*, 2003; Moreno , 2002; Ruan *et al.*, 2004).

3.2 Diversidad de los hongos

Los hongos son un grupo de eucariotes heterótrofos, los cuales están ampliamente distribuidos en todos los ecosistemas, soportando algunas especies temperaturas extremas, presiones atmosféricas elevadas o muy bajas, en diferentes condiciones de salinidad y pH (Zhdanova *et al.* 2000). En cuanto a la estimación de la diversidad de hongos en el planeta, los estudios que se han realizado desde 1991 a la fecha se basan en parámetros que revelan cifras muy variables, que van desde 500 000 hasta 9.9

millones de especies (Hawksworth, 1991, 2001). Otros autores indican que existen por lo menos 700 000 especies de hongos en el mundo, de las cuales más del 80% son hongos microscópicos. Para el caso sólo de macrohongos a nivel mundial, se han descrito 21 679 especies, y se estima que debe haber entre 53 000 y 110 000 especies (Schmit y Müller, 2007).

En lo que se refiere al conocimiento de la diversidad de hongos en México, se estima que se conocen 4 500 especies de macrohongos y 2 000 de microhongos, esto representa el 6.6% de lo que se conoce en el mundo (Kirk *et al.* 2008). Se calcula que en México habría más de 200 000 especies de hongos, por lo que sólo se conoce el 3.2% de las que crecen en el país (Guzmán, 1998).

3.3 Biología de los hongos

Los hongos son organismos que constituyen uno de los cinco reinos de la naturaleza, el cual es denominado el Reino Fungi (Mendoza, 2004). Se definen como organismos heterotróficos y eucarióticos, la mayoría de ellos, están formados por células alargadas y filamentosas llamadas hifas, que cuando se agrupan forman micelios, los cuales realizan funciones de respiración, nutrición y crecimiento (Lorenzana, 2008). Las hifas son ramificadas y en la mayoría de los casos están constituidas por paredes celulares que contienen quitina y/o celulosa. Las hifas pueden formar un órgano reproductor, esporangio o gametangio. Por lo general se reproducen de manera asexual y sexual (por esporas) (Alexopoulos y Mims, 1985; Herrera y Ulloa, 1998).

La reproducción asexual es la más importante para la propagación de la especie, debido a que permite la producción de numerosos individuos, y sobre todo, porque el ciclo asexual se repite varias veces al año, mientras que la fase sexual de muchos hongos se produce solo una vez al año o una vez cada cinco o diez años (Lodge *et al.*, 2004).

3.4 importancia biológica y función ecológica

Los hongos son el segundo grupo más diverso de individuos, después de los insectos. Esto debido a que desempeñan funciones de suma importancia relacionadas con el reciclaje de materia orgánica en los ecosistemas (Trappe y Luoma, 1992). Ecológicamente destacan por los múltiples roles que juegan en los ambientes naturales, lo cual está íntimamente relacionado con su tipo de nutrición. La absorción de nutrientes la realizan a través de la membrana y depende íntimamente del sustrato donde se

desarrollen, siendo capaces de desdoblar materiales orgánicos tan complejos como la celulosa, hemicelulosa y lignina, componentes más importantes de la hojarasca, constituyendo de 50 a 80 % de la materia seca (Valenzuela *et al.*, 2001).

Los hongos macroscópicos viven en diversos sustratos, pues mientras unos aprovechan elementos del suelo para su desarrollo (los terrícolas), otros se establecen sobre la madera (los lignícolas), la materia orgánica en proceso de descomposición (los humícolas), el excremento de algunos animales (los coprófilos), y algunos más se desarrollan sobre plantas, animales u otros hongos que aún están vivos (los biotrofos, endófitos y parásitos) (Delgado *et al.*, 2005).

Con base en sus características tróficas, los hongos se clasifican en tres niveles tróficos: saprobios, simbioses y parásitos (Marmolejo, 2000). Estas interacciones, han sido de gran interés por el impacto que tienen en los ecosistemas. Una de las más extendidas es aquella formada por algunos hongos con las plantas, denominada micorriza, que es una interacción ecológica mutualista donde las plantas se benefician al obtener minerales y elementos del suelo, mientras que el hongo recibe a cambio hidratos de carbono y algunas vitaminas que éste es incapaz de sintetizar por sí mismo; así también les proporciona protección física contra patógenos y el frío (Sánchez, 2005).

3.5 Hongos silvestres comestibles

Los hongos silvestres comestibles son organismos muy comunes en la naturaleza, pueden vivir prácticamente en todos los medios. Algunos viven de la materia orgánica ya sea viva o muerta, la cual degradan para alimentarse de ella. (Guzmán *et al.*, 2002)

Los hongos silvestres comestibles cuentan con propiedades nutrimentales singulares y éstas varían debido a factores como la especie, el desarrollo de esporoma, la región del mundo donde éstos crecen, época del año, tipo de suelo, entre otros, e inclusive el método analítico utilizado para calcular su valor nutrimental.

Constituyen una fuente formidable de alimento, debido principalmente a su contenido proteínico, así como a la presencia de vitaminas B y D, y de quitina como una importante fuente de fibra; son además bajos en grasa y carecen totalmente de colesterol. Se podría señalar que el contenido proteínico de los hongos silvestres comestibles se encuentra entre 10 y 40% en peso seco, habiendo casos excepcionales por debajo del límite inferior (Martínez, 2010).

En general los hongos silvestres comestibles poseen un buen contenido de proteínas y minerales en peso seco, uno bajo en grasas, un contenido de aminoácidos esenciales y minerales importantes, además que son ricos en fibra y favorecen la digestión (Boa, 2005).

3.6 Género *Helvella*

El género *Helvella* es un grupo de aproximadamente 40 especies en el mundo perteneciente a la familia Helvellaceae. Se encuentra ubicado dentro del Phylum Ascomicota (Kirk *et al.*, 2001). Se define como uno de los grupos más grandes y diversos dentro del reino Fungi, caracterizándose por presentar meiosis después de la formación de un cigoto de vida corta para producir esporas dentro de meiosporangios llamados ascas. Su compatibilidad sexual es de tipo bipolar y presentan una pared celular de dos capas (Barr, 2001).

Algunas especies de *Helvella* presentan un compuesto llamado giromitrina, que al entrar en contacto con el agua se hidroliza formando monometilhidrazina (MMH), altamente tóxica para el ser humano (Lincoff y Mitchel, 1977). Sin embargo, también se presentan especies comestibles que rara vez son causa de intoxicación, pues ninguna se consume cruda y generalmente la MMH es desechada con el agua de cocción. Aun así se debe estar seguro de su determinación debido a que la distribución de la toxina aún no ha sido bien establecida (Hansen y Knudsen, 2000).

El conocimiento del género en México se basa principalmente en listados de especies para alguna región particular en los que se incluyen otros grupos de Ascomicetos, varios grupos de Basidiomicetos, Líquenes e incluso Mixomicetos. Se han reportado un total de 23 especies desde sus primeros registros (García-Romero *et al.*, 1970).

La distribución de *Helvella* corresponde a bosques templados fríos, principalmente Bosques de *pinus* spp., *Quercus* spp., *Abies* spp. Y bosques mixtos incluyendo el bosque mesófilo de montaña para diversos estados del país. El periodo de fructificación ocurre entre agosto y octubre a una altitud de 210 a 3500 msnm, con hábito de gregario a solitario en función de la especie, creciendo comúnmente sobre tierra o humus y en ocasiones sobre madera (Guzmán- Dávalos, 1984).

Las especies comestibles más comunes son *Helvella lacunosa* y *Helvella crispa* que se encuentran normalmente en mercados, aunque también se ha reportado a *H. elastica*, *H.*

macropus y *H. acetabulum*. Además este género incluye especies ectomicorrízicas, principalmente *H. lacunosa*, *H. crispa* y *H. macropus* (Quintos *et al.* 1984).

3.7 Género *Ramaria*

Por su morfología externa, el género *Ramaria*, tradicionalmente se ha considerado como perteneciente a los hongos clavaroides (Petersen, 1968). Aunque el epíteto del género *Ramaria* fue introducido por Holmskjöld en 1790, no se reconoció debido a que de manera equivocada designó a un ejemplar de *Clavulina* como la especie tipo, nombrándola como *R. coralloides* la cual evidentemente presentaban esporas blancas, mientras que las especies que conforman a *Ramaria* las tiene ocráceas. No obstante, consideró el hábito ramificado como una de las características más significativas para conjuntar a los miembros de este grupo (Marr y Stunz, 1973).

El género *Ramaria* cuenta con una amplia diversidad de especies que se desarrollan principalmente en bosques templados, subtropicales o en selvas tropicales. A nivel mundial hasta ahora se han descrito 221 especies, sin embargo, se ha estimado que pueden existir no menos de 300 especies (Kirk *et al.*, 2008). En el caso de México, su conocimiento es bastante restringido donde uno de los primeros registros fue realizado por Nieto-Roaro en 1934, quien citó a *Ramaria flava* y *Ramaria formosa* (Estrada-Torres 1994).

Algunas especies como *R. botrytis* y *R. rubripermanens* del subgénero *Ramaria*, tienen gran importancia en México, ya que en varias zonas se consumen como alimento siendo nombradas como “escobetas rojas, rositas y moraditas” “manitas” y “pata de gallo”. Entre otras especies encontradas y comercializada en el Estado de México encontramos especies como *Ramaria aurea*, *R. fennica*, *R. holorubella*, *R. pallida*, *R. rasilispora*, *R. rubiginosa*, *R. sanguinea*, *R. stricta*, por mencionar algunas (Gómez *et al.*, 2005,).

No se ha reportado hasta ahora alguna especie mortal que pertenezca a este género, sin embargo, se ha reportado algunos casos, en los cuales la ingestión de este tipo de hongos (ejemplo *R. formosa*) sobre todo los de sabor amargo pueden provocar una irritación en estómago, causando diarrea y dolor. Cabe mencionar que muchas veces la intensidad de síntomas dependen de la susceptibilidad de la persona (Villegas, 1987).

3.8 Análisis proximal

El análisis proximal es un análisis químico que determina la composición de un alimento en términos de sus principales grupos y nutrimentos, sin especificarlos en forma individual. Comprende humedad, cenizas, grasa cruda o extracto etéreo, fibra cruda y por diferencia a 100, el extracto libre de nitrógeno (Badui, 1996).

El análisis proximal es un sistema que combina procedimientos desarrollados en Alemania hace más de un siglo y es el esquema más utilizado para describir a los alimentos. Su estandarización fue llevada a cabo en los Estados Unidos por la Association Official Analytical Chemists (AOAC); y desde entonces solo ha sufrido ligeros cambios (Morfin, 1991).

Este análisis consta de las siguientes determinaciones:

- Determinación de humedad.
- Determinación de extracto etéreo (grasa cruda).
- Determinación de proteína cruda.
- Determinación de fibra cruda.
- Determinación de cenizas.
- Determinación de extracto libre de nitrógeno (Hidratos de carbono).

El conjunto de estas determinaciones se denomina "A.Q.P."(Sánchez, 2002).

3.8.1 Agua

El contenido de agua en los alimentos varía en función del tipo de alimento. Por ejemplo, en el caso de frutas y verduras se reportan porcentajes que van desde el 85 al 90%, mientras que para el caso de legumbres secas entre el 8 y 15%.

El agua desempeña funciones estructurales que afectan la textura de las células animales y vegetales. Además influye en la estabilidad de los alimentos, ya que es necesaria para que se lleven a cabo ciertas reacciones químicas y bioquímicas. El agua en los alimentos puede encontrarse en forma de agua libre o disponible, está es la forma más predominante y se pierde con gran facilidad, este tipo de agua se estima en la mayoría de los métodos para determinación de humedad. También existe el agua ligada, que se encuentra como agua de cristalización o ligada a las proteínas y a las moléculas de disacáridos (Hernández y Sastre, 1999).

La mayoría de las funciones biológicas del agua está relacionadas con su propiedad de actuar como disolventes de numerosos compuestos. Participa en la digestión (hidrolisis de proteínas, grasa e hidratos de carbono), la absorción de nutrimentos digeridos, el transporte de metabolitos en el organismo, regula la temperatura corporal, la excreción de los productos de desecho así como medio donde se llevan a cabo las reacciones metabólicas de un organismo. De allí la importancia de determinar la cantidad de agua que se consume (Aron, 1998).

3.8.2 Proteína

Las proteínas son moléculas muy complejas, en cuya composición elemental se encuentra siempre presentes carbono, hidrogeno, oxígeno y nitrógeno. La mayoría de ellas también incluye en su composición al azufre y en algunas se observa además presencia de fósforo, hierro, zinc, molibdeno, u otros elementos (Peña, Arroyo, Gómez, Gómez y Tapia, 2004).

Las proteínas son las macromoléculas que están presentes en todos los tejidos del organismo. Algunas de las funciones que cumplen las proteínas es que son constituyentes principales de las células que forman los tejidos y los órganos. También cumplen funciones especiales en la regulación de procesos biológicos y también son una fuente de energía (García, 1983).

Al hablar del aprovechamiento nutritivo de las proteínas, se deben distinguir tres aspectos: cantidad, calidad y digestibilidad, debido a que consumir grandes cantidades de proteína no implica que satisfagan las necesidades de aminoácidos del individuo. La calidad de éstas, se define de acuerdo al contenido de aminoácidos indispensables, que son utilizados para el crecimiento y mantenimiento del organismo; la digestibilidad, se considera una medida de la capacidad con la que el organismo metaboliza y aprovecha los nutrimentos, es decir la disponibilidad fisiológica (Feldman, 1988).

3.8.3 Lípidos

Las grasas son un importante combustible contenido en los alimentos debido al alto aporte calórico que suministran y representa una reserva importante de energía. Son considerados como ésteres de ácidos grasos y glicerol. Entre las funciones más importantes de las grasas son el mantenimiento de la temperatura corporal, reserva energética y vehículo de vitaminas liposolubles.

Los ácidos grasos pueden ser sintetizados en el organismo mediante vías metabólicas específicas, sin embargo existen ácidos grasos de importancia nutricional, ya que son indispensables, es decir necesaria su ingesta, debido a que el organismo no los produce; tal es el caso del ácido linoleico, linolénico y araquidónico, los cuales son necesarios para realizar funciones específicas (Lopez, 2000)

3.8.4 Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono, son los nutrimentos más abundantes que se encuentran en la naturaleza y por lo tanto los más consumidos. Son compuestos de carbono, hidrogeno y oxígeno, químicamente son polihidroxicetonas, polihidroxialdehidos y sus derivados, comúnmente son de origen vegetal como: glucosa, sacarosa al igual que los polisacáridos almidón y celulosa (Brownsell *et al.*, 1993).

Por cada gramo de hidratos de carbono se obtienen 4 kcal. Es una fuente de energía rápida para el organismo de tal forma que son necesarios para llevar a cabo funciones biológicas, los músculos e hígado pueden ocuparla para satisfacer demandas energéticas.

El almidón en los vegetales y el glucógeno en los animales son hidratos de carbono de almacenamiento que pueden ser utilizados rápidamente para formar glucosa, que es el combustible primario para liberar energía y llevar a cabo las funciones celulares (Mendoza y Calvo, 2010).

3.8.5 Fibra cruda

Con el nombre de fibra cruda se agrupa una mezcla heterogénea de componentes de origen vegetal resistentes a las enzimas del tracto gastrointestinal del hombre, es un residuo orgánico insoluble constituido principalmente por celulosa, pectina, lignina, hemicelulosa, gomas y mucílagos.

La celulosa es el hidrato de carbono más abundante en la naturaleza y es uno de los componentes estructurales de las células vegetales, representando un 20 a 40% de la materia seca de las plantas verdes. La unión de las moléculas de glucosa, mediante un enlace β -glucósido hace a la celulosa especialmente insoluble y resistente a la degradación por enzimas digestivas (López, 2003).

La fibra cruda se encuentra en verduras, cereales, leguminosas y en frutas, es responsable de la motilidad gastrointestinal con la reducción del tiempo de tránsito de los alimentos (Hart y Johnstone, 1984).

3.8.6 Cenizas

Las cenizas, proporcionan un porcentaje aproximado de la cantidad de minerales presentes en la muestra, provienen de las sales minerales que incluyen todos los compuestos inorgánicos fijos de la muestra, son el residuo que queda al incinerarlas. La incineración de la muestra destruye la materia orgánica cambiando su naturaleza, las sales metálicas se convierten en óxidos o carbonatos y reaccionan durante la incineración para formar fosfatos, sulfatos o haluros. Entre los minerales presentes se encuentran el hierro, cobre, magnesio, sodio, calcio, fósforo, azufre y zinc (Aragon y Villa, 1994).

3.9 Digestibilidad *in vitro*

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. Constituye un indicador de la calidad de la materia prima que a veces varía notablemente, de una especie a otra; así como antes y después de someterlo a tratamientos tecnológicos como el procesamiento térmico (Manríquez y Romero, 1993).

La digestibilidad proteínica es uno de los parámetros utilizados para medir el valor nutricional, debido a que no basta que la proteína se encuentre en altos porcentajes en el alimento sino que debe ser digerible para que pueda ser asimilado y, por consecuencia, aprovechado por el organismo que lo ingiere. Por lo tanto, la digestibilidad constituye una excelente medida de calidad y ello ha suscitado la idea de medirla de diferentes formas. Una de ellas es de forma *in vitro* simulando las condiciones y reacciones fisiológicas que se llevan a cabo dentro del organismo al someter a las proteínas a una digestión artificial mediante el uso de enzimas proteolíticas; sin embargo uno de sus inconvenientes es que los resultados pueden ser inexactos pero son reproducibles. (Manríquez y Romero, 1993).

Las proteínas de origen animal son más digeribles (95 a 100%) que las de origen vegetal (60 a 85%). Un decremento en la digestibilidad de las proteínas puede ser debido a su contenido de fibra, que actúa como una barrera física para la difusión enzimática, además hace que el paso por el intestino sea más rápido, por lo que disminuye el tiempo de absorción. La digestibilidad proteínica también puede afectarse por factores tóxicos, los

cuales disminuyen la absorción de la mucosa intestinal, así como factores antinutricionales que disminuyen la acción de las enzimas digestivas (Rodríguez, 2010).

Algunos procesos pueden mejorar la digestibilidad, uno de ellos es el tratamiento térmico, el cual debido a la desnaturalización de las proteínas nativas y hacerlas más susceptibles a la acción de las enzimas digestivas; sin embargo, se puede revertir este efecto con un sobrecalentamiento, ya que se puede modificar la solubilidad de las proteínas y hacerlas poco digeribles. Otro tratamiento es mediante un remojo, ya que el ácido fítico, los inhibidores de tripsina y los taninos pueden lixiviarse en el agua de remojo y la reducción de éstos se incrementa, aumentando la digestibilidad (Kataria, *et al*, 1992; Swaisgood, 1991).

3.10 Densidad calórica

La estimación del contenido calórico en los alimentos o dietas es indispensable para estudios de metabolismo y balance de energía; así como en la propuesta de dietas en problemas de obesidad y malnutrición. Los nutrimentos se requieren en primera instancia para aportar la energía necesaria en el mantenimiento normal de las funciones vitales y suministrar de energía para la actividad física diaria (Browman y Russell, 2003).

La densidad calórica es la cantidad de calor liberado cuando se quema en forma completa la masa de una sustancia a presión y temperatura constantes, ésta proporciona una medida de energía química contenida en el alimento. Una forma práctica de obtener el contenido energético o densidad calórica de un alimento es utilizando el método directo con una bomba calorimétrica; sin embargo, hay que tomar en cuenta que este dispositivo determina la energía liberada por la oxidación completa del alimento, mientras que el cuerpo humano realiza la oxidación incompleta. Por lo tanto, se puede asumir que la energía determinada en la bomba calorimétrica, da el máximo potencial energético de un alimento (calor de combustión), que por convención se conoce como “Energía Gruesa (EG) o bruta” (Browman y Russell, 2003; Laidler y Meiser; 1997).

3.11 Factores tóxicos y antinutricionales

La mayoría de los alimentos habituales en la dieta, además de nutrimentos, contienen proporciones variables de sustancias sin valor nutritivo o incluso peligrosas para el organismo, a estas se les denominan factores tóxicos (Derache, 1990).

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

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

Agente tóxico: cualquier sustancia xenobiótica que es capaz de producir una anomalía fisiológica y/o anatómica a corto plazo (toxicidad aguda o subaguda), la cual no puede ser atenuada por una simple fortificación o suplementación del alimento que lo contiene.

Agente antinutricional: sustancia presente en el alimento, que tiene la capacidad de reaccionar o interferir con un nutriente, disminuyendo su biodisponibilidad y a largo plazo (toxicidad crónica) es capaz de producir una anomalía fisiológica y/o anatómica, que en la mayoría de los casos es irreversible. Sin embargo, el propio nutriente puede actuar como antagonista; por lo cual, una fortificación de éste, en la etapa inicial del efecto dañino, puede atenuar o eliminar el problema (Valle, 2000).

3.11.1 Inhibidores de tripsina

Los inhibidores de proteasa son sustancias antinutrientales de naturaleza proteínica presentes en la mayoría de las leguminosas y cereales. Se caracteriza por inhibir la actividad de las proteasas, enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos de las proteínas y péptidos permitiendo su asimilación, en este caso, específicamente de la tripsina. Dicha enzima es de suma importancia en la digestión de los humanos y animales monogástricos. Debido a la formación de un complejo enzima-inhibidor, el páncreas se ve estimulado a secretar en exceso enzimas proteolíticas debido a la falta de estas enzimas libres, lo que agranda e incrementa la demanda de la enzima por el órgano (Derache, 1990; Martínez, 1997).

Los inhibidores más conocidos son los de Kunitz y Browman-Birk en la soya. El primero es una proteína celular, no helicoidal, con 197 aminoácidos, con un peso molecular de 21 KDa con dos enlaces disulfuro, de los cuales uno de ellos es fundamental para su actividad. El segundo consta de 72 aminoácidos, con un peso molecular de 7.9 KDa, este

contiene 8 enlaces disulfuro, se asocia reversiblemente y forma una mezcla de monómero-dímero siendo más estable al calor, a los ácidos y a la pepsina que el primero. Ambos inhiben el crecimiento, reducen la absorción de lípidos, la digestibilidad de proteínas, causan hipertrofia pancreática, aumentando la secreción de bilis y jugo pancreático (Liener, 1975).

El calentamiento de leguminosas puede mejorar el valor nutritivo y producir un suplemento proteínico de mayor calidad, no obstante en algunas legumbres puede detectarse actividad inhibitoria de la tripsina después de haberlas calentado. Con esto se recomienda buscar un equilibrio de tiempo y temperatura con el fin de que no se dañen las sustancias nutrimentales sensibles al calor (Robinson, 1991).

Kakade ha propuesto un método en el cual ha fijado un límite máximo permisible, de acuerdo a la actividad que presentan los inhibidores. Cuando la concentración de inhibidores de tripsina sobrepasa las 10 UTI/mg (unidades de tripsina inhibida), se considera al alimento no apto para alimentación humana, ya que no permite la adecuada biodisponibilidad de la proteína dietética (Martínez, 1997).

3.11.2 Lectinas o Fitohemaglutininas

Las lectinas son un grupo importante de proteínas y glicoproteínas que tienen la propiedad de ligar ciertos hidratos de carbono. Cuando estos hidratos de carbono forman parte de las paredes celulares las lectinas causan aglutinación de las células que las contienen. Cuando las lectinas se unen a los hidratos de carbono de las células epiteliales intestinales provocan una disminución de la absorción de nutrientes del tracto digestivo (Takayuki y Leonard, 1996). Las hemaglutininas han sido encontradas en una amplia variedad de alimentos. Sin embargo, la primera que se reconoció, fue la ricina de la semilla de ricino (*Ricinus cummunis*) la cual adicionalmente es de las proteínas más tóxicas, con un DL₅₀ de 0.05 mg/kg en ratón por vía intraperitoneal (Valle, 2000).

Jaffé encontró que la causa del efecto tóxico de las lectinas ingeridas se relaciona con su acción sobre la absorción intestinal, la lectina interacciona con grupos receptores situados en las superficies de las células que conforman la mucosa gástrica, interfiriendo en la absorción de nutrimentos. Se ha observado que cuando los animales en experimentación consumen una dieta preparada con semillas de leguminosa con elevado contenido de lectinas tóxicas presentan diarrea, daño hepático, absorción reducida de aminoácidos,

hipoglucemia, pérdida de peso y si la ingesta continua se presenta un daño severo al tracto gastrointestinal que puede producir la muerte del animal, por lo cual actualmente se consideran enterotoxinas (Jeffé, 1968; Liener, 1975).

Dada la naturaleza proteínica de las lectinas, pueden ser destruidas mediante el calor con métodos tradicionales de cocción. Comúnmente altas temperaturas pueden destruir efectivamente la actividad hemaglutinante presente en los alimentos (Thompson, 1983).

3.11.3 Saponinas

Las saponinas son glucósidos anfifílicos, en los cuales la parte polar la constituyen los azúcares (pentosas, hexosas o ácidos urónicos), que se encuentran enlazados a un grupo no polar llamado aglicona o sapogenina, el cual puede ser un esteroide o un triterpeno, siendo triterpenoides la mayoría de saponinas que han sido identificadas. Las saponinas se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal, principalmente en hojas, raíces, tallos y flores (López, 2000).

Las saponinas son sustancias en su mayor parte amorfas, de sabor amargo, por lo general inodoras; sus soluciones coloidales al producir espuma disminuyen la tensión superficial y forman complejos con las proteínas y con los lípidos, por ejemplo, el colesterol. Debido sobre todo a su reacción con los lípidos, la membrana de los eritrocitos se hace permeable permitiendo la salida del pigmento sanguíneo (Lindner, 1995; López, 2000).

Las saponinas crean lesiones gastrointestinales y producen hemólisis en diferentes tipos de glóbulos rojos. La hemólisis se define como la destrucción de los glóbulos rojos, que producen liberación de hemoglobina, el punto de ataque en la hemólisis es el colesterol de la membrana de los eritrocitos, al unirse la saponina al colesterol se da lugar a la formación de canales en la membrana y/o una posible desnaturalización (Giron, 1992).

Las saponinas se emplean también como aditivos para alimentos y bebidas, como correctores de sabor, agentes espumantes en cervezas y otras bebidas. En la actualidad se han realizado un incremento en el conocimiento de estas sustancias, ya que aparte de manifestar efectos tóxicos, también se le ha asignado cualidades tecnológicas y medicinales (Elizalde *et al.*, 2009).

3.11.4 Nitratos

Una gran variedad de plantas almacenan nitratos en sus tallos y hojas; especialmente cuando han sido abonadas con estas sales. Los nitratos se encuentran presentes en los alimentos de origen vegetal como componentes inherentes a las plantas, en el aire que se respira y como contaminantes en el agua potable debido al uso de fertilizantes nitrogenados. Los nitratos contenidos en la planta por lo general no son muy tóxicos; su toxicidad radica en la reducción de nitratos (NO_3^-) a nitritos (NO_2^-) (Hidalgo, 1999; Lindner, 1995).

Solo en dos condiciones se puede tener una toxicidad por nitratos: en primer lugar por una ingestión masiva de estos compuestos y en segundo lugar si los mismos se transforman a nitritos por la microflora digestiva. El ion nitrito en contraste con el ion nitrato, es inestable, por lo tanto es muy reactivo y está dotado de numerosos efectos tóxicos. El paso del ion NO_3^- al ion NO_2^- no es posible de forma espontánea ya que se trata de una reducción que necesita energía; en los medios biológicos esta reducción solo puede efectuarse bajo la acción de una enzima, la nitrato reductasa, presente en plantas y bacterias, pero ausente en los tejidos animales (Derache, 1990; Roberts, 1981).

Los nitratos por sí no son cancerígenos, pero actúan como pro-cancerígenos, lo cual quiere decir que reaccionan con otras sustancias para formar compuestos que sí lo son, a través de un proceso de numerosas etapas. La primera etapa de este proceso es la reducción del nitrato a nitrito después de la ingestión. En segundo lugar el nitrito reacciona con compuestos orgánicos conocidos como aminas secundarias o amidas, presentes en los alimentos, para formar nuevas entidades químicas conocidas como nitrosaminas o bien nitrosamidas, muchas de las cuales son cancerígenas. Dentro del organismo esta síntesis es llevada a cabo en el estómago ya que se reúnen las condiciones necesarias como pH ácido, nitrito libre, aminas secundarias básicas provenientes de los alimentos o medicamentos (Hidalgo, 1999).

Se ha demostrado que el lavado y la cocción de los vegetales reduce considerablemente la concentración de éstos, ya que son solubles en agua (Corré y Breimer, 1979; Bryan *et al* 2012).

En 1974 la OMS en cooperación con la FAO, establecieron la Dosis Diaria Admisible (DDA de nitrato de 3.65 mg/kg de peso corporal/día (Derache, 1990).

3.11.5 Alcaloides

Los alcaloides son un grupo importante de compuestos orgánicos complejos que tienen mínimo un nitrógeno heterocíclico que le da el carácter básico y son biológicamente activos, sintetizados en su mayoría por plantas para protegerse de los insectos y otros animales. La mayoría de los alcaloides son sustancias cristalinas bien definidas por unión de ácidos, forman sales. En las plantas pueden existir libres, en estado de sales o como N-óxidos. Además de los elementos carbono, hidrógeno y nitrógeno, la mayoría tiene oxígeno (Wade, 2004).

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

Algunos alcaloides centran su radio de acción en alguna parte concreta del cuerpo, aunque muchos de ellos pueden actuar en distintos frentes a la misma vez, entre las partes más afectadas están el sistema nervioso central, en el cual pueden ejercer una función estimulante como lo hace la cafeína, la teobromina o la estricnina. El sistema digestivo también puede afectarse ya que produce irritaciones violentas de todas las mucosas gástricas con manifestaciones tan típicas como diarrea, vómitos, etc. El sistema circulatorio también se ve afectado, ya que puede bajar la presión sanguínea y también los alcaloides pueden tener efectos psicotrópicos, ya que afectan a la mente, alterando la percepción entre los que se mencionan: alucinógenos, narcóticos y estimulantes (Anette y Ferraz, 1999).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Método

A continuación se presenta la figura 1, en la cual se observa el diagrama de trabajo analítico que ilustra el desarrollo del trabajo experimental.

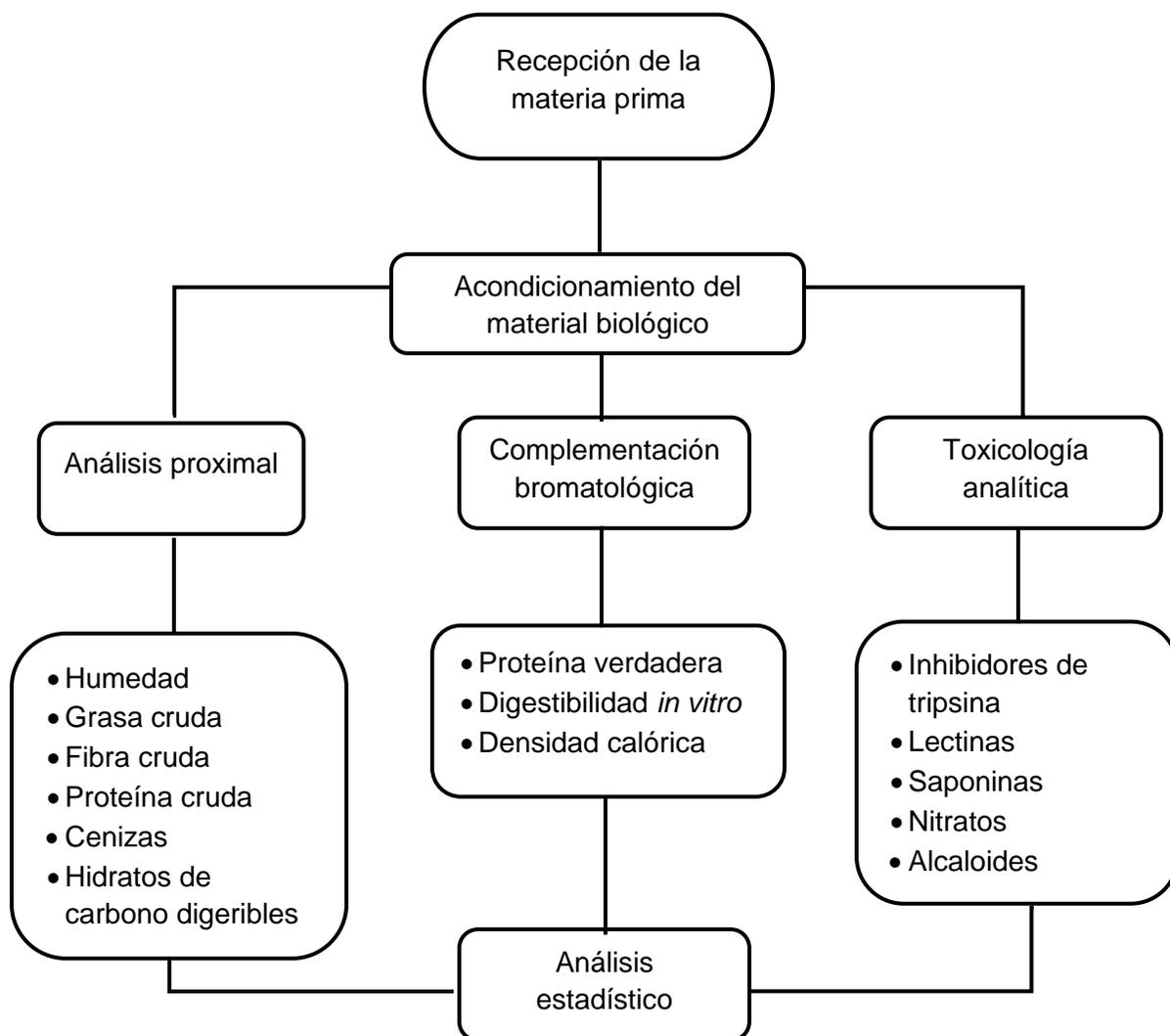


Figura 1. Diagrama de trabajo experimental

4.2 Obtención del material biológico

El material biológico fue proporcionado por la M. en C. María Edelmira Linares Mazari, del Instituto de Biología, UNAM. Las muestras eran procedentes de la región de los volcanes Izta-Popo, ubicados en el estado de México. Las muestras recibidas eran tres hongos originarios de esta zona.

Tabla 1. Muestras recibidas

Hongos silvestres comestibles	
Nombre científico	Nombre común
<i>Ramaria</i> spp	Escobetas
<i>Helvella lacunosa</i>	Gachupines negros
<i>Helvella elastica</i>	Cerillitos

4.3 Acondicionamiento del material biológico

Al material fresco se le dio un tratamiento de deshidratación a una temperatura de 55 °C dentro de una estufa de circulación forzada, este tratamiento se efectuó hasta obtener un peso constante en una balanza granataria (± 0.1 g).

El material biológico deshidratado se molió en un molino de cuchillas de acero inoxidable Thomas Wiley, a un tamaño de partícula de 1 mm, la harina obtenida, se sometió nuevamente a un proceso de molienda, esta vez utilizando un molino Cyclotec, esto con el objetivo de obtener un tamaño de partícula de 0.5 mm. Las harinas obtenidas se homogeneizaron y se guardaron en frascos secos y cerrados a temperatura ambiente.

4.4 Análisis Bromatológico

Se determinó el análisis bromatológico bajo el esquema Weende, con métodos establecidos por la AOAC y ligeras modificaciones. Este análisis consta de las siguientes determinaciones: Humedad analítica, grasa cruda, proteína cruda, fibra cruda, cenizas e hidratos de carbono asimilables (estos obtenidos por diferencia) (Adrian, 1990).

4.4.1 Determinación de humedad en estufa al vacío

Fundamento

Método gravimétrico basado en una diferencia de masa de la muestra, antes, y después de que el agua libre de ésta ha sido evaporada. Se basa en el principio fisicoquímico que relaciona la presión de vapor con la presión del sistema a una temperatura dada. Si se trabaja a presión debajo de la atmosférica (reducida), también se abate la presión de

vapor de agua y necesariamente se reduce el punto de ebullición de ésta (Pearson, 1981).

Material

Charolas de aluminio

Estufa de vacío marca Lab-Line, mod Duo-VAC.

Balanza analítica marca Sartorius, mod Extend.

Desecador de vidrio con cloruro de calcio anhidro

Procedimiento

Poner a peso constante en la estufa al vacío la charola de aluminio en donde se efectuara la determinación, hasta peso constante.

Pesar en la charola de aluminio a peso constante de 2 a 5 g de muestra y distribuirla, tratando de que presente la mayor superficie de evaporación e introducirla en la estufa que se encuentra entre 60 y 65 °C.

Realizar pesadas periódicas de las muestras, sacándolas de la estufa y colocándolas inmediatamente en un desecador donde permanecerá durante 15 minutos; para su posterior pesado en la balanza analítica; este último paso se repetirá hasta obtener un peso constante.

Se considera a peso constante una muestra cuando al pesarla en la balanza analítica solo se presente variación en la cuarta decimal con respecto al valor anterior. La determinación se realiza por triplicado.

Cálculos

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

Dónde:

P_i : = El peso en g de la charola con muestra, antes de secar (muestra húmeda).

P_f : =Peso en g de la charola con muestra, después de secar (muestra seca).

m = Peso en g de la muestra.

4.4.2 Determinación de Grasa cruda

Fundamento

Extracción de los materiales liposolubles de la muestra con éter de petróleo y determinación gravimétrica del extracto tras la evaporación del disolvente. Con material de origen vegetal se hace referencia siempre a extracto etéreo y no a grasa bruta, ya que además de la grasa, el éter extrae importantes cantidades de pigmentos vegetales, ceras y otros compuestos no polares (Pearson, 1981).

Material / Reactivos

Aparato de extracción Goldfish
marca Labconco, mod. 35001-00CV
Anillo metálico para Goldfish
Vasos de borde esmerilado
Porta dedales de vidrio
Cartucho de celulosa de 22 x 80 mm
Balanza analítica marca Sartorius, mod. Extend.
Estufa de vacío
marca Lab-line, mod. Duo vac
Bomba de recirculación marca Little Grant, mod. 1
Colector recuperador de disolvente
Éter de petróleo 40 a 60 °C

Procedimiento

Se colocan los vasos esmerilados en la estufa de vacío hasta alcanzar un peso constante. Se pesan de 2 a 3 g de muestra seca en un pañuelo desechable y se realizan varios pliegues de tal forma que la muestra quede en el centro del pañuelo desechable. Se coloca dentro del cartucho de celulosa, para después introducirlo dentro del portadetal de vidrio.

Los portadedales se introducen en el compartimiento de extracción Goldfish. Se añaden 50 mL de éter de petróleo a los vasos y se colocan en el aparato de extracción. Se acopla al aparato de extracción Goldfish una bomba de recirculación de agua helada y se somete a reflujo aproximadamente 2 horas.

Se verifica la total extracción de la grasa, para ello se deja caer una gota de la descarga sobre un trozo de papel y se verifica que el disolvente no deje residuos de grasa. Una vez finalizada la extracción, se retira el portadetal del compartimiento y se introduce en el compartimiento un colector para recuperar el disolvente. Se retira la mayor parte de disolvente del vaso de extracción y después se deja secar en una campana de extracción. Por último, se colocan los vasos con el extracto etéreo en la estufa de vacío, hasta alcanzar peso constante y se registra el peso.

Cálculos

$$\% \text{ Grasa} = \frac{Pf - Po}{m} \times 100$$

Dónde:

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

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

m= peso de la muestra original (en gramos)

4.4.3 Determinación de Fibra cruda

Fundamento

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

Para esta determinación la muestra debe estar desengrasada y es sometida a una hidrólisis ácida, seguida de una hidrólisis alcalina con una posterior incineración del material insoluble para que por diferencia obtener el contenido de hidratos de carbono no digeribles (Hart, 1984).

Material/Reactivos

Aparato de digestión marca Labconco	Ácido sulfúrico al 1.25% (m/v)
Vasos digestores Berzelius	Silicato de aluminio
Embudo Buchner tipo "California"	Hidróxido de sodio al 1.25% (m/v)
Estufa de vacío marca Lab line, mod 3620	Antiespumante (SIGMA #A5758)
Desecador de vidrio con cloruro de calcio anhidro	Etanol
Balanza analítica marca Sartorius, mod Extend.	
Crisoles	
Mufla eléctrica marca Heraew	

Procedimiento

Se pesan de 3 a 5 gramos de muestra desengrasada sobre un vaso de Berzelius que contenga 0.5 g de Silicato de aluminio (limpio y calcinado) y unas perlas de ebullición. Se adicionan 200 mL de H_2SO_4 al 1.25%, el cual debe estar previamente calentado y 4 gotas de antiespumante y se coloca inmediatamente en el aparato de digestión Labconco, el cuál debe estar previamente caliente; se deja en ebullición durante 30 minutos.

Una vez finalizada la digestión, el contenido se vierte sobre un embudo Buchner tipo "California" y se filtra con ayuda de vacío; se realizan lavados con agua caliente (250 mL) para eliminar el exceso de ácido. Una vez terminado los lavados, el residuo se transfiere nuevamente al vaso Berzelius y se adicionan 200 mL de NaOH al 1.25% previamente calentado y 4 gotas de antiespumante y se coloca en el equipo de digestión durante 30 minutos a ebullición constante. Transcurrido ese tiempo, se filtra nuevamente con ayuda del embudo Buchner tipo "California" y se realizan lavados utilizando agua hirviendo (aproximadamente 250 mL) hasta eliminar el álcali presente en el residuo. Se retiran las perlas de ebullición y se lava el residuo con 25 mL de alcohol etílico, el residuo se pasa cuantitativamente a un crisol de porcelana previamente puesto a peso constante y se coloca en la estufa convencional a 110°C durante 3 horas hasta peso constante.

Posteriormente se carbonizan y se calcinan en la mufla a 500°C durante 3 horas hasta obtener a peso constante.

Cálculos

$$\% \text{ Fibra cruda} = \frac{P2 - P3}{P1} \times 100$$

En donde:

P1= Peso de la muestra original

P2= Peso del crisol después del secado en estufa de vacío

P3= Peso del crisol después de calcinarlo en la mufla.

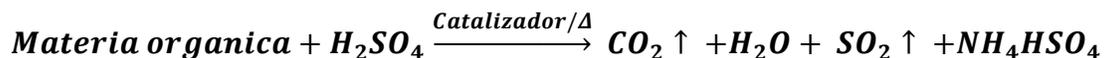
4.4.4 Determinación de proteína

Fundamento

El método generalmente empleado para la determinación de nitrógeno en alimentos, es el método Kjeldahl. Se basa en la digestión completa de la materia orgánica por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado en presencia de catalizadores metálicos y peróxido de hidrógeno, para reducir el nitrógeno orgánico hasta nitrógeno inorgánico, el cual queda en solución en forma de sulfato ácido de amonio. El digerido, una vez alcalinizado con hidróxido de sodio, se destila directamente o por arrastre de vapor para desprender el amoniaco, el cual es atrapado en una solución de ácido bórico, formando borato de amonio el cual se titula con ácido clorhídrico. El contenido de nitrógeno se multiplica por un factor de conversión para poder expresar en términos de % de proteína bruta o cruda (Pearson, 1981).

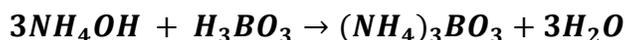
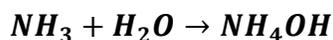
Las reacciones antes descritas se muestran a continuación:

Digestión

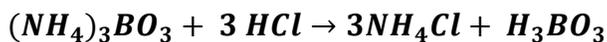


Destilación





Titulación



Material / Reactivos

Digestor marca Tecator, mod. Ab-20/40	Mezcla digestiva (a)
Equipo de microdestilación marca Tecator, mod. Kjeltec 1030	Peróxido de hidrógeno al 30%
Tubo de digestión Tecator de 100 mL	Solución de hidróxido de sodio al 40% p/v
Balanza analítica marca Sartorius, mod: Extend	Sulfato de potasio R.A
	Solución de ácido bórico con indicadores (b)
	Verde de bromocresol al 0.1% en metanol
	Rojo de metilo al 0.1% en metanol
	Solución de ácido clorhídrico 0.01 N valorada

Preparación de soluciones

- (a) Disolver 3 g de sulfato de cobre pentahidratado en 20 mL de agua destilada y una vez disuelto, agregar 50 mL de ácido ortofosfórico (H₃PO₄); a continuación se adicionan 430 mL de ácido sulfúrico concentrado resbalando por la pared del recipiente. Agitar por aproximadamente 30 minutos.
- (b) Pesar 10 g de ácido bórico y colocarlo en un matraz aforado de 1L; se adiciona agua y se agita hasta disolverlo, a continuación se adiciona 10 mL del indicador de verde de bromocresol al 0.1% en metanol (100 mg de verde de bromocresol en 100 mL de metanol) y 7 mL del indicador de rojo de metilo al 0.1% en metanol (100 mg de rojo de metilo en 100 mL de metanol). Se ajusta a color a un tono café rojizo con ácido o álcali según se requiera y se afora a 1L con agua destilada.

Procedimiento

Se pesa de 10 a 100 mg de muestra y un blanco de glucosa en papel cebolla, se coloca en el tubo de digestión, a este tubo se le adiciona aproximadamente 0.5 g de sulfato de sodio o potasio y 5 mL de mezcla digestiva; el tubo se coloca en el digestor por un tiempo de 15 minutos a una temperatura entre 250 a 300 °C, posteriormente se retiran los tubos del digestor y se dejan enfriar para adicionarles 3 mL de peróxido de hidrógeno al 30 % y se colocan nuevamente en el digestor a una temperatura de 370 °C por 1 hora o hasta que se consiga una completa digestión. Se considera que la digestión está realizada, cuando el tubo no muestra manchas ni puntos negros y además la mezcla de digestión sea traslúcida con un ligero tono verde-azuloso.

La destilación se realiza en el Kjeltex Auto 1030 Analyzer una vez que los tubos estén fríos. El equipo se enjuaga con un tubo sin muestra y una vez listo se agregan 25 mL de agua destilada a los tubos con muestra, se coloca el tubo, se cierra la puerta de seguridad y se da inicio a la destilación y a la titulación, la destilación la lleva a cabo el equipo con NaOH al 40% y la titulación con HCl 0.01N. Se corre primero los blancos, después un control interno de caseína y al final las muestras.

Cálculos

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

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

$$\%Proteína = \%N_2 \times F$$

Donde:

P =mL de titulación de la muestra.

B =mL de la titulación del blanco

N = Normalidad de la solución de HCl

meq = Miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m = peso de la muestra (en gramos)

F = factor de conversión

4.4.5 Determinación de cenizas totales

Fundamento

Esta determinación se basa en la destrucción de la materia orgánica contenida en una matriz alimentaria considerándose a las cenizas como residuo inorgánico que queda después de incinerar dicha materia orgánica en la mufla (Pearson, 1981).

Material

Mufla eléctrica marca Heraew.

Balanza analítica marca Sartorius, mod analytic.

Desecador de vidrio con cloruro de calcio anhidro

Crisoles de porcelana

Mechero Fisher

Soporte metálico

Anillo de hierro

Triángulo de porcelana/ tela de asbesto

Procedimiento

Se colocan crisoles en la mufla a una temperatura de 450 °C, hasta alcanzar peso constante. Para pesar el crisol, una vez que se retira de la mufla, se deja enfriar un poco y se coloca en el desecador hasta que alcance la temperatura ambiente para luego pesarlo.

Se pesa en el crisol de 2 a 3 g de muestra y se carbonizan bajo una campana de extracción hasta que no desprenda humo. Se introduce el crisol a la mufla, la cual debe encontrarse entre 400 a 500 °C. Se deja calcinar la muestra hasta la obtención de cenizas, las cuales deben quedar totalmente blancas o en su defecto ligeramente grises y se tenga peso constante.

Cálculos

Cálculos

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

$$\% \text{ de Cenizas} = \left(\frac{Pf - Po}{m} \right) \times 100$$

Dónde:

Pf: Peso en gramos del crisol con la muestra después de incinerada.

Po: Peso en gramos del crisol a peso constante

m: Peso en gramos de la muestra

4.4.6 Determinación de hidratos de carbono

El porcentaje de hidratos de carbono se calculó por diferencia, restando al 100 % la suma de los porcentajes de humedad, cenizas, proteína cruda, grasa cruda y fibra cruda.

Cálculos

$$\% \text{ hidratos de carbono} = 100 - (\% \text{ humedad} + \% \text{ cenizas} + \% \text{ proteina} + \% \text{ grasa} + \% \text{ fibra})$$

4.5 COMPLEMENTACIÓN BROMATOLÓGICA

4.5.1 Determinación de proteína verdadera

Fundamento

La técnica se basa en la solubilización del nitrógeno no proteico así como de la proteína soluble y la posterior precipitación de dicha proteína con tungstato de sodio; con el fin de eliminar nitrógeno no proteico que puede interferir en la determinación de nitrógeno por medio de un micro Kjeldahl. Con este método la proteína insoluble también es tomada en cuenta ya que en la etapa de filtración ésta es incluida junto con la proteína soluble precipitada (Howirtz and Latimer, 2005).

Material/ Reactivos

Balanza analítica marca Sartorius, mod: Extend	Mezcla digestiva (a) Solución precipitante (b)
Digestor marca Tecator, mod. Ab-20/40	Solución de peróxido de hidrógeno al 30%
Tubo de digestión Tecator de 100 mL	Solución de hidróxido de sodio 40%
Equipo de microdestilación marca Tecator, mod. Kjeltex 1030	Sulfato de potasio R.A Solución de ácido bórico con indicadores (c)
Agitador magnético	Verde de bromocresol al 0.1% en metanol
Barras magnéticas de 12x5 mm	Rojo de metilo al 0.1% en metanol
Papel Whatman #50 de 5 cm de	Solución de ácido clorhídrico 0.01 N

diámetro de poro cerrado

valorada

Solución de HCl 0.01 N (valorada)

Preparación de soluciones

- (a) Disolver 3 g de sulfato de cobre pentahidratado en 20 mL de agua destilada y una vez disuelto, agregar 50 mL de ácido ortofosfórico (H_3PO_4); a continuación se adicionan 430 mL de ácido sulfúrico concentrado resbalando por la pared del recipiente. Agitar por aproximadamente 30 minutos.
- (b) Disolver 5 g de tungstato de sodio y 1.51 g de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ en 20 mL de H_2O , añadir 22 mL de HCl 2N y mezclar y aforar a 50 mL con agua destilada.
- (c) Pesar 10 g de ácido bórico y colocarlo en un matraz aforado de 1L; se adiciona agua y se agita hasta disolverlo, a continuación se adiciona 10 mL del indicador de verde de bromocresol al 0.1% en metanol (100 mg de verde de bromocresol en 100 mL de metanol) y 7 mL del indicador de rojo de metilo al 0.1% en metanol (100 mg de rojo de metilo en 100 mL de metanol). Se ajusta a color a un tono café rojizo con ácido o álcali según se requiera y se afora a 1L con agua destilada.

Procedimiento

a) Proceso de precipitación

Pesar de 50 a 100 mg de muestra finamente molida y colocarla en un vaso de precipitados de 50 mL. Adicionar 5 mL de H_2O caliente y se agita mecánicamente por 15 minutos, agregar 2 mL de solución precipitante y se deja reposar durante 10 min; se transfiere cuantitativamente y se filtra en papel Whatman # 50 0 542 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 K_2SO_4 5 mL de mezcla digestiva, colocar el tubo durante 15 minutos en el digestor a una temperatura de $340^\circ C$, retirar los tubos del digestor y esperar que se enfríen para añadirle 3 mL de peróxido de hidrógeno al 30% y colocarlos nuevamente en el digestor el cual debe estar a una temperatura de $370^\circ C$ hasta que se termine la digestión, 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

La destilación se realiza en el Kjeltex, una vez que los tubos estén fríos. El equipo se enjuaga con un tubo sin muestra y una vez listo se agregan 25 mL de agua destilada a los tubos con muestra, se coloca el tubo, se cierra la puerta de seguridad y se da inicio a la destilación y a la titulación, la destilación la lleva a cabo el equipo con NaOH al 40% y la titulación con HCl 0.01N. Se corre primero los blancos, se continúa con una referencia de caseína y al final las muestras.

Cálculos

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

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

$$\%Proteína = \%N_2 \times F$$

Donde:

P =mL de titulación de la muestra.

B =mL de la titulación del blanco

N = Normalidad de la solución de HCl

meq = Miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m = peso de la muestra (en gramos)

F = factor de conversión

4.5.2 Digestibilidad *in vitro*

Fundamento

Este método enzimático que se basa en crear un medio similar al del organismo digiriéndose las proteínas con sistema multienzimático, y asumiendo que por cada enlace peptídico se produce un protón $[H^+]$, el cambio de pH está relacionado con la hidrólisis de la proteína. Los métodos *in vitro* tienen la ventaja de determinar la disponibilidad de la

proteína en alimentos que han sido sometidos a algún proceso, siendo métodos relativamente rápidos y de mayor precisión y en consecuencia menos costosos que los métodos biológicos (Helrich, 1990).

Material/ Reactivos

Balanza analítica marca Sartorius, mod. Extend.
Potenciómetro Marca Thermo Scientific Mod. Orion 3 Star
Baño reciclador de agua Grant mod 5E-10 a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$
Baño de agua Polystat a $55 \pm 0.5^\circ\text{C}$
Cronometro digital
Agitadores magnéticos de arroz
Vasos especiales para digestión de la muestra
Matraz aforado de 10 mL
Espátulas
Naves de vidrio
Pipeta volumétrica de 10 mL
Pipeta volumétrica de 1 mL
Parrilla de agitación

Tripsina pancreática Porcina (tipo IX) Sigma (T-0303) **227040 Unidades BAAE de tripsina**
HCl 0.1N y 0.05N (10 mL cada una)
Pepsina intestinal porcina (Grado I) Sigma (p-7000) **2321 unidades de peptidasa**
 α -quimiotripsina pancreática bovina (tipo II) Sigma (C-4129) **1860 unidades BAAE de α -quimiotripsina.**
Proteasa bacteriana Sigma (P-5147) **65 unidades de caseína de proteasa**
NaOH 2N, 1N, 0.1N y 0.05N (10 mL de cada una)

Preparación de soluciones

- (a) Solución A: Disolver 227040 BAAE unidades de tripsina + 1860 BAAE unidades de α -quimiotripsina+ 2321 unidades de pepsina gástrica de porcino en 10 mL de agua
- (b) Solución B: Disolver 65 unidades de caseína de proteasa bacteriana en 10 mL de agua.

Donde BAAE es el sustrato N- α -benzoil-L-arginina etil ester.

- 1) Una unidad de tripsina contiene 17953 BAAE unidades por mg de proteína. Por lo tanto para disolver 227040 BAAE unidades de tripsina, se requiere:

$$\frac{(227040 \text{ unidades BAEE} \times 1 \text{ mg de enzima})}{17953 \text{ unidades BAEE}} = 12.646 \text{ mg de enzima}$$

Una unidad de α -quimiotripsina contiene 62 unidades BAEE por mg de proteína con pureza del 86%. Por lo tanto para disolver 1860 unidades BAEE de enzima se requiere:

$$\frac{(1860 \text{ unidades BAEE} \times 1 \text{ mg de enzima} \times 100 \text{ mg sólido})}{62 \text{ unidades BAEE} \times 86 \text{ mg proteina}} = 34.88 \text{ mg de enzima}$$

Una unidad de peptidasa intestinal porcina contiene 424 unidades BAEE por mg de proteína. Por lo que para disolver 2321 unidades BAEE de enzima se requiere:

$$\frac{(2321 \text{ unidades BAEE} \times 1 \text{ mg de enzima})}{424 \text{ unidades BAEE}} = 5.474 \text{ de enzima}$$

Una unidad de proteasa bacterial contiene 5 unidades BAEE por mg de proteína. Por lo que para disolver 65 unidades BAEE de tripsina se requiere:

$$\frac{(65 \text{ unidades BAEE} \times 1 \text{ mg de enzima})}{5 \text{ unidades BAEE}} = 13 \text{ mg de enzima}$$

Procedimiento

Se parte de 10 mg de nitrógeno de la proteína (caseína) o muestra según sea el caso, a la cuales se le añaden 10 mL de agua destilada en agitación a una temperatura de 37 °C durante 1 hora; se atemperan las soluciones enzimáticas a 37 °C y se ajusta el pH de éstas a 8.0 ± 0.03 antes de usarse. A continuación se mide el pH de la solución proteínica (caseína o muestra) y se ajusta a 8.0 ± 0.03 con HCl o NaOH 0.1 N según sea necesario. Inmediatamente se le adiciona 1.0 mL de solución A, la cual debe permanecer 10 min medidos con cronometro exactamente en agitación a una temperatura de 37 °C, transcurrido el tiempo, se añade 1 mL de solución B, permaneciendo en agitación 9 min a una temperatura de 55 °C. Al término, se coloca la muestra a 37 °C durante 1 min y a los 20 min exactos de haber adicionado la solución A, se mide pH con la lectura hasta las centésimas.

El pH para la caseína control o referencia deberá ser de 6.42 ± 0.05 y sólo hasta que se obtiene este pH en la serie de referencia se podrá realizar la determinación en las muestras problemas.

Cálculos

Para obtener el % de digestibilidad de la muestra se realiza el siguiente cálculo:

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

Lectura pH = Lectura obtenida al término de la digestión de la muestra (20 minutos).

4.5.3 Densidad calórica

La densidad calórica, también denominada densidad energética de un alimento, es la cantidad de energía en términos de kilojoules (kJ) que proporciona un gramo de alimento. El instrumento que se utilizará para determinar la densidad calórica será una bomba balística. El método consiste en la combustión por ignición eléctrica en una muestra de peso conocido en una atmósfera de oxígeno; la energía producida en forma de calor, se transmite al cilindro de la bomba, el cual a su vez está conectada a un detector de cambio de temperatura. El aumento producido en la temperatura después de la combustión de la muestra se compara con el cambio de temperatura que se produce con una cantidad conocida de ácido benzoico que es el estándar de referencia con contenido calórico certificado (Bowman y Russell, 2003).

Material /Reactivos

Desecador de vidrio	Ácido Benzoico (Valor calórico certificado)
Pinceles	
Mango metálico compactador	
Crisol de acero inoxidable de 25.4 mm de diámetro	
Balanza analítica marca Sartorius, mod. Extend.	
Mecha de algodón de 75 mm de longitud	
Bomba calorimétrica balística marca Gallenkamp, mod CBB-330-010L	

Procedimiento

Pesar de 0.5 a 1 g de muestra en forma de harina seca y homogénea. Se coloca en el crisol metálico, previamente tarado junto con la mecha de algodón, de tal manera que un

extremo de la mecha quede introducido dentro de la muestra. Se procede a pesar la muestra, este peso corresponderá al peso preliminar (Pp). Se compacta la muestra con el mango metálico, lo más uniforme posible y un extremo de la mecha introducido en la muestra, el extremo libre servirá para insertarla en el alambre de ignición de la bomba. El crisol con la muestra compactada se pesa nuevamente para tener el peso final (Pf).

Se coloca el crisol en la base superior del pilar central de la bomba, con mucho cuidado se introduce la punta suelta de la mecha de algodón en el alambre de ignición. Se cierra herméticamente el capuchón de la bomba de combustión con ayuda del anillo metálico. Se coloca el termopar en el orificio del capuchón y se abre la válvula de oxígeno hasta tener una presión mínima dentro de la bomba de 25 bars. Una vez alcanzada la presión, se cierra la válvula de paso y se ajusta el indicador del galvanómetro a cero. Si estas condiciones se mantienen durante 10 segundos, se oprime el botón de ignición y se toma el tiempo el cual debe de ser 3 minutos para tomar la lectura marcada en el galvanómetro. Tomada la lectura, se abre la válvula de salida de los gases de combustión, se desconecta el sensor termopar y una vez liberados los gases de combustión, se retira el capuchón.

Cálculos

Para calcular la densidad calórica de una muestra es necesario contar con una curva de calibración, para lo cual se debe realizar la combustión de diferentes pesos de ácido benzoico y anotar la respectiva lectura obtenida de la escala del galvanómetro. Se recomienda pesar entre 0.1 a 0.8 g de ácido benzoico. Una vez obtenidas las lecturas, se debe convertir los gramos de ácido benzoico en kJ y kcal, para lo cual se utilizan las siguientes conversiones:

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

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

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

La densidad calórica de la muestra se calcula con la formula siguiente:

$$\frac{kJ}{100} g \text{ de muestra} = \frac{\text{Lectura (kJ)} * 100}{\text{peso de la muestra (g)}}$$

4.6 Determinación de factores tóxicos y antinutrimientales

4.6.1 Inhibidores de tripsina

Fundamento

La técnica es la utilizada por Kakade y colaboradores, la cual se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso (solución de NaOH 0.01 N) de la muestra sobre una solución estándar de tripsina (Kakade *et al*, 1974).

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

Material/ Reactivos

Potenciometro Marca Thermo Scientific	NaOH 0.01 N
Mod. Orion 3 Star	HCl 0.001N
Parrilla de agitación magnética	Solución amortiguadora TRIS pH 8.2 (a)
Espectrofotómetro marca Thermo Scientific	Solución BAPNA (b)
mod Genesys 10 uv	Ácido acético al 30%
Mezclador de tubos marca Lab-line mod	Solución estándar de tripsina (c)
super-mixer	
Baño recirculador de agua Grant mod. 5E-	
10 a 37 ± 0.5°C	

- (a) 6.05 g de tris (hidroximetil-amino-metano) y 2.94 g de CaCl₂·2H₂O se disuelven en 900 mL de agua destilada. Se ajusta el pH a 8.2 y se afora a un volumen de 1 Litro.

- (b) 100 mg de benzoil- DL-arginina-p-nitroanilida-HCl (BAPNA) se disuelven en 2.5 mL de dimetil-sulfoxido y se diluye a 250 mL con amortiguador TRIS previamente calentado a 37 °C. ESTA SOLUCION DEBE SER PREPARADA EL MISMO DIA Y CUANDO ESTE EN USO DEBE MANTENERSE A 37°C.
- (c) Se pesan con mucha exactitud 4 mg de tripsina bovina (SIGMA # T-1426) y se disuelven en 200 mL de HCl 0.001N. Esta solución contiene 20 µg de tripsina/mL y debe ser almacenada en refrigeración donde puede durar de 2 a 3 semanas sin pérdida apreciable de actividad.

Procedimiento

Preparación de extracto

Se pesa 1 gramo de muestra finamente molida en un vaso de precipitado y se le adiciona 45 mL de NaOH 0.01N, se ajusta el pH de esta suspensión a 9.6 ± 0.2 y se afora a 50 mL. A continuación se trasvasa y se somete a agitación durante 2.5 horas a 300 r.p.m. Después de dicho tiempo se deja 30 minutos en reposo, y por simple decantación se obtiene el sobrenadante eliminando el residuo insoluble. El sobrenadante debe ser diluido hasta que 1 mL produzca una inhibición de 40 a 60%, indispensable para reducir la desviación estándar relativa.

Determinación de actividad

La determinación de la actividad se determina utilizando porciones de 0.0, 0.6, 1.0, 1.4 y 1.8 mL de extracto directo o diluido, estos son pipeteados a tubos de ensaye por duplicado y ajustando el volumen a 2.0 mL con agua destilada, una serie de tubos se introduce al baño-maría a 37 °C. Se adicionan 2.0 mL de solución estándar de tripsina (previamente mantenida a 37 °C) y se mantiene en contacto inhibidor-tripsina durante 10 minutos exactos. A continuación se adicionan 5 mL de solución BAPNA (a 37 °C) a cada tubo y se mantiene dicha mezcla de reacción por 10 minutos exactos. La reacción enzimática se detiene por la adición de 1 mL de ácido acético al 30 % para detener la reacción.

Si en este paso se torna turbia la solución o se forma un precipitado fino, se centrifuga la mezcla de reacción a 6000 rpm durante 15 minutos y se lee la solución translúcida a una absorbancia de 410 nm.

Para la segunda serie, se adicionan a cada tubo 2.0 mL de solución estándar de tripsina (previamente mantenida a 37 °C) e inmediatamente se adiciona también 1.0 mL de ácido acético y se deja la reacción durante 10 minutos. Posteriormente se adicionan 5 mL de solución BAPNA (37°C) a cada tubo y se deja dicha reacción durante aproximadamente 10 minutos. Esta serie será el blanco.

En caso de que se observe turbiedad y/o precipitación en los tubos, es necesario centrifugar (como la otra serie) ó filtrar la mezcla de reacción a través de papel filtro (Whatman #40) y posteriormente realizar la medición.

Cálculos

La lectura de absorbancia (A), directamente se puede pasar a unidades de tripsina (U.T.) de la siguiente forma:

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

En donde:

U.T.= Unidades de tripsina

A= Absorbancia

Ya que tenemos una serie de alícuotas del extracto, tendremos a su vez una serie de valores de U.T., los cuales al restar el valor del dato de la referencia obtendremos los respectivos valores de unidades de tripsina inhibida (U.T.I.). Esto lo podemos expresar de la siguiente forma:

$$U.T.I. = U.T_R. - U.T.$$

En donde:

U.T.I.= Unidades de tripsina inhibida

U.T.= Unidades de tripsina de cualquier tubo

U.T_{R.}=Unidades de tripsina del tubo de referencia

Una vez obtenido estos valores debemos calcular el porcentaje de inhibición el cual debe estar en el intervalo de 40 y 60% en el tubo 3 que comprende a 1 mL de extracto. Este porcentaje de inhibición lo podemos obtener de la siguiente manera:

$$\% \text{ inhibicion} = \frac{U.T.I. \times 100}{U.T_R.}$$

En donde:

$U.T.I.$ = Unidades de tripsina inhibida en un mililitro de extracto.

$U.T_R.$ = Unidades de tripsina del tubo de referencia.

Cuando se pone en una gráfica la actividad enzimática inhibitoria (U.T.I./mL) en función de la alícuota del extracto, se observa una correlación lineal negativa, de donde se puede obtener el valor extrapolado, correspondiente al valor de la solución inhibitoria (Lo anterior es sólo cuando en el extracto se encuentran inhibidores de tipo Kunitz).

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

Es conveniente reportar las unidades de inhibición por mg de proteína de la muestra, para lo cual es necesario determinar el contenido de proteína en el extracto directo. De no tener el anterior dato se puede reportar las unidades de inhibición con respecto a 1 mg de muestra:

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

Donde:

B= Valor extrapolado o promedio en (U.T.I./mL)

F= Factor de dilución el cual depende de la(s) dilución (es) realizada(s). Cuando se trabaja el extracto directo F=1.

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

A_1 = Primer aforo

a_1 = Primer alícuota

A_2 = Segundo aforo

a_2 = Segundo alícuota

4.6.2 Lectinas

Fundamento

Se basa en la capacidad que tienen las fitohemaglutininas o lectinas, por aglutinar los eritrocitos por efecto sus receptores específicos presentes. Consisten en hacer diluciones seriadas de un extracto acuoso en las cuales se determina el punto final de la aglutinación de los glóbulos rojos de hámster lavados y sensibilizados con solución de proteasa para mejorar la sensibilidad; se realiza mediante el método de microtitulación que es rápido y requiere una mínima cantidad de muestra (Lucas and Sotelo, 1993).

Material / Reactivos:

Balanza analítica marca Sartorius mod. A-210-P	Solución anticoagulante (heparina)
Agitador magnético múltiple marca Corning Stirrer mod. 440825	Solución salina al 1% preparada con agua desionizada
Centrifuga marca International Equipment mod A 3076x-2	Solución salina al 0.9% preparada con agua desionizada
Incubadora bacteriológica marca Blue M.	Sangre de Hamster desfibrinada y lavada
Espectrofotómetro marca Coleman mod. Junior II-A	Extracto de frijol peruano
Tubos de centrifuga de 15 mL con graduación	Solución de lectina de frijol (<i>phaseolus vulgaris</i>) polvo liofilizado (SIGMA I-8754) (a)
Probeta de 100 mL	Proteasa (SIGMA P-5147) 0.2% en solución salina al 0.9 %
Microtiter kit (Cook Eng Alexander, Virginia, USA)	
Gasa	
Embudo de filtración de talle corto	
Pipeta volumétrica de 0.5 y 2.0 mL	
Pipeteador de goteo (50µL)	
Microdilutor de 50 µL	
Filtros de vidrio de poro grueso	
Matraz erlenmeyer de 25, 125 y 250 mL	

- (a) Pesar con la mayor exactitud posible 1 mg de faseolotoxina y pasarla a un matraz volumétrico de 10 mL; a continuación se afora con solución isotónica (0.9%). De esta solución (0.1 mg/mL) se realiza una dilución 1:100 para ocuparla en la placa de microdilución tipo "V". con la finalidad de definir la cantidad mínima de faseolotoxina que produce prueba positiva de aglutinación.

Procedimiento

Preparación del extracto

Suspender 0.1 g de muestra finamente molida en 10 mL de solución salina al 1% y efectuar la extracción con agitación mecánica durante 2 horas a 300 rpm a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, centrifugar el extracto a 3000 rpm por 10 minutos, esto con el fin de eliminar el residuo insoluble; se filtra el sobrenadante a través de un filtro de vidrio de poro grueso y de ser necesario se lava el residuo con solución salina al 1% para llevar finalmente el extracto filtrado a un volumen de 10 mL.

Preparación de la sangre

Se realiza una sangría por vía seno-ocular a un hámster Sirio macho (previamente anestesiado). La sangre colectada se coloca dentro de un matraz el cual debe contener anticoagulante. Se agita suavemente para una completa homogenización y se diluye un poco con solución salina isotónica, se trasvasa a tubos de centrifuga para lavarla con solución salina al 0.9 % y se centrifuga a 1500 rpm durante 15 minutos, posteriormente se decanta el líquido sobrenadante y se lava dos veces más. Al término del último lavado, se miden los mL del paquete de eritrocitos, se decanta el sobrenadante y se diluyen al 4% (por cada mL de eritrocitos se adicionan 24 mL de solución salina al 0.9%). En caso de observar coágulos, se filtran a través de una gasa.

Sensibilización se los glóbulos rojos

Por cada 10 mL de suspensión al 4% se agrega 1 mL de proteasa al 0.2% y se coloca en la incubadora por espacio de 1 hora a una temperatura de 37 ± 0.5 °C. Transcurrido el tiempo, se centrifuga a 1500 rpm durante 15 minutos para eliminar la enzima sobrenadante. Una vez realizado esto, se realizan 3 lavados con solución salina al 0.9% y centrifugando a 1500 rpm durante 15 minutos. Después del último lavado se mide el

paquete de eritrocitos y resuspende al 4% con solución salina al 0.9%, la suspensión se filtra con ayuda de una gasa en un matraz Erlenmeyer.

Ajuste de la suspensión de glóbulos rojos

Se ajusta el espectrofotómetro Coleman al 100% de T con solución salina al 0.9%, a una longitud de onda de 620 nm, para ajustar la suspensión de eritrocitos se toman 0.5 mL con pipeta volumétrica de la suspensión de eritrocitos y se coloca en la celda, posteriormente se adicionan 2 mL de solución salina al 0.9% con pipeta volumétrica, se homogeniza antes de colocarla en el espectrofotómetro, se diluye la suspensión lo necesario hasta obtener una lectura de $24 \pm 1\%T$.

Microtitulación

Se colocan 100 μ L de solución salina al 0.9% a cada pozo de las placas tipo "V" del microtiter, evitando tocar las paredes del pozo y adicionando con mucha precaución para evitar un desfase en el volumen de adición. Se llena el microdilutor con 50 μ L del extracto problema o de faseolotoxina y se realizan las diluciones sucesivas desde el primer pozo (siguiendo la hilera horizontal hasta donde se desee) y se elimina el residuo de la última dilución. Ya realizadas las diluciones pertinentes se colocan con el pipeteador de gota 50 μ L de la suspensión de eritrocitos sensibilizados y ajustados, se recomienda que cada placa se tenga una hilera de control negativo (solución salina: sangre ajustada) y otra positiva de solución salina 0.9% con estándar de faseolotoxina. Al término de las diluciones sucesivas, se rota la placa en forma circular, para homogeneizar y se coloca en la incubadora por espacio de 1 hora a 37 ± 0.5 °C. Para realizar la lectura de las placas es preciso colocar la placa en cuestión sobre el dispositivo con el espejo adaptado, posteriormente localizar en la hilera horizontal de la placa el número correspondiente al último pozo donde se aprecia la aglutinación.

Cálculos

Para determinar el contenido de unidades de hemaglutininas en gramo de muestra se tienen que realizar los siguientes cálculos.

Límite de detección del método:

$$E = M * D$$

Donde:

E =Cantidad que realmente se coloca en el primer pozo para hacer la dilución seriada

D = Cantidad de muestra tomada por el microtitulador en μL

M = Concentración de lectina en solución final ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

Si se realizó la dilución se expresa:

$$\left(\frac{1 \text{ mg PHT}}{10 \text{ mL}}\right) \left(\frac{1}{100}\right) = \frac{1 \times 10^{-3} \text{ mg de PHT}}{\text{mL}} = \frac{1 \mu\text{g PHT}}{\text{mL}}$$

Donde:

PHT = Faseolotoxina

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

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

Límite de detección del método; o sea la cantidad de lectina que produce prueba positiva de aglutinación.

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

Donde

L = Cantidad de lectina requerida para prueba positiva en aglutinación en μg

t = Lectura hasta el último pozo que dio positiva la aglutinación (Título)

Determinación de aglutinación en la muestra:

$$e = m * D$$

Donde:

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

m = Concentración de muestra en el extracto directo diluido (expresado en mg/mL)

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

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

Donde:

g = Gramos de muestra para la extracción

F = Factor de dilución.

Título de la muestra problema

$$L_m = 2 \left(\frac{e}{3t} \right)$$

Donde

L_m = Cantidad mínima de muestra que produce prueba positiva de aglutinación

t = Lectura hasta el último pozo que dio positiva la aglutinación (Título)

Relación entre el límite de detección de la lectura de referencia (L) y el límite que da prueba positiva con la muestra.

$$R_E = \frac{L}{L_m} = \frac{\mu g \text{ PHT}}{mg \text{ M}} = \frac{mg \text{ PHT}}{g \text{ M}}$$

Donde

R_E = Relación equivalente

Sí definimos que una unidad de hemaglutinación (UHG) es equivalente a un mg de la lectina de referencia, se puede expresar el resultado en UHG/g muestra, cuando no sea el caso de frijol (*Phaseous vulgaris*)

4.6.3 Saponinas

Fundamento

Las saponinas son glucósidos anfífilos, en los cuales la parte polar la constituye los azúcares que se encuentran enlazados a un grupo no polar llamado sapogenina, el cual puede ser de estructura esteroide o triterpenoide. La determinación está basada en el aprovechamiento de la capacidad hemolítica de las saponinas sobre los eritrocitos. Se

emplea un método de microtitulación en el cual se pone en contacto un extracto metanólico de la muestra resuspendida en solución salina, con los eritrocitos sensibilizados (Giron, 1992)

Material/ Reactivos

Aparato de extracción Goldfish
marca Labconco, mod. 35001-00CV
Cartuchos de celulosa Watman de 22X88
mm
Rotavapor marca Büchi mod RE-111
Centrifuga marca International Equipment
mod A 3076x-2
Incubadora bacteriológica marca blue mod
M
Espectrofotómetro marca Coleman mod
junior II-A
Parrilla de agitación y calentamiento
Tubos de centrifuga de 15 mL con
graduación
Pipetas volumétricas de 0.5 y 2.0 mL
Microtiter kit (Cook Eng Alexander Virginia
USA)
Matraz Erlenmeyer de 25, 125 y 250 mL
Probeta de 100 mL
Embudo de filtración de talle corto
Filtros de vidrio de poro grueso
Gasa
Tubo Vacutainer de 6 mL con EDTA o
citrato de sodio 0.1M
Aguja tipo mariposa para colectar sangre
Soporte tubo vacutainer
Curita

Solución anticoagulante (a)
Solución salina al 1% preparada con
agua desionizada
Solución de metanol al 85% (v/v) en
agua
Sangre humana tipo O
Alcohol etílico desnaturalizado
Tripsina de páncreas porcino (Sigma T-
8128 tipo II)
Solución estándar de saponinas al 0.5
% en solución salina (b)

- (a) Tripsina de páncreas porcino (Sigma t-8128 Tipo II) al 0.1% en solución salina al 0.9% para el proceso de sensibilización.
- (b) El estándar de saponinas es una mezcla 1:1 de digitonina (Saponina tipo esteroideal Sigma 18125-A) y un extracto de quijalla (saponina tipo triterpenoide Merck 7695), en ella se pesan 0.025 g de digitonina y 0.025 g de quijalla y se lleva a un aforo de 10 mL con solución salina.

Procedimiento

Preparación del extracto

Se pesan exactamente 3.75 gramos de muestra finamente molida y desengrasada, se coloca dentro de un cartucho de celulosa y se coloca en el portadedales del extractor Goldfish, la extracción se realiza durante 2 horas utilizando 50 mL de metanol (85%) y a una temperatura que se observe un goteo constante. Transcurrido el tiempo de extracción, se trasvasa el extracto a un matraz de bola y se concentra a sequedad en el rotavapor, a una temperatura no mayor de 65°C, este concentrado obtenido se pre-disuelve en solución salina 0.9% y se filtra con ayuda del vacío empleando filtros de vidrio de poro grueso, posteriormente se lleva a un aforo de 50 mL con la misma solución al 0.9%.

Preparación de la sangre

Se realiza una extracción de sangre humana empleando una jeringa de 5 o 10 mL y un tubo vacutainer. Este tubo se homogeneiza suavemente para que exista una correcta incorporación de la sangre con el EDTA. Posteriormente se trasvasa a tubos de centrifuga para lavarla con solución salina al 0.9 % y se centrifuga a 1500 rpm durante 15 minutos, posteriormente se decanta el líquido sobrenadante y se lava dos veces más. Al término del último lavado, se miden los mL del paquete de eritrocitos, se decanta el sobrenadante y se diluyen al 4% (por cada mL de eritrocitos se adicionan 24 mL de solución salina al 0.9%). En caso de observar coágulos, se filtran a través de una gasa.

Sensibilización de glóbulos rojos

A cada 10 mL de suspensión de glóbulos rojos al 4% se le adiciona 1 mL de Tripsina al 0.1%, está se coloca en la incubadora por espacio de 1 hora a 37 ± 0.5 °C. Transcurrido el tiempo, se trasvasa la sangre a tubos de centrifuga para eliminar la enzima

sobrenadante centrifugando a 1500 rpm por 15 minutos, una vez terminado la centrifugación, se decanta el líquido sobrenadante y se lava 3 veces más. Al término del último lavado, se mide el paquete de eritrocitos y se resuspende al 5% (por cada mL de eritrocitos se agrega 19 mL de solución salina al 0.9%) la suspensión se filtra a través de una gasa en un matraz Erlenmeyer.

Ajuste de la suspensión de glóbulos rojos

Se ajusta el espectrofotómetro COLEMAN al 100 % de T con solución salina al 0.9 %, a una longitud de onda de 620 nm y en una celda se colocan 0.5 mL de la suspensión de eritrocitos con la pipeta volumétrica y se adicionan 2 mL de solución salina al 0.9%, se homogeneiza antes de introducirlo al espectrofotómetro COLEMAN, se diluye lo necesario hasta obtener una lectura de $26 \pm 0.5\%$ T.

Microtitulación

Se colocan 50 μ L de solución salina al 0.9% a cada pozo de las placas tipo "U" del microtiter. Se llena el microdilutor con 50 μ L del extracto problema o del estándar de saponinas y se realizan las diluciones sucesivas desde el primer pozo (siguiendo la hilera horizontal hasta donde se deseé) y se elimina el residuo de la última dilución. Ya realizadas las diluciones pertinentes se colocan con el pipeteador de gota 50 μ L de la suspensión de eritrocitos sensibilizados y ajustados, se recomienda que cada placa se tenga una hilera de control negativo (solución salina: sangre ajustada) y otra positiva de solución salina 0.9% con estándar de saponinas. Al término de las diluciones sucesivas, se rota la placa en forma circular para homogeneizar y se coloca en la incubadora por espacio de 1 hora a 37 ± 0.5 °C. Para realizar la lectura de las placas es preciso colocar la placa en cuestión sobre el dispositivo con el espejo adaptado, posteriormente localizar en la hilera horizontal de la placa el número correspondiente al último pozo donde se aprecia la hemólisis.

Cálculos

Para determinar el contenido de unidades de hemólisis en miligramo de muestra se tienen que realizar los siguientes cálculos:

Cantidad de estándar de saponinas (1:1) que se coloca en el primer pozo para realizar la dilución derivada:

$$E = M * D$$

Donde:

E = Cantidad de saponina que se coloca en el primer pozo para hacer la dilución seriada

D = Volumen de muestra tomada por el microtitulador (50 μ L)

M = Concentración saponinas en solución de referencia (mg/mL).

$$\left(\frac{0.5 \text{ g STD Sap}}{100 \text{ mL}}\right) \left(\frac{10^3 \text{ mg STD Sap}}{\text{g STD Sap}}\right) \left(\frac{1 \text{ mL}}{10^3 \mu\text{L}}\right) = \frac{5 \times 10^3 \text{ mg STD Sap}}{\mu\text{L}} = M$$

$$E = 5 \times 10^3 \text{ mg} / \mu\text{L} \times 50 \mu\text{L} = 0.25 \text{ mg STD Sap}$$

Límite de detección del método; o sea la cantidad mínima de STD Sap que produce prueba positiva de Hemólisis.

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

Donde

L = Límite de detección del STD Sap

t = Título de solución al 0.5% (# de pozo donde se observa prueba positiva)

Cantidad de muestra que se coloca en el primer pozo para realizar la dilución seriada:

$$e = m * D$$

Dónde:

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

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

D = Volumen de muestra tomada por el microdilutor (50 μ L)

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

Donde:

g = Gramos de muestra para la extracción

F = Factor de dilución

Título de la muestra problema

$$L_m = \left(\frac{e}{2t} \right)$$

Donde

L_m = Cantidad mínima de muestra que produce prueba positiva de hemólisis

t = Lectura hasta el último pozo que dio positiva la hemólisis (Título)

Relación entre el límite de detección de la lectura de referencia (L) y el límite que da prueba positiva con la muestra.

$$R_E = \frac{L}{L_m} = \left(\frac{mg\ sap}{mg\ M} \right) \left(\frac{1\ mg\ M}{1\ g\ M} \right) \left(\frac{1000\ \mu g}{1\ mg\ sap} \right) = \frac{\mu g\ sap}{g\ M}$$

Donde

R_E = Relación equivalente

Sí definimos que 10 unidades de hemólisis (UH) es equivalente a un μg de la saponina de referencia, se puede expresar el resultado en UH/g muestra.

4.6.4 Nitratos

Fundamento

Se basa en la extracción acuosa de nitratos de tejidos vegetales, con la posterior centrifugación y la formación de un complejo como resultado de la nitración del ácido salicílico bajo condiciones extremas, este complejo tiene su máximo de absorción a 410 nm en soluciones alcalinas. La absorbancia del cromóforo es directamente proporcional a la cantidad de nitratos presentes. Se determina el contenido de nitratos usando una curva estándar preparada con la sal de nitrato químicamente pura (Cataldo *et al*, 1975)

Material /Reactivos

Vasos de precipitados de 50 mL

Probeta de 50 mL

Matraces volumétricos de 50 mL

Papel Whatman # 41 y # 542

Solución estándar de nitrato 0.6 mg/mL

Solución estándar de nitratos 10 mg/mL

Solución de ácido salicílico al 5% (m/v) en

ácido sulfúrico concentrado

Tubos de ensaye de 140X14 NaOH 2 M
Embudos Buchner Carbón activado
Matraces kitasato
Micropipeta de 50, 200 y 1000 μ L
Bureta de 50 mL
Tubos de centrifuga
Agitador magnético Marca Thermolyne
mod multi-stir play four 29387
Centrifuga marca Eppendorf mod 5702
Mezclador de tubos marca Lab-line mod
super-mixer
Baño regulador de temperatura Grandt
con escala de 0 a 100 °C
Espectrofotómetro marca Thermo
Scientific mod Genesys 10 uv

a) Preparación de la curva estándar

En un vaso de precipitados de 50 mL se adicionan 3 mL de la solución estándar de nitratos, 550 mg de carbón activado y 30 mL de agua; se mezclan hasta homogeneizar. Se filtra con ayuda de vacío sobre papel Whatman #41. El filtrado se transfiere cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 mL, se afora con agua y posteriormente se traspasa a un tubo de centrifuga. Se centrifuga a 3000 r.p.m. por 1 hora. Se filtra el sobrenadante con ayuda de vacío sobre papel Whatman #542 y se homogeneiza; la concentración del sobrenadante es de 0.6 mg de NO_3^-/mL .

En 6 tubos de ensaye, correspondiente el numero 1 al blanco de la curva, se adicionan 0, 10, 20, 50, 70 y 100 μ g de nitratos a partir de la solución patrón 0.6 mg de NO_3^-/mL (se hacen los cálculos correspondientes para obtener el volumen que contenga los μ g de nitratos correspondientes). Se añade agua a cada tubo a fin de llevar a un volumen de 0.1 mL y se agita. Posteriormente se adiciona 0.4 mL de la solución de ácido salicílico a cada tubo, se agita y se introduce en un baño de agua a 30 °C durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo se adicionan lentamente con bureta 9.5 mL de solución de NaOH 2M, se agita y se introduce al baño nuevamente durante 15 minutos. Finalmente se transfiere a celdas de medición y se lee en el espectrofotómetro a 410 nm y una vez

registradas las absorbancias se grafican los resultados de absorbancia vs concentración de nitratos, expresada como μg de nitrato.

Preparación del extracto

Se pesan de 0.25 a 0.9 g de muestra dentro de un vaso de precipitados de 50 mL y se adicionan 550 mg de carbón activado, se disuelven en 30 mL de agua. Se agita a 700 rpm durante 15 minutos. Se filtra sobre un papel Whatman #41, el filtrado se transfiere cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 mL y se lleva a la marca de aforo, se homogeneiza y se transfiere a un tubo de centrifuga de 50 mL, se centrifuga una hora a 3000 rpm. Se filtra el sobrenadante con ayuda del vacío sobre un papel Whatman del #542 y se homogeneiza para proceder a la determinación.

Desarrollo de color

Se rotulan 4 tubos de ensayo, donde el número 1 será el blanco de la muestra. Se adicionan a cada tubo 100 μL del extracto. Se adicionan 0.4 mL de la solución de ácido salicílico, excepto al blanco, al cual se le adiciona 0.4 mL ácido sulfúrico concentrado; se agitan y se introducen en el baño regulado a 30 °C por 20 minutos. Transcurrido el tiempo, se adiciona con ayuda de una bureta 9.5 mL de solución de NaOH, se agitan y se introduce nuevamente en el baño de 30 °C por 15 minutos, transcurridos se transfiere el volumen a celdas y se lee en el espectrofotómetro a 410 nm.

Cálculos

Se elabora la curva patrón de nitratos, graficando la absorbancia ABS (y) vs concentración de nitratos (en μg) (x). A partir de la ecuación de la recta de la curva patrón y la lectura de absorbancia de la muestra problema, es posible conocer la concentración de nitratos (en μg) de la muestra problema con la siguiente ecuación:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

Donde:

x = Concentración de nitratos en μg

y = ABS de la muestra problema

m = pendiente de la ecuación de la curva patrón

b = ordenada al origen de la ecuación de la curva patrón

Una vez obtenido el contenido de nitratos (NO_3^-) en μg se sustituye en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Nitratos} = \frac{\mu\text{g nitratos}}{0.1 \text{ mL}} \times 50 \text{ mL} \times \frac{1 \text{ g nitratos}}{1000000 \mu\text{g nitratos}} \times \frac{100}{\text{g muestra}}$$

4.6.5 Determinación semicuantitativa de Alcaloides

Fundamento

El material biológico seco y desengrasado de la planta se extrae con metanol. Se acidifica la solución con ácido, con el fin de precipitar proteínas y componentes que puedan intervenir en la determinación. Posterior se lleva a un pH básico con amoníaco y se le extrae de manera diferencial, con dos disolventes de extracción: cloroformo y cloroformo-etanol. A los 2 extractos obtenidos y se les hace reaccionar con 7 diferentes reactivos específicos para alcaloides, que son:

- 1) Reactivo de MAYER (Cloruro de mercurio y yoduro de potasio)
- 2) Reactivo de WAGNER (Triyoduro de potasio)
- 3) Reactivo de DRAGENDORFF (Nitrato de bismuto y yoduro de potasio)
- 4) Reactivo de SONNENSCHNEIN (Ácido fosfomolibdénico)
- 5) Reactivo de HAGER (Ácido Pícrico)
- 6) Reactivo de SCHEIBLER (Ácido fosfotúngstenico)
- 7) Reactivo de ÁCIDO SILICOTUNGSTENICO

El precipitado formado con los reactivos para alcaloides varía en cantidad con los diferentes alcaloides; en consecuencia, una estimación de la concentración de alcaloides a partir de la cantidad de precipitado con un reactivo, es solamente aproximado. La exactitud es mejorada usando varios reactivos y el método está basado en la comparación de la cantidad de precipitado obtenido con los 7 diferentes reactivos de alcaloides (Abisch y Reichstein, 1960).

Material/ Reactivos

Baño de agua con control de temperatura (a 50 ± 1 °C) y agitación oscilatoria marca Lab-line, mod. Dubnoff incu shaker
Embudos de separación de 125 mL
Embudo de tallo corto
Papel filtro Whatman #52
Rotavapor Marca buchi Mod. R 111
Probetas graduadas de 10 y 125 mL
Matraces bola de fondo plano de 125 mL
Matraz kitasato de 125 mL
Pipeta volumétrica de 2 mL y 10 mL
Soporte universal y pinzas de 3 dedos
Potenciómetro Marca Thermo Scientific Mod. Orion 3 Star

Ácido sulfúrico al 1%
Ácido nítrico (30% ó $\delta = 1.180$)
Sulfato de sodio anhidro R.A.
Ácido clorhídrico al 1%
Ácido Silicotúngstico ($4\text{H}_2\text{O}-\text{SO}_2-12\text{WO}_2-22\text{H}_2\text{O}$)
Metanol R.A.
Etanol R.A.
Agua destilada
Hexano
Agua desionizada
Amoniaco concentrado al 25%
Cloroformo R.A. Mezcla etanol-clororformo (3:2)
Solución de ácido sulfúrico 0.01N
Reactivo de MAYER (Cloruro de mercurio y yoduro de potasio) (1)
Reactivo de WAGNER (Triyoduro de potasio)(2)
Reactivo de DRAGENDORFF (Nitrato de bismuto y yoduro de potasio) (3)
Reactivo de SONNENSCHNEIDER (Ácido fosfomolibdénico) (4)
Reactivo de HAGER (Ácido Pítrico) (5)
Reactivo de SCHEIBLER (Ácido fosfotúngstenico) (6)
Reactivo de ÁCIDO SILICOTUNGSTENICO (7)

- (1) Se disuelven 1.36 g de HgCl_2 en 60 mL de agua y 5 g de KI en 10 mL de agua se juntan las 2 soluciones y se aforan a 100 mL de agua destilada.
- (2) Se disuelven 1.27 g de yodo (resublimado) y 2 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua; la solución se afora a 100 mL con agua destilada.
- (3) Se disuelven 8.0 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 mL de ácido nítrico (densidad 1.18 igual a 30%) y 27.2 g de KI en 50 mL de agua. Se mezclaron las 2 soluciones y se dejaron reposar 24 horas. Se decanta la solución y se afora con agua a 100 mL.
- (4) A 100 mL de una solución caliente de molibdato de amonio (43 g/100 mL) adicionar 100 mL de una solución caliente de fosfato de sodio dibásico anhidro (10 g /100 mL); a esta solución clara se le adiciona 10 mL de ácido nítrico concentrado, al precipitado amarillo que se formó se deja reposar durante una hora. Decanta el líquido sobrenadante y desecha. Se suspende el precipitado amarillo en 50 mL de agua destilada y se calienta. A la suspensión caliente se adiciona 100 mL de la solución de carbonato de sodio anhidro caliente (28 g/ 100 mL). Una solución clara debe formarse, y esta solución se evapora a sequedad en una capsula; se flamea la superficie del polvo con un mechero bunsen hasta encenderse para evaporar las sales de amonio. Se pesa el polvo, y debe ser aproximadamente 30 g (si se realizó con las cantidades indicadas anteriormente). Se disuelve el polvo con 200 mL de agua destilada caliente, se calienta y adiciona a esta solución 50 mL de ácido nítrico concentrado, a esta solución se adiciona agua destilada hasta llevar a un aforo de 300 mL; resultando una solución clara amarilla de ácido fosfomolibdico.
- (5) Preparar una solución saturada de ácido pícrico (2.0 g /100 mL)
- (6) Se disuelven en 50 mL de agua 10 g de tungstato de sodio y 7 g de fosfato disódico. La solución se acidula con ácido nítrico.
- (7) Se disuelven 5.0 g de ácido sílicotúngstico en ácido sulfúrico.

Procedimiento

De la muestra seca y molida se pesa 5 g y se adiciona 40 mL de metanol dejando reposar por 16 horas; después del tiempo cumplido se calienta durante 4 horas a 50 °C, la mezcla se filtra en papel (Whatman #52) a vacío y el residuo se lava con 20 mL de metanol, los extractos se combinan y se evapora el metanol en un rotavapor. El residuo se resuspende con 2 mL de metanol y 12 mL de HCl al 1%; la mezcla se agita y se filtra con

papel (Whatman #52) a vacío; lavando el residuo con 8 mL de HCl al 1%, se combinan los extractos filtrados y se alcaliniza la solución con amoníaco concentrado a un pH 9.5 ± 0.2 . Se extrae con tres porciones de 20 mL de cloroformo cada una, obteniendo la Fracción "A".

La solución acuosa residual de la anterior extracción, se extrae con una mezcla de cloroformo-etanol 3:2 (v/v), con tres porciones de 20 mL cada una, con lo cual se obtiene la Fracción "B".

Las fases orgánicas A y B se secan con 3 g de sulfato de sodio anhidro y se decantan. Las dos fracciones A y B, se evaporan en un rotavapor por separado; y el residuo se resuspende con 1.5 mL de HCl al 1 % y se agita vigorosamente con 1.5 mL de cloroformo. La fase acuosa de cada fracción es pipeteada y filtrada a través de algodón (esto en caso de que se observe una turbiedad, en el caso contrario se puede omitir esto) y dividida en 7 porciones que se hacen reaccionar con cada uno de los 7 reactivos de alcaloides.

Resultados de alcaloides

Debido a la frecuencia de falsos positivos con los reactivos comunes de alcaloides, solo se consideran como positiva la presencia de alcaloides cuando cualquiera de las dos fracciones (A ó B) da reacción positiva con los siete reactivos enumerados:

- (1) Reactivo de MAYER: La mayoría de las soluciones aciduladas de alcaloides forman precipitados blancos.
- (2) Reactivo de WAGNER: La mayoría de las soluciones aciduladas de alcaloides forman precipitados floculentos color marrón.
- (3) Reactivo de DRAGENDORFF: se usa sobre soluciones aciduladas. Forma un precipitado anaranjado- marrón.
- (4) Reactivo de SONNENSCHNEIDER: Los alcaloides y las sales de amonio dan precipitados amarillos.
- (5) Reactivo de HAGER: La mayoría de las soluciones aciduladas de alcaloides forman precipitados color amarillo.
- (6) Reactivo de SCHEIBLER: La solución acidulada forma un precipitado blanco-grisáceo.
- (7) Reactivo de ÁCIDO SILICOTUNGSTENICO: La solución acidulada forma un precipitado blanco-grisáceo.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados obtenidos a partir de análisis químico proximal realizado a las harinas de tres muestras de hongos por triplicado.

Tabla 2. Análisis químico proximal realizado a tres muestras de hongos^a

Muestra	Humedad	Proteína ^b	Grasa	Cenizas	Fibra cruda	HC ^c
<i>H. elástica</i>	8.65 ± 0.07	24.55 ± 0.25	4.75 ± 0.25	10.17 ± 0.04	12.14 ± 0.57	39.75
<i>Ramaria spp</i>	9.37 ± 0.11	17.73 ± 0.50	1.00 ± 0.03	10.77 ± 0.07	9.67 ± 0.15	51.46
<i>H. lacunosa</i>	8.53 ± 0.18	20.57 ± 0.42	3.57 ± 0.04	10.70 ± 0.04	11.46 ± 0.65	45.17

^aSe expresan los valores en g/100 g de muestra (%). Se muestran los valores promedio ± desviación estándar, n=3 (CV≤5%).

^bProteína cruda= N × 6.25

^cHidratos de carbono calculados por diferencia (método Weende)

En la tabla 2 observamos que existe una tendencia del porcentaje de estos componentes presentando en las tres muestras, se observa un mayor contenido de hidratos de carbono, le sigue el contenido de proteína, fibra cruda, cenizas, humedad y por último el menor porcentaje es de grasa. Esto se hace mucho más evidente en la figura 2:

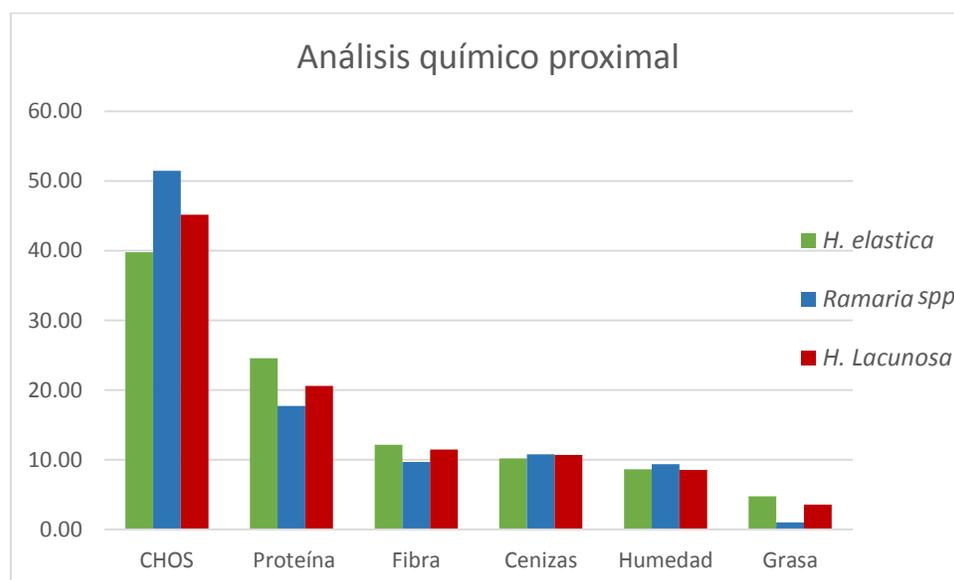


Figura 2. Resultados del análisis químico proximal

Como se observa en la presentación de barras, la muestra que presenta un mayor contenido de Hidratos de carbono es la muestra de *Ramaria spp*. En cuanto a proteína y

fibra cruda, la muestra de *Helvella elástica* es la que contiene un mayor porcentaje de estos componentes. En cenizas y humedad destaca la muestra de *Ramaria* spp. Por último la muestra de *Helvella elástica* es la muestra que contiene más grasa. Aquí observamos que la muestra de *Helvella lacunosa* no destaca en alguna de estas macromoléculas.

Al tener muy poca información de las muestras analizadas, especialmente de *Helvella elastica*, se procedió a realizar un análisis más profundo, se realizó un análisis bromatológico complementario determinando más parámetros alimenticios, entre los que se incluyen proteína verdadera, digestibilidad *in vitro* y determinación de contenido calórico.

En la tabla 3 se observan los resultados obtenidos en la complementación bromatológica realizada en la harina de las 3 muestras de hongos.

Tabla 3. Resultados del análisis bromatológico complementario^a

Muestra	Determinación				
	Proteína verdadera ^{bc}	Digestibilidad <i>in vitro</i> ^d	Energía gruesa ^e	Contenido calórico experimental ^e	Contenido calórico teórico ^e
<i>H. elástica</i>	19.20 ± 0.76	60.60 ± 2.78	371.87 ± 4.5	320.87	297.39
<i>Ramaria</i> spp	14.83 ± 0.39	65.18 ± 1.78	365.03 ± 24.7	326.39	285.80
<i>H. lacunosa</i>	11.95 ± 0.89	60.52 ± 3.60	375.03 ± 15.2	333.03	298.68

^aSe muestran los valores promedio ± desviación estándar, n=3 (CV≤5%).

^bSe expresan los valores en g/100 g de muestra (%)

^c Proteína cruda= N × 6.25

^dValores expresados en %

^eValores expresados en kcal/100g muestra

Como se observa en la tabla 3, el contenido de proteína disminuye en las tres muestras, presentando una mayor pérdida en la muestra de *Helvella lacunosa*, le sigue la muestra de *Ramaria* spp y la muestra de *Helvella elastica* fue la que presentó mayor contenido de proteína. Sin embargo pese a que *Ramaria* spp presentó menor contenido proteínico, esta proteína se puede aprovechar ligeramente más a comparación de las muestras restantes,

ya que presentó el mayor porcentaje de digestibilidad *in vitro*. En cuanto al contenido energético, se observa que la muestra de *Helvella lacunosa* aporta más calorías que las restantes. Todo esto lo podemos observar de forma clara en la figura 3:

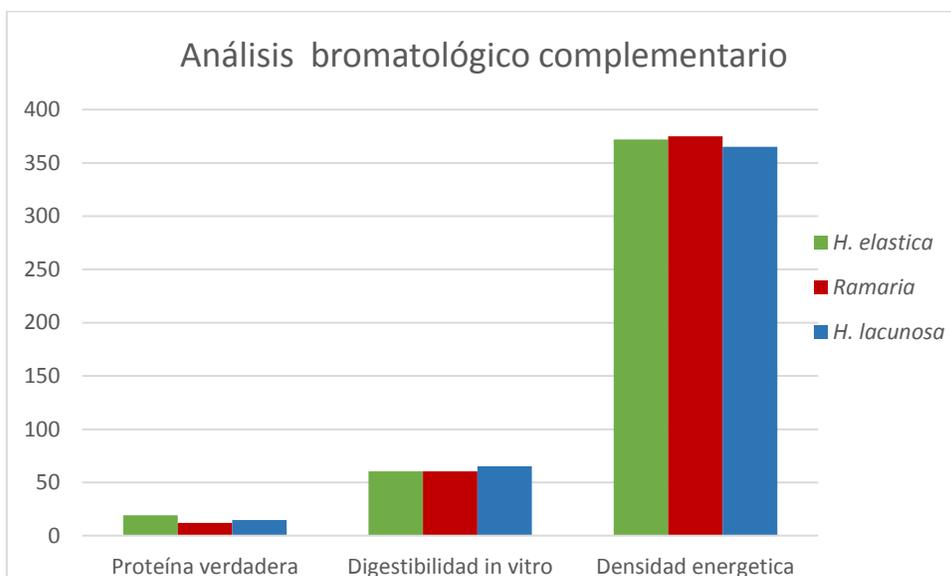


Figura 3. Resultados del análisis bromatológico complementario

Sin embargo, en la tabla 2 se observa que las tres muestras analizadas presentan diferente porcentaje de humedad, por lo que es conveniente expresar los resultados en base seca, es decir que se expresen en 100 % de sólidos totales y de esta manera la humedad no llegue a influir.

A continuación se presenta la Tabla 4 en donde se aprecian los valores en base seca:

Tabla 4. Resultados del análisis proximal expresados en base seca^a

Muestra	Hidratos de carbono	Proteína cruda ^b	Proteína verdadera ^b	Fibra cruda	Cenizas	Grasa
<i>H. elástica</i>	43.51	26.87 ± 0.84 ^A	21.02 ± 0.83 ^A	13.28 ± 0.62 ^A	11.13 ± 0.04 ^A	5.20 ± 0.27 ^A
<i>Ramaria spp.</i>	56.78	19.56 ± 0.55 ^B	16.36 ± 0.43 ^B	10.67 ± 0.16 ^B	11.88 ± 0.07 ^B	1.10 ± 0.04 ^B
<i>H. lacunosa</i>	49.38	22.49 ± 0.46 ^C	13.06 ± 0.97 ^C	12.53 ± 0.71 ^A	11.70 ± 0.04 ^B	3.91 ± 0.05 ^C

^aSe expresan los valores en g/100 g de muestra (%). Se muestran los valores promedio ± desviación estándar, n=3 (CV≤5%).

^bProteína cruda= N × 6.25

Diferentes letras dentro de la columna indican diferencia estadística significativa

En la siguiente figura se presentan los resultados de la tabla 4, en ella se aprecia de manera clara los datos del análisis proximal así como los resultados de proteína verdadera.

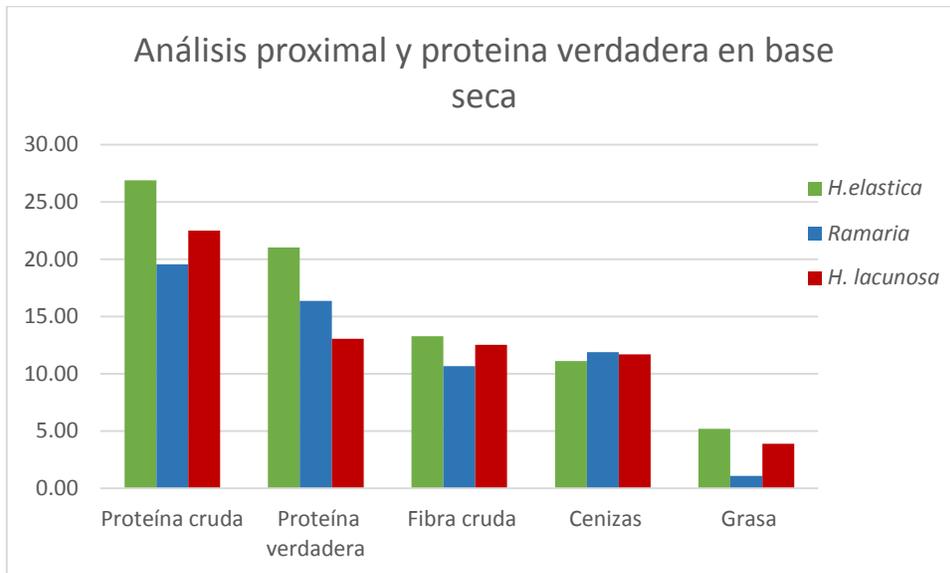


Figura 4. Resultados del análisis proximal y complementario expresado en base seca

Con los resultados obtenidos en la tabla 4, se puede observar los resultados de proteína cruda, en estos datos se encontró que las tres muestras presentaron diferencia significativa al igual que en proteína verdadera. Al comparar los resultados obtenidos de proteína cruda y proteína verdadera notamos que este nutrimento se ve reducido en todas las muestras, una de las razones por las cuales este nutrimento presenta esa tendencia, es el hecho de que experimentalmente se determinó el contenido de nitrógeno total en las muestras y posteriormente se multiplico por un factor de 6.25 (valor comúnmente usado para la mayoría de alimentos de los cuales no se tiene información del contenido de nitrógeno). Al realizar esto en la proteína cruda, se puede cuantificar nitrógeno no proteínico que pudiese corresponder a otros componentes nitrogenados como lo pueden ser aminas, purinas, pirimidinas, betainas, porfirinas, alcaloides y aminoácidos no proteínicos. Estos compuestos son eliminados mediante la determinación de proteína verdadera y es por ello que este contenido de nitrógeno se reduce y por ende también el contenido de proteína.

Para ilustrar el contenido verdadero de nitrógeno en las muestras, se presentan las siguientes ilustraciones. En la figura 5 observamos que el contenido de proteína

expresado en % de nitrógeno para el caso de *H. elastica* es relativamente alto, ya que aproximadamente el 80 % del nitrógeno consumido es proteína, por lo que no hay gran pérdida

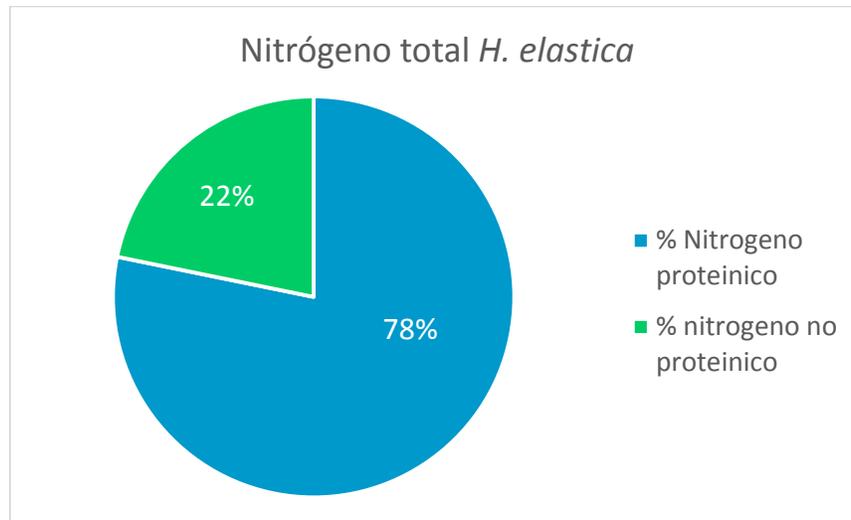


Figura 5. Distribución del nitrógeno total en la muestra de *Helvella elastica*

Para el caso de la muestra de *Ramaria spp*, observamos que el contenido de proteína verdadera es ligeramente más alto que en el caso de *H. elastica*, por lo que se obtendría un mayor aporte tanto energético como nutricional.

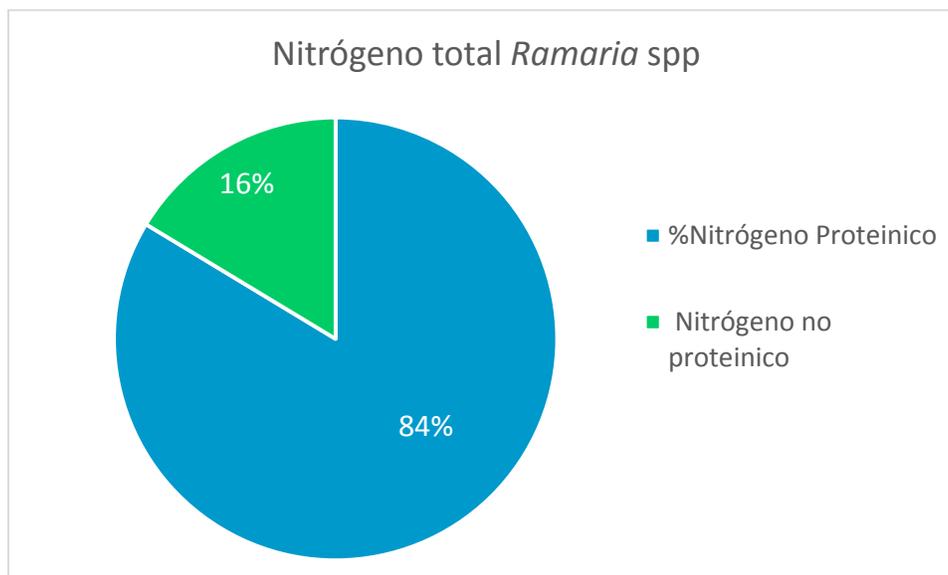


Figura 6. Distribución del nitrógeno total en la muestra de *Ramaria spp*

En el caso de *H. lacunosa* el contenido de nitrógeno proteínico es el más bajo de las tres muestras, teniendo casi la mitad de nitrógeno total no proteínico por lo que al consumir este tipo de hongo no se aprovecha todo el nitrógeno de la muestra y por ende se obtendría menos proteína en comparación con las otras muestras.

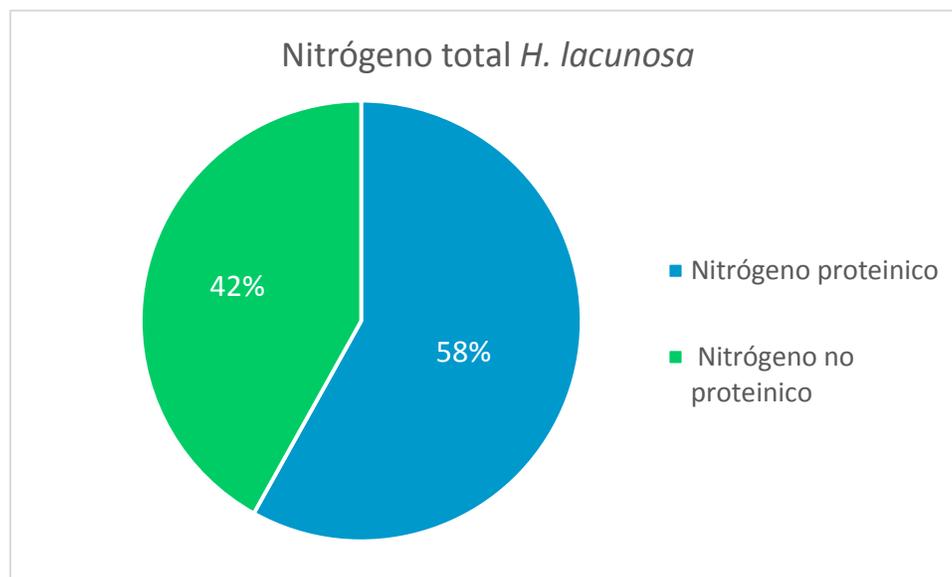


Figura 7. Distribución del nitrógeno total en la muestra de *Helvella lacunosa*

Pese a que 2 de las 3 muestras presentan un alto contenido de proteína verdadera, no necesariamente expresan la calidad de las mismas ya que inclusive *H. lacunosa* pese a tener el menor contenido de proteína, podría tener mayor calidad proteínica y por ende tener un mayor impacto en la nutrición, es por ello que se tendría que hacer el perfil de aminoácidos para poder evaluar esta calidad.

En el caso particular de la proteína, se mencionaron algunos factores que pueden influir en el contenido de nitrógeno proteínico, sin embargo el tipo de suelo, la zona específica de recolección así como las condiciones ambientales también influyen en el contenido de este macronutriente.

En cuanto a fibra cruda, podemos observar que las muestras de *H. elástica* y *H. lacunosa* no presentan diferencia estadística significativa, sin embargo estas dos muestras si presentan esta diferencia con *Ramaria* spp. Una de las razones más lógicas es que ambas muestras pertenecen al género *Helvella*, estas muestras presentaron el mayor contenido de fibra cruda *H. eslatica* presenta ligeramente más fibra en comparación con *H. lacunosa* y la muestra de *Ramaria* spp fue la que contenía menos fibra de todas. La

fibra es la segunda macromolécula más abundante sin tomar en consideración a los hidratos de carbono digeribles, esto principalmente a que los hongos son buena fuente de fibra ya que contienen cerca del 2 al 9 % de fibra insoluble y de 0.3 a 2 % de fibra soluble. La mayor cantidad de fibra en hongos la abarcan los β -glucanos, seguido de la quitina (Mattisek, 1998).

En los resultados de cenizas, observamos que todas las muestras presentan un porcentaje general del 11%. Estos resultados entran dentro de los rangos de algunas especies de hongos que establecen el contenido de cenizas entre 6 a 11% de cenizas sobre materia seca. Estos porcentajes corresponden principalmente a minerales como lo son el calcio, fósforo, potasio y magnesio, aunque también se pueden encontrar cobre, selenio, hierro y cinc pero en menor cantidad (Barr, 2001).

En el caso de la grasa presente en las muestras, todas presentaron diferencia estadística significativa. Todas las muestras se pueden considerar bajas en grasa (ya que presentan menos del 5.20% de grasa en peso seco). La muestra que presentó el mayor contenido de grasa fue *H. elastica* (5.20%), le sigue *H. lacunosa* (3.91%) y por último, *Ramaria spp* (1.10%). La mayoría de los hongos son bajos en grasa por lo que entran en el intervalo de 1 a 5% de grasa. En los hongos el contenido de ácidos grasos insaturados es predominante ya que está en mayor cantidad que los saturados siendo el ácido linoleico el que está presente en mayor proporción en hongos (Becker, 1989).

A continuación, se presentan los resultados de las determinaciones complementarias realizadas a las tres muestras:

Tabla 5. Resultados del análisis bromatológico complementario

Muestra	Digestibilidad <i>in vitro</i> ^a	Densidad energética gruesa ^b	Contenido calórico experimental corregido ^b	Contenido Calórico teórico ^b
<i>H. elastica</i>	60.60 ^A	371.87 ^A	320.87	299.94
<i>Ramaria spp</i>	60.52 ^A	375.03 ^A	333.03	285.76
<i>H. lacunosa</i>	65.18 ^A	365.03 ^A	326.39	295.09

^a Valores expresados en %

^b Valores expresados en kcal/100g muestra

Diferentes letras dentro de la columna indican diferencia estadística significativa

En cuanto a los resultados obtenidos de digestibilidad *in vitro* observamos que las muestras no presentan diferencia significativa entre ellas. En la tabla 5 observamos que las muestras analizadas presentan digestibilidad entre el 60 a 65%, estos resultados nos indican que las muestras presentan una digestibilidad aceptable, ya que el rango de digestibilidad para muestras de origen vegetal se considera bueno en un rango del 60 a 80%. Con estos resultados se esperaría que el aprovechamiento de las proteínas presentes en las muestras será asimilado sin problemas por el organismo. .

En cuanto a la densidad energética gruesa observamos que no existe diferencia significativa entre las muestras y que todas las muestras presentan valores muy similares, aportando todas las muestras cerca de 370 kcal /100 g de muestra. Para este parámetro se tiene que analizar el contenido calórico experimental corregido ya que este valor se obtiene al descartar el aporte de la fibra que se considera en la densidad energética gruesa, ya que esta fibra no aporta calorías para el metabolismo de monogástricos. Si comparamos el contenido de energía gruesa contra el experimental corregido, observaremos que las muestras aportan de 320 a 333 kcal/100 g mientras que el valor teórico para monogástricos de acuerdo a factores establecidos para los nutrimentos que aportan calorías estimaba solo entre 285 a 300 kcal. Se podría pensar que la muestra que aportaría más calorías fuese *H. elastica* al contener el mayor porcentaje de grasa (5.20%), siendo esta la macromolécula que aporta más energía o *Helvella lacunosa* que fue la segunda muestra con mayor contenido de grasa (3.91%), sin embargo la muestra que aporta más calorías es *Ramaria* spp, una de las posible razones es que esta muestra presenta el menor contenido de fibra cruda con un porcentaje del 10.67% y el mayor contenido de Hidratos de carbono digeribles 51.4%, mientras que las muestras de *Helvella elastica* y *Helvella lacunosa* presentaban mayor contenido de fibra y también menos hidratos de carbono digeribles.

Pese a que el consumo de alimentos de origen vegetal proporciona muchos beneficios por su aporte en nutrimentos, no se debe olvidar que pueden tener diversos componentes antinutritivos o tóxicos, los cuales pueden ser naturales y por ende son productos originados en el metabolismo del recurso vegetal. Muchas de estas sustancias podrían ser potentes tóxicos con efectos adversos inmediatos o podrían tener una toxicidad crónica, por ende se determinaron los siguientes factores tóxicos: Inhibidores de tripsina, nitratos, lectinas, saponinas y alcaloides.

Los resultados obtenidos de estas determinaciones se presentan en la tabla 6:

Tabla 6. Resultados de factores tóxicos obtenidos en las tres muestras de hongos

Muestra	Inhibidores de tripsina ^{ab}	Nitratos ^{ac}	Lectinas ^d	Saponinas ^c	Alcaloides
<i>H. elastica</i>	13.35 ± 0.60	0.45 ± 0.02	0.300	0.83	Negativo
<i>Ramaria spp</i>	3.10 ± 0.15	0.27 ± 0.01	0.004	Negativo	Negativo
<i>H. lacunosa</i>	7.85 ± 0.32	0.29 ± 0.02	0.899	0.41	Negativo

^aSe muestran los valores promedio ± desviación estándar, n=3 (CV≤5%).

^bResultados expresados en Unidades de Tripsina Inhibida/mg de muestra

^c Resultados expresados en % (g/100 g muestra)

^dResultados expresados en Unidades de Hemaglutinación /g de muestra

Al igual que en el análisis bromatológico, los resultados obtenidos se pasaron a base seca con el fin de evitar que la humedad influyera en la concentración de estos factores tóxicos.

En las siguientes tablas se presentan los análisis estadísticos de cada factor tóxicos y en la tabla 7 se presentan los resultados de los inhibidores de tripsina:

Tabla 7. Resultados obtenidos en Inhibidores de tripsina

Muestra	Inhibidores de tripsina (U.T.I./mg muestra)
<i>H. elastica</i>	14.61 ^A
<i>Ramaria spp</i>	3.42 ^B
<i>H. lacunosa</i>	8.59 ^C

Diferentes letras dentro de la columna indican diferencia estadística significativa

En tablas anteriores hemos observado que el contenido de proteína verdadera es aceptable y la digestibilidad de todas las muestras es buena, es por ello que se tienen que determinar si no existe una reducción de este nutrimento que es ocasionado por algún inhibidor de proteasa. En este caso se analizaron los inhibidores de tripsina, los cuales sabemos que inhiben la enzima tripsina e impiden la hidrolisis de las proteínas, reduciendo la digestibilidad de las proteínas así como la pérdida de aminoácidos esenciales.

De acuerdo a la técnica de Kakade *et al.*, establece que la concentración mínima de inhibidores de tripsina que puede generar un riesgo a la salud son 10 U.T./ mg muestra, sobrepasando esa concentración de inhibidores de tripsina puede ocasionar algún riesgo, ya que el páncreas puede llegar a sintetizar más enzima, lo que incrementa la actividad del mismo y se puede llegar a derivar una hiperplasia e hipertrofia del tejido pancreático.

En la tabla 7 observamos que existe diferencia estadística significativa entre todas las muestras, sin embargo la única muestra que sobrepasa la concentración establecida por Kakade fue *H. elastica*, mientras que las muestras restantes no implicarían riesgo alguno.

Al realizar el análisis de las muestras mediante la técnica propuesta por Kakade, se encontró que las muestras del género *Helvella* mostraron un comportamiento de inhibición del tipo Browman-Birk, esto significa que los inhibidores de tripsina presentes en ambas muestras tendrán mayor resistencia térmica por lo que la cocción de las muestras no será suficiente para reducir las concentraciones de este tóxico, por el contrario la muestra de *Ramaria* spp. mostró un comportamiento del tipo Kunitz y estos son muy termolábiles, por lo que un tratamiento térmico sería suficiente para reducir la concentración de estos inhibidores. Todas estas muestras tienen una preparación en donde se llevan a altas temperaturas por tiempos prolongados, por lo que la muestra de *Ramaria* spp. y *H. lacunosa* su consumo no presentaría riesgo alguno, en el caso de *H. elastica* pese a tener inhibidores tipo Browman que presenta cierta resistencia, podría llegar a verse una reducción de ellos.

En la tabla 8 se presentan los resultados de nitratos obtenidos en base seca, así como su respectivo análisis estadístico:

Tabla 8. Resultados obtenidos de nitratos

Muestra	Nitratos (%)
<i>H. elastica</i>	0.50 ^A
<i>Ramaria</i> spp	0.30 ^B
<i>H. lacunosa</i>	0.31 ^B

Diferentes letras dentro de la columna indican diferencia estadística significativa

En la tabla 8 encontramos que no existía diferencia significativa entre las muestras de *Ramaria* spp y la muestra de *H. lacunosa* ya que al observar la concentración en ambas

muestras es mínimamente diferente, sin embargo al compararlas con la muestra de *H. elastica*, notamos que la concentración de nitratos es cerca del doble que en las anteriores. Pese a esto, estas concentraciones no representan ningún riesgo a la salud ya que la OMS indica que la ingesta diaria admisible es de 3.65 mg/ kg p.c./día, en consecuencia una persona con un peso corporal de 60 kg podrá consumir 219 mg de nitratos al día, por lo que se podría llegar a consumir 44.4 g de harina de la muestra de *H. elastica*, 74 g de *Ramaria spp* y 71.6 g de *H. lacunosa* al día sin rebasar el IDA de este tóxico y por ende no se presenta ningún riesgo el consumirlos en estas concentraciones.

A continuación se presenta la tabla 9 en la cual se presentan los resultados obtenidos en el análisis de lectinas:

Tabla 9. Resultados obtenidos de lectinas

Muestra	Lectinas (UHG/ mg muestra)
<i>H. elastica</i>	0.328
<i>Ramaria spp</i>	0.004
<i>H. lacunosa</i>	0.983

Al ser esta una prueba semicuantitativa, se realiza el análisis de las medias obtenidas y solo se analiza el valor absoluto. Al observar los concentraciones de las unidades de aglutinación, notamos que la muestra que presenta la mayor concentración es *H. lacunosa*, sin embargo esta concentración no llega a representar un riesgo potencial, ya que solo concentraciones superiores a 1 UHG/g muestra presentan un comportamiento tóxico (Gonzalez, 2001)

A continuación se presentan los resultados de la actividad de saponinas presentes en las tres muestras:

Tabla 10. Resultados obtenidos de saponinas en las tres muestras de hongos

Muestra	Saponinas (%)
<i>H. elastica</i>	0.83
<i>Ramaria spp</i>	<0.05
<i>H. lacunosa</i>	0.41

En los resultados obtenidos notamos que en la muestra de *Ramaria spp* no se logró encontrar la presencia de este factor tóxico debido a que su concentración se encuentra debajo del límite de detección (<0.05%), mientras que en las muestra del género *Helvella* se encontraron concentraciones menores al 1%. Estas 2 muestras no representan riesgo alguno para la salud, ya que los niveles son casi nulos, además la toxicidad de este tipo de sustancias está a discusión, debido a que en algunos países se utilizan como aditivos alimentarios. Un ejemplo de esto es el extracto de quilaya, el cual es un extracto que contiene viarias saponinas del tipo triterpenoides y es utilizado en la industria alimentaria como espumante y estabilizante, esta sustancia tiene un IDA de 5 mg/kg p.c/día por lo que una persona con un peso de 60 kg podría consumir 300 mg de saponinas y no generaría algún riesgo alguno. Para lograr estas concentraciones de saponinas se necesitaría consumir 36.14 g de harina de *H. elastica* ó 73.17 g de *H. lacunosa* para poder representar algún riesgo a la salud.

En el caso de los alcaloides, se realizó una prueba semi-cuantitativa como prueba presuntiva. En la tabla 6 observamos que las tres muestras dieron un resultado negativo, por lo que no se detectó la presencia de este tóxico en las muestras y en consecuencia no representan riesgo. En el anexo 1 se describen con mayor extensión los resultados a cada prueba realizada a estas muestras.

Todos estos resultados presentados, fueron obtenidos a partir de las harinas de las muestras, por lo que sus concentraciones son mucho mayores que las esperadas en la muestra fresca, ya que en la mayoría de los hongos se reportan humedades del 88 a 90% y por ende las concentraciones tanto de nutrimentos como de estos factores tóxicos se verían muy disminuidas.

Por otro lado, se debe mencionar que el consumo de estas muestras comúnmente es en caldos, de manera que los hongos son sometidos a temperaturas normalmente de

ebullición, las cuales ayudan a reducir aún más la mayoría de estos tóxicos y por ende no se esperaría algún efecto adverso.

6. CONCLUSIONES

- Se aportó información tanto nutrimental como toxicológica de tres muestras de hongos, siendo una de estas *H. elastica* de la cual existe poca información debido a su difícil recolección.
- En todas las muestras el componente bromatológico mayoritario fueron los hidratos de carbono, seguido de las proteínas, fibra, cenizas y por último los lípidos.
- Pese a que las proteínas fueron el segundo componente mayoritario, no todo el contenido de nitrógeno correspondía a proteína. pese a esto en *Ramaria* y *Helvella elastica* no se ve tan reducido, solo *H. lacunosa* que mostró una reducción significativa.
- Todas las muestras presentan una digestibilidad aceptable comparada con el rango de alimentos de origen vegetal.
- Todas las muestras presentan un contenido calórico similar, siendo *Ramaria* spp. la muestra que más calorías aporta.
- En general las concentraciones de los factores tóxicos cuantificados fueron menores a la concentraciones que podrían representar algún riesgo a la salud, excepto la muestra de *H. elastica* la cual rebaso el límite en inhibidores de tripsina, sin embargo las preparaciones culinarias de estas muestras al someterse a altas temperaturas por tiempos prolongados ayuda a disminuir estos tóxicos.
- El posible consumo fresco de las muestras de *Ramaria* spp. y *Helvella lacunosa* no representa riesgo alguno a la salud, no siendo el mismo caso para *Helvella elastica*.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adrian, J. y Frangne, R. 1990. La ciencia de los alimentos de la A a la Z, Editorial Acribia. Barcelona. Pág. 16-21
- Abisch, E. and Reichstein, T.1960. Alkaoid-screening (Micromethod). *Helvetica Chimica Acta* 43: 1844 -1861
- Alexopoulos, C. y Mims, C. 1985. Introducción de la micología. Omega. Barcelona. Pág. 638.
- Anete C. and Ferraz, M. 1999. Pharmacological evaluation of ricine a central nervous System Stimulant Isolated from *Ricinus communis*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 63 (3): 367-375 .
- Aron, A.1988. Nutrición animal, 1 er edición, Acribia, Zaragoza. Pág. 43-59
- Aragón, M. y Villa, N. 1994. "Prácticas de laboratorio de análisis de alimentos", Departamento de Alimentos y Biotecnología, División de Ingeniería, Facultad de Química UNAM, México D.F. Pág. 2-19
- Badui, D. 1996. Diccionario de Tecnología de los alimentos, Editorial Alambra Mexicana. México. Pág. 47-51.
- Barr, M. 2001. *Ascomycota In: The Mycota VII parte A*; Springe-Verlang. Berlin. Pág. 161-174
- Becker, G. 1989. El libro de las setas de Europa. Editorial Susaeta. Madrid.
- Boa, E. 2005. Wild edible fungi, a global overview of their use and importance to people, Food and Agriculture Organization (non-wood forest productrs, 17). Roma. Pág. 43-53
- Bowman, B. Russell, R. 2003. Conocimientos actuales sobre nutrición. 8 Edición. Organización Panamericana de la Salud e Instituto Internacional de la Ciencias de la Vida. Washington D.C. Pág. 7-11, 297-311
- Brownsell, V. Griffith, C. y Eleri, J. 1993. La ciencia aplicada al estudio de los alimentos. Editorial Diana, Mexico, D.F. Pág. 13

- Bryan. N. Alexander, D. Coughlin, J., Milkowski, A. Bofetta, P. 2012. Ingested nitrate and nitrite and stomach cancer risk: An updated review. *Food and Chemistry Toxicology* 50: 3646-3665.
- Cataldo, D. Haroon, M. Schrader, L. and Young, V. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Soil Science Plant Annual* 6: 71-80
- Corré, W. and Breimer, T. 1979. Nitrate and Nitrite in Vegetable. Pudoc, Wageningen. Pág. 85, 32-35.
- Delgado, A. Villegas, M. Ríos, J. Cifuentes B. 2005. *Glosario ilustrado de los caracteres macroscópicos en Basidiomycetes con himenio laminar*. Las prensas de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, México. D.F. Pág. 16-20
- Derache. R. 1990. Toxicología y seguridad de los alimentos. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. Pág. 109-121.
- Elizalde, A. Porrilla, P. y Chaparro, C. 2009. Antinutritional factors in eatable seeds. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Pág. 7, 45-54.
- Estrada-Torres, A., 1994. La familia Gomphaceae (Aphylophorales:Fungi) en el estado de Tlaxcala. Tesis de doctorado de la ENCB, IPN, México D.F. Pág. 52-68
- Feldman, E. 1988. Principios de nutrición clínica. El Manual Moderno, México, D.F. Pág. 46-48
- Fernández , C. 2005. Prouctos Forestales no Maderables (PFNM), una oportunidad de desarrollo para las comunidades forestales rurales. PNUMA. Ciudad de México.
- García, J. y Guevara, G. 2005. Macromicetos (Hongos superiores) de Tamaulipas. *Biodiversidad Tamaulipeca* 1: 67-79
- García, P. 1983. Fundamentos de nutrición. Editorial Universidad Estatal a Distancia. San José. Pág. 41-49
- García-Romero L. Guzmán, G. y Herrera, T. 1970. Especies de macromicetos citadas de México. I. Ascomycetes, Tremellales y Aphylophorales. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología*. 4: 54-76

- Garibay, R. Cifuentes J. Estrada, A. and Caballero, J. 2006. People using macro-fungal diversity in Oaxaca, Mexico. *Fungal Diversity* 21: 41-67
- Girón, M. 1992. Determinación semicuantitativa de saponinas en muestras vegetales aprovechando su capacidad hemolítica. Tesis. Facultad de Química, UNAM. México, D.F. Pág. 30-50
- Gómez-Pompa, A. 1982. La Etnobotánica en México. *Biotica* 7(2): 151-161.
- Gómez, R. Gómez, P. y Ortega, V. 2005. Hongos silvestres comestibles de la comunidad indígena Nicolás Romero, Municipio de Zitácuaro, Michoacán. *Biológicas* 7: 23-27.
- Gonzalez, P. 2001. Efecto del procesamiento con calor sobre la cuantificación de lectinas de frijol y su toxicidad remanente. Tesis. Facultad de Química, UNAM. México, D.F. Pág. 116
- Guzmán-Dávalos L. 1984. Hongos del Estado de Jalisco, IV. Nuevos registros. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología*. 19: 319-326.
- Guzmán G. 1998. Análisis cualitativo y cuantitativo de la diversidad de los hongos en México (Ensayo sobre el inventario fúngico del país). En *La diversidad biológica de Iberoamérica II*, G. Halffter (ed). *Acta Zoológica Mexicana*, nueva serie vol. Especial CYTED e instituto de Ecología, Xalapa: 111-175
- Hansen L. and Knudsen, H. 2000. *Nordic Maromycetes, vol. I. Ascomycetes*. University Printing House, Helsinki. Pág. 40-43
- Hart, F. y Johnstone, H. 1984, *Análisis moderno de los alimentos*. Editorial Acriba, S.A. Zaragoza. Pág. 1-22
- Hawksworth, D. 1991. Fungal dimensión of biodiversity: magnitude, significance and conservation. *Mycological Research* 95: 641-655.
- Hawksworth, D. 2001. The magnitude of fungal diversity: 1.5 million species stimate revisited. *Mycological Research* 105: 1422-1432
- Helrich, K. 1990. *Official Methods of Analysis of the Association Official Analytical Chemists* 16 edition, Vol. 2, AOAC, Arlington. Pág 12

Hernández, M. y Sastre, A. 1999, Tratado de nutrición, Diaz de santos, Madrid. Pág. 335-336

Herrera, T. y Ulloa, M. 1998. El Reino de los Hongos. Micología Básica y Aplicada. UNAM-FCE, México, D.F. Pág. 323-330

Hidalgo G. 1999. Adaptación y validación de métodos cuantitativos para determinar nitratos y taninos en muestras vegetales. Tesis. Facultad de Química, UNAM, México D.F. Pág. 19-24,45-48

Howirtz, W. and Latimer, G. 2005. Official Methods of Analysis of the Association Official Analytical Chemists, 17 edition, AOAC International, Gaithersburg. Pág. 33-42

Jaffé, W. 1968. Factores tóxicos en leguminosas. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 18: 205-218

Kakade, M. Rackis, J. Maghee, J. and Puski, G. 1974. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. Cereal Chemistry 51: 376-380

Kataria, A. Chauhan, B. and Punia, D. 1992. Digestibility of proteins and starch (*in vitro*) of amphidiploids (black gram X mung bean) as affected by domestic processing and cooking. Plant Food for Human Nutrition. 42: 117-125.

Kirk P. Cannon, D. and Stalpers, J. 2001. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the fungi. CABI Bioscience, Wallingford. Pág. 655

Kirk, P. Canon, D. and Stalpers J. 2008. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi. 10th edition. International Mycological Institute, CAB International, Wallingford. Pág 784

Laidler, K. y Meiser, J. 1997. Fisicoquímica. 2da edicion. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. Pág. 45-87.

Liener, I. 1975. Effects of antinutritional and toxic factors on utilization of legume proteins, in Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds. Frieman, M. (Ed.) Marcer Deekker. Inc, Vol.2, New York. Pág. 523-550.

Lincoff G. and Mitchel, D. 1977. Group II. Monomethylhydrazine poisoning. *In: Toxic and hallucinogenic mushrooms poisoning. (A handbook for physicians and Mushrooms hunters)*. Van Nostrand Reinhold Company, New York. Pág. 84.

- Lindner, E. 1995. Toxicología de los alimentos. 2ª edición. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza. Pág. 5-13
- Lodge, J. Ammirati, J. O'Dell, T. and Muleller, G. 2004. Collecting and describing macrofungi. In Mueller G. (Eds.). Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press. San Diego California. Pág 127-130.
- López, G. 2003. Estudio de la composición y valor nutricio de los residuos de uva (*Vitis vinífera*) y su posible uso en la alimentación animal. Tesis. Facultad de Química, UNAM, México D.F. Pág. 43-47.
- López, M. 2000. Determinación de factores tóxicos en varias almendras no tradicionales con potencial aporte de proteína y grasa dietética. Tesis. Facultad de Química, UNAM, México, D.F. Pág. 28-33.
- 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: 71-74
- Manríquez, J. y Romero, J. 1993. Determinación de la digestibilidad del alimento utilizando en la salmonicultura. Una herramienta para su certificación ambiental. Seminario internacional de acuicultura y medio ambiente. Santiago. Pág. 189.
- Marmolejo, J. 2000. Diversidad fúngica en dos ecosistemas forestales del estado de Nuevo León, México. Reporte científico No. 36. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Forestales. Nuevo León. Pág. 43
- Marr, C. and Stunz, D. 1973. *Ramaria* in western Washington. Bibliotheca Mycologica. Cramer Lhere, New York. Pág. 38.
- Martinez, B. y Rincon, F.1997. Inhibidores de tripsina II: efectos del proceso y métodos de determinación. Alimentaria. 279: 15-20.
- Martinez, D. Curvetto, N. Sobal, M. Morales, P. y Mora, V. 2010. Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamerica, Colegio de Postgraduados, Puebla. Pág. 59-76
- Mattisek, M., Schenepel, F. y Steiner, G. 1998. Análisis de los alimentos. 2a edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza.

- Mendoza, M. 2004. Determinación de los hongos asociados con encinos y su importancia ecológica en la porción noroeste de la sierra de Pachuca, Hidalgo. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo. Texcoco. Pág. 33-40
- Mendoza, M. y Calvo, C. 2010. Bromatología, composición y propiedades de los alimentos. Editorial Mc Graw Hill, 1ª edición, México D.F. Pág. 23-34
- Montoya, A. Hernández, O. Estrada A., Kong, A. and Caballero, J. 2003. Traditional knowledge about mushrooms in a Nahuatl community in the state of Taxcala, Mexico. *Mycologia* 95(5): 793-806.
- Moreno A. Garibay, R. Velasco, T. y Cifuentes, J. 2001. Situación actual de la etnomicología en México y el mundo. *Etnobiología* 1: 75-84
- Moreno, A. 2002. Estudio Etnomicológico comparativo entre comunidades rarámuris de la Alta Tarahumara, en el estado de Chihuahua. Tesis de Doctorado de Ciencias. Facultad de Ciencias, UNAM. México. D.F. Pág. 277
- Morfin, L. 1997. Manual de laboratorio, UNAM-FESC4 MVZ Div. Ciencias Pecuarias. México. D.F. Pág. 2-4.
- Palomino, A. 1990. Etnomicología Talhuica de san Juan Atzingo, Estado de México. Tesis de Licenciatura. ENEP Iztacala. UNAM. México. D.F. Pág. 118.
- Pearson, D. 1981, Técnicas de laboratorio para análisis de alimentos, Editorial Acribia. Zaragoza. Pág 54-68
- Peña, A. Arroyo, A. Gómez, A. Gómez, C. y Tapia, R. 2004. Bioquímica. Editorial Limusa S.A. México. D.F. Pág. 65-80
- Pérez, J. Martínez, M. Yesca, A. Delgado, A. y Xoconostle, B. 2008. Wild mushroom markets in central Mexico and a case study at Ozumba. *Econ. Bot.* 62(3):425-436
- Petersen, R. 1968. *Ramaria* (Holmskjöld) S.F. Gray versus *Ramaria* (Fries) Bonorden. *Taxon* 17: 279-280.
- Quintos, M. Varela, L. y Valdés, M. 1984. Contribución al estudio de los macromicetos, principalmente los ectomicorrícicos en el Estado de Durango. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* . 19: 283-290

- Roberts, H. 1981. Food Safety. Wiley interscience Publication. Westport. Pág. 196,245-246.
- Robinson D. 1991. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. Pág. 162-171
- Rodríguez, R. 2010. Evaluación bromatológica y determinación de los factores tóxicos naturales en el grano de frijol gordo (*Phaseolus polynthus*) verde y seco, consumidos en el municipio de Cuetzalan, Puebla. Tesis. Facultad de Química UNAM, México, D.F. Pág. 14-15
- Ruán, F. 2005. Etnomicología en la Selva Lacandona; percepción, uso y manejo de hongos en Lacanjá-chansayab y Playón de la gloria, Chiapas. Tesis de Maestría del Colegio de la Frontera Sur, San Cristóbal de las Casa. Pág. 24-30
- Ruan, J. Garibay, R. y Cifuentes, J. 2004. Conocimiento micológico tradicional en la planicie costera del Golfo de México. Revista Mexicana de Micología 19: 57-70
- Salazar, T. 1999. Sistemas de garantía de calidad. Tecnología de Alimentos. Vol. 34, Num. 8: 18-24
- Sánchez, M. 2005. *Micorrizas: aspectos generales*. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Iztacala, Pág. 33-45.
- Schmit, J. 2007. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. Biodiversity and Conservation 16: 99-111
- Swaisgood, H. and Catignani, G. 1991. Protein digestibility: *in vitro* methods of assessment, Advances in Food and Nutrition Research 35, 185-236
- Takayuki S. y Leonard, F. 1996 Introducción a la toxicología de los alimentos, Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. Pág. 73-78
- Thompson, L. Rea, R. and Jenkins, D. 1983 Effect of heat processing on hemagglutinin activity in red kidney beans. Journal of the Science of Food and Agriculture. 43: 215-228.
- Trappe, J. y Louma, D. 1992. The ties that bind: fungi in ecosystems. In The fungal community-its organization and role in the ecosystems. Carroll G., y D. Wicklow (Eds.). Marcel Dekker. New York. Pág.17-27

Valenzuela, E. Leiva, S. y Godoy, R. 2001. Variación estacional y potencial enzimático de microhongos asociados con la descomposición de hojarasca de *Nothofagus Pumilio*. Revista Chilena de Historia Natural. 74: 737-749.

Valle, P. y Lucas, B. 2000. Toxicología de alimentos. Instituto Nacional de Salud Pública. Centro Nacional de Salud Ambiental. México. D.F. Pág. 59-74.

Vasconcelos, I., and Oliviera, J., 2004. Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon*, 44: 385-403

Villareal, L. 1997. Los hongos silvestres: componentes de la biodiversidad y alternativa para la sustentabilidad de los bosques templados. Instituto de Recursos Genéticos y Productividad. CONABIO. Cd. De México.

Villegas, R. 1987. Revisión de algunas especies del género *Ramaria* subgénero *Lentoramaria* en México. Tesis. Facultad de Ciencias, UNAM, México. D.F. Pág 22-37

Wade L.G. 2004. Química orgánica. 5ª edición. Editorial Pearson. Madrid. Pág. 836.

Xorge A.1979. Métodos de investigación Fotoquímica, Edit. Limusa, México, D.F., Pág. 211-215.

Zhdanova, N., Zakharchenko, V., Vember, V. and Nakonechnaya, L. 2000. Fungi from Chernobyl: Mycobiota of the inner regions of the containment structures of the damage nuclear reactor. *Mycological Research* 104: 1421-1424

ANEXOS

A continuación se presentan todos los resultados de los reactivos obtenidos de la prueba semicuantitativa de alcaloides:

Tabla 11. Resultados de pruebas presuntivas de alcaloides para *H. elastica*

Reactivo	<i>H. elastica</i>	
	Fracción A	Fracción B
Mayer	Negativo	Negativo
Wagner	Positivo	Negativo
Dragendorff	Positivo	Negativo
Sonnenchein	Negativo	Negativo
Hager	Negativo	Negativo
Scheibler	Negativo	Positivo
Ácido silicotungstenico	Negativo	Positivo

Tabla 12. Resultados de pruebas presuntivas de alcaloides para *Ramaria spp*

Reactivo	<i>Ramaria spp</i>	
	Fracción A	Fracción B
Mayer	Negativo	Negativo
Wagner	Negativo	Positivo
Dragendorff	Negativo	Positivo
Sonnenchein	Positivo	Positivo
Hager	Negativo	Negativo
Scheibler	Negativo	Negativo
Ácido silicotungstenico	Negativo	Negativo

Tabla 13. Resultados de pruebas presuntivas de alcaloides para *H. lacunosa*

Reactivo	<i>H. lacunosa</i>	
	Fracción A	Fracción B
Mayer	Negativo	Negativo
Wagner	Negativo	Negativo
Dragendorff	Negativo	Negativo
Sonnenchein	Negativo	Positivo
Hager	Negativo	Negativo
Scheibler	Negativo	Positivo
Ácido silicotungstenico	Negativo	Positivo

Pese a que observamos en todas las tablas algunas pruebas positivas, se necesita obtener mínimo 5 pruebas de reactivos positivos para considerar la presencia de alcaloides, sin embargo ninguna muestra mostró ese resultado, por lo que se concluyó la ausencia de alcaloides.