

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE QUIMICA**



**COMPOSICION QUIMICA Y VALOR NUTRICIONAL**  
**DE TRES PLANTAS SILVESTRES**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
**P R E S E N T A**

**MA. AZUCENA BURILLO AMEZCUA**

**MEXICO, D. F.**

M-21639

**1980**



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.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE QUIMICA**



**COMPOSICION QUIMICA Y VALOR NUTRICIONAL**  
**DE TRES PLANTAS SILVESTRES**



**DEPTO. DE PASANTES Y**  
**EXAMENES PROFESIONALES**  
**FAC. DE QUIMICA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
**P R E S E N T A**

**MA. AZUCENA BURILLO AMEZCUA**

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Prof. Enrique García Galeano  
VOCAL: Prof. Angela Sotelo López  
SECRETARIO: Prof. Emilio Barragán Hernández  
1er. Suplente: Prof. Salvador Badui Dergal  
2o. Suplente: Prof. Eduardo Barzana García

Sitio donde se Desarrolló el Tema:

División de Estudios de Posgrado

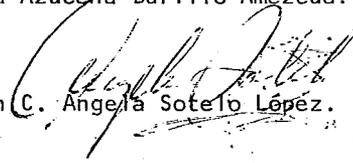
Facultad de Química, U.N.A.M.

Sustentante:



María Azucena Burillo Amezcua.

Asesor:



M. en C. Angela Sotelo López.

A mis Padres:

Jesús y Amparo

Por sus alientos apoyo y cariño  
que me brindan siempre; a ellos  
mi admiración y respeto.

A mi Esposo:

Manuel Padilla

Por su confianza y comprensión  
con su profundo cariño.

A mi Hija Susy:

Por las horas robadas de su querida  
compañía.

A mis Hermanos:

Guille

Amparo

Rebeca

Rubén

Por sus estímulos y ayuda.

Quiero agradecer  
a la M. en C. Angela Sotelo L.  
por su valiosa asesoría, apoyo  
y paciencia en el desarrollo de  
este trabajo.

Así mismo a todos mis Maestros y Amigos.

Hago patente mi reconocimiento a la  
Organización de Estados Americanos  
bajo cuyo patrocinio se realizó el  
presente trabajo.

---

---

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION -----	1
I. GENERALIDADES -----	3
II. OBJETIVO -----	17
III. PARTE EXPERIMENTAL -----	18
Material y Análisis realizados -----	18
Análisis Bromatológico -----	19
Determinación de Aminoácidos -----	19
Determinación de Triptofano -----	25
Determinación de Azúcares Reductores ---	25
Cromatografía en Capa Fina para Identificación de Azúcares -----	28
Determinación de Inhibidores de Tripsina-	32
Determinación de Polifenoles Totales ---	36
Determinación de Hemaglutininas -----	38
Digestibilidad "in vitro" -----	40
IV. RESULTADOS Y DISCUSION -----	46
V. CONCLUSIONES -----	58
VI. BIBLIOGRAFIA -----	60

## INTRODUCCION

Uno de los principales problemas que aún no ha podido resolverse en el mundo, es la nutrición, ya que cada día hay mas millones de gentes que no tienen que comer, y otros millones que no conocen la forma adecuada de comer, por lo que el problema de la alimentación es uno de los más complejos, ya que está además influenciado por condiciones como son:

- fuerzas económicas
- estándares de vida
- tradiciones sociales y culturales
- hábitos de trabajo
- educación
- y otros muchos factores <sup>(12)</sup>.

Este problema de la alimentación es de los mas viejos ya que muchas generaciones han sufrido de hambre, mal nutrición, o ambos, hoy aunque mas alimentos son producidos que en otros tiempos nos queda un largo camino por lograr una buena alimentación para satisfacer la demanda siempre en aumento provocadas por el crecimiento acelerado de la población.

En algunos países la productividad agropecuaria crece a un ritmo menor que la población, la disponibilidad de alimentos es insuficiente. Para mayor complejidad del problema, la productividad agropecuaria crece más rapidamente que la población en los países desarrollados, circunstancia que provoca lo que se ha llamado "la brecha de desnutrición" ya que también un individuo

puede consumir fácilmente dos o tres veces mas cantidad de proteínas de la que su organismo necesita y en esta forma disminuye la disponibilidad de proteínas para otros <sup>(11)</sup>.

Los datos presentados en México sobre el consumo de alimentos, descubren serias deficiencias, mas acentuadas en el medio rural y especialmente marcadas entre los niños. Se calcula que aproximadamente el 55% de la población total consume una dieta que condiciona a un estado de desnutrición crónica, cuya repercusión afecta gravemente al bienestar de la población nacional, su salud y productividad.

Por otro lado, últimamente en México se ha provocado una demanda creciente en productos agrícolas de alta calidad nutritiva, lo que se ha reflejado en el aumento de los precios de los ingredientes empleados en la alimentación animal, por lo que la mayor parte de los esfuerzos para reducir los costos de alimentación en la producción, ha incrementado la substitución de ingredientes como los granos de cereales y las pastas oleaginosas <sup>(6)</sup>.

Sin embargo existe también la posibilidad de disminuir dichos costos con sistemas de alimentación que permite mejorar en la eficiencia alimenticia.

Por lo tanto estos estudios sobre nutrición animal han tratado de buscar nuevas fuentes de alimentos no convencionales viendo la forma de poderlos utilizar de una manera equilibrada y disminuir de esta forma el consumo de alimentos convencionales.

## I GENERALIDADES

En México se encuentra una zona tropical muy extensa y donde se encuentra gran variedad de plantas, muchas no utilizadas y algunas de estas aprovechadas localmente para diferentes usos; pero en realidad se conoce muy poco su importancia, por lo que esta tesis se enfocó al estudio de 3 plantas silvestres conocidas en el estado de Tamaulipas y son descritas a continuación:

### 1.- NACAHA

Nombre científico: *Cordia Boissieri* D. C.

Arbusto perteneciente a la familia de las Borraginaceas.

#### - Borraginaceas

Esta familia cuenta con 90 géneros y cerca de 1500 especies, es ampliamente distribuido através de las regiones de clima caliente de ambos hemisferios. En su gran mayoría son herbáceas.

Sinopsis de los generos de América.

Género

*Cordia*

*Bourreica*

Las Cordias son un grupo con cerca de 250 especies de árboles<sup>(15)</sup> y arbustos, la mayoría son tropicales de América, algunos de estos producen excelentes maderas y otros son propagados por sus frutos<sup>(18)</sup>.

En México hay unas 30 especies de *Cordia*<sup>(29)</sup>.

#### Características de la especie *Cordia Boissieri* D. C.

Nombres comunes.- Anacahuite, Trompillo, Nacahuita, Siricote, Ras-

ca Viejo, Cícuas de Cuerao, Anacahuítl y Nacahua.

Características.

Es un arbusto ó arbolillo de 5 a 6 m. de altura, con la corteza gris que se desprende en láminas y hojas ovales ó elípticas, ligeramente dentadas, ásperas y rugosas de 8 a 10 cm. de largo y 5 a 6 cm. de ancho.

Flores en carimbas terminales sobre ejes bellosos de color leonado, corola blanca, fruto ablongado de unos 2 cm. de largo con el mesocarpio dulce y comestible de color obscuro, tiene solamente 1 semilla.

La madera contiene ácido gálico y tánico, goma, resina y oxalato de calcio que se nota en forma de polvo blanco al partirla en trozos.

El anacahuíte se produce en climas cálidos del vertiente oriental. Se encuentra principalmente en Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz, Hidalgo y San Luís Potosí.

Partes usadas:

La madera, las flores y los frutos.

- Con la madera se prepara un extracto con el que se hace pastillas recomendadas como pectorales.
- Las flores para la tos.
- Los frutos para conservas a los que se atribuyen también virtudes pectorales, para catarros crónicos, constipados y bronquitis<sup>(24)</sup>.



## 2.- CACACHILA

Nombre científico *Citharexylum Berlandieri* Robinson.

Arbusto perteneciente a la familia de las verbenáceas.

Verbenáceas

Esta familia incluye cerca de 80 géneros y cerca de 1200 especies de plantas, la mayoría herbáceas.

Muchas de estas son usadas como piezas hornamentales.

Dos de estos géneros son encontrados en los bosques tropicales.

Sinópsis de estos géneros:

Género

Avecenina

Citharexylum<sup>(15,9)</sup>.

Citharexylum.

Comprende un grupo pequeño de árboles Tropicales Americanos y arbustos nombrando cerca de 20 especies<sup>(29)</sup>.

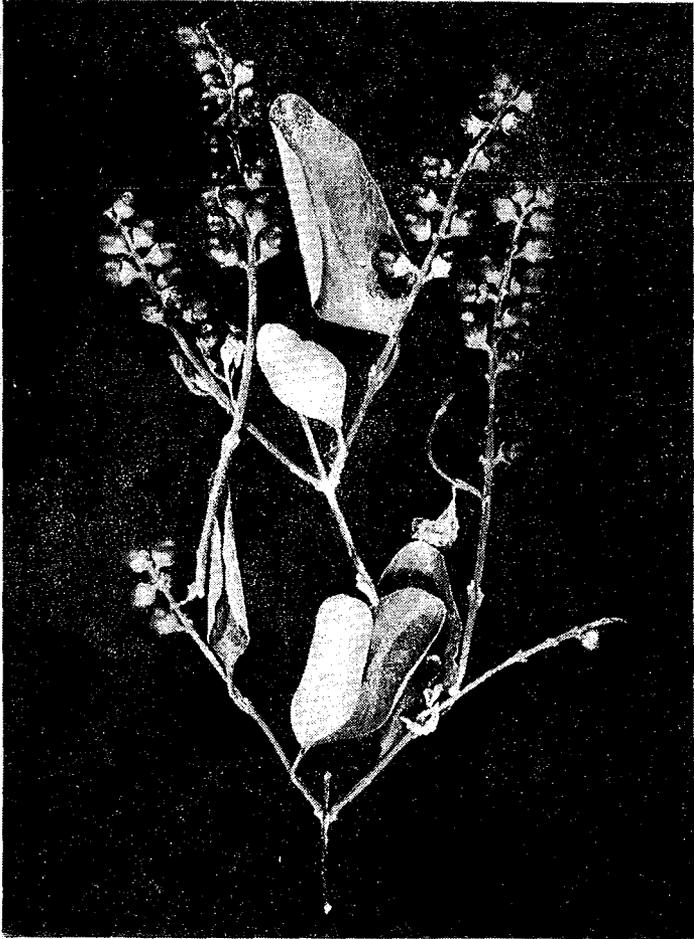
Características de la especie Citharexylum Berlandieri Robinson.

Nombres comunes.- Cacachila, Panochillo (Sinaloa), Carne de Gallina, Negrita, Orezuelo (Tamaulipas), Revienta Cabra, Saucohedondo (Veracruz).

Se encuentra principalmente en Sinaloa, Tamaulipas, San Luis Potosí y Veracruz.

Usos. Se toma el cocimiento de las hojas contra los resfriados; alimento para pájaros y rumiantes<sup>(24)</sup>.

Descripción. Son frutos pequeños, se dan en forma de racimos y son de color rojo.



### 3.- CHAPOTE

Nombre científico Diospyros Palmeri Eastw.

Es un arbusto perteneciente a la familia de las Ebenaceas. Esta es una familia típica originaria de regiones tropicales o subtropicales, raramente de las templadas.

Consta de 6 géneros de arbustos de árboles de madera dura, contando con 275 especies.

La mayoría de las especies son naturales de la India, China y América, principalmente proveedoras de buenas maderas casi todas negras. Las más importantes son las del género Diospyros. El jugo de los frutos de algunas especies son utilizados para teñir telas, especialmente de negro, para fabricar tintas de escribir o para impermeabilizar redes y otros implementos de pesca.

Debe hacerse notar que algunas especies se consideran tóxicas, aunque existen también las que poseen algún valor nutricional. El género Diospyros incluye solo representantes de América (25, 5).

#### Diospyros.

El género Diospiros de la familia ebenacea está constituido por unas 250 especies, nativas de regiones tropicales y subtropicales y cuyo fruto es comestible y su madera apreciada por su dureza y resistencia a las termitas.

En México crecen silvestres o ya en cultivo, 11

especies en Veracruz y Tamaulipas, crecen el *Diospyros ebanaster*, conocido como zapote prieto y en el noroeste del país se encuentra el *D. Texana* y *D. Palmeri*.

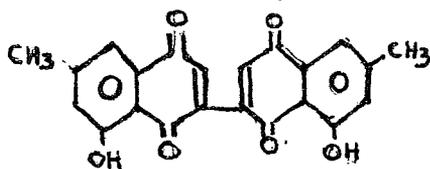
Los estudios químicos de las raíces, tallos y frutos de unas 40 especies de *Diospyros* han proporcionado naftoles, naftoquinonas y triterpenos.

#### Características de *Diospyros Palmeri* Eastw.

Nombre común Chapote.

El nombre de *Diospyros* viene del antiguo griego de "Dios" (divino) y "puros" (trigo) literalmente "alimento del cielo" ó "trigo de Zeus" (15).

Del tronco de *D. Palmeri* se han separado sitosterol, diospirina II y los triterpenoides, ácido betúlico, epilupeol y la cetona D<sub>p</sub>EEPA-160, triterpenoide penta acíclico insaturado con el núcleo del lupano

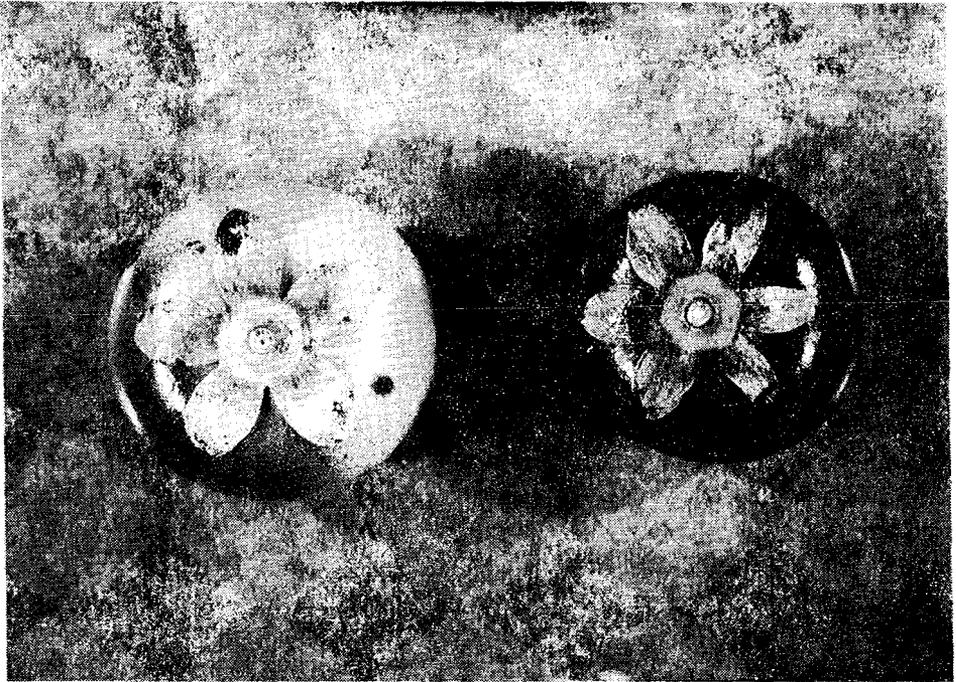


Diospirina II (10)

Usos conocidos.- Como alimento humano y animal.

#### Descripción.

Son frutos de color amarillo rojizo, al secarse toman un color negro, son muy pegajosos debido a su alto contenido de azúcares.



### EVALUACION NUTRITIVA DE LOS ALIMENTOS

Los estudios que se llevan a cabo para evaluar la calidad nutricional de los alimentos consta principalmente de: EL ANALISIS PROXIMAL. Este ha sido por mas de un siglo el punto de partida en la evaluación de los alimentos, sin embargo, debido a sus limitaciones, ya que determina grupos de compuestos con caracterfsticas físicoquímicas semejantes, pero con diferente valor nutritivo, en los últimos años se han venido cambiando ciertos procedimientos de manera que los parámetros para medir estén mas de acordes con el valor biológico del alimento.

Las técnicas mas empleadas para determinarlas en nutrición animal son:

### 1.- Humedad.

Esta determinación es indispensable a pesar de que no contribuye el valor nutritivo del alimento, excepto en condiciones especiales de acidez, pero si lo hacen susceptible de descomposición<sup>(32)</sup>.

Aunque también el agua en otros casos puede ser correlacionada positivamente con la digestibilidad del alimento<sup>(8)</sup>.

### 2.- Proteína cruda.

### 3.- Material mineral (cenizas).

### 4.- Grasa cruda ó extracto etéreo.

### 5.- Fibra cruda.

El contenido de fibra cruda en un alimento es de importancia, ya que los compuestos que lo forman (celulosas, hemicelulosas y ligninas) son prácticamente indigeribles por animales monogástrico, aunque en rumiantes la situación cambia con respecto a las celulosas y hemicelulosas ya que estas son degradadas por la flora y fauna ruminal<sup>(7)</sup>.

### 6.- Extracto libre de nitrógeno (carbohidratos).

Los carbohidratos tienen como función dar energía al organismo, solo una pequeña parte de ellos es almacenada en forma de glucógeno.

Los carbohidratos más digeribles son los azúcares simples posteriormente las dextrinas, almidones y finalmente celulosas y hemicelulosas.

Son los compuestos que más se consumen ya que los alimentos que contienen son de bajo precio, dado con esto también a las personas de escasos recursos<sup>(19)</sup>.

En los rumiantes el total de carbohidratos ingeridos una parte se convierte en ácido acético, propionico y butírico y gases como metano y  $CO_2$  <sup>(27)</sup>.

#### 7.- Cuantificación de los aminoácidos totales.

#### 8.- Digestibilidad biológica.

Las pruebas para digestibilidad "in vivo" son probablemente las pruebas mas valiosas en la evaluación nutritiva de los alimentos, desafortunadamente son costosas y lentas de realizarse, por esto se han desarrollado técnicas de laboratorio que permitan su valoración en menos tiempo y a menor costo. Las pruebas de digestibilidad "in vitro" utilizando líquido ruminal obtenido de animales alimentados con dietas adecuadas, estan siendo usados ampliamente como indicadores de digestibilidad de alimentos para rumiantes.

9.- La determinación de elementos específicos deben realizarse especialmente en aquellos alimentos ó suplementos particularmente ricos en ellos <sup>(21,32)</sup>.

Por lo que en estas plantas como contienen muchos carbohidratos se hizo necesaria la determinación de azúcares, como azúcares solubles totales, almidones, azúcares reductores directos, azúcares totales, etc.

### FACTORES TOXICOS

Es también necesario determinar los tóxicos presentes, ya que existen plantas que tienen un papel importante en la dieta de la población, o que se utilizan en la alimentación de animales; sin embargo, su consumo generalmente se ve limitado por la presencia de factores tóxicos, que son capaces de impedir el máximo aprovechamiento del material o de alterar, el metabolismo del que los ingiere<sup>13)</sup>.

Practicamente todos los alimentos pueden contener sustancias tóxicas naturales, algunas veces en cantidades que pueden producir efectos tóxicos en diferentes niveles.

La Academia Nacional de Ciencias y el Consejo de Investigaciones Nacionales de E.E.U.U. han estudiado la farmacología y toxicología de esta variedad de tóxicos en alimentos<sup>3)</sup>.

Estos incluyen:

- las hemaglutininas
- inhibidores de tripsina
- glucósidos cianogénicos
- saponinas
- compuestos polifenólicos

- estrógenos
- estimulantes
- depresivos
- antivitamínicas
- cancerígenos
- elementos radioactivos.

Interesándonos en este estudio principalmente inhibidores de tripsina, compuestos polifenólicos y hemaglutininas.

### INHIBIDORES DE TRIPSINA

Los inhibidores de enzimas se pueden definir como: Cualquier sustancia capaz de reducir la acción enzimática.

La inhibición de una enzima en "vivo" da como resultado:

- Afectar la unión y transformación de un sustrato o producto haciéndolo indispensable.
- Interferir con la biosíntesis de la enzima.
- Incrementar la liberación de la enzima.
- Afectar una hormona, la cual a la vez afecta el nivel de la actividad de la enzima<sup>34)</sup>.

Estos inhibidores se encuentran ampliamente distribuido en el reino vegetal.

Los inhibidores de tripsina actúan inhibiendo la tripsina que es una enzima proteolítica que se libera del páncreas al intestino del hombre y de los animales.

Además de que la pobre utilización de las proteínas ha sido también atribuida a la presencia de este tóxico.

Los inhibidores de tripsina son usualmente destruidos por calentamiento, con ciertas condiciones de temperatura, duración del tratamiento, y condiciones de humedad.

#### COMPUESTOS POLIFENOLICOS.

Los radicales fenólicos son el sitio de formación de puentes de hidrógeno.

Este tipo de uniones determinan el comportamiento de estas sustancias.

Muchas sustancias fenólicas se encuentran en las plantas en forma de glucósidos, y su presencia frecuentemente se ha asociado con la resistencia a ciertas enfermedades. (Estas suposiciones, se basan en la correlación que existe entre el oscurecimiento originado por la oxidación de compuestos polifenólicos y la resistencia a la infección).<sup>4)</sup>

Estos tienen una marcada influencia negativa en el valor nutricional. Son usadas como protectores de proteínas debido a que disminuyen su solubilidad y por lo tanto el ataque microbiano.

Los compuestos polifenólicos pueden estar no solo en las semillas, sino en las hojas, raíces y otras partes de las plantas.

Se ha visto que inhiben enzimas pectolíticas y celulolíticas, pero sus productos de oxidación son generalmente más activa<sup>4)</sup>.

#### Clasificación:

- 1.- fenoles simples
- 2.- flavonas no tánicas
- 3.- taninos condensados o no hidrolizables
- 4.- taninos hidrolizables.

#### HEMAGLUTININAS.

Las fitohemaglutininas (lectinas) son proteínas que tienen la propiedad de aglutinar los eritrocitos de la sangre de diferentes animales<sup>22)</sup>.

Son ampliamente distribuidas en la naturaleza.

El efecto tóxico de las hemaglutininas ingeridas están probablemente relacionada por su acción sobre la mucosa gástrica y la absorción intestinal<sup>16)</sup> Jaffé<sup>17)</sup> supone que lo que causa el efecto tóxico oral es que la hemaglutinina se combina con los grupos receptores en la superficie de las células de la mucosa gástrica, interfiriendo en la absorción de los nutrientes, y que esa actividad hemaglutinante, se deba probablemente a una reacción entre la aglutinina, con ciertos grupos receptores situados en la superficie de las membranas de los eritrocitos.

Casi todas las hemaglutininas obtenidas de diferentes plantas se distinguen entre sí por su especificidad frente

a glóbulos rojos de diferentes **especies**.

El efecto tóxico de las hemaglutininas puede ser generalmente eliminado por tratamiento térmico.

Se puede reconocer sin embargo que las condiciones por medio del cual se destruyen completamente las fitohemaglutininas no se ha alcanzado.

Por todo lo ya expuesto, es posible determinar el valor nutritivo de los alimentos en forma más real si se eligen los métodos de análisis apropiados para el fin a que se destinan y de acuerdo al presupuesto disponible.

## II OBJETIVO

Estudiar el valor nutricional, químico y toxicológico de las siguientes plantas:

- *Diospyros palmeri* Eastw (Chapote)
- *Cordia Boissieri* D. C. (Nacagua)
- *Citharexylum berlandieri* Robinson (Cacachila)

Buscando la posibilidad de que sean utilizadas como fuente de alimentos, no humano (ya que no siempre las plantas pueden ser aprovechadas por los humanos debido a su escaso valor nutritivo), pero sí en la alimentación animal.

Estas plantas son utilizadas en forma restringida y local para diversos usos conocidos solo por estas regiones, pero no hay un trabajo científico que respalde esto, por lo que se les ha tomado en cuenta para la realización de esta tesis, especialmente los frutos de estos arbustos ya que se ha visto que es una de las partes más utilizadas, ya que tienen buena aceptación unas por los humanos y otras por los animales debido a que presentan un agradable sabor dulzón.

Es por eso que se planeó la realización de este estudio promoviendo la búsqueda de nuevas fuentes alimenticias tratando de ayudar a este problema aprovechando nuestros recursos naturales.

### III PARTE EXPERIMENTAL

#### 1.- MATERIAL.

En este estudio se usaron frutos y hojas secas de:

Nacahua.- *Cordia Boissieri* D.C.

Chapote.- *Diospyros palmeri* Eastw

Cacachila.- *Citharexylum berlandieri* Robinson

colectadas cerca de Ciudad Victoria, Tamaulipas.

Estas plantas son conocidas en ciertas regiones donde son utilizadas eventualmente como alimento humano y animal.

#### 1.2 PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

Las muestras fueron limpiadas y secadas a 60° C. y se molieron en un molino Wiley con una malla de 1 mm.

#### 2.- ANALISIS REALIZADOS.

2.1 Determinaciones químicas.

2.1.1 Análisis Bromatológico.

2.1.2 Determinación de Aminoácidos.

2.1.3 Determinación de Azúcares Reductores.

2.1.3.1 Por el método de Lane-Eynon (Soxhlet modificación de Fehling)

2.1.3.2 Identificación de los azúcares por cromatografía en capa fina.

2.2 Determinación de Tóxicos.

- 2.2.1 Determinación de Inhibidores de Tripsina.
- 2.2.2 Determinación de Polifenoles.
- 2.2.3 Determinación de Hemaglutininas.
- 2.3 Pruebas Biológicas.
- 2.3.1 Digestibilidad "in vitro"

#### METODOLOGIA.

##### 2.1.1 Análisis Bromatológico.

Se realizó este siguiendo las técnicas descritas en el A.O.A.C.<sup>1)</sup> determinándose:

Humedad

Cenizas

Proteína cruda

Grasa cruda

Fibra cruda

Carbohidratos asimilables por diferencia.

##### 2.1.2 determinación de Aminoácidos.

Esta determinación se realizó en autoanalizador Technicon Mod. NG2P.

#### FUNDAMENTO.

Consiste en la separación de los aminoácidos para su cuantificación, utilizando resinas de intercambio iónico.

Para esto se requiere efectuar:

- 1) - Una hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 6N.
- 2) - Una separación de los aminoácidos en la columna de resinas de intercambio iónico usando buffers como eluyentes.
- 3) - Determinación colorimétrica de los aminoácidos por formación de un complejo colorido con la ninhidrina que es registrado automáticamente graficando , llamando a esta gráfica amino-grama.

#### MATERIAL.

- tubos Pyrex con tapón de rosca con empaque de teflón
- matraces aforados de 25 ml.
- embudos
- balanza analítica
- parrilla eléctrica
- termometro
- digestor marca Tecator mod. ab
- rotavapor marca Büchi
- autoanalizador marca Technicon mod. NE2P

#### REACTIVOS.

- Acido clorhídrico 6N
- Ninhidrina al 1% en metilcelosolve
- Metil celosolve
- Sulfato de hidrazina 2 milimolar

Hidroxido de sodio 0.2N

Solución Buffer PH 1.5

Buffer # 1 PH 3.90

buffer # 2 PH 4.10

Buffer # 3 PH 5.50

#### PREPARACION DE LAS SOLUCIONES

Reactivos y soluciones	Buffer # 1 regenerador de la columna.	Buffer # 2 para separar aminoácidos neutros	Buffer # 3 separar aminoácidos básicos
1) Acetato de sodio anhidro	4.1 g.	4.1 g.	85.0 g.
2) Acido acético glacial	11.8 ml.	11.8 ml.	15.0 ml.
3) Acetato de zinc. (CH <sub>3</sub> COO) 2Zn.2H <sub>2</sub> O solución 0.5 M	---	0.6 ml.	2.0 ml.
4) Alcohol etílico.	78.0 ml.	78.0 ml.	---
5) Alcohol benzílico.	---	---	11.0 ml.
6) Hidroquinona	0.11 g.	0.11 g.	---
7) Solución de BRIJ-35 al 20%	4.0 ml	4.0 ml	4.0 ml
8) E.D.T.A.	0.1 g.	---	---
9) Acido caprílico.	0.1 ml.	0.1 ml.	0.1 ml.
10) Agua desionizada.	0.1 ml.	0.1 ml.	0.1 ml.
11) Ajuste de PH.	3.90± 0.02	4.10± 0.02	5.50± 0.02

En medio litro de agua destilada y desionizada se disuelve el acetato de sodio, añadir hasta el reactivo #8 y calentar por 15 minutos con agitación. Transcurrido este tiempo se enfría para ajustar el PH. Una vez ajustado el PH, se afora al volumen con agua desionizada y el ácido caprílico.

#### NINHIDRINA AL 1.0%

Ninhidrina 10 g.

Metilcelosolve 500 ml.

Buffer de acetato de sodio 4N 250 ml.

Agua destilada desionizada cbp 1 lt.

- a) En un vaso de 1 l. disolver la ninhidrina en metilcelosolve con agitación.
- b) Adicionar el Buffer de acetato de sodio lentamente.
- c) Llevar a 1 l. con agua destilada desionizada en un matraz volumétrico.
- d) Pasarla a un frasco oscuro de reactivo y burbujearle  $N_2$ . (Esto se prepara 24 horas antes de usarse).

#### METILCELOSOLVE AL 50%

Metilcelosolve 500 ml.

Agua destilada y desionizada 500 ml.

Solución de sulfato de hidrazina 2 mN.

Sulfato de hidrazina 0.262 g.

Agua desionizada 992.5 ml.

Sol. BRIJ-35 al 20% 7.5 ml.

- a) Disolver el sulfato de hidrazina en agua con agitación y agregar el BRIJ-35 al 20%.
- b) Adicionar una gota de  $H_2SO_4$  conc. por cada lt. (para acidular la solución).

Solución de Na OH 0.2N

NaOH 2.0 N. 2 ml.

Agua desionizada cbp 1 l.

### TECNICA

En los tubos con tapón de rosca se coloca la cantidad de muestra resultante de la fórmula:

$$\text{mg} = \frac{0.05 \times 100}{\%P}$$

de manera que contenga 0.05 g. de proteína, después añadir la cantidad de ml. de HCl 6N resultante de la fórmula:

$$\frac{2 \times 100}{\% P}$$

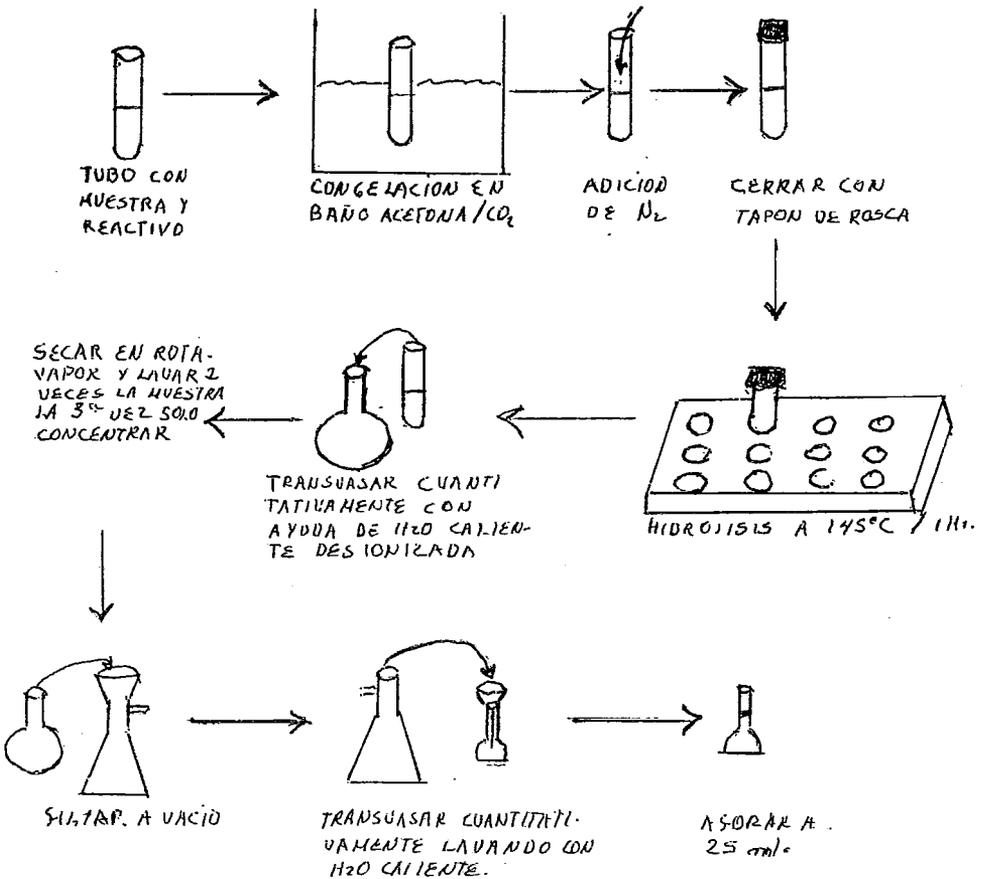
Se congelan en baño de acetona  $CO_2$  y se hace pasar  $N_2$  y se tapan muy bien.

Estos tubos se colocan en el digestor a una temperatura de  $145^\circ C$  durante 4 horas, transcurriendo ese tiempo se retiran los tubos que contienen el hidrolizado y se evaporan a sequedad y se lava por dos veces con agua desionizada caliente evaporando cada vez a sequedad para eliminar el exceso de ácido en el rotavapor, agregando por último agua caliente desionizada y evaporando sin ser esta vez a sequedad.

Se filtra y se afora a 25 ml. con agua desionizada, tomando este volumen un mililitro y añadiéndole un mililitro de buffer PH 1.5, se agita y de esta solución se toma 0.1 ml. para inyectarse en el autoanalizador.

Se reporta como g. de aminoácido/16 g. de nitrógeno.

DESCRIPCION ESQUEMATICA.



## DETERMINACION DE TRIPTOFANO.

Se realizó por el método del autoanalizador, siguiendo el procedimiento descrito en la determinación de aminoácidos. La variación fué principalmente el tipo de hidrólisis y la solución amortiguadora utilizada como eluyente. (Método establecido en el laboratorio por Bernardo Lucas, trabajo en prensa).

## FUNDAMENTO.

Consiste básicamente en una hidrólisis alcalina con hidróxido de litio 6N. para evitar la destrucción del triptofano, una separación del triptofano en una columna de resinas sintéticas de intercambio iónico, usando buffer Ph 5.5 para lograr la elución del triptofano y la determinación colorimétrica del complejo colorido con ninhidrina.

## MATERIAL Y TECNICA.

Se utilizó lo mismo que para la determinación de aminoácidos solo que se usó Hidróxido de litio 6N y la digestión se hizo por un lapso de 8 horas a una temperatura de  $145^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

### 2.1.3 Determinación de Azúcares Reductores.

#### 2.1.3.1 Método Lane-Eynon (Soxhlet Modificación de Fehling).

Se realizó siguiendo la técnica descrita en el A.O.A.C.<sup>1)</sup> por medio de la precipitación del cobre presentes en las soluciones Soxhlet (Modificación a la solución Fehling) y el calculo de azúcares reductores totales informados como azúcares invertidos.

#### FUNDAMENTO:

Se basa en la propiedad de los monosacáridos y algunos disacáridos, de reducir en medio alcalino, el cobre en estado cúprico a óxido cuproso y por esto, reciben el nombre de azúcares reductores.

#### MATERIAL.

Equipo convencional de laboratorio.

#### REACTIVOS

- 1) Para la defecación de la muestra:
  - a) Solución acuosa saturada de acetato de plomo.
  - b) Solución acuosa saturada de sulfato de sodio.
  - c) Acido acético glacial Q.P.
  
- 2) Para determinación de sacarosa en el filtrado:
  - a) Solución Fehling modificación Soxhlet.  
Se prepara mezclando volúmenes iguales de solución A y B, inmediatamente antes de su empleo.

Estas soluciones se preparan como sigue:

- A.- Disolver 34.639 g. de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en agua destilada, aforar a 500 ml. y filtrar a través de asbesto preparado.
- B.- Disolver 173 g. de tartrato de sodio y potasio y 50g. de sosa en agua, aforar a 500 ml, dejar reposar 2 días y filtrar a través de asbesto preparado.
- b) Solución acuosa de azul de metileno al 1%.
- c) Solución estándar de sacarosa.

se pesa 9.5 g. de sacarosa pura y se le añaden 5 ml. de HCl, diluir con agua destilada a 100 ml. Almacenar por 7 días entre 12-15° C ó 3 días a 20-25° C.

Después se diluye a 1 l.

Esta solución de azúcar invertido es estable por varios meses.

Antes de su uso neutraliza una alícuota con NaOH 1N.

## TECNICA

### Extracción de las muestras.

Colocar 10g. de muestra en un matraz de 250 ml, si hay acidez neutralizar adicionando  $\text{CaCO}_3$ . Se añade 125 ml. de alcohol al 50%, agitar y calentar por 1 hora en baño de agua a 83-87°C utilizando un embudo para condensar el vapor, se enfría, se agita y se deja en reposo toda la noche.

Diluir a un volumen conocido (250 ml.) con alcohol

al 95%, agitar fuertemente y centrifugar 15' a 1500 rpm, decantar y pipetear 200 ml. de sobrenadante. Evaporar hasta 20-30 ml. y transferir a un matraz volumétrico de 100 ml. lavando cuantitativamente con agua.

Defecar añadiendo 2 ml. de solución saturada, neutra de acetato de plomo, para producir floculación, agitar vigorosamente y dejar en reposo 15'; añadir oxalato de potasio, aforar, filtrar y determinar azúcares por el método Fehling.

NOTA.

Las muestras para hacer este análisis fueron secada en la estufa a vacío a menos de 40°C para evitar caramelización de los azúcares.

#### Determinación de los azúcares en la muestra.

Mezclar en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, 5 ml. de solución A y 5 ml. de solución B; agregar 50 ml. de agua destilada y calentar a ebullición.

Añadir con una bureta la solución de la muestra, hasta cambio de color, mantener la ebullición moderada y agregar 1 ml. de solución de azul de metileno. Añadir mas solución de la muestra gota a gota hasta decoloración del indicador.

2.1.3.2. Cromatografía en capa fina<sup>26)</sup> para identificación de azúcares.

## TECNICA BIDIMENSIONAL.

### FUNDAMENTO.

Se basa en la movilidad que tienen los azúcares en placas con silicagel, que depende principalmente de los pesos moleculares y del número de grupos oxhidrilo y consecuentemente de la diásteroisomerización:, por lo que pueden ser separados midiendo sus RF correspondientes<sup>23,31)</sup>.

### MATERIAL.

- placas de vidrio de 10x5 cm.
- 2 cámaras.
- propipetas de 2 ml.
- estufa
- material convencional de laboratorio

### REACTIVOS.

- sílica gel 60 G. cromatofolios de silicagel 6F254 Merck
- butanol
- ácido bórico al 5%
- isoprepanol
- acetonitrilo
- fenol
- etanol
- ácido sulfúrico concentrado

METODO.

Preparación de los eluyentes.

Eluyente 1.-

Butanol: isopropanol: sol. ácido bórico al 5%  
(30:50:20).

100 mg. de ácido bórico se disuelven en 20 ml. de agua. Se mezcla 1-butanol-2 propanol y la solución de ácido bórico en la proporción de volúmenes 30:50:20. A temperaturas entre 20 y 25°C.

La mezcla preparada se conserva 1 año como mínimo.

Eluyente II

Acetonitrilo agua (85:15)

Revelador

(fenol-ac. sulfúrico)

Se pesa 3 g de fenol y se agrega 5 ml de ácido sulfúrico concentrado y se disuelven en 95 ml. de etanol.

Solución patrón:

En un matraz aforado de 100 ml. se pesan 20 mg. de cada uno de los azúcares que se van identificar, se disuelven en 50 ml. de agua, y se completa hasta la marca con 2-propanol, al mezclar la solución se calienta. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se afora con iso-propanol para compensar la pérdida por concentración.

#### Preparación de la muestra.

Se pesa 2 g. de muestra y se le agregan 15 ml. de alcohol-agua (1:1) se colocan en baño maría a 40-50°C durante 15 min., repetir la operación, decantando en cada extracción, juntando el líquido sobrenadante, se filtra y se lava cuantitativamente con alcohol agua (1:1) y finalmente con alcohol al 96% ó absoluto, y se defeca con solución saturada de acetato de plomo y después oxalato de potasio, para eliminar el plomo en exceso se filtra y se afora a 100 ml.

De esta solución se hacen diluciones de tal forma que queden aproximadamente 20 mg. de azúcares en 100 ml.

#### Técnica.

Los cromatofolios de silicagel 254 se lavan en el eluyente I (colocándolos en la cámara uno frente al otro y se dejan correr hasta que cubra toda la placa, se sacan de las cámaras y se secan (con una pistola secadora) ). Se introducen nuevamente en el eluyente I en la misma dirección y se secan.

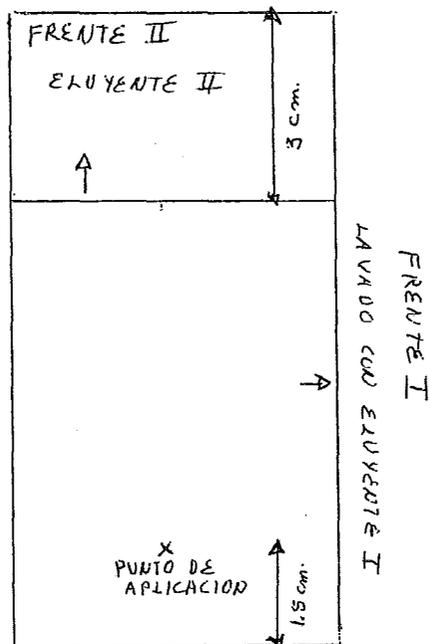
En los cromatofolios ya lavados se aplica la muestra (3 aplicaciones) como se indica en la figura.

En otra placa o en la misma se aplica la solución patrón en la misma forma anterior.

se corren en dirección perpendicular a la primera hasta el borde de la placa, en el eluyente II, se seca y se repite el desarrollo dos veces mas en la dirección.

Se revelan aplicando el reactivo fenol-ac. sulfúrico por rociado hasta que la placa se vea transparente, y se seca con aire caliente hasta que la placa tome un color café y las

manchas de los carbohidratos aparezcan de color pardo.



Se miden los RF de las muestras y de los patrones.

## 2.2. Determinación de Tóxicos.

### 2.2.1 Determinación de Inhibidores de Tripsina.

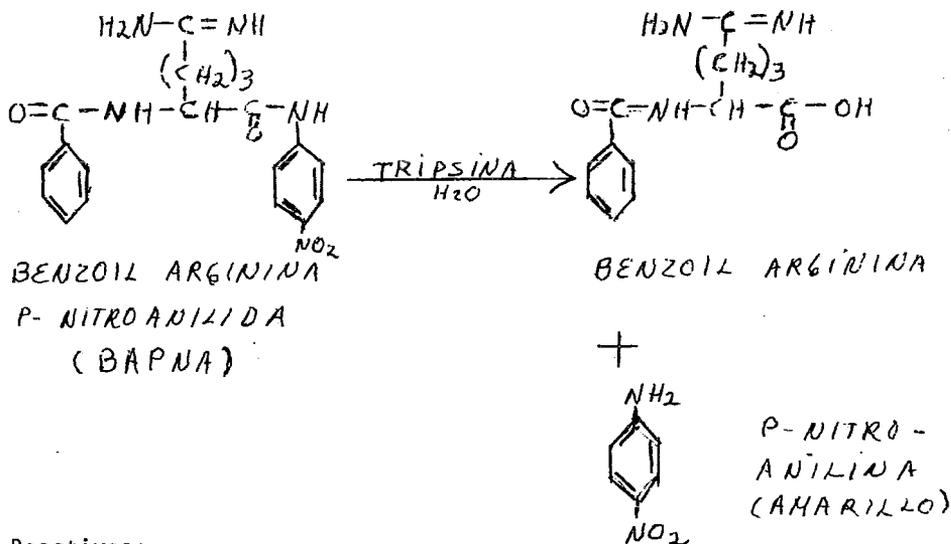
Se llevó a cabo siguiendo el método de Kakade y Col.<sup>20)</sup>

#### FUNDAMENTO.

Se basa en una determinación "in vitro", en la cual la tripsina se pone en contacto con la muestra y después se hace reaccionar la tripsina no inhibida con un sustrato sintético (BAPNA (benzoil/arginina p-nitroanilina) Sigma Co.) liberando ben-

zoil arginina y p. nitroanilina que es de color amarillo y cuya concentración es inversamente proporcional a la concentración de inhibidor de tripsina en la muestra.

REACCIÓN :



Reactivos:

- Solución amortiguadora de Tris (hidroximetil amino etano) 0.05 M PH=8.2.  
Se prepara pesando 6.05 g. de Tris g 2.94 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .  
Se disuelven en agua destilada y se mezclan en un volumen total de 900 ml. y se ajusta el PH a 8.2 y se afora a 1l con agua destilada.
- Solución BAPNA 3 milimolar.  
Primero se prepara una solución BAPNA 0.04M, para lo cual se pesan 870 mg. de BAPNA y se disuelven en 50 ml. de dimetil-sulfóxido (debe tenerse cuidado de que la disolución sea completa, ya que los residuos de cristales hacen precipitar el

reactivo.

La solución obtenida puede guardarse en el refrigerador.

La solución BAPNA 3 milimolar se prepara tomando 3.75 ml. de solución BAPNA 0.04 M y aforando a 100 ml. con solución amortiguadora Tris (se prepara antes de ser usada).

- Solución estándar de tripsina de 40 Mg/ml.

Se pesan exactamente 4 mg. de tripsina (cristalizada 2 veces y libre de sales Sigma Co.) y se disuelve en 100 ml. de NaCl 0.001 M. Esta solución puede guardarse en refrigeración por 2 o 3 semanas sin pérdida de actividad.

#### TECNICA.

Preparación de la muestra.

Se pesa 1 g. de la muestra secada al aire y molida, se le adiciona 45 ml. de Na OH 0.01N y se ajusta el PH a 9.6, se afora a 50 ml. y se agita mecánicamente durante 1 h., después se centrifuga y se toman alícuotas de 5 ml. del sobrenadante y aforar a 50 ml. en agua destilada. Del extracto obtenido se emplearon alícuotas para la determinación ( $\pm$  1 ml).

#### Determinación de la actividad antrípica de las muestras.

- Tomar alícuotas de 1 ml. de cada uno de los extractos de las muestras por triplicado y colocarlas en tubos de ensaye.
- Agregar 5 ml. de H<sub>2</sub>O destilada a cada uno de los tubos.

- Adicionar 1 ml. de solución estandar de tripsina a todos los tubos.
- Agitar.
- Colocar los tubos en un baño de agua a 37°C.
- Agregar 1 ml. de ac. acético al 30% a uno de los tres tubos, de cada muestra, que servirá como blanco correspondiente.
- Dejar reposar 5 min. para estabilizar la temperatura.
- Agregar 2 ml. de solución BAPNA 3 m.M. a todos los tubos.
- Dejar reposar 15 min. para que se lleve a cabo la reacción.
- Agregar 1 ml. de ácido acético al 30% a los tubos que no tienen para detener la reacción.
- Sacar los tubos del baño y agitar.
- Leer en el espectrofotómetro (Modelo Coleman Junio II A, a 420 n.m.

Al mismo tiempo que las muestras se corre una curva estandar de tripsina de la siguiente forma:

Tubos	Estandar de Tripsina	H <sub>2</sub> O	Ac.acetico 30% (1 ml.) tubos	BAPNA	Ac.acetico (1 ml.) tubos
1,2,3	0.2 ml.	5.8 ml.	1	2 ml.	2,3
4,5,6	0.4	5.6	4	2	5.6
7,8,9	0.6	5.4	7	2	8.9
10,11,12	0.8	5.2	10	2	11,12
13,14,15	1.0	5.0	13	2	14,15

Agitación H<sub>2</sub>O Baño de 37°C  
 Reposo 5 min.  
 15 min. de reposo  
 Agitación.

CALCULOS:

Los resultados de los problemas se pueden leer directamente en la curva estandar y reportarse como mg. de tripsina inhibida por gramo de muestra, o se pueden reportar en UTI (número de unidades de tripsina inhibida).

Donde una unidad de tripsina se define arbitrariamente con el aumento de 0.01 unidades de densidad óptica (D.O.) a 420 n.m.

Entonces las UTI/mg. de muestra se obtienen restando la D.O. de cada problema a la D.O. del último punto de la curva estandar, equivalente a 1 ml. de solución estandar de tripsina. Después se hace la relación con IUTI=0.01 unidades de D.O. a 420 n m.

$$UTI = \frac{(D.O. \text{ de } 40 \text{ Ug} - D.O. \text{ problema})}{\text{mg. de muestra}}$$

2.2.2 Determinación de Polifenoles.

Se utilizó el método de Price y Butler<sup>28)</sup>.

FUNDAMENTO.

Esta prueba consiste básicamente en la reducción del ión férrico a ión ferroso, por taninos y polifenoles, siguiendo la formación de un complejo de ferrocianuro-ferroso, conocido como azul de Prusia.

MATERIAL.

- baño maría con agitación
- centrífuga
- espectrofotómetro modelo Coleman Junio IIA

REACTIVOS.

- solución de cloruro de sodio 0.2 M.
- cloruro férrico 0.1 N en HCl 0.1 N
- ferricianuro de potasio 0.08 M
- solución de ácido tánico (20 Mg/ml)

TECNICA.

Extracción de los polifenoles.

50 mg. de muestra se agitan con agua durante 20 min. a temperatura ambiente. Se afora a 50 ml. para después centrifugar.

- 1.- Se coloca en tubos de ensayo de 1-2 ml. de extracto acuoso.  
En ocasiones se debe hacer diluciones precisas.
- 2.- Se adiciona agua, de tal manera que el volumen de ésta, sumado con el anterior den 5 ml. en total.
- 3.- A cada tubo se le adicionan 0.3 ml. de  $FeCl_3$ .
- 4.- Se agitan y se agregan 0.3 ml. de  $K_3Fe(CN)_6$ .
- 5.- Se agitan y al cabo de 10 min. se leen a 720 nm. contra un blanco que ha estado en idénticas condiciones. Las lecturas se hacen un lapso de 10 min. debido a que después aparece un

precipitado. Cada muestra se trabaja por triplicado.

6.- Se interpola esta absorbancia en la curva estandar para obtener los microgramos de polifenoles totales.

La curva estandar de ac. tánico se hace de la misma manera utilizando de 0 a 1.0 mg. de ácido tánico en c/tubo.

<u>Tubos por triplicado</u>	<u>mg. ac. tánico</u>	<u>H<sub>2</sub>O</u>	<u>Fe Cl<sub>3</sub></u>	<u>K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub></u>
1	0	10	0.3	0.3
2	.1	9.9	0.3	0.3
3	.2	9.8	0.3	0.3
4	.3	9.7	0.3	0.3
5	.4	9.6	0.3	0.3
6	.5	9.5	0.3	0.3
7	.6	9.4	0.3	0.3
8	.7	9.3	0.3	0.3
9	.8	9.2	0.3	0.3
10	.9	9.1	0.3	0.3
11	1.0	9.0	0.3	0.3

### 2.2.3 Determinación de Hemaglutininas.

Se hizo de acuerdo al método descrito por Jaffé y Cal.<sup>16)</sup>

### FUNDAMENTO.

Esta es una prueba semicuantitativa basada en la propiedad que tienen las hemaglutininas presentes en los extractos de las muestras, de aglutinar diferentes tipos de eritrocitos (de vaca, conejo y humanos).

### MATERIAL.

- aparato de micro-titer (Cook Eng. Alexander Virginia U.S.A.)
- sangre de vaca
- sangre humana
- sangre de conejo

### Reactivos:

- solución salina al 1.0%
- solución de tripsina 0.1%

### METODOLOGIA.

Preparación de los extractos de las semillas.

Se suspende 1 g. de muestra molida en 10 ml. de solución salina 1.0% y se agita mecánicamente por 2 horas en las muestras crudas y 3 si son cocidas, después se centrifuga para separar el sobrenadante que es el que se utiliza en las determinaciones, se debe tener una concentración final de 100 mg/ml.

### Preparación de los eritrocitos.

La sangre se lava mas o menos con la misma can-

tividad de solución de NaCl - al 0.85% por tres veces y se centrifuga durante 30 min, el sobrenadante. Una vez lavada se diluye al 4% (por c/ml de globulos rojos se añade 14 ml. de Na Cl 0.85%).

A cada 9 ml. de la suspensión de los glóbulos rojos al 4% se le agrega 1 ml. de la solución de tripsina 0.1%, se dejan en contacto a 37°C en la estufa por 1 hora. Se centrifuga para eliminar el sobrenadante, se lava tres veces con la solución salina 0.85% y se lleva al volumen inicial.

La sangre tratada con tripsina dura  $\pm$  3 o 4 días en refrigeración.

#### Técnica.

Se coloca 0.05 ml. de extracto final en un micro tubo ó microtiter y se diluye sucesivamente con la solución salina a 0.85% agregando posteriormente sobre cada una de estas diluciones un volumen de 0.05 ml. de suspensión de eritrocitos. La lectura se realiza después de media hora de la adición de eritrocitos, considerándose positiva la dilución en que la aglutinación era evidente a simple vista.

#### 2.3.1 Digestibilidad in vitro.

Se utilizó la modificación de Barnes al método de Tilley y Terryz)<sup>2,10</sup>.

## FUNDAMENTO.

Se basa en una simulación del desdoblamiento de algunos componentes de los carbohidratos estructurales en componentes solubles mediante enzimas producidas por microorganismos del líquido ruminal bajo condiciones anaerobias y con temperatura y PH controladas, así mismo se simula el desdoblamiento del material protéico por medio de pepsina, en el tracto intestinal posterior de los rumiantes mediante las siguientes etapas:

- 1° la incubación de una muestra con microorganismos del rumen en un medio nutritivo buffer.
- 2° La incubación del residuo de la 1a. etapa en una solución de pepsina-ácido clorhídrico.

Por lo que la cantidad de materia seca que desaparece esta relacionada a los valores de digestibilidad "in vivo".

## MATERIAL.

- tubos de ensayo de 100 ml.
- tapones de goma equipados con válvulas Bunsen, o perforados con agujas desechables ( para dejar escapar el gas )
- papel filtro whatman # 541
- fuente para producir vacío
- manta de cielo
- termo de boca ancha
- potenciómetro Corning Scientific Instruments Model 10
- baño de incubación

- tanque fuente de  $\text{CO}_2$
- equipo convencional de laboratorio

### REACTIVOS

- saliva artificial de Mc-Dougall ( para 1 l.)
  - 9.80 g. de  $\text{NaHCO}_3$
  - 7.00 g. de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  ó 3.71g anhidro
  - 0.57 g. de  $\text{KCl}$
  - 0.47 g. de  $\text{NaCl}$
  - 0.12 g de  $\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
  - 0.04 g. de  $\text{Ca Cl}_2$

Se mezclan los primeros 5 reactivos en 500 ml. de agua destilada hasta que se disuelvan, se afora a 1.l. ( se pueden almacenar). Antes de usarse se adiciona el  $\text{Ca Cl}_2$ , se mantiene a  $39^\circ\text{C}$  y se burbujea  $\text{CO}_2$  en la solución hasta  $\text{PH} = 6.8-7.0$ .

- $\text{HCl}$  2N:
- solución de pepsina 5%
- inóculo de líquido ruminal filtrado.

Se utiliza líquido extraído de rumiantes que tengan fístula ruminal y que se ha alimentado regularmente dos veces al día con heno de alfalfa de mediana calidad (12% de pasto), con minerales y sal (si no existe heno de alfalfa se puede sustituir por un forraje similar).

Por medio de una fístula se introduce una manguera-

guera de una pulgada de diámetro. Esta manguera se une a un tapón colocado en un matraz kitazato. El matraz se coloca en el piso dentro de una cubeta con agua a 40°C cubierta con una tela gruesa de color oscuro. Se succiona con bomba de vacío hasta obtener la cantidad requerida. Una vez obtenido el líquido se filtra a través de varias capas de manta de cielo. El líquido ruminal se colecta a media mañana, dos horas después de que ha-lla comido el animal, pero sin acceso al agua. El líquido se lleva al laboratorio en un termo a 39° C, se le burbujea CO<sub>2</sub> durante un minuto y se utiliza inmediatamente. El líquido utilizado fué de un borrego y fué proporcionado en la Universidad de Chapingo.

#### METODOLOGIA.

Las muestras a analizar se secan al aire y deben tener una humedad menor del 12% y pasar un tamiz de 1 mm.

Se pesa exactamente 0.5 g. de muestra (haciendo 5 veces cada muestra) y se le adicionan 40 ml. de saliva artificial. Se deja estabilizar a 39°C durante 15 min. y se le adiciona entonces 10 ml. de líquido ruminal.

Se hace pasar CO<sub>2</sub> dentro del tubo durante 15 segundos antes de tapar fuertemente con el tapón equipado con válvula bunsen. Se colocan los tubos en una incubadora a 39°C y en la obscuridad.

Esta prueba se realiza por quintuplicado y se in-

cluyen cuando menos cinco blancos que contengan líquido ruminal y saliva artificial.

Se incuba durante 48 horas agitando los tubos suavemente a las 2, 4, 20 y 28 horas después de iniciada la incubación para dispersar las partículas. Todas las operaciones anteriores se realizan en la oscuridad.

Después de 48 horas de incubación se remueven los tubos y se mide y registra el PH de los blancos.

Agregar 1 ml. de HCl 2N controlando la espuma con alcohol amílico. Se repite la operación agregando 2 y despues 5.4 ml. de HCl 2N hasta completar 7.4 ml. por tubo.

Se adiciona finalmente 2 ml. de solución de pepsina al 5% a cada tubo, se agita y se incuban a 39°C por 48 horas, agitando a las 2, 4, 20 y 28 horas de incubación. (En esta etapa ya no es necesario hacerlo en la oscuridad).

Después de las 48 horas se filtra cada tubo en un papel filtro Whatman # 541 previamente secado a la estufa y tarado.

Se usa posteriormente el filtrado en estufa a 105°C durante una noche. Se deja enfriar en un desecador y se pesa.

El material que permanece en el filtro es la materia seca no digerida. La cual se obtiene por diferencia.

Cálculos:

$$\text{Materia seca inicial g} = \frac{A \times B}{100} = (E)$$

donde:

A = peso de la muestra secada al aire

B = porcentaje de materia seca en la muestra

Materia seca residual en la muestra  $g-E = D - C = (F)$

donde:

C = peso del papel filtro tarado

D = peso del papel filtro con el residuo

Materia seca residual en el blanco  $g = D-C$  en blancos (G)

Digestión de materia seca in vitro

$$\% = \frac{E - (F - G)}{E} \times 100$$

#### IV RESULTADOS Y DISCUSION.

##### ANALISIS BROMATOLOGICO.

Los resultados obtenidos en el análisis bromatológico se presentan en el cuadro I, donde se puede observar que en general su contenido de proteína no es bueno, pero su contenido de carbohidratos es muy alto por lo que se piensa podrían ser utilizados para alimentación animal.

Solo en nacahua se puede ver que sus componentes como cenizas, grasa y carbohidratos se encuentran en buena proporción, la proteína está a un nivel superior a cereales comunes, sin embargo la cantidad de fibra cruda se encuentra un poco alta.

##### COMPOSICION DE AMINOACIDOS.

Respecto a todos los aminoácidos (cuadro II) se nota que en general los esenciales tienen un valor bajo comparados con el patrón de huevo entero, siendo isoleucina y los azufrados y aromáticos los que mostraron los mas bajos valores. El total de aminoácidos esenciales se encuentra en mayor proporción en cacachila y nacahua es la que tiene un contenido de aminoácidos esenciales mas bajo.

Es importante hacer notar que el contenido de triptofano es en general alto excepto en la nacahua, encontrándose en las hojas de chapote un contenido ligeramente superior al del patron de huevo.

### Azúcares Reductores.

Los resultados obtenidos sobre la determinación de azúcares reductores nos muestran (cuadro II) que los frutos de chapote principalmente, y nacahua contienen muy alto contenido de azúcares y aparentemente buena cantidad de sacarosa; pero en cambio el fruto de cacachila tiene muy poca cantidad de estos.

Teniendo nacahua mayor cantidad de sacarosa aparente que chapote.

### Determinación de Azúcares por Cromatografía.

Como se puede observar en la figura 1 en la muestra de chapote se identificaron dos azúcares que son los que se encuentran en mayor proporción de este fruto; siendo estos sacarosa y glucosa estando en mayor proporción la glucosa.

En la figura 2 se ve que en la muestra de nacahua se pudieron identificar 4 azúcares fructosa, sacarosa, glucosa y maltosa

### FACTORES TOXICOS.

#### INHIBIDORES NUTRICIONALES.

En el cuadro IV se muestran los resultados de los inhibidores de tripsina donde se puede ver que las frutas de las muestras de chapote y nacahua son las que contienen menor inhibidores de tripsina teniendo más las hojas y el de mayor contenido es la cacachila.

Respecto a las hemaglutininas sus resultados se pueden ver en el cuadro No. V.

Donde se muestra que en ninguna de las muestras se encuentra la presencia de hemaglutininas, ya que no presentan aglutinación frente a las tres diferentes sangres, solo en la hoja de nacahua se presentó hemólisis debido tal vez a la presencia de saponinas.

En el cuadro No. VI se presentan los resultados de los polifenoles totales. Viendo que el que presenta menor contenido de polifenoles totales es cacachila y las otras muestras tienen un contenido muy similar.

#### DIGESTIBILIDAD IN VITRO.

Los resultados de esta prueba se muestran en el cuadro VII. Estos % de digestibilidad fueron comparados con unos patrones que fueron:

Avena	% digestibilidad
1	64.90
2	54.75
3	49.48
4	42.68
Acacia	28.89

Comparando los resultados de las muestras con estos patrones se puede ver que la hoja de cacachila, los frutos de chapote y nacagua tienen una buena digestibilidad (valores altos) y las demas muestras son menos digeribles.

CUADRO No. I

ANALISIS BROMATOLOGICO

( gramos/100 gramos de muestra )

<u>MUESTRA</u>	<u>HUMEDAD</u>	<u>CENIZAS</u>	<u>PROTEINA</u>	<u>GRASA</u>	<u>FIBRA CRUDA</u>	<u>CARBOHIDRATOS</u>
Chapote	5.67	2.565	2.87	2.27	12.385	74.24
Hoja de chapote	3.79	12.40	11.56	9.62	19.03	43.6
Cacachila	4.42	3.82	7.24	3.42	12.645	38.455
Hoja de cacachila	3.61	9.45	19.34	8.34	19.16	40.1
Nacahua	6.16	5.20	14.47	7.38	19.825	46.965
Hoja de nacahua	7.02	16.94	15.76	6.86	15.42	38

CUADRO No. 11

CONTENIDO DE AMINOACIDOS DE LAS MUESTRAS ESTUDIADAS

(g. de aminoácidos/16 g. de N)

AMINOACIDOS	NACAHUA	HOJA DE NACAHUA	CACACHILA	HOJA DE CACACHILA	HOJA DE CHAPOTE	HUEVO ENTERO
Isoleucina	1.20	2.46	3.92	2.45	2.98	6.6
Leucina	2.04	4.66	6.11	4.11	5.39	8.8
Lisina	1.07	3.13	3.55	3.08	3.79	6.4
Total Aromáticos	2.08	4.97	5.78	4.71	6.75	10.0
Fenitalanina	1.27	2.98	3.66	3.04	4.13	5.8
Tirosina	0.81	1.99	2.12	1.67	2.62	4.2
Total Azufrados	0.61	1.21	1.34	1.35	1.53	5.5
Cisteina	0.23	0.38	0.28	0.46	0.48	2.4
Metionina	0.38	0.83	1.06	0.89	1.05	3.1
Treonina	1.48	2.47	3.56	2.70	3.38	3.1
Triptofano	0.68	1.53	1.55	1.44	1.69	1.6
Valina	1.36	3.04	4.19	2.97	3.86	7.3
Total Esenciales	10.51	23.47	30.00	22.81	29.57	51.3
Ac. Aspártico	2.44	5.51	13.56	5.44	4.23	
Ac. Glutámico	4.79	8.26	14.76	5.57	9.61	
Glicina-alanina	5.72	11.52	11.20	9.48	12.16	
Prolina	1.17	2.76	6.00	4.85	3.37	
Hidroxiprolina	0.38	1.60	3.77	0.79	0.68	
Serina	1.15	2.26	3.21	2.02	2.61	
Arginina	2.60	3.74	3.45	2.83	3.98	
Amoniaco	1.69	1.02	1.06	0.81	0.90	

NOTA: No se determinaron los aminoácidos en chapote debido a su bajo contenido de proteína.

## CUADRO No. III

AZUCARES REDUCTORES

<u>FRUTOS</u>	<u>R.D.*</u> <u>(%)</u>	<u>R.T.**</u> <u>(%)</u>
Chapote	36.42	59.55
Nacahua	12.66	49.82
Cacachila	3	12.4

\*R.D.- Reductores directos

\*\*R.T.- Reductores totales

## CUADRO No. IV

INHIBIDORES DE TRIPSINA

<u>MUESTRA</u>	<u>UTI*</u>
Chapote	13.16
Hoja de Chapote	17.51
Cacachila	19.67
Hoja de Cacachila	14.84
Nacahua	10.62
Hoja de Nacahua	15.77
Soya**	41.90

\*UTI = Unidades de Tripsina Inhibida

\*\* Se uso como control de alta contenido de UTI.

## CUADRO No. V

## HEMAGLUTININAS

(dilución máxima que causan aglutinación)

MUESTRA	HERITROCITOS DE:		
	CONEJO	HUMANA	VACA
Chapote	0	0	0
Hoja de Chapote	0	0	0
Cacachila	0	0	0
Hoja de Cacachila	0	0	0
Nacahua	0	0	0
Hoja de Nacahua	hemolizó hasta 3	hemolizó hasta 2	hemolizó hasta 3
Frijol Escumite*	6	9	8

---

\* Se uso como control de alto contenido de lectinas.

## CUADRO No. VI

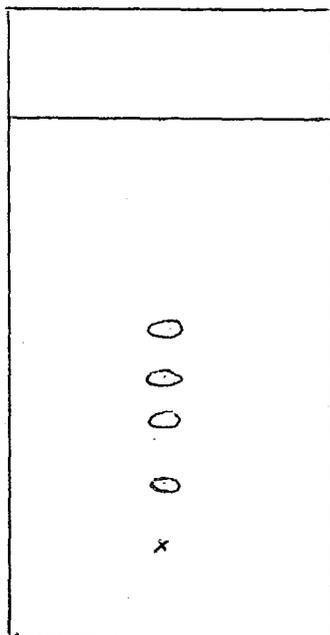
CONTENIDO DE POLIFENOLES

<u>MUESTRAS</u>	<u>g. Polif. T</u> <u>100 g. m.</u>
Chapote	1.01
Hoja de Chapote	2.09
Cacachila	0.35
Hoja de Cacachila	1.132
Nacahua	1.661
Hoja de Nacahua	0.936

CUADRO No. VII  
DIGESTIBILIDAD "IN VITRO"

<u>MUESTRAS</u>	<u>% DE DIGESTIBILIDAD</u>
Chapote	65.98
Hoja de Chapote	48.76
Cacachila	47.09
Hoja de Cacachila	72.43
Nacahua	66.015
Hoja de Nacahua	45.45
Patrones de digestibilidad conocida	
Avena 1	64.9
Avena 2	54.75
Avena 3	49.48
Avena 4	42.68
Acacia	28.89

FIGURA No. 1

FRUTO DE CHAPOTE

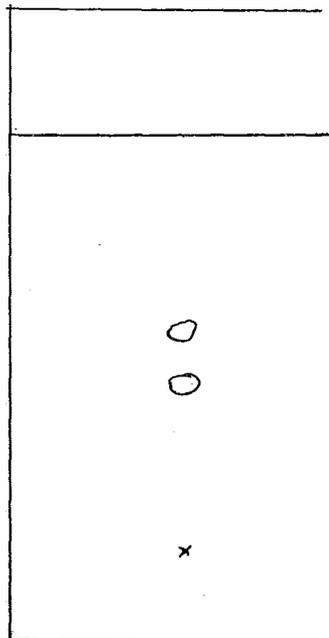
SOLUCION PATRON

sacarosa RF = 0.5

glucosa RF = 0.4

maltosa RF = 0.32

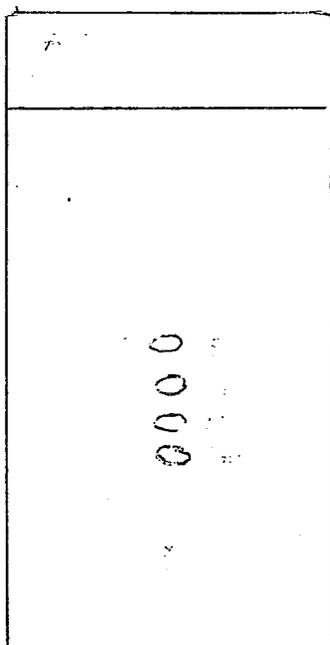
fructosa RF = 0.16



CHAPOTE

RF<sub>1</sub> = 0.53RF<sub>2</sub> = 0.42

FIGURA No. 2

FRUTO DE NACAHUA

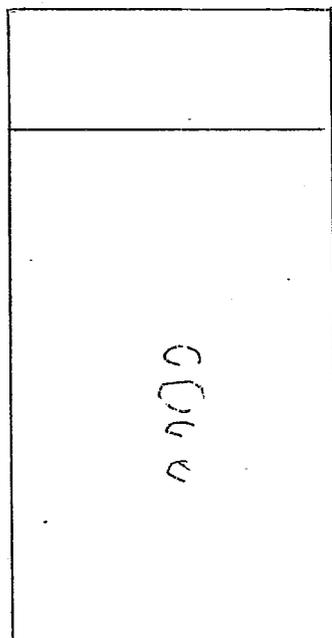
## SOLUCION PATRON

sacarosa RF = 0.46

glucosa RF = 0.36

maltosa RF = 0.28

fructosa RF = 0.2



## NACAHUA

RF = 0.46

RF = 0.36

RF = 0.28

RF = 0.18

## V. CONCLUSIONES

Del estudio efectuado se sacaron las siguientes conclusiones:

- 1.- Las plantas estudiadas tienen un alto contenido de carbohidratos asimilables, lo que nos indica su posible uso como alimento animal, además de que el fruto de nacahua tiene una cantidad de fibra cruda adecuada para la alimentación de los rumiantes, teniendo además sus otros componentes en buena proporción.
- 2.- Aunque el contenido de aminoácidos esenciales es en general bajo en las muestras, su contenido de triptofano es alto, encontrándose la posibilidad de utilizarlas en suplementaciones.
- 3.- Las tres plantas estudiadas no contienen hemaglutininas y tienen bajo contenido de polifenoles totales y de inhibidores de tripsina, lo que hace mas posible su utilización.
- 4.- La cantidad de azúcares reductores es muy alta en chapote y nacahua por lo que pueden ser utilizada como fuente calorigénica.
- 5.- Los azúcares identificados en chapote fueron: sacarosa y glucosa; y en nacahua fueron sacarosa, glucosa, fructosa y maltosa.

6.- Las muestras de fruto de chapote y nacahua resultaron con valores altos de digestibilidad demostrando que es posible utilizarlos en la alimentación de rumiantes.

Por lo que los frutos de chapote y nacahua pueden ser usados fundamentalmente como fuentes calorigénicas y como buenos elementos para la composición o formulación de forrajes.

Aunque también podrían aprovecharse como fuente de azúcares, además de que los azúcares que tienen en mayor proporción son muy utilizables ya sea para alguna industria de transformación, para el consumo de carbohidratos en cualquier producto procesado, como alimento para cubrir una parte de los requerimientos diarios aprovechando su agradable sabor, etc.

Con lo que respecta a cacachila su posible uso sería únicamente para suplementación en la formulación de forrajes.

---

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists.  
Eleventh Ed. Washington D. C., 1973.
- 2.- Barnes R. V.  
"Colaborative research with the Two Stge in vitro technique".  
Proc. National Conference on Forage Evaluation and Utiliza-  
tion.  
Lincoln Nebraska, 1969.
- 3.- Boyd E. M.  
"Toxicity of pure Foods"  
Ed. C. R. C. Press  
Cleveland, Ohio, 1973.
- 4.- Bozidar L. J. Milić  
"Lucene zaponins I contentand composition during growth"  
U. Sci. Fd. Agric. 23: 1151-1156, 1952.
- 5.- Brockman Zin Mirreleess,  
"Trees of North America"  
Golden Press New York, 1968.
- 6.- Cuaron A. José A. Robles A. Shimada,  
"Estudio sobre dos sistemas de restricción alimentaria en  
cerdos de abasto"  
Veterinaria Vol. X No. 1 15-23, En-Mar. 1979.
- 7.- Church D. C. et al  
"Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants"  
Vol. 2 Albany Printing Co. 1974.
- 8.- Danker J. D.  
"Effects of driging on forage qulity of alfalfa and reed  
conary grass feed to lambs"  
J. of Animal Science U. 42 No. 1 181-190, 1976.

- 9.- Dominguez A. Xorge  
"Métodos de Investigación Fitoquímica"  
Ed. Limusa, México 1973.
- 10.- Domínguez X. A., R. Franco, G. Cano, Adriana González, Orlando Pugliesa, M. A. Domínguez y Gustavo A. Sánchez.  
"Estudio Químico de las raíces y troncos de los Diospynos Texana, ebanester y palmeri"  
Journal: Rev. Latinoam. Quim. 10: 92-94, 1979.
- 11.- Duran de Flores Elba  
"Aspectos del estado nutricional de la República Mexicana".  
Tecnología de Alimentos, México 7: 6 1972.
- 12.- F.A.O.  
"World Food Problems"  
1976-79.
- 13.- George, A. J.  
"Legal Status and Toxicity of Saponins"  
Food Cosmet Toxicol. 3: 85-91 , 1965.
- 14.- Giral-Rojaha.  
"Productos Químicos y Farmaceuticos"  
Ed. Atlante Vol. III , 1956.
- 15.- Harrar S. Ellewood.  
"Guide to Southern Trees"  
Dover Publication Inc. 2a. ed.  
New York 1962.
- 16.- Jaffe' W. G. Leney A y D. I. González  
"Isolation and partial characterization of bean phytochemistry 13: 2685-2693, 1974.  
Phytohema gglutinins.
- 17.- Jaffé W. G.  
"Factores tóxicos en leguminosas"  
Ard. Latinoam. Nutr. 18, 205-218, 1968.

- 18.- Johnatan M. Iyan  
"Cordia Section Varronia in Mexico and Central America"  
Reprinted without change of pagins from  
J. of the Arnold Arboreton  
Vol. XXX, 14-18, 1949.
- 19.- Johnson R. A.  
"Influence of carbohidrates solubility on nonprote in  
nitrogen utilization in the ruminant"  
J. of Animal Science Vol. 43 No. 1 184-191, 1976.
- 20.- Kakade M. Loliner I.E.  
"An evaluation of natural us synthetic substrates for  
measuring the antitryptic activity of soyben sample"  
Cereal Chemistry 46: 518-526; 1969.
- 21.- Larsen, R. E. Jones G. M.  
"A Modified method for the in vitro determination of  
dry matter and organic matter digestibility"  
Con J. Animal Science 53: 251, 1973.
- 22.- Liener L. E.  
"Toxic factors in edibles legumes and their elimination"  
Ame. J. Clin. Nutr. 11: 281 - 298, 1962.
- 23.- Macek. K.  
"Pharmaceutical application of thin layer cromatography"  
Elsevier, 1964.
- 24.- Martínez Maximino  
"Plantas útiles en la flora Mexicana"  
Ed. BOTAS, México , 1959.
- 25.- Metcalfe Co. R.  
"Anatomy of the Dicotyledona"  
Oxford at the Clamendon Press, 1950.

- 26.- Merck  
"Separación de azúcares por cromatografía en capa fina, sistema bidimensional"  
Catálogo proporcionado por Asesoría Técnica de Merck.
- 27.- Pigman W.  
"The Carbohydrates"  
Academic Press, N. Y. 1957.
- 28.- Price M. L. and L. G. Butler  
"Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghon grain"  
J. Agric. Food. Chem; 25 (6): 1268-1273, 1977.
- 29.- Standley P. G.  
"Trees and Shrubs of México"  
United State National Herbarium.
- 30.- Stein W. S. Moore  
"Chromatographic determination of aminoacid by the use of automatic recording equipment"  
Methods in Enzimology Vol. VI  
Academic Press N. Y. and London 1963.
- 31.- Sthal E.  
"Thin Layer Chromatography"  
Academic Press N. Y.; 1969.
- 32.- Tejada de Hernández Irma.  
"Alternativas del análisis próximo para medir el valor nutritivo de alimentos para animales"  
Veterinaria Vol. IX No. 4, 17-28 oct-dic., 1978.
- 33.- Tilley J. M. and R. A. Terry  
A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops.  
J. British grass Soc. Vol. 28, 104-111, 1963.
- 34.- Whitaker J. R. y R. E. Feeney  
"Protease Inhibitors"  
Toxicants Occurring Naturally in Foods National Academic of Science. Washington D. C. 1973.