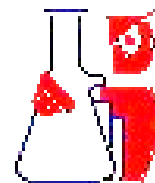




BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA - ALIMENTOS

LIC. QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

TESIS:

**DETERMINACIÓN DE FACTORES ANTINUTRICIONALES DE HARINA
INTEGRAL DE MEZQUITE (*Prosopis laevigata*).**

Que para obtener el Título de

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

pQFB. Ana Karen Sánchez de Jesús

DIRECTORA DE TESIS:

M. C. Rosa María Dávila Márquez

ASESOR:

D.C. Raúl Ávila Sosa Sánchez

Puebla, Pue. Octubre, 2014

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN	1
2- JUSTIFICACIÓN	2
3. OBJETIVOS	3
3.1 Objetivo general	3
3.2 Objetivos particulares	3
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
4.1 Leguminosas	4
4.2 Factores antinutricionales	5
4.2.1 Metabolitos secundarios	6
4.2.1 Terpenos	8
4.2.1 Alcaloides	10
4.2.1 Glicósidos	14
a) Saponinas	15
b) Glucósidos cianogénicos	17
4.2.1 Compuestos fenólicos: Taninos	20
4.2.2 Factores antinutricionales de naturaleza proteica	24
Lectinas	24
Inhibidores de proteasas	28
Hemolisinas	30
4.2.3 Otros factores antinutricionales	31
4.3 <i>Prosopis laevigata</i>	33
4.4 Harina de mezquite	36
5. DIAGRAMA DE TRABAJO	37
6. MATERIALES Y MÉTODOS	38
6.1 Material biológico	38
6.2 Material y equipo de laboratorio	38
6.3 Métodos	39

7. METODOLOGÍA	40
7.1 Obtención de harina integral de mezquite (<i>Prosopis laevigata</i>)	40
7.2 Metabolitos secundarios	40
7.2.1 Alcaloides	40
7.2.2 Saponinas	41
7.2.3 Glucósidos cianogénicos	41
7.2.4. Taninos	42
7.3 Factores antinutricionales de naturaleza proteica	42
7.3.1 Lectinas	42
7.3.2 Inhibidores de proteasas	43
7.3.3 Hemolisinas	44
7.4 Cromatografía en capa fina para caracterización parcial de alcaloides	45
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	46
8.1 Metabolitos secundarios	46
8.2 Factores antinutricionales de naturaleza proteica	47
8.3 Cromatografía en capa fina para caracterización parcial de alcaloides	49
9. CONCLUSIONES	51
10. RECOMENDACIONES	52
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
12. ANEXOS	59

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Alcaloides; precursores, características, ejemplos y sus efectos en humanos	12
Tabla 2	Glucósidos cianogénicos y sus precursores	18
Tabla 3	Familias de los inhibidores de proteasas	29
Tabla 4	Clasificación taxonómica del mezquite (<i>Prosopis laevigata</i>)	33
Tabla 5	Equipos y sus características específicas, utilizados en la determinación de factores antinutricionales de harina integral de mezquite (<i>Prosopis laevigata</i>)	38
Tabla 6	Métodos y referencias para la determinación de factores antinutricionales de harina integral de mezquite (<i>Prosopis laevigata</i>)	39
Tabla 7.	Evaluación de metabolitos secundarios de mezquite (<i>Prosopis laevigata</i>)	46
Tabla 8	Evaluación de factores antinutricionales de carácter proteico de harina integral de mezquite (<i>Prosopis laevigata</i>)	48
Tabla 9	Cromatografía en capa fina para la identificación parcial de alcaloides de harina integral de mezquite (<i>Prosopis laevigata</i>) utilizando diferentes reveladores	49

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Biosíntesis de los metabolitos secundarios	7
Figura 2	Terpenos	9
Figura 3	Ruta biosintética general de alcaloides	11
Figura 4	Estructura química de saponinas: esterooidal y triterpénica	16
Figura 5	Glucósidos cianogénicos	19
Figura 6	Taninos condensados	22
Figura 7	Taninos hidrolizables	23
Figura 8	Lectina de la leguminosa <i>Lotus tetragonolobus</i>	26
Figura 9	Inhibidor de proteasas de la familia de Bowman-Birk	30
Figura 10	Otros factores antinutricionales	32
Figura 11	<i>Prosopis laevigata</i>	34

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por permitirme concluir esta etapa de mi vida.

A mis padres Alfredo y Esperanza

Por todo su amor y apoyo incondicional, por brindarme un hogar y una familia, por no dejarme caer ni rendirme, mi amor, mi admiración y mi respeto por siempre.

A mis hermanos Alma, Estefany y Alfredo

Por existir, por hacer de mi vida toda una aventura, por las muchas alegrías compartidas, por su cariño y su comprensión

A mi familia

Principalmente a mis abuelitos, pero sobre todo a mi abuelita Angelina por estar a mi lado, por sus enseñanzas y por todo su inigualable amor.

A mis asesores M. C. Rosa María y D. C. Raúl

Por la oportunidad que me brindaron, por su confianza, por sus enseñanzas y sobre todo por su paciencia, me llevo además del conocimiento grandes ejemplos en el ámbito profesional y además de calidad humana, de verdad gracias por creer en mí.

A mis amigos

Por hacer de estos años de las mejores experiencias de mi vida, por todas las sonrisas compartidas, por brindarme su amistad sin pedir nada a cambio, por estar ahí en los momentos difíciles y aun así siempre buscar el lado bueno.

Y en especial al angelito que desde el cielo me cuida siempre, ¡te extraño!

RESUMEN

Uno de los principales problemas de los países en desarrollo es la desnutrición energética proteica (falta de suficiente energía, proteína y micronutrientes). Las leguminosas representan una importante fuente de proteínas de origen vegetal, desempeñando un papel primordial en la nutrición humana, sin embargo, presentan factores antinutricionales, por lo tanto las leguminosas no convencionales (mezquite en este estudio) deben ser analizados antes de su utilización como alimento seguro y que cumpla con los requerimientos nutricionales. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de factores antinutricionales en harina integral de mezquite (*Prosopis laevigata*). No existe una metodología universal para la determinación de los factores antinutricionales por lo que las determinaciones se hicieron mediante análisis fitoquímicos, haciendo la extracción específica para cada factor de acuerdo a su naturaleza química, así para metabolitos secundarios se utilizaron solventes de diferente polaridad, mientras que para los factores antinutricionales de naturaleza proteica se utilizaron soluciones buffer. Los ensayos realizados fueron: gravimétricos, cromatografía en capa delgada (para alcaloides), poder tensoactivo (para saponinas), colorimétricos (para taninos, glucósidos cianogénicos e inhibidores de proteasas), hemaglutinación (para lectinas) y hemólisis (para hemolisinas). Los resultados muestran que no hay presencia de glucósidos cianogénicos, saponinas, lectinas y hemolisinas. Sin embargo se demostró la presencia de alcaloides, taninos condensados e inhibidores de proteasas. Se realizó una caracterización parcial de alcaloides encontrando la posible presencia de hordenina, cefalina, reserpina y escopolamina. Por lo tanto es preferible no consumir la harina integral de mezquite sí no ha tenido un tratamiento previo para la eliminación de los factores antinutricionales antes mencionados.

1 INTRODUCCIÓN

La desnutrición energético-proteica está entre los problemas más graves a los que se enfrentan los países en desarrollo actualmente. Esto es atribuido principalmente al incremento de la población, así como la dependencia a una dieta a base de cereales, la escasez de tierra fértil y la degradación de los recursos naturales. Se ha estimado que existen alrededor de 800 millones de personas desnutridas en algunos países en desarrollo y subdesarrollados. Además los altos precios de los alimentos (la provisión de proteínas de origen animal resulta difícil y costosa) y las limitaciones políticas son factores que contribuyen al empeoramiento de la situación alimentaria en estos países (Bhat y Karim, 2009).

Una posible alternativa para mejorar el estado nutricional de la población es complementar la dieta con proteínas de origen vegetal. Las leguminosas desempeñan un importante papel en la nutrición humana debido a que son ricas fuentes de proteína, calorías, algunos minerales y vitaminas. Además es importante hacer notar que la familia *Leguminosae* tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y puede ser utilizada dentro de los sistemas agroforestales para la recuperación o mantenimiento de la fertilidad del suelo (Iqbal y col. 2005; López y col. 2008).

La exploración de leguminosas no convencionales puede ser de gran importancia para el desarrollo de alimentos seguros, que cumplan los requerimientos nutricionales y agrícolas, y puedan así contribuir eficazmente a la mejora de la economía de una nación. Las vainas de mezquite (*Prosopis laevigata*) son una alternativa alimentaria debido a su contenido nutricional (12 a 18% de proteína cruda) y sus excelentes capacidades de adaptación a zonas áridas o semiáridas. Sin embargo en el estudio de los alimentos no convencionales además de evaluar la composición nutricional química, también es importante identificar la presencia de factores antinutricionales que pueden afectar la degradación y la digestión alimentaria (López y col. 2008; Andrade-Montemayor y col. 2009; Bhat y Karim, 2009).

2 JUSTIFICACIÓN

Las leguminosas en general presentan factores antinutricionales y otras sustancias nocivas a la salud que imposibilitan la utilización de todo su potencial nutritivo por el organismo. De esta forma, granos no convencionales con uso potencial en la alimentación, deben ser analizados en dietas animales antes de su utilización en dietas humanas. A pesar de que la harina de la vaina del *Prosopis spp* es ampliamente utilizada en la elaboración de bebidas, dulces y sustitutos del café, los trabajos relacionados al estudio de los antinutrientes en la harina son muy escasos.

El Mezquite del Valle de Tehuacán perteneciente a la especie *Prosopis laevigata*, es de gran importancia ecológica para la región, participa en la regeneración de suelos y retención de agua, sin embargo, es subempleado como alimento para ganado y desaprovechado como fuente potencial de alimento para el hombre. Por lo que es importante caracterizar el contenido de factores antinutricionales de la harina integral de *Prosopis laevigata* para proponerlo como una posible fuente alimentaria segura para el hombre.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- ✓ Determinar la presencia de factores antinutricionales en harina integral de Mezquite (*Prosopis laevigata*).

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Elaborar harina integral de Mezquite (*Prosopis laevigata*)
- ✓ Determinar la presencia de alcaloides, saponinas, glucósidos cianogénicos, taninos, lectinas, inhibidores de proteasas y hemolisinas en Mezquite (*Prosopis laevigata*)
- ✓ Caracterizar parcialmente a los alcaloides presentes en Mezquite (*Prosopis laevigata*)

4 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Leguminosas

Las leguminosas son un conjunto de especies vegetales pertenecientes a la familia *Leguminosae* o también llamada *Fabaceae*, se diferencian de otras familias por su morfología característica, en la cual las semillas están contenidas en una vaina que constituye el fruto o la legumbre. Existen aproximadamente 650 géneros y 20,000 especies de leguminosas, y su cultivo ocupa alrededor del 15% de la tierra agrícola mundial. Son reconocidas como la segunda fuente vegetal más valiosa para la nutrición humana y animal. Además juegan un papel importante en la agricultura sostenible, ya que tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico a través de simbiosis con las bacterias de género *Rhizobium*, por lo que pueden ser utilizadas dentro de los sistemas agroforestales para la recuperación o mantenimiento de la fertilidad del suelo (Goyoaga, 2005; López y col. 2008; Bhat y Karim, 2009; Del Ángel y col. 2013).

Las semillas de las leguminosas pueden ser divididas en dos grupos, de acuerdo a su contenido lipídico: en oleaginosas y leguminosas secas. Las oleaginosas contienen niveles del 20 al 50% de grasa, mientras que las legumbres secas o leguminosas presentan un contenido graso de entre 1 y 7% (Goyoaga, 2005).

El valor nutritivo de las leguminosas se atribuye a que pueden ser buenas fuentes de proteínas, hidratos de carbono, lípidos, minerales y vitaminas, siendo especialmente importantes por su aporte en proteínas de alta calidad con un porcentaje variable de entre el 18 y 40%. Se sabe que las proteínas de leguminosas presentan cantidades adecuadas del aminoácido lisina, a diferencia de las proteínas de cereales que son deficientes de éste, sin embargo las leguminosas son deficientes en los aminoácidos azufrados metionina, cistina y cisteína (Iqbal y col. 2005; Del Ángel y col. 2013).

Por otra parte las leguminosas también aportan carbohidratos complejos, especialmente almidón, y de la misma manera fibra. Las vitaminas aportadas por las leguminosas son tiamina, niacina y ácido fólico, y por las oleaginosas las vitaminas A

y D. Mientras que los minerales aportados son potasio, calcio, fosforo, zinc, hierro y magnesio. No obstante la composición química de las leguminosas puede variar, dependiendo del suelo y de las condiciones climáticas de su cultivo (Dávila y col. 2003; Iqbal y col. 2005)

A pesar de su importancia en la alimentación, las leguminosas contienen una variedad de factores antinutricionales en concentración variable, que interfieren en la disponibilidad de los nutrimentos lo que causa un efecto negativo en el valor nutricional del alimento y en la salud de los consumidores (animales o humanos) (García 2004; Del Ángel y col. 2013).

4.2 Factores antinutricionales

Los factores antinutricionales son compuestos químicos que impiden la digestión, la absorción y la utilización de los nutrientes de algunos alimentos, especialmente de semillas, producen efectos fisiológicos y bioquímicos adversos en humanos y animales pudiendo llegar a presentar toxicidad en algunos casos. Estas sustancias pueden ser a) compuestos de reserva, como los α -galactósidos, sintetizados y acumulados durante la maduración de la semilla para ser utilizados a lo largo del proceso germinativo, b) compuestos de defensa de la planta, como inhibidores de proteasas, lectinas, taninos, alcaloides, glucósidos cianogénicos, saponinas, entre otros frente al ataque de bacterias, virus, hongos y herbívoros, ó c) compuestos producidos en respuesta a condiciones de estrés (García, 2004; Goyoaga, 2005; Elizalde y col. 2009).

Bioquímicamente los factores antinutricionales constituyen un grupo de compuestos de compleja clasificación, pues estructuralmente pueden ser fenoles, proteínas, anillos heterocíclicos de naturaleza variada y glicósidos (García, 2004). En función de su comportamiento con aplicación de calor se clasifican en factores termo-estables y en factores termo-lábiles. Los factores termo-estables incluyen a factores antigénicos, oligosacáridos, aminoácidos no proteicos, saponinas, estrógenos, cianógenos y fitatos, mientras que los factores termo-lábiles son inhibidores de

proteasas, lectinas, goitrogenos y antivitaminas (Elizalde y *col.* 2009). Los principales compuestos que se han caracterizado en diferentes sistemas vegetales incluyen a los metabolitos secundarios, los inhibidores de enzimas digestivas, proteasas, lectinas, polifenol oxidasas y otras proteínas de defensa (Ming-Shun, 2008).

4.2.1 Metabolitos secundarios

Una estrategia utilizada por las plantas contra estrés biótico y abiótico es la producción de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, estos compuestos orgánicos se denominan metabolitos secundarios. Químicamente son moléculas de bajo peso molecular de gran importancia ecológica, ya que participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, en el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersadores de las semillas y frutos (Sepúlveda-Jiménez y *col.* 2004; Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

A principios de este siglo se argumentaba que los metabolitos secundarios surgían espontáneamente o mediante enzimas no específicas, actualmente se conocen cerca de 85,000 metabolitos secundarios en las plantas y se sabe que estos son derivados de las vías laterales a la producción de los metabolitos primarios, particularmente de la fotosíntesis como se muestra en la Figura 1. Las rutas metabólicas que producen metabolitos secundarios en las plantas son: la vía del shikimato, la vía del ácido malónico, la vía del ácido mevalónico y la vía MEP (2C-metil-D-eritrol-4-fosfato). Como consecuencia de una síntesis enzimática específica, los productos finales casi siempre tienen distinta estereoquímica. A menudo estas moléculas se parecen a sustratos endógenos, hormonas o neurotransmisores y pueden así imitar la respuesta a su blanco molecular correspondiente (Wink, 2010; García y *col.* 2014).

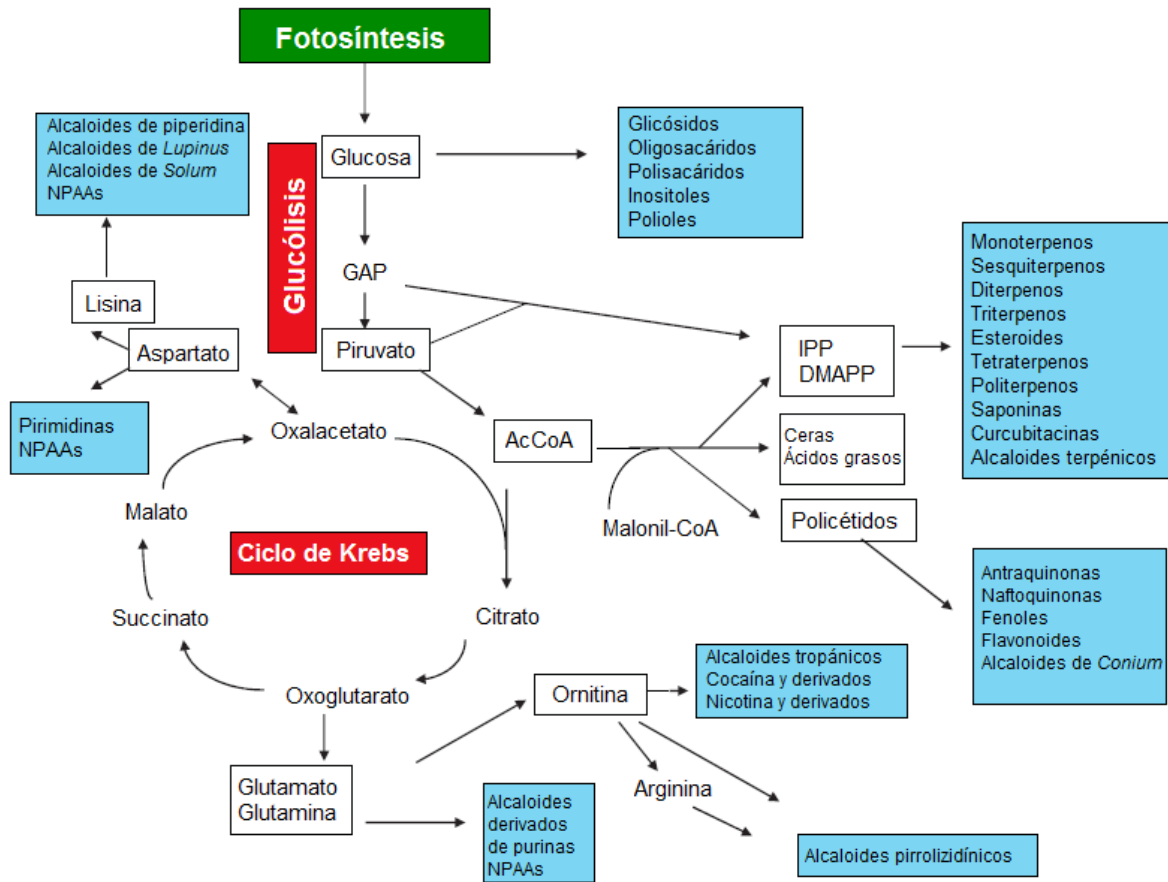


Figura 1. Biosíntesis de los metabolitos secundarios. Abreviaturas: IPP, isopentenil difosfato; DMAPP, dimetilalil fosfato; GAP, gliceraldehído-3-fosfato; NPAAs, aminoácidos no proteicos; AcCoA, acetil coenzima A

Fuente: Wink, 2010

Una síntesis activa de metabolitos secundarios es inducida cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas, tales como, el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), el ataque por microorganismos (virus, bacterias y hongos), la competencia entre diferentes especies de plantas (por el espacio de suelo, luz y nutrientes) y la exposición a radiación, así como otros tipos de estrés abiótico. En plantas anuales los metabolitos secundarios se encuentran principalmente en flores, frutos y semillas, mientras que en especies perennes se presentan mayormente en bulbos, raíces, rizomas y en la corteza de raíces y tallos (Sepúlveda-Jiménez y col. 2004; Wink, 2010).

De acuerdo a su composición química los metabolitos secundarios son clasificados en dos grupos principales: nitrogenados y no nitrogenados. Los que contienen nitrógeno incluyen a los alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos, mientras que los no nitrogenados son los terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides (Sepúlveda-Jiménez y *col.* 2004; Wink, 2010). Por otro lado García y *col.* (2014) los clasifican en cuatro grupos principales: terpenos, alcaloides, glicósidos y fenoles.

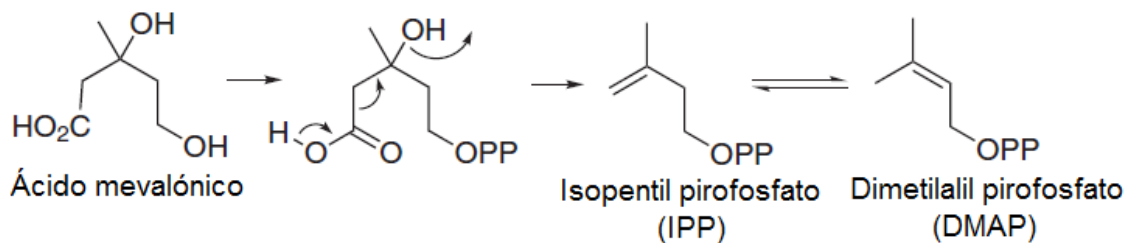
4.2.1 .1 Terpenos.

Los terpenos o terpenoides constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios, químicamente son hidrocarburos que pertenecen a las familias de los alquenos, alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y cetonas. Son insolubles en agua y derivan de la unión de unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno). Cuando la molécula contiene átomos de oxígeno se da preferencia al término terpenoide, aunque ambas denominaciones son empleadas indistintamente (Ávalos y Pérez-Urria, 2009; Ormeño y Fernández, 2012).

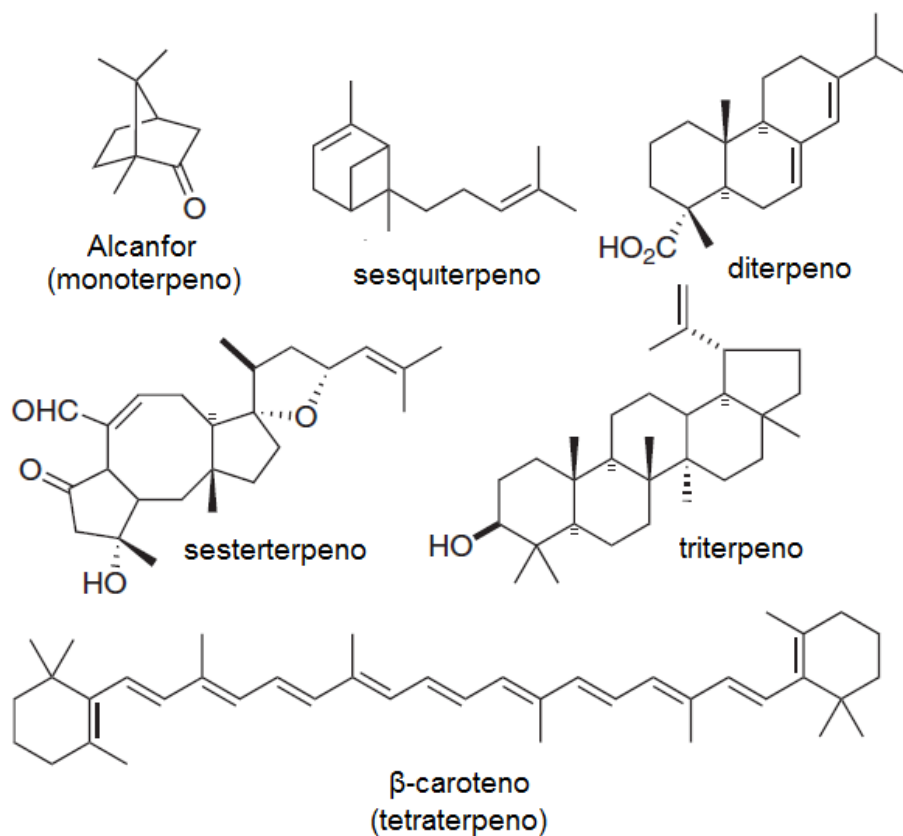
Se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno presentes en su estructura, teniendo así monoterpenos (2 unidades de isopreno), sesquiterpenos (3 unidades de isopreno), diterpenos (4 unidades de isopreno), sesterterpenos (5 unidades de isopreno), triterpenos (6 unidades de isopreno), tetraterpenos (8 unidades de isopreno) y politerpenos (9 – 30,000 unidades de isopreno) (Ávalos y Pérez-Urria, 2009; Ormeño y Fernández, 2012; Wink, 2010).

Se sintetizan a partir de las rutas del ácido mevalónico y la ruta 2C-metil-D-eritrol-4-fosfato (MEP). El isopreno en sí no está implicado en la biosíntesis de terpenos como una especie reactiva, pero se utiliza en forma de isopentenil y dimetilalil pirofosfato (IPP y DMAP, respectivamente) (Figura 2a). Algunos ejemplos típicos son mostrados en la figura 2b El papel fisiológico de estas moléculas es en respuesta ante agresiones bióticas; de herbívoros o de patógenos víricos, bacterianos o fúngicos. Los terpenos se localizan principalmente en hojas, flores y frutos, y en menor

cantidad en tallos, tronco y raíces. Éste grupo incluye hormonas como giberelinas y ácido abscísico, pigmentos carotenoides incluyendo carotenos y xantofilas, esteroides, así como derivados de los esteroides y aceites esenciales (Ávalos y Pérez-Urria 2009; Ormeño y Fernández, 2012; García y col. 2014).



a) Biosíntesis de IPP y DMAP



b) Ejemplos típicos de terpenos

Figura 2. Terpenos: a) biosíntesis de isopentenil pirofosfato (IPP) y dimetilalil pirofosfato (DMAP), y b) ejemplos de terpenos

Fuente: Koskinen, 2012

4.2.1.2 Alcaloides.

La investigación de la bioquímica de los alcaloides comenzó con el aislamiento de la morfina en 1806, extraordinariamente la estructura de la morfina fue esclarecida hasta 1952, debido a la complejidad estereoquímica de la molécula. Desde entonces, tres principales avances técnicos han llevado al conocimiento de la formación de alcaloides; 1) en la década de los 50's, la introducción de precursores radiomarcados; 2) en los 70's, el uso de cultivos celulares como fuente de enzimas biosintéticas; y 3) en los 90's, técnicas moleculares que facilitan el aislamiento de genes involucrados en su biosíntesis. El término alcaloide (de *alkaly* y *eidos*), fue propuesto por el químico alemán Carl Friedrich Wilhem Meissner (1792-1853) en 1819, el cual se aplicó a los compuestos de origen vegetal con propiedades alcalinas (Facchini, 2001; Arango, 2002).

Los alcaloides son un grupo diverso de compuestos de bajo peso molecular que contienen nitrógeno formando parte de un heterociclo, en su forma básica son poco solubles en agua, mientras que en forma de sal son hidrosolubles. Se han encontrado en alrededor del 20% de las especies de las plantas teniendo una amplia distribución en la familia *Leguminosae*. Su función es actuar como barreras químicas contra herbívoros y fitopatógenos (bacterias, hongos y virus) o también como reservorios de nitrógeno. El efecto tóxico de los alcaloides radica en su capacidad para bloquear neuroreceptores, intermediarios de la transducción de señales neuronales y canales iónicos de vertebrados e insectos. En humanos generan respuestas fisiológicas, la mayoría de ellas consecuencia de su interacción con neurotransmisores. Por otro lado su efecto como inhibidores del crecimiento de microorganismos patógenos está dado por su capacidad de intercalarse con el DNA, detener la síntesis de proteínas, inducir apoptosis e inhibir las enzimas del metabolismo de carbohidratos (Facchini, 2001; García, 2004; Sepulveda-Jiménez y col. 2004).

La mayoría de alcaloides son biosintetizados a partir de los aminoácidos ornitina, arginina, lisina, fenilalanina, tirosina o triptófano, aunque también pueden derivar de otros precursores. Los alcaloides comprenden aproximadamente unas 12,000 sustancias químicas que se pueden agrupar a una gran variedad de constituyentes químicos, por lo que se han estructurado de acuerdo a su origen biogenético. En la Figura 3 se presentan las principales rutas biosintéticas de los grupos de alcaloides (Loyola-Vargas y col. 2004; Wink, 2010; Koleva y col. 2012).

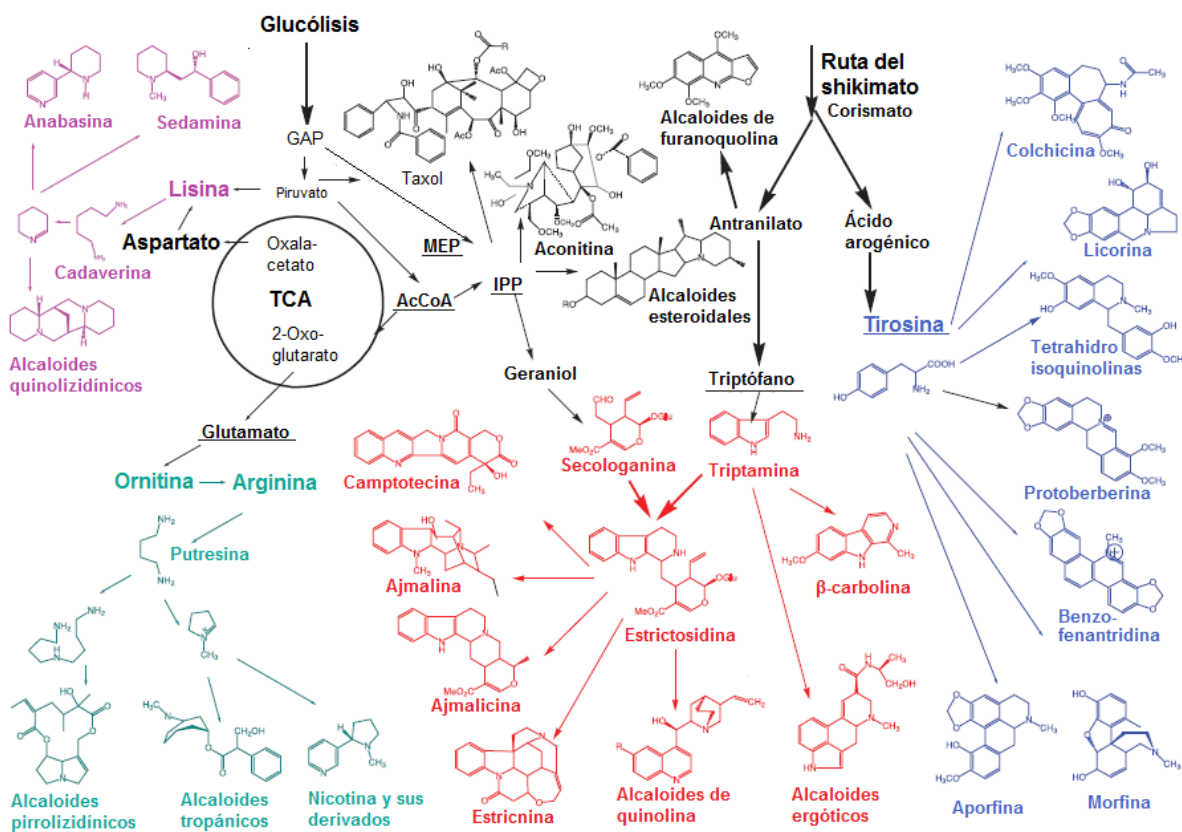


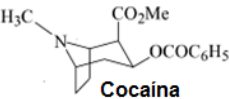
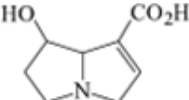

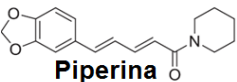
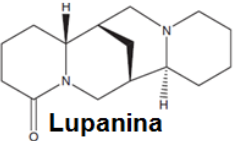
Figura 3. Ruta biosintética general de alcaloides.

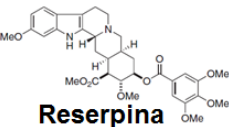
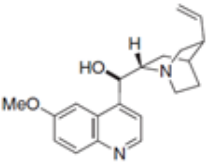
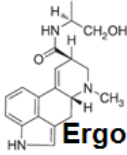
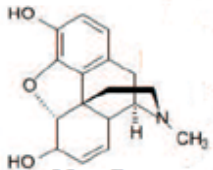
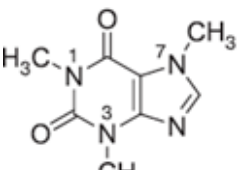
Fuente: Wink, 2010

Los alcaloides derivados de ornitina y arginina son los alcaloides tropánicos y pirrolizidínicos, mientras que los derivados de lisina son los alcaloides de piperidina, piridina y los de quinolizidina. El triptófano da lugar al grupo más amplio caracterizado por presentar un núcleo de tipo indol, incluye alcaloides indólicos, de quinolina y de Ergot. La tirosina es precursor de los alcaloides bencilisoquinolínicos.

En la tabla 1 se muestran los diferentes tipos de alcaloides, sus precursores, un ejemplo y sus efectos en humanos.

Tabla 1. Alcaloides: precursores, características, ejemplos y sus efectos en humanos.

Tipo de alcaloide	Características	Estructura química (ejemplo)	Efectos	
Ornitina y Arginina	Tropánicos	Más de 200 estructuras Principalmente en familia <i>Solanaceae</i>	Núcleo tropánico (tropan-3 α -ol)  Cocaina	Drogas anticolinérgicas y alucinógenos. Provocan sequedad de mucosas, dilatación de pupilas, fotofobia, hiper o hipotensión, arritmias, nerviosismo, irritabilidad entre otros
	Pirrolizidínicos	Más de 500 estructuras	Pirrolizidina  Retronecina	Son metabólicamente activados en hígado y pueden alquilar DNA y proteínas conduciendo a mutaciones e incluso cáncer. Intoxicación aguda: dolor abdominal, ascitis, náuseas, vómito, diarrea y edema.
	Nicotina y derivados	Compuestos de defensa química	Nicotina  Nicotina	Actúan sobre receptores nicotínicos colinérgicos. Inducen incremento en frecuencia cardiaca y presión sanguínea, incremento de catecolaminas en sangre, entre otros.
Lisina	Piperidina y piridina	Responsables del sabor picante de especias y chile	Sistema heterocíclico con nitrógeno (C ₅ N)  Piperina	Son irritantes y producen sensación de ardor
	Quinolizidina	Presentes en <i>Lupinus</i>	Estudios limitados  Lupanina	Bloquean receptores colinérgicos nicotínicos y son antagonistas débiles de receptores colinérgicos muscarínicos Neurológicamente producen debilidad, mareos, midriasis, malestar general, pérdida de coordinación, entre otros

Triptófano	Indólicos o indolterpénicos	Más de 3,000 estructuras Derivados de triptófano y del terpeno iridoide secologanina	Núcleo tipo indol  Reserpina	Algunos alcaloides indolterpénicos son usados como anticancerígenos, antiarrítmicos y en el tratamiento de la malaria
	Alcaloides de quinolina	También derivan de fenilalanina	Quinolina  Quinina	La quinina se utiliza como fármaco frente a <i>Plasmodium vivax</i> y otros protozoos.
	Ergóticos	Productos de interacción simbiótica entre hongos y su planta hospedera	Sistema ergolíneo tetracíclico  Ergometrina	Son micotoxinas que actúan como agonistas de monoaminas afectando el sistema cardiovascular, nervioso, reproductivo e inmune.
Tirosina	Benciliso-quinolínicos	Alrededor de 2,500 estructuras	Esqueleto 1-benciltetrahydroisoquinolina  Morfina	Actividades farmacológicas diversas como por ejemplo: analgésicos, supresores de la gota, bloqueadores neuromusculares, antimicrobianos y otros.
	Otros precursores	Cafeína, Teobromina y Teofilina	Derivados de Xantosina  Cafeína	Cantidades mayores a 400mg/día: toxicidad general que incluye temblor, problemas gastrointestinales, cardiovasculares, arritmias e hipertensión.

Elaboración propia a partir de la información de diversas fuentes. (Facchini, 2001; Arango, 2002; Loyola-Vargas y col. 2004; Martínez, 2007; Wink, 2010; De-la-Cruz y col. 2012; Finefield y col. 2012; Koleva y col. 2012; Koskinen, 2012; O'Connor, 2012; Ballesteros y col. 2013).

A altas dosis, casi todos los alcaloides son tóxicos, no obstante a bajas dosis poseen un alto valor terapéutico, por lo que son utilizados como productos farmacéuticos, estimulantes, narcóticos y venenos. Originalmente se pensaba que los alcaloides eran esencialmente productos vegetales, ahora se sabe que estos compuestos también están presentes en microorganismos y animales. Algunos alcaloides vegetales de uso clínico son por ejemplo, los analgésicos; morfina y codeína, los agentes anticancerígenos; vinblastina y taxol, el supresor de la gota; colchicina, el relajante muscular; tubocurarina, el antiarrítmico; ajmalina, el antibiótico; sanguinarina y el sedante; escopolamina. Otros alcaloides vegetales de importancia incluyen cafeína, nicotina, cocaína entre otros (Facchini, 2001; Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

No existe una sistematización de la nomenclatura de los alcaloides, generalmente tiene terminación “ina”. Algunos criterios para denominarlos son: a) de acuerdo a la especie que los contiene, por ejemplo efedrina de *Ephedra sp*, b) de acuerdo al nombre vulgar de la especie que lo produce, por ejemplo, ergotamina del Ergot de cornezuelo de centeno (*Claviceps purpurea*), c) de acuerdo al género del cual se ha obtenido, por ejemplo, papaverina de *Papaver somniferum*, d) de acuerdo a la actividad farmacológica, por ejemplo, emetina con actividad farmacológica emética, y e) raramente de acuerdo a algún investigador, por ejemplo, nicotina por el embajador francés Jean Nicot que envió semillas de la planta de tabaco a Francia (Silva, 2010).

4.2.1.3 Glicósidos

El término glicósido hace referencia al enlace glicosídico que se forma entre compuestos con grupos –OH, -NH y –SH que reaccionan con el –OH del carbono anomérico de un monosacárido, con pérdida de una molécula de agua. Los glicósidos son metabolitos secundarios de las plantas, muchos de los cuales son reconocidos como metabolitos activos o aleloquímicos que interactúan con otras plantas, microorganismos, insectos y animales. Siendo su actividad biológica determinada usualmente por la estructura química de la aglicona, es decir, de la porción no glucídica de la molécula. Dentro de los glicósidos de importancia se

encuentran a) las saponinas, compuestos solubles en agua que forman espuma al agitarlos, b) glicósidos cardiotónicos, usados como fármacos o venenos, debido a su efecto en el corazón, por ejemplo la digitalina utilizada para el tratamiento de la hipertensión, c) glucósidos cianogénicos, con función de defensa, liberando HCN al ser hidrolizados y d) glucosilatos, precursores de isotiocianatos (aceites de mostaza), que al ser hidrolizados producen subproductos tóxicos e inhibidores de crecimiento (Majak, 2001; García y *col.* 2014).

a) Saponinas

Son glicósidos que se encuentran ampliamente en las plantas, hasta el punto que parecen ser ubicuas, sin embargo, sólo un pequeño número de especies contienen saponinas que son tóxicas para los mamíferos. El nombre “saponina” es derivado del latín “sapo” el cual significa jabón, debido a que estas moléculas forman espuma como el jabón cuando son agitadas en una solución acuosa. Químicamente están formadas por una aglicona o sapogenina de origen terpénico, esterooidal y/o esterooidal alcaloide unidas a una porción glúcida de una a cinco moléculas de azúcar, comúnmente glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa y xilosa. La combinación de elementos estructurales polares y no polares en estas moléculas explica su comportamiento como jabón en soluciones acuosas. Las saponinas tienen un gran número de propiedades, entre las que se incluyen dulzura y amargura, propiedades espumante y emulsificante, farmacológica y medicinal, así como actividades hemolítica, antimicrobiana, insecticida y molusquicida (Majak, 2001; Anaya, 2003; Vincken y *col.* 2007; Díaz; 2009).

Las saponinas, a menudo son subdivididas en dos clases principales: las saponinas triterpenoides y las saponinas esteroidales. Separar triterpenos de los esteroides no es fácil, especialmente por su cercana relación estructural, de manera que sólo considerando la ruta biosintética es posible separar a los dos grupos. Se ha propuesto que los triterpenoides derivan del ácido mevalónico vía escualeno. Las saponinas esteroidales, incluyendo esterooidal alcaloides, no han sido estudiadas extensivamente, sin embargo se cree que probablemente se forma el sistema del

anillo esteroidal a partir de colesterol. En la figura 4 se muestra la estructura química de una saponina esteroidal y una saponina triterpénica. (Wink, 2010)

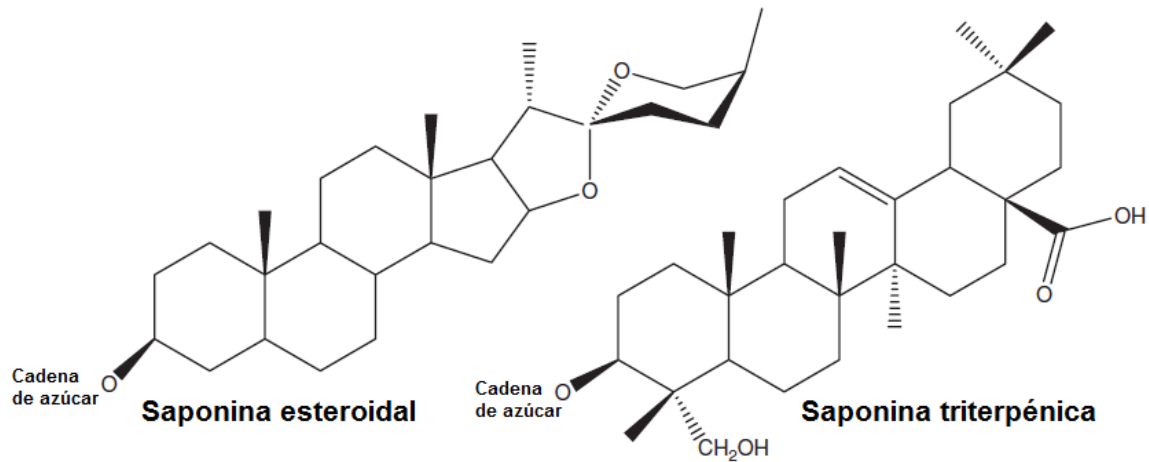


Figura 4. Estructura química de saponinas: esteroidal y triterpénica.

Fuente: Wink, 2010.

Las saponinas esteroidales no son muy abundantes en la naturaleza, pero se encuentran principalmente en monocotiledóneas, además son importantes materias primas para la producción comercial de hormonas esteroides. Las saponinas triterpenoides son abundantes principalmente en dicotiledóneas. Por otro lado las saponinas glicoalcaloides en determinadas concentraciones, son tóxicas para microorganismos, insectos, animales y humanos, por lo que su presencia en alimentos se considera un factor antinutricional (Anaya, 2003; Díaz, 2009).

En general el efecto tóxico de las saponinas se inicia por la interacción con la membrana de la mucosa, causando cambios de permeabilidad o pérdida de enzimas unidas a la membrana, dificultando la asimilación de nutrientes. Sin embargo la actividad antinutricional de las saponinas es muy controvertida, ya que su diversidad hace que los efectos en la nutrición sean muy variados. Pequeñas concentraciones de saponinas absorbidas en el intestino ejercen un efecto positivo al unirse al colesterol del alimento e impedir su absorción, además también se les han atribuido propiedades antiinflamatorias y función protectora frente a cáncer de estómago (Majark, 2001; Goyoaga, 2005).

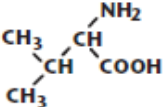
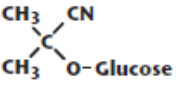
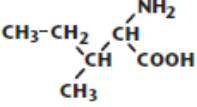
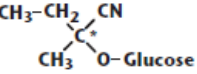
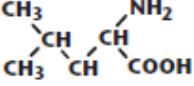
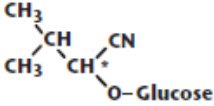
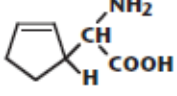
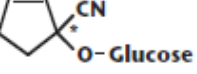
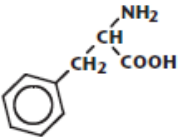
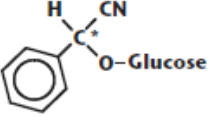
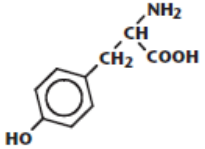
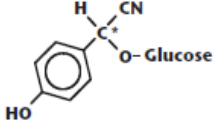
b) Glucósidos cianogénicos

La cianogénesis y los glicósidos cianogénicos están ampliamente distribuidos entre las plantas, se han reportado en alrededor de 3,000 especies de plantas. Los glucósidos cianogénicos son compuestos nitrogenados que no son tóxicos por sí mismos pero que liberan HCN cuando hay una agresión o traumatismo al tejido de la planta cianogénica, por lo que son un importante factor ecológico en la defensa contra herbívoros. Algunos glucósidos cianogénicos bien conocidos son la amigdalina presente en almendras amargas, albaricoque, cereza o melocotón y la durrina contenida en sorgo (Ávalos y Pérez-Urria, 2009; Wink, 2010).

Estructuralmente los glucósidos cianogénicos son β -glucosidos formados de α -hidroxinitrilos estabilizados por glucosa, se conocen más de 60 diferentes estructuras de glucósidos cianogénicos. Las diferencias estructurales resultan de la variación de aglicona y de la glucosilación adicional de la fracción original de glucosa. Existen además glucósidos cianogénicos que son moléculas incluso más complejas, que involucran formación de ésteres con diferentes ácidos orgánicos (Zagrobelyny y *col.* 2008; Wink, 2010).

Los glucósidos cianogénicos derivan de los aminoácidos alifáticos L-valina, L-isoleucina y L-leucina, de los aminoácidos aromáticos L-fenilalanina y L-tirosina o del aminoácido no proteico 2-(2'-ciclopentenil)-glicina. Con la excepción de pocos compuestos especiales, tal como acalifina (derivado del metabolismo del ácido nicotínico) y trigloquina (derivado no aromático de tirosina) todos los glucósidos cianogénicos se convierten a uno de los seis grupos listados en la tabla 2 (Zagrobelyny y *col.* 2008; Wink, 2010).

Tabla 2. Glucósidos cianogénicos y sus precursores

Precursor	Estructura básica	Derivados (ejemplos)
L-valina 	Linamarina 	Linustatina
L-isoleucina 	Lotaustralina Epilotaustralina 	Neolinustatina
L-leucina 	Heterodendrina Epiheterodendrina 	Proacacipetalina Cardiospermina Proacaciberina
2-(2'-ciclopentenil)-glicina 	Deldaclina Tetrafillina A 	Taraktofilina Taraktofilin-6'-ramnosido Ginocardina
L-fenilalanina 	Prunasina Sambunigrina 	Amigdalina Holocallina Prunasin-6'-malonato Vicianina
L-tirosina 	Durrina Taxifillina 	Proteacina Durrina-6'-glucósido Nandinina

Fuente: Wink, 2010.

Los aminoácidos son convertidos en aglicona (α -hidroxinitrilo), gracias a una enzima citocromo P₄₅₀, la aglicona es glicosilada gracias a una glicosiltransferasa. En la figura 5a se muestra la biosíntesis de los glucósidos cianogénicos (Zagrobelyny y *col.* 2008; Wink, 2010).

En la célula los glucósidos cianogénicos están acumulados en vacuolas y están, así, espacialmente separados de sus enzimas hidrolíticas, ubicadas en apoplasto o en cloroplastos. Cuando las células son agredidas pierden su integridad, entonces las enzimas catabólicas β -glucosidasas se mezclan con sus sustratos y la cianogénesis *postmortem* es iniciada. Los glucósidos cianogénicos son escindidos por β -glucosidasas produciendo un α -hidroxinitrilo o cianohidrina y HCN (Figura 5b). El α -hidroxinitrilo resultante es inestable y se disocia para producir un compuesto carbonil, reacción acelerada por una hidroxinitril liasa (Zagrobelyny y *col.* 2008; Wink, 2010).

Casi todas las plantas usadas para la nutrición humana contienen glucósidos cianogénicos y, así, casi todas nuestras comidas contienen cianuro que surge de glucósidos cianogénicos durante la preparación del alimento. Sin embargo, la concentración del cianuro es usualmente pequeña, a menudo en el rango de partes por billón (ppb). El cianuro ciertamente es tóxico pero por baja concentración en nuestros alimentos no causan problemas serios, esto debido al eficiente sistema de detoxificación. En mamíferos, el cianuro es detoxificado en el hígado por la enzima rodanasa que cataliza la conversión del cianuro para producir tiocianato, algunas veces llamado rodanida, el cual es excretado en orina (Figura 5c) (Wink, 2010).

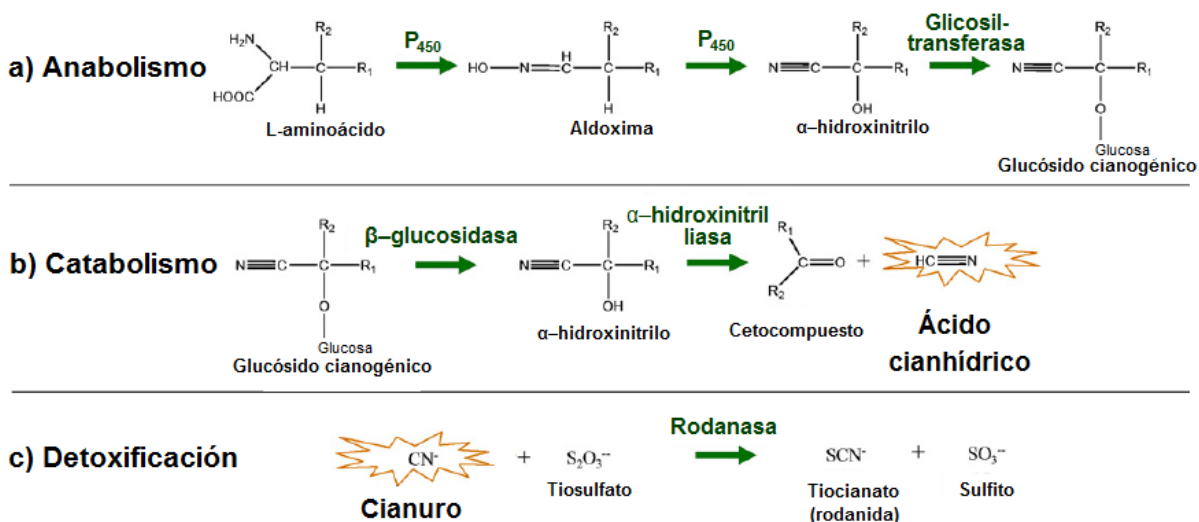


Figura 5. Glucósidos cianogénicos: a) anabolismo, b) catabolismo y c) detoxificación en mamíferos

Fuente: Zagrobelyny y *col.* 2008

La aguda toxicidad del HCN es una consecuencia de su afinidad por diferentes metales, tales como hierro o cobre y poder formar ciano-complejos, por lo que el ácido cianhídrico es un efectivo inhibidor de muchas metaloenzimas, especialmente la citocromo oxidasa, enzima terminal de la respiración celular, aunque también muchos otros procesos pueden ser afectados. Fisiológicamente, el envenenamiento con HCN resulta en anoxia histotóxica con manifestaciones iniciales de hiperpnea, seguida de disnea y crisis convulsivas. La dosis letal de cianuro para humanos es considerada alrededor de 1mg por Kg de peso (Belmar y Nava, 2000; Majark, 2001; García, 2004; Wink 2010).

4.2.1.4 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides son compuestos esenciales en la fisiología de la planta, contribuyen en la morfología de la planta (pigmentación), están involucrados en el crecimiento y reproducción, y además proveen a la planta resistencia contra patógenos y depredadores (Bravo, 1998). Químicamente se trata de compuestos que se caracterizan por tener en su estructura un anillo aromático con uno o más hidroxilos que son capaces de unir y precipitar proteínas y otras macromoléculas en soluciones acuosas. Es un grupo heterogéneo con más de 10,000 compuestos, dentro de los que se encuentran los flavonoides, isoflavonoides, cumestanos, lignanos y estilbenos (fenilpropanoides de doble simetría), estilpironas y cumarinas, lactonas del ácido resorcílico, lignina y taninos (Salminen y Karonen, 2011; García y col. 2014).

La principal ruta de la formación de estos compuestos emplea a L-fenilalanina y en menor medida a L-tirosina; las reacciones subsecuentes originan al ácido cumarínico y al 4-cumaronil CoA (producto central de la ruta fenilpropanoide) que da lugar a un gran número de diferentes productos naturales, tales como flavonoides, lignanos, cumarinas taninos, ésteres de ácido hidroxicinámico y amidas, así como también monómeros de lignanos (Drago, 2007; Wink, 2010). Los fenilpropanoides simples y los flavonoides tienen una amplia actividad antioxidante, también actúan como agentes quelantes de iones de hierro y cobre, así como de radicales como el radical

hidroxilo, y pueden reaccionar con moléculas como el ácido hipocloroso o nitroso para producir compuestos con menor capacidad oxidativa (Sepulveda-Jiménez y *col.* 2004).

Taninos. El término tanino deriva de la palabra inglesa “tanning” (curtido), originalmente usado para describir la sustancia de los extractos vegetales usados para curtir cueros. Químicamente son moléculas altamente hidroxiladas que tienen la capacidad de formar complejos insolubles con carbohidratos, proteínas y otros polímeros del alimento. Ésta función de los taninos es responsable de la astringencia en plantas ricas en taninos, debido a precipitación de proteínas salivares (Bravo, 1998; Belmar y Nava, 2000).

Estructuralmente, los taninos se pueden dividir en dos principales grupos: taninos condensados (o proantocianidinas), que son de origen flavonoide y taninos hidrolizables, que son definidos como ésteres de ácido gálico con una fracción polioliol, principalmente β -D-glucosa (Wink, 2010). Un tercer grupo de taninos son los florotaninos, encontrados exclusivamente en organismos marinos como las algas pardas, siendo estructuralmente quizás el grupo más simple de los taninos. Los taninos condensados son más frecuentemente producidos por plantas dicotiledóneas (Salminen y Karonen, 2011).

Los taninos condensados no son susceptibles a hidrólisis pero pueden ser degradados oxidativamente en ácidos fuertes para producir antocianidinas (Belmar y Nava, 2000). Son oligómeros solubles o polímeros insolubles de dos o más flavan-3-ol (usualmente catequina o epicatequina). Las unidades flavan-3-ol se polimerizan mediante enlaces Carbono-Carbono en las posiciones 4 del heterociclo con el carbono en la posición 6 u 8 de la unidad adyacente. Dentro de los taninos condensados hay diferentes subtipos que difieren en su estereoquímica y en el patrón de hidroxilación del grupo flavonoide. En la figura 6 se muestran las estructuras de los monómeros comunes (a-f) y los poco frecuentes (g-l) que forman a los taninos condensados, y un ejemplo de un tanino condensado polimérico (m). Los

taninos condensados se acumulan en vacuolas, a menudo en las capas epidérmica o subepidérmica de hojas y frutos. (Bravo, 1998; Isaza, 2007; Barbehenn y Constabel, 2011; Salminen y Karonen, 2011).

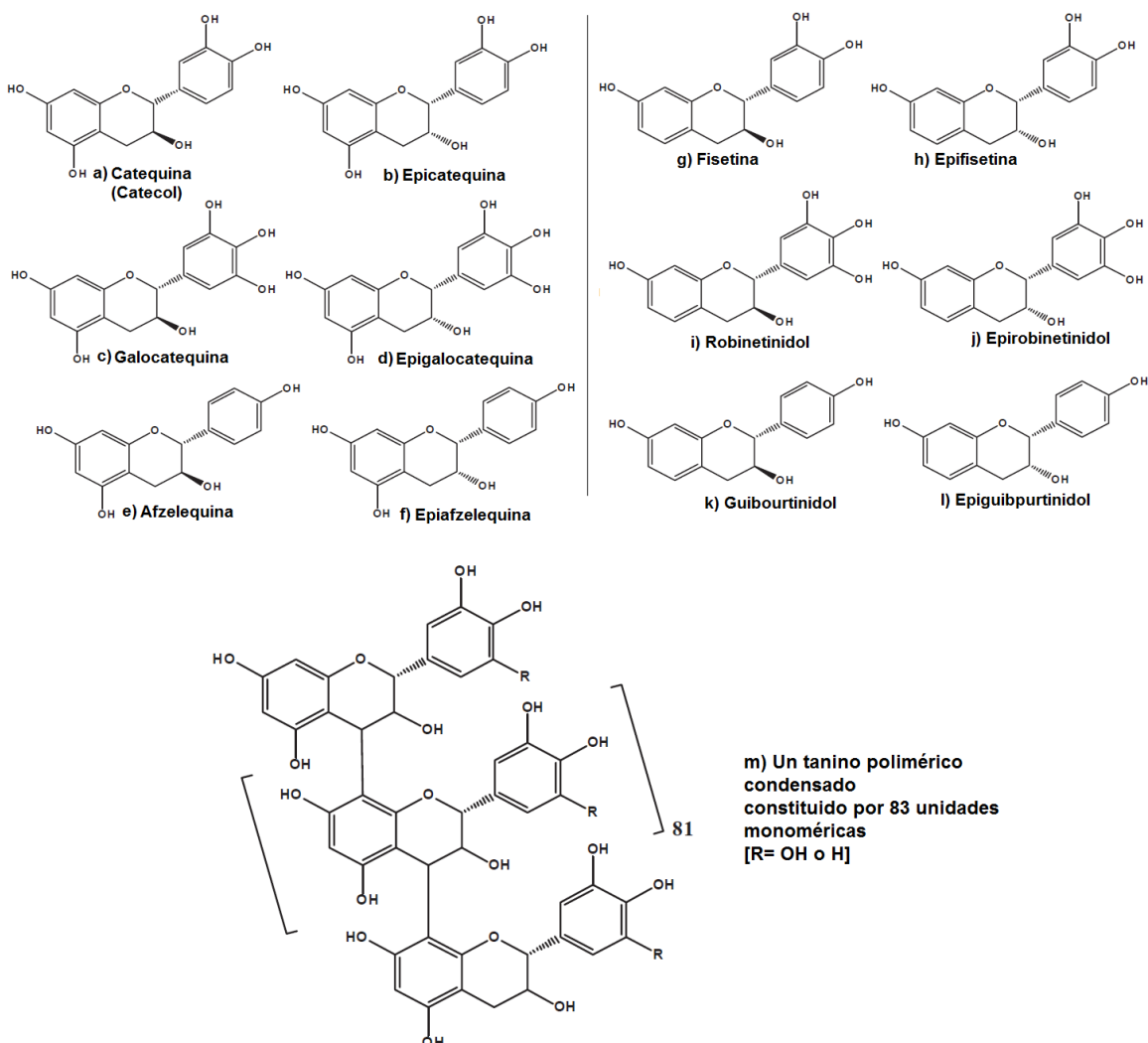


Figura 6. Taninos condensados

Fuente Salminen y Karonen (2011).

Por otra parte los taninos hidrolizables son fácilmente transformados por ácidos o enzimas. Derivan su parte fenólica de la vía del ácido shiquímico que se transforma en ácido gálico el precursor de este grupo. Los taninos hidrolizables pueden ser subdivididos en tres clases; derivados del ácido gálico simple, gallotaninos y elagitaninos. Los derivados de ácido gálico simple contienen cinco o menos grupos

galoil y son comúnmente esterificados con glucosa o ácido quínico. Los gallotaninos se caracterizan por tener uno o más grupos digaloil. Los elagitaninos se caracterizan por producir ácido eláxico tras la hidrólisis del grupo hexahidroxidifenico (HHDP). En la figura 7 se presenta la estructura química de un derivado de ácido gálico simple (a), un gallotanino (b), y un elagitanino (Belmar y Nava, 2000; Isaza, 2007; Salminen y Karonen, 2011).

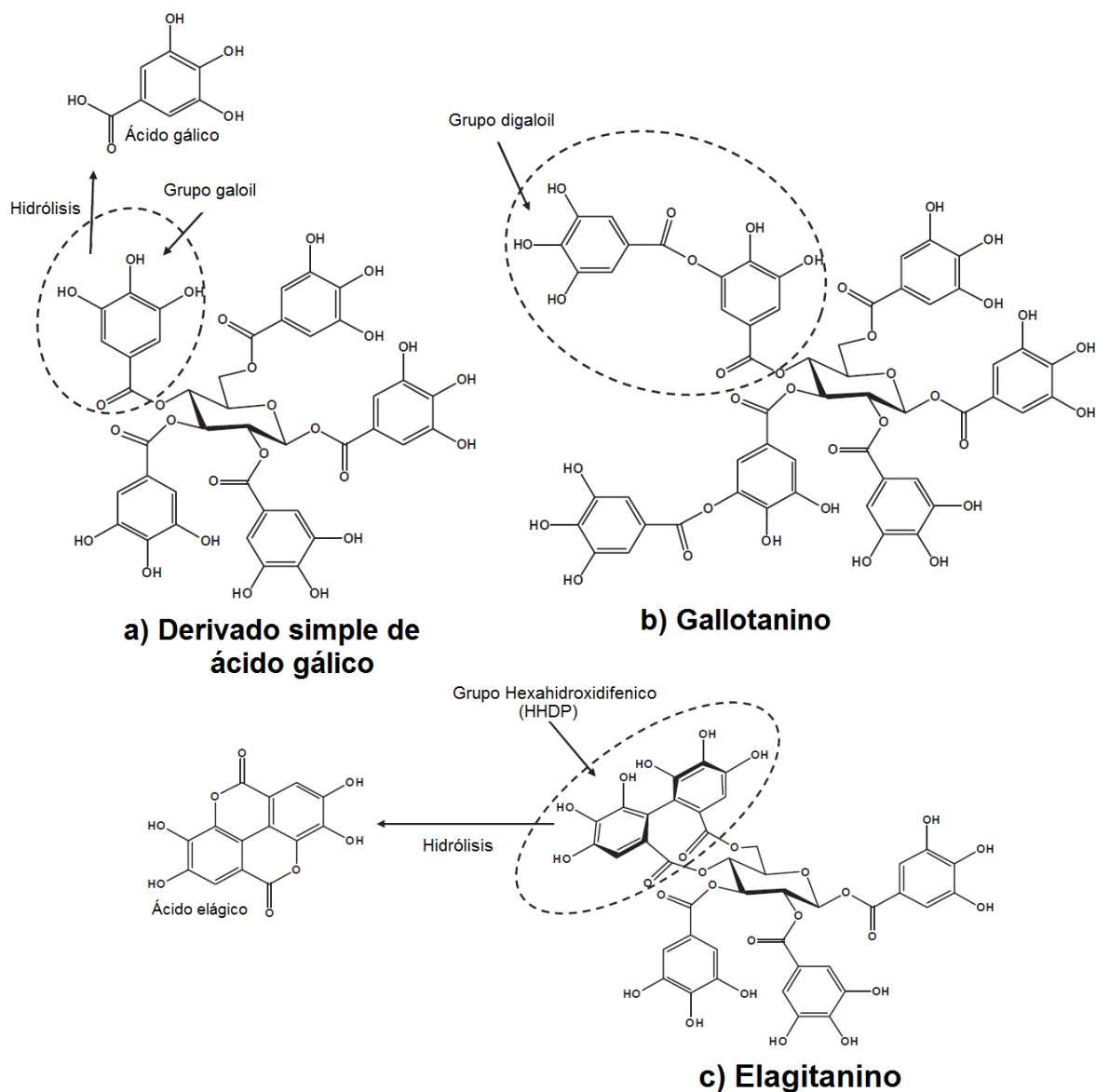


Figura 7. Taninos hidrolizables

Fuente Salminen y Karonen (2011).

4.2.2 Factores antinutricionales de naturaleza proteica

La defensa de las plantas está dividida en defensa constructiva o preexistente y defensa inducible, la primera está expresada como característica normal del desarrollo de la planta, mientras que la segunda se activa al contacto con un organismo patógeno o plaga. Existe un gran número de proteínas que han sido descritas como mecanismos de defensa de las plantas. Las proteínas protectoras pueden ser divididas en dos grandes grupos basados en sus patrones de expresión: el primero es el constitutivo y el segundo es un sistema inducible, aunque hay una considerable sobreposición entre ellas (Blanco-Labra y Aguirre, 2002).

En el grupo de las proteínas constitutivas o tejido-específicas su expresión no está relacionada a la infección o daño, y además pueden estar restringidas a órganos, tejidos o tipos de células específicas. Éstas particularmente se encuentran diseminadas en semillas y otros tejidos de almacenamiento donde su presencia podría cumplir diferentes funciones, tales como, fuente de aminoácidos, funciones de defensa y crecimiento, así como también en la germinación y en diferentes etapas del desarrollo de las plantas. Un ejemplo de proteínas constitutivas son las lectinas, mientras que los inhibidores de enzimas hidrolíticas, principalmente de proteasas y de amilasas, son proteínas protectoras que además de ser constitutivas tejido específicas, se pueden clasificar también como proteínas inducibles (Blanco-Labra y Aguirre, 2002; de Souza y *col.* 2009).

4.2.2.1 Lectinas

En 1919 James B. Summer cristalizó la Concavalina A, una proteína aislada de semillas de la leguminosa Canavalina, pero fue hasta 1936 cuando Summer y Howell reportaron que la Concavalina A aglutinaba células como eritrocitos, levaduras y también precipitaba soluciones de glicógeno, observando que la hemaglutinación era inhibida por la sacarosa, introduciendo el término lectina, del latín “legere” que significa escoger. Las lectinas son un grupo de proteínas o glicoproteínas de origen no inmune que poseen al menos un dominio no catalítico que se une a monosacáridos u oligosacáridos específica y reversiblemente, además también

precipitan algunos polisacáridos y glicoproteínas de manera específica. Las lectinas pueden reconocer hasta dos de diez carbohidratos diferentes de manera específica, tales como D-glucosa, D-manosa, D-fucosa, D-xilosa, D-galactosa, D-glucosamina, D-galactosamina, N-acetil D-glucosamina, N-acetil galactosamina y el ácido acético neuramínico (Van Driessche y col. 2000; De Hoff y col. 2009; Torres, 2010; Vázquez-Luna y col. 2012).

Las lectinas son encontradas en células, membranas y secretomas de organismos de todos los reinos de la naturaleza. Algunas lectinas presentes en plantas y frutas pueden aglutinar eritrocitos de diferentes grupos sanguíneos, por lo que también se les conoce como fito-hemaglutininas, estas se encuentran en diversas plantas comestibles, particularmente en semillas y tubérculos, así como en cereales y en hojas, cáscara y pulpas de frutas (De Hoff y col. 2009; Vázquez-Luna y col. 2012).

Las fitohemaglutininas de la familia de las leguminosas han sido las más estudiadas, ya que las semillas de la mayor parte de las leguminosas son ricas en lectinas, representando un grupo de proteínas muy conservadas y homólogas. Las lectinas constituyen entre el 2 al 10% del total de las proteínas y se encuentran en mayor concentración en las semillas y tejidos de almacenamiento, principalmente en los cuerpos proteicos de las células de los cotiledones y en menor cantidad en hojas, raíces y tallos (De Hoff y col. 2009; Van Driessche y col. 2000; Torres, 2010).

Las lectinas vegetales son sintetizadas como propéptidos con una secuencia señal. Antes de su introducción en el lumen del retículo endoplásmico rugoso y su retención dentro del aparato de Golgi, varias etapas del proceso se llevan a cabo, incluyendo la escisión del péptido señal y la adición de oligosacáridos a la cadena polipeptídica a residuos específicos de asparagina. Se cree que la glicosilación sirve para mediar el destino u objetivo final de la lectina. La mayoría de las lectinas de leguminosas contienen un N-glicano, pero algunas, como la Concavalina A no contiene ningún carbohidrato asociado covalentemente (De Hoff y col. 2009; Vázquez-Luna y col. 2012).

Las lectinas de leguminosas exhiben un patrón de plegamiento similar, muestran una conservación estructural tridimensional, consisten de 2 a 4 subunidades de entre 25-30 kDa. Cada una de las subunidades contiene un sitio de unión para iones metálicos Ca^{2+} Mn^{2+} y Mg^{2+} . Una subunidad contiene aproximadamente 250 aminoácidos y presenta una gran homología con las otras subunidades. Está constituida por hojas β antiparalelas conectadas entre sí mediante α -hélices, lo que genera una estructura aplanada en forma de domo, cuatro hélices localizados en la parte superior del monómero forman el sitio de reconocimiento a carbohidratos. En la figura 8a se muestra una lectina con estructura homotetramérica de la leguminosa *Lotus tetragonolobus*, un ejemplo de una lectina altamente conservada, el sitio inusual de unión al carbohidrato (distal del cofactor) es potencialmente influenciado por el arreglo tetramérico de los monómeros (De Hoff y col. 2009; Torres, 2010).

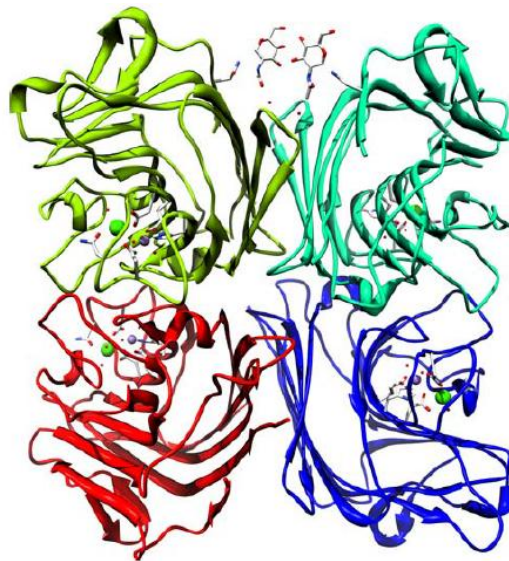


Figura 8. Lectina de la leguminosa *Lotus tetragonolobus*

Fuente: De Hoff y col. 2009

Las lectinas no desempeñan solo una función fisiológica, ya que dentro de la misma planta pueden cumplir diferentes funciones de acuerdo al tejido en que se encuentren; en la semilla como proteína de reserva, en la raíz parecen estar involucradas en la nodulación simbiótica con bacterias pertenecientes al género *Rhizobium*, en tallo y hojas pueden inmovilizar bacterias patógenas y de ésta manera

impedir su diseminación, además de formar parte del mecanismo de resistencia de las plantas contra hongos, insectos y eventualmente contra roedores (Van Driessche y col. 2000).

El efecto *in vitro* de las lectinas consiste en combinarse con las glicoproteínas de las membranas de los eritrocitos las cuales aglutinan, mientras que su acción *in vivo* radica en su alta especificidad para reconocer carbohidratos; su principal efecto es que se adhieren a los carbohidratos sobre la superficie del intestino delgado y causan daños en la pared intestinal, afectando la absorción y transporte de nutrimentos. La unión de las lectinas a la mucosa intestinal produce un cambio en la actividad de las enzimas digestivas, una hipersecreción de proteína endógena debido a la descamación de células dañadas, un aumento en la producción de mucinas y una pérdida de proteínas del plasma en el lumen intestinal; además, existe la posibilidad que algunas bacterias puedan encontrar una ruta de ingreso al sistema circulatorio debido al daño infligido en la mucosa intestinal (Elizalde y col. 2009).

La orientación de las líneas antiparalelas de las hojas β les proporcionan una estructura rígida y fuerte que puede explicar la extrema resistencia de las lectinas de las leguminosas al ataque proteolítico enzimático por lo que son resistentes a la digestión por enzimas de los mamíferos y sobreviven al paso a través del tracto digestivo. Sin embargo debido a su naturaleza proteica, las lectinas son inactivadas bajo condiciones de calor debido a la desnaturalización irreversible, ya que son termo-lábiles (Torres, 2010).

Algunas aplicaciones comunes y usos productivos de las lectinas por su unión a carbohidratos específicos han sido la separación de células por medio de aglutinación selectiva, identificación de serotipos sanguíneos, preparación de la médula ósea y tipos celulares de tejido mamífero para trasplante, identificación de células madre *in vitro* y estimulación mitógena (Van Driessche y col. 2000; De Hoff y col. 2009).

4.2.2.2 Inhibidores de proteasas

Los inhibidores de proteasas son compuestos termo-lábiles de naturaleza proteica que alteran la digestión de las proteínas, inhibiendo la acción de las enzimas digestivas que hidrolizan las proteínas de la dieta. En las plantas se concentran principalmente en semillas, tubérculos, raíces y hojas. La mayoría de los inhibidores son específicos para serin endopeptidasas, como la tripsina, quimotripsina y elastasa, y otras enzimas con especificidad similar. El papel de los inhibidores es la regulación de actividades proteolíticas no deseadas, además de su función asociada a mecanismos de defensa contra la infección por patógenos. Los inhibidores de proteasas encontrados en las plantas contienen altos porcentajes de cisteína formando puentes disulfuro (Gómez y *col.* 1998; Blanco-Labra y Aguirre, 2002; Alonso y *col.* 2008; Elizalde y *col.* 2009).

Su mecanismo de acción es el mecanismo estándar, es decir, la asociación enzima-inhibidor es llevada a cabo a través de la interacción del sitio reactivo del inhibidor con el sitio activo de la enzima, similar a la del complejo enzima-sustrato. Se forma un complejo proteasa-inhibidor no covalente y estable, en el cual no ocurren cambios conformacionales en la molécula del inhibidor (Blanco-Labra y Aguirre, 2002; Alonso y *col.* 2008).

Existen inhibidores formados por una sola unidad inhibitoria, capaces de actuar frente a una o más proteasas gracias a la presencia de más de un dominio en su estructura. Estos compuestos pueden inhibir simultánea o independientemente, o no, a una misma o distintas enzimas, a través de diferentes sitios reactivos. Los inhibidores multicabezas, generalmente multidominios, pueden ser el resultado de asociaciones no covalentes de varias cadenas polipeptídicas, cada una con un sitio reactivo, capaz de inhibir la misma enzima o enzimas diferentes de una misma clase mecanística. Un ejemplo son los inhibidores de la familia Bowman-Birk (Figura 9), aislados de semillas de plantas de leguminosas, que consisten en dos secuencias homólogas unidas por puentes disulfuro, cada una con un sitio reactivo (Alonso y *col.* 2008).

Los inhibidores de proteasas difieren en términos de masa, contenido de cisteínas y número de sitios activos. Los inhibidores de proteasas estudiados se han clasificado en familias de acuerdo a sus características como se muestra en la tabla 3 (Blanco-Labra y Aguirre, 2002; de Souza y *col.* 2009).

Tabla 3. Familias de los inhibidores de proteasas

Familia	Monómero		Enzimas inhibidas	Distribución
	kDa	Cisteínas		
Bowman-Birk	8-9(14)	14(18)	Tripsina Quimotripsina Elastasa	Leguminosas Gramíneas
Kunitz	21-22	4	Tripsina Quimotripsina Subtilisina Kalikreina Amilasa	Leguminosas Gramíneas Aráceas Alismatáceas
Papa I	8-9	0-2	Quimotripsina Tripsina Subtilisina	Solanáceas Gramíneas Leguminosas Poligonáceas Cucurbitáceas
Papa II	6(12)	8	Tripsina Quimotripsina	Solanáceas
Cucúrbitas	3	6	Tripsina Factor Hageman	Cucurbitáceas
Superfamilia cereales	12-13	10	Amilasa Tripsina Factor Hageman	Gramíneas Crucíferas Euforbiáceas Lecitidáceas Leguminosas
Ragi AI2/cebada arroz (LTP)	12-13	7-8	Amilasa ¿Proteasa?	Gramíneas
Carboxi-peptidasa	4	6	Carboxipeptidasa	Solanáceas
Tipo Cistatína	12	0	Cisteín proteasa	Gramíneas Animales

Fuente: Blanco-Labra y Aguirre. 2002.

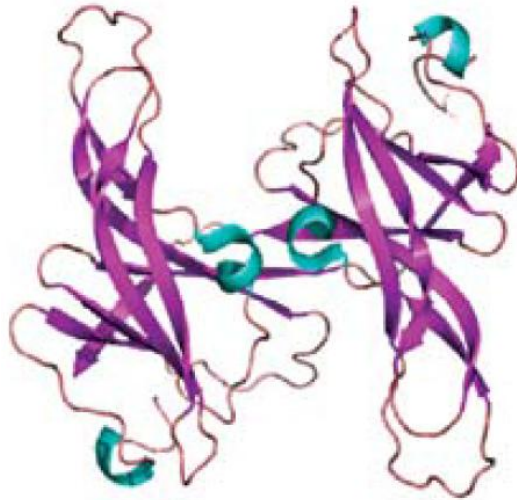


Figura 9. Inhibidor de proteasas de la familia Bowman-Birk

Fuente: Alonso y col. 2008

El efecto antinutricional es debido a un mecanismo de retroalimentación negativo, que se activa ante la presencia de proteínas de la dieta en el estómago, y la simultánea inactivación de proteasas, con lo que se provoca la liberación de la colecistoquinina (CCK), una hormona de la mucosa intestinal que estimula a las células acinares del páncreas para liberar más tripsina y otras enzimas como quimotripsina, elastasa y amilasa. Así, además de la subutilización de la proteína dietética, el resultado neto es la pérdida de proteína endógena rica en aminoácidos azufrados y la consecuente depresión del crecimiento (Belmar y Nava, 2000). En biotecnología se han utilizado para obtener variedades de plantas más resistentes a las plagas y enfermedades (Alonso y col. 2008).

4.2.2.3 Hemolisinas

La actividad hemolítica puede ser atribuida a dos compuestos: las saponinas y las hemolisinas. Las saponinas tienen la propiedad de producir lisis como consecuencia de la capacidad que poseen para alterar la permeabilidad de las membranas celulares y producir la ruptura de los glóbulos rojos. Mientras que las hemolisinas, proteínas de bajo peso molecular, producen lisis por la capacidad que poseen para formar pequeñas lesiones de la membrana celular de los eritrocitos causando su destrucción (Hernández y Fariñas, 2005).

4.2.3 Otros factores antinutricionales

Los factores antigénicos son macromoléculas que luego de ser absorbidas son reconocidas por el sistema inmunológico como extrañas produciendo una respuesta de tipo humoral, pudiendo ser los responsables de alergias alimenticias, junto con una reducción de la digestibilidad aparente de la proteína, anomalías en el movimiento intestinal, disminución de la absorción de nutrientes, predisposición a diarreas y ocasionalmente muerte. Estos factores se caracterizan por su resistencia a la desnaturalización por procedimientos térmicos convencionales, y al ataque enzimático que tiene lugar en el sistema digestivo (Elizalde y col. 2009).

Los α -galactosidos u oligosacáridos pertenecen a la familia de la rafinosa: rafinosa, estaquiosa, verbascosa y ajucosa, que se encuentran dentro del grupo de los oligosacáridos de galactosil sacarosa. Son compuestos de reserva presentes en cantidades variables en órganos vegetativos y en semillas de numerosas plantas, incluidas las leguminosas. El consumo de estos factores provoca flatulencia, diarrea, retortijones e incomodidad, debido a la acción de la microflora anaeróbica sobre los oligosacáridos. La falta de la enzima α -galactosidasa en los animales monogástricos (cerdos, aves, humanos) provoca que estos azúcares pasen indigeridos hacia el intestino grueso donde son degradados por la acción de las bacterias α -galactosidasas, la fermentación de estos compuestos resulta en la producción de gases como dióxido de carbono, hidrogeno, metano y otros. Sin embargo algunos estudios sugieren que los α -oligosacáridos en cantidades apropiadas son ingredientes funcionales, ya que poseen propiedades prebióticas; producen ácidos de cadena corta (AGCC) propionato y butirato, disminuyen el pH por lo que actúan como fibra dietética; disminuyen colesterol e índice glicémico, así como el riesgo de padecer cáncer de colon (Belmar y Nava, 2000; Goyoaga, 2005; Elizalde y col. 2009).

Los aminoácidos no proteicos tóxicos son compuestos tóxicos capaces de proteger a la planta contra predadores y enfermedades, e impartirle la habilidad de competir por recursos con otras plantas. En aminoácidos proteicos, el grupo amino está unido al

carbono alfa (α -C), en aminoácidos no proteicos el grupo amino puede estar unido al carbono beta (β -C), o al carbono gamma (γ -C) (Wink, 2010). La presencia de aminoácidos no proteicos tóxicos es una característica de las leguminosas. La mayoría de las veces estos compuestos presentan analogía estructural con aminoácidos indispensables o con sus derivados neurotransmisores presentes en el sistema nervioso central, provocando efectos adversos que van desde la reducción en la utilización de alimento y los nutrientes, hasta profundos desórdenes neurológicos e incluso la muerte (Belmar y Nava, 2000).

El ácido fítico constituye la principal forma de reserva de fosfato inorgánico y mio-inositol de la semilla. Con la activación de las fitasas preexistentes y la síntesis de fitasas de *novo*, puede hidrolizarse el mio-inositol hexaquisfosfato para obtener el fosfato inorgánico necesario para el crecimiento de la planta, y mio-inositol utilizado *in situ* para la síntesis de la pared celular (Goyoaga, 2005). El interés desde el punto de vista nutricional es su capacidad de formar complejos con minerales esenciales como Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, Mn^{2+} , Ca^{2+} y Mn^{2+} disminuyendo su absorción intestinal y su biodisponibilidad. Además también interacciona con residuos básicos de proteínas formando complejos proteína-fitato y proteína-fitatomineral, paralizando reacciones enzimáticas a nivel digestivo (Elizalde y *col.* 2009).

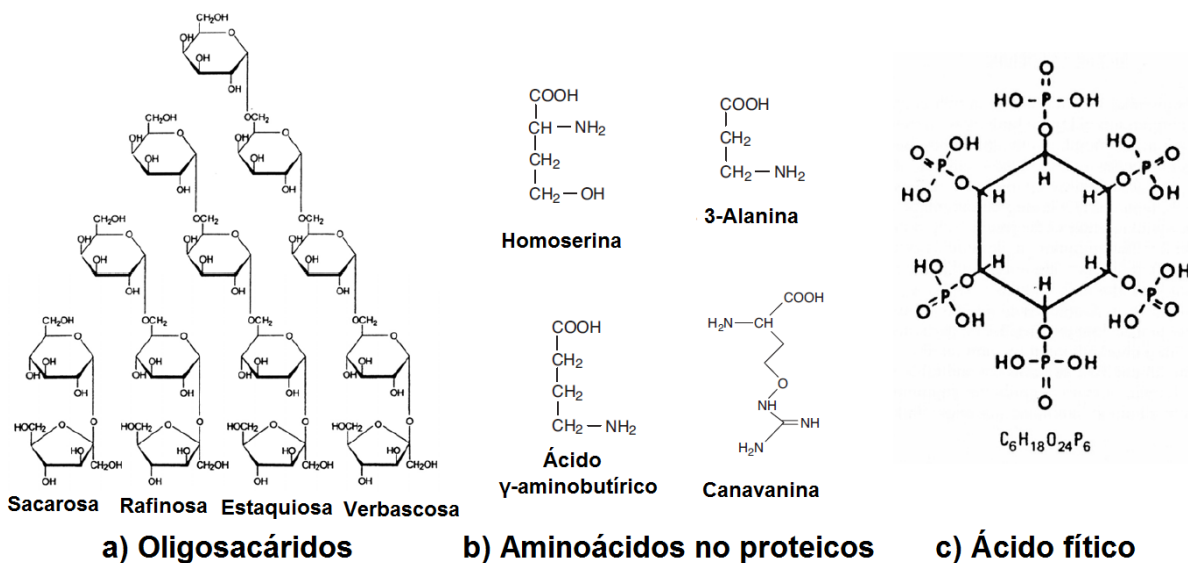


Figura 10. Otros factores antinutricionales

Fuente: a) y c) Goyoaga, 2005, b) Wink, 2010

4.3 *Prosopis laevigata*

El nombre de *Prosopis* viene del griego antiguo de la palabra "*Prosopis*", que significa "corteza que se utiliza para el curtido de pieles de ovejas". Este particular tipo de árbol se conoce en México como "mezquite", la palabra "mizquitl" viene del náhuatl lengua materna y también significa "corteza para curtido". *Prosopis* es un árbol leguminoso presente principalmente en regiones áridas y semi-áridas del mundo. En América se encuentra en dos importantes centros de desarrollo ubicados en América del Norte (México-Texas) y América del Sur (Argentina-Paraguay-Chile-Brasil), con 42 géneros distribuidos desde los Estados Unidos hasta la Patagonia (Carrillo-Parra, 2007; Andrade-Montemayor y col. 2011).

En México hay alrededor de 4 millones de hectáreas de *Prosopis spp* distribuidas principalmente en zonas áridas y semi-áridas del país, que incluye las siguientes especies: *P. glandulosa*, *P. juliflora*, *P. velutina*, *P. pubescens*, *P. reptans*, *P. articulata*, *P. tamaulipana*, *P. palmeri* y *P. laevigata*. Los mezquites constituyen parte importante de la flora nacional, alcanzando inclusive carácter predominante en ciertas regiones; han estado ligados con la vida del campesino mexicano desde tiempos remotos. *Prosopis laevigata* es el mezquite típico del centro de México, es especialmente importante en algunas localidades de Guerrero, Querétaro, Estado de México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Veracruz, Nuevo León, Aguascalientes, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco y Zacatecas. (Carrillo-Parra, 2007; Andrade y col. 2011; Rodríguez y col. 2014).

Tabla 4. Clasificación taxonómica del mezquite (*Prosopis laevigata*)

Clasificación taxonómica

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i> (Dicotiledóneas)
Subclase	<i>Rosidae</i>
Orden	<i>Fabales</i>
Familia	<i>Fabaceae</i>
Género	<i>Prosopis</i>
Especie	<i>laevigata</i>

Fuente: Rodríguez y col. 2014

La clasificación taxonómica de *Prosopis laevigata* es mostrada en la tabla 4. *Prosopis laevigata* es un árbol leñoso a veces hasta de 12 m de altura, aunque generalmente menor, tronco de hasta 1 m de diámetro, corteza gruesa color café-negruzco, copa más ancha que alta, ramas glabras o pilosas (armadas de espinas estipulares de 1-4 cm de largo), hojas bipinnadas (con 12 a 25 pares de folíolos oblongos o lineares, que miden de 5 a 10 mm de largo), flores dispuestas en espigas densas (5-10 cm de largo) de color amarillo-verdoso y raíces de hasta más de 50 m de profundidad y hasta 15 m en sus laterales. El fruto es una vaina que mide de 7-20 cm de largo por 8-15 mm de ancho de color paja o a veces rojizo violáceo, con forma alargada, recta o arqueada, plana o cilíndrica y en la madurez contiene de 12 a 20 semillas oblongas, comprimidas de 8 a 10 mm de largo, de color blanco-amarillento. En la figura 11 se muestran las características de *Prosopis laevigata* (Palacios, 2006; Reséndez y col. 2013; Rodríguez y col. 2014).

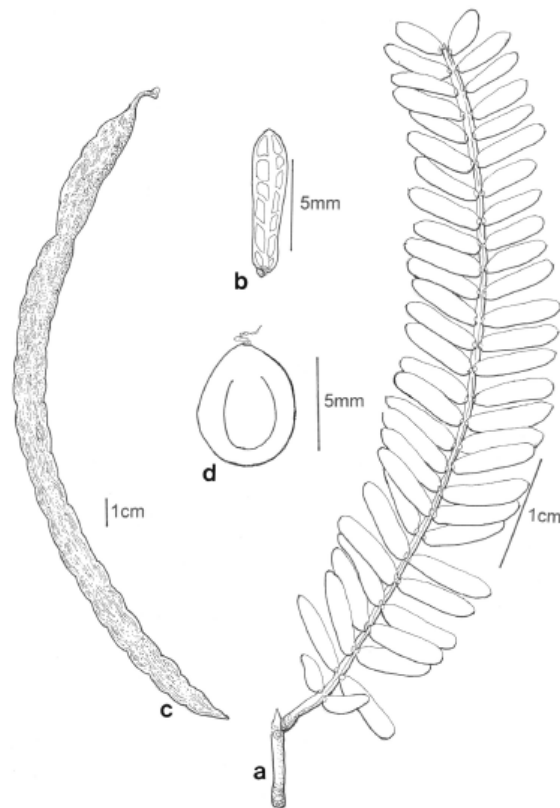


Figura 11. *Prosopis laevigata*, a) pinna, b) folíolo, c) fruto o legumbre, d) semilla

Fuente: Palacios, 2006.

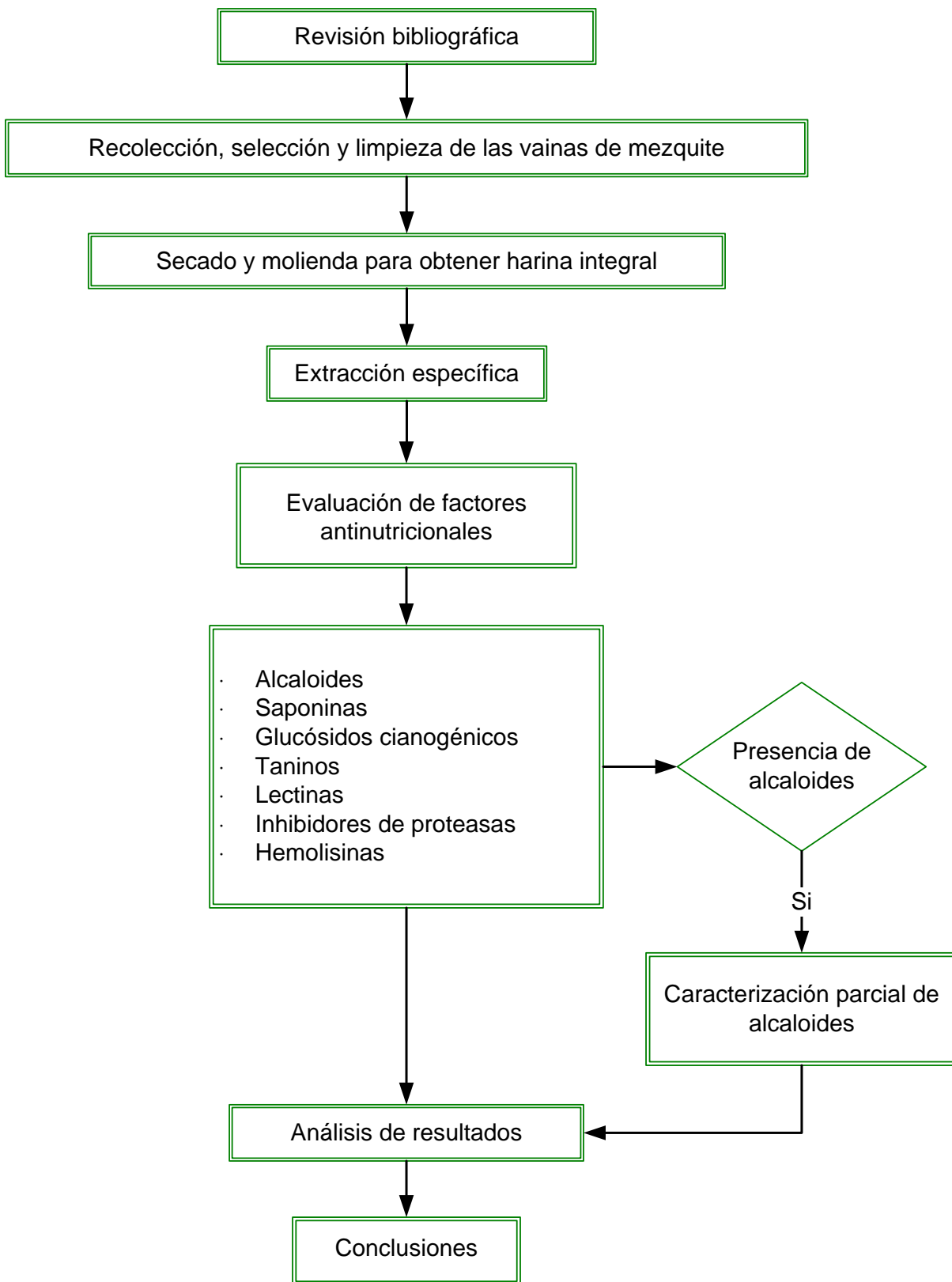
Entre los usos comunes se encuentran a) maderable, su madera es dura y resistente, se utiliza para fabricar muebles, mangos de herramientas, utensilios de cocina, juguetes, artesanías y como materiales de construcción de viviendas en zonas rurales, b) combustible, es utilizado como recurso leñoso o como carbón por excelencia en comunidades rurales de zonas áridas y semiáridas, c) forraje, utilizado como alimento para diversos tipos de ganado estabulado, porcino, caprino, y en menor medida a caballos, asnos y mulas, d) goma, producida por heridas de la corteza, la calidad de esta se ha comparado con goma arábica comercial (de *Acacia senegal*) utilizada principalmente como estabilizador de emulsión, protector de coloides y agente encapsulador de sabores en comida, cosmética e industrias farmacéuticas y petroquímicas, y e) otros usos; como alimento humano, las vainas se consumen en forma de harinas o de bebidas fermentadas, la corteza por su alto contenido de taninos ha sido utilizada en curtiduría y también es cocida utilizándola como planta medicinal (curar vómito, disentería, afecciones en los ojos y servir como purgante). Asimismo el mezquite es de gran importancia ecológica, ya que fija el nitrógeno atmosférico, mejora la fertilidad del suelo, favorece el crecimiento de matorrales, actúa como planta nodriza de numerosas especies vegetales y animales, proporciona alimento y refugio a la fauna silvestre, además actúa como indicador de profundidad del manto freático y controla la erosión (Carrillo-Parra, 2007; Valenzuela-Núñez y col. 2013; Rodríguez y col. 2014).

Barba y col. (2006) argumentan que el uso industrial del mezquite es prácticamente inexistente, ya que crece en las regiones donde el uso de la vegetación natural está restringido; la explotación y el conocimiento de la germinación, la siembra, el cultivo, la protección, la floración, la maduración y la cosecha están limitados. Por otro lado González y col. (2008) consideran los frutos de *Prosopis spp.* como importantes recursos alimenticios para humanos y animales en regiones áridas y semiáridas del mundo, con un contenido de proteínas entre 11 y 17 g/100 g de materia seca teniendo como aminoácidos limitantes tirosina y metionina/cistina y de 13 a 34 g/100 g de materia seca de carbohidratos, siendo el principal azúcar la sacarosa.

4.4 Harina de mezquite

Tradicionalmente, las vainas de mezquite se utilizan para preparar harina, que se utiliza para hacer productos horneados, o se fermenta para producir bebidas alcohólicas. El contenido de aminoácidos en harina de mezquite muestra un buen equilibrio como el recomendado para adultos y niños por día por la FAO, los aminoácidos esenciales, tales como la histidina, treonina, triptófano, valina y fenilalanina están presentes en cantidades suficientes (Barba y *col.* 2006).

5 DIAGRAMA DE TRABAJO



6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

Vainas de mezquite (*Prosopis laevigata*) en buen estado libres de plagas, obtenidas en el Valle de Tehuacán, Puebla.

6.2 Material y equipo de laboratorio

Material de laboratorio: material vidrio y reactivos de grado analítico los necesarios para cada determinación.

Tabla 5. Equipos y sus características específicas, utilizados en la determinación de factores antinutricionales de harina integral de mezquite (*Prosopis laevigata*).

Equipo	Características	
	Marca	Modelo
Balanza analítica	Ohaus	PA313
Estufa de incubación	Aparatos de laboratorio BG	E-41
Destilador Kjeldahl	Prendo	DEK 01
Baño María	AquaBath	V-120
Centrifuga refrigerada	IEC Centra	CL3R
Espectrofotómetro	PerkinElmer	Lambda 25
Termostato	Cole-Parmer	Polystat
Centrifuga	Solbat	J-40
Centrifuga	Eppendorf	5804
Refrigerador	Torrey	R16
Parrilla de agitación	Barnstead International	SP131325
Vortex	Vortexmixer	Finevortex

6.3 Métodos

Tabla 6. Métodos y referencias para la determinación de factores antinutricionales de harina integral de mezquite (*Prosopis laevigata*).

Determinación	Técnica	Referencia
Alcaloides	Gravimétrica	Domínguez (1973)
	Cromatografía en capa delgada	Zamora-Natera y col. (2008)
Saponinas	Poder tensioactivo	Domínguez (1973)
Glucósidos cianogénicos	Colorimétrica	García y col. (2004)
		Giannuzzi y col. (2012)
Taninos	Colorimétrica	Galindo y col. (1989)
Lectinas	Hemaglutinación	Alegría-Ríos y col. (2007)
		González y col. (2008)
Inhibidores de proteasas	Colorimétrica	Goyoaga (2005)
Hemolisinas	Hemólisis	Toraño y col. (1999)

7 METODOLOGÍA

7.1 Obtención de harina integral de *Prosopis laevigata*

Se recolectaron vainas de mezquite en el municipio de Ajalpan, Puebla (región de Tehuacán), éstas se encuentran en el suelo bajo los mezquiales. Posteriormente en el laboratorio se seleccionaron descartando vainas con signos evidentes de plaga o de hongos, las vainas en buen estado se secaron en estufa a 60°C durante 1 hora. Obtenidas las vainas y semillas secas se molieron hasta la obtención de tamaño de partícula deseado, se pasó por el tamiz con número de mesh 80 obteniendo harina integral de mezquite, ésta se almacenó en un recipiente limpio y seco con tapón hermético.

Para evaluar los factores antinutricionales se utilizó harina integral de *Prosopis laevigata*. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado a partir del extracto específico en el laboratorio de Bromatología general de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

7.2. Metabolitos secundarios

7.2.1 Alcaloides.

Para la prueba presuntiva se pesaron 20 g de la harina integral de *Prosopis laevigata* y se le agregaron 100 mL de etanol al 95%, colocándose a reflujo sobre baño María durante 1 hora. Se dejó enfriar y se filtró en Buchner lavando con 4 volúmenes de 50 mL de etanol al 95%. El filtrado y las soluciones lavadoras se concentraron hasta 50 mL, éste concentrado se aforó a 100 mL con H₂O y se dividió en 2 porciones (A y B, para determinación de saponinas y alcaloides, respectivamente). Se evaporaron 50 mL de la Solución B en baño María y se extrajeron 2/5 del residuo con 8 mL de HCl al 1% (Solución C). Alícuotas de 0.5 mL de la solución C se ensayaron con los reactivos para alcaloides: Dragendorff, Mayer, Wagner, Sonneschein y Bertrand.

Para la prueba confirmatoria se agregó NaOH al 1% a 3 mL de la Solución C hasta llegar a pH 8 a 9 y se extrajo con un volumen igual de CHCl₃. La fase clorofórmica se extrajo nuevamente con un volumen igual de HCl al 1%. Se tomaron alícuotas

iguales del extracto ácido y se hicieron reaccionar con los reactivos para alcaloides: Dragendorff, Mayer, Wagner, Sonneschein y Bertrand.

7.2.2 Saponinas

El extracto empleado fue la solución A de la prueba preliminar de alcaloides. Para el ensayo se tomó 1 mL de la Solución A y se disolvió en 9 mL de agua. Ésta mezcla se agitó vigorosamente (vortex) durante 5 minutos. Sí no se formó espuma con apariencia de panal de abeja estable por unos 30 minutos la prueba se consideró negativa.

7.2.3 Glucósidos cianogénicos

Como prueba presuntiva se efectuó la reacción de Guignard: Se mezcló 1 g de harina integral de *Prosopis laevigata* con CHCl_3 en un tubo con tapón de baquelita (16 x 150 mm), colocando en la parte superior un papel filtro seco previamente embebido con el reactivo de Guignard, se cerró el tubo herméticamente y se incubó a 35°C durante 3 horas. Se consideró positiva sí apareció una coloración roja y negativa si no hubo reacción al menos durante 24 horas.

Para confirmar la presencia de ácido cianhídrico (HCN) se utilizó la técnica del azul de Prusia modificada: primero se realizó una destilación simple en el equipo de destilación Kjeldahl, a la cual se le agregó ácido tartárico al 10%. El destilado se recogió sobre NaOH al 10%. Para poner de manifiesto la presencia de HCN se midió 1 mL del destilado y se agregaron 2 gotas de solución de fenoftaleína (medio básico rosa), posteriormente solución de H_2SO_4 0.1 N hasta virar el indicador a incoloro, a continuación se llevó a pH alcalino gota a gota con solución de carbonato de calcio al 20% y se agregaron 3 gotas de sulfato ferroso al 2%, dejándolo reposar durante 3 minutos. Finalmente se acidificó con HCl concentrado. Un color azul indicó HCN. El blanco de la muestra se hizo con sacarosa (reacción incolora), mientras que el testigo se realizó con NaCN dando la coloración azul característica de la reacción (formación de azul de Prusia).

7.2.4 Taninos

Se pesaron 10 g de harina integral de *Prosopis laevigata*, se agregaron 30 mL de éter de petróleo y 30 mL de una mezcla metanol-agua (9:1). La muestra se maceró y reposó hasta la obtención de dos capas, las cuales se aislaron en un embudo de separación. La capa del fondo fue la formada por metanol-agua, es decir, la fracción polar mientras que la capa no polar fue la conformada por el éter.

Se tomó la fracción polar y se repartió en cinco compartimentos de un platillo de pruebas de cerámica, al primer compartimento se le agregaron gotas de agua destilada como testigo, para los ensayos se agregó una gota de FeCl_3 en el segundo pocillo, dos en el tercero y así sucesivamente hasta llegar al quinto. La caracterización de fenoles se hizo de acuerdo a la coloración: a) ninguna reacción; no hay presencia de fenoles, b) coloración azul oscuro; fenoles o taninos pirogálicos (hidrolizables) y c) coloración verde oscuro; fenoles o taninos de tipo catecol (flavonoides o taninos condensados).

7.3 Factores antinutricionales de naturaleza proteica

7.3.1 Lectinas

Se pesaron 10 g de harina integral de *Prosopis laevigata*, ésta se desengrasó 2 veces con una solución de cloroformo-metanol (3:1) en agitador orbital durante 15 minutos. El solvente se evaporó a temperatura ambiente. La harina se pesó y se disolvió en agua desionizada en una relación de 1:4 posteriormente se mantuvo en agitación a 4°C por 12 horas continuas. Por último se centrifugó a 4,000 rpm durante 30 minutos, decantando el sobrenadante. En una placa de microtitulación se hizo una serie de diluciones en base 2 y se adicionó una suspensión de eritrocitos de sangre de carnero al 2%. Los resultados se expresan en número de unidades hemaglutinantes (UH), calculados a partir del inverso del título mayor que presentó aglutinación visible. El control negativo se realizó con solución salina fisiológica y eritrocitos de carnero al 2%.

7.3.2 Inhibidores de Proteasas

Se pesó 1 g de harina integral de *Prosopis laevigata* y se le agregaron 40 mL de HCL 0.05 M manteniéndose en agitación durante 1 hora a 4°C. El extracto se centrifugó a 3,000 G durante 10 minutos, se recogió el sobrenadante y se mantuvo en refrigeración hasta su valoración. Antes de comenzar la evaluación se llevaron a cabo pruebas con diferentes volúmenes del extracto y buffer Tris-HCl 0.005M pH 7.5 para obtener valores de absorbancia inferiores a 0.4.

Testigo de tripsina: En un tubo se agregaron 400 µL de buffer Tris-HCl 0.005M pH 7.5, termostatizado a 37°C y a continuación se le adicionaron 400 µL de solución de tripsina. A los 2 minutos se agregaron 1000 µL de la solución BTC (precalentada a 37°C) y se agitó manualmente, se dejó en reposo durante 10 minutos. Para detener la reacción se adicionaron 200 µL de ácido acético al 30% y se agitó manualmente. Por último se centrifugó la muestra a 3,000 G durante 4 minutos y se hizo la lectura de absorbancia en espectrofotómetro a una longitud de onda $\lambda=410$ nm.

Blanco de tripsina: En un tubo se agregaron 400 µL de buffer Tris-HCl 0.005 M pH 7.5, termostatizado a 37°C y a continuación se le adicionaron 400 µL de solución de tripsina. Al pasar un minuto se adicionaron 200 µL ácido acético al 30%, al siguiente minuto se adicionaron 1000 µL de la solución BTC (precalentada a 37°C) y se agitó manualmente. Finalmente se centrifugó la muestra a 3,000 G durante 4 minutos y se hizo la lectura de la absorbancia en espectrofotómetro a una longitud de onda $\lambda=410$ nm.

Valoración del extracto: En un tubo se agregaron 400 µL de una mezcla del extracto evaluado inicialmente y el buffer Tris-HCl 0.005 M pH 7.5 termostatizado a 37°C, en seguida se adicionaron 400 µL de solución de tripsina. Al pasar 2 minutos se agregaron 1000 µL de la solución BTC (precalentada a 37°C) y se agitó manualmente. Pasados 10 minutos se adicionaron 200 µL de ácido acético al 30% agitando manualmente. Por último se centrifugó a 3,000 G durante 4 minutos y se

hizo la lectura de la absorbancia en espectrofotómetro a un longitud de onda $\lambda=410$ nm.

La actividad del inhibidor de tripsina se expresó en términos de unidades de tripsina inhibida, de manera que una unidad de inhibidor de tripsina (UIT) es la cantidad de inhibidor que reduce 0.01 unidades de absorbancia, en relación con el control de la tripsina y en las condiciones anteriormente definidas, de manera que:

$$UIT = \frac{Abs\ control\ de\ tripsina - Abs\ de\ la\ muestra}{0.01}$$

7.3.3 Hemolisinas

Se pesaron 20 g de harina integral de *Prosopis laevigata* y se agregaron 50 mL de solución buffer Tris-salina 10mM pH 7.4, se agitó suave y constantemente durante 3 horas y se filtró. Con el filtrado se hicieron 10 diluciones seriadas del extracto. Por otra parte la muestra de sangre de carnero, se centrifugó a 2,500 rpm para separar el plasma del paquete globular. El paquete globular se resuspendió en solución salina fisiológica y se centrifugó a 2,500 rpm durante 3 minutos, se descartó el sobrenadante y se repitió la operación 2 veces. El paquete globular lavado se preparó al 2% p/v en solución salina fisiológica.

Obtenidas las diluciones y la solución de eritrocitos de carnero al 2% se hizo el ensayo. En una placa de microtitulación se colocaron: 150 μ L de cada dilución (pocillos 1-10) y 150 μ L de eritrocitos al 2%. El control positivo (pocillo 11) se hizo con 150 μ L de eritrocitos y 150 μ L de una solución de Cloruro de Amonio al 1.66%, mientras que el control negativo (pocillo 12) se preparó con 150 μ L de eritrocitos y 150 μ L de solución salina fisiológica. La placa de microtitulación se tapó y se incubó a 37°C durante 2 horas. Se observó la presencia de hemolisis.

7.4 Cromatografía en capa fina para la identificación parcial de alcaloides

Harina integral de *Prosopis laevigata* se desengrasó en equipo Soxhlet con hexano y se dejó evaporar el solvente. Posteriormente 0.5 g de harina desengrasada se homogeneizó con 5 mL de ácido tricloroacético al 5% durante 1 minuto a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 2,400 G durante 15 minutos y se decantó el sobrenadante, repitiendo la extracción dos veces. A los sobrenadantes se les agregaron 0.8 mL de NaOH 10M y se extrajeron con cloruro de metilo para obtener el extracto crudo de alcaloides. El extracto crudo se evaporó hasta sequedad a 25°C y el residuo se disolvió en 1 mL de metanol.

Previo al análisis se hicieron pruebas con diferentes sistemas de solventes (fase móvil) para observar la mejor separación y corrimiento de la muestra. Obtenido el sistema de solventes apto se tomaron alícuotas de 2 µL del extracto, colocándolas en placas de sílica gel 60F₂₆₄ dejándolas secar antes de introducir en una cámara cromatográfica que contenía el sistema diclorometano-metanol-agua (87:12:1). Se utilizaron diferentes reveladores para la identificación de alcaloides específicos; reactivo de Marquis, FeCl₃, HNO₃, reactivo de Frödhe, reactivo de Mandelin, reactivo alcohol-ácido y el revelador general yodoplatinato de potasio.

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

8.1 Metabolitos secundarios.

Como se puede observar en la tabla 7 no hay evidencia de la presencia de glucósidos cianogénicos ni la presencia de saponinas en harina integral de *Prosopis laevigata*. Referente a las saponinas el estudio de González y col. (2008) encontró la presencia de estos compuestos en las especies *P. juliflora*, *P. nigra*, *P. chilensis* y *P. alba*, sin embargo, los contenidos de saponinas en estas harinas se consideran bajos comparados con las exigencias del mercado que fijan como valor límite 0.05 g/100 g de materia seca para la quínoa (Forturbel, 2003).

Tabla 7. Evaluación de metabolitos secundarios de harina integral de mezquite (*Prosopis laevigata*).

Determinación	Resultado
Alcaloides	Preliminar positivo en 4 pruebas: Dragendorff, Mayer, Wagner y Bertrand Confirmatorio positivo para 3 pruebas: Dragendorff, Wagner y Bertrand
Glucósidos cianogénicos	Negativo
Saponinas	Negativo
Taninos	Presencia de taninos de tipo catecol (flavonoides o taninos condensados)

La principal propiedad utilizada de los alcaloides para su detección es que forman complejos insolubles con sales de metales pesados, como Hg y Bi en medio ácido (García, 2004). En este estudio para la determinación de alcaloides se utilizaron los reactivos de uso general: Dragendorff, Mayer, Wagner, Sonneschein y Bertrand, dando reacciones positivas en cuatro pruebas. De acuerdo a Lock de Ougaz (1994) se considera que hay presencia de alcaloides si da positivo en al menos cuatro reactivos. La presencia de alcaloides en harina integral de *Prosopis laevigata* concuerda con lo encontrado por López (1993) donde se encontraron alcaloides en semillas de esta leguminosa.

Con respecto a los taninos, estos se identifican como hidrolizables o condensados, de acuerdo a la coloración obtenida con el reactivo FeCl₃, en la determinación realizada en este trabajo, se encontró una coloración verde oscuro que según la técnica propuesta por Galindo y col. (1989) las tonalidades verdes corresponden a compuestos fenólicos de tipo catecol o condensados. Existen reportes de la presencia de taninos condensados en vainas de mezquite (*Prosopis laevigata*) presentados por Andrade-Montemayor y col. (2011). En los últimos años a este tipo de compuestos se le han atribuido propiedades benéficas tales como antimutagénicas, anticarcinogénicas y de protección frente a enfermedades vasculares y lesión hepática, el fundamento de estas propiedades es su actividad como moléculas antioxidantes y su capacidad para neutralizar radicales libres (Carmeán y Repetto, 2006). La estructura general de los taninos condensados (oligómeros y polímeros formados por unidades de flavonoles no hidrolizables) permite una multitud de patrones de sustitución, por lo que su actividad antioxidante va a depender tanto del tipo de flavonoide como del número de monómeros que conforman su estructura (Iglesias, 2009).

8.2 Factores antinutricionales de naturaleza proteica

Como se puede observar en la tabla 8 no se encontró la presencia de hemolisinas ni lectinas (hemaglutininas) en harina integral de *Prosopis laevigata*. En 2008 González y col. encontraron valores considerados bajos (menores a 1.0 UH) en harina de *P. juliflora*, *P. nigra* y *P. alba*, mientras que *P. chilensis* no mostró actividad hemaglutinante, por otro lado Alegría-Ríos y col. (2007) reportaron la presencia de lectinas en vainas de *Prosopis laevigata*. En el presente estudio se evaluó la actividad hemaglutinante con eritrocitos de carnero al 2%, sin embargo bajo las condiciones de trabajo no se observó actividad hemaglutinante. En contraste Ranea y col. (2009) encontraron en el extracto acuoso del endocarpio de *Prosopis chilensis* la presencia de una lectina que fija N-Acetil-D.galactosamina mostrando actividad hemaglutinante (64 UH) en eritrocitos de conejo al 2%.

Tabla 8. Evaluación de antinutricionales de naturaleza proteica de harina integral de mezquite (*Prosopis laevigata*).

Determinación	Resultado
Lectinas	Negativo
Inhibidores de proteasas	54.97 \pm 0.41 UIT
Hemolisinas	Negativo

En el caso de los inhibidores de proteasas se cuantificó su presencia por medio de un ensayo espectrofotométrico en el cual se encontró presencia de estos factores teniendo una media de 54.97 \pm 0.41 UIT (unidades inhibidoras de tripsina), se encontraron en la literatura diferentes técnicas de detección de inhibidores de proteasas y por lo tanto que las unidades de medición no pueden ser comparables entre las especies estudiadas, por ejemplo Andrade-Montemayor y col. (2011) reportan 17.5 UI (unidades inhibitorias de proteasas) en vainas de mezquite (*Prosopias laevigata*).

El resultado obtenido en este estudio es bajo comparado por ejemplo con otra leguminosa como la soya, la cual tiene hasta 100 unidades de inhibición de tripsina (Serratos y col. 2008). Se ha encontrado que algunos inhibidores de tripsina son relativamente termoestables, propiedad atribuida a los puentes disulfuro de la estructura de estas proteínas por lo que es importante caracterizar este tipo de factores antinutricionales (Valle y Lucas, 2000; Goyoaga, 2005).

Franco y col. (2002) aislaron un inhibidor bifuncional, activo frente a tripsina y papaína en *Prosopis juliflora*, la inhibición de las dos enzimas se realiza a través de una misma reacción, lo que impide la inhibición simultanea de las enzimas.

Cabe mencionar que González y col. (2008) adicionalmente reportaron los nutrientes y antinutrientes de harina de *Prosopis spp* donde reportan la presencia de fitatos, oxalatos y nitratos, lo que implica un posible daño a la salud debido a la forma en que interaccionan con los comensales.

8.3 Cromatografía en capa fina para la identificación parcial de alcaloides.

Dado que se encontró presencia de alcaloides en el ensayo gravimétrico, se hizo necesario hacer cromatografía en capa fina para tratar de identificar los alcaloides presentes en harina integral de mezquite (*Prosopis laevigata*). De acuerdo a Domínguez (1973) se pueden identificar ciertos alcaloides en cromatografía de capa fina con el revelador general yodoplatinato de potasio dependiendo de su Rf, en este estudio se encontró la posible presencia de los alcaloides mencionados en la tabla 9.

Tabla 9. Cromatografía en capa fina para la identificación parcial de alcaloides en harina integral de mezquite (*Prosopis laevigata*) utilizando diferentes reveladores.

Revelador	Resultado
Yodoplatinato de potasio	Rf < 0.3, se encontró 0.15 y 0.2 Posiblemente: ergometrina, ergotamina, hordenina, cefalina y/o reserpina Rf > 0.3, se encontró 0.31, 0.45 y 0.75 Posiblemente: fisostigmina, bulbocapnina, escopolina, aspidospermina y/o arecolina.
Reactivo de Marquis	Negativo para morfina y sus derivados
FeCl ₃ ,	Negativo para morfina
HNO ₃ concentrado	Negativo para brucina y eserina
Reactivo de Frödhe	ND
Reactivo de Mandelin	Negativo para estricnina, yohimbina y curare
Reactivo alcohol-ácido	Negativo para novocaína, mezcalina y nicotina

ND = No determinado

Los posibles alcaloides presentes en el primer grupo (Rf inferior a 0.3) son ergometrina, ergotamina, hordenina, cefalina y reserpina. La ergometrina, ergotamina y la reserpina son alcaloides derivados del triptófano, mientras que la ergometrina y ergotamina son alcaloides de ergot (los alcaloides ergóticos son considerados micotoxinas o alcaloides neurotóxicos), la reserpina es un alcaloide con núcleo indólico, de uso farmacológico como antihipertensivo (Koskinen, 2012). La hordenina

es un alcaloide derivado de la tirosina. Y la cefalina es un alcaloide isoquinoleico monoterpénico, los alcaloides isoquinoleicos monoterpénicos no son muy comunes, son derivados de la tirosina y el secoidoide secologanina, al igual que la emetina, la cefalina tiene actividad emética (Arango, 2002).

Los posibles alcaloides encontrados en el segundo grupo (Rf superior a 0.3) son fisostigmina, bulbocapnina, aspidospermina, escopolina y arecolina. La fisostigmina o también llamada eserina es un alcaloide pirrolidínico se consideró que no está presente en harina integral del *Prosopis laevigata* ya que se utilizó el revelador HNO₃ concentrado con el cual se obtuvo un resultado negativo. La bulbocapnina es un alcaloide aporfinoide (término ligado a la morfina debido al rearreglo estructural), sin embargo este alcaloide se descarta ya que también se utilizó el reactivo de Marquis, revelador para poner de manifiesto a la morfina y sus derivados, dando resultado negativo para estos componentes. La escopolamina es un alcaloide tropánico (diversos alcaloides tropánicos son alucinógenos y algunos son poderosas drogas anticolinérgicas). La aspidospermina es un alcaloide indólico con diversos usos farmacológicos, aislado de *Aspidosperma quebracho*, mientras que la arecolina es un alcaloide derivado del ácido nicotínico encontrado en la nuez de areca (*Areca catechu*), por lo que también se descarta la presencia de aspidospermina y arecolina en harina integral de *Prosopis laevigata*.

Con respecto a los demás reactivos utilizados mostrados en la tabla 9 todos fueron negativos, descartándose por lo tanto la presencia de los alcaloides: morfina y sus derivados, brucina, eserina, novocaína, mezcalina y nicotina en harina integral de *Prosopis laevigata*.

9 CONCLUSIONES

Los resultados indican la presencia de los factores antinutricionales alcaloides, taninos e inhibidores de proteasas.

Debido a las características químicas de estos compuestos, principalmente a la termo-estabilidad de los alcaloides, los cuales tienen poca importancia como inhibidores de la digestión, pero que presentan efectos altamente tóxicos no se recomienda el consumo de harina integral de mezquite (*Prosopis laevigata*) en seres humanos, sí ésta no ha tenido ningún tratamiento previo para la eliminación de estos compuestos.

Los inhibidores de proteasas y taninos, por otra parte son compuestos termo-lábiles por lo que pueden ser fácilmente eliminados o disminuir en concentración mediante tratamientos térmicos.

10 RECOMENDACIONES

Determinar los alcaloides específicos presentes en harina integral de *Prosopis laevigata* mediante técnicas específicas y más sensibles para determinar su cantidad para cada tipo de alcaloide.

Hacer pruebas con diferentes tratamientos térmicos y/o químicos para la eliminación de los compuestos antinutricionales, ya que el mezquite tiene un alto valor nutricional y con el tratamiento adecuado, se puede aprovechar todo su potencial nutritivo y económico.

11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alegría-Ríos, F.S., García-Gasca, T., Andrade-Montemayor, H. (2007). Efecto del tostado de la vaina de Mezquite (*Prosopis laevigata*) sobre el contenido de la proteína y factores Antinútricos. XXII Reunión Nacional sobre caprinocultura. Zacatecas, México:1-2 [publicación en línea] [Acceso enero 2014] Disponible en: http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/26_6UAQAlegriaRios.pdf
2. Alonso, R. M., González, y, Pascual, I. García, R. Delfín, J. Díaz, J., Chavez, M. A. (2008). Inhibidores de proteasas multifuncionales de naturaleza proteica. Revista cubana de ciencias biológicas (Vol.2, No.1):14-21
3. Anaya, L. A. L. (2003). Ecología química., Editores Plaza y Valdez. 1ra ed. pp: 53-59
4. Andrade-Montemayor, H., Alegría-Ríos, F., Pacheco-López, M., Aguilar-Borjas, H., Villegas-Díaz, J. L. O., Basurto-Gutiérrez, R., Jiménez-Severiano, H. y Vera-Ávila, H. R. (2009). Effect of dry roasting on composition, digestibility and degradability of fiber fractions of mesquite pods (*Prosopis laevigata*) as feed supplement in goats. Tropical and Subtropical Agroecosystems (Vol. 11):237-243
5. Andrade-Montemayor, H.M., Codova-Torres, A.V., García-Gasca, T., y Kawas, J.R. (2011). Alternative foods for small ruminants in semiarid zones, the case of Mesquite (*Prosopis laevigata spp.*) and Nopal (*Opuntia spp.*). Small Ruminant Research (Vol.98):87-90
6. Arango, A. G. J. (2002). Alcaloides y compuestos nitrogenados. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia: 1-88
7. Ávalos, G. A, y Pérez-Urria, C. E. (2009). Metabolismo secundario de las plantas. Reduca (Biología) Serie Fisiología Vegetal (Vol.2: No.3):119-145
8. Ballesteros, G. P., Claramunt, V. R. M., Sanz, C. D., Teso, V. E. (2013). Química Orgánica avanzada. Editorial UNED, Tema 23: pp 843-862
9. Barba, R. A. P., Frías-Hernández, J. T., Olalde-Portugal, V., y González, C.J. (2006). Processing, nutritional evaluation, and utilization of whole Mesquite flour (*Prosopis laevigata*). Journal of food science (Vol. 71, No. 4): 315-320

10. Barbehenn, R. V., y Constabel, C. P. (2011). Tannins in plant-herbivore interactions. *Phytochemistry* (Vol. 72):1551-1565
11. Belmar, C. R., y Nava, M. R. (2000). Factores antinutricionales en la alimentación de animales monogástricos. *Alimentación no convencional para monogástricos en el trópico*: 51-59
12. Bhat, R. y Karim, A. A. (2009). Exploring the nutritional potential of wild and underutilized legumes. *Comprehensive reviews in food science and food safety* (Vol. 8):305-331
13. Blanco-Labra, A., y Aguirre, M. C. (2002). Proteínas involucradas en los mecanismos de defensa de las plantas. *Acta Universitaria* (Vol 12 No. 3);3-28
14. Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* (Vol. 56, No. 11);317-333
15. Carneán, A. M., y Repetto, M. (2006). *Toxicología alimentaria*. Ediciones Díaz de Santos, pp. 206-207
16. Carrillo-Parra, A., (2007). Technological Investigation of *Prosopis laevigata* Wood from Northeast Mexico. Tesis doctoral, Faculty of Forest Sciences and Forest Ecology, University of Göttingen, Alemania
17. Dávila, M. A., Sangronis, E. y Granito M. (2003). Leguminosas germinadas o fermentadas: alimentos o ingredientes de alimentos funcionales. Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela (Vol. 53, No.4) [publicación en línea] [Acceso septiembre 2014] Disponible en: http://www.alanrevista.org/ediciones/2003-4/leguminosas_germinadas_fermentadas.asp
18. De Hoff, P. L. Brill, L. M., y Hirsch, A. M. (2009). Plant lectins: the ties that bind in rood symbiosis and plant defense. *Mol Genet Genomics* (Vol. 282):1-15
19. De-la-Cruz, C. I. González-Esquinca, A. R. Riley-Saldaña, C. A. (2012). Biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos. *Universitas Scientiarum* (Vol 17, No. 2):189-202
20. Del Ángel, M. A. R. Interián, G. L. y Esparza, M. R. M. (2013). Principios básicos de bromatología para estudiantes de nutrición. Pp. 223-224
21. de Souza, C. E., Flaviane, S. P. M., Barbosa, P. P., Bergamin, L. T., Nascimento, S. O., Pogue, R., Grosii-de-Sá, M. F., y Franco, O. L. (2009). Plant storage

- proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. The FASEB Journal: 3290-3305
22. Díaz, P. L. N. (2009). Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos, una revisión. *Revista de estudios Transdisciplinarios* (Vol. 1 No. 2): 32-55
 23. Domínguez, X. A. (1973). *Métodos de Investigación Fitoquímica*, Departamento de Química y Química Orgánica del Instituto Tecnológico y de Estudios superiores de Monterrey, México:39-43, 211-226
 24. Drago, S. M. E. (2007). Flavonoides recombinantes de relevancia farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. (Vol. 38, No. 4);42-47
 25. Elizalde, A. D. D., Porrilla, Y. P., y Chaparro, D. C. C. (2009). Factores antinutricionales en semillas. *Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad del Cauca* (Vol. 7 No. 1): 45-54
 26. Facchini, P. J. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, Cell Biology, Molecular Regulation, and Metabolic Engineering applications. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* (Vol. 52): 29-66
 27. Finefield, J. M., Sherman, D. H., Kreitman, M., y Williams, R. M. (2012). Enantiomeric natural products: occurrence and biogenesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* (Vol. 51):4802-4836
 28. Fortúrbel, R. F. (2003). Problemática de la producción y comercialización de *Chenopodium quinoa* W. (Chenopodiaceae), debido a la presencia de saponinas. *Ciencia abierta* (Vol. 21):1-10
 29. Franco, O. L., Grossi, S. M. F. Sales, M- P, Mello, L. V., Oliveira, A. S., y Rigden, D. J. (2002). Overlapping binding sites for trypsin and papain on a Kunitz-type proteinase inhibitor from *Prosopis juliflora*. *Proteins: structure, function, and genetics* (Vol.49):335-341
 30. Galindo, W.F., Rosales, M., Murgueitio, E., y Larrahondo, J. E. (1989). Sustancias Antinutricionales en hojas de guamo, nacedero y matarratón. *Livestock Research for Rural Development* (Vol. 1, No. 1) [publicación en línea] [Acceso enero 2014] Disponible en: <http://www.lrrd.cipav.org.co/lrrd1/1/mauricio.htm>

31. García, D. E. (2004). Principales factores antinutricionales de las leguminosas forrajeras y sus formas de cuantificación. *Pastos y Forrajes* (Vol. 27, No. 2): 101-116
32. García, S. M. D, Lechuga, C. A., Gómez, O. J. L., Castro, C. A., Salame, M. A., y Serrano, H. (2014). Metabolitos secundarios vegetales con importancia natural y biomédica: fenilpropanoides con actividad estrogénica. *Ciencia en la frontera: revista de ciencia y tecnología de la UACJ* (Vol 12, No. 3):75-91
33. Giannuzzi, L., Tomas, M., y Ferrari, L. A. (2012). Manual de Técnicas Analíticas en el laboratorio de Toxicología. Cap. 4: Tóxicos volátiles y gaseosos, pp 13 [publicación en línea] [Acceso mayo 2014] Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/200000727/capitulo4-120406192718-phpapp02>
34. Gómez, G., Quesada, S., y Nanne, C. I. (1998). Efecto de Factores Antinutricionales en el Pejibaye (*Bactris gasipaes*) sobre el metabolismo de ratas jóvenes. *Agronomía Costarricense* (Vol. 22, No. 2):191-192
35. González, G. A., Duarte, C. A., Patto, A. C. M., y Piccolo, B. M. F. (2008). Caracterización química de la harina del fruto de *Prosopis ssp.* procedente de Bolivia y Brasil. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* (Vol. 58, No. 3): 309-315
36. Goyoaga, J. C. (2005). Estudio de factores no nutritivos en *Vicia faba L.* Influencia de la germinación sobre su valor nutritivo. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, España.
37. Hernández, G., y Fariñas, M. (2005). Propiedades biológicas de extractos acuosos de órganos de cuvier, piel y músculo de *Brandothuria impatiens* (Forsk., 1776) (Echinodermata: Holothuroides). *Saber, Universidad de Oriente, Venezuela* (Vol.17, No. 2):118-124
38. Iglesias, N. (2009). Diseño de ingredientes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, España
39. Isaza, M. J. H. (2007). Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia et Technica* Año XIII, (No. 33): 13-18
40. Iqbal, A., Khalil, I. A., Ateeq, N. y Sayyar, K. M. (2005). Nutritional quality of important food legumes. *Food Chemistry* (Vol 97):331-335

41. Koleva, I. I., van Beek, T. A, Soffers, A. E. M. F., Dusemund, B., y Rietjens, I. M. C. M. (2012). Alkaloids in the human food chain – Natural occurrence and posible adverse effects. *Mol. Nutr. Food Res.* (Vol. 56):30-52
42. Koskinen, A. M. P. (2012) *Asymetric synthesis of natural products*. Second Edition, John Wiley & Sons, Cap. 8: Terpenos, pp 219-245, Cap. 10: Alkaloids, pp 10:257-287
43. Lock de Ougaz, O. (1994). *Investigación fitoquímica, métodos en el estudio de productos naturales*. Segunda edición, Pontifica Universidad Católica del Perú, Fondo editorial, cap. 4, pp. 211-237
44. López, H. M. A., Rivera, L. J. A., Ortega, R. L., Escobedo, J. G., Magaña, M. M. A., Sanginés, G. J. R., y Sierra, V. A. C. (2008). Contenido nutritivo y factores antinutricionales de plantas nativas forrajeras del norte de Quintana Roo. *Téc Pecu Méx* (Vol. 46, No. 2):205-215
45. López, R. M. D. (1993). *Laboratorial de sustancias toxicas en leguminosas antes y después de tratamientos térmicos y químicos*. Tesis, Universidad de Guadalajara, Jal. México.
46. Loyola-Vargas, V. M., Sánchez-Iturbide, P., Canto-Canché, B., Gutiérrez-Pacheco, L. C. Galaz-Ávalos, R. M. y Moreno-Valenzuela, O. (2004). Biosíntesis de los alcaloides indólicos, una revisión crítica. *Rev. Soc. Quím. Méx.* (Vol. 48): 67-94
47. Majak, W. (2001). Review of toxic glycosides rangeland and pasture forages. *Journal of range management* (Vol. 54, No. 4): 494-498
48. Martínez, S. I. (2007). *Manual de Fitoterapia*. Ed. Elsevier Masson. Cap. 3:pp 25-45
49. Ming-Shun, C. (2008). Inducible direct plant defense against insect herbivores: a review. *Insect Science* (Vol. 15):101-114
50. Muzquiz, M., Burbano, C., Cuadrado, C., y De la Cuadra, C. (1993). Determinación de Factores Antinutritivos Termorresistentes en leguminosas. I: Alcaloides. *Invest. Agr.: Prod. Prot. veg.* (Vol. 8, No. 3): 351-361
51. O'Connor, S. E. (2012) *Natural Products in Chemical Biology* (ed N. Civjan), John Wiley & Sons, Inc. cap. 9: Alkaloids, pp 209-237

52. Ormeño, E., y Fernández, C. (2012). Ecología: Los terpenos de las plantas. Investigación y Ciencia: 62-69
53. Palacios, R. A. (2006). Los Mezquites mexicanos: Biodiversidad y Distribución geográfica. Bol. Soc. Argent. Bot. (Vol. 41, No. 1-2):99-121
54. Ranea, F. G., Ricco, R. A., Gurni, A. A., Wagner, L. M. (2007). Identificación de una hemaglutinina que fija N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) en *Prosopis chilensis*-Mimosaceae-. Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromáticas (Vol 6 No. 6): 320-361
55. Reséndez, V. K. L., González, C. M. P., Chirez, H. I., y Díaz, M. O. (2013). Aspectos biológicos, ecológico y usos del mezquite. Repositorio Digital Institucional, Instituto Politécnico Nacional [publicación en línea] [Acceso septiembre 2014] Disponible en: <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/16954>
56. Rodríguez, S. E. N., Rojo, M. G. E., Ramírez, V. B., Martínez, R. R., Cong, H. M. C., Medina, T. S. M., y Piña, R. H. (2014). Análisis técnico del árbol del Mezquite (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. Ex Willd.) en México. Ra Ximhai (Vol.10, No. 3):173-193
57. Salminen, J. P., y Karonen, M. (2011). Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. Functional Ecology (Vol. 25): 325-338
58. Sepúlveda-Jiménez, G., Porta-Ducoing, H., y Rocha-Sosa, M. (2004). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Revista mexicana de Fitopatología (Vol. 21, No. 3): 355- 363
59. Serratos, A. J. C., Carreón, A. J., Castañeda, V. H., Garzón, M. P., y García, E. J. (2008). Composición químico-nutricional y de factores antinutricionales en semillas de parota (*Enterolobium cyclocarpum*). Interciencia (Vol. 33, No. 11):850-854
60. Silva, P. C. N. (2010). Cuantificación de los alcaloides de *Berberis hallii* "Carrasquilla" sector la Josefina San sidro de Cantón Guano Povia de Chimborazo. Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador

61. Toraño, P. G. T., Vilaseca, M. J. C., Tamargo, M. I., y Pérez, M. M. (1999). Producción y purificación parcial de la hemolisina principal (Neumolisina) de *Streptococcus pneumoniae*. *Revista cubana de Medicina Tropical* (Vol.53, No.3):160-165
62. Torres, A. I. C. (2010). Purificación y caracterización parcial de una lectina de frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) con actividad citotóxica sobre células cancerígenas. Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Querétaro, Qro. México.
63. Valenzuela-Nuñez, .L.M., Rivera-González, .M., y Trucios-Casiano, R. (2013). Características ecológicas y dasométricas de dos comunidades con mezquite (*Prosopis laevigata* [Humb. et Bonpl. ex Willd] M. C. Johnston) en el estado de Durango. *Tecnociencia Chihuahua* (Vol. 7, No. 1):32.38
64. Valle, V. P., y Lucas, F. B. (2000). Toxicología de alimentos. Instituto Nacional de Salud Pública, Centro Nacional de Salud Ambienta, D. F., México.
65. Van Driessche, E., de Cupere, F. Cruz, E. Machado, J., y Beeckmans, S. (2000). Lectinas de Origen Vegetal: definiciones, métodos de purificaciín y aplicaciones. *Acta Farm Bonaerense* (Vol.19, No.2):147-154
66. Vázquez-Luna, A., Rivadeneyra-Domínguez, E., y Díaz-Sobac, R. (2012). Lectinas en frutas y plantas comestibles: nuevas posibilidades de interacción entre la ciencia de los alimentos y la biomedicina. *CienciaUat* (Vol. 23, No. 1):60-66
67. Vincken, J. P., Heng, L., de Groot, A., y Gruppen, H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* (Vol. 68): 275-297
68. Wink, M. (2010). *Annual Plant Reviews, Volume 40, Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. Ed. Wiley-Blackwell, Chapter 1, 2 , 3 , 4, y 6
69. Zagrobelny, M., Bak, S., y Lindberg, M. B. (2008). Cyanogenesis in plants and arthropods. *Phytochemistry* (Vol 69):1457-1468
70. Zamora-Natera, F., García-López, P., Ruiz-López, M., y Salcedo-Pérez, E. (2008). Composición de alcaloides en semillas de *Lupinus mexicanus* (Fabaceae) y evaluación antifúngica y alelopática del extracto alcaloideo. *Agrociencia* (Vol. 42):185-192

12. ANEXOS

ANEXO I

Preparación de reactivos para alcaloides

- ✓ Reactivo de Dragendorff. Se disuelven 8.0 g de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 20 mL de HNO_3 (al 30%) y 27.2 g de KI en 50 mL de H_2O . Se mezclan las dos soluciones y se dejan reposar 24 horas. Se decanta la solución y se afora con H_2O a 100 mL.
- ✓ Reactivo de Mayer. Se disuelven 1.36 g de HgCl_2 en 60 mL de H_2O y 5 g de KI en 10 mL de H_2O . Se mezclan las dos soluciones y se aforan a 100 mL con H_2O .
- ✓ Reactivo de Wagner. Se disuelven 1.27 g de yodo resublimado y 2 g de KI en 20 mL de H_2O , la solución se afora a 100 mL de H_2O .
- ✓ Reactivo de Sonneschein (ácido fosfomolibdico). Se prepara una solución acuosa de molibdato de amonio y se añade lentamente a una solución saturada de Na_2HPO_4 que está a unos 40°C hasta que no se forme más precipitado. Se recoge el precipitado por filtración y se lava con H_2O , luego se mezcla con una solución concentrada de CaCO_3 . La suspensión se calienta hasta que se disuelve todo el precipitado, y se continúa calentando hasta sequedad. El residuo se humedece con HNO_3 y vuelve a secarse. El nuevo residuo se disuelve 10 veces su peso en una mezcla de HNO_3 y H_2O (1:9) v/v, se filtra y se almacena en una frasco cerrado.
- ✓ Reactivo de Bertrand (ácido silicotúngstico). Se disuelven 5.0 g de ácido silicotúngstico ($4\text{H}_2\text{O} \cdot \text{SO}_4 \cdot 12\text{WO}_3 \cdot 22 \text{H}_2\text{O}$) en HSO_4 6N necesario para aforar a 100 mL de solución.


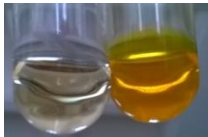


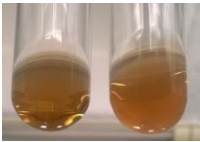




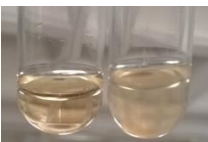
Preparación de la solución BTC para inhibidores de proteasas.

- ✓ Solución BTC. A 100 μL de solución BAPNA (40 mg de BAPNA diluidos en 1 mL de dimetil sulfoxido) se le agregan 10 mL del tampón Tris-HCl 0.05M pH 8.2 y 200 μL de cloruro cálcico.

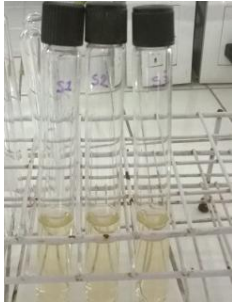


ANEXO II

Evidencias de las pruebas realizadas

Alcaloides

Reactivo	Prueba preliminar		Prueba confirmatoria	
	Blanco/ Prueba	Resultado	Blanco/ Prueba	Resultado
Dragendorff		Positivo		Positivo
Mayer		Positivo		Negativo
Wagner		Positivo		Positivo
Sonneschein		Negativo		Negativo
Bertrand		Positivo		Positivo

Saponinas

Extracto	Agitación	Resultado
		 Negativo

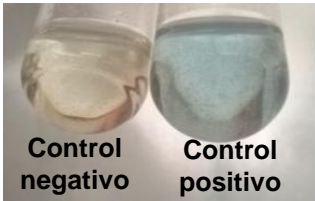
Glucósidos cianogénicos

Reactivo de Guignard



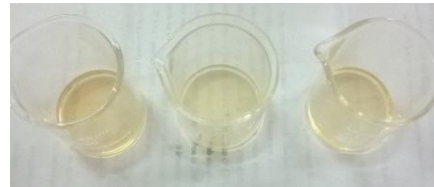
Negativo

Aislamiento e identificación del ácido cianhídrico



Control negativo

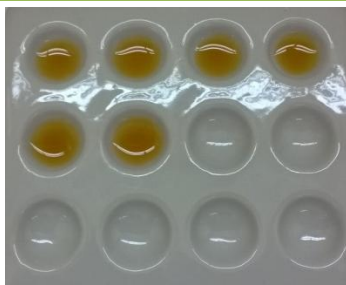
Control positivo



Resultado: Negativo

Taninos

Extracto



Ensayo con FeCl₃



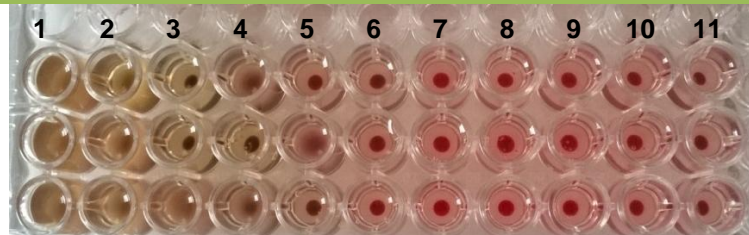
Resultado: Positivo

Lectinas

Hemaglutinación

Pocillos 1-10: diluciones en base 2,
Pocillo 11: control negativo

Sangre de
carnero



Inhibidores de proteasas

Muestra

Blanco

Control

Ensayos

Evidencia



Absorbancia

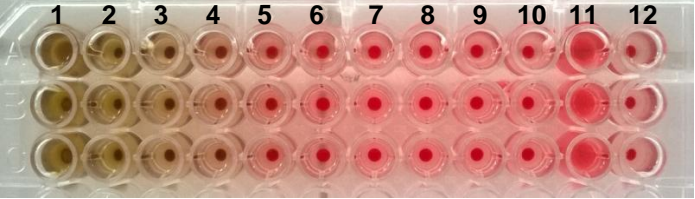
0.7689

0.2210

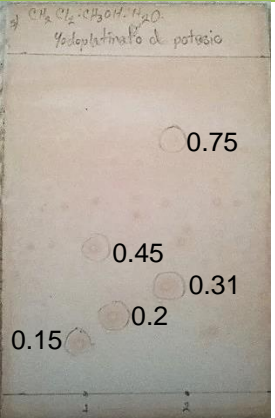


0.2221

0.2195

Hemolisinas

Hemolisis	<p>Pocillos 1-10: diluciones Pocillo: 11 control positivo Pocillo12: control negativo</p>
Sangre de carnero	

Cromatografía en capa fina para la identificación parcial de alcaloides

Revelador	Yodoplatinato de potasio	Reactivo de Marquis	FeCl ₃ ,
Evidencia			

Revelador	HNO ₃ concentrado	Reactivo de Frödhe	Reactivo alcohol-ácido
Evidencia	