

3 300627
2ej



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA

Incorporada a la
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COMPOSICION QUIMICA DE THEOBROMAS SILVESTRES Y
SU COMPARACION CON EL CACAO
(Theobroma cacao L.)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Titulo de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a

REYNA GUADALUPE ALVAREZ POLA

México, D. F.

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

INDICE

	TEMA	PAGINA
1	Introducción	
	Objetivo	
2	Antecedentes	1
2.1	Historia del cacao	1
2.2	Botánica	2
2.3	Varietades silvestres	4
2.4	Extensión del cultivo del cacao	5
2.5	El beneficiado del cacao	7
2.6	Etapas del beneficiado	9
2.7	Composición química del grano de cacao	12
2.8	Alcaloides del cacao	13
2.8.1	Propiedades físicas de la teobromina, teofilina y cafeína.	15
2.8.2	Propiedades farmacológicas de la teobromina, teofilina y cafeína.	17
2.8.3	Métodos empleados en la medición de la concentración de teobromina, teofilina y cafeína.	18
3.	Factores antinutricionales	20
3.1	Inhibidores de proteasas	20
3.2	Hemaglutininas	27
4.	Cromatografía de líquidos	34
4.1	Cromatografía de líquidos de alta resolución	34
4.2	Ventajas de la HPLC	35
5.	Parte Experimental	37
5.1	Material y Métodos	37

5.1a	Análisis proximal -----	39
5.1b	Determinación de azúcares -----	44
5.1c	Determinación de alcaloides -----	50
5.1d	Determinación de inhibidores de tripsina -----	54
5.1e	Determinación semicuantitativa de hemaglutininas ---	59
5.2	Resultados y discusión de resultados -----	64
6	Conclusiones -----	81
7	Bibliografía -----	93

1. INTRODUCCION.

Las plantas de las especies del género *Theobroma* pertenecen a la familia de las esterculias (sterculiaceae), formada por 22 especies (1) una de las cuales es el cacao (*Theobroma cacao* L.), es la única que presenta importancia comercial (2), las otras variedades están insuficientemente estudiadas (3).

La semilla del cacao tiene una importancia comercial muy grande, motivo por el cual ha sido y sigue siendo objeto de numerosos estudios que han servido para el desarrollo de la tecnología aplicada a su procesamiento y utilización.

Hoy se ha desarrollado ya una poderosa industria de cacao en polvo, de manteca de cacao, de jarabe y pastas, a la vez que la presentación del verdadero chocolate toma el foros y aceites. Al mismo tiempo que esta industria se ha popularizado ha provocado una demanda extraordinaria de cacao que ha dado lugar a dos fenómenos, por un lado, una gran seguridad en el futuro de los agricultores que se dediquen a este cultivo; por otro lado el alto costo del cacao hace necesario el estudio de otras variedades silvestres pertenecientes a esta familia con el propósito de averiguar si por su contenido de teobromina, grasa y otros componentes pudieran ser utilizadas con los mismos fines que la *Theobroma cacao*, o si presentan alguna otra propiedad y puedan ser utilizadas dentro de la dieta común.

Las especies del género *Theobroma* conocidas en México son: el cacao, que se cultiva en los estados de Chiapas y Tabasco, la

"castarrica" (*Theobroma angustifolium* B.C.) y el "pataste" (*Theobroma bicolor* H.B.), que crecen en forma silvestre en el estado de Chiapas.

La amplia flora silvestre de nuestro país y la búsqueda de sustitutos de algunos nutrientes ha hecho que con base a los resultados obtenidos en la presente investigación se plantee la utilización de las dos *Theobromas* silvestres como posibles sustitutos del cacao.

OBJETIVO:

Conocer la composición química de dos especies de *Theobroma* silvestres y su comparación con la *Theobroma cacao*.

2 ANTECEDENTES

2.1 HISTORIA DEL CACAO

En la época de la Conquista de México, a principios del siglo XVI, los granos de cacao no sólo se utilizaban para preparar una bebida, sino también como moneda, a veces para pagar el tributo a los señores aztecas, y también en diversos usos rituales y medicinales (Thompson, 1956) (3).

El grano de cacao era elemento esencial en la vida azteca, aunque no figuraba como alimento fundamental, sino secundario, al lado del maíz (4).

El uso del cacao como bebida se hallaba restringido a las clases superiores de la sociedad de aquellos tiempos, en cambio el empleo de las semillas como moneda era general, de tal manera que puede decirse que constituía la base del sistema comercial (3).

Para utilizar el cacao como alimento existían diversos procedimientos. El cacao era secado al aire y conservado en estas condiciones, se preparaba tostándolo en vasijas de tierra, con lo que se iniciaba el aroma y podían separarse fácilmente a mano la cutícula y la pulpa, bien en frío, para prepararlo en polvo, o bien en caliente, para formar una masa redonda. El cacao no era consumido solo, sino mezclada principalmente con maíz molido, y se hervía añadiéndole otros ingredientes como vainilla o alguna otra especia, haciendo con la mezcla una bebida espesa llamada chocolate (4).

Los españoles descubrieron que con los granos de cacao se podía hacer otra bebida más sabrosa para ellos, mezclándolos con azúcar. En esta forma se hizo popular en España, de donde se extendió a otros países de Europa. Como resultado de ello, los españoles introdujeron el cacao a algunas otras de sus posesiones. De esa manera, el cultivo del cacao se extendió a Trinidad y a otras islas y países del Caribe, que abastecieron la creciente demanda de Europa. En el siglo XVII el gusto por la bebida de cacao pasó de España a Francia e Inglaterra, pero resultaba costosa consumiéndose, por ejemplo, en las casas aristocráticas inglesas (3).

2.2 BOTÁNICA.

El cacao es un árbol que en condiciones naturales, esto es sometido a una extensa sombra, medio ambiente húmedo y húmedo (3), la temperatura de 18 C-40°C y humedad relativa que llega al 100%, una precipitación anual mínima de 125 centímetros (6) alcanza alturas de 4 a 8 metros.

El tronco es bastante tortuoso e irregular, las ramas, las hojas, las flores y frutos se hallan representados en alguna época del año, y participan cada uno de ellos en diversa proporción en la constitución del cacao según se expresa en el cuadro siguiente: (4).

CUADRO No. 1

CONSTITUCION DEL CACAO

ORGANO	% EN PESO
Raíces	27
Tronco	20
Ramas	43
Hojas	7
Flores y Frutos	3

Las flores son pequeñas, de aproximadamente 1 centímetro de diámetro (6), de color rosa a blanco, no nacen aisladas sino en inflorescencias que tienen su iniciación en la axila de la hoja caída (8).

El fruto es una cápsula que según la especie y la variedad adopta diversos tamaños y colores con ligeras alteraciones de forma.

En plena madurez es oval, alargada o incluso esférica, de color dorado a rojo, su longitud, según la variedad es de 10 a 25 centímetros, con un peso de 200 a 500 gramos. En el centro del fruto un cordón fibroso, blanco, sirve de asiento a cada uno de los granos o almendras, que se hallan envueltos en la pulpa blanca o cremosa, muy jugosa y azucarada.

Las semillas son diversas en tamaño y forma, de acuerdo con la variedad, son también diferentes dentro de el fruto, pues las

de los extremos son más pequeñas, aplastadas y deformes, suelen tener 2 centímetros de largo, 0.7 centímetros de espesor y 1 centímetro de ancho. (3).

2.3 VARIEDADES SILVESTRES.

Las especies silvestres son numerosas, si de acento estas especies no tienen interés práctico por el escaso valor comercial de sus productos pueden en un futuro próximo ser un material muy útil.

Estos parientes del cacao no son introducidos en cultivo, pero algunos son aprovechados por los indígenas de los países en que nacen en forma silvestre (2).

Theobroma bicolor, Huab et Bonpl, tiene extensa área de dispersión desde el Ecuador a México, donde recibe diversos nombres como patate de México a Nicaragua, "cacao blanco" en el Ecuador, "bacao" y "cacao silvestre" en Colombia, "cacao tigre" en otras regiones, su desarrollo es considerable pues llega a los 14 metros de altura, lo que hace que en Nicaragua lo empleen para sobras.

Ramas con tendencia a la horizontal, frutos ovoides con cinco surcos profundos y otros cinco alternos menos hundidos, a la vez que toda la superficie está recorrida por otros salientes de trazado reticular.

El fruto madura con un tono amarillo pálido en la cáscara, pulpa muy desarrollada, semillas de sabor agradable cuando están

frescas.

Es característica su floración que se produce en las axilas incluso de las ramas más jóvenes, lo que distingue del cacao ordinario, a la vez que la inflorescencia se presenta en una cima bien aparente y desarrollada. Corteza del tronco gruesa que cicatriza difícilmente. (6).

La pulpa de las semillas del patate se utiliza en la preparación de una bebida refrescante y las mismas semillas mezcladas dan un chocolate muy saapo. (6).

Theobroma angustifolia D.C.

En el Brasil utilizaban su deficiente semilla para obtener el cacao que allí llaman socomusco o eseseraida y que en realidad no tiene que ver con los acreditados cacaos mexicanos y ecuatorianos de igual nombre respectivamente es de flores amarillentas, fructifican en rama joven y hojas estrechas. (5,6).

2.4 EXTENSION DEL CULTIVO DE CACAO.

Se cree que el cacao se originó en las cabeceras de la cuenca del Amazonas y se puede suponer que en tiempos antiguos una población natural de *Theobroma cacao* se dispersó por toda la parte central de la zona Amazónica Guayana, hacia el oeste y al norte, llegando hasta el sur de México, en esas dos poblaciones se desarrollaron en dos formas, separadas geográficamente por el Istmo de Panamá (Cuatrecasas, 1964), esta es una teoría reciente del origen de los dos tipos principales de cacao,

Criollo y Forastero, encontrándose el primero al norte y occidente de los Andes y al segundo en la Cuenca del Amazonas. (4).

Su cultivo se ha ido extendiendo por otros países tropicales, siempre manteniéndose dentro de un medio apropiado en que resulte económico su cultivo, evitando zonas frías por excesivamente altas o fuera de latitud, o de lluvias escasas, mal repartidas para sus exigencias.

Se puede señalar como límite aproximado de su cultivo, la isla de Cuba (paralelo 22 Norte) y la isla de la Reunión (paralelo 21 Sur).

Los países en que actualmente se cultiva el cacao pueden agruparse en grades zonas:

AMERICA

Amazonica.- Brasil, Guayana Francesa, Guayana Holandesa, Guayana Inglesa.

Caribe.- Venezuela, Colombia, Trinidad, Granada, Guadalupe, Martinica, Dominica, St. Vicente, Sta. Lucía, República Dominicana, Haití, Jamaica, Puerto Rico, Cuba.

América Central.- Panamá, Costa Rica, Nicaragua, Honduras, México.

Andes.- Perú, Ecuador.

AFRICA

Region Guineense.- Sierra Leona, Liberia, Costa de Marfil, Togo, Nigeria, Camerun, Guinea Española, Principe, Santo Tomé y Gabón.

Region Congolese.- Congo, Angola, Uganda.

Region Malgache.- Madagascar, Comoras, Reunion.

OCEANIA

Insulindia.- Indonesia, Nueva Guinea, Filipinas, Timor.

Mar del Sur.- Samoa (5).

2.5 EL BENEFICIADO DEL CACAO.

Con el nombre de beneficiado se designa toda la serie de operaciones a que se somete un producto natural para convertirlo en un artículo comercial exportable; en caso del cacao, dichas operaciones consisten, sucesivamente, en la fermentación, secado, limpieza, selección y clasificación, junto con labores complementarias, como el pulimento, abrillantamiento y el antiguo terrado, hoy prácticamente desaparecido (6).

El fin fundamental del beneficiado es convertir el cacao en un producto conservable, de fácil transporte y que posea las cualidades de aroma y sañor que le dan todo su valor comercial para su posterior utilización en las industrias de la

alimentación, de las grasas y farináceas. (7).

Las investigaciones científicas sobre el beneficiado del cacao comenzaron a principio de siglo en trabajos desarrollados en Sri-Lanka, Puerto Rico, Surinam, Tobago y Caserón, los cuales fueron recopilados por Smith en 1913. Estos científicos se percataron que durante la fermentación se degradaba la pulpa y que durante el secado se efectúa un oscurecimiento enzimático de los taninos. Mucho antes se había demostrado que el tostado de cacao seco sin fermentar no produce el sabor y el aroma buscado, sino un fuerte olor característico a semillas quemadas. Además, dicho cacao no posee el color chocolate, sino más bien un color violeta a gris según las variedades. (6).

Después de estos trabajos, se han efectuado actualmente un gran número de investigaciones en diversos países los cuales proporcionan un conocimiento sobre la microflora y cambios que se efectúan en el interior de las almendras durante el beneficio. (7).

2.4 ETAPAS DEL BENEFICIADO.

A) Fermentación.- Tiene por objeto facilitar la eliminación de la pulpa y mejorar los caracteres organolépticos del grano. Se inicia en cuanto la piña es cortada ya que queda al descubierto la pulpa en la cual se depositan microorganismos entre los que destacan las levaduras. Durante la fermentación se desarrolla una población microbiana cuya composición, depende del país, así como de la temperatura, del periodo de fermentación, de la ventilación de la

masa e incluso de la acción del hombre, que pueden actuar desde esas anteriormente fermentadas e cultivos puros, con siembras de microorganismos mas o menos directamente gobernados; dirigiendo la fermentación de forma que sea principalmente alcohólica, los escilagos y pectines son transformados, con lo que la pulpa se separa fácil por el lavado y secado, una parte considerable del agua de la pulpa desaparece en forma de líquidos de escurrido y evaporados, la masa se deseca posteriormente, la eliminación es con rastrillado de la pulpa escurridiza, que es ahora ligeramente parda y pegajosa. Como consecuencia de la elevación de la temperatura y activa difusión de líquidos se produce una serie de transformaciones internas que contribuyen a dar al cacao su máximo valor pues durante ellas se pierde parte del azúcar, de menor astringencia y se desarrolla el aroma. A continuación se analizan los cambios y alteraciones del grano durante la fermentación.

a) Hay una evidente pérdida de peso en materia seca.

b) A causa de la pérdida de materia seca, que no afecta a la materia grasa, y si a la materia nitrogenada y mineral, hay un aumento de grasa.

c) Oxidación del alcohol a ácido acético propiciado por la entrada de aire y por las bacterias acéticas que llegan a masa de fermentación.

Este ácido penetra en los tejidos de los cotiledones hasta llegar a producir la muerte de la almidón. (8).

- d) Mejora el sabor y el aroma. Como consecuencia de las alteraciones tónicas se produce una pérdida aparente del sabor astringente.
- e) Variación del contenido de teobromina. Existen diversas teorías para explicar su presencia la cual para Schweitzer (6) tiene su origen en un glucósido "cacaonina" que una enzima descompone en teobrosina, rojo de cacao y dextrosa. Para Fincke(6), la teobrosina se halla forada en el grano fresco, bien libre o asociada a taninos particulares. El hecho es que en la fermentación los cotiledones pierden con gran rapidez teobromina la cual se solubiliza en el líquido que rellena los pliegues e impregna la superficie de aquellos, este líquido se difunde a través de la cutícula, que así se ve considerablemente enriquecida de teobromina pues las aguas de escurrido son pobres, quedan con el 0.02%; el propio grano comercial solo conserva el 1.1% y en cambio en la cutícula según Knapp y Madnworth (7) pasa del 0.20 al 2.35%, lo que le da valor como materia prima de esta base purínica, e incluso puede utilizarse la determinación de su riqueza como indicador de la duración de la fermentación, factor más preciso que la apreciación organoléptica.
- f) Variación en el contenido de azúcares, proteínas y minerales; las pérdidas de materia seca acarrear principalmente una disminución de materia nitrogenada, una cantidad notable de azúcares fermentables y minerales.

- B) Lavado.- Suprime los restos de pulpa.
- C) Secado.- Con la disminución de la humedad del grano, hasta un grado que se cree un medio poco apropiado para los ataques de criptógamas e insectos, se pretende conservar el cacao en las debidas condiciones hasta su industrialización.
- D) Limpieza.- Tiene por fin separar impurezas, granos partidos, pasillas, etc., es decir, todo lo que no quede comprendido dentro de la definición de cacao comercial.
- E) Selección y Clasificación.- Hecha a mano o a máquina, tiene como seta presentar comercialmente el producto de tal modo que sea lo más homogéneo posible, tanto en cuanto a forma y color como en cuanto a tamaño.
- F) Pulimento y Abrillantado.- Se mejora aun más la presentación si la cutícula aparece tersa, limpia y brillante.
- G) Terrado.- Una forma de homogeneizar la superficie del grano en cuanto a color, a la vez que se crea una defensa contra los achos cubriendo las alveolas con tierra roja.
- H) Postfermentación.- Modernos tratamientos para mejorar el grano comercial, que se reflejan principalmente en una disminución de los taninos. (6,7).

2.7 COMPOSICION QUIMICA DEL GRANO DE CACAO.

La composición química del cacao tiene además de un interés teórico, aplicaciones inmediatas, puesto que con su conocimiento se obtiene la primera aproximación de los productos extraídos del suelo con las cosechas, de las necesidades de fertilizantes de una tierra, de las carencias o límites tóxicos de algunos elementos cuyo mejor detector es el análisis de las hojas, de la utilización de diversos subproductos para combustibles, piensos, abonos, materia prima para industrias de fermentación, etc. (10).

En el siguiente cuadro se muestra la composición química del grano del cacao.

CUADRO No. 2
COMPOSICION QUIMICA DEL GRANO DE CACAO

COMPONENTE	CANTIDAD EN %
Agua	2.13
Grasa	54.68
Ceniza total	3.82
Nitrógeno:	
Nitrógeno total	2.16
Nitrógeno proteínico	1.34
Nitrógeno amoniacal	0.042
Nitrógeno amídico	0.336
Teobrodina	1.42
Cafeína	0.068
Hidratos de Carbono	17.43
Taninos	6.15

Acidos	0.436
Extractos:	
Agua fria	12.29
Alcohol (85%)	9.67

2.8 ALCALOIDES:

Los alcaloides que se encuentran en el café, cacao y el té, se conocen con el nombre genérico de bases purínicas porque todos ellos son derivados de la misma sustancia original, la purina.

Uno de los componentes más característicos del cacao es la teobromina que es el principal alcaloide del *Theobroma cacao*.

La teofilina es isómero de la teobromina pero por semejanzas que sean en cuanto a composición química, presentan diferentes propiedades (11).

El cacao contiene teobromina y cafeína en razón de 8 ó 9 partes a 1, pero no se ha encontrado teofilina.

La teobromina, teofilina y cafeína son tres alcaloides estrechamente relacionados entre sí, que provienen de plantas de amplia distribución geográfica, como el café, té, cacao etc.

El cacao es la semilla desecada y fermentada de la *Theobroma cacao* contiene 2.5% de teobromina y 0.4% de cafeína. (11).

La teobromina, teofilina y cafeina son compuestos derivados de la xantina, por lo que se denominan xantinas.

Las xantinas de importancia farmacológica resultan de la introducción de grupos metilo a nivel de los átomos de nitrógeno heterocíclico, originándose la teobromina y la teofilina que son dietilxantinas y la cafeina que es una trimetilxantina. Estas xantinas pueden considerarse como alcaloides porque al solubilizarse en agua dan soluciones alcalinas.

Las fórmulas de las xantinas son:



XANTINA
3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona.



TEOBROMINA
3,7-dihidro-3,7-dimetil-1H-purina-2,6-diona.



TEOFILINA
3,7-dihidro-1,3-dimetil-1H-purina-2,6-diona.



CAFEINA

3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-1, H-purina-2,6-diona.

3.8.1 PROPIEDADES FISICAS DE TEOBROMINA, TEOFILINA Y CAFEINA.

TEOBROMINA

Nombre químico: 3,7-dihidro-3,7-dimetil-1, H-purina-2,6-diona.

Fórmula química condensada: $C_7H_8N_4O_2$

Peso molecular: 180.17; C=46.66 %, H=4.49 %, N=31.1 % y O=17.74 %.

También se le da el nombre de: 3,7-dimetilxantina.

Es el principal alcaloide del cacao, contiene de 1.5 a 3 %

Cristaliza de sus soluciones acuosas en agujas monoclinicas.

Su punto de fusión es de 387 °C, sublima a 290-295 °C.

Un gramo de teobromina se disuelve en 2000 ml. de agua, 150 ml. de agua hirviendo, 2220 ml. en alcohol al 95 %.

TEOFILINA

Nombre químico: 3,7-dihidro-1,3-dimetil-1, H-purina-2,6-diona.

Fórmula química condensada: $C_7H_8N_4O_2$

Peso molecular: 180.17; C=46.66 %, H=4.48 %, N=31.1 %, y
O=17.76 %.

Se le da también los nombres de: 1,3-dietilxantina; Teocina;
Acurbron, Amofilina.

Es un polvo blanco cristalino de sabor amargo, es isómero de
la teobronina, existe en pequeña cantidad en el té. Su punto de
fusión es de 370 a 374 °C, se sintetiza de dietil urea y
etilcianoacetato.

Un grano se disuelve en 120 ml. de agua, 80 ml. de alcohol,
110 ml. de cloroformo. Soluble en agua hirviendo, hidróxido de
sodio, hidróxido de amonio, ácido clorhídrico o ácido nítrico
diluido.

CAFEINA

Nombre químico: 3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-1, H-purina-2,6-
diona.

Fórmula química condensada: $C_8H_{10}N_4O_2$

Peso molecular: 194.19; C=49.48 %, N=29.35 %, H=5.17 % y
O=16.48 %.

Otros nombres de la cafeína que se conocen son: 1,3,7-trimetilxantina; 1,3,7-trimetil-2,6-dioxipurina; teína, guaranina, etil teobromina.

Sublima de 170 a 180 °C a presión atmosférica formando prismas hexagonales en foras de agujas incoloras. Su punto de fusión es de 238 °C, hierve a 340 °C con vapor incoloro y descomposición parcial.

Un gramo de cafeína se disuelve en 46 ml. de agua, 5.5 ml. de agua a 80 °C, 1.5 ml. de agua hirviendo, 44 ml. de alcohol, 132 ml. de alcohol a 60 °C, 50 ml. de acetona.

El ácido sulfúrico y el ácido nítrico la disuelven sin decolorar. (13).

2.8.2. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DE TEOBROMINA, TEOFILINA Y CAFEÍNA.

La teobromina, teofilina y cafeína tienen en común varias acciones farmacológicas de interés terapéutico, en este orden creciente en potencia, estimulan al sistema nervioso central (SNC).

Avivan la actividad mental, el rendimiento físico y la asociación de ideas, quitan la fatiga y la somnolencia.

Estos efectos pueden producirse con 85 a 250 mg. de cafeína o la cantidad contenida en una o tres tazas de café.

Por la vía oral o parenteral provocan un aumento prolongado

de la secreción gástrica, son irritantes para la mucosa gástrica y pueden provocar náuseas y vómitos, lo que limita su administración por vía oral.

En este sentido, la teofilina se libera fácilmente en el estómago cuando se administra, es la más irritante y es capaz de provocar erosiones hemorrágicas.

Las xantinas son diuréticos aumentando el volumen urinario, así como la excreción de iones de sodio (saluresis), disminuyen la reabsorción tubular del sodio. Aumentan la capacidad funcional del músculo estriado, haciendo más potente la contracción, mientras la fatiga disminuye, aumentan el metabolismo basal.

Las xantinas se absorben por todas las vías que se administran (bucal, rectal, intravascular), siendo los derivados solubles los que se absorben mejor, hay que señalar que las xantinas liberadas a nivel del estómago se comportan como bases sumamente débiles, la cafeína y la teofilina se encuentran parcialmente ionizadas en el jugo gástrico e intestinal absorbiéndose también parcialmente. (14,15,16).

2.8.3. MÉTODOS EMPLEADOS EN LA MEDICIÓN DE LA CONCENTRACION DE TEOBROMINA, TEOFILINA Y CAFEINA.

El método del A.O.A.C. (Official Methods Of Analysis) No.12-017 de Bailey-Andrew se basa en la determinación del nitrógeno total de la muestra. (17).

Otro método del A.G.A.C. es el cromatográfico-espectrofotométrico No. 15.020, que consiste en la separación del compuesto por medio de columnas cromatográficas (una ácida con ácido sulfúrico y Celite 545 y una básica con hidróxido de potasio y Celite 545). (17).

Este método basado en la absorción de luz ultravioleta por los alcaloides es muy complicado, tiene muchas manipulaciones debido a la preparación de las columnas y a la separación y obtención de las muestras en las columnas.

Existen otras técnicas para el análisis de estos alcaloides en diversos productos alimenticios y que utilizan el método de Kjeldahl, espectrofotometría ultravioleta, cromatografía en capa fina, cromatografía de gas, cromatografía en papel, titulaciones potenciométricas, etc. Estos métodos requieren tratamientos lentos y a veces complicados o bien no permiten la separación y cuantificación de los tres alcaloides al mismo tiempo.

La utilización de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) para realizar este trabajo, se escogió de entre las demás técnicas por: su alta resolución, rapidez, sensibilidad y operación automática. Y al mismo tiempo detectar, separar y cuantificar los tres alcaloides que se analizan en el cacao.

3 FACTORES ANTINUTRICIONALES.

En el reino vegetal la naturaleza ha dotado a ciertas plantas con capacidad de sintetizar una amplia variedad de sustancias químicas, las cuales se sabe, ejercen ciertos efectos dañinos cuando son ingeridas por el hombre o los animales (18).

La investigación de estas sustancias tóxicas, resulta de gran importancia, ya que hasta ahora sólo se tiene referencia de factores que en mayor o menor grado influyen sobre los efectos antinutricionales, sin que se conozca el papel que desempeñan estos compuestos tóxicos en la fisiología de la planta, o de saber los mecanismos de acción de estos factores antinutricionales en el organismo por su ingestión. Hacemos referencia especialmente de aquellos compuestos termostables en los cuales la sustancia activa, ha resultado ser una proteína o una mezcla de proteínas como son: fitohemaglutininas e inhibidores de tripsina.

3.1 INHIBIDORES DE PROTEASAS.

Son sustancias que tienen la capacidad de inhibir la actividad proteolítica de ciertas enzimas (19,20).

Estos inhibidores de proteasas han atraído la atención debido al posible papel que estas sustancias podrían jugar en el valor nutritivo de proteínas de plantas.

En gran parte de las plantas consideradas como hortalizas, se

encuentran inhibidores de proteasas, en primer lugar hay que mencionar a las leguminosas como las especies de phaseolus, la soya y habas, pero también los guisantes y patatas contienen tales sustancias.

También los cereales como el trigo, maíz, centeno, avena, arroz contienen en el grano sustancias inhibitorias de tripsina y quimotripsina.

Los inhibidores se presentan en gran cantidad sobre todo en las partes comestibles de estas plantas, principalmente en las semillas, pudiendo ser inhibidores de la tripsina y de la quimotripsina. No se conoce a ciencia cierta la acción fisiológica de estos factores y de su gran variabilidad química, posiblemente puede implicar la existencia de diferencias en su toxicidad.

Debido al gran interés de la harina de soya como fuente de proteína y a causa de su alto contenido de inhibidores de proteasas, se han hecho diversos ensayos en animales de experimentación sobre su influencia en el crecimiento y su valor protéico.

Los inhibidores más estudiados son el de Kunitz y el de Bowman-Birk. Con lo que respecta a la reacción del inhibidor de Kunitz con la tripsina es casi instantánea, su constante de velocidad es de segundo orden y es de 2×10^7 litros/moles/segundos. El peso molecular del inhibidor de Kunitz y el de la tripsina es aproximadamente el mismo (24,000) y la relación molar se considera generalmente 1:1.

El complejo tripsina inhibidor de tripsina tiene poca tendencia a disociarse, excepto cuando el pH es inferior a 2.9, es por eso que se pensó que la inhibición de la tripsina por el inhibidor de Kunitz era no competitiva, sin embargo, se comprobó que la inhibición es competitiva con pequeñas moléculas de sustrato tales como N-benzoyl-L-arginina etil éster, ya que la reacción del inhibidor de Kunitz con tripsina es casi anulada en presencia de este sustrato.

El primer paso de la interacción entre el inhibidor y la tripsina, consiste en la ruptura del enlace arginin-isoleucina que se encuentra entre dos puentes disulfuro del inhibidor (21,22).

Aparentemente, se forma entonces una unión éster entre el resto de serina de la porción activa de la molécula de tripsina y el carbono terminal que acabó de aparecer en el resto de arginina del inhibidor modificado.

El inhibidor de Kunitz es capaz de atacar las tripsinas derivadas de una amplia variedad de fuentes (23).

La quiotripsina de bovino, piasa humano y larvas son también inhibidos a varios grados.

Entre las enzimas que son inhibidas por el inhibidor de Kunitz están: Las proteasas de tielos, pepsina, trombina, colagenasas y las carboxipeptidasas. Para el caso de quiotripsina de bovino el inhibidor de Kunitz forma un complejo disociable muy alto con una constante de disociación

$10^{-5}M$ (24,25).

El inhibidor de Bowman-Birk fue descrito primeramente por Bowman en 1944 y subsecuentemente purificado y caracterizado por Birk y colaboradores (26).

El inhibidor de Bowman-Birk difiere del inhibidor de Kunitz en los siguientes aspectos: su peso molecular es de aproximadamente 20,000 especialmente rico en residuos de cisteína, tiene enlaces disulfuro pero está desprovisto de glicina y triptofano (27). Presenta doble cabeza en donde existen sitios de enlace para la quicotripsina y la tripsina, tiene marcada estabilidad hacia el calor, el ácido y el álcali una propiedad atribuible al efecto estabilizador de los enlaces disulfuro de la proteína (28).

La primera hipótesis que se realizó sobre la baja digestibilidad, como explicación del reducido valor alimenticio de muchas leguminosas crudas, encontró apoyo en el descubrimiento efectuado por Bowman (29), por Hae y Sandstedt (30), de los inhibidores de tripsina en la soya y en otras leguminosas.

Se han obtenido en forma pura inhibidores tripsicos de soya, de frijol, de habas de lima y de otras leguminosas. Parece muy probable que la destrucción de estos factores podría ser la causa del mejoramiento en el valor nutritivo de las semillas crudas de las leguminosas, al someterlas a cocción. En un estudio comparativo se observó que los índices de digestibilidad de las especies con el mayor contenido de inhibidores tripsicos eran los más bajos (30,30,31,32).

La adición de un extracto pancreático a una dieta de soya cruda mejora mucho más por la suplementación con metionina que el de una dieta de soya cocida. Esta observación de Mellinck (31) al formular la hipótesis de que en la digestión de la soya cruda, la liberación de este aminoácido fuera más lento que en la soya cocida debido al inhibidor tripsico.

Se atribuye a los inhibidores tripsicos de soya y de frijoles la hipertrofia del páncreas que regularmente se observa en animales alimentados con dietas que contienen estas leguminosas en forma cruda (34).

Scott y colaboradores (36) son de la opinión que la hipertrofia del páncreas, lleva a una excesiva pérdida de proteínas endógenas secretadas por el páncreas.

Ya que estas proteínas están compuestas de enzimas pancreáticas, ricas en cisteína, el resultado de este efecto en el cuerpo es una pérdida de aminoácidos. Esto puede explicar el hecho de la necesidad de metionina, la cual es inherentemente la proteína limitante en la soya, esto se manifiesta aún más en dietas que contienen soya cruda. Recientemente hubo evidencias para indicar que la tripsina en el intestino suprime la secreción de enzimas pancreáticas por inhibición de retroalimentación y que los inhibidores de tripsina provocan un incremento en la secreción de enzimas impidiendo la supresión producida por tripsina. (35).

El efecto sobre el páncreas desaparece al usar las semillas

en forma cocida lo que se explica por la termolabilidad de los inhibidores. Es difícil estimar cual puede ser el efecto de los inhibidores tripsicos en el organismo humano.

Diversos autores tratan de averiguar el papel de los inhibidores de proteasas en la fisiología de la planta. Si su acción está dirigida principalmente hacia la proteólisis endógena, así por ejemplo se ha observado que en algunas semillas estos inhibidores que son activos contra ciertas proteínas endógenas, desaparecen cuando la semilla entra en la etapa de germinación. La otra hipótesis es que estos inhibidores actúan hacia la proteólisis exógena producida por microorganismos invasores. Dentro de los factores que afectan el contenido de los inhibidores de tripsina tenemos:

- 1.- El tratamiento con calor en donde el límite por el cual el inhibidor de tripsina es destruido por el calentamiento está en función de la temperatura, duración del calentamiento, tamaño de partícula y condiciones variables de humedad.
 - a) En autoclave a una atmósfera de vapor de 15 lb/in durante 15-20 min. se inactiva casi por completo el inhibidor de tripsina del frijol de soya.
 - b) Si los frijoles están en remojo durante la noche y posteriormente se ponen a cocer se inactiva casi completamente el inhibidor de tripsina.
- 2.- Durante la germinación hay un mejoramiento en el valor nutritivo del frijol de soya y un gran número de leguminosas,

aunque la actividad del inhibidor de tripsina no parece cambiar durante este proceso (25).

3.- Los preparados de soya fermentada conocida como *tempech* o *natto* según reportes, se tiene que el nitrógeno de *tempech* es fácilmente disponible y se atribuye la destrucción del inhibidor de tripsina durante la preparación de esta comida.

4.- Aislados de proteínas. En la actualidad los aislados de soya y texturizados de carne son de gran importancia aunque se ha reportado que la calidad nutritiva de estos alimentos texturizados es equivalente a la caseína o a la carne de res, la eficiencia de la proteína del aislado es muy baja, pero puede mejorarse por tratamiento térmico.

Estos resultados indican la posible presencia de inhibidores de crecimiento en el aislado de proteína, los cuales se inactivan durante el proceso en el que el aislado se convierte en fibra (26).

3.2 HEMAGLUTININAS.

Las lectinas son glicoproteínas cuya característica principal es que se unen específicamente a los azúcares de las glicoproteínas de las membranas celulares, poseen múltiples lados de unión y cuando las lectinas entran en contacto con ciertos sacáridos se ponen en mutua conexión ligando a un gran número de células provocando su aglutinación o reagrupación. Cada lectina se une de forma más o menos específica a una determinada molécula o a un determinado grupo de moléculas de azúcar (37).

Las lectinas se encuentran principalmente en las leguminosas y es en donde más se han estudiado, las lectinas son proteínas que se destruyen por la acción del calor (38,39).

Se ha detectado la presencia de lectinas no solo en plantas, (incluyendo a las bacterias) sino también en algunos invertebrados por ejemplo caracoles, peces, anfibios y tejidos mamíferos (40). Vivian Teichberg del Weizmann Institute (Israel), descubrió la presencia de una lectina en el anguila eléctrica, no obstante las lectinas están más ampliamente distribuidas entre las plantas; como líquenes y micelios de hongos, de las 3,000 especies examinadas en los últimos años, en casi 1,000 de ellas se han encontrado lectinas (37,41,42).

Las leguminosas son particularmente ricas en lectinas, hasta el momento se ha logrado la purificación e identificación de las estructuras químicas de unas 50 lectinas, en su mayoría de origen vegetal (43,44).

Los primeros estudios al respecto fueron presentados por Stillmark en 1890 (43), sobre una proteína obtenida de la semilla de cártamo (*Ricinus communis*), capaz de aglutinar las células de la sangre.

Posteriormente Sumner (44) aisló de una variedad de frijol (*Canavalia ensiformis*) una globulina que llamó Concanavalina A y la cual tiene la propiedad de aglutinar glóbulos rojos.

También en diferentes variedades de frijoles (*Phaseolus vulgaris*) se han encontrado fracciones proteínicas, correspondientes a lectinas, que tienen actividad hemaglutinante. En realidad la toxicidad varía considerablemente en los diferentes tipos de frijoles (45).

Originalmente se conocieron como fitohemaglutininas y se relacionaron a las leguminosas euforbiáceas.

Actualmente estas sustancias se denominan lectinas del griego *legere* que significa elegir. También se les conoce como hemaglutininas porque poseen afinidad muy marcada por los carbohidratos de la membrana de eritrocitos. (43,44).

En las leguminosas, las lectinas se localizan indistintamente en toda la planta, aunque la máxima concentración se encuentra en las semillas, estas a su vez se hallan concentradas en el cuerpo de la proteína del endospermo, donde aparecen durante la maduración y desaparecen rápidamente en la germinación (45).

Las fitohemaglutininas se distinguen por sus respectivas

especificidades, frente a los glicúlicos rojos de diferente origen. La mayoría de las membranas celulares contienen glicoproteínas situadas en la superficie de la membrana, por lo tanto se considera que las lectinas se unen a ciertos receptores siempre y cuando tengan la misma afinidad. Siendo de gran interés para la determinación de grupos sanguíneos y también para distinción serológica de varias especies de animales (47). Por ejemplo, extractos de arvejas, garbanzos o lentejas son activos en aglutinar sangre de conejo, pero no actúan en sangre humana de ningún grupo sanguíneo, los extractos de habas de lima (*Phaseolus lunatus*), aglutinan solo sangre humana del grupo A (48,49).

Son capaces de inducir la mitosis en los cultivos de leucocitos humanos (50,51). Es interesante mencionar que por su afinidad con carbohidratos, han sido un arma muy eficaz para estudiar la dinámica de la membrana celular (52). Una de las características de las lectinas es la de actuar mediante un mecanismo similar al complejo enzima-sustrato o antígeno anticuerpo sobre los carbohidratos mediante múltiples sitios de unión.

Por otro lado se les asoció una actividad tóxica ya que se encontró que las lectinas de ciertos frijoles (*Phaseolus vulgaris*), son responsables del efecto tóxico cuando son administrados oralmente en forma cruda a los animales (53,54,55).

Jaffé en 1950 encontró que la causa del efecto tóxico oral se relaciona con su acción sobre la absorción intestinal. Sucede que la aglutinación se debe a la combinación con grupos receptores de

la superficie de las células de las mucosas gástricas de una manera muy semejante como se combina con los glóbulos rojos, interfiriendo en la absorción de los nutrientes (56).

Hay varias hipótesis acerca de las funciones que desempeñan estas sustancias en la planta y son las siguientes:

- 1.- Actuar como anticuerpos para contrarrestar la acción de bacterias del suelo.
- 2.- Proteger a la planta contra el ataque de hongos.
- 3.- Transporte y almacenamiento de azúcares.

Algunas bacterias tales como el *Rizobium*, forman nódulos en las raíces de las leguminosas y fijan nitrógeno el cual es vital para la planta. Una satisfactoria relación simbiótica entre las bacterias y las plantas es caracterizada por un alto grado de selectividad del simbionte huésped. Esto involucra a las lectinas en la base molecular para esta selectividad. La presencia de lectinas en los nódulos de la raíz de algunas leguminosas fueron observadas por Eisler y Porthorn (57,58).

Cada lectina con una especificidad distinta debe considerarse como una sustancia diferente a todas las demás fitohemaglutinas con propiedades fisiológicas específicas, que pueden o no incluir acciones que resulten nocivas para los animales que las ingieren, pueden o no ser toxinas (25,59).

Aquellas que tienen efectos tóxicos, producen trastornos parecidos, entre los que resulta, la intensa inflamación de la

mucosa intestinal, con la posterior destrucción del epitelio y edema.

En el hígado se observa degeneración de grasa y necrosis, así mismo se ha observado que las lectinas de los frijoles aparecen fuertemente ligadas a los homogenados de la mucosa intestinal de la rata lo que hace suponer que tiene para este tejido una afinidad semejante a la que manifiesta por los eritrocitos, por lo que el posible efecto tóxico, esté relacionado a una mala absorción intestinal.

Ya que las fitohemaglutinas son compuestos termolábiles, muchos de los efectos antinutricionales de las leguminosas pueden ser eliminados por la aplicación de calor. Presentándose así un incremento general en el valor nutritivo de las proteínas en las leguminosas (59,37).

Las lectinas se encuentran en plantas y principalmente en las leguminosas. la presencia de las lectinas en semillas ha sido estudiada ampliamente, pero también hay evidencias basadas en la hemaglutinación y radioinmunoensayo, las cuales afirman la existencia de lectinas en tallos, hojas y raíces.

Las lectinas en raíces han sido reportadas en frijol y chícharo. (60).

Las lectinas también se pueden obtener de invertebrados marillos, como es la lectina extraída de la almeja *Meqapitaria equalida* (61). Así como se encontró en este molusco la presencia de una lectina, se sigue buscando en nuevas fuentes. (62,63).

La forma comúnmente usada para detectar la presencia de una lectina, es llevada a cabo realizando la prueba de aglutinación celular, poniendo en contacto una suspensión de eritrocitos lavados en solución que contenga a la lectina. Así la reacción negativa, después de dejar de reaccionar, será la sedimentación de los eritrocitos y la reacción positiva será la formación de agregados. Los eritrocitos tienen en su superficie al receptor el cual se ligará con la lectina. (64).

En algunas investigaciones se reporta que la lectina facilita la agregación celular, formando puentes entre las células incrementando la cantidad de eventos de adhesión celular. Al modificarse la distribución del receptor, se facilita el contacto célula-célula. (65).

Otros científicos afirman, que después de haber hecho experimentos con lectinas marcadas radiactivamente, el incremento en la aglutinación es consecuencia de cambios en la distribución topográfica de los receptores y también debido a la fluidez de la membrana que permite la agrupación de los receptores en uno de los polos.

Hay lectinas que por ser muy pequeñas, no alcanzan a enlazar los receptores y es necesario la agregación de ciertos polímeros, para incrementar la aglutinación. (66).

La presencia de cierta cantidad de sal es necesaria para cancelar las repulsiones electrostáticas entre las células y/o entre lectinas y células. (66).

Otros factores importantes que influyen en la asociación carbohidrato-lectina son el pH y la temperatura. La mayoría de las aglutininas reaccionan entre un pH de 4.5 a 11.

La temperatura está relacionada con la fluidez de la membrana y ésta necesita fluidez para que los receptores se muevan. (60).

Las aglutininas pueden presentar reacción en un rango de 4°C a 40°C. A 0°C la solilidad de los receptores es reducida. (63).

Es importante mencionar la influencia de la pureza de la lectina, como es el caso de la Hura crepitans, que al purificarla, su actividad hemaglutinante se incrementa 300 veces más. (51).

Si los eritrocitos son tratados con enzimas tales como tripsina, pepsina o papaina, la capacidad de aglutinación aumenta notablemente, ya que se cree que hay un "desensacaramiento" de un número grande de receptores, los cuales se vuelven accesibles. (60).

Otros autores hablan de lectinas no termestables y termestables. Esta división se ha observado en el germen de trigo, al exponerlo a 110°C por 30 minutos en autoclave, no perdieron su actividad con el calor. (67).

Por lo expuesto anteriormente es muy importante que estos componentes sean identificados en vegetales que han sido poco estudiados.

4 CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS.

La cromatografía es un término aplicado a una amplia variedad de técnicas de separación de una sustancia, donde se emplea una fase móvil que puede ser un gas o un líquido y una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido.

Los componentes de una mezcla se transportan a través de la fase estacionaria por medio de la fase móvil que fluye.

Las separaciones se basan en las diferentes velocidades de migración de los componentes de la muestra.

Los componentes que se desean separar deben ser solubles en la fase móvil, capaces de interactuar con la fase estacionaria, ya sea disolviéndose, absorbiéndose o reaccionando químicamente con ella, como consecuencia durante la separación los componentes se distribuyen en esta fase.

4.1 CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (HPLC).

El término de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), se define como la técnica de cromatografía de líquidos que emplea en su operación alta presión en la fase móvil, también se le puede llamar cromatografía de líquidos de alta velocidad o cromatografía de líquidos moderna.

La HPLC se basa en los mismos principios de la cromatografía de gas.

La HPLC tiene muchas ventajas sobre la cromatografía de gas, algunas de ellas son las siguientes: no está limitada por la estabilidad térmica y volatilidad de las muestras, es ideal para la separación de especies iónicas, productos lábiles, compuestos estables y/o de peso molecular alto, tiene una gran variedad de espeques que pueden ser utilizados como fase estacionaria en la columna, la separación de los componentes de una muestra se puede llevar a cabo a temperaturas bajas, sus fases cromatográficas entran en interacción con las moléculas de las muestras y las muestras se pueden recuperar.

La HPLC, emplea columnas reusables, que pueden ser usadas en diferentes tipos de muestra, la inyección se lleva a cabo fácil y rápidamente usando una jeringa de inyección o una válvula de muestra, el flujo de solventes se produce por bombas de alta presión la detección y cuantificación se lleva a cabo en detectores continuos de varios tipos y los resultados son registrados automáticamente de la separación de los componentes de la muestra.

4.2. VENTAJAS DE LA CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

La cromatografía de líquidos de alta resolución puede ser considerada complementaria a la cromatografía de gas. En muchos casos las dos técnicas se usan para efectuar la misma separación. En la cromatografía de gas es necesaria la formación de derivados, en cambio en la cromatografía de líquidos de alta resolución esto puede ser o no factible. Para los materiales que

son tercolábiles o no volátiles la cromatografía de líquidos de alta resolución es una selección lógica. La formación de derivados se está haciendo más común en la cromatografía de líquidos, para incrementar la sensibilidad del detector visible-ultravioleta.

La cromatografía de líquidos de alta resolución ofrece muchas ventajas sobre la cromatografía de líquidos tradicional como:

- a) Rapidez
- b) Resolución
- c) Sensibilidad; detector único
- d) Columnas reusables
- e) Ideal para grandes moléculas y especies no iónicas
- f) Fácil recuperación de la muestra . (68).

3 PARTE EXPERIMENTAL.

3.1 MATERIAL Y METODOS.

Las muestras analizadas se recolectaron en los alrededores de Tapachula, Chiapas, y fueron las siguientes:

cacao (*Theobroma cacao* L.).

cacao costarricense (*Theobroma cacao* L.).

patate (*Theobroma bicolor*, hueb el Bompil).

costarricense (*Theobroma angustifolium* D.C.).

Se clasificaron en el Departamento de Botánica del Instituto de Biología de la UNAM.

De cada muestra se utilizaron diferentes partes de la planta como son: semilla, cascavilla, cáscara, hojas, flores y pulpa esta última solo en patate, ya que la pulpa de las otras 3 *Theobromas* se adhiere a la cáscara haciendo difícil su separación.

Una parte de las muestras fueron secadas directamente a 50°C y una vez secas fueron molidas en un molino Thomas Willey hasta pasar la malla de 1 mm. La otra porción de las muestras excepto flores y hojas se envolvieron con papel para imitar la fermentación que de manera normal se realiza para incrementar la teobromina.

5.1 a. ANALISIS PROXIMAL.

Para llevar a cabo estas determinaciones se siguieron las técnicas descritas en el A.D.A.C. (17), con ligeras modificaciones. Las cuales se describirán más adelante. El análisis proximal se realizó en cáscara y semilla de cacao, cacao costarricense, patate, costarricense y en pulpa de patate.

Determinación de Humedad.

Fundamento.

Es necesario conocer la humedad de la muestra para darle un valor real a la cantidad de los otros componentes, este dato también está relacionado con la edad y estado de conservación de la muestra.

Material.

- Estufa
- Balanza analítica
- Pesafiltros o charolas de aluminio
- Desecador.

Procedimiento.

Se pone a peso constante el recipiente en donde se va a efectuar la determinación. Se adicionan de 2 a 5 g. de muestra tratando de que presente la mayor superficie de evaporación, se

introduce a la estufa que se encuentra entre 100-110 °C. El tiempo de permanencia dentro de la estufa depende del material de que se trate, de 4 a 8 hrs. muestras de baja humedad y de 24 a 48 hrs. muestras de alta humedad. Se considera a peso constante una muestra cuando al pesarla en la balanza analítica solo presenta variación en la cuarta cifra decimal.

Cálculos.

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

Donde:

P_i = peso charola con muestra antes de secada (en g)

P_f = peso charola con muestra después de secada (en g)

m = peso de la muestra (en g).

Determinación de Cenizas.

Las cenizas incluyen todos los compuestos inorgánicos fijos de la muestra, tanto los originales como los de contaminación.

Material.

- Hufia
- Balanza analítica
- Mechero
- Criedales

- Desecador.

Procedimiento.

Se ponen a peso constante los crisoles a una temperatura de 700 °C, al crisol se le adicionan de 2 a 3 g de muestra, se carboniza a la flama de un mechero y bajo una campana, ya que desprende una gran cantidad de humo, cuando desaparece, se puede introducir el crisol a la mufla, la cual debe tener una temperatura de 500-550 °C.

El tiempo que permanece en la mufla es muy variable y depende del material que se trabaja. Si después de la incineración se obtienen cenizas con puntos negros, es conveniente adicionarle una gota de agua destilada, con el fin de obtener cenizas grisáceas o blancas homogéneas, lo que nos indica el punto final de esta determinación.

Cálculos.

$$\% \text{ CENIZAS} = \frac{P_f - P_i}{a} \times 100$$

Donde:

Pf = peso crisol con muestra después de incinerada (en g).

Pi = peso crisol a peso constante (en g).

a = peso de la muestra (en g).

Determinación de Grasa.

Fundamento.

La determinación del extracto etéreo incluye una gran variedad de compuestos orgánicos, aquellos que se encuentran en gran cantidad incluyen la grasa verdadera, ácidos grasos y sus ésteres, vitaminas liposolubles y provitaminas tales como son los carotenoides. El éter etílico es el solvente más eficaz y se utiliza en el establecimiento de las normas existentes.

Material.

- Aparato de extracción Boldfisch, LABCONCO
- Cartuchos de celulosa de 22 x 80 mm
- Estufa
- Vasos con borde liso
- Balanza analítica
- Éter etílico (anhidro).

Procedimiento.

Dentro del cartucho de celulosa se colocan de 2 a 5 g de muestra se tapa con un pedazo de algodón y se coloca en el compartimiento de extracción, la cantidad de solvente depende del tamaño del dispositivo de extracción y en términos generales se recomienda la cantidad que produzca dos descargas y una más que solo cubra el cartucho de celulosa pero sin llegar a sifonear.

Extracción en el aparato Goldfisch.

Es un dispositivo que consta de 5 unidades, en este caso el cartucho de celulosa se coloca en el portadetal y este a su vez en el seguro metálico del aparato, se colocan aproximadamente 50 ml de éter etílico sobre el vaso y este se asegura con el anillo metálico al aparato de extracción.

Se sube la parrilla hasta hacer contacto con el vaso, para el calentamiento y se hace circular agua por los refrigerantes. El tiempo de calentamiento es aproximadamente de 8 hrs.

Cálculos.

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

Donde:

P_f = peso del vaso después de la extracción (en g).

P_i = peso del vaso antes de la extracción (en g)

m = peso de la muestra (en g)

Determinación de fibra.

Fundamento.

La denominación popular de fibra, se refiere a las partes de la pared celular de los tejidos vegetales, las cuales no pueden ser digeridas por las enzimas del intestino, como son los carbohidratos estructurales, tales como celulosa y hemicelulosa.

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

Material.

- Aparato de digestión Fibertec marca TECATOR mod. 1010

- Heat Extractor

- Crisoles de vidrio TECATOR

- Estufa de vacío LAB-LINE mod. 3620

- Mufia THERMOLYNE mod. 1500

- Solución de H_2SO_4 al 1.25 % (a/v)

- Solución de NaOH al 1.25 % (a/v)

- Antiespumante (emulsión SIGMA-B)

- Alcohol etílico.

Procedimiento.

Se ponen a incinerar los crisoles, se pesan de 1 a 1.5 g de muestra en los crisoles, se introducen al aparato, se agregan 150 ml de H_2SO_4 caliente, se mantiene a ebullición exactamente 30 minutos, transcurrido este tiempo se hacen 3 lavados con agua caliente se agrega antiespumante y se adicionan 150 ml de NaOH al 1.25% se mantiene a ebullición exactamente 30 minutos, después de

este líquido, se agregan 25 ml de H_2SO_4 para neutralizar la sosa, se hacen 3 lavados con agua caliente y se pasa al aparato de extracción en frío, se da un lavado con alcohol.

Se meten los crisoles a la estufa hasta peso constante y se pesan, después se carbonizan y se introducen a la eufia para su incineración, se pesa nuevamente el crisol.

Cálculos.

$$\% \text{ FIBRA} = \frac{P_a - P_c}{m} \times 100$$

Donde:

P_a = peso crisol con residuo después de secado (en g)

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

m = peso de muestra (en g).

Determinación de Proteína.

(Kjeltes Auto System).

Fundamento.

El método de Kjeldahl está basado en la combustión húmeda de la muestra, calentándola con ácido sulfúrico concentrado en presencia de catalizadores metálicos para efectuar la reducción del nitrógeno orgánico de la muestra a amoníaco, el cual es retenido en solución como sulfato de amonio. La solución de la

digestión se hace alcalina y se destila o se arrastra con vapor para liberar el amoniaco que es atrapado y titulado.

Material.

- Kjeltac Auto Analyzer 1030.
- Acido Sulfúrico concentrado grado analítico libre de Nitrógeno.
- Tabletas catalizadoras de Mercurio, Selenio y Cobre.
- Peroxido de hidrógeno al 30%.
- Solución al 40% de hidróxido de Sodio.
- Acido Bórico al 1% con verde de bromocresol y rojo de metilo en solución.

Preparación.

Se disuelve 100 g de Acido Bórico en 10 litros de agua destionizada.

Se adicionan 100 ml de verde de bromocresol en solución (100 mg en 100 ml de etanol).

Se adiciona 70 ml de rojo de metilo en solución (100 mg en 100 ml de etanol). Se adicionan 5 ml de NaOH al 4%.

Solución 0.05N de HCl.

Procedimiento.

Se pesan exactamente de 0.1 a 0.3 g de la muestra sólida en papel libre de nitrógeno, las cuales se pasan en los tubos digestores y se agregan

- 1.- Tabletas catalizadoras de mezcla reactiva.
- 2.- 10 ml de ácido sulfúrico agitando cuidadosamente.

3.- 1 ml de solución de peróxido de hidrógeno.

Después de preparar los tubos se llevan al digestor y se conectan al tubo colector de gases.

4.- Colocar los tubos dentro del digestor y se eleva la temperatura a 470 °C.

5.- Cuando la digestión se lleva a cabo totalmente se dejan enfriar.

6.- Se agregan 25 ml de agua desionizada y se agita cuidadosamente porque la reacción es muy violenta.

Los tubos se pasan al Autoanalizador Auto Kjeldahl 1030 y se toma la lectura de la titulación.

Cálculos:

$$\% \text{ de Nitrógeno} = \frac{(\text{ml gastados en la titulación}) \times N \times 0.014}{\text{ps}}$$

Donde:

N= normalidad del ácido

ps = peso muestra

5.1.b. DETERMINACION DE AZUCARES.

Los azúcares que tienen en su estructura grupos aldehídicos o cetónicos libres reaccionan como agentes reductores débiles y se denominan azúcares reductores.

Estos incluyen todos los monosacáridos y a los disacáridos maltosa, lactosa y celobiosa. Los disacáridos tales como la sacarosa, rafinosa y oligosacáridos superiores están constituidos por azúcares simples combinados a través de sus grupos aldehídicos o cetónicos y por consiguiente son carbohidratos no reductores, que requieren una hidrólisis para liberar la porción reductora. Estas propiedades se emplean para determinar los azúcares por medición de la reducción de Cu II a Cu I utilizando la solución de Fehling.

La solución de Fehling está constituida por tartrato cúprico alcalino que es convertido en óxido cuproso insoluble cuando se hierve con la solución de un azúcar reductor.

MATERIAL Y REACTIVOS.

- Parrilla Eléctrica
- Bureta de 500 ml
- Matraces Erlenmeyer de 250 ml
- Matraces volumétricos de 250 ml
- Balanza analítica
- Oxalato de sodio
- Solución saturada de acetato de plomo

- Solución A. Se disuelven 34.639 g de sulfato de cobre pentahidratado en 500 ml de agua destilada y se filtra.
- Solución B. Se disuelven 175 g de tartrato de sodio y potasio y 50 g de hidruóxido de sodio en agua y se diluye a 500 ml, se deja reposar 2 días y se filtra.
- Solución acuosa de azul de metileno al 0.2%
- Solución de azúcar invertido al 1 %. Se pesan 9.5 g de sacarosa y se disuelven en 50.0 ml de agua, se añaden 5 ml de HCl concentrado y se diluyen con agua a 100 ml. Se mantiene 1 hora a 65 °C. Después de esta inversión diluir a 1 lit.
- Solución de hidróxido de sodio 1 N.

Procedimiento.

- Titulación de las soluciones A-B

Se neutralizan 10 ml de la solución de azúcar invertido con la solución de NaOH en un matraz volumétrico de 100 ml, se diluye con agua hasta el aforo. Se transfiere la solución a una bureta y se deja caer la solución mililitro a mililitro a un matraz Erlenmeyer que contenga 5 ml de la solución A, 5 ml de la solución B y 50 ml de agua que debe estar hirviendo. El matraz se coloca sobre una parrilla y se va agregando la solución de azúcar invertido hasta poco antes de la reducción total del cobre. Se agrega 1 ml de la solución de azul de metileno y se completa la titulación hasta la decoloración del indicador. La titulación se efectúa aproximadamente en 3 minutos.

El título se expresa indicando que 10 ml de solución A-B corresponde a 1g de azúcar invertido; este valor se utilizará en el cálculo de las soluciones problema.

- Determinación de los Reductores directos.

A) Defecación de la muestra.

Se pesan de 5 a 10 g de muestra y se coloca en un matraz volumétrico de 250 ml, se añaden 100 ml de agua, se agita lo suficiente para que todo el material soluble en agua quede disuelto. Se añaden de 2 a 10 ml de la solución saturada de acetato de plomo neutro se agita perfectamente y se deja sedimentar. Se añade poco a poco oxalato de sodio o potasio hasta la total precipitación del acetato de plomo. Se llena hasta el aforo, se agita y se filtra.

B) Determinación.

Se transfiere el filtrado retenido de la defecación a una bureta y se titula como en la titulación de las soluciones A-B.

C) Cálculos.

$$\% \text{ azúcares reductores directos} = \frac{250 \times T}{V} \times 100$$

pe

T= título de la solución A-B en g de azúcar invertido.

V= volumen en ml de la solución problema gastados en la titulación de 10 ml de la solución A-B.

pe= peso de la muestra en gramos.

- Determinación de reductores totales.

A) Defecación de la muestra.

Se realiza de la misma manera que en la determinación de reductores directos.

El filtrado se recibe en un matraz volumétrico de 250 ml, se lava 3 veces el matraz Erlenmeyer y el papel filtro con 20 ml de agua destilada, se recibe el agua de lavado en el matraz volumétrico.

B) Determinación

Se añaden 10 ml de HCl concentrado al matraz volumétrico que contiene el filtrado obtenido en la defecación. Se calienta a 45 °C durante 15 minutos, se enfría y se neutraliza con la solución de hidróxido de sodio 1.0 N, se afora con agua. Se transfiere a una bureta y se titula como en la titulación de las soluciones A-B.

Cálculos.

$$\% \text{ de azúcares reductores} = \frac{\frac{250 \times T}{V} \times 100}{p_m}$$

T= título de la solución A-B en g de azúcar invertido.

V= volumen en ml de la solución problema gastados en la titulación de la solución A-B.

p_m= peso de la muestra en gramos.

5.1.c. DETERMINACION DE TEOBROMINA, TEOPILINA Y CAFEINA.

Para la medición de la concentración de los alcaloides se sigue la metodología descrita en el A.D.A.C. (17), haciendo las modificaciones adecuadas para el material que se trabaja.

Fundamento:

Este método se basa en la separación de los alcaloides por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y su posterior detección con luz ultravioleta.

Material y Reactivos.

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución. Varian modelo 5000, con un registrador de datos Vista 401 y un detector de luz ultravioleta de rango de 200 a 900 nm.

La columna que se utilizó fue de fase reversa Micro-pak MCH-10 de 30 cm de largo 4 mm de diámetro, empacada con octadecilsilanos.

Las condiciones de trabajo del instrumento fueron:

flujo 0.6 ml/min.

vel. papel 0.5 cm/min.

fase móvil: Agua, Acido acético, Metanol (60:1:30).

longitud de onda: 280 nm.

Método de extracción de los alcaloides.

Se pesan de 0.05 a 1.0 g dependiendo del tipo de muestra, se colocan en un matraz Erlenmeyer de 125 ml poniendo perlas de ebullición, se agregan aproximadamente 50 ml de agua desmineralizada hirviendo y se sigue con la ebullición durante 20 minutos; se pasa el contenido a un matraz aforado de 100 ml, lavando el matraz original con agua desmineralizada, se enfría el matraz hasta temperatura ambiente se agrega 1 ml de estándar interno con una concentración de 100 mcg/ml y se afora, se homogeniza perfectamente, se filtra en papel y de esta solución se toma un volumen de 20 ml y se le hace una extracción con 10 ml de éter de petróleo para eliminar la grasa, la fase acuosa se filtra por membrana Millicore y de este filtrado se inyecta al HPLC una alícuota de 10 microlitros.

El área obtenida para cada muestra problema se interpola en la curva estándar correspondiente para cada alcaloide, obteniendo la concentración de cada muestra. Las muestras se inyectan por cuadruplicado.

Para la obtención de la concentración de cada alcaloide en 100 g de muestra se usó la siguiente fórmula.

$$\text{mcg/100g} = \frac{C \times A}{\text{peso muestra}} \times 100$$

Donde: C = concentración A = aforo

Estándar Interno

La sustancia que se utilizó como estándar interno, para la realización de este trabajo fue la cuarina, la cual fue probada como estándar interno para estos alcaloides en trabajos anteriores. Se disolvieron 100 mg de cuarina en un matraz aforado de 100 ml, resultando una concentración de 1000 mcg/ml, de esta solución se toma 1 ml y se afora a 10 ml obteniéndose una concentración final de 100 mcg/ml.

Curva Estándar.

Se pesaron exactamente 10 mg de cada alcaloide, en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, poniendo perlas de ebullición se agregan aproximadamente 50 ml de agua desmineralizada hirviendo, se sigue la ebullición por 20 min, se pasa cuantitativamente a un matraz aforado de 100 ml, se deja enfriar a temperatura ambiente y se afora con agua desmineralizada. La concentración de cada alcaloide es de 100 mcg/ml.

De esta solución se pasan 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0 ml a matraces aforados de 10 ml, se agrega 1 ml de cuarina y se afora con agua desmineralizada, se filtra por membrana Millipore y se inyecta una alícuota de 10 microlitros al HPLC.

La concentración de cada punto de la curva se dan en la siguiente tabla, así como las áreas obtenidas para cada punto.

Resultados de la curva estándar

Concentración (mcg)	Area (ca)		
	Teobromina	Teofilina	Cafeina
1	32402	29660	34337
2	61806	62408	60555
3	85642	89048	87331
4	121338	123697	118347
5	141776	152287	149457
6	182610	182073	170112
7	200525	200664	200567
8	240102	241026	236635
9	269836	267190	274783
10	321104	285383	313592
	r=0.9966	r=0.9984	r=0.9974

r= índice de correlación

AREA (cm²)

x 1000

CURVA STD. DE TEOBROMINA

400

300

200

100

60

40

20

1

2

3

4

5

6

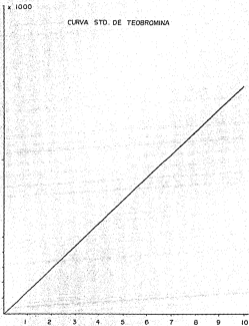
7

8

9

10

CONCENTRACION (µg/l)



AREA (cm²)

400

x 1000

CURVA STD. DE TEOFILINA

300

200

100

80

60

40

20

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

CONCENTRACION (µg/l)



AREA (cm²)

x 1000

CURVA STD. DE CAFEINA

400

300

200

100

80

60

40

20

1

2

3

4

5

6

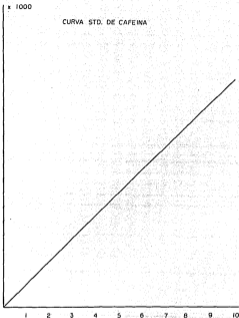
7

8

9

10

CONCENTRACION (µg)

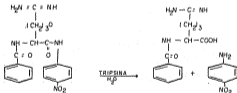


S.I.d. DETERMINACION DE INHIBIDORES DE TRIPSINA.

Fundamento.

La técnica es la utilizada por Kikade y Col. la cual se basa en la inhibición producida por un extracto acuoso (sol. NaOH 0.01 N) de la muestra sobre una solución patrón de tripsina. (A7,68,69).

El extracto se pone en contacto con una solución patrón de tripsina (40 ecg/10cl) y después de un cierto tiempo se determina la actividad proteolítica remanente, por medio de un sustrato sintético BAPNA (Benzil arginina p-nitroanilida), el cual producirá una coloración que se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm (la coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de la muestra).



Una unidad de tripsina (UT) es arbitrariamente definida como un incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm. por 10 ml de mezcla de reacción descritas por Kikade y Col. La actividad de inhibidores de tripsina se expresa en términos de unidades de tripsina inhibida (U.T.I.).

Material y Reactivos.

- Potenciometro CORNING, mod. 10
- Parrilla con agitacion magnetica THERMOLINE, mod SP-13025
- Baño maria GRANT, mod BE 10
- Espectrofotometro COLEMAN mod. Junior II-A
- Mezclador de tubos LAB LINE, mod Super-mixer
- NaOH 0.01 N
- Solucion amortiguadora de TRIS, pH 8.2 y 0.05 M.

6.05 g de TRIS (hidroximetil-aminometano) 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 1 lit.

- Sol. BAPNA

100 mg. benzil-DL-arginina-p-nitroanilida-HCL, se disuelven en 2.5 ml de dimetil-sulfonido y se diluye a 250 ml con amortiguador TRIS previamente calentado a 37 °C. (Esta solucion debe ser preparada el mismo dia y cuando estén en uso deben mantenerse a 37 °C).

- Acido acético al 30%

- solucion patrón de tripsina.

Se pesa 4 mg de tripsina bovina (SIGMA # T-8253) y se disuelven en 200 ml de HCL 0.001N. Esta solucion contiene 20 mcg de tripsina/ml y debe ser almacenada en refrigeracion donde puede durar de 2 a 3 semanas sin pérdida apreciable de actividad.

- HCL 0.001N

Procedimiento.

Preparación del extracto.

Se pesa 1 g. de muestra finasente sólida (desengrasada si es necesario) en un vaso de precipitado y se le adicionan 45 ml de NaOH 0.01N se ajusta el pH de esta suspensión a 9.6 ± 0.2 y se afora a 50 ml. Se transfiere el contenido a un vaso que contenga un imán para poder agitar la suspensión mecánicamente por espacio de 2 1/2 hr. a 300 rpm. Transcurrido este tiempo se quita el imán y se deja 1/2 hr. en reposo, y 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 estandar relativa.

Determinación de la actividad.

Se pipetea 0.0, 0.4, 1.0, 1.4, 1.8 ml del extracto directo o diluido a tubos de ensaye por duplicado y se ajusta el volumen a 2.0 ml con agua destilada, se introducen al baño maria a 37°C . Se adicionan 2.0 ml de solución patrón de tripsina (a 37°C) y se mantiene en contacto la muestra con la tripsina por espacio de 5 minutos. A continuación se adicionan 5 ml de solución BAPNA a 37°C a cada tubo y se mantiene dicha mezcla de reacción por 10 minutos exactos (con cronómetro). La reacción enzimática se detiene por la adición de 1 ml de ácido acético al 30 %; el cual debe homogenizarse inmediatamente.

Cuando por la adición del ácido acético al tubo de reacción se enturbia o forma un precipitado, será necesario filtrar el contenido a través de papel filtro (Whatman # 1); para ello es

conveniente dejar el tubo en reposo por 15 minutos (aproximados) para después filtrar primeramente el sobrenadante y por último la porción del precipitado gelatinoso. Es necesario cerciorarse que el filtrado está transparente.

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.

El tubo con 0.00 ml de extracto es la referencia (40 ccg tripsina / 10 ml), sobre el cual se basan los cálculos.

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

CLAVE:	ml EIT,	ml H ₂ O	ml de STD de tripsina 5 min.	ml BAPNA a 37 °C 10 min.	ácido acético al 30%
BCD 1	1.8	0.2	2.0+1.0 ml acético	5.0	-----
1	1.8	0.2	2.0	"	1.0
BCD 2	1.4	0.6	2.0+1.0 ml acético	"	-----
2	1.4	0.6	2.0	"	1.0
BCD 3	1.0	1.0	2.0+ 0 ml acético	"	-----
3	1.0	1.0	2.0	"	1.0
BCD 4	0.6	1.4	2.0+1.0 ml acético	"	-----
4	0.6	1.4	2.0	"	1.0
BCD REF	0.0	2.0	2.0+1.0 ml acetico	"	-----
R	0.0	2.0	2.0	"	1.0

Calculos.

La lectura de absorbancia, directamente se puede pasar a unidades de tripsina.

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

Se tienen una serie de alícuotas del extracto y a la vez una serie de valores de U.T., los cuales al restar este valor al tubo de referencia; se obtendrán los valores de unidades de tripsina inhibida (UTI) y se puede calcular el valor de UTI / ml de cada una de las alícuotas.

Las unidades de inhibición pueden reportarse por mg de muestra:

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

Donde

B = valor extrapolado o promedio en UTI/ml

F = factor de dilución. Cuando se trabaja con extracto directo F = 1.

5.1.e. DETERMINACION SEMICUANTITATIVA DE HEMAGLUTININAS.

Fundamento:

La detección de hemaglutininas o lectinas en extractos de plantas se lleva a cabo con una técnica de diluciones seriadas en la cual se determina el punto final por una estimación visual de la aglutinación de los glóbulos rojos en estudio.

El método de microtitulación es rápido y requiere una mínima cantidad de muestra. Se necesita trabajar con glóbulos rojos lavados y activados con una solución de proteasa disponible (como pepsina, tripsina o papaina), ya que la sensibilidad de la aglutinación se mejora considerablemente con este tratamiento. (70,71,72).

Materia) y Reactivos:

Agitador magnético con tacómetro marca THERMOLINE.

Centrífuga para tubos marca CYNAC.

Tubos de centrifuga de 15 ml con graduación.

Jeringa de 5 ó 10 ml con agua # 22.

Incubadora marca BLUE-M.

Espectrofotómetro COLEMAN Junior II-A.

Adaptador para celdas de 10 X 75 mm (acondicionado a una abertura de 1 cm).

Microtiter Kit (Cook Eng-Alexander Virginia USA).

Filtro de vidrio poroso (pore grueso).

Sangre defibrinada y lavada.

Solución anticoagulante (a).

Solución salina al 1%.

Solución salina al 0.07%.

Solución de pepsina al 0.01% en solución salina (b).

Tripsina de páncreas porcino (SIGMAT-B12B).

Pepsina de S. griseus (SIGMA P-5005).

- a) Cuando la sangre se va a trabajar inmediatamente se puede utilizar ya sea solución de heparina o citrato.
- b) En términos generales se usa tripsina al 0.1% en solución salina, para el proceso de sensibilización; sin embargo, cuando se trabaja con sangre de cualquier roedor (ratón, hamster, etc), es conveniente trabajar con pepsina al 0.2% en solución salina.

Metodología:

a) Preparación del extracto:

Una vez que se tiene la muestra finamente molida y desengrasada (si es necesario), se suspende 1 g. en 10 ml de solución salina al 1%, se efectúa una extracción con agitación mecánica 2 horas a 300 r.p.m. a la temperatura ambiente.

Después de este tiempo se centrifuga el extracto a 1,400 rpm

140 U) durante 15 minutos para eliminar el residuo insoluble; el sobrenadante se filtra a través del filtro de vidrio y de ser necesario se puede bajar el residuo con más solución salina al 1%, para llevar el extracto filtrado al volumen inicial.

b) Preparación de la sangre:

Una vez que se sangra al animal, la sangre se coloca en un matraz pequeño que contenga solución anticoagulante, agitar suavemente para la completa homogenización de la sangre con la solución anticoagulante. (No interrumpir hasta el momento de diluirla).

La sangre con anticoagulante se trasvasa a tubos de centrifuga para lavarla (3 veces) con solución salina al 0.9%. La relación sangre:solución salina es aproximadamente 1:5.

Se centrifuga a 1,500 rpm (50 U) durante 10 minutos. Después del líquido lavado, se mide en el tubo de centrifuga, la cantidad de paquete de eritrocitos y se diluye al 4 % para lo cual se agregan por cada 1.0 ml de glóbulos rojos 24 ml de solución salina al 0.9%.

c) Sensibilización de los glóbulos rojos.

A cada 10 ml de suspensión de glóbulos rojos al 4% agregarles 1 ml de solución de pronasa al 0.2% (en solución salina) y colocarlos en incubadora por espacio de 1 hora a 37 °C.

Después del tiempo estipulado, centrifugar para eliminar la enzima sobrenadante, dando además 3 lavados con solución salina al 0.9%.

Después del último lavado se resuspende el paquete de glóbulos rojos al 5%, por lo cual cada 1.0 ml de paquete de eritrocitos se le adiciona 19 ml de solución salina 0.9%.

NOTA: Cuando se observa que la sangre tiene algunos coágulos (aunque sean pequeños), es necesario filtrar esta suspensión para lo cual se puede hacer a través de un pequeño trozo de gasa, colocando dentro de un embudo de cuello corto.

d) Ajuste de la suspensión de glóbulos rojos.

Se toma 1 ml de la suspensión de glóbulos rojos ya sensibilizados y se agregan 4 ml de solución salina al 0.85%. Se lee el espectrofotómetro a 620 nm, usando un adaptador de celdas que permita el paso de solo 1 cm de luz y como blanco solución salina al 0.85%.

La lectura que se debe obtener será de 25% \pm 2 de transmitancia, en caso contrario se realizará la dilución necesaria para que nuestra suspensión de glóbulos quede dentro de dicho rango.

e) Microtitulación:

En las placas tipo "V" del microtiter, se coloca, en cada pozo de una hilera, 50 microlitros de solución salina al 0.85% con el pipeteador de gota evitando tocar las paredes del pozo.

A continuación se llena el microdilutor de 50 microlitros por

contacto con la superficie del extracto problema y se procede a realizar las diluciones sucesivas en la hilera escogida, introduciendo el microdilutor en el pozo y rotándolo sin excesiva presión.

NOTA: Es recomendable checar que el volumen que esté tocando nuestro microdilutor, sea el requerido. Esto se realiza con solución salina al 0.85% en una placa de prueba.

Por último con un pipetero de gota colocar en cada pozo 20 microlitros de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizada y ajustada. Luego se rota la placa en forma circular y se lleva a la incubadora a 37 °C por espacio de 1 hora.

f) Lectura:

Una vez transcurrido el tiempo estipulado se coloca la placa de plástico sobre el dispositivo de lectura. Se observa a través del espejo el fondo de los pozos de cada hilera de prueba.

Se reporta la máxima dilución que presente aglutinación.

NOTA: Cuando se trabaja con sangre de alta sensibilidad (como Haester o Eaton) o un extracto de alto título, es conveniente realizar un mayor número de diluciones, por lo cual se pueden tomar hasta tres hileras, realizando la serie de dilución en forma de culebra.

5.2. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS.

A continuacion se presentan los resultados obtenidos en el analisis proximal de las theobromas.

CUADRO No. 1

ANALISIS QUIMICO PROXIMAL DEL CACAO
(Theobroma cacao L.)
(g/100g)

	SEMILLA		CASCARA	
	B.H.	B.S.	B.H.	B.S.
HUMEDAD	52.50	-----	94.69	-----
PROTEINA	7.88	16.60	0.42	7.96
GRASA CRUDA	23.92	50.37	0.06	1.14
FIBRA CRUDA	3.13	6.60	1.52	28.02
CENIZAS	2.07	4.37	0.53	10.14
E.L.N.*	10.50	22.06	2.75	51.93

E.L.N.: Extracto libre de nitrogeno.

*CALCULADO POR DIFERENCIA

B.H.: BASE HUMEDA

B.S.: BASE SECA

CUADRO No. 2

ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL DE CACAO COSTARRICA
(Theobroma cacao L. variedad costarrica)
(g/100g)

	SEMILLA		CASCARA	
	B.H.	B.S.	B.H.	B.S.
HUMEDAD	61.01	-----	90.08	-----
PROTEINA	6.34	16.28	1.00	10.93
GRASA CRUDA	19.56	50.17	0.10	1.06
FIBRA CRUDA	3.17	8.15	3.44	34.76
CENIZAS	1.41	3.62	0.98	10.69
E.L.N.*	8.51	21.78	4.39	42.55

E.L.N.: Extracto libre de nitrógeno.

* CÁLCULO POR DIFERENCIA.

B.H.: BASE HUMEDA

B.S.: BASE SECA

CUADRO No. 3

ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL DE PATATE
(Theobroma bicolor, Hubb et Bonpl)
(g/100g)

	SEMILLA		FULPA		CASCARA	
	B.H.	B.S.	B.H.	B.S.	B.H.	B.S.
HUMEDAD	52.31	-----	92.14	-----	50.69	-----
PROTEÍNA	11.36	23.83	1.25	21.80	3.25	6.60
GRASA CRUDA	17.00	35.66	0.29	3.68	0.37	0.75
FIBRA CRUDA	8.80	18.44	0.83	10.59	31.98	64.87
CENIZAS	1.74	3.66	0.70	8.96	1.11	2.26
E.L.N. *	8.79	18.39	4.79	55.27	12.59	25.02

E.L.N.: Extracto libre de nitrógeno.
* CALCULADO POR DIFERENCIA.
B.H.: BASE HUMEDA
B.S.: BASE SECA

CUADRO No. 4

ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL DE CASTARRICA
(Theobroma angustifolium D.C.)
(g/100g)

	SEHILLA		CASCARA	
	B.H.	B.S.	B.H.	B.S.
HUEDAD	44.17	-----	55.68	-----
PROTEÍNA	5.55	9.95	3.51	7.92
GRASA CRUDA	17.48	31.32	0.17	0.40
FIBRA CRUDA	11.50	20.25	28.56	64.45
CENIZAS	1.02	3.27	1.09	4.28
E.L.N. *	19.68	35.21	10.19	23.75

E.L.N.: Extracto libre de nitrógeno.

* CALCULADO POR DIFERENCIA

B.H.: BASE HUMEDA

B.S.: BASE SECA

Como podemos observar en los cuadros 1, 2, 3 y 4 se encontró que el componente que estuvo en mayor proporción en las 4 semillas es la grasa.

De acuerdo a los resultados expresados en los cuadros 1 y 2 el mayor porcentaje de grasa se encuentra en la semilla de cacao y cacao costarrica.

Según el cuadro No.3 se observa que la semilla de patate tiene un contenido de proteína elevado comparado con las otras tres semillas, siendo las semillas de costarrica la que contiene menos cantidad de proteínas. Las semillas de las 2 variedades de cacao contienen una cantidad de proteínas muy similar. El contenido de fibra encontrado en las 2 theobromas silvestres es muy elevado con respecto al que se encontró en la semilla de Theobroma cacao L.

Del análisis realizado a la cáscara podemos decir que las 4 theobromas tienen composiciones muy similares con respecto a grasa y proteínas, el contenido de fibra es mas elevado en las 2 theobromas silvestres y el extracto libre de nitrógeno se encuentra en mayor cantidad en el cacao y el cacao costarrica, esto puede explicarse ya que la pulpa de estas se adhiere a la cáscara haciendo difícil su separación.

En la única theobroma que se pudo analizar la pulpa fue en la theobroma bicolor (patate) ya que esta se encuentra en una cantidad mayor a la de las otras theobromas y se encontró que tiene una gran cantidad de proteínas, su contenido de grasa es bajo y su contenido de azúcares es alto, razón por la cual es

may utilizada por los indígenas que habitan los lugares en los que el patate crece de manera silvestre.

A continuación se presentan los resultados del análisis de alcaloides de las 4 theobromas.

En todas las theobromas analizadas se encontraron los 3 alcaloides, teobromina, teofilina y cafeína.

La distribución de la teobromina en el cacao es diferente comparada con la distribución de este alcaloide en las theobromas silvestres.

CUADRO No. 5

ANÁLISIS DE TEBRODINA, TEOFILINA Y CAFEINA
EN CACAO (*Theobroma cacao* L.)
(mg/100g)

Muestra	Tebrodina	Teofilina	Cafeina
semilla fermentada	1,474.77	366.97	919.72
semilla no fermentada	1,387.75	473.92	769.61
cascarilla fermentada	143.37	29.73	12.98
cascarilla no fermentada	93.60	12.90	72.32
cáscara fermentada	19.56	15.30	25.17
cáscara no fermentada	17.54	18.79	22.66
hojas	41.04	36.62	11.03
floras	12.88	16.39	16.58

CUADRO No. 6

ANÁLISIS DE TEOBROMINA, TEOFILINA Y CAFEINA EN
CACAO COSTARRICA (*Theobroma cacao* L. variedad costarrica)
(mg/100g)

Muestra	Teobromina	Teofilina	Cafeina
semilla fermentada	2,021.0	357.92	180.0
semilla no fermentada	2,034.67	325.42	182.0
cascarilla fermentada	106.12	15.61	23.20
cascarilla no fermentada	107.04	19.72	36.32
cáscara fermentada	22.32	7.64	5.58
cáscara no fermentada	17.48	5.81	5.11
hojas	98.24	20.03	22.17
flores	77.50	19.21	24.30

Según los cuadros 5 y 6 podemos decir que la Theobroma cacao, L. (en sus 2 variedades) se encuentra en mayor cantidad en la semilla, le sigue en orden decreciente la cascarrilla y en cáscara, hojas y flores solo se encuentran pequeñas cantidades.

Así mismo, en el cuadro No. 5 se observa que en la semilla de cacao la cafeína es el alcaloide que existe en mayor proporción después de la teobromina y por último se encuentra la teofilina, sin embargo, como se ve en el cuadro No. 6 la mayor cantidad de teobromina está en la semilla del cacao variedad costarricense, en esta semilla la teofilina se encuentra en mayor proporción que la cafeína.

Como se mencionó anteriormente la distribución de los alcaloides es diferente en la theobromas silvestres ya que según los resultados expresados en el cuadro No. 7, en el patate, la mayor cantidad de teobromina se encontró en cascarrilla, flores y hojas. En semilla se encontró muy baja cantidad de este alcaloide comparada con la cantidad que se encuentra en la semilla del cacao, aproximadamente 10 veces menos.

En la pulpa del patate se encuentra una cantidad de teobromina similar a la que hay en la semilla de éste.

La teofilina se encuentra en flores y hojas, en las otras partes analizadas no hay gran cantidad de este alcaloide.

La cafeína se encuentra en muy baja proporción en todas las partes analizadas.

CUADRO No. 7

ANÁLISIS DE TEOBROMINA, TEOFILINA Y CAFEINA
EN PATASTE (*Theobroma bicolor*, Hubb et Bonpl.)
(mg/100g)

Muestra	Teobromina	Teofilina	Cafeina
semilla fermentada	113.94	19.41	10.98
semilla no fermentada	171.02	21.58	14.66
cascarilla fermentada	878.70	21.01	19.19
cascarilla no fermentada	915.76	24.15	23.50
cáscara fermentada	12.86	5.31	7.20
cáscara no fermentada	11.70	27.25	13.84
pulpa fermentada	143.52	45.27	16.42
pulpa no fermentada	146.84	52.19	15.87
floras	725.37	301.25	96.66
hojas	619.14	186.74	48.00

En el cuadro No. 8 se presentan los resultados del análisis realizado a la *Theobroma angustifolium* D.C. (castañero), y se encontró que no cuenta con cantidades significativas de ninguna de los 3 alcaloides, excepto en flores, que es en donde se localizó la mayor cantidad de teobromina.

CUADRO No.8

ANÁLISIS DE TEOBROMINA, TEOFILINA Y CAFEÍNA
EN CASTAÑERO (*Theobroma angustifolium* D.C.)
(mg/100g)

Muestra	Teobromina	Teofilina	Cafeína
semilla fermentada	33.03	8.45	3.50
semilla no fermentada	36.77	9.61	5.68
cascajilla fermentada	29.40	13.61	3.84
cascajilla no fermentada	33.21	11.27	5.22
cáscara fermentada	3.18	5.25	6.24
cáscara no fermentada	2.78	4.70	6.00
hojas	5.42	15.00	5.42
flores	510.32	83.45	7.11

En el cuadro No. 7 se dan a conocer los resultados obtenidos en la determinación de azúcares que se realizó en la pulpa de patate y en la cáscara de las 4 theobromas, el análisis se hizo en la cáscara por que la pulpa no se separó.

La mayor cantidad de azúcares reductores totales se encontró en la pulpa del patate, le siguen la cáscara del cacao y en menor proporción la cáscara del cacao costarricense y la costarricense; En la cáscara de patate no se encontraron azúcares esto debido a que la pulpa se separó totalmente de la cáscara.

La cantidad de azúcares reductores directos es muy similar en el cacao y en la pulpa de patate.

CUADRO No. 9

DETERMINACION DE AZUCARES
(g/100g de muestra)*

MUESTRA	REDUCTORES DIRECTOS	REDUCTORES TOTALES	NO REDUCTORES
cáscara de cacao	13.02	19.30	5.48
cáscara de cacao variedad costarricense	3.79	3.79	-----
cáscara de patate	-----	-----	-----
pulpa de patate	13.56	46.21	32.65
cáscara de costarricense	3.15	3.15	-----

* en base seca.
----- no se detectó

También se realizó el análisis de algunos factores tóxicos como son inhibidores de tripsina (Cuadro No. 10) y hemaglutininas (cuadro No. 11), se consideraron estos análisis debido a que son plantas silvestres y se desconoce la presencia de estas sustancias en este tipo de plantas.

Los análisis fueron realizados en las semillas y hojas de las 4 theobromas.

En el cuadro No. 10 se presentan los resultados de la determinación de inhibidores de tripsina y se encontró que la mayor cantidad de UTI/mg está presente en la semilla de cacao (en sus 2 variedades).

En las semillas de las 2 theobromas silvestres se encontraron solo pequeñas cantidades de inhibidores. En la hoja de cacao se encuentra una pequeña cantidad comparada con la de las hojas de las 2 theobromas silvestres.

Es muy importante mencionar que estos valores de inhibidores de tripsina comparados con las de la mayoría de leguminosas (género en el que se han encontrado en mayor cantidad) son muy bajas, por ejemplo la semilla de soya contiene normalmente de 97 a 110 UTI/mg de muestra.

Y sabiendo que el principal uso que se le da al cacao requiere de un tratamiento térmico (tostado) esta cantidad de UTI/mg no presenta mayor problema.

CUADRO No. 10

DETERMINACION DE INHIBIDORES DE TRIPSINA
(UTI/ug de muestra)*

MUESTRA	UTI/ug DE MUESTRA
Semilla de cacao	41.43
Semilla de cacao Variedad Costarrica	39.06
Semilla de patate	7.99
Semilla de castarrica	8.57
Hoja de cacao	7.83
Hoja de cacao Variedad Costarrica	13.73
Hoja de patate	23.63
Hoja de castarrica	15.27

*En base seca.

Con respecto a la determinación semicuantitativa de hemaglutininas. En el cuadro No. 11 se puede observar que esta prueba resultó negativa para todas las semillas y las hojas.

Caso en el caso de los inhibidores de tripsina, las hemaglutininas son termolábiles.

CUADRO No.11

DETERMINACION SEMICUANTITATIVA
DE HEMAGLUTININAS

(prueba con sangre de hamster)

MUESTRA	TITULO (máxima dilución en la que presenta aglutinación)
Semilla de cacao	(-)
Semilla de cacao Variedad Costarrica	(-)
Semilla de patate	(-)
Semilla de castarrica	(-)
Hoja de cacao	(-)
Hoja de cacao Variedad costarrica	(-)
Hoja de patate	(-)
Hoja de castarrica	(-)

(-) No presentó aglutinación.

6 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que las 2 semillas silvestres presentan un contenido de grasa elevado, que podría ser utilizada en la industria de alimentos y de productos farmacéuticos ya sea como sustituto o aditivo de la grasa del cacao.

Debido al alto contenido de proteínas y grasa las semillas silvestres podría resultar adecuadas para alimentación animal.

La distribución del principal alcaloide de el cacao, la teobromina, es muy diferente en las 2 theobromas silvestres, pudiéndose utilizar la teobromina de la cascarrilla, flores y hojas de *Theobroma bicolor* (patate).

La pulpa del patate es rica en azúcares por lo que también podría ser utilizada para alimentación animal.

En ninguna de las 3 theobromas se encontró una cantidad considerable de inhibidores de tripsina.

No se encontraron hemaglutininas en las theobromas.

La theobroma angustifolius (castarrica) es la que menos se parece, (de acuerdo a su composición), al cacao excepto en que si tiene una elevada cantidad de grasa.

y la castorica pueden sustituir al cacao en la fabricación del chocolate, principalmente por su diferencia en el contenido de teobromina

Es muy importante un estudio a fondo sobre el posible cultivo y el rendimiento de estas theobromas silvestres, para los usos propuestos, así como continuar la búsqueda de otras variedades silvestres que posiblemente no han sido localizadas tanto en el estado de Chiapas como Tabasco que son los lugares donde se encuentra con más frecuencia este género.

BIBLIOGRAFIA.

- 1) Cuatrecasas, J. 1964. Cocoa and its allies. A taxonomic revision of the genus theobroma. U.S. National Museum 35, part 6. Washington, D.C.
- 2) A. de la Vega, A. Sobelo. 1985. Estudio comparativo de la composición química del cacao y dos theobromas silvestres. Rev. Soc. Quím. Vol. 29, No. 5. México.
- 3) F. Miranda 1976. La Vegetación de Chiapas. Ed. del Gob. del Edo. México.
- 4) Wood Char 1970. Cacao. Ceca México.
- 5) Peña Eduardo. 1963. Producción y beneficio del cacao Ed. Banco de Méx. S.A. México.
- 6) Nosti Nava J. 1972. Cacao, Café y Té. Salvat. Ed Barcelona.
- 7) Rohan, T.H. 1964. El beneficiado del cacao bruto. F.A.O. Italia.
- 8) Fincke. 1967. The tannins in cacao beans. 6th. Anual Report on cacao Research. Trinidad.
- 9) Schweitzer. 1971. Anages in the Nitrogenous components of forastero cacao during fermentation. Protein and protein decomposition products 10th. Anual Report on cacao Research. Trinidad.
- 10) Ochoa JJ. 1981. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales. Ed Limusa México.

- 11) Kirk y Othmer. 1979. Encyclopedia of Chemical Technology; Ed. John Wiley and Sons, USA.
- 12) Youngken M.H. 1951. Tratado de farmacognosia. Ed. Atlante. México.
- 13) Wincholz R. and Budavaris (Eds). The Merck Index. Merck & Co. Inc. 10th Ed. Rahway N.Y. USA.
- 14) Goodman Gilman. A.S. Goodman L.W. Rail. 1966. Bases farmacológicas de la terapéutica 7a. Ed. Panamericana. México.
- 15) Litter M. 1977. Farmacología Experimental y Clínica. 5a Ed. Botas México.
- 16) Bowman W.C. y Rand M.J. 1984. Farmacología bases bioquímicas y patológicas, aplicaciones. 2a. Ed. Panamericana. México.
- 17) Official Methods of Analysis of the Association Official Analytical Chemist. 14 Ed. Arlington Virginia 1984.
- 18) Instituto Nacional de la Nutrición. 1980. La alimentación en el medio rural de México; segunda encuesta nacional de alimentación. Div. Publicaciones. México.
- 19) Fabrè R. y Thuhant R. 1976. Tratado de toxicología; Paraninfo, S.A. Madrid.
- 20) Bressani, R. and Elias, L.G. 1974. Legume Foods. In New protein foods; Altschul, A.H. (ed) Academic Press. N.Y.

- 21) Herb Hord, K and J.L. Orbison 1966. Lathyrism in fetal rat. evidence for impairment of elastin formation. Arch. Path. 81.
- 22) Honover, F.M. Schie C.V. & Liener, J.E. 1962. The inhibition of the growth of rats by purified hexagglutinin isolated from *Phaseolus vulgaris*. J. Nutr. 77.
- 23) Alquist, M.J. and Morris J.B. 1953. Effect of crystalline trypsin on the raw soybean growth inhibitor; Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 83.
- 24) Aguilar C.A. y Zolla C. 1981. Plantas tóxicas de México. I.R.S.E. Subdirección Gral. Médica. México.
- 25) Liener J.E. 1964. Soyin a toxic protein from the soybean. I. Inhibition of rat growth. J. Nutr. 45.
- 26) Aykroyd W.R. y Doughty, J. 1977. Las leguminosas en la alimentación humana; FAO. Estudios sobre nutrición 19. Roma.
- 27) Barrow, H.V. Simpson, C.F. and Hillier. 1974. Lathyrism (a review); Quart. Rev. Biol. 49.
- 28) Bressani R., M. Flores; 1973. Acceptability and value of foods legumes in Latin América. Cali Colombia series Seminars. 2.
- 29) Conn J. M. 1974. Natural foods toxicants; nut. Rev. 32.
- 30) Binha, S.K.; 1978. Las leguminosas alimenticias; FAO Estudios de producción y protección vegetal. 3 Roma.

- 31) Whyte, R.D., S. Nilsson-Leisner. 1970. Departamento de fitotécnica de la Dirección de Agricultura. Las leguminosas en la agricultura. ONU 21.
- 32) Rachis, JJ; Honing D.H. sessa and Steggerda 1970. Flavor and flatulence factors in soybean protein products; J. Agr. Food Chem. 18.
- 33) Kaplan L. 1965; Archeology and domestication in American Phaseolus (beans) Econ. Botany 19.
- 34) Mac. Neish. 1964. The origins of new world civilization. Scientific American 5.
- 35) Batean, J.V. 1970, Nutrición animal (manual de métodos analíticos); Herreros Hnos. México.
- 36) Bowman, D.E. 1944. Fractions derived from soybean and navy beans which retard the tryptic digestion of casein. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 57.
- 37) Huelsaere H.J.M.; 1965. Toxicity and Hemagglutinating activity of legumes. Nature 206.
- 38) Botello A., Hdez. M. Arteaga C. 1978. Inhibidores de tripsina y hemaglutininas en algunas leguminosas comestibles, Arch. Invest. Med. 9.
- 39) Stead. R. H., de Huelsaere, Quicke. 1966. Trypsin inhibition hemagglutination and intraperitoneal toxicity of extracts of Phaseolus vulgaris, and glycine max. Arch. Biochem. 113.

- 40) Herrera L.M. 1982. "The Search for New Lectins Sources on the Baja California. Lectins-Biology-Biochem. 2.
- 41) Zenteno E; Ochoa J.L. 1984. Aglutininas de Cactáceas, un nuevo recurso de valor científico y económico. Ciencia 33.
- 42) Bannet, M.E.J.; Strachan J.P. and Porter. 1979. Immunologically mediated nutritional disturbances associated with soya proteinantigena. Proc. Nutr. Soc. 38.
- 43) Brown J.M.S. Osborne T.C. Bliss C.A. Hall T.C. 1982. Bean Lectins, Theo, appl. Genet. 62.
- 44) Caron, M. Daugnier, M.A., Joubert R. 1984. Biological functions of lectins. Marker Proteins in Inflammation 2.
- 45) Jaffe, H.G. y Brucher, G.; 1972. Toxicidad y especificidades de diferentes fitoheaglutininas de frijoles, Arch. Latinoamericanas Nutr. 22.
- 46) Jaffe H.G.; 1980. Hemagglutinins (Lectins) In toxic constituents of plant foodstuf. Liener E.J. Academic Press. N.Y.
- 47) Bressani R. and Elias L.B. 1974. Legume Foods. In new proteinfoods Altschul, A.M. Academic Press Vol. IA. N.Y.
- 48) Boyd. W.C. and Reguera; 1949. Hemagglutinating Substances for human cell in various plants; J. Inbund. 62.
- 49) Boyd W.C. and Shaplergh E. 1974. Specific precipitating activity of plant agglutins (Lectins)!. Science 119.

- 50) Kisura S., et al. 1987 T. cell mitogenicity of a novel α -D-galactoside-specific Lectin from the Beetle, *Allomyrina dichotoma* *Immunopharmacology* 13.
- 51) Falasca A. 1980. Mitogenic and Haemagglutinating Properties of a lectin Purified from *Hura crepitans* seeds. *Biochimica et Biophysica Acta* 632.
- 52) Linder E.; *Toxicología de los alimentos*. 1978. Acribia Zaragoza. 1982.
- 53) Jaffe, W.S. 1962. Hemagglutininas y tóxicos presentes en el frijol. *Exp.* 18.
- 54) Nowel, P. 1960, Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human Leukocytes. *Cancer Res.* 20.
- 55) Shoji, O. and TOJIKI. 1978. Studies on Soybean trypsin inhibitors. *J.Biochem.* 83.
- 56) Jaffe W.S.K. 1965. Hemagglutinin Hering: Fractionation of protein from kidney beans. *Arch. Biochem.* 80.
- 57) Has. W.E. & Sandstedt, R.H. 1944. A proteolytic inhibiting substance in the extract from unheated soybean meal. *J. Biol. Chem.* 154.
- 58) Morgan, W.T. Watkins J.W. 1953. The inhibition of the hemagglutinins in plant seeds by human blood group substances and simple sugars. *Brits. J. Exp.* 34.

- 59) Jaffe W.G. and Brucker G. 1972 Toxicidad y especificidad de las diferentes fitohemaglutininas de frijoles. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 22.
- 60) Su L.C., et. al. 1982. Lectins Definition and classification. Acta Histochem 71, 19-21.
- 61) Ascencio F, Ochoa J.L. 1985. Marine Invertebrate Agglutinins; The lectin from *Megapitaria squalida* CLAR. Lectins 4. 409-414.
- 62) Herrera E.H. et al 1982. The Search for new Lectins Sources on the Baja California. Lectins-Biology, Biochem, Clinical Biochem. 2. 693-700.
- 63) Zenteno E., Ochoa J.L. 1983. Cacti Lectins. Lectins 4. 438-445.
- 64) Zenteno E. Ochoa J.L. 1984. Aglutininas de Cactáceas un nuevo recurso de valor científico y económico. Ciencia 38. 153-162.
- 65) Ochoa J.L., Kristiansen T. 1982. Purification and Partial Characterization of an Agglutinin from *Phaseolus coccineus* var. *Alubia*. Biochemica et. Biophysica Acta. 705. 396-404.
- 66) Bunn M.M., Campos A. 1991. Lectin(s) Extracted from Seeds of *Artocarpus integrifolia* (Jackfruit) Potent and Selective Stimulator(s) of Distinct Human T and B cell Functions. The Journal of Immunology 127. 427-429.

- 67) Condon, J.M. et al Lectins in Wheat. Gluten Proteins. J. Agric. Food Chem. 31. 939-341.
- 68) Johnson L.E. And Stevenson R. (Eds) 1978. Basic Liquid Chromatography. Varian Associates. Inc. Palo Alto. California.
- 69) Kakade, M.L. et al. 1974. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products cereal chem 51. 374-382.
- 70) Kakade, M.L., Hoffa D.E., and Liener, J.R. 1973. Contribution of trypsin inhibitors to the deteterious effects of unheated soybeans fed to rats, J. Nutr. 103. 1772-1778.
- 71) Kakade, M.L. Sissons, M! and Liener I.E. 1969. An evaluation of natural us synthetic substrates for assuring the antitryptic activity of soybean samples. Cereal Chem. 46. 518-526.
- 72) Conrath, T.B. 1972. Handbook of microfilter procedures Dynatech Co. 1-29 Mass.
- 73) Jaffé, S. y Brocher, O. 1972. Toxicidad y Especificidad de diferentes fitohemaglutinias de frijoles. Arch. Latinoamericanas. Nutr. 22. 267-281.