

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

62

FACULTAD DE QUIMICA

***ESTUDIO BROMATOLOGICO Y TOXICOLOGICO DE
CUATRO ESPECIES DE PAPAS SILVESTRES NATIVAS DE
MEXICO***

**INFORME DE TRABAJO
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRA EN CIENCIAS DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
ELIZABETH CONTRERAS LOPEZ**

MEXICO D.F.

1995





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 SEGUN EL TEMA:

Presidente	Dr. Héctor Bourges R.
Primer vocal	M. en C. Miguel Hernández I.
Segundo vocal	Dr. Pedro Valle V.
Tercer vocal	M. en C. Bernardo Lucas F.
Secretario	Dra. Amanda Gálvez M.
1er Suplente	M. en C. Francisca A. Iturbe Ch.
2do. Suplente	Dr. Jesús Guzmán G.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 111, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM

Asesor del tema: M en C. Angela Sotelo L.

Sustentante: Q.F.B. Elizabeth Contreras L.

AGRADECIMIENTOS

A DGAPA por el apoyo recibido a través del proyecto IN214394.

A CONACyT por el apoyo otorgado durante la realización de la maestría.

A la maestra Angela Sotelo por todo lo que me ha enseñado en este tiempo que he trabajado con ella.

Al maestro Bernardo Lucas por todo el apoyo y enseñanzas que siempre me dió.

A toda mi familia y amigos que nunca me han dejado sola y siempre han confiado en mi.

INDICE

	Pag.
Resumen	i
Objetivos	1
Introducción	2
I Antecedentes	3
Papa	
Producción de papa y factores que la afectan	
Composición química de la papa	
Factores antifisiológicos y tóxicos presentes en la papa	
Generalidades sobre bioensayos toxicológicos	
II Parte experimental	22
Análisis proximal	
Proteína verdadera	
Contenido de vitamina C	
Composición aminoacídica	
Presencia de tóxicos naturales	
Bioensayo de toxicidad con <i>Artemia salina</i>	
Citotoxicidad con linfocitos	
III Resultados y Discusión	43
IV Conclusiones	62
- Recomendaciones	63
V Bibliografía	64

RESUMEN

La papa es originaria de América. Se estima que existen alrededor de 2000 especies del género *Solanum*, de las cuales el mayor número de especies tanto silvestres como cultivadas existen en el Continente Americano, distribuidas principalmente en los andes de Perú y Bolivia. Actualmente el consumo de papa a nivel mundial es alto, y son pocas las especies cultivadas, dejando a un lado las especies silvestres, que en ocasiones son utilizadas para alimentar ganado.

Poco se conoce de la composición de las especies nativas de nuestro país, por lo que resulta importante conocer su valor potencial como alimento.

Para este estudio se colectaron 4 especies silvestres en las zonas de San Luis Potosí, Zacatecas y Guanajuato. Las especies colectadas son las siguientes:

- *Solanum polytrichon* colectada en La Tesorera, Zacatecas
- *Solanum ehrenbergii* colectada en San Angel de Río, San Luis Potosí
- *Solanum cardiophyllum*, colectada en las regiones de La Amapola, San Luis Potosí y en San Elías, Guanajuato
- *Solanum stoloniferum*, colectada en El Jacalón, San Luis Potosí

Las muestras frescas se dividieron en dos lotes de los cuales se obtuvieron las harinas liofilizadas y las sometidas a tratamiento térmico de las pulpas y cáscaras. De manera simultánea se trabajo con la parte aérea de las especies estudiadas.

Los análisis que se realizaron fueron los siguientes:

- Análisis proximal (Proteína bruta, Extracto etéreo, Fibra bruta, Cenizas y Carbohidratos por diferencia)
- Contenido de proteína verdadera
- Contenido de aminoácidos
- Análisis toxicológico (Lectinas, Inhibidores de tripsina y Alcaloides)
- Toxicidad *in vitro* y Citotoxicidad con linfocitos

En las cáscaras solamente se cuantificó alcaloides.

Con los resultados se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- La composición química fue muy similar entre las especies estudiadas y también muy semejante a la de la papa comercial (*Solanum tuberosum*), siendo su mayor componente químico los carbohidratos como corresponde a este tipo de especies tuberosas.

Los aminoácidos limitantes en todas las especies fueron los azufrados y el segundo aminoácido limitante fue la treonina.

- El principal tóxico encontrado en las papas silvestres fueron los alcaloides, distribuidos principalmente en la cáscara.

- Con las dos pruebas *in vitro* escogidas para medir la toxicidad no fue posible encontrar una relación entre la concentración de alcaloides y toxicidad.

OBJETIVO GENERAL

Conocer el contenido nutrimental y la posible utilización en la alimentación humana de algunas especies de papas silvestres nativas de la República Mexicana, considerando su composición química así como la presencia de sustancias tóxicas que quizás hayan impedido su consumo humano y animal en el pasado.

OBJETIVOS PARTICULARES

Conocer la composición bromatológica de algunas especies silvestres del género *Solanum*.

Realizar el análisis cuantitativo de alcaloides en las especies silvestres de *Solanum*.

Cuantificar los factores antifisiológicos presentes en las especies silvestres de papas.

Medir el efecto tóxico *in vitro* y citotóxico de las especies silvestres de *Solanum* colectadas.

INTRODUCCIÓN

La papa representa uno de los alimentos mas importantes del mundo, esto se debe a que su cultivo puede adaptarse a diferentes terrenos, altitudes y climas, además del aporte energético que representa y su bajo costo.

La papa es originaria de América. Los tubérculos de estas especies fueron empleados en la alimentación desde tiempos remotos y fueron parte de la dieta de los primeros pobladores de América. Con la llegada de los españoles la papa fue llevada a España, donde posteriormente fue distribuida a Europa.

Se estima que en el mundo existen alrededor de 2000 especies del género *Solanum*, de las cuales hay alrededor de 160 especies silvestres y solamente son 8 las especies mas cultivadas y 2 las mas importantes (*Solanum tuberosum* L. y *Solanum tuberosum* var. *andigenum* Juz. & Buk).

El mayor número de especies, tanto silvestres como cultivadas, existe en el Continente Americano. Se estima que hay 90 especies de papa silvestres, y aproximadamente 400 variedades de papa cultivada, distribuidas principalmente en los Andes de Perú y Bolivia. En nuestro país, se han clasificado 33 especies silvestres del género *Solanum* y aproximadamente 20 variedades de *Solanum tuberosum*

Actualmente, el consumo de papa a nivel mundial es alto, y son pocas las especies cultivadas, dejando a un lado las especies silvestres, que en ocasiones son utilizadas para alimentar ganado. Es por esto, que el estudio de papas silvestres resulta interesante para conocer su composición y posible uso para aprovechar los recursos regionales.

Este estudio se enfocó exclusivamente a conocer la composición química y toxicológica de algunas de las especies silvestres del género *Solanum* nativas de nuestro país.

ANTECEDENTES

PAPA (Palabra de origen Quechua)

La papa es originaria de América. No existe un informe específico sobre su introducción en Europa, pero los primeros en conocerla fueron los españoles cuando llegaron a Perú, donde se encontraba el antiguo imperio Inca en 1532. El primer dato que se tiene sobre el uso de la papa en la alimentación es de 1573 de un hospital en Sevilla, España. En esa época aún se desconocía la importancia de ésta en la alimentación de los pueblos de los Andes.

De España pasó a Italia y de ahí a Inglaterra en 1596; posteriormente pasó a Alemania en 1601.

En Inglaterra, el botánico John Gerard incluyó la papa en un catálogo en 1596. Debido a problemas en la adaptación del cultivo de la papa, principalmente por el clima europeo y a que inicialmente sólo se obtenían papas pequeñas, el potencial de la papa fue pasado por alto y sólo se vio como una novedad botánica. Pasó largo tiempo para que la papa tuviera un uso más común (1).

Se ha descubierto que muchas de las especies silvestres tienen una alta resistencia a plagas, por lo que actualmente existen programas de investigación para incluir estas variedades en la alimentación.

Por definición la papa es un tallo subterráneo y no una raíz, ya que posee nodos, ojos y otras características de los tallos (2).

Las especies de papa pertenecen a la sección *Petota* del subgénero *Potatoe* del género *Solanum* de la familia *Solanaceae*. De esta sección existen 8 especies cultivadas, siendo las más importantes *Solanum tuberosum* L. y *Solanum tuberosum* var. *andigenum* (3).

Algunos autores en el siglo XVIII y XIX suponían que las papas silvestres escaparon de los cultivos y que solamente requerían ser cultivadas para regresar a la domesticación. Mucho tiempo y esfuerzo fue desperdiciado durante el siglo XIX y principios del XX en intentos por convertir especies silvestres como *Solanum maglia*, *S. commersonn* Dunal y *S. chacoense* Bitter, en papas comestibles (4).

Con el tiempo se ha logrado que la papa sea uno de los alimentos más consumidos a nivel mundial, esto gracias a su bajo costo y alto rendimiento en su cultivo.

PRODUCCIÓN DE PAPA Y FACTORES QUE LA AFECTAN

La papa se cultiva en muchas partes del mundo, siendo los principales productores a nivel mundial la Ex-Unión Soviética, Polonia, Alemania, Estados Unidos y Francia.

En nuestro país, de acuerdo a la Dirección General de Estadística, S.A.R.H. de 1992, la superficie total cosechada fue de 71,121 Ha, con un rendimiento promedio de 16.818 Ton/Ha y una producción total de 1,212,915 Ton. Los principales estados productores de la República Mexicana son Sinaloa, Puebla y Edo. de México.

Dependiendo de la calidad y cantidad de la cosecha, es la parte de la producción que se destina a la fabricación de almidón y alimento para animales, aunque el principal objetivo es la alimentación humana.

La cantidad de papa que se procesa ha ido aumentando en los últimos años. De manera simultánea la cantidad de papa que se utiliza fresca ha disminuido. (5)

Algunos factores que tienen influencia sobre la producción de papa son el tipo de suelo, pH, humedad, temporada, composición mineral del suelo, control de insectos y enfermedades, temperatura, control de maleza y tiempo de cosecha (6). A continuación se explicarán mas ampliamente estos factores.

a. Cultivares

Las variedades de papa difieren en el tiempo de madurez, apariencia, calidad y resistencia a enfermedades y plagas. Las primeras variedades cultivadas eran ásperas, de forma irregular, con gran número de “ojos” y poca resistencia a enfermedades y plagas. Con estas desventajas, a partir de 1925 en el Departamento de Agricultura de Estados Unidos se empezaron a mejorar las variedades logrando que estas sean de forma homogénea, pocos “ojos”, resistentes a enfermedades y plagas. Actualmente en Perú y Holanda existen Centros Internacionales de Papa, donde se continua investigando el mejoramiento de las distintas variedades de papa.

b. Clima

Los factores climáticos que afectan el cultivo de papa son la temperatura, intensidad y período de luz, lluvias y duración del ciclo de cultivo. La papa esta clasificada como un cultivo de temporada fría. La mejor temperatura para el cultivo de papa es de 20°C. La temperatura resulta importante por que tiene

influencia sobre el grado de absorción de nutrimentos y su distribución dentro de la planta, influye también sobre la fotosíntesis y el grado de respiración. A bajas temperaturas el grado de respiración es menor que el de la fotosíntesis, resultando en una mayor acumulación de hidratos de carbono en el tubérculo.

c. Suelo

Los factores del suelo tienen influencia sobre el crecimiento y estructura del tubérculo, estos factores son: aireación, capacidad de retención de agua, temperatura, drenaje y nutrimentos.

El pH óptimo del suelo es de 5.0-5.5. El contenido de humedad del suelo es un factor importante que determina el tiempo de cosecha.

d. Fertilizantes

La papa requiere de grandes cantidades de minerales para su desarrollo, particularmente de nitrógeno y potasio.

Por estudios realizados se conoce que a edad temprana el cultivo de papa requiere fósforo. Otros nutrimentos como magnesio, cobre y zinc son importantes para la calidad nutricional de la papa.

e. Enfermedades de las papas

Las enfermedades, plagas y medio ambiente pueden afectar la producción ó la calidad de la papa.

El ataque de microorganismos causa la pérdida mas seria en la producción de papa. Las enfermedades pueden causar pérdidas cualitativas y cuantitativas .

Las pérdidas patogénicas cuantitativas resultan de la rápida y extensiva ruptura de los tejidos de la papa, como es el caso de la putrefacción rosa, putrefacción seca, putrefacciones bacterianas y algunas enfermedades por virus.

Las pérdidas patogénicas cualitativas son típicamente el resultado de enfermedades como: costras negras y plateadas ó enfermedades deformativas como verrugas. Todas estas enfermedades afectan la apariencia de la papa y por lo tanto hay una influencia sobre el valor del mercado.

Algunas de las enfermedades mas comunes en la papa son las siguientes:

Enfermedades bacterianas causadas por:

- *Erwinia phytophthora* Appoi
- *Erwinia caratorova* Jones
- *Corinebacterium sepedonicum* (Spiedk and Kotth) (Skapt and Burkh)

- *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith

Enfermedades por hongos causadas por:

- Enmohecimiento por *Puccinia pitteriana*
- Manchas por *Thecapora solani*
- Verrugas por *Synchytrium endobioticum*

Las plagas por nemátodos incluyen:

- *Globodera (Heterodera) spp.*
- *Globodera rostochionis*
- *Globodera pallida*

Insectos que atacan cultivos de papa:

- *Drasterius spp.*
- *Lemonium spp.*
- *Hypolithus spp.*

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA PAPA

Los alimentos de origen vegetal representan el mayor aporte nutricional en la alimentación de países subdesarrollados. Esto se debe al bajo costo que tienen los productos vegetales comparados con los productos de origen animal. Entre todos los alimentos de origen vegetal, la papa es uno de los veinte alimentos más consumidos a nivel mundial, debido a sus características de cultivo, que la hacen fácilmente adaptable en una extensa variedad de nichos ecológicos (7,8). La papa es rica en hidratos de carbono, posee además cantidades significativas de otros componentes como proteínas, minerales y vitaminas.

La composición química de la papa depende de varios factores como la variedad, el almacenaje, la temporada de cosecha, tipo de suelo, condiciones de precosecha, y el método de análisis usado por el investigador (6).

Se ha descrito a la papa como un alimento bajo en grasa, fuente importante de vitamina C, hierro y vitaminas del complejo B.

Los principales componentes de la papa serán descritos a continuación:

1. Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono constituyen aproximadamente el 80 % de los sólidos totales de la papa. Son el segundo componente en cantidad (el primero es el agua).

La contribución energética de las papas varia dependiendo de cómo hayan sido cocinadas, en agua o aceite.

Las papas cocidas proveen 0.3 MJ/ 100 g , las papas fritas 0.6 MJ/ 100 g , es decir, 5 y 15 % respectivamente, de los requerimientos diarios.

Entre los hidratos de carbono presentes en la papa existen diferentes tipos, entre ellos se encuentran:

a. Almidón

El almidón es el principal hidrato de carbono en las papas. Mucho del almidón presente se encuentra en forma de gránulos.

Algunos de los factores que influyen en el contenido de almidón son:

- la fertilización del cultivo
- la temperatura de almacenamiento de las papas
- las enfermedades de las papas'
- la aplicación de agentes químicos como plaguicidas
- el tiempo de madurez. de las papas (se ha observado que la amilosa se incrementa con el tiempo de madurez (9))
- Tratamientos mecánicos postcosecha (incrementan la degradación de almidón.

En el almidón la amilosa se encuentra en una proporción de 18.5 a 32 %.

Los tubérculos con gránulos de almidón pequeños contienen una mayor cantidad de amilosa que los tubérculos que tienen gránulos más grandes.

b. Azúcares

El contenido de azúcares en la papa puede variar desde “huellas” hasta un 10 % del peso en base seca del tubérculo.

La sacarosa, la glucosa y la fructosa comprenden el mayor contenido de azúcares presentes en la papa.

Existen también cetoheptosa, melibiosa, melesitosa, y rafinosa en bajas concentraciones (9).

Algunos de los factores que influyen en el contenido de azúcares son:

-el tiempo de cosecha

-la temperatura de almacenamiento (aumenta el contenido de azúcares a baja temperatura)

-la presencia de brotes incrementa el contenido de azúcares

Se ha observado también que existe una mayor concentración de azúcares en el centro de la papa que en la parte exterior.

Las papas almacenadas bajo atmósfera de nitrógeno no acumulan azúcares y se va perdiendo el contenido de almidón.

c. Otros hidratos de carbono

Otros hidratos de carbono presentes en la papa son la celulosa, sustancias pécticas (como protopectina, pectina soluble y ácido péctico), hemicelulosa (contiene ácido glucorónico, xilosa, ácido galacturónico y arabinosa) y otros polisacáridos. La celulosa constituye de un 10-12 % y las sustancias pécticas de 0.7 a 1.5 %.

La cáscara contiene cerca de diez veces más de pectina que la pulpa. La protopectina constituye aproximadamente 70 % del total de las sustancias pécticas.

El almacenamiento de las papas incrementa la pectina soluble y disminuye la protopectina. La pectina soluble representa aproximadamente el 10 % del total de sustancias pécticas.(6)

d. Fibra

A últimas fechas la fibra ha recibido mayor atención ya que ha sido relacionada con la prevención de enfermedades como diverticulosis, ataques al corazón, cáncer de colon y diabetes.

En las papas frescas el contenido de fibra se encuentra entre 1-2 % Este contenido resulta bajo al compararlo con otras raíces y tubérculos y mucho más bajo que la encontrada en cereales y leguminosas. (10).

2. Constituyentes nitrogenados

El contenido de nitrógeno en los tubérculos está influido por las condiciones de cultivo y medio ambiente en las cuales la papa creció. Se ha encontrado una relación inversa entre el contenido de almidón y nitrógeno (6).

Los diferentes constituyentes nitrogenados de la papa son los siguientes:

a. Proteínas

El contenido de proteínas en la papa varía de 1-2 % (base húmeda), a pesar de tener un contenido bajo, en estudios realizados se indica que la proteína de la papa es de buena calidad.

Las dos principales proteínas de la papa son la tuberina y la tuberinina (5) . Solo la mitad del nitrógeno está en la forma de proteínas. Algunos resultados indican que la proporción de nitrógeno proteínico y no proteínico varía enormemente de una variedad a otra . Se ha demostrado también que los materiales nitrogenados no se encuentran distribuidos de manera uniforme en todo el tubérculo así, los materiales nitrogenados están presentes principalmente en la cáscara y corteza.

b. Aminoácidos

Del total del nitrógeno presente en el tubérculo, la fracción no proteínica comprende desde la mitad hasta dos terceras partes, presente en la forma de aminoácidos libres.

En la papa, la asparagina y la glutamina están presentes en cantidades muy similares y juntas constituyen cerca de la mitad del total de aminoácidos.

La metionina y cistina/cisteína son los aminoácidos limitantes de la papa, esta deficiencia puede resolverse al suplementar dietas de papa con cereales.

Se ha encontrado que la calidad de la proteína de la papa es superior a la del arroz. El PER encontrado en ratas alimentadas con papa es alto (11).

La calidad de las proteínas de la papa varía considerablemente entre lotes de la misma variedad. Existe poca información en lo concerniente a la influencia de la variedad, prácticas culturales, factores de clima y medio ambiente sobre la calidad de la papa.

c. Enzimas

Otro de los componentes proteínicos de la papa son las enzimas, entre estas se encuentran: polifenol oxidasa, peroxidasa, catalasa, esterasa, enzimas proteolíticas, invertasa, fosforilasa y ácido ascórbico oxidasa. Estas enzimas tienen influencia sobre las propiedades de procesamiento de la papa y se encuentran involucradas en los brotes (6).

3. Lípidos

La cantidad de lípidos presentes en la papa es baja (aproximadamente 0.1 % en la papa fresca), aunque algunos autores señalan que la calidad de los lípidos de la papa no debe ser juzgada por su cantidad.

4. Vitaminas

Las papas son una fuente excelente de ácido ascórbico, tiamina, niacina, piridoxina (y sus derivados) (12).

El contenido de vitaminas en las papas varía dependiendo algunos factores como: variedad, madurez, tipo de suelo, condiciones de almacenamiento y temperatura de cocimiento.

La papa puede contener 30 mg ó mas de ácido ascórbico por 100 g de peso de tejido fresco, este valor disminuye cuando las papas son almacenadas, cocidas o procesadas.

La vitamina C en la papa está presente tanto en la forma reducida (ac. ascórbico) como en el estado oxidado (ac. deshidroascórbico), pero el contenido de este último es usualmente bajo (13).

La vitamina C es un nutrimento abundante en la papa, necesario en la dieta ya que por ser un antioxidante reacciona con radicales libres.

Otra de las vitaminas que se encuentran en la papa es la vitamina B₆, la cual ha sido propuesta para el tratamiento de enfermedades crónicas como anemia, asma, cáncer y enfermedades cardiovasculares. La papa es la tercera fuente importante de vitamina B₆ para adultos de 19-74 años, superada por la carne de res y bebidas alcohólicas.

5. Minerales

La papa es un buen aportador de hierro, fósforo, magnesio y otros minerales.

El contenido de hierro es comparable al encontrado en otras raíces y tubérculos. La papa tiene una disponibilidad de hierro superior a la de otros alimentos vegetales.

La papa también es una buena fuente de fósforo. Un porcentaje bajo de este se encuentra en la forma de ácido fítico. Como se sabe, el ácido fítico interactúa

con el calcio, hierro y zinc en la forma de fitatos. Este tipo de complejos no se encuentran disponibles para ser absorbidos por el organismo.

Las papas aportan poco calcio y sodio, pero son abundantes en potasio. Por esta razón las papas pueden usarse en dietas para restringir el contenido de sodio en pacientes con presión sanguínea alta.

Otros minerales encontrados en la papa son el magnesio, cobre, cromo, manganeso, selenio y molibdeno. (6)

FACTORES ANTIFISIOLOGICOS Y COMPUESTOS TÓXICOS PRESENTES EN PAPA

Existe un alto contenido de proteínas en el reino vegetal que no es explotada por el hombre para su alimentación y la de animales. Esto se debe a la presencia de factores tóxicos y antifisiológicos que limitan el consumo de especies silvestres.

Estos factores limitantes pueden desaparecer con la ayuda de procesos tecnológicos.

Entre los factores tóxicos más comunes en los materiales vegetales se encuentran: inhibidores de proteasas, hemaglutininas, factores bociogénicos, saponinas, alcaloides y aminoácidos raros, principalmente (6).

La detección de estos factores resulta importante, ya que en casos extremos algunos de estos tóxicos pueden llegar a causar la muerte al ser consumidos. En la papa se ha identificado la presencia de factores tóxicos y antifisiológicos que a continuación se describen .

1. Hemaglutininas (o lectinas)

Desde 1888 ya se conocía el efecto aglutinante de las lectinas.

Las lectinas han sido detectadas en virus, bacterias, algas, hongos, plantas superiores, esponjas, crustáceos, moluscos y en otros invertebrados y vertebrados.

Las lectinas son proteínas (en su mayoría glicoproteínas) con una afinidad muy selectiva por los residuos glicosídicos presentes en la superficie de los glóbulos rojos, de ahí que el nombre de lectina derive del latín “legere” que significa elegir.(14)

Se ha sugerido que las lectinas constituyen una clase especial de proteínas de almacenaje. Las semillas de leguminosas pueden presentar hasta un 20 % de lectinas del contenido total de proteína.

Se ha observado que en general las lectinas se concentran en las semillas, pero en otras partes de la planta puede haber lectinas las cuales pueden ser idénticas, similares o diferentes de las que se encuentran en la semilla.

En cuanto al género *Solanum*, Marcusson y Begun observaron en 1925 actividad hemaglutinante en el jugo de papa. Posteriormente una lectina de papa fue purificada en 1962 por Ensgraber. La actividad aglutinante varía en los diferentes cultivares de papa; algunos son escasos en actividad aglutinante mientras que otros presentan altos títulos de aglutinación. (15,16)

Las lectinas de la papa tienen especificidad por azúcares, similar a las lectinas del germen de trigo (17).

Existen muy pocos estudios disponibles sobre el significado nutricional de las lectinas de la papa (6).

Las lectinas en una primera etapa se unen a las células epiteliales en el intestino, ocurriendo así cambios en el proceso de absorción.

Las lectinas específicas de N-acetilglucosamina (como las del germen de trigo y papa) y las que tienen especificidad sobre hidratos de carbono complejos, se unen ávidamente al epitelio del intestino delgado de ratas, interfiriendo con la absorción.

Las lectinas varían considerablemente en la naturaleza y efecto antifisiológico; algunos de los efectos son los siguientes (18):

- Se ha observado una pérdida del músculo esquelético en ratas alimentadas con dietas altas en lectinas.

- Interfieren en la secreción y síntesis de insulina pancreática.

- Las dietas altas en lectinas pueden causar reducción en el tamaño del timo y un ligero aumento en el tamaño del hígado (las implicaciones fisiológicas y metabólicas de estos cambios permanecen desconocidas).

- Las lectinas actúan como factores de crecimiento del intestino de ratas, por lo que puede doblar su peso de 5 a 10 días. Este incremento se debe a la hipertrofia e hiperplasia.

- Inducen también el crecimiento del páncreas.

-Causan acortamiento de las vellosidades, ruptura severa y desarrollo anormal de la microvellosidades del intestino. Esto causa finalmente una reducción en la actividad enzimática propia del intestino hay un efecto sobre enteroquinasa, leucina aminopeptidasa, fosfatasa alcalina, maltasa, sacarasa y una disminución en la absorción de los lípidos, glucosa y electrolitos.

-Provocan cambios en la flora intestinal, debido quizá a que se incrementa el número de sitios potenciales de unión a bacterias en el epitelio del intestino delgado.

-Causan también un incremento en la excreción de material endógeno.

Por otra parte, las lectinas tienen un papel benéfico dentro de la planta ya que protegen a la misma contra depredadores y parásitos.

2. Inhibidores de proteasas

Los inhibidores de proteasas son proteínas que inhiben la actividad proteolítica de ciertas enzimas. En el reino vegetal se encuentran distribuidos principalmente en las leguminosas.

En las plantas tuberosas, como la papa, se encuentran distribuidas tanto en las hojas como en el tubérculo.

En los cereales se encuentran distribuidos principalmente en el endospermo y en menor cantidad en el germen.

En el caso de la papa (*Solanum tuberosum*), la concentración de inhibidores de proteasas se encuentran entre 15-25% de las proteínas solubles del tubérculo. Se han identificado 13 diferentes clases de inhibidores, de los cuales 10 se han purificado y caracterizado parcialmente dentro de tres categorías (15) :

Inhibidor 1 peso molecular de 39 000

Inhibidor 11 peso molecular de 2 100

Inhibidor de carboxipeptidasa peso molecular de 4 100

Los tubérculos presentan altas concentraciones de inhibidores de proteasas (20-23). Entre estos inhibidores de proteasas se encuentran: los inhibidores de tripsina, de quimotripsina (19) y el inhibidor de la calicreina.

La especificidad de inhibición varía de un inhibidor a otro .

Se ha informado también la existencia de un inhibidor de enteroquinasa en papas (24). Esto resulta importante porque la enteroquinasa inicia la reacción que activa las proteínas en el sistema digestivo de los animales, por lo que este inhibidor puede afectar el proceso de digestión.

La composición en aminoácidos de los diferentes inhibidores de proteasas en la papa es similar (25) .

El inhibidor de quimotripsina funciona como una proteína de almacenaje durante el desarrollo de la planta de papa .

Se ha informado que la cocción ó el calentamiento por microondas destruyen mucha de la actividad inhibitoria, pero el inhibidor de carboxipeptidasa es extremadamente estable.

Se ha encontrado que el inhibidor de quimotripsina es responsable de la baja utilización del nitrógeno en cerdos (26).

La digestibilidad del nitrógeno en la papa cruda es del 32.8 % mientras que la tratada por calentamiento tiene una digestibilidad del 89.8 %. La digestibilidad de papas parcialmente cocidas es del 48 %. Estos estudios indican que el bajo aprovechamiento de los nutrimentos de la papa cruda se debe a la presencia de factores antifisiológicos.

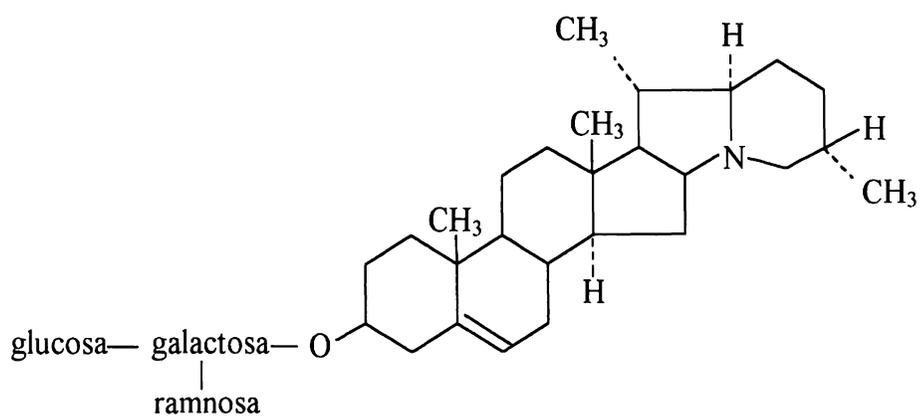
Estos inhibidores de proteasas presentes en la papa, están implicados en los mecanismos de defensa de los tubérculos contra el ataque de plagas (20).

Existe especulación sobre el papel que juegan los inhibidores de proteasas dentro de la planta. Su acción es inhibir las proteasas pero se desconoce si esta acción es directamente a proteasas endógenas ó a proteasas exógenas producidas por organismos que invaden la planta.

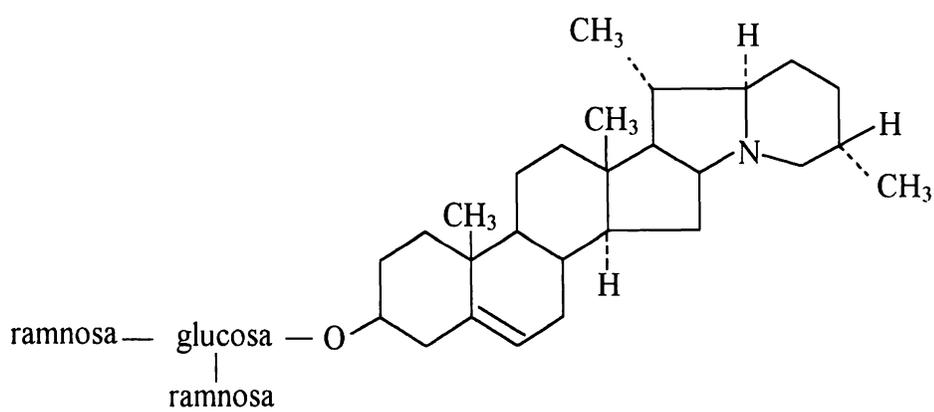
Dentro de la planta, los inhibidores de proteasas juegan un papel importante en el mecanismo de defensa de la planta. Cuando una planta sufre un daño mecánico o un ataque por insectos, ocurre una acumulación de los inhibidores de proteasas no solamente en el sitio del daño, sino también en tejidos adyacentes; y así suprimen el crecimiento del patógeno invasor.

También se presume que los inhibidores de proteasas impiden la germinación durante el almacenamiento de granos ó previenen la degradación de proteínas de reserva durante la maduración de semillas.

Entre los efectos que producen los inhibidores de proteasas cuando son ingeridos en la dieta, se encuentran los que causan hipertrofia e hiperplasia del páncreas en ratas. Algunos autores señalan que existe una depresión en el crecimiento causada por los inhibidores de tripsina y puede ser el resultado de una pérdida endógena de aminoácidos indispensables derivado de una



α - Solanina



α - Chaconina

Figura 1

La concentración de glicoalcaloides depende de los siguientes factores:

- La constitución genética
- Factores de cultivo como suelo, localización geográfica, clima, edad del tubérculo y fertilización.
- Manejo postcosecha

Dentro del factor postcosecha las condiciones de estrés, de almacenamiento, la exposición a la luz afectan el contenido de glicoalcaloides. Se ha observado también que después de un daño físico, los tubérculos sintetizan alcaloides que normalmente no se encuentran presentes.

La función que tienen los glicoalcaloides dentro de la papa aún no es clara, pero su presencia se ha asociado con un papel de protección y resistencia contra los insectos, hongos, etc. que puedan atacar a la planta.

El consumo de papa que presenta altas concentraciones de glicoalcaloides provoca envenenamiento y esporádicamente son fatales tanto en seres humanos como en animales. Los síntomas incluyen alteraciones gastrointestinales y neurológicas; se ha observado que la solanidina es menos tóxica que la α -solanina.

Los alcaloides se han asociado con efectos teratogénicos. (28,15, 30).

Concentraciones mayores a 3 mg/kg peso pueden ser letales a seres humanos .

GENERALIDADES SOBRE BIOENSAYOS TOXICOLÓGICOS

Para conocer la toxicidad de un nuevo agente xenobiótico es necesario realizar pruebas toxicológicas que involucran algunas especies animales como: ratas, ratones, conejos, perros, monos, y otros. Estos son empleados en cinco áreas principales:

- Estudios generales de toxicidad (Con duración de hasta 1 año)
- Estudios sobre el efecto de tóxicos en la reproducción (efecto sobre fertilidad, desarrollo del embrión o desarrollo psicomotor perinatal)
- Ensayos de mutagenicidad, llevados a cabo *in vitro* observándose daño a nivel de DNA.
- Estudios de carcinogenicidad llevados a cabo en roedores.
- Ensayos especiales como hipersensibilidad, fototoxicidad y reacciones en la piel.

hiperactividad del páncreas como una respuesta compensatoria al efecto del inhibidor de tripsina.

El inhibidor de quimotripsina encontrado en la papa es destruido rápidamente con calentamiento.

3. Alcaloides

Los alcaloides son metabolitos secundarios nitrogenados distribuidos principalmente en el reino vegetal.

En papas y tomates se han encontrado al menos 20 alcaloides estructuralmente diferentes y cerca de 300 en otras especies de *Solanaceae*.

La papa común (*Solanum tuberosum*) contiene glicoalcaloides derivados biosintéticamente del colesterol.

En general, los glicoalcaloides están presentes en bajas concentraciones (0.01 a 0.1 g/100 muestra en base seca) (27,28) ; sin embargo, pueden acumularse cuando las papas están inmaduras, son almacenadas, dañadas o irradiadas.

Los principales glicoalcaloides encontrados en la papa son la α -chaconina y α -solanina (Figura 1), se encuentran en una proporción del 95% del total de los glicoalcaloides presentes ; ambos son derivados glicosilados del aglicón solanidina, y se ha encontrado que existe ligeramente un mayor contenido de α -chaconina que de α -solanina.

El resto de la fracción de glicoalcaloides consiste en otros glicósidos de solanina, otros alcaloides solanidanos y un segundo tipo de alcaloides, los spirosolanos.

La concentración de alcaloides encontrada en papas destinadas a consumo humano es de 2-13 mg/100 g de peso fresco.

En la papa la mayor proporción de glicoalcaloides se localiza en la cáscara (ó piel), inmediatamente debajo de ella y en áreas de alta actividad metabólica como las regiones de los “ojos” (29).

En papas que contienen altas concentraciones de glicoalcaloides, estos pueden encontrarse también difusos en la pulpa. Los tallos, hojas y flores son mucho mas ricos en glicoalcaloides que el tubérculo

En papas que contienen altas concentraciones de glicoalcaloides, estos se encuentran también difusos en la pulpa. Los tallos, hojas y flores son mucho más ricos en glicoalcaloides que el tubérculo.

Los hallazgos clínicos, hematológicos, bioquímicos, exámenes patológicos e histopatológicos ayudan a interpretar los datos cinéticos concernientes a la absorción y al metabolismo del agente xenobiótico en animales y en el hombre, por lo que este tipo de estudios en animales no pueden ser reemplazados totalmente por pruebas *in vitro*, ya que la complejidad de un organismo no puede ser reducida a un estudio celular *in vitro*.

Actualmente con el progreso de la biología celular y molecular, así como con la mejora en la técnicas de cultivos celulares, cada vez más y más investigadores emplean estudios toxicológicos *in vitro* con células.

Las técnicas *in vitro* son empleadas para afinar pruebas con animales esto con la finalidad de disminuir el número de animales usados y en algunos casos reemplazar pruebas con animales por pruebas *in vitro*.

Una de las desventajas de las pruebas con animales es que solo del 20-30 % de los efectos tóxicos encontrados pueden ocurrir en el hombre, por lo que existe una necesidad de mejorar la predicción del efecto de una droga sobre el organismo humano.

El uso de cultivos celulares provee un método no solamente de investigación de mecanismos de toxicidad, sino también el de evitar extrapolar problemas relacionados a las especies, específicamente por el uso de células humanas.

Por razones éticas, económicas y científicas la introducción de la biología celular y molecular dentro de la toxicología, ha contribuido al desarrollo de métodos alternativos y complementarios al estudio de la toxicología *in vitro*.

Algunas de las ventajas de los ensayos *in vitro* es que son rápidos, requieren de pequeñas cantidades de muestra y es posible manejar un gran número de muestras.

El hecho de que células humanas (como linfocitos, eritrocitos, etc.) puedan ser usadas es una de las mayores ventajas de los métodos *in vitro*, porque los resultados pueden extrapolarse directamente al hombre. (32)

BIOENSAYO CON *Artemia salina*

Existen muchos compuestos que son aislados, caracterizados, etc. , pero su potencial biológico es desconocido. Realizar un estudio para buscar actividad farmacológica, frecuentemente es mucho más caro que el proceso de obtención y fraccionamiento de la planta, por lo que la búsqueda de actividad específica no siempre se realiza.

El uso de *Artemia salina* ha facilitado que se realice este tipo de bioensayos, además de que el costo es inferior. En un futuro se debe de pensar en incorporar bioensayos para conocer la actividad biológica e identificar posteriormente el compuesto bioactivo; para lo cual tres tecnologías podrían ser combinadas:

-Técnicas de separación (cromatografía)

-Métodos de elucidación estructural (espectrómetros de masas, infrarrojo, cristalografía, etc.)

-Bioensayos

Hoy en día, los dos primeros métodos son muy empleados en los productos naturales, pero se ignora el tercero.

Los bioensayos se puede ayudar a fraccionar y aislar nuevos prototipos de drogas, principalmente en países donde existe la medicina tradicional. Una vez aislados los principios activos, es recomendable un análisis estructural si en estos compuestos ha sido demostrada previamente una bioactividad alta. Para monitorear e ir fraccionando nuevos compuestos bioactivos son convenientes los ensayos de letalidad *in vivo*. Para este tipo de pruebas *Artemia salina* ha dado también buenos resultados con las siguientes ventajas: es rápido el crecimiento de la larva (24 hrs.), además de ser barato y simple, no se requieren técnicas de asepsia. Utiliza un gran número de organismos para su validación estadística, no requiere ningún equipo especial y la cantidad de muestra empleada es del rango de 2-20 mg.

Este tipo de bioensayos es mas barato que los ensayos citotóxicos, pero no detectan una actividad fisiológica específica.

Compuestos antitumorales y pesticidas naturales han sido aislados y su actividad monitoreada mediante el uso de estos bioensayos. (33,34)

Dichos bioensayos podrían ser empleados para estudiar la toxicidad de componentes tóxicos presentes en muestras vegetales.

CITOTOXICIDAD EMPLEANDO LINFOCITOS HUMANOS

Los linfocitos son células mononucleares de 7-12 μ . Contienen cromatina nuclear densamente empaquetada y un pequeño borde de citoplasma que se tiñe de color pálido con los colorantes de Ramanovsky.

Existen dos tipos de linfocitos:

-Los linfocitos T son células derivadas del timo que participan en diversas reacciones inmunológicas.

-Los linfocitos B son células estrictamente derivadas de las bolsas de Fabricio en las aves, y por analogía, células equivalentes a las derivadas de la bolsa en especies no aviarias. Las células B son las precursoras de las células plasmáticas que producen anticuerpos.

Tanto los linfocitos T como los linfocitos B provienen de las células precursoras en la médula ósea (35).

Los linfocitos tienen propiedades físicas heterogéneas, que los hacen diferentes de las otras células de la sangre. Estas mismas características pueden usarse para distinguir linfocitos y sus subpoblaciones. Las propiedades que más han sido estudiadas son: tamaño, densidad, adherencia y carga.

Reacciones

Cuando los linfocitos son incubados con el antígeno al cual son sensibles ó con mitógenos no específicos como fitohemaglutininas, los linfocitos tienen la capacidad de diferenciarse y transformarse a blastos y proliferar.

Algunos agentes que inducen un efecto sobre linfocitos son:

-Antígenos solubles (bacterianos, fúngicos ó polen, proteínas, drogas, polímeros sintéticos de aminoácidos)

-Células alogénicas (cultivos mezclados de linfocitos)

-Fitomitógenos: fitohemaglutininas de frijol (*Phaseolus vulgaris*), Concanavalina A (*Canavalia ensiformis*), de lenteja (*Lens culinaris*).

-Productos bacterianos: lipopolisacáridos, enterotoxinas.

-Anticuerpos: antilinfocitos, anti-inmunoglobulinas, hidratos de carbono específicos.

-Sustancias químicas: metaperiodato de sodio, metales pesados (zinc, mercurio, níquel), enzimas proteolíticas (papaina) y calcio. (36)

Aislamiento de linfocitos

En los animales se pueden obtener linfocitos de órganos linfoides, como timo, bazo y nódulos linfáticos, en los cuales 95 % ó más de las células son linfoides.

En el hombre, la obtención de linfocitos es a partir de la sangre, por lo que el aislamiento de linfocitos requiere de la eliminación de eritrocitos, células

polimorfos y monocitos. El método usual de separación emplea una mezcla de Ficoll ó triosil, el cual tiene una densidad intermedia entre los linfocitos y las células polimorfos. Después de la centrifugación, los eritrocitos y las células polimorfos atraviesan el Ficoll dejando atrás las células mononucleadas (linfocitos y monocitos esencialmente).

Otro método para separar linfocitos es mediante una filtración a través de nylon o a través de una columna de algodón, la cual retiene monocitos y células polimorfos, pero permite el paso de un porcentaje significativo de linfocitos puros. La desventaja de esta técnica es que se pierden ciertas subpoblaciones de linfocitos (B y células T inmaduras) (36).

Los linfocitos se emplean en pruebas de citotoxicidad por que presentan las siguientes ventajas:

- fácil separación de otras células
- son células vivas
- los resultados pueden extrapolarse a seres humanos
- pueden utilizarse los llamados colorantes vitales
- fácil observación y conteo

Otro tipo de células que han sido empleadas para detectar actividad específica de fracciones proteínicas son las células epiteliales (37,38).

PARTE EXPERIMENTAL

El interés por estudiar las papas silvestres mexicanas se originó al revisarse un estudio botánico que informaba que en México habían sido localizadas algunas especies de papas silvestres, cuya composición química y toxicológica no era conocida, pero que se sabía del efecto tóxico de algunas de ellas.

Para este estudio se recolectaron 4 especies de papas silvestres en la zona del altiplano de San Luis Potosí y Zacatecas, y una especie en Guanajuato,. en dicha recolecta se incluyó la parte aérea de la papa (tallo y hojas) y el tubérculo.

A continuación se muestra la clasificación de los especímenes colectados, el lugar donde se colectaron, los nombres de los colectores, los números de registro y el herbario donde depositaron los ejemplares.

-*Solanum polytrichon* Rydb

La Tesorera; terreno de cultivo, Mpio. Pánfilo Natera, ZACATECAS 10 septiembre 1994; M. Luna C., A. Ruiz C. y M. C. López 1033 (FEZA).

-*Solanum ehrenbergii* (Bitt.) Rydb

San Ángel del Río; terreno de cultivo, Mpio. Salinas, SAN LUIS POTOSÍ: 1 octubre 1994; M. Luna C. y A. Ruiz C. 1037 (FEZA).

-*Solanum cardiopyllum* Lindl.

San Elías; terreno de cultivo, Mpio. Dolores Hidalgo, GUANAJUATO, 10 septiembre 1994; M. Luna C., A. Ruiz C. y M. C. López 1032 (FEZA).

-*Solanum cardiophyllum* Lindl.

La Amapola, Ejido Escalerillas, terreno de cultivo, Mpio. San Luis Potosí, SAN LUIS POTOSÍ, 2 octubre 1994; M. Luna C. y A. Ruiz C. 1038 (FEZA).

-*Solanum stoloniferum* Schlecht

La Amapola, Ejido Escalerilla; terreno de cultivo, Mpio. San Luis Potosí, SAN LUIS POTOSÍ, 16 septiembre 1994; M. Luna C. y A. Ruiz C. 1035 (FEZA).

ANÁLISIS PROXIMAL

Realizado de acuerdo a las técnicas oficiales del AOAC (39), el cual consta de los siguientes análisis (40):

- Humedad
- Cenizas
- Grasa bruta
- Proteína bruta
- Fibra bruta
- Hidratos de carbono (calculados por diferencia)

Todos los análisis se realizaron por duplicado.

PROTEÍNA VERDADERA

Fundamento

La técnica se basa en la solubilización del nitrógeno no proteínico así como de la proteína soluble y la precipitación posterior de dicha proteína con tungstato de sodio con el fin de eliminar el nitrógeno no proteínico que puede interferir en la cuantificación del nitrógeno por medio de la técnica de Kjeldahl. Con este método la proteína no soluble también es tomada en cuenta ya que en la etapa de filtración esta incluida junto con la proteína soluble precipitada. (41)

Reactivos

(a) **Solución precipitante:** disolver 5 g de tungstato de sodio y 1.51 g de fosfato dibásico de sodio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) en 20 ml de agua, añadir 22 ml de ácido clorhídrico 2 N, mezclar y aforar a 50 ml con agua destilada.

Procedimiento

Precipitación

Se pesan de 50-100 mg de muestra (finamente molida) en un vaso de precipitados de 50 ml. Agregar 5 ml de agua caliente y agitar mecánicamente por 15 minutos, se agregan 2 ml de la solución precipitante y se deja reposar 10 minutos transferir cuantitativamente para su filtración en papel Whatman No.5 utilizando 25 ml de agua destilada caliente y succión ligera.

Digestión

Colocar el papel filtro con el precipitado en un tubo de digestión, agregar 0.5 g de K_2SO_4 y 5 ml de la mezcla digestiva, posteriormente colocarlo en el digestor por espacio de 15 minutos a una temperatura inferior a $370^\circ C$, se retira del digestor y se espera a que se enfríe para añadirle 3 ml de H_2O_2 al 30 % ; se introduce nuevamente al digestor y se calienta hasta que la digestión sea completa (aproximadamente 30 minutos a una temperatura de digestión de $370^\circ C$).

Destilación

Una vez efectuada la digestión se lleva a cabo una destilación en el microdestilador de acuerdo a la técnica de Kjeldahl Finalmente titular con HCl 0.01 N, hasta un vire de color verde esmeralda a rosa fresa.

Nota 1: Es conveniente correr un blanco en las mismas condiciones que la muestra, pero sustituyendo la muestra por glucosa ó sacarosa e incluyendo el papel filtro.

Nota 2: La cuantificación de proteína verdadera se realizó por duplicado.

Cálculos

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

$$\% \text{ Proteína verdadera} = \% \text{ N} \times 6.25$$

donde:

B= cantidad empleada para la titulación del blanco

P= cantidad empleada para la titulación de la muestra

N= Normalidad del HCl

meq= miliequivalentes del nitrógeno

m= peso de la muestra en gramos.

CUANTIFICACION DE VITAMINA C

Fundamento

La vitamina C por su poder reductor decolora al indofenol (diclorofenol indofenol) colorante azul pasandolo a la forma reducida incolora o leucobase; la cantidad decolorada es proporcional a la cantidad de reductores (vitamina C) presentes. (42)

Reactivos

(a) **Solución patrón de vitamina C:** preparar una solución de ácido acético al 5% que contenga 1 mg de la solución de vitamina C por ml.

(b) **Preparación y titulación del indofenol:** pesar 25 mg de diclorofenol-indofenol y 21 mg de bicarbonato de sodio, disolver y aforar a 500 ml con agua destilada. Para su titulación tomar 1 ml de la solución patrón de ácido ascórbico (vitamina C) agregar 9 ml de la solución de ácido acético al 5%, poner la solución de indofenol en una bureta y titular hasta color rosa persistente (37.5 ml corresponden aproximadamente a 1 mg de vitamina C).

Procedimiento

Preparación de la muestra

Tomar 5 g del alimento y homogeneizarla con 50 ml de ácido acético al 5 % (para impedir la acción oxidante de algunas oxidasas presentes en el tejido vegetal) con la ayuda de arena lavada para moler la muestra. Filtrar la mezcla en un matraz aforado de 100 ml, lavando cuantitativamente y aforar con agua destilada.

Titulación

Pipetear 10 ml del extracto de la muestra dentro de un matraz Erlenmeyer y titular con el indofenol. El color azul vira al rosa tan pronto como se pone en contacto con la vitamina C presente; continuar la adición del indofenol hasta que persista un color rosa por lo menos 10 segundos esto significa que la cantidad de colorante agregado ha reaccionado con todo el ácido ascórbico presente.

Nota: La cuantificación de Vitamina C se realizó por triplicado.

Cálculos

$$\frac{\text{vit C mg}}{100\text{g de alimento}} = \frac{\text{vit C patrón mg}}{\text{indofenol patrón ml}} \times \frac{\text{aforo ml}}{\text{alicuota ml}} \times \frac{\text{indofenol muestra ml}}{\text{muestra g}} \times 100$$

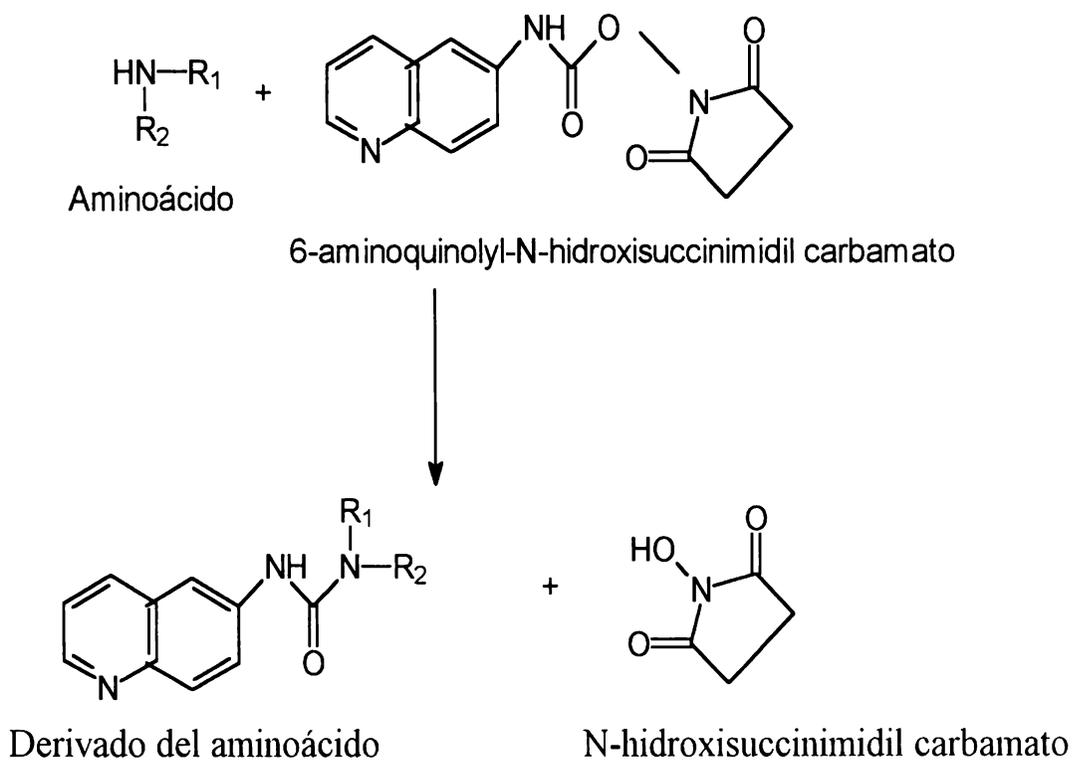
AMINOÁCIDOS

Esta cuantificación se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). (43,44)

Fundamento

Consiste en realizar la hidrólisis ácida de las proteínas seguida de la formación de los derivados fluorescentes de los aminoácidos, con la separación y detección posterior de cada aminoácido .

Reacción de derivación:



Eluyentes

(a) Eluyente A:

Acetato de sodio	19.0%
Ácido fosfórico	6.9%
Trietilamina	1.72%
Azida de sodio	0.1%
Agua grado HPLC	72.28%

La solución buffer puede ser adquirida ya preparada y diluida en la siguiente proporción: 50 ml de A conc. + 500 ml de H₂O grado HPLC

(b) Eluyente B:

Acetonitrilo	60 %
Agua HPLC	40 %

Procedimiento

Hidrólisis

Se pesa dentro del tubo de hidrólisis la cantidad de muestra finamente molida y desgrasada (el contenido de grasa en la muestra debe ser menor del 5 %) de acuerdo a la fórmula siguiente (1).

Se adiciona con mucho cuidado la cantidad de HCl 6 N requerida de acuerdo a la fórmula (2), tratando de que toda la muestra se humedezca con el reactivo de hidrólisis; de ser necesario se puede ayudar con un agitador mecánico vortex).

$$(1) \quad A = \frac{0.0125 \times 100}{\% P}$$

$$(2) \quad B = \frac{1 \times 100\%}{P}$$

Donde;

A= Cantidad de muestra en gramos

B= ácido HCl 6N (ml)

P= g proteína/100 g muestra

Se insufla nitrógeno al tubo y se cierra perfectamente. Posteriormente se somete a las condiciones de hidrólisis en el digestor tecedor por 4 h a 145° C.

Una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis, se deja enfriar un poco el tubo y se transvasa cuantitativamente a un matraz de bola de 100 ml, lavando el tubo con agua caliente y solución lavadora agua:etanol (3:1 v/v). En el rotavapor se elimina el ácido, llevándolo a sequedad dos veces, a continuación se concentra el hidrolizado en el tercer lavado a un volumen menor de 30 ml.

El hidrolizado concentrado se filtra a través de papel filtro (Whatman No. 542) sobre un embudo buchner y un matraz kitasato con ayuda de vacío; es conveniente dar un lavado con 5 ml de la solución lavadora, enjuagando el matraz de bola y filtrando.

Al hidrolizado filtrado se le agregan 2 ml del patrón ac. α -amino butírico 2.5 mM y se afora a un volumen de 50 ml. Cuando la muestra no vaya a ser analizada inmediatamente es apropiado ajustar el hidrolizado a un pH de 6.8 ± 0.2 con la ayuda de un potenciómetro y NaOH 5 N.

Filtración

Para activar el sep-pack C₁₈:

-Se pasan 6 ml de acetonitrilo grado HPLC, en seguida se pasan 6 ml de agua grado HPLC y de esta forma queda activado el sep-pack. La muestra se filtra previamente por membrana de 0.22 μ m eliminando el primer mililitro, se toman 2 ml de esta muestra filtrada y se mezclan con 2 ml de acetonitrilo al 20 %, se mezclan y se hacen pasar por el sep-pack activado; se elimina el primer mililitro. Es importante que la muestra se pase lentamente por el sep-pack.

Derivación

Colocar con una micropipeta 20 μl de muestra filtrada en el fondo de un tubo de 6 x 50 mm, adicionar 60 μl de buffer AccQ. Fluor -Borato y agitar brevemente, enseguida adicionar 20 μl del reactivo AccQ Fluor al tubo con la muestra, dejar reposar a temperatura ambiente durante 1 min. Tapar el tubo con cinta teflón y colocar en el bloque de calentamiento a 55°C durante 10 min., transcurrido el tiempo, se deja enfriar a la temperatura ambiente por 5 min. para posteriormente inyectarla en el HPLC.

Condiciones del HPLC

Columna Nova pak C₁₈, 4 μm

Diámetro medio de poro 60°A 3.9 x 150 mm

Temperatura de la columna 36°C

Detector de fluorescencia de longitud de onda variable (Waters 486)

λ EX 250 nm

λ EM 395 nm

Volumen de inyección 5.0 μl

Bombas 510

HEMAGLUTININAS

Se realizó de acuerdo al método descrito por Jaffé y colaboradores. (45)

Fundamento

Esta es una prueba semicuantitativa basada en la propiedad que tienen las hemaglutininas presentes en los extractos acuosos de las muestras, para aglutinar diferentes tipos de eritrocitos.

Procedimiento

Preparación del extracto

Se suspende 1 gramo de muestra finamente molida en 10 ml de solución salina al 1 %, se efectúa una agitación mecánica durante 2 hrs. a 300 rpm. Después de este tiempo se centrifuga durante 15 min., el sobrenadante se filtra a través de papel filtro Whatman No. 1 con ayuda de vacío. El residuo es lavado con sol. salina al 1 % hasta llevar el extracto filtrado al volumen inicial (10 ml).

Preparación de la sangre.

La sangre de Hamster se transvasa a tubos de centrifuga para lavarla (3 veces) con sol. salina al 0.9%. La relación sangre:sol. salina es aproximadamente 1:5. Se centrifuga a 1500 rpm durante 10 minutos. Después del último lavado diluir al 4% el paquete de glóbulos rojos, para lo cual se agregan por cada ml de glóbulos rojos 24 ml de solución salina al 0.9%.

A cada 10 ml de la suspensión de glóbulos rojos al 4% agregarles 1 ml de pronasa (Sigma P-5005) al 2 % en solución salina y colocarlos en la incubadora por espacio de una hora a 37°C. Después centrifugar para eliminar la enzima sobrenadante, dando tres lavados con solución salina al 0.9%. Después del último lavado se resuspende el paquete de glóbulos rojos al 5 %, para lo cual a cada ml de glóbulos rojos se le adicionan 19 ml de solución salina al 0.9%.

Se toman 5 ml de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizados y se agregan 2 ml de solución salina al 0.9%. Se lee en el espectrofotómetro a 620 nm, usando como blanco sol. salina. La lectura que se debe obtener será de $25 \% \pm 2$ de transmitancia, en caso contrario se realizará la dilución necesaria para que la suspensión de eritrocitos quede dentro de dicho rango de transmitancia.

Preparación de placas

En las placas tipo V del Microtiter (Cook Eng-Alexander Virginia USA) colocar en cada pozo de una hilera 50 μ l de sol. salina al 0.9% con el pipeteador de gota evitando tocar las paredes del pozo. Agregar con un microdilutor 50 μ l del extracto problema, en el primer pozo, agitar, de este pozo tomar una alícuota y diluir, agitando sucesivamente en los pozos

siguientes. Por último con un pipetero de gota colocar en cada pozo 50 µl de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizados y ajustados. Luego se rota la placa en forma circular y se lleva a la incubadora a 37°C por espacio de una hora.

Una vez transcurrido el tiempo se coloca la placa sobre el dispositivo de lectura, observando a simple vista si se produce aglutinación. Ante una aglutinación, la prueba se considera positiva (+) y se informa como título (máxima dilución donde se observa aglutinación)

Nota: La prueba de lectinas se realizó por triplicado.

INHIBIDORES DE TRIPSINA

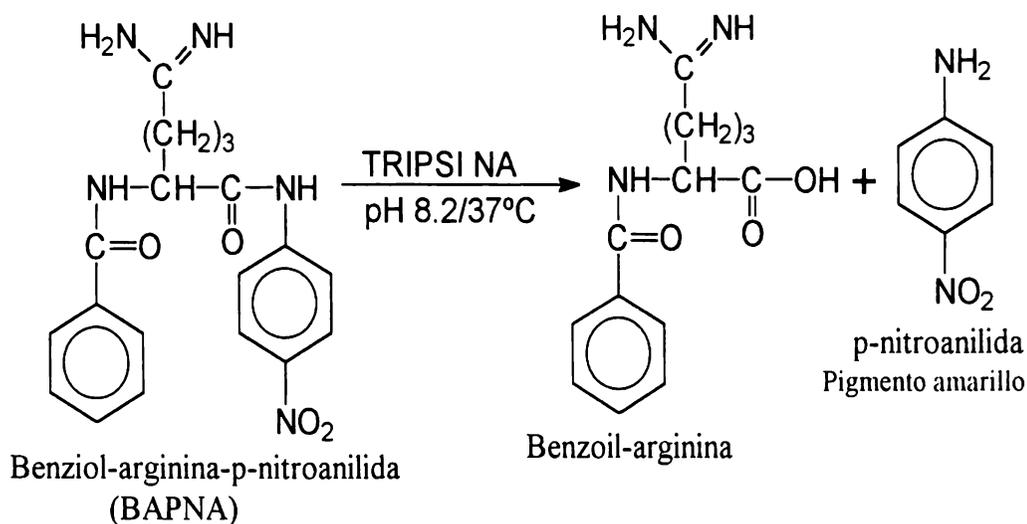
La cuantificación se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Kakade y colaboradores. (46)

Fundamento

La técnica se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso de la muestra sobre una solución estándar de tripsina.

El extracto directo o diluido se pone en contacto con una solución estándar de tripsina y después de cierto tiempo se mide la actividad proteolítica remanente, por medio de un sustrato sintético Benzoil arginina-p-nitroanilida (BAPNA), el cual producirá una coloración amarilla, la cual es inversamente proporcional al contenido de inhibidores en la muestra.

La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



Una unidad de tripsina (U.T.) se define arbitrariamente como un incremento de 0.01 unidades de absorbencia a 410 nm por 10 ml de la mezcla de reacción descritas por Kakade y colaboradores. La actividad de inhibidores de tripsina se expresa en términos de unidades de tripsina inhibida (U.T. I.).

Reactivos

(a) **Solución buffer TRIS:** 6.06 g de TRIS (hidroximetil-amino-metano) y 2.94 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se disuelven en 900 ml de agua destilada se ajusta el pH a 8.2 y se afora a un litro.

(b) **Solución BAPNA:** 100 mg de BAPNA (benzoyl-DL-arginina-p-nitroanilida-HCl) se disuelven en 2.5 ml de dimetil sulfóxido se diluye a 250 ml con amortiguador TRIS previamente calentado a 37°C. Esta solución debe ser preparada el mismo día, y cuando esté en uso debe mantenerse a 37°C.

(c) **Solución patrón de tripsina:** Se pesa con mucha exactitud 4 mg de tripsina bovina (SIGMA No. T-8253) se disuelven en 200 ml de HCl 0.001 N. Debe ser almacenada en refrigeración (4°C) y puede durar de 2-3 semanas sin pérdida apreciable de actividad.

Procedimiento

Preparación del extracto

Se pesa 1 g de muestra finamente molida en un vaso de precipitados y se le adicionan 45 ml de NaOH 0.01 N, se ajusta el pH de esta suspensión a 9.6 ± 0.2 y se afora a 50 ml. Se transvasa a un vaso que contenga un magneto para poder agitar la suspensión mecánicamente en la parrilla de agitación durante 2 1/2 hrs. a 300 rpm. Transcurrido dicho tiempo, se quita el magneto y se deja 30 min. en reposo; por simple decantación se obtiene el sobrenadante eliminando el residuo insoluble. El sobrenadante debe ser diluido hasta el punto en que 1 ml produzca una inhibición de 40-60 % , este requisito es indispensable para reducir la desviación estándar relativa.

Cuantificación de la actividad

La siguiente tabla muestra en forma esquemática la serie de tubos que se deben de preparar para poder medir la actividad inhibitoria de la muestra.

Tubo	ml ext.	ml agua	ml tripsina	ml BAPNA	ml Ac.
B1	1.8	0.2	2.0 + 1.0 Ac	5.0	---
1	1.8	0.2	2.0	5.0	1.0
B2	1.4	0.6	2.0 + 1.0 Ac	5.0	---
2	1.4	0.6	2.0	5.0	1.0
B3	1.0	1.0	2.0 + 1.0 Ac	5.0	---
3	1.0	1.0	2.0	5.0	1.0
B4	0.6	1.4	2.0 + 1.0 Ac	5.0	---
4	0.6	1.4	2.0	5.0	1.0
BR	0.0	2.0	2.0 + 1.0 Ac	5.0	---
R	0.0	2.0	2.0	5.0	1.0

B= Blanco

Ac= Ácido acético al 30 %

R= Reactivos

NOTA 1:

La sol. de tripsina y el BAPNA deben estar a 37°C antes de usarse.

NOTA 2:

La cuantificación de inhibidores de tripsina se realizó por duplicado.

La lectura en el espectrofotómetro se realiza a 410 nm y es necesario para cada una de las alícuotas ajustar el aparato a 100 % de transmitancia con su respectivo blanco.

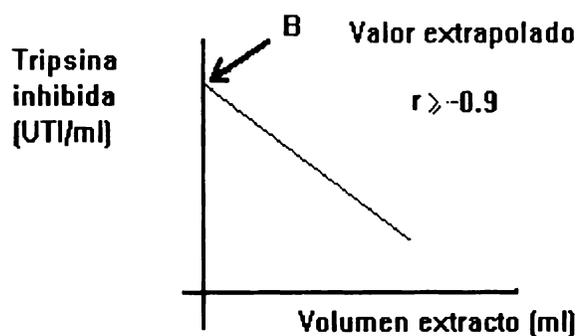
Cálculos

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

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

Ya que se tiene una serie de alícuotas del extracto, se tendrá a su vez una serie de valores de U.T., los cuales al restar este valor al dato de referencia, se obtienen los valores de tripsina inhibida (U.T.I.), al dividir este valor entre los ml de cada alícuota se obtienen U.T.I./ml.

Cuando se pone en una gráfica la actividad enzimática inhibitorio (UTI/ml) como función de la alícuota del extracto se observa una correlación lineal negativa, de donde se puede obtener el valor extrapolado correspondiente al cero de la solución inhibitoria.



Este dato extrapolado, es el valor mas cercano a la actividad inhibitoria verdadera o real (si se refiere uno al inhibidor de soya tipo Kunitz).

Cuando no se obtiene una correlación lineal satisfactoria se puede emplear el valor promedio de la serie de alícuotas, informando en términos de UTI/ml.

Se expresa el resultado como unidades de inhibición con respecto a 1 mg de muestra, de la siguiente forma,

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

donde:

B= valor extrapolado o promedio en UTI/ml

F= Factor de dilución, lo cual depende de las diluciones realizadas.

Cuando se emplea el extracto directo F= 1

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

A = Aforo

a = Alicuota

ALCALOIDES

Esta cuantificación se realizó en base a los métodos de Hultin, E. y Torsseli, K. (47)

Fundamento

La técnica se basa en una extracción diferencial con cloroformo y cloroformo etanol de la fase orgánica y acuosa respectivamente. A los dos extractos así obtenidos se les elimina el solvente y posteriormente, mediante titulación ácido-base, se cuantifica el contenido de alcaloides.

Procedimiento

Se pesan 4g de muestra seca y finamente molida, se adicionan 40 ml de metanol y se deja en agitación mecánica toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se pone en agitación mecánica durante 4 hrs. a 50°C. Al cabo de este tiempo, se filtra sobre papel Whatman No 52, el residuo es lavado con 20 ml de metanol, los filtrados son combinados y el solvente es eliminado en un rotavapor. El residuo es resuspendido en 2 ml de metanol y 12 ml de HCl al 1%, la mezcla es filtrada y el residuo lavado con 8 ml de HCl al 1%. El filtrado se ajusta a pH de 9.5 ± 0.2 . El filtrado básico se pasa a un embudo de separación y se extrae con tres porciones de 20 ml de cloroformo (Fracción A), la fracción acuosa residual (Fracción B) es tratada posteriormente.

Las fases orgánicas de la fracción A son juntadas y lavadas con 5 ml de sol. saturada de sulfato de sodio mas agua (50:50), posteriormente esta fracción es secada con 5 g de sulfato de sodio anhidro, se elimina este y el disolvente es eliminado en rotavapor.

A la fracción residual acuosa (B) se le adiciona sol. saturada de sulfato de sodio para hacerla media saturada, posteriormente se extrae la fase orgánica con 3 porciones de la mezcla cloroformo:etanol (3:2), las fases se juntan y lavan con 5 ml de sol. saturada de sulfato de sodio anhidro mas agua (50:50) y

posteriormente se seca con 5 g de sulfato de sodio anhidro, finalmente el solvente se elimina en rotavapor.

Ambas fracciones, A y B, son disueltas en 4 y 6 ml de H₂SO₄ 0.01 N respectivamente, se adicionan a cada fracción 5 gotas de rojo de metilo al 1 % y finalmente son tituladas las fracciones con NaOH 0.01 N.

De manera simultánea a las muestras se corren blancos.

NOTA: El análisis de las muestras se realizó por duplicado.

Cálculos

Se informa en mg solanina/g de muestra

$$\text{mg solanina/100g muestra} = \frac{(\text{ml blanco} - \text{ml muestra}) \times N_{\text{NaOH}} \times \text{meq solanina} \times 10^5}{\text{g muestra}}$$

$$\text{meq solanina} = 0.868$$

BIOENSAYO DE TOXICIDAD CON *Artemia salina*

Fundamento

La técnica está basada en observar la mortalidad que produce un extracto vegetal *sobre Artemia salina*, hacer el conteo de larvas muertas y calcular la concentración letal media (LC₅₀) en µg/ml. (34)

Procedimiento

Preparación de la muestra

Pesar 4 g de muestra finamente molida y seca, adicionar 40 ml de metanol y dejar en agitación mecánica durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, filtrar sobre papel Whatman No. 52 y lavar el residuo con 20 ml de metanol, posteriormente eliminar el disolvente con rotavapor para obtener el extracto sólido. Tomar 20 mg del extracto seco y suspenderlos en 2 ml de metanol para obtener una concentración final de 10 mg/ml.

Diluciones de la muestra

En viales se adicionan 5, 50, y 500 µl de la muestra preparada por triplicado, para obtener una concentración de 10, 100 y 1000 µg/ml. El solvente se evapora bajo N₂ por aproximadamente 30 min.; en el caso de disolventes volátiles se puede evaporar durante la noche a temperatura ambiente.

Preparación de *Artemia salina*

Preparar el agua salada, pesando 38.5 g de sal marina por cada litro de agua destilada; filtrar. Posteriormente aerar el agua marina por espacio de 30 min y finalmente sembrar los huevos de *Artemia salina* (San Francisco bay); dejar incubar 48 h a una temperatura de 35°C.

Después de 2 días, cuando la larva esté lista, agregar 10 a cada vial que tiene la muestra, ajustar el volumen a 5 ml con agua marina, dejar incubando durante 24 h y contar el número de sobrevivientes después de este tiempo .

De manera simultánea se hizo un blanco.

Los datos son analizados con el programa Finney para conocer la LC₅₀ con 95 % de intervalo de confianza.

El programa esta basado en calcular las unidades Probit y graficar estas contra el logaritmo de la concentración de las diferentes diluciones para finalmente interpolar dentro de la curva y obtener el valor de LC₅₀.

CITOTOXICIDAD CON LINFOCITOS

Fundamento:

La técnica se basa en observar la mortalidad que causan los extractos acuosos de las muestras sobre linfocitos humanos. El porcentaje de mortalidad corresponde a aquellas células que fueron dañadas por el tóxico presente y las cuales se encuentran teñidas con el colorante azul tripan debido al efecto que tuvo a nivel de membrana el tóxico, lo que permitió el paso del colorante. (48)

Reactivos

(a) **Solución de azul tripan:** pesar 0.1 g de azul tripan y disolverlo en buffer de fosfatos 0.2 M pH= 7.2, finalmente aforar a 100 ml con el mismo buffer. Es posible emplear también como colorante la nigrosina-eosina al 10 y 0.1 %, respectivamente, en solución acuosa.

Procedimiento

Preparación de la muestra

Pesar 1 g de la muestra finamente molida y desgrasada (si presenta mas de 5 % de grasa), adicionar 10 ml de solución salina al 0.9 % y agitar mecánicamente durante 2 h , transcurrido este tiempo centrifugar la muestra durante 15 min a 2500 rpm , filtrar al sobrenadante y aforar a 10 ml con sol. salina al 0.9 %.

Extracción de linfocitos

Colocar en un tubo de ensaye “Lymphoprep” (Nygard & Co. A/S Oslo, $\delta=1.077$ g/ml) y adicionar la sangre, resbalándola por las paredes del tubo, en una relación de 1:2 partes de lymphoprep:sangre. Centrifugar a 2000 rpm. durante 30 min. Después de este tiempo, extraer los linfocitos que quedaron en

la interfase con una pipeta Pasteur y pasarlos a un medio de cultivo RPMI 1640 hasta su uso.

Observación al microscopio

Poner 20 μ l del extracto sobre un portaobjetos, adicionar 20 μ l de linfocitos y 20 μ l de azul tripan, homogeneizar y poner el cubreobjetos. El tiempo de exposición de los linfocitos con la muestra fue el mismo en todos los casos.

Observar la preparación al microscopio con el objetivo de 10 ó 40 y contar el número de células vivas y muertas en cinco diferentes campos.

Es importante conocer el porcentaje de viabilidad de los linfocitos empleados y referir a esta viabilidad los resultados de las muestras; para ello se observa una preparación al microscopio de linfocitos y se cuentan en cinco campos el número de células vivas.

Cálculos

Informar como % de viabilidad promediando el resultado de los cinco campos leídos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se presentan los resultados del contenido de humedad gruesa en las muestras de papas silvestres. Todas las pulpas de papa presentaron un alto contenido de agua, como era de esperarse en el material vegetal fresco (entre 72.24 y 88.91 g/100 g muestra). En la pulpa de *S. polytrichon* (Zacatecas) se encontró la humedad más alta con un valor de 88.91 g/100 g muestra.

En la tabla 2 se presentan los valores de humedad de las harinas empleadas para los estudios y que son necesarios para obtener los valores en base seca.

En las tablas 3 y 4 se presentan los resultados del análisis proximal, en base húmeda y en base seca respectivamente. En cuanto al contenido en base seca de cenizas, no se observaron grandes diferencias en los resultados; el menor valor se encontró en la muestra de *S. cardiophyllum* de Guanajuato (4.14 g/100 g muestra) y el mas alto en la muestra de *S. ehrenbergii* de S.L.P. (5.64 g/100 g muestra); la papa comercial estuvo entre estos valores.

En cuanto al contenido del extracto etéreo, los valores en todas las muestras fueron bajos, correspondiendo a *S. cardiophyllum* de Guanajuato el valor mas bajo (0.14 g/100 g muestra) y el superior a *S. ehrenbergii* de S.L.P. con 0.58 g/100 g muestra. La papa comercial presentó un contenido del extracto etéreo superior al de las especies silvestres estudiadas (0.68g/100 g muestra).

TABLA 1

Contenido de humedad gruesa en algunas especies silvestres del género *Solanum* (g/100 g de pulpa)

Nombre científico	Humedad
Solanum polytrichon Zacatecas	88.91
Solanum stoloniferum S.L.P.	77.00
Solanum ehrenbergii S.L.P.	83.90
Solanum cardiophyllum Guanajuato	75.26
Solanum cardiophyllum S.L.P.	72.24
Solanum tuberosum (Papa comercial)	79.01

TABLA 2
Contenido de humedad en las harinas de cáscara y pulpa con tratamiento térmico (T.T.)
y liofilizada de las papas silvestres.
(g/100 g de muestra)

Muestra	Cáscara (T.T.)	Cáscara liofilizada	Pulpa (T.T.)	Pulpa liofilizada
Solanum polytrichon Zacatecas	1.40	8.48	1.98	2.15
Solanum stoloniferum S.L.P.	1.15	1.38	2.60	2.27
Solanum ehrenbergii S.L.P.	1.37	11.57	1.53	1.34
Solanum cardiophyllum Guanajuato	1.39	12.08	1.61	0.61
Solanum cardiophyllum S.L.P.	1.20	13.00	1.75	0.63

TABLA 3

**Análisis proximal de las pulpas con tratamiento térmico (T.T.)de papas silvestres.
Base húmeda
(g / 100 g de muestra)**

Nombre científico	Humedad	Cenizas	Extracto etéreo	Fibra bruta	Proteína bruta	H de C*
Solanum polytrichon Zacatecas	88.91	0.49	0.03	0.29	0.94	9.34
Solanum stoloniferum S.L.P.	77.00	1.24	0.09	0.51	2.59	18.57
Solanum ehrenbergii S.L.P.	83.90	0.91	0.09	0.34	1.73	13.03
Solanum cardiophyllum Guanajuato	75.26	1.02	0.03	0.44	2.35	20.90
Solanum cardiophyllum S.L.P.	72.24	1.21	0.05	0.48	3.13	22.89
Solanum tuberosum (Papa comercial)	79.01	0.90	0.15	0.39	2.12	17.43

* H de C = Hidratos de carbono calculados por diferencia.

TABLA 4

**Análisis proximal de las pulpas de papas silvestres con tratamiento térmico
Base seca
(g/ 100 g de muestra)**

Nombre científico	Cenizas	Extracto etéreo	Fibra bruta	Proteína bruta	H de C*
Solanum polytrichon Zacatecas	4.40	0.25	2.62	8.50	84.23
Solanum stoloniferum S.L.P.	5.40	0.37	2.22	11.26	80.75
Solanum ehrenbergii S.L.P.	5.64	0.58	2.11	10.73	80.94
Solanum cardiophyllum Guanajuato	4.14	0.14	1.79	9.52	84.41
Solanum cardiophyllum S.L.P.	4.35	0.17	1.74	11.27	82.47
Solanum tuberosum (Papa comercial)	4.24	0.68	1.83	10.0	83.27

*H de C = Hidratos de carbono calculados por diferencia.

En cuanto al contenido de fibra, la muestra de *S. polytrichon* de Zacatecas presentó el mayor contenido (2.62 g/100 g muestra) y *S. cardiophyllum* de S.L.P. presentó el menor contenido de fibra bruta (1.74 g/100 g muestra). En las especies de *cardiophyllum* se observó poca diferencia en el contenido de fibra bruta. La papa comercial presentó un contenido de fibra bruta de 1.83 g/100 g muestra, muy similar al de *S. cardiophyllum* de Guanajuato (1.79 g/100 g muestra).

Las muestras presentaron un contenido de proteína bruta similar; que en base seca es semejante al encontrado en cereales. *S. cardiophyllum* de S.L.P. presentó el mayor contenido de proteína bruta (11.27 g/100 g muestra) muy similar al encontrado en *S.staloniferum*. El menor contenido de proteína se encontró en la especie de *S. polytrichon* de Zacatecas (8.5 g/100 g muestra). Entre la misma especie de *cardiophyllum* (Guanajuato y S.L.P.) se observaron diferencias en su contenido de proteína bruta. La papa comercial presentó un valor intermedio entre los valores encontrados en las especies silvestres.

El contenido de hidratos de carbono entre todas las muestras, incluyendo la papa comercial fue muy similar, encontrándose valores entre 80.75 y 84.41 g/100 g muestra.

Las diferencias que se observaron entre la misma especie de *cardiophyllum* de las regiones de Guanajuato y S.L.P., se encuentran principalmente en el contenido de proteína, esto se puede deber a que se desarrollaron en diferentes estados de la República, y la composición del terreno, la fertilización y otras condiciones que influyen en la composición química final de los tubérculos (6).

Al comparar el contenido de proteína bruta en las pulpas con tratamiento térmico y en la parte aérea de la planta (Tabla 5), se obtuvo un mayor contenido en las partes aéreas que en las pulpas. Estos valores encontrados en las partes aéreas son similares a proteínas foliares. El contenido más alto de proteína bruta se obtuvo en la parte aérea de *S. ehrenbergii* con 22.01 g/100 g muestra, mientras que en las pulpas el valor mas alto se obtuvo en *S. cardiophyllum* de S.L.P. con 11.27 g/100 g muestra. Se observa también que entre la misma especie de *S. cardiophyllum* de Guanajuato y de S.L.P., existen diferencias en los valores encontrados. Por el alto contenido de proteína bruta en los follajes, podría ser conveniente su adición en dietas de animales.

Al comparar el contenido de proteína bruta y el de proteína verdadera tanto de las pulpas como de partes aéreas, se observa que el contenido de proteína verdadera es inferior al contenido de proteína bruta, como en el caso de la pulpa de *S. cardiophyllum* de S.L.P. que presenta un contenido de 11.27g de proteína bruta/100 de muestra y 6.03 g de proteína verdadera/100 g muestra, y en la parte aérea de *S. staloniferum* de S.L.P. que presenta un contenido de 20.91g proteína bruta/100 g muestra y 12.22 g de proteína verdadera/100 g muestra.

En general, en las pulpas se observó que aproximadamente la mitad de proteína bruta corresponde a proteína verdadera, a excepción de la muestra de *S. ehrenbergii* de S.L.P. en la cual una mayor proporción de nitrógeno es de origen proteínico. En el caso de las partes aéreas, existe un mayor contenido de nitrógeno proteínico en relación al contenido de proteína bruta.

TABLA 5

**Contenido de proteína bruta y verdadera en el tubérculo y parte aérea
de especies de papas silvestres
Base seca
(g/100 g muestra)**

Nombre científico	Pulpa con tratamiento térmico (T.T.)			Parte aérea (Tallos y hojas)		
	Proteína bruta	Proteína verdadera	<u>Prot.verdadera x 100</u> Prot. bruta	Proteína bruta	Proteína verdadera	<u>Prot. verdadera x 100</u> Prot. bruta
Solanum polytrichon Zacatecas	8.50	4.40	51.76	12.28	8.60	70.03
Solanum stoloniferum S.L.P.	11.26	6.49	57.63	20.91	12.22	58.44
Solanum ehrenbergii S.L.P.	10.73	9.58	89.28	22.01	12.99	59.01
Solanum cardiophyllum Guanajuato	9.52	5.62	59.03	17.34	10.54	60.78
Solanum cardiophyllum S.L.P.	11.27	6.03	53.50	13.14	8.91	67.81

Esta reducción se debe a que el nitrógeno que se detecta en proteína bruta no proviene solamente de proteína, sino también de otros compuestos nitrogenados presentes de manera común en especies silvestres, tales como aminas, alcaloides, aminoácidos raros o no proteínicos, etc. En el caso de este género son los alcaloides los principales aportadores de nitrógeno no proteínico.

En cuanto al contenido de vitamina C (Tabla 6), éste fue bajo en todas las pulpas silvestres cuando se compararon con la papa comercial que tuvo un valor de 17.18 mg/ 100 g de muestra, lo cual puede deberse a que el tiempo que transcurrió entre la colecta y el análisis fue demasiado largo, por lo que pudo haberse afectado el contenido de vitamina C de manera considerable. Numerosos factores afectan el contenido de vitamina C, incluso puede ser que por ser muestras silvestres tengan ese bajo contenido de vitamina C. El menor contenido se presentó en la muestra de *S. ehrenbergii* de S.L.P. con 2.36 mg vit. C/100 g de muestra. Se esperaba un mayor contenido de esta vitamina, ya que se ha considerado a la papa una fuente de esta vitamina, que puede contener hasta 30 mg vit C/100 g muestra (6).

En la Tabla 7 se presenta el contenido de aminoácidos en las pulpas liofilizadas. Todas las pulpas de las papas silvestres son más ricas en ácido aspártico que la papa comercial y que otros alimentos vegetales como los tomates y el chícharo (4). En cuanto al contenido de aminoácidos indispensables (Tabla 8) y comparando la calificación química se encontró que todas las especies silvestres estudiadas, incluyendo a la papa comercial, son limitantes en aminoácidos azufrados.

TABLA 6

Contenido de vitamina C en la pulpa fresca de las papas silvestres

Nombre científico	mg Vit. C/100 g de muestra fresca
Solanum polytrichon Zacatecas	5.87
Solanum stoloniferum S.L.P.	2.93
Solanum ehrenbergii S.L.P.	2.36
Solanum cardiophyllum S.L.P.	5.78
Solanum cardiophyllum Guanajuato	9.15
Solanum tuberosum (Comercial)	17.18

TABLA 7
Contenido de aminoácidos en la pulpa liofilizada de papas silvestres
g aminoácido/16 g de nitrógeno

Aminoácido	Solanum polytrichon Zacatecas	Solanum stoloniferum S.L.P	Solanum ehrenbergii S.L.P.	Solanum cardiophyllum S.L.P.	Solanum cardiophyllum Guanajuato	Solanum tuberosum (comercial) ^a
Ac. aspártico	24.5	21.4	23.6	22.3	14.8	12.4
Serina	3.0	2.5	2.3	2.8	4.7	4.1
Ac. glutámico	16.1	11.7	11.3	9.4	7.4	10.2
Glicina	3.2	2.5	2.3	2.7	3.6	3.8
Histidina	2.5	1.5	1.5	2.0	2.3	1.5
Arginina	8.5	6.3	10.4	12.4	7.8	5.0
Treonina	4.0	2.3	2.1	2.6	2.4	3.7
Alanina	3.4	2.3	2.1	2.3	2.8	4.4
Prolina	5.9	8.8	5.8	5.2	3.7	3.8
Cistina	1.4	0.7	0.7	^b	^b	0.6
Tirosina	3.8	2.0	1.9	2.4	2.1	2.7
Valina	5.1	3.9	3.9	3.9	4.0	4.7
Metionina	1.8	0.8	0.7	1.3	1.2	1.3
Lisina	7.2	4.9	4.8	5.0	4.4	4.8
Isoleucina	4.5	3.1	2.9	3.4	2.9	3.8
Leucina	7.6	5.3	4.7	5.2	4.3	6.0
Fenilalanina	4.5	3.0	2.7	3.4	2.7	4.0
Triptofano ^c	1.9	1.5	1.5	1.5	1.4	1.7

^aRef. (49) ^bNo fue detectado

^cCuantificación colorimétrica (ref. 52,53)

TABLA 8
Contenido de aminoácidos indispensables en papas silvestres
g aminoácido / 16 g de nitrógeno

Aminoácido	Solanum polytrichon Zacatecas	Solanum stoloniferum S.L.P	Solanum ehrenbergii S.L.P.	Solanum cardiophyllum S.L.P.	Solanum cardiophyllum Guanajuato	Solanum tuberosum (comercial)	Huevo ^a	Patron ^b FAO
Isoleucina	4.5	3.1	2.9	3.4	2.9	3.8	6.3	4.0
Leucina	7.6	5.3	4.7	5.2	4.3	6.0	8.8	7.0
Azufrados	3.2	1.5	1.4	1.3	1.2	1.9	5.8	3.5
Aromáticos	8.2	5.0	4.7	5.8	4.8	6.7	9.9	6.0
Lisina	7.2	4.9	4.8	5.0	4.4	4.8	7.0	5.5
Treonina	4.0	2.3	2.1	2.6	2.4	3.7	5.1	4.0
Valina	5.1	3.9	3.9	3.9	4.0	4.7	6.9	5.0
Triptofano	1.9	1.5	1.5	1.5	1.4	1.7	1.5	1.0
Total	41.7	27.5	26.0	28.7	25.4	33.3	51.3	36.0
C.Q. ^c azufrados	79	56	55	47	49	62	-----	-----
C.Q. ^c treonina	86	75	73	82	85	>100	-----	-----

Azufrados = cistina + metionina

Aromáticos = fenilalanina + tirosina

a) Ref. (49)

b) Patrón provisional FAO/OMS 1973 (50).

c) C.Q. = Calificación Química

El segundo aminoácido limitante en las muestras silvestres fue la treonina, aunque su calificación química particular mas baja en una especie (*S. ehrenbergii*) fue de 73. En el caso de la papa comercial este aminoácido tiene una calificación química superior al 100 %. En todas las especies silvestres y comercial el contenido de triptofano fue superior al patrón.

De acuerdo a la calificación química, la especie *S. cardiophyllum* colectada en S.L.P., tuvo el menor valor con una calificación química de 47, en cambio la especie de *S. polytrichon* tuvo la mejor calidad proteínica con una calificación química de 79 e incluso presentó mayor cantidad de aminoácidos indispensables que la papa comercial. Excepto en esta especie, todas las demás tuvieron un contenido de aminoácidos indispensables muy semejantes entre si y ligeramente mas bajos que los de la papa comercial.

En este estudio no se realizó la cuantificación de aminoácidos de la parte aérea de la planta, pero recientemente se reportó que la parte aérea de la papa comercial (*S. tuberosum*) presentó el doble de arginina, alanina y leucina que la caseína (51).

El contenido de factores antifisiológicos y tóxicos se presentan en la tabla 9. En cuanto a lectinas en pulpa liofilizada y parte aérea se encontró el título más alto en la pulpa de *S. stoloniferum* similar al de la papa comercial, títulos iguales se obtuvieron en las pulpas de *S. ehrenbergii* y *S. cardiophyllum* de S.L.P. Es importante mencionar que en la prueba de lectinas en la muestra de *S. polytrichon* de Zacatecas se observó hemólisis y aglutinación. En cuanto a la partes aéreas, en dos muestras se encontró el mismo título de aglutinación y solamente en la de *S. ehrenbergii* no se observó presencia de lectinas.

En cuanto a inhibidores de tripsina, en general en la parte aérea de las plantas (con excepción de *S. stoloniferum*) se observó un contenido bajo. En las pulpas el contenido es mayor, especialmente en *S. stoloniferum* y *S. ehrenbergii* con 22.52 y 23.71 UTI/mg de muestra respectivamente, este contenido es superior al valor encontrado en la especie comercial y va de acuerdo con estudios anteriores en los que se ha informado la presencia de inhibidores de proteasas de diferentes clases en el tubérculo, como inhibidores de tipo Kunitz, inhibidores de quimotripsina (52). Se considera que a partir de 10 UTI/mg de muestra el contenido de inhibidores de tripsina es de tomarse en cuenta ya que afectan la digestibilidad y absorción de nutrimentos, como se ha explicado anteriormente.

Se observó poca variación en las concentraciones de inhibidores de tripsina de la misma especie pero de diferente región, tanto en la pulpa como en la parte aérea.

TABLA 9
Contenido delectinas, inhibidores de tripsina y alcaloides en pulpa liofilizada y parte aérea de papas silvestres

Nombre científico	Lectinas (Título) ¹		Inhibidores de tripsina (UTI/mg muestra) ²		Alcaloides (mg solanina/100 g muestra)		
	Pulpa liofilizada	Parte aérea	Pulpa liofilizada	Parte aérea	Pulpa liofilizada	Cáscara liofilizada	Parte aérea
Solanum polytrichon Zacatecas	4 (3 hemólisis)	4	5.4	1.2	73.1	1609.1	128.4
Solanum stoloniferum S.L.P.	8	4	22.5	15.3	144.2	788.4	368.6
Solanum ehrenbergii S.L.P.	6	0	23.7	6.0	348.3	473.6	281.2
Solanum cardiophyllum S.L.P.	6	2	11.3	1.1	238.9	355.1	312.
Solanum cardiophyllum Guanajuato	4	3 (1 hemólisis)	12.0	1.6	168.7	94.5	90.2
Solanum tuberosum (comercial)	8	----- ³	15.96	----- ³	(-)	----- ³	----- ³

¹ Título= Máxima dilución donde se observa aglutinación

² UTI= Unidades de tripsina inhibida

³ No determinado

La ventaja de los factores antifisiológicos es que en general por calentamiento pueden ser destruidos dado su origen proteínico.

En general, las cáscaras liofilizadas presentaron mayor contenido de alcaloides que las pulpas; esto era de esperarse ya que se sabe que en la cáscara de los tubérculos se concentra un mayor contenido de alcaloides que en la pulpa (29). La cáscara de *S. polytrichon* de Zacatecas presentó el mayor contenido de alcaloides (1609.1 mg so lanina/100 g muestra), de las pulpas el mayor contenido lo presentó la muestra de *S. ehrenbergii* de S.L.P. (348.3 mg solanina/100 g muestra) y *S. stoloniferum* presentó el mayor contenido de alcaloides en la parte aérea (368.6 mg solanina/100 g muestra). En cuanto a la papa comercial, no se detectó presencia de alcaloides, esto concuerda con reportes en literatura donde indican que la papa cultivada (*S. tuberosum*) presenta bajos contenidos de alcaloides. (30)

La única muestra que presentó mayor concentración de alcaloides en la pulpa que en la cáscara y parte aérea es la de *S. cardiophyllum* de Guanajuato, esto puede deberse a que al separar la cáscara de la pulpa para liofilizarlas se arrastra pulpa, esto pudo diluir el contenido de alcaloides en la harina liofilizada. Considerando que el tamaño de las papas es pequeño y por lo tanto es difícil separar cáscara y pulpa.

En la tabla 10 se presentan los resultados de toxicidad *in vitro* y citotoxicidad. En cuanto a los resultados de la prueba de toxicidad *in vitro*, en general en las partes aéreas se observó un efectopocotóxico hacia *Artemiasalina*, siendo la muestra de *S. polytrichon* de Zacatecas la que presentó un mayor

TABLA 10
Toxicidad *in vitro* y Citotoxicidad de pulpas y parte aérea de papas silvestres

Nombre científico	Toxicidad “in vitro” ^a LC ₅₀		Citotoxicidad			
	Pulpa liofilizada µg/ml	Parte aérea µg/ml	Pulpa liofilizada		Parte aérea	
			Extracto salino % viabilidad	Extracto metanólico % viabilidad	Extracto salino % viabilidad	Extracto metanólico % viabilidad
Solanum polytrichon Zacatecas	53.2	177.9	29.7	94.1	28.0	31.2
Solanum staloniferum S.L.P.	323.2	>1000	81.8	95.3	84.3	86.4
Solanum ehrenbergii S.L.P.	>1000	700.2	82.3	93.7	74.7	86.8
Solanum cardiophyllum S.L.P.	0.028	>1000	14.5	91.5	87.5	90.3
Solanum cardiophyllum Guanajuato	0.128	>1000	52.1	91.9	3.9	91.9

^a Se empleó *Artemia salina* San Francisco Bay

mayorefecto de toxicidad en relación a las otras muestras, ya que la concentración necesaria para matar las larvas fue menor.

En las pulpas liofilizadas, existió una mayor variación en los resultados; la menos tóxica fue *S. ehrenbergii* de S.L.P. con una $LC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$, y las más tóxicas fueron las especies de *cardiophyllum* de S.L.P. y Guanajuato con LC_{50} de $0.028 \mu\text{g/ml}$ y $0.128 \mu\text{g/ml}$ respectivamente.

Como se puede ver, no se encontró una relación entre la LC_{50} sobre *Artemia salina* y el contenido de alcaloides, así que se realizó la prueba de citotoxicidad con linfocitos, tratando de encontrar una relación entre el contenido de alcaloides y el efecto tóxico.

Con los resultados de citotoxicidad se observó que los extractos metanólicos de las partes aéreas de las papas no tuvieron un efecto tóxico elevado sobre los linfocitos, con excepción de *S. polytrichon* de Zacatecas que presentó una viabilidad del 31.2 %. En cuanto a los extractos salinos de las partes aéreas, se observó un efecto tóxico de las muestras de *S. polytrichon* de Zacatecas y *S. cardiophyllum* de Guanajuato con porcentajes de viabilidad de 28.0 y 3.9 % respectivamente. Estos resultados se ven lógicos puesto que los alcaloides de la papa son muy solubles en soluciones salinas.

En los extractos metanólicos de las pulpas, no se observó un efecto tóxico de las especies silvestres, los porcentajes de viabilidad se encuentran entre valores de 91.5 y 95.3.

En cuanto al extracto salino de las pulpas liofilizadas, se observó un efecto tóxico de *S. polytrichon* de Zacatecas y *S. cardiophyllum* de S.L.P. y

Guanajuato con porcentajes de viabilidad de 29.7, 14.5 y 52.1 %, las otras especies presentan valores muy similares de viabilidad.

En general, los extractos metanólicos de las pulpas y de las partes aéreas no tienen un efecto tóxico sobre linfocitos, esto puede deberse a problemas en la solubilidad de extractos sólidos metanólicos en solución salina o como se mencionó anteriormente a la solubilidad de la mayoría de los alcaloides.

La toxicidad observada de *S. polytrichon* de Zacatecas sobre *Artemia salina* y linfocitos, concuerda con comentarios de pobladores de la zona donde fue colectada dicha especie, ya que mencionan a esta especie como no comestible. Su efecto citotóxico se puede deber también a la presencia de factores hemolíticos observados en la prueba de lectinas, los cuales pueden afectar la integridad de la membrana de los linfocitos.

En la especie de *S. cardiophyllum* de S.L.P. se observó un efecto tóxico de la pulpa sobre *Artemia salina* y linfocitos, pero no de la parte aérea.

Se atribuía el efecto tóxico al contenido de alcaloides sobre *Artemia salina* pero esto no pudo comprobarse al realizar el ensayo de citotoxicidad con linfocitos. El hecho de que no se haya encontrado una relación entre el contenido de tóxicos y las pruebas toxicológicas *in vitro* con *Artemia salina* y linfocitos, se puede deber a que de acuerdo al estudio aquí realizado, el efecto tóxico no es a nivel de membrana, sino que el tóxico penetra al organismo y es dentro de este donde actúa, es por esto quizá que se observó efecto tóxico con *Artemia salina* pero no en los linfocitos. Por lo que será necesario obtener una cantidad mayor de estos extractos y realizar pruebas de toxicidad con animales de laboratorio.

CONCLUSIONES

1. La composición bromatológica de las especies silvestres estudiadas fue muy similar a la de la papa comercial (*Solanum tuberosum*).
2. En cuanto al contenido de aminoácidos, de manera general las especies silvestres mostraron un perfil similar al de la papa comercial; solo el ácido aspártico y arginina se encontraron más elevados que en la papa comercial. Respecto a los aminoácidos indispensables, en todas las especies silvestres los aminoácidos limitantes fueron los azufrados y el segundo aminoácido limitante fue la treonina. La especie de *S. polytrichon* fue la de mayor contenido de aminoácidos indispensables, superior al patrón de FAO. Al efectuar el cálculo de la calificación química de las muestras esta misma especie dio el valor más alto, seguido por la papa comercial con una notable diferencia.
3. De los tóxicos estudiados, lo notable fue la elevada concentración de alcaloides presentes en las especies silvestres, los cuales dieron valores negativos en la papa comercial. En todas las muestras excepto en una, la concentración de alcaloides fue mayor en la cáscara que en la pulpa y más variación se encontró en la parte aérea de las especies estudiadas.
4. Con las dos pruebas *in vitro* escogidas para medir la toxicidad no fue posible encontrar relación entre la concentración de alcaloides y toxicidad.

RECOMENDACIONES

Estudiar las características químicas del almidón en las muestras en estudio ya que este componente imparte una característica de calidad a las papas.

Obtener mayor cantidad de muestras de las especies para realizar estudios de toxicidad con animales de laboratorio.

En un estudio más de fitoquímica, aislar y caracterizar los alcaloides de las especies en estudio de las cuales hasta ahora no se había realizado ningún estudio sobre su composición y posible utilización para consumo humano o animal y consecuentemente promover estudios agronómicos de estas especies de papa.

BIBLIOGRAFIA

1. Brown, C. R. (1993). Origin and history of the potato. *American Potato Journal* 70: 363-373.
- ...
2. Desrosier, N. W. (1986). Elementos de Tecnología de Alimentos. Editorial Continental, México, 225-233,
3. Luna, C. M. (1987). Estudio taxonómico de papas silvestres (*Solanum* l.), sección Petota de terrenos cultivados del altiplano Potosino-Zacatecano. Tesis de Maestría. Colegio de posgraduados, Chapingo, México D.F. 1-25.
4. Hawks, J. G. (1993). A chilean wild potato species and the publication of its name, *Solanum maglia* (Solanaceae). *Taxon*, 42 (3): 671-673.
5. Altschul, A. M. (1958). Processed Plant Protein Foodstuffs. Academic Press Inc. Publishers, New York, 26-27, 56-57, 890.
6. Salunke, D.K., Kadam, S.S. and Jadhav, S.J. (Editors). (1991). Potato: Production, Processing and Products. CRC Press, Inc. U.S.A., 10-31, 38-65.
7. Ramos, R.G. (1985). Alimentación normal en niños y adolescentes. Editorial El Manual Moderno, México, 308-314.
8. Kolasa, K.M. (1993) The potato and human nutrition. *American Potato Journal* 70: 375-384.
9. Schwimmer, S., Vevenue, A., Weston, W. and Potter, A. (1954). Survey of major and minor sugar and starch components of white potato. *J. Agric. Food Chem.* 2: 1284
10. Paul, A.A. and Southgate, D.A.T., McCance and Widdowson's. (1987). *The Composition of Foods*, 4 th ed., MRC Spec. Rep. 297, Her Majesty's Stationery Office, London.

11. Chang, Y.O. and Avery, E.E. (1969). Nutritive value of potato protein, *J. Am. Diet. Assoc.* 55: 565.
12. Finglas, P.M. and Faulks, R.M. (1985). A new look at potatoes. *Nutr. Food Sci.* 92: 12.
13. Rosenberg, M.R. (1942) *Chemistry and Physiology of the Vitamins*. Interscience, New York.
14. Goldstein, I.J. and Hynes, C.E. (1978). *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Tipson R.S. and Horton D. Eds. Academic Press, New York.
15. Liener, I. E. (1980). *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs*. Ed. Academic Press, 2a. ed. New York, 7-57, 73-98, 447-449.
16. Jaffé, W. G. (1973). Toxic proteins and peptides in Toxicants Occurring Naturally in Foods. Committee on food protection. 2nd. edition, National Academy of Science, Washington, D.C. 106-123.
17. Kilpatrick, D.C. (1980). Isolation of a lectin from pericarp of potato (*Solanum tuberosum*) fruits. *Biochem. J.* 191: 273.
18. Van der Poel, A. F. B., Huisman, J. and Saini, H. S. (1993). Recent Advances of Research in antinutritional factors in legume seed. EAAP Publication No. 70, Wageningen, Hol. 219-229.
19. Balls, A. and Ryan, C. (1963). Concerning a crystalline chymotrypsin inhibitor from potatoes and its binding capacity for the enzyme. *J. Biol. Chem.* 238: 2976.
20. Santarius, K. and Belitz, H.D. (1978). Protease activity in potato plants. *Planta* 141: 145.
21. Ryan, C.A. and Hass, G.M. (1981). *Antinutrients and Natural Toxicants in Foods*. Ory, R.L. Ed. Food and Nutrition Press, Westport, C.T.

22. Hass, G.M., Derr, J.G., Makus, D.J. and Ryan, C.A. (1979). Purification and characterization of the carboxypeptidase inhibitors from potatoes. *Plant Physiol.* 64: 1022.
23. Richardson, M. (1977). The proteinase inhibitors of plants and micro-organisms. *Phytochemistry* 16: 159.
24. Lau, A., Ako, H. and Werner-Washburne, M. (1980). Survey of plants for enterokinase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92:1243, 1980.
25. Ryan, C.A., Kuo, T., Pearce, G. and Kunke, R. (1976). Variability in the concentration of 3 heat stable proteinase inhibitor proteins in potato tubers *Am. Potato J.* 53: 443.
26. Livingstone, R.M., Baird, B.A., Atkinson, T. and Croft, R.M.T. (1980). The effect of either raw or boiled liquid extract from potato (*Solanum tuberosum*) on digestibility of diet based on barley in pigs. *J. Sci. Food Agric.* 31: 695.
27. Gull, D.D. and Isenberg, F.M. (1960). Chlorophyll and solanine content and distribution in four varieties of potato tubers. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 75: 545.
28. Jadhav S.J. and Salunkhe, D.K. (1975). Formation and control of chlorophyll and glycoalkaloids in tubers of *Solanum tuberosum* L. and evaluation of glycoalkaloid toxicity. *Adv. Food Res.* 21: 307.
29. Friedman, M. and Dao Lan. (1992). Distribution of Glycoalkaloids in Potato Plants and Commercial Potato Products. *J. Agric. Food. Chem.* 40: 419-423.
30. Watson, D. H. (1987). *Natural Toxicants in Food Progress and Prospects.* Ellis Horwood, International publishers in science and technology, England, 221-227.

31. Reeve, R.M., Hautula, E. and Weaver, M.L. (1969). Anatomy and compositional variation within potatoes II. Phenolics, enzymes and other minor components. *Am. Potato J.* 46: 347.
32. Jolles, G. and Cordier, A. (1992). *In vitro Methods in toxicology.* Academic Press, New York, 21-27.
33. Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Anderson, B., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., Powell, R.G. and Smith, C.R. (1992). Modification and evaluation of the potato disc assay and antitumor screening of euphorbiaceae seeds. *Journal of Natural Products*, 45 (6): 679-686.
34. Meyer, B. N., Ferrigni, J. E., Putnam, L. B., Jacobsen, L. B., Nichols D. E. and McLaughlin, J. L. (1982). Brine Shrimp: A convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Médica* 45: 31-34.
35. Fudenberg, H.H. and Stites, P.D. (1982). *Inmunología clínica.* 3ra edición, El Manual Moderno, México.
36. Bach, J.F. (1978). *Immunology.* John Wiley and Sons, Medical Publication, 45-46, 364, 368.
37. González-Garza, M.T., Sousa, V. and Sotelo, A. (1982) Differential cytotoxicity of the isolated protein fraction of Escumite bean (*Phaseolus acutifolius*). *Qual Plant Foods Hum Nutr* 31: 319-325.
38. Sotelo, A., Arteaga, M.E., Frías, M.I. and González-Garza, M. T.(1980) Cytotoxic effect of two legumes in epithelial cells of the small intestine. *Qual Plant Foods Hum Nutr* 30: 79-85.
39. Helrich, K. (editor). (1990). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical chemist 15 th. Edition,* Published by AOAC, Arlington. Vol. I 17-18, 40-62 y 69-83, Vol. II 1012.
40. Winton, A.L: y Winton K.B.(1957). *Análisis de Alimentos.* Ed. Continental, S.A. México, D.F., 64-81.

41. Lucas, B., Guerrero, A., Sigales, L. and Sotelo, A. (1988). True protein content and non-protein amino acids present in legumes seeds. *Nutrition Reports International*, 37: 3, 545-553.
42. Asociación Química de Vitaminas. (1969). *Métodos de Análisis de Vitaminas*. Ed. Academia, España, 265-313.
43. Lucas, B. and Sotelo, A. (1982) Aminoacid determination in pure proteins, foods and feeds using two different acid hydrolysis methods. *Anal. Biochem.* 123: 349-356.
44. Manual Waters(1993) AccQ.Tag Chemistry Package Instruction Manual. Millipore, Waters Chromatography. Milford, Ma. USA.
45. Jaffé, W. G., Leney, A. and González, D. I. (1974). Isolation and Partial Characterization of beans phytohemagglutinins. *Phytochemistry* 13: 2685-2693.
46. Kakade, M. L. (1974). Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. *Cereal Chemistry* 51: 376-382.
47. Hultin, E. and Torssell, K. (1965). Alkaloid Screening of Swedish plants. *Phytochemistry* 4: 425-433.
48. Heather, M. D. and Kissmeyer-Nielsen, I. (1979). *Histocompatibility*. Elsevier, North Holland, 10-11.
49. FAO (1970). Amino acid content of foods and biological data on proteins , No 24, Pub. Rome .
50. (1973) Food Agricultural Organization/World Health Organization Energy and Protein Requerimenes. WHO Technical Report Series No. 522
FAO Nutrition Meeting Report Series No. 52, WHO, Geneva, FAO, Rome.
51. Domek, J. M., Cantelo, W.W., Wagner, R.M., Li, B.W. and Miller-Ihli, N.J. (1995). Nutritional Composition of Potato Foliage. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1512-1515.

52. Walsh, T.A. and Twitchell, W.P. (1991). Two Kunitz-Type Proteinase Inhibitors from Potato Tubers. *J. Agric. Food Chem.* 97: 15-18.
53. Lucas, B. and Sotelo, A. (1980). Effect of different alkalies temperature and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins and foods. *Analytical Biochem.* 109: 192-197.
54. Rama Dao, M.V. and Krishnan, C.K. (1974). Colorimetric estimation of tryptophan content of pulses. *Journal of Food Science and Technology* 11: 213-216.