

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”



DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.
DIVISION: CIENCIA ANIMAL

**DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA Y CARACTERIZACION DE
EXTRACTOS DEL CHIPILIN (*CROTALARIA LONGIROSTRATA*) CON POTENCIAL
APLICACIÓN EN ALIMENTOS.**

POR
JUAN PABLO LAGUNA GONZÁLEZ

TESIS

Presentada como requisito para
Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México Noviembre del 2016.

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.
DIVISION: CIENCIA ANIMAL

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA Y CARACTERIZACION DE EXTRACTOS DE
CROTALARIA LONGIROSTRATA CON POTENCIAL APLICACIÓN EN ALIMENTOS.

TESIS


Que se somete a consideración del H. Jurado examinador como requisito parcial para
obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS


Presentado por:

JUAN PABLO LAGUNA GONZÁLEZ

El presente trabajo ha sido evaluado y aprobado por el siguiente comité:



Dr. Mario A. Cruz Hernández
PRESIDENTE



Dra. Ruth E. Belmares Cerda
SINODAL I



M.C. Mildred Inna M. Flores Verástegui
SINODAL II



Dr. Armando Robledo Olivo
SINODAL III



Dr. José Duénez Alanís
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN CIENCIA ANIMAL



Buenavista, Saltillo, Coahuila, México Noviembre del 2016.

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.
DIVISION: CIENCIA ANIMAL

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA Y CARACTERIZACION DE EXTRACTOS DE
CROTALARIA LONGIROSTRATA CON POTENCIAL APLICACIÓN EN ALIMENTOS.

TESIS

Que se somete a consideración del H. Jurado examinador como requisito parcial para
obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS

Presentado por:

JUAN PABLO LAGUNA GONZÁLEZ

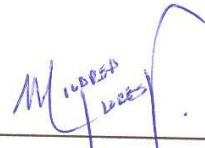
El presente trabajo ha sido Dirigido y Asesorado por el siguiente comité:



Dr. Mario A. Cruz Hernández
Director



Dra. Ruth E. Belmares Cerda
Co-Director



M.C. Mildred Inna M. Flores Verástegui
Asesor



Dr. Armando Robledo Olivo
Asesor

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México Noviembre del 2016.

“nunca consideres el estudio como una obligación si no como una oportunidad para penetrar en el bello mundo del saber.”

Albert Einstein

Agradecimientos

Los retos de hoy no me asustan, medan orgullo porque son el éxito del mañana y esto te lo debo a ti mi Dios por haberme otorgado una familia maravillosa, quienes han creído en mí siempre, dándome ejemplos de superación, humildad y sacrificio; enseñándome a valorar todo lo que tengo y que a veces en la vida hay que sacrificar para poder alcázar nuestros propios sueños.

Es por eso que este trabajo se los dedico a mis padres ; **María de Jesus González y Javier Laguna** por que ha fomentado en mi el deceso de superacion y triunfo en la vida. Lo que han contribuido ala consecucion de este logro.

A mis hermanas y hermanos que han sido mi mano derecha durante mucho tiempo, que a pesar de las adversidades siempre estuvieron con migo en los momentos más difíciles alimentándome a seguir adelante con mis sueños; **Mayi, Fabiola, Lupe, Yaneh, Carlos, Javier, Pedro y a mi Fercho**

que sin el este proyecto de vida no se abría culminado.

A mis amigos y amigas que han estado con migo en las buenas y en las malas, que en momentos difíciles pudieron sacarme una sonrisa sincera, aunque me hubiese gustado mencionar uno por uno pero eso no es suficiente para agradecerles por esas noches que se hicieron mañana, amigos que se volvieron familia que sin conocernos nos volvimos como hermanos y que hoy por demos ver el fruto que cosechamos nuestra larga y sincera amistad.

A ti **Claudia y Sebastián** que son parte esencial en mi vida agradezco su apoyo y su comprensión en los momentos difíciles. Siempre recibiendo de ustedes la palabra de aliento que me dio la fuerza para seguir luchando.

A esas dos personas que desde el cielo me cuidan y que cuando estuvieron en la tierra hicieron mis días más felices del mundo con sus compañía y sus alegrías **Juan A. Y Valente N.**

A mis asesores de tesis por la confianza depositada en mí, su apoyo y su tiempo para llevar acabo satisfactoriamente este trabajo, y conseguir mi formación profesional. A ustedes mi admiración y respeto.

A mi Ama Terra Mater (UAAAN) que me permitió formarme profesionalmente a través de su personal docente.

A quienes tienen el tiempo de leer esta tesis...

A quienes hoy me acompañan...

Hoy recuerdas el por qué, el cuándo, el cómo...

Has llegado hasta aquí...

INDICE DE CONTENIDO

CAPITULO 1.	
RESUMEN	7
CAPITULO 2.	
INTRODUCCION	8
CAPITULO 3.	
HIPOTESIS	10
CAPITULO 4.	
OBJETIVOS	10
4.1. Objetivos generales.....	10
4.2. Objetivos específicos.....	10
CAPITULO 5.	
JUSTIFICACIÓN	11
CAPITULO 6.	
REVISIÓN DE LITERATURA	12
6.1. Plantas con hojas comestibles en México.....	13
6.2. El Quelites, frescas hierbas mexicanas.....	14
6.3. Plantas comestibles no convencionales en Chiapas.....	15
6.3.1. Lista de algunas plantas no convencionales.....	16
6.3.2. Diferenciación de chípil y chipilín.....	16
6.4. Chipilín.....	17
6.5. Usos.....	18
6.6. Tablas de valor nutricional del chipilín de diferentes literaturas.....	20
6.7. Taxonomía.....	26
6.8. Análisis bromatológico.....	28
6.8.1. Análisis de humedad y contenido de solidos totales.....	28
6.8.2. Cenizas.....	29
6.8.3. Azucares totales.....	29

6.8.4. Proteínas.....	31
6.8.5. Fibras dietéticas.....	32
6.8.6. Lípidos.....	34
6.8.6.1. Clasificación general.....	35
6.8.7. Determinación de ELN.....	35
6.8.8. Fenoles.....	35
6. 8.1. Clasificación general.....	36
6.8.2. Propiedades beneficiosas papel en la prevención de enfermedades.....	37
6.8.3. Características químicas generales.....	38
6.8.4. Métodos para determinar fenoles totales.....	38
6.9. Antioxidantes.....	39

CAPITULO 7.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	42
7.1. Caracterización de la materia prima.....	42
7.1.1. Obtención de la materia prima.....	42
7.2. Caracterización de la planta mediante análisis bromatológico (físico-química).....	44
7.2.1. Determinación de materia seca total.....	44
7.2.2. Determinación de humedad.....	45
7.2.3. Determinación de ceniza por vía seco.....	45
7.2.4. Determinación de azúcares totales.....	46
7.2.5. Determinación de proteínas solubles.....	47
7.2.6. Determinación de fibra cruda.....	48
7.2.6.1. Determinación de fibra cruda por el método de detergente neutro o pared celular.....	49
7.2.6.2 Determinación de fibra cruda por el método de ácido.....	50
7.2.6.3. Hemicelulosa.....	51
7.2.6.4. Determinación de celulosa FDA.....	51

7.2.6.5. Determinación lignina.....	52
7.2.7. Cuantificación de lípidos.....	52
7.2.8. Cuantificación de ELN.....	55
7.2.9. Obtención de los extractos a base de acetona y etanol para cuantificar el contenido poli fenólico y antioxidantes.....	53
7.2.9.1. Cuantificación de polifenoles totales.....	54
7.2.9.2. Actividad antioxidante por el método DPPH.....	56
7.2.9.3. Actividad antioxidante por el método ABTS.....	57
CAPITULO 8.	
RESULTADOS Y DISCUSION.....	58
8.1. Análisis bromatológico (físico-química).....	58
8.2.- Cuantificación del contenido polifenolico de extractos de CL. (Etanol y Acetona).....	61
8.3.- Actividad antioxidante por el método DPPH.....	62
8. 4.-Actividad antioxidante por el método ABTS.....	64
CAPITULO 9.	
CONCLUSION.....	65
CAPITULO 10.	
PERSPECTIVA.....	66
CAPITULO 11.	
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA.....	67

1.- RESUMEN

La investigación realizada es con el fin de conocer más acerca de la planta el chipilín (*Crotalaria longirostrata*), tanto su composición físico-química, como las moléculas de importancia por su actividad antioxidante y compuestos poli fenólicos que pueden ser utilizados en la industria alimentaria.

Los estudios fueron en hojas, peciolo y flores, extraídas de la planta del chipilín de la zona frailesca del estado de Chiapas, realizando una comparación de resultados con otras investigaciones de Rivas Larios y col (2014), Alegría Salmerón y col. (2006), L Arias y col. (2003) en correlación a su valor nutrimental y actividad antioxidante.

Las diferencias en resultados comparados se le pueden atribuir al espacio geográfico, el clima, el suelo, la disponibilidad y la calidad de agua, donde se va a ver reflejado en la absorción de nutrientes que necesita la planta para su crecimiento.

En esta investigación se analizó el porcentaje del valor nutrimental de la planta a través del método AOAC (1990) (*Official Methods of Analysis*) como; proteínas, fibras, materia seca total, cenizas, lípidos, azúcares, etc. Además de la presencia de compuestos polifenólicos; que son antioxidantes que nos ayudaran a inhibir o retardar oxidación de otras moléculas inhibiendo la iniciación y / o propagación de las reacciones en cadenas de los radicales libres que podrían afectar nuestra salud.

Los resultados obtenidos demuestran que esta planta es adecuada debido a sus propiedades físico-químicas para la aplicación en diversas industrias alimenticias, tales como aditivos, suplementos alimenticios y como un vegetal en fresco para acompañar diversos platillos.

Palabras claves; Chipilín, *Crotalaria longirostrata*, polifenólicos, físico-químico, antioxidante.

2.- INTRODUCCION

En México existen aproximadamente 26,000 especies de plantas comestibles, las cuales son utilizadas con diferentes fines: envolver, aromatizar, condimentar, infundir, cocinar o incluirlas frescas. (Morales Romero, nb)

El chipilín (*Crotalaria longirostrata*) es una de las plantas silvestres, perenne catalogada como una de las especies más importantes de la hoja silvestre de follaje tierno y comestible parecida a la verdolaga, que crece durante todo el año en climas tropicales y con gran abundancia de agua, por lo que se ha catalogado en muchos lugares como una planta invasora, pero en parte de Latinoamérica como México, Guatemala, Salvador y Honduras ha tenido gran popularidad en la gastronomía, debido que desde hace mucho tiempo es un alimento básico para las familia de bajos recurso y de algunos grupos indígenas que se encuentran marginados, debido a que es una planta muy abundante y de fácil cultivo miento es por ello que se ha venido explotando hasta nuestro días como una planta de traspatio y que es parte de una alimentación por muchas regiones. México y Guatemala son los países donde esta planta no solo se utiliza en la gastronomía, sino también para curar algunas enfermedades y como abono para fertilizante del suelo, la utilidad que actualmente se conoce es la que se ha venido reflejando y transmitiendo de generación en generación hasta hoy en día.

En México el chipilín (*Crotalaria longirostrata*) crece en los estado de Chiapas, Veracruz, Tabasco y Oaxaca, el nombre que se le atribuye es según el lugar donde crezca. En estado de Chiapas se le conoce como el nombre popular de Chipilín y es el nombre con mayor popularidad y que podemos encontrar en el mercado del estado y donde sea caracterizado por su rico sabor, olor en el momento de ser cocinado y al ser unos de los mejores acompañamientos exóticos en algunos platillos de la gastronomía Chiapaneca.

Informes de literatura con respecto a su composición físico- química o su valor nutricional en Centroamérica son escasos y la poca que se conoce hasta ahora es referente a su uso gastronómico, en México las investigaciones que hay referente a los componentes activos de la *Crotalaria longirostrata*.

Co-responden a los estados de Veracruz, Tabasco, Chiapas y al país vecino Guatemala, pero como se sabe no todas las plantas contienen los mismos porcentajes de nutrientes según el espacio geográfico donde esta se encuentre.

El presente estudio describe la determinación de la actividad biológica y caracterización del extracto de la *Crotalaria longirostrata* que se cultiva en el estado de Chiapas en la región de la Frailesca, con aplicación a futuro en los alimentos para humano y al mismo tiempo realizar un comparativo de porcentaje nutrimental, en correlación con otros resultado obtenidos en otras investigaciones.

3.- HIPOTESIS

Los extractos del chipilín (*Crotalaria longirostrata*) poseen moléculas con actividad antioxidante, que pueden ser utilizados en la industria alimentaria.

4- OBJETIVOS

4.1. - Objetivo general

Determinar la actividad biológica mediante la medición de poli-fenoles y actividad antioxidantes y caracterización físico-química del extracto de *Crotalaria longirostrata* con potencial aplicación en alimentos.

4.2.- Objetivos específicos

- Obtención de la materia prima de la planta *Crotalaria longirostrata* recolectada en la región de San Pedro Buenavista Mpo. Villacorzo Chiapas.
- Caracterización de la planta mediante análisis físico-química por el método de AOAC 1990 (Official Methods of Analysis)
- Obtención de los extractos de la *Crotalaria longirostrata* por diferentes solventes (acetona, etanol y hexano).
- Cuantificación de polifenoles presentes en los extractos de *Crotalaria longirostrata*.
- Determinación de la actividad de antioxidante presentes en los extractos de *Crotalaria longirostrata*.

5.- JUSTIFICACION

El chipilín (*Crotolaria longirostrata*) planta silvestre muy conocida en Latinoamérica. En México en el estado de Chiapas y del país circunvecino que es Guatemala es catalogada como una planta indígena. Es unos de los platillos de hojas más exóticos y ricos que se consume en algunas regiones ya que produce una sustancia somnífica que para muchas personas que las consumen es una terapia para los que quieren conciliar el sueño.

Las investigaciones que hoy en día existe referente al valor nutrimental y antioxidantes del chipilín en México son de los estados de Veracruz, Tabasco y Chiapas, pero como se sabe no todos los compuestos activos de una planta son iguales, lo que los va a diferenciar es la ubicación geográfica donde se encuentre.

Es por eso que el propósito de esta investigación es conocer más acerca del chipilín (*Crotolaria longirostrata*), cultivado en el estado de Chiapas de la zona Frailesca donde esta hierba se encuentra con gran demanda alimenticia por los pobladores.

Por tal motivo la intención de esta investigación es estudiar y aprovechar esta planta que crece de manera abundante durante todo el año y la posible actividad biológica que aún no se ha estudiado, realizado una caracterización de dicha planta y hacer un comparativo con otras investigación sobre los resultados obtenidos, para su posible aplicación en los alimentos y así a contribuir a una investigación de una planta silvestre, poca explorada que podría a futuro ser un vegetal reconocido como son la hierba mora, la verdolaga, etc. Que son vegetales esenciales en la dieta humana.

6. REVISION DE LITERATURA

El *chipilín* (*Crotalaria Longirostrata*) es una leguminosa silvestre tropical utilizada desde tiempos prehispánicos donde el hombre por necesidad de sobrevivencia se dio a la tarea de la recolección de plantas y semilla para su alimentación (Hernández y León 1994) manteniendo las características antropocéntricas reportados para otras plantas del país (Vieyra y col. 2002). Abarca una amplia gama de aplicaciones tales como: comida y bebida refrescante para los seres humanos conocidas hasta hoy en día debido a que se ha venido transmitiendo de generación en generación (Centurión col. 2000), se ha utilizado no solo en la gastronomía y en la medicina alternativa natural sino también para los cultivo de cobertura o abono verde (mediante la fijación de nitrógeno atmosférico), mejora de los barbechos (Desaeger y Rao 1999), elaboración de papel, planta medicinal y las especies melíferas (Fischler y Wortman1999); (L. Arias y col.2003)

Según (Standley 1922 y col.) El chipilín, también conocido como plata indígena, chop, chipile, su nombre asignado que se le da según la popularidad a la región en que pertenezca, en Chiapas el nombre popular de chipilín es de origen de la lengua Náhuatl (Chepel'ixh) se llama así según se cuenta las personas mayores de algunas comunidades del estado que este nombre se le atribuye a una historia antigua donde una princesa fue obligada a casarse con el dios de la lluvia (Dios Chac) quien maldijo al pueblo con una hambruna mandando nubes y lluvia, para evitar esa tragedia la princesa (Chhepel'ixh) se sacrifica casándose con él para evitar que la maldición callera a su pueblo.

Pero todo fue un engaño para evitar que la princesa se casara con otro y a si también que admiraran su belleza, al darse cuenta la princesa (Chepel'ixh) del engaño se sacrificó a los ojos de la luna y la pradera, convirtiéndose así en chipilín que significa hojas de luna. (Guillen Reyes; 2008)

6.1.- Plantas con hojas comestibles en México

En México existen aproximadamente 26,000 especies de plantas comestibles, las cuales son utilizadas con diferentes fines: envolver, aromatizar, condimentar, inficionar, cocinar o incluirlas frescas; (Morales Romero, nb)

Las plantas desempeñan una gran labor en nuestro planeta desde la fotosíntesis hasta transformar la energía de la luz del sol en energía química entre otras funciones. Las plantas son el origen verdadero de proteínas, carbohidratos y otras moléculas complejas. Sin las plantas el planeta sería una esfera sin vida que da vuelta, estéril y yermo.

Las plantas de hoja son el mejor ejemplo de la ley natural del tomar la luz del sol y del dar oxígeno.

Existen muchísimas variedades de vegetales de hoja verde comestible y son tanto aquellos que crecen como hojas por sí solas (rúcula, berros, hojas de mostaza, ruibarbo) o las mismas hojas de las raíces (de la zanahoria, del nabo, de los rabanitos) o las hojas de otras verduras como la coliflor, brócoli o las verduras redondas verdes como todas las variedades de coles, el brócoli, etc. La mayoría de ellas pueden comerse crudas en ensalada durante el verano (y en menor cantidad, también en primavera), escaldadas o al vapor.

Algunos vegetales de hojas verdes, crecen durante el invierno y otros durante el verano; algunos son perennes y otros de estación.

Actualmente se conocen cerca de mil especies de plantas con hojas comestibles.

Las plantas de hojas comestibles son bajas en calorías, bajas en grasa, altas en proteína por caloría, altas en fibra, altas en hierro, magnesio y calcio. Al igual que muchos vegetales contienen antioxidantes que ayudan al organismo a desintoxicarse, lo cual las sitúa entre los alimentos que ayudan a reducir los riesgos de cáncer.

Sobre todo las hojas verde oscuro poseen grandes propiedades alimenticias. Son ricas en fibra, clorofila, beta caroteno (precursor de la vitamina A), en vitamina C, en calcio, hierro y magnesio. También contienen luteína y zeaxantina, las cuales se piensa que protegen la vista de cataratas y degeneración de la macula. Los folatos intervienen en la producción de glóbulos rojos y blancos, en la síntesis de material genético y en la formación de anticuerpos en el sistema inmunológico. <http://agnesmacrobiotica.blogspot.mx/2010/12/verduras-verdes-y-hojas-comestibles.html>

6.2.- El Quelites, frescas hierbas mexicanas

La palabra quelite procede de la voz náhuatl “quilitil”, utilizada comúnmente en el centro de la República Mexicana para designar varias especies de hierbas silvestres de follaje tierno y comestible.

Durante muchos años los quelites fueron de consumo rural, en preparaciones caseras o incluidas en el forraje, pero desde el punto de vista nutricional, los quelites son importantes para complementar la dieta. Además algunos se usan con propósitos medicinales.

Estas plantas aparecen en las milpas comúnmente en temporada de lluvias, eran desechadas por muchos por ser consideradas mala hierba, en la actualidad su valor gastronómico va a la alza.

Su utilización no es nada nuevo, desde tiempos prehispánicos eran apreciados e incorporados en la dieta de uso común. Y ahora, el afán por rescatar ingredientes tradicionales los trae de nueva cuenta al plato.

Algunos chefs e investigadores mencionan que los quelites por lo general no se cultivan, sino que crecen espontáneamente en el sistema de milpas, siendo básicamente hierbas jóvenes, brotes, retoños y flores mexicanas tiernas comestibles.

Existen más de 400 variedades y suelen crecer alrededor del maíz y el frijol. No son arbustos ni matas, son una familia herbal mexicana que vive un auge en las grandes cocinas y se han vuelto cada vez más comunes en tiendas y mercados gourmet. Encontrando una gran variedad durante todo el año.

Preferentemente deben ser consumidos muy tiernos, ya que la mayoría cambia a un sabor amargo cuando madura.

Quintonil, chípil, pipicha, verdolaga, romerito, cenizo, lengua de vaca, chaya, hierbamora, pápalo, epazote, cilantro, berro, alache, etcétera... algunos de ellos pueden ser indigestos, pero pueden ser protagonistas o excelentes acompañantes en un sin fin de platillos.

El pápalo y el epazote en exceso pueden llegar a ser indigestos, las hojas de a cuyo o hierba santa deben blanquearse e igualmente las hojas de chaya en las que se encuentran grandes cantidades de cianuro, con ello se obtiene un mejor sabor. (Óscar Gutiérrez, 2012)

6.3.- Plantas comestibles no convencionales en Chiapas

En la república mexicana el estado de Chiapas se caracteriza por ser uno de los estados con mayor diversidad florística y étnica. Según Miranda existen aproximadamente 128 alimentos de origen vegetal no convencionales, pero actualmente se considera que puede ser superior a 200 el número de plantas silvestres comestibles. (Chávez 2010) reporta que se conocen 71 de estos vegetales no convencionales, describiendo aspectos: etnobotánicos culinarios y químico nutracéuticos. El proceso alimentación-nutrición es interdisciplinario y en las comunidades rurales el papel que juega la cultura en su estrecho vínculo con las variaciones de la naturaleza y por ende con la salud nutricional es directo. El conocimiento tradicional en relación al uso de las especies comestibles por los grupos indígenas es diverso, y de estas especies comestibles no todas son vendidas en los mercados y la transmisión oral entre ellos, no permanece, sobre todo en las nuevas generaciones se está perdiendo sin mencionar la deforestación.

Además, en los medios urbanos existe cierta competencia con los alimentos conservados con tecnología moderna y exceso de publicidad.

6.3.1.-Lista de algunas plantas no convencionales:

Ajalte, alcachofa, ashen'té, blede, bushná, cacaté, caco, caimito, canela, capulín, caspirola, cilantro, condua, chaya, chípil, chipilín, cupape, cilantro, chaco, etc.

6.3.2.- Diferenciación de chípil y chipilín

El chipilín y el chípil pertenecen a la misma familia fabácea, son catalogados como quelite debido a que las dos son plantas silvestres y con follajes tiernos comestibles y utilizados como alimento esencial por muchas comunidades rurales de Mesoamérica, comprende una diferenciación tanto la asignación de su nombre y su significado, como su taxonomía, mas sin embargo comprende una característica muy peculiar en la gastronomía ya que se preparan de igual forma en diferentes platillos. Tanto el chípil y el chipilín crecen de manera abundante durante todo el año, sin embargo su crecimiento dependerá de la ubicación geográfica, por ejemplo en Chiapas el chípil crece la cabecera municipal Las Margaritas y sus alrededores, la población que la utilizan son Tojolabal y mestiza, el clima de este lugar es templado.

El chipilín crece en las regiones de Tuxtla Gutiérrez y aledaños, donde la población que la utiliza son Mestiza y zoque y su clima de esta región es muy tropical. (Chávez Quiñones y col, 2009)

6.4.- Chipilín (*Crotalaria longirostrata*)

El chipilín es un vegetal considerado por muchos como un quelite (del vocablo nahuatl quiltil que es verdura tierna comestible).

El nombre de chipilín corresponde a su nombre científico *Crotalaria longirostrata* es una planta originaria del sur de México y Centroamérica, es la especie más utilizada como alimento, donde se consumen las hojas y los brotes tiernos y es utilizado como un acompañamiento en diferentes platillos, sus hojas son rica en proteína, de alto contenido en lisina, por lo que es un excelente suplemento de los cereales, además de un elevado contenido de carotenos de alta biodisponibilidad, crece en terrenos húmedos, laderas abiertas y plantadas en campos y jardines. (Rivas Larios y col; 2003)

El origen de la palabra «chipilín»: del Náhuatl, cuyo significado es «alimento con que los enfermos tomarán fuerza», y de la palabra Tzotzil «Tsi-ipilli» que significa «hierba de la fuerza». De los diversos «chipilines» que se consumen en México, el «chipilín blanco» (*Crotalaria longirostrata*) es el que se emplea en la alimentación tradicional del estado de Chiapas. *C. longirostrata* crece de forma silvestre o en cultivo de traspatio y sus tallos y hojas jóvenes son empleadas para preparar diversos alimentos, ya sea como aderezo o como componente principal.

En Chiapas el consumo de *C. Longirostrata* es generalizado, ya que una encuesta realizada por Joo (1987) reveló que el 92% de la población la utiliza en su alimentación y el restante no la usa por considerarla desagradable, tanto en su sabor como en su aroma, además de argumentar que es una planta que les causa daño, manifestando que les causa dolor de cabeza, nerviosismo y problemas estomacales. Así mismo se comenta que *C. Longirostrata* induce una situación de somnolencia después de ser ingerida. Diversos compuestos se han aislado de algunos miembros del género *Crotalaria*, entre éstos los alcaloides son los más reportados. Así mismo se han reportado compuestos de interés farmacológico, como la monocrotalina que tiene actividad antineoplásica y no se ha reportado la

presencia de alguna sustancia que pueda inducir sueño (Hall, 1995). (Rodríguez Campos y col; 1998)

6.5.- Usos de la planta chipilín (*Crotalaria longirostrata*)

El uso de esta planta puede ser de dos formas:

A) Gastronómica

Con el chipilín se cocinan diferentes platillos según la región.

- En el Salvador es muy popular la sopa de chipilín (se hierva la planta y se le agrega chile verde, cebolla, ajo, huevos y algunas especias, al igual que sus muy populares pupusas hechas de queso y chipilín que les fascinan a todos sus pobladores y más cuando quieren una buena noche de sueño, comercializado a nivel local y también exporta a un distribuidor (Lupita productos) en Los Ángeles, California. (JULIA F. MORTON; 1994)
- En Honduras, chipilín sólo se utiliza en la sopa.
- Guatemaltecos consumen una gran parte de las hojas jóvenes y brotes de hojas, simplemente cocidos como verdes, o añadirse a sopas, guisos, y tortillas (Munsell y col, 1950)
- En Chiapas hacen el tamal de chipilín relleno de queso, de pollo o de ambos. También en Chiapas se hace un caldo con esta hierba, añadiéndole camarón seco y bolas de masa frita, tal y como se muestra en la figura 1. (a) y (b). El chipilín es muy usado en Chiapas vendiéndose en las calles de muchas ciudades del mismo.

(a)



(b)



Fig. 1 Preparación gastronómica del chipilín (a) para tamales y (b) en caldo.

B) Medicinales

- Su consumo reduce el estrés; ayuda al crecimiento, la reparación de tejidos y la producción de hormonas, enzimas y anticuerpos. Importante en la recuperación de pacientes con anemia. Es una rica fuente de proteína vegetal. (Ecky Santoyo; 2013)
- El extracto de la flor se emplea en Guatemala como un sedante, y para el tratamiento de nerviosismo, hemorragias, y la disentería. (Aguilar Giron 1966)
- A las hojas en crudo se le atribuyen propiedades hipnóticas, mineralizante, narcótica, purgante y vomitiva. (Julia F. Morton; 1994)

6.6.- Tablas de valor nutricional del chipilín de diferentes literaturas.

En la tabla 1 se presenta el valor nutricional y calidad proteica de tres plantas autóctonas de Guatemala (chipilín, hierba mora y bledo). Reportado por (Rivas Larios; 2014)

Tabla 1. Valor nutricional del maíz, frijol y de las plantas de chipilín, bledo y hierba mora o quelite y en 100 gramos de producto.

Nutrientes	Chipilín	Bledo	Hierba mora	Maíz	Frijol
Kilocalorias (Kcal)	57	32	45	365	343
Agua (%)	81.8	87.7	85	10.37	10.40
Proteína (g)	7.1	2.72	5.1	9.42	22.70
Grasas (g)	1	0.55	0.8	4.74	1.60
Carbohidratos(g)	8.7	5.73	7.3	74.26	61.60
Fibra cruda(g)	8.7	5.73	7.3	74.26	61.60
Ceniza(g)	1.4	2.54	1.8	1.2	3.70
Calcio (mg)	248	278	226	7	134
Fosforo(mg)	74	81	74	210	415
Hierro(mg)	4.9	6.34	12.6	2.71	7.10
Vitamina A(mcg)	3843	517	1883	11	0
Tiamina (mg)	0.33	0.05	0.20	0.38	0.47
Riboflavina (mg)	0.52	0.24	0.35	0.2	0.15
Niacina (mg)	2.02	1.2	0.97	3.63	2.09
Ácido ascórbico (vitamina C)(mg)	112	65	92	0	1

Fuente: Adaptado de Bressani, R. Rottmann, M. Grünes, C. (1993) (a) (17). Tabla de composición de alimentos de Centroamérica, (2009)

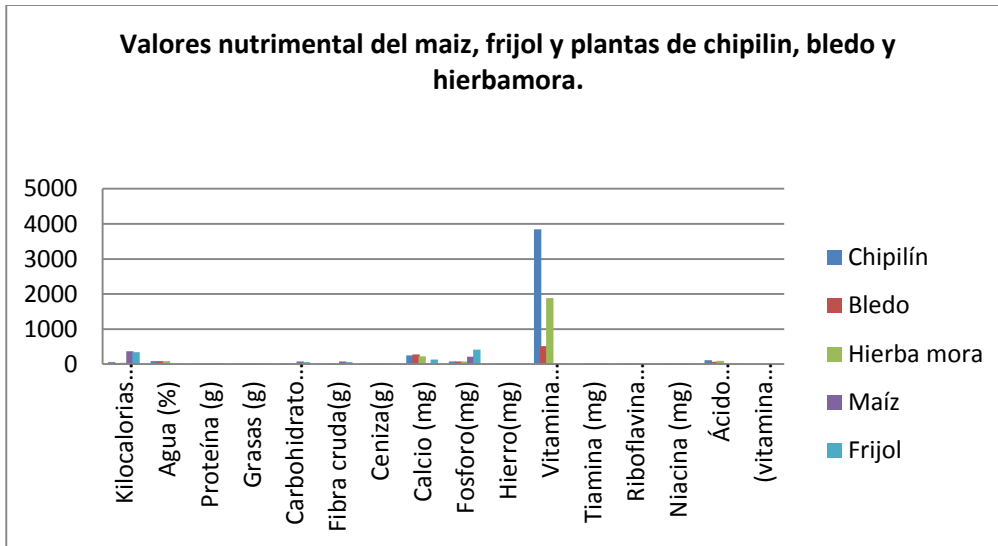


Fig. 2 Valor nutricional del maíz, frijol y de las plantas de chipilín, bledo y hierba mora o quelite y en 100 gramos de producto.

En la tabla 2 se presentan valores nutricionales de plantas no convencionales en Chiapas (Chipilín), reportado por (Chávez Quiñones y col, 2010).

Tabla 2. Valores nutricionales de humedad, prótidos, lípidos y fibras en 100 gramos de producto (chipilín) de la región de Tuxtla Gutiérrez Chiapas.

Humedad (%)	Prótidos (g)	Lípidos (g)	Fibra (g)
80.70	6.90	0.60	2.20

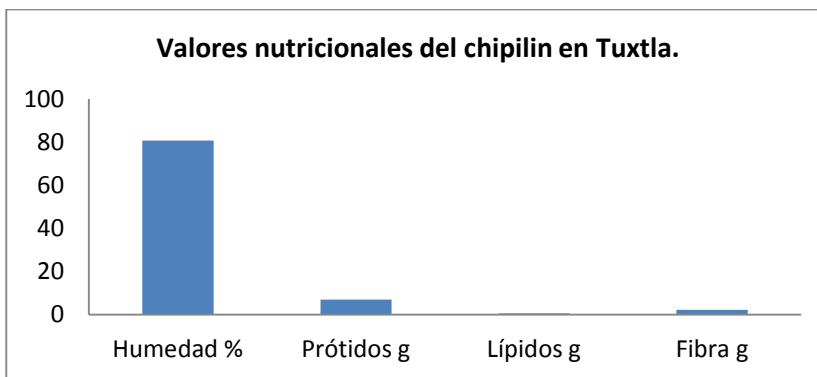


Fig.3 Valores nutricionales de humedad, prótidos, lípidos y fibras en 100 gramos de producto (chipilín) de la región de Tuxtla Gutiérrez Chiapas.

En la tabla 3 se presentan estudio gastronómico y nutricional del chipilín en el Salvador, reportado por (Alegria Salmerón y col, 2006).

Tabla. 3. Valores nutricionales de proteína, grasas, carbohidratos, fibra, cenizas en 100 gramos de) producto (chipilín) en hojas y puntas en el Salvador.

Proteína (g)	Grasa (g)	Carbohidrato(g)	FC(g)	Ceniza g
7.00	0.80	9.10	3.24	1.50

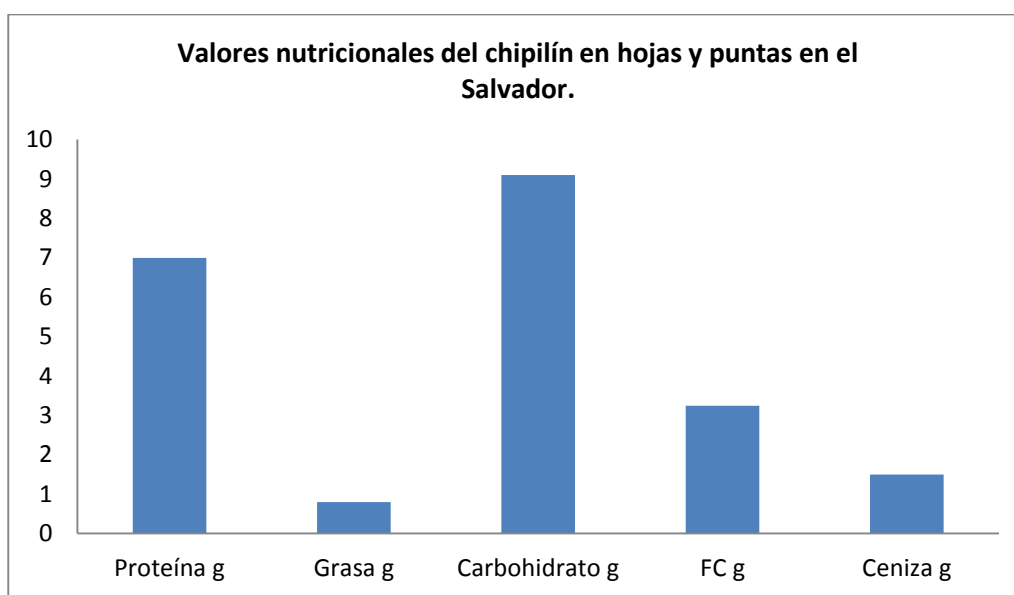


Fig. 4 Valores nutricionales de proteína, grasas, carbohidratos, fibra, cenizas en 100 gramos de producto (chipilín) en hojas y puntas en el Salvador.

En la tabla 4 y 5 se presentan la composición química de las diferentes partes de la planta del chipilín, obtenida en Veracruz y en la tabla 5 se presenta las fracciones de fibras presentes en la planta, reportado por (L Arias y col; 2003).

Tabla 4. Contenido de materia seca (DM), proteína (CP), extracto etéreo (EE), fibra bruta (CF) y extracto libre de nitrógeno (ELN) en las diferentes partes de del chipilín como tallos con hojas, hojas con peciolo y hojas.

Porción de la planta	DM, %	CP, % MS	EE, % MS	CF, % MS	Ceniza, % MS	ENF, % MS
Tallos-con-hojas	20.0	30.6	1.3	22.8	8.0	37.1
Hojas-con-peciolo	13.0	36.3	1.9	13.1	8.5	39.9
Hojas	10.0	38.3	2.2	11.8	9.2	38.3

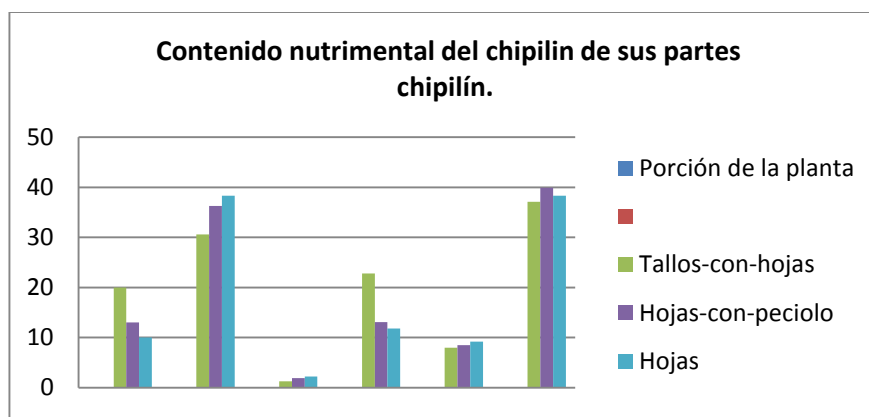


Fig. 5 Contenido de materia seca (DM), proteína (CP), extracto etéreo (EE), fibra bruta (CF) y extracto libre de nitrógeno (ELN) en las diferentes partes de del chipilín como tallos con hojas, hojas con peciolo y hojas.

Tabla5. Fracciones de fibras en las diferentes partes del chipilín como tallos con hojas, hojas con peciolo y hojas.

Las fracciones de fibra	Tallos-con-hojas, % MS	Hojas con peciolo, % MS	Hojas, % MS
Fibra detergente neutro	33.8 ± 2.39	28.4 ± 5.29	22,5 ± 1,73
Fibra ácido detergente	26.2	15.5	13.6
Celulosa	21,5 ± 0,55	13.1 ± 2.20	11,1 ± 0,12
Hemicelulosa	7.59 ± 2.18	12.8 ± 3.06	8.99 ± 2.12

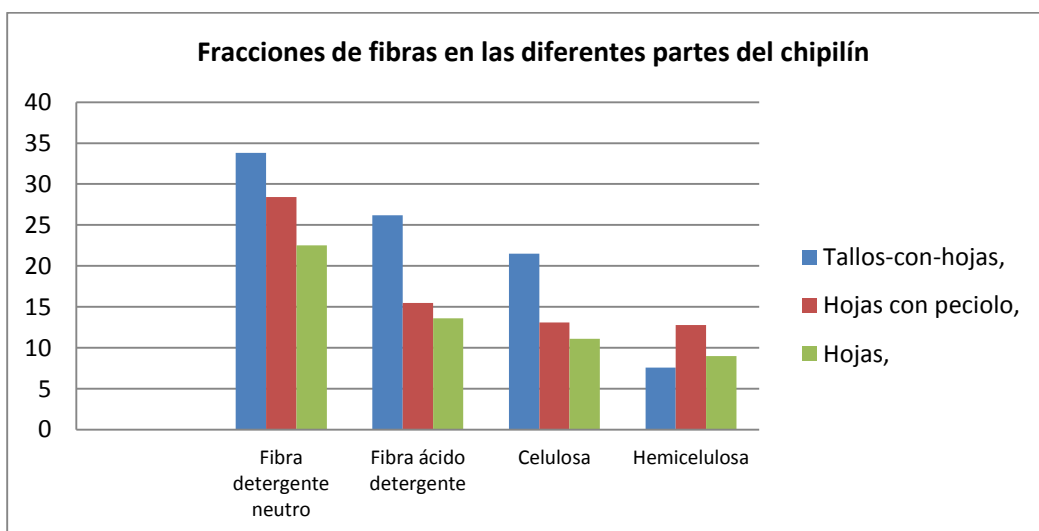


Fig.6 Fracciones de fibras en las diferentes partes del chipilín como tallos con hojas, hojas con peciolo y hojas.

En la tabla 6 se muestran los resultados de los valores de concentración de compuestos polifenólicos de las plantas estudiadas de chaya y chipilín (mg equivalentes de Ácido gálico/g de muestra fresca), (metanol y agua) reportado por (Valdez Villareal y col, nd).

Tabla 6. Concentraciones de los compuestos polifenolicos (mg equivalente de ácido gálico /g de muestra) de las plantas de chaya y chipilín.

Chaya	Chipilín
97.76±0.91	92.98±0.64

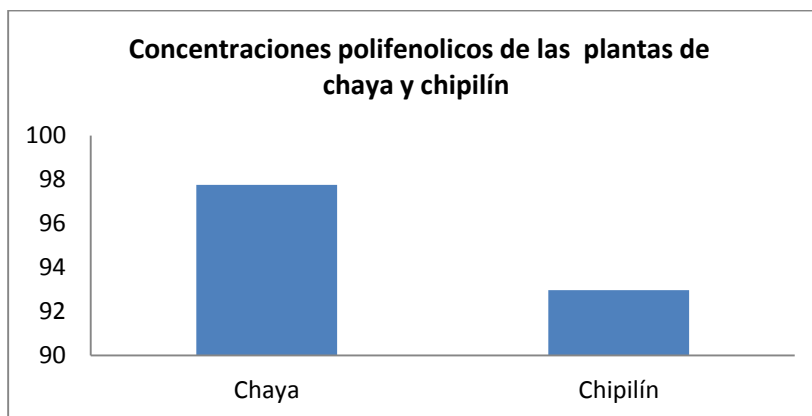


Fig.7 Concentraciones de los compuestos polifenolicos (mg equivalente de ácido gálico /g de muestra) de las plantas de chaya y chipilín.

En la tabla 7 Se muestran los resultados de las determinaciones de porcentaje de inhibición de cada dilución y cada extracto (metanol y agua) , reportado por (Valdez Villareal y col, nd).

Tabla 7. Porcentajes de inhibición de DPPH, con cada extracto de las plantas de chipilín y chaya.

Chipilín	Chaya
% inhibición	% inhibición
20.64±0.5796	24.63±0.708
26.21±0.2676	30.67±0.9817
36.88±0.9817	39.5±0.8997

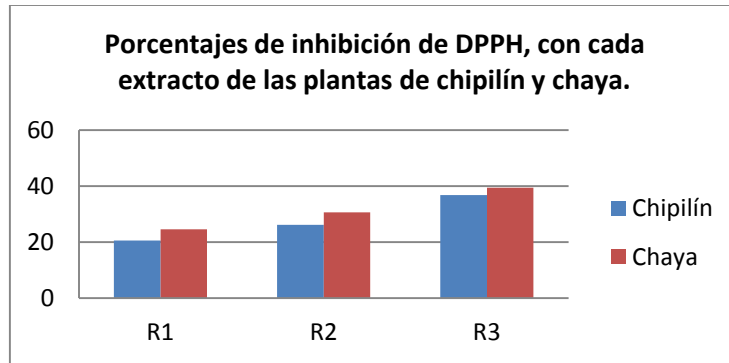


Fig.8 Porcentajes de inhibición de DPPH, con cada extracto de las plantas de chipilín y chaya

6.7.- Taxonomía

Según (Hook Y Arn 1838) *La Crotalaria longirostrata* (Chipilín) es un arbustos perteneciente de la familia fabácea que su crecimiento seda de forma silvestres en muchos lugares de Centro américa, su crecimiento seda de forma anual y a veces permanece todo el año dependiendo en la región en que se encuentre, es un vegetal indígena por su crecimiento repentino y rápido.

Crece de manera vertical alcanzando un tamaño de hasta 2 m de alto; tallos terete casi glabros con delgadas ramas verticales o arqueadas casi cilíndricas, contiene en pelos diminutos.

Folículos 3, elípticos, 2.3–3.5 cm de largo y 1.1–1.5 cm de ancho, los laterales más pequeños, ápice agudo a redondeado, base cuneada, haz glabra, envés estriguloso; pecíolos 2.2–3.2 cm de largo, estípulas linear-trianguares y rizadas, 1.5–2 mm de largo.

Inflorescencias 14–25 cm de largo, con 18–30 flores, pedicelos 5–6 mm de largo, brácteas filiformes, 3 mm de largo, bractéolas ca 1 mm de largo, por encima de la mitad del pedicelo, flores amarillas, ocasionalmente con machas rojas; lobos del cáliz 3–5 mm de largo y 2 mm de ancho; estandarte 11–16 mm de largo y 8–10 mm de ancho, a las 11–14 mm de largo y 4–5 mm de ancho, quilla 12–16 mm de largo y 8–11 mm de ancho, con un rostro muy prolongado e incurvado distalmente.

Legumbres 1.8–1.9 cm de largo, pubescentes, cafés; semillas reniformes, cafés.

Tabla 8. Taxonomía de la *Crotalaria Longirostrata* descrita por Hook y ARN 1838.

TAXONOMIA	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Subfamilia	Faboideae
Tribu	Crotalarieae
Genero	Crotalaria
Especie	Crotalaria Longirostrata



Fig.9 Imagen del Chipilín (*Crotalaria Longirostrata*) con sus ramificaciones (Hook y ARN 1838)

6.8.- Análisis bromatológico

Un análisis bromatológico conocido también como análisis físico-químico, son la evaluación de la materia que componen los nutrientes como son: proteínas, azucares totales, grasas, MST, entre otras. Etimológicamente se puede definir como Broma, “alimentos” y logos “tratado o estudio, es decir la bromatología es una de las ciencias que se encarga del análisis de la calidad de los alimentos tanto sus características, valor nutricional y adulteraciones.

6.8.1.- Análisis de humedad y contenido de sólidos totales

Uno de los procedimientos analítico más fundamentales en el análisis de los alimentos es el ensayo en busca de la cantidad de humedad presentes en los alimentos. La materia que permanece después de la separación de la humedad se conoce como sólidos totales. Este valor analítico es de sumamente importante para la industria alimentaria, ya que el agua es un relleno económico.

La humedad es uno de los factores de calidad para la conservación de algunos productos y afecta a la estabilidad en; verduras y frutas deshidratada, como también para otros productos alimenticios, además de ser un factor esencial en el momento de empaque y manipulación.

El contenido de humedad va a variar según el alimento analizado, el contenido de humedades aproximado esperado puede afectar a la elección del método de medida. Así mismo también puede guiar al análisis en la determinación del nivel práctico de exactitud requerido cuando se mide el contenido de humedades, en relación con otros componentes de los alimentos.

La eliminación del agua presente en los alimentos va a depender de cómo se encuentre, los tres estados son:

- **Libre:** esta agua conserva sus propiedades físicas y, en consecuencia, actúa como agente dispersante para los coloides y como disolvente para sales.

- **Adsorbida:** esta agua está firmemente sujeta u ocluida en las paredes celulares o el protoplasma, y está sujeta en las proteínas.
- **Hidratación:** esta agua se encuentra enlazada químicamente.
(S. Suzanne Nielsen; 2009)

6.8.2.- Cenizas

Este método se refiere a los residuos inorgánicos que permanece, ya sea después de la calcinación o tras la oxidación completa de la materia orgánica de un comestible. En este método se utilizan dos tipos de calcinación: la calcinación por vía seca, principalmente para la composición inmediata y para algunos tipos de análisis específicos de elementos inorgánico; y la calcinación por vía húmeda(oxidación) con una preparación para el análisis de determinados elementos inorgánico.

El contenido de ceniza de los alimentos puede ser expresados bien sea sobre la base del peso en húmedo (tal como se ha recibido) o bien del peso seco.

- **la calcinación por vía seca:** se refiere a la utilización de un horno de mufla, con capacidad de temperatura de 500 y 600 °C. el agua y los componentes volátiles se evaporizan y las sustancias orgánicas son incineradas, en presencia del oxígeno del aire, para dar CO₂ y óxidos de nitrógeno.
- **La calcinación por vía húmeda;** es un procedimiento para oxidar las sustancias orgánicas mediante los usos de ácidos y agentes oxidantes. (S.Suzanne Nielsen, 2009)

6.8.3.- Azúcares totales

La determinación de los azúcares totales en los alimentos es de gran importancia en la tecnología de los alimentos ya que tienen funciones muy específicas en nuestro organismo además de proporcionar al alimento características organolépticas.

Para su análisis existen una gran variedad de métodos utilizados en la industria alimentaria, cuando se requiere determinar el análisis del contenido en azúcares reductores o azúcares totales, se utiliza los métodos químicos basados en la reducción del cobre es una opción muy adecuada. A su vez, este tipo de metodología incluye una gran variedad de métodos, entre los que cabe destacar el método de Fenol-sulfúrico, en este tipo de método los carbohidratos se logran destruir por calor y por adición de ácido y son particularmente sensibles a ácidos fuertes y altas temperaturas. Complejas toman lugar empezando con una deshidratación simple, si se continúa. (Dubois y Col. 1956)

El calentamiento y la catálisis ácida se producen varios derivados del furano que condensan consigo mismos y con otros subproductos para producir compuestos coloridos producto de la condensación de compuestos fenólicos y con heterociclos con el nitrógeno como heteroátomo. La condensación más común es con fenol. Este método es fácil, eficaz y rápido. Todos los azúcares como oligosacáridos y polisacáridos pueden ser determinados, recordando que éstos bajo hidrólisis ácida producen monosacáridos.

Bajo estas condiciones una serie de reacciones complejas toman lugar empezando con una deshidratación simples, si se continúa el calentamiento y la catálisis ácida se producen varios derivados del furano que condensan consigo mismos y con otros subproductos para producir compuestos oscuros o compuestos coloridos producto de la condensación de compuestos fenólicos y con heterociclos con el nitrógeno como heteroátomo. La condensación más común es con fenol y es un método fácil, eficaz y rápido. Todos los azúcares como oligosacáridos y polisacáridos pueden ser determinados, recordando que estos bajo hidrólisis ácida producen monosacáridos. La forma en que procede la reacción no es estequiometría y depende de la estructura del azúcar, por lo tanto se realiza una curva patrón. La intensidad del color naranja es proporcional a la cantidad total de carbohidratos presentes. Esta absorbancia puede ser medida a 492nm y la concentración total de carbohidratos de las soluciones problema puede ser medida con respecto a una curva estándar preparada.

Los carbohidratos son compuestos formados por carbono, hidrogeno y oxígeno, sintetizados a partir de CO₂ (dióxido de carbono) y H₂O por los organismo fotosintéticos, mediante el aprovechamiento de la energía de luz solar (fotosíntesis).

La clasificación de los carbohidratos son: monosacáridos, disacáridos, polioles, oligosacáridos y polisacáridos. (Toledo Medina; 2013)

Los azúcares reductores son aquellos azúcares que presentan un grupo aldehído (aldosa) que pueden ceder electrones(es decir, actúan como agentes reductores) a un agente oxidante, el cual se reduce al recibir los electrones. La oxidación del grupo aldehído da lugar a un grupo ácido carboxilo. Bajo condiciones alcalinas, las acetosa se comportan como agentes reductores suaves, dado que se isomerizaran a aldosa. (S. Suzanne Nielsen, 2009).

6.8.4.- Proteínas

Las proteínas son compuestos abundantes de todas las células, y todas ellas, con excepción de las proteínas de almacenamiento, son de gran importancia para la función biológica y la estructura de las células. Las proteínas de los alimentos son muy complejas. Muchas de ellas han sido purificadas y caracterizada, muchas de ellas varían según su masa molecular, abarcando desde 5.000 millones hasta un millón de daltonios.

Estas están compuestas de hidrogeno, carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre. 20 aminoácidos son piezas esenciales para su estructura, donde los residuos de aminoácidos se encuentran unidos por un enlace peptídicos. El nitrógeno es uno de los elementos más característicos de las proteínas, no obstante el contenido de nitrógeno abarca un 13.4 % hasta un 19.1 %, debido a la variación en la composición específica de aminoácidos de la proteína.

Las proteínas se pueden clasificar según su composición, estructura, función biológica o sus propiedades de solubilidad.

Las proteínas presentan una conformación única, que puede ser alterada por agentes desnaturalizadores como el calor, ácidos, álcalis, urea 8 M, guanidina-HCl 6 M, disolventes orgánicos y detergentes. Como también la solubilidad podría verse afectada por agentes desnaturalizantes.

El análisis de las proteínas viene complicado por algunos componentes alimentarios que presentan propiedades físico-químicas muy similares.

El nitrógeno no proteico provendría de los aminoácidos libres, péptidos pequeños, ácidos nucleicos, fosfolípidos, aminoazúcares, porfirina y algunas vitaminas, alcaloides, ácidos úricos, urea y iones amonio. Por lo tanto el contenido total de nitrógeno orgánico en los alimentos pertenece a las proteínas.

Se ha desarrollado diferentes métodos para determinar el contenido de proteínas en los alimentos. Donde el principio básico de este método, incluyen la determinación de nitrógeno, de enlaces peptídicos, aminoácidos aromáticos, capacidad de unión de los tintes, absorbancia de las proteínas (UV) y de dispersión de la luz. (S. Suzanne Nielsen: 2009)

6.8.5.- Fibras dietéticas

La fibra dietética es la parte comestible de las plantas o los hidratos de carbono análogos que son resistentes a la digestión o absorción en el intestino delgado humano, con una fermentación parcial o completa en el intestino grueso.

La fibra dietética incluye a los polisacáridos, oligosacáridos, lignina y sustancias vegetales asociadas. La fibra dietética tiene efectos fisiológicos benéficos para la salud, tales como la laxación o la atenuación del colesterol sanguíneo o la disminución de la glucosa en la sangre.

En sí la fibra dietética es la suma de los componentes no digeribles de un producto alimenticio. La mayor parte de ella, casi toda es material de las paredes celulares de los vegetales (celulosa, hemicelulosa y lignina) por lo consiguiente están compuestas de polisacáridos.

Puesto que solo son digestibles las moléculas de amilosa y amilopectina en el almidón cosido, todos los demás polisacáridos son parte de las fibras cruda, algunos insolubles y otros contribuyen a la fibra soluble.

La fibra insoluble es la celulosa, celulosa microcristalina añadida como un ingrediente alimentario, la lignina, hemicelulosa inmovilizada en una matriz lignocelulosica y el almidón resistente.

El consumo de la fibra dietética procedente de diversos alimentos ayuda a prevenir diferentes enfermedades como cáncer de colon, ayuda a normalizar los lípidos en la sangre y a disminuir enfermedades cardiovasculares.

Componentes principales de las fibras dietéticas son:

- **Celulosa:** polímero lineal formado por la unión B-D-glucopiranosilo (1). Algunas moléculas pueden contener (10.000 o más unidades glucosilos. El enlace de hidrogeno entre polímeros paralelos forma microfibrillas fuertes. Las microfibrillas de celulosa proporcionan la fuerza y la rigidez a la pared celulares primarios y secundarios de las plantas.
- **Hemicelulosa:** son un grupo heterogéneo de polisacáridos, siendo su única similitud entre ellas su asociación con la celulosa en las paredes celulares. las unidades de D-xilosa, D-manosa y D-galactosa forman, con frecuencia, las estructuras de sus cadenas principales; las unidades de L-arabinosa, D-galactosa y de los ácidos uronicos, las cuales están a menudo presentes como unidades ramificación o en cadenas laterales. La hemicelulosa pueden ser solubles o insolubles en agua.
- **Lignina:** es un polímero distinto de un hidrato de carbono, tridimensional, insoluble en agua y un componente principal de las paredes celulares de los vegetales superiores terrestres, la lignina puede estar unida covalentemente a la hemicelulosa. (S. Suzanne Nielsen; 2009)

- **Determinación de fibra acida detergente**

Este procedimiento nos permite rápidamente determinar la lignocelulosa en los alimentos, mas sin embargo también aparece una fracción de Silice. Y como también este método nos ayuda a tener una determinación preliminar de la lignina. (Van´ Soest; 1967)

- **Determinación de fibra neutra**

En este método se hierve a reflujo con una solución neutra una muestra de alimento, secado a una temperatura inferior 55°C. Donde el residuo obtenido es llamado pared celular, si es de un material vegetal y si no es de un material no vegetal se le denomina fibra detergente neutra. (Van´Soest, 1967)

6.8.6.- Lípidos

Los lípidos son un componente principal de los alimentos, los cuales son un grupo de sustancias que en general son solubles en éter, cloroformo u otros disolventes orgánicos, pero que son escasamente solubles en agua. Algunos lípidos como los triglicéridos (triacilgliceroles), son muy hidrófobos. Otros lípidos, tales como los di y monogliceridos, contienen en su molecula ambos constituyentes, hidrófobos e hidrófilos, y son solubles en disolventes polares. Los acidos grasos de cadena corta tales como los C1-C4 son totalmente miscible con el agua e insolubles en disolventes polares, mas sin embargo, la definición más ampliamente aceptada es la solubilidad.

Mientras que la mayor parte de las macromoléculas son clasificadas por sus características estructurales, la designación de lípido se hace referencia por las características de solubilidad.

Los lípidos abarcan un amplio grupo de sustancias que presentan propiedad y composición en común, los triglicéridos son grasas y aceites que representan una de las categorías más extensas del grupo de compuestos de los lípidos.

6.8.6.1.- Clasificación general:

- **Lípidos simples:** son los éteres de los ácidos grasos con los alcoholes (grasas y ceras)
- **Lípidos complejos:** son los compuestos que contienen otros grupos funcionales, además de éter de un ácido graso con un alcohol (fosfolípidos, cerebrosidos, esfingolípidos). (S. Suzanne Nielsen, 2009)

6.8.7.- Determinación de ELN

El ELN representa a la fracción de los carbohidratos solubles que se encuentran en muchos alimentos, por ejemplo almidones, glucosa, fructosa, sacarosa etcétera, pero no se determina por un método químico de laboratorio, sino que se calcula.(J. Manuel Martínez, 2010)

6.8.8- Fenoles

Los compuestos naturales fenólicos han jugado un papel muy importante en los procesos de oxidación lipídica y se les asocia con la actividad antioxidante, además se les ha considerado en los últimos años como un efecto inhibitorio sobre la mutagénesis y carcinogénesis en los humanos cuando son parte esencial en la dieta alimenticia diaria.

El término «compuestos fenólicos» se refiere a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol, nombre popular del hidroxibenceno, unido a estructuras aromáticas o alifáticas. Únicamente, algunos compuestos fenólicos de la familia de los ácidos fenoles no son polifenoles, sino monofenoles.

Los compuestos fenólicos tienen su origen en el mundo vegetal. Son unos de los principales metabolitos secundarios de las plantas y su presencia en el reino animal se debe a la ingestión de éstas. Los fenoles son sintetizados *de novo* por las plantas y son regulados genéticamente, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo,

aunque a este nivel también existen factores ambientales. Además, actúan como fitoalexinas (las plantas heridas secretan fenoles para defenderse de posibles ataques fúngicos o bacterianos) y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta (p. ej. los antocianos son los responsables del color rojo, naranja, azul, púrpura o violeta que encontramos en las pieles de las frutas y hortalizas). Por otro lado, cuando los fenoles son oxidados, dan lugar a las quinonas que dan un color pardo que muchas veces es indeseable.

Los fenoles se encuentran casi en todos los alimentos de origen vegetal. Son alimentos ricos en fenoles la cebolla, el té, el vino tinto, el cacao, el aceite de oliva virgen, etc. Estas sustancias influyen en la calidad, aceptabilidad y estabilidad de los alimentos, ya que actúan como colorantes, antioxidantes considerada como la actividad biológica responsable del efecto preventivo de algunas enfermedades de origen cardiaco e inmunológico y proporcionan sabor.

6.8.1.- Clasificación general

Los polifenoles se pueden clasificar de muchas maneras debido a su diversidad estructural (fig.10). Según su estructura química tenemos 2 grandes grupos:

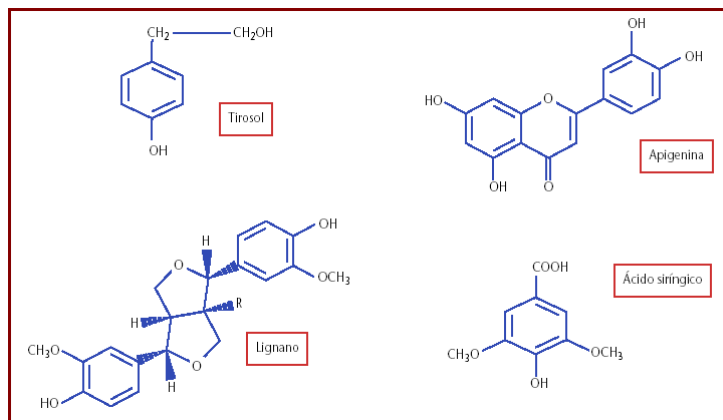


Fig.10 Ejemplos de estructuras de compuestos fenólicos. (Gimeno Creus; 2004)

Uno de los mecanismos de estos compuestos más importantes tienen la capacidad de captar los radicales libres que puedan generar en las células del cuerpo humano.

Donde los radicales actuarán sobre ácidos grasos poliinsaturados, colesterol, ADN y lípidos, donde los dos últimos son más susceptibles a la sustracción de electrones por parte del radical que lo requiere para alcanzar su estabilidad electroquímica y donde los antioxidantes actuarán como una fuente de hidrogeno y protegerá a los compuestos anterior mente mencionado, dando pie a que el mismo se oxide. (Polo Vidal y Col; 20016)

6.8.2.- Propiedades beneficiosas: papel en la prevención de enfermedades

Los compuestos fenólicos que encontramos en los distintos alimentos constituyen una fracción muy compleja formada por un número muy grande de compuestos, algunos todavía no identificados. La concentración en polifenoles de cualquier alimento también es muy variable, porque depende de muchos factores tales como la variedad o el grado de maduración del vegetal. También su biodisponibilidad es muy variable: muchos de ellos son metabolizados por microorganismos del colon antes de ser absorbidos. Además, los procesos tecnológicos y los hábitos culinarios del consumidor pueden reducir en gran parte los fenoles del alimento.

Los compuestos fenólicos que encontramos en los distintos alimentos constituyen una fracción muy compleja formada por un número muy grande de compuestos, algunos todavía no identificados

Los polifenoles tradicionalmente han sido considerados como antinutrientes por los nutricionistas de animales, debido al efecto adverso de los taninos sobre la digestibilidad de las proteínas que provoca un menor crecimiento del ganado y una menor puesta de huevos por parte de las aves de corral. Sin embargo, actualmente hay un interés creciente debido a su capacidad antioxidante, tanto como captadores de radicales libres como quelantes de metales. Estas propiedades antioxidantes son el motivo de sus posibles implicaciones en la salud humana, como son la prevención del cáncer, de las enfermedades cardiovasculares o incluso de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. Como hemos comentado anteriormente, también existen sustancias con actividad estrogénica

(fitoestrógenos) como las isoflavonas, los lignanos y el estilbeno resveratrol, y otras con propiedades antimicrobianas.

6.8.3.- Características químicas generales

Lo más destacable de los compuestos fenólicos son sus propiedades antioxidantes. Por un lado, son muy susceptibles a ser oxidados y por otro, impiden que los metales catalicen las reacciones de oxidación. Así, los grupos hidroxilo, al estar unidos a un anillo bencénico, presentan la posibilidad de que el doblete del átomo de oxígeno interaccione con los electrones del anillo, lo que les confiere unas características especiales respecto al resto de alcoholes. Por otro lado, pueden actuar de quelantes (sobre todo los fenoles no flavonoides) y formar complejos con metales di o trivalentes, especialmente con el hierro y el aluminio, lo que puede tener también implicaciones nutricionales.

En cuanto a sus características organolépticas, los taninos son conocidos por dar sensación de astringencia (p. ej., en el vino), ya que son capaces de unirse a la proteínas lubricantes de la saliva por puentes de hidrógeno. (Gimeno Creus; 2004)

6.8.4.- Métodos para determinar fenoles totales

El método más utilizados para determinar fenoles torales es por el Folin- ciocalteu, la cual se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agente oxidantes, este reactivo contienen molibdato y tungstato sódico, que van a reaccionar con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotungstico. La transferencia de electrones a pH básicos donde reducen los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula.

El DPPH la cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción, en solución etanolica, además que el radical libre puede

obtenerse directamente sin una preparación previa. Cuando una solución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrogeno o con otra especie radical (R^*) se produce la forma reducida DPPH-H o DPPH-R con la consecuente pérdida de color y por lo tanto de la absorbancia. El parámetro IC50, que es la concentración necesaria para la obtención del 50 % de efecto, es generalmente usado para la interpretación de dicho método. (Polo Vidal y Col. 2016)

6.9.- Antioxidantes

Como se sabe las plantas de hojas comestibles son una fuente de bajas calorías, bajas en grasa, altas en proteína por caloría, alta en fibra, alta en hierro y calcio y muy buena fuente de fotoquímicos. Al igual que muchos vegetales contienen antioxidantes que ayudan al organismo a desintoxicarse, lo cual las coloca entre los alimentos que ayudan a reducir los riesgos de cáncer. Sobre todo las de hojas verde oscuro poseen grandes propiedades alimenticias. (Joe Reardon, nd)

En los últimos año la gran importancia de los antioxidantes en los alimentos en frutas y verduras ha tenido gran relevancia no solo por la capacidad de preservar las características organolépticas de muchos alimentos y su valor nutrimental, sino también porque al ser ingerido por el organismo ayuda a preservar en forma considerable la salud, y así reducir el riesgo de desarrollo de aquellas enfermedades crónicas.

Un antioxidante se puede definir como cualquier molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación (pérdida de uno o más electrones) de otras moléculas, generalmente sustratos biológicos como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos.

Los antioxidantes van actuar como una barrera en el organismo para evitar que los radicales libres actúen, causando envejecimiento y la oxidación. (Hernán Speisky, nd)

Un radical libre son moléculas "desequilibras", que contenga a lo menos un electrón desapareado en su orbital más externo y que sea capaz de existir de forma

independiente, por lo que son muy reactivos. Estos radicales recorren el organismo intentando captar un electrón de las moléculas estables, con el fin de lograr su estabilidad electroquímica y con potenciales reacciones en cadenas destructoras de las células del cuerpo.

Un antioxidante va a retrasar el proceso de envejecimiento combatiendo la degeneración y muerte de las células que provocan los radicales libres. La incapacidad del cuerpo humano para neutralizar a los radicales libres a los que está expuesto diariamente, obliga al hombre a recurrir a alimentos con las propiedades antioxidantes con capacidad de neutralizarlos. (Gutiérrez Zavala y col, 2007)

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una de las estrategias más aplicadas en las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración. No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* nos dan tan sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo*.

La capacidad antioxidante de una mezcla no viene dada solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes; también depende del microambiente en que se encuentra el compuesto. Los compuestos interactúan entre sí pudiendo producirse efectos sinérgicos o inhibitorios. Por otra parte, es necesario considerar que los ensayos *in vivo* pueden presentar algunos inconvenientes, como la adaptabilidad en respuesta al aumento del estrés oxidativo.

Alternativamente, diversos compuestos cromógenos (ABTS, DPPH, DMPD, DMPO y FRAP) son utilizados para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos que contienen los frutos y vegetales para captar los radicales libres generados, operando así en contra los efectos perjudiciales de los procesos de oxidación, que implican a especies reactivas de oxígeno

Los métodos más aplicados son ABTS y DPPH, ambos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias.

- En el método de ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP), enzimática (peroxidase, mioglobulina), o también electroquímica. Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico. El radical ABTS^{•+} tiene, además, la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico, mientras que el DPPH presenta un pico de absorbancia a 515 nm. (E. Marta KUSKOSKI y col, 2005)
- El DPPH la cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción, en solución etanólica, además que el radical libre puede obtenerse directamente sin una preparación previa. Cuando una solución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrogeno o con otra especie radical (R^{*}) se produce la forma reducida DPPH-H o DPPH-R con la consecuente pérdida de color y por lo tanto de la absorbancia. El parámetro IC₅₀, que es la concentración necesaria para la obtención del 50 % de efecto, es generalmente usados para la interpretación de dicho método. (Polo Vidal y col, 2016)

La capacidad antioxidante de un alimento depende de la naturaleza y concentración de los antioxidantes naturales presentes en él. El contenido de los principales antioxidantes en los alimentos varía de un alimento a otro, dentro del mismo grupo como el de frutas y vegetales.

Los frutos y vegetales que presenta mayor capacidad de antioxidantes serán a aquellos con presencia de carotenoide y fenoles, que son fitoquímicos presentes en los alimentos con un marcado poder reductor, que tienen el poder de combatir los radicales libres causantes del envejecimiento y de algunas enfermedades. (Gutiérrez Zavala y col, 2007)

7.- METODOLOGIA EXPERIMENTAL

7.1.- Caracterización de la materia prima

7.1.1.- Obtención de la materia prima

La recolección de muestra fue en viviendas de San Pedro Buenavista en los meses de septiembre y noviembre del 2015, en donde el cultivo es de traspatio donde se realizó una valoración de la calidad de la planta de 2 mts, para la obtención de la muestra requerida.

Cortando la mitad del tallo, para conservar la parte de la raíz en el suelo, para que rebrote a los quince días.

Luego se realizó una clasificación de la materia a estudiar, donde se separó las hojas del tallo, recolectando así hojas pequeñas y grandes, con peciolo y algunas flores, obteniendo aproximadamente un kilo y medio de materia fresca.

Continuando con un secado a sombra donde fue removida continuamente para tener una deshidratación homogénea a una temperatura ambiente, evitando que el sol le diera directamente a nuestra muestra durante 2 semanas. El resultado del proceso de secado se puede observar en la figura 11.



Fig.11 Resultado del proceso de secado de la planta del chipilín durante dos semanas.

Una vez teniendo un secado parcial, fue transportada de Chiapas a Saltillo con una durabilidad de viaje de 1 semana por vía terrestre, para luego proseguir con un análisis físico-químico en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Una vez que la materia prima llegó al centro de estudio se realizó una selección de las hojas con peciolo y algunas flores, para evitar que llevaran materias extrañas como palos, tallos, piedras, tierra entre otra. (Fig.12).

(a)

(b)



Fig.12 Resultado de la selección de hojas-peciolos-flores (a) y de materias extrañas en la muestra (b).

Teniendo la muestra ya clasificada se realizó una molienda utilizando un molino Torrey obtenido un peso de 472 g, estas partículas fueron almacenadas a temperatura ambiente en dos frascos, previamente etiquetados, hasta ser el proceso de análisis.

7.2.- Caracterización de la planta mediante análisis bromatológico (físico-química)

El análisis bromatológico a través de la metodología de la AOAC 1990, se llevó a cabo durante dos semanas, para cumplir con los objetivos propuestos dicha investigación y a su vez satisfacer con las necesidades de métodos analíticos de las agencias gubernamentales de reglamentación e investigación.

7.2.1.- Determinación de materia seca total (método indirecto por secado en estufa)

Para la determinación de materia seca total, se toman 3 crisoles de porcelanas de la estufa (Fig. 13).



Fig.13 Obtención de los crisoles de la estufa.

Dejando a enfriar por 20 minutos en un desecador, previamente se identificó el número que corresponde a cada crisol.

Transcurrido el tiempo pesar cada crisol en una balanza analítica y registrar su peso. Pesar 2 gramos de muestra seca y colocar en los crisoles previamente pesados, ponerlos en una estufa (Fig.14) a una temperatura de 100-105°C por 24 horas.



Fig. 14 Resultado de la selección de hojas-peciolos-flores (a) y de materias extrañas en la muestra (b).

Transcurrido el tiempo se continúa con un enfriamiento de las muestras + crisol en un desecador por 20 minutos, para obtener un registrar de su peso con una balanza analítica, concluyendo con el siguiente calculo atreves de esta fórmula.

Ec. 1

$$\%MST = \frac{\text{peso crisol con muestra seca} - \text{peso de crisol solo}}{\text{g de muestra}} \times 100$$

7.2.2.- Determinación de humedad

La determinación de la humedad se calculó atreves de la siguiente formula:

Ec. 2

$$\%H = 100 - \%MST$$

7.2.3.- Determinación de ceniza por vía seco

Ya obtenido el peso constante de la determinación de materia seca total se prosigue a quemar la muestra en una parrilla (Fig.15) hasta que dejara de salir humo, como se observa en la figura 8. Transcurrido el tiempo se colocaron los crisoles en una mufla a una temperatura de 588 °C por 24 horas, una vez concluido el tiempo se dejó enfriar por 50 minutos, luego se pesó y se cálculos el % de ceniza.



Fig.15 Proceso de quemado de muestra.

Ec. 3

$$\% \text{Ceniza seca} = \frac{\text{peso crisol con ceniza} - \text{peso de crisol solo}}{\text{g de muestra}} \times 100$$

7.2.4.- Determinación de azúcares totales de la *Crotalaria longirostrata* por métodos de la AOAC, 1990. (fenol-sulfúrico)

- **Preparación de nuestra curva estándar**

Para este método se realizó los cálculos correspondientes de fenoles 5 % y sacarosa a 500 pm. Donde se prepararon 6 tubos (Fig.16) con diferentes concentraciones.



Fig.16 Preparación de 6 tubos, para curva estándar.

Donde de las concentraciones preparadas se toma 250 uL por triplicado y se le agrega los siguientes reactivos, 250 uL de fenol, se agita por 5 min en un vortex, para luego añadirle cuidadosamente 1000 uL de ácido sulfúrico (H_2SO_4), sometiendo a los tubos a ebullición por 5 minutos, pasado el tiempo se deja a enfriar a temperatura ambiente por 5 minutos; para finalizar con una lectura en el espectrofotómetro a una absorbancia de 480 nm y registrando las lecturas obtenidas.

- ***Preparación de la extracción acuosa de la muestra y lectura***

Se pesó un 1 g de muestra en 10 ml de agua por 3 minutos a 70 °C, de la extracción se tomó 1 ml de sol de los 10 ml preparado para diluir. De la muestra preparada se tomó 250 micro litros, luego se le añade 250 micro litros de fenol, para luego agitarlo en un vortex y colocarlo a baño maría en hielo durante un periodo de 5 min.

Transcurrido el tiempo se le agrego 1000 micro litros de ácido sulfúrico (H_2SO_4) cuidadosamente para no quemar la muestra.

Agitar cuidadosamente y dejar ebullicir por 5 min a baño maría, transcurrido este tiempo dejar enfriar por 5 min más, para luego tomar lectura de la muestra en un espectrofotómetro a 480nm.

7.2.5.- Determinación de proteínas solubles

Para este método se pesó 1 g de muestra por triplicado, envueltas en papel filtro, colocándolas en un matraz de bola cuello largo con perlas de vidrio, se le agrego una cucharada de Rex y 30 ml ácido sulfúrico concentrado 0.225 N, para luego ser instalado en un digestor Microkjendahl (Fig. 17).



Fig.17 Aparato de digestor kjendahl para determinar proteína

Hasta que la reacción de compuesto pase de una coloración oscura a verde cristalino.

Trascurrido el tiempo de cambio de coloración se le agregó agua ionizada bajo chorro de agua fría, como también 50 ml de H₃B₀₃ al 4 % más 5 gotas de indicador mixto y NaOH al 45% a cada matraz.

Una vez teniendo el paso anterior se instaló en un destilador Kjeldhal hasta tener una coloración azul y para luego hacer una recuperación de 250 ml de la muestra y finalmente titular (Fig. 18) con H₂SO₄ N 0.10526315.



Fig.18 Titulación con H₂SO₄ de la muestra recuperada.

Ec. 4

$$\%N = \frac{(\text{ml gastados}-0.5) \times (0.014)(N \text{ de H}_2\text{SO}_4)}{\text{g de muestra}} \times 100$$

• **Conversión de proteína**

Ec. 5

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

Nota: el método se realizó por duplicado

7.2.6.- Determinación de fibra cruda

- Para este método se pesó 2 g de muestra sin grasa, colocándola en vaso Berzelius luego se le agregó 100 ml de solución de ácido sulfúrico 0.225 N, ya teniendo este pase se prosigue a conectar al aparato de reflujo labconco (Fig.19) por 30 min contados a partir del momento en que se empieza a hervir, transcurrido el tiempo se continuó con un secado y filtrado a través de la tela de lino previamente montada en embudo pequeño, se lavó con 3 porciones de 100 ml de agua destilada caliente, se verificó con una prueba de papel tornasol si hay presencia de ácido, para continuar con una segunda digestión ahora con hidróxido de sodio 0.313 N (NaOH) de igual forma se secó, filtro con una tela de lino y con 3 porciones de agua destilada se lava hasta quitar el exceso de ácido sobrante.
- Se retira la tela de lino del embudo, se extendió y recupera la fibra obtenida con una espátula suavemente y se deposita en un crisol de porcelana, previamente identificado.
- Para luego colocarlo en un peso constante en una estufa a 100-103 °C por 12 h. transcurrido el tiempo, se deja enfriar en un desecador para luego ser pesado.
- Continuando con una pre-incineración a la muestra en una parrilla hasta dejar de salir humo, para ser colocados en una mufla a 550-600 °C por 2-3 horas. Con el tiempo transcurrido el tiempo se retira, enfría y se pesa, para luego hacer los cálculos correspondientes.

Nota: la prueba se realizó por triplicado

Ec. 5

$$\%FC = \frac{\text{peso crisol con fibra seca} - \text{peso de crisol fibra ceniza}}{\text{g de muestra}} \times 100$$



Fig.19 Aparato de reflujo labconco para determinar fibra vegetal.

7.2.6.1.- Método de detergente neutro o pared celular (Va'n Soet, 1967)

- **Preparación del reactivo detergente neutro**

Se pesó y preparo previamente lo siguiente solutos-solventes que es el detergente neutro. EDTA 74.44g, borato de sodio 27.24 g, dodecil sulfato de sodio 120 g, fosfato acido de sodio 18.24 g y 40 ml de etilenglicol monoetileter, para 4 litros, donde 2 litros fue de agua caliente y 1 ½ agua fría disolver hasta que no haya presencia de grumos en la jara y luego se aforo a un litro.

- **Preparación de la muestra**

En esta parte se pesó 1 gramo de muestra por triplicado, se colocó en diferentes vasos berzelius de 600 ml, agregándole 100 ml de solución detergente neutra previamente preparada a temperatura ambiente, para luego ser montado a un reflujo Labconco, a una temperatura media, en el momento que empezó a hervir se tomó un tiempo de 60 minutos para luego ser retirado.

Por separado se pesó los crisoles capa porosa de vidrio que están a peso constante en la estufa, transcurrido el tiempo de ebullición se filtró a vacío a través del crisol de vidrio capa porosa, se lavó con agua caliente, por un momento se retiró del equipo de vacío para ser agregado 1 ml de acetona desprendiendo la capa de fibra con el agitador, dejándolo reaccionar por 1 minuto transcurrido este tiempo se le volvió a aplicar nuevamente al vacío (Fig.20), esto se repitió hasta quitar excesos sobrantes de alguna solución, para continuar con un lavado de agua destilada y se dejó en un desecador a 100-103°C por 24 hr. Ya transcurrido el tiempo se enfrió y se pesó, para luego hacer los cálculos correspondientes.

Ec. 6

$$\%FDN = \frac{(p \text{ crisol} + \text{fibra}) - \text{peso de crisol solo}}{\text{g de muestra}}$$

X 100



Fig. 20.- Proceso de aplicación de vacío en la muestra (g) y (h).

7.2.6.2- Determinación de fibra cruda por el método de ácido

Para este método se pesó 1 gramo de muestra por triplicado, se colocó en diferentes vasos berzelius de 600 ml, agregándole 100 ml de solución ácido detergente a temperatura ambiente, más 2 ml de decahidronaftaleno, luego se montó en el aparato de reflujo Labconco, a una temperatura media, en el momento que empezó a hervir se tomó 60 minutos de tiempo y se retiró.

Por separado se pesó los crisoles capa porosa de vidrio que están a peso constante en la estufa, transcurrido el tiempo de ebullición se filtró a vacío a través del crisol de vidrio capa porosa, se lavó con agua caliente, por un momento se retiró del equipo de vacío para ser agregado 1 ml de acetona desprendiendo la capa de fibra con el agitador, dejándolo reaccionar por 1 minuto transcurrido este tiempo se le volvió a aplicar nuevamente al vacío, esto se repitió hasta quitar excesos sobrantes de alguna solución, para continuar con un lavado de agua destilada y se dejó en un desecador a 100-103°C por 24 hr. Ya transcurrido el tiempo se enfrió y se pesó, para luego hacer los cálculos correspondientes

Ec. 7

$$\%FDA = \frac{(p \text{ crisol} + \text{fibra}) - \text{peso de crisol solo}}{\text{g de muestra}} \times 100$$

7.2.6.3.- Determinación de Hemicelulosa

Para el método de hemicelulosa nada más se saca la diferencia en % entre FDA y FDN.

Ec. 8

$$\% \text{ Hemicelulosa} = \%FDN - \%FDA$$

7.2.6.4.- Determinación de celulosa FDA

Ya teniendo la muestra en los crisoles de cristal de FDA, se preparó una solución de 100 ml de permanganato de potasio (KMnO₄) y más 50 ml de buffer de lignina, de esta solución se toma una cantidad hasta cubrir la muestra, dejando reposar por un periodo de una 1 hr (Fig.21).

Transcurrido el tiempo se colocó en una máquina de vacío para quitar el exceso de la solución violeta preparada, como también se le agrega agua desmineralizadora por 30 min para quitar los excesos restantes y con esa misma solución se filtró hasta tener una recuperación de solución sin ningún tipo de coloración, para corroborar también se filtró a la muestra con etanol para quitar excesos sobrantes de cualquier solución utilizada anteriormente.

Luego colocar las muestras ya filtradas a una estufa 100-120 ° C por 24 hr, transcurrido el tiempo registrar el peso perdido, luego se colocó en una mufla de 500 °C por 24 hr. Y se tomó registro de su peso perdido, para finalizar se realiza los cálculos correspondientes.

Ec. 9

$$\% \text{ Celulosa FDA} = \frac{(\text{crisol} + \text{residuo de fibra KMnO}_4(\text{estufa})) - (\text{crisol} + \text{ceniza}(\text{mufla}))}{\text{g de muestra}} \times 100$$



Fig. 21 Muestra con el reactivo preparado (violeta).

7.2.6.5.- Determinación lignina

Para este método se prosiguió sacándolo los cálculos con la siguiente formula:

Ec. 10

$$\% \text{ lignina} = \frac{((\text{FDA}) - (\text{crisol} + \text{ceniza}(\text{mufla})) - ((\text{crisol} + \text{fibra KMnO}_4) - (\text{crisol} + \text{ceniza}(\text{mufla})))}{\text{g de muestra}} \times 100$$

7.2.7.- Cuantificación de lípidos (Método de Soxhlet)

Para este método se pesó 4 g de muestra seca por triplicado, la cual se envolvieron en papel filtro previamente cortados, para luego depositarlos en dedal de celulosa, el cual se colocan en el interior de un sifón de un aparato de extracción de Soxhlet (Fig.22)

Luego se sacó tres matraces redondos planos, bocas esmerilada de la estufa que este a peso constante, se dejó enfriar por 3 minutos transcurrido este tiempo se pesó y se le agregó éter de petróleo hasta la mitad, luego se acoplo al refrigerante del depósito Soxhlet, Una vez recuperado el solvente, los matraces se colocaron en una estufa por 24 horas, transcurrido el tiempo se dejó enfriar por 20 minutos para culminar con un registro de pesos de los matraces y realizar los cálculos correspondientes.

Ec. 11

$$\% \text{ Extracto etéreo} = \frac{m_2 - m_1}{m} \times 100$$



Fig.22 Aparato de extracción de Soxhlet.

7.2.8.- Cuantificación de ELN (Extracto libre de nitrógeno)

Es la suma de los resultados en porcentajes de: ceniza, proteína, lípidos y fibra y se calculó con la siguiente fórmula:

Ec. 12

$$\% \text{ELN} = 100 - (\% \text{C} + \% \text{PC} + \% \text{EE} + \text{FC})$$

7.2.9.- Obtención de los extractos a base de acetona y etanol para cuantificar el contenido polifenólico y antioxidantes.

- En este método se utilizó 100 ml de acetona y etanol, la cual fue invertida en una columna de vidrio con 10 gr de silica gel y 1 gr de muestra (Fig.23). Donde la recuperación del extracto fue con quita zato en dos porciones de 50 ml por cada solución, para luego ser almacenada en frascos envueltos en papel aluminio a temperatura ambiente (Fig.24)



Fig.23 Proceso de extracción de los extractos con los diferentes solventes.



Fig.24 Extractos ya listos en frascos y cubiertos para almacenarlos para evitar la exposición a la luz.

7.2.9.1.- Cuantificación de polifenoles totales del extracto de la CL.

- Procedimiento para preparación de la muestra.

Son los extracto previamente extraídos con acetona y etanol donde se tomó 10 ml de cada una, dejándolo reposar durante toda la noche, evitando la exposición de la luz (forrar en papel aluminio).

- **Procedimiento para la obtención de lectura de la muestra.**

Ya transcurrido el tiempo de reposo, se aisló el sobrenadante para su análisis de fenoles, de ese líquido aislado se tomó 800 microlitros, luego se colocó en un tubo de ensaye (16X50) y se le adiciono 800 microlitros del reactivo Folin Ciocalteu (se diluyo 1ml del reactivo en 9 ml de agua ionizada), se agito y se dejó reposar por 5 min.

Pasado este tiempo de reposo se le agrego 800 microlitros de carbonato de sodio 0.01 M, de igual forma se homogenizo y reposar por 5 min.

Ec. 13

Cálculos: $\text{Na}_2\text{CO}_3 = 105.99 - 100\text{ml} - 1\text{M} - 0.01\text{M}$

$$1,0599 - 1000\text{ml}$$

$$X \quad 100\text{ml}$$

$$X = 0.10599 \text{ g} - 100 \text{ ml} \text{ por } 2 \text{ litros} = 0.21198 - 200 \text{ ml}$$

Ya transcurrido el tiempo se le adiciono 2.5 ml de agua destilada y se tomó una lectura en es espectrofotómetro a 725 nm y se registró lo obtenido, la lectura obtenida se realizó por triplicado.

Nota: este procedimiento se realizó por duplicado y no hay factor de dilución.

- **elaboración de la curva patrón estándar fenoles totales.**

Para la elaboración de la curva, se utilizó una solución de ácido gálico a una concentración de 500 pm en 5 tubos de ensaye. Para preparar una solución madre o estándar de ácido gálico se tomó la siguiente ecuación:

Sol. Madre de ácido gálico:

0.025 g de ácido galico-50 ml de agua destilada

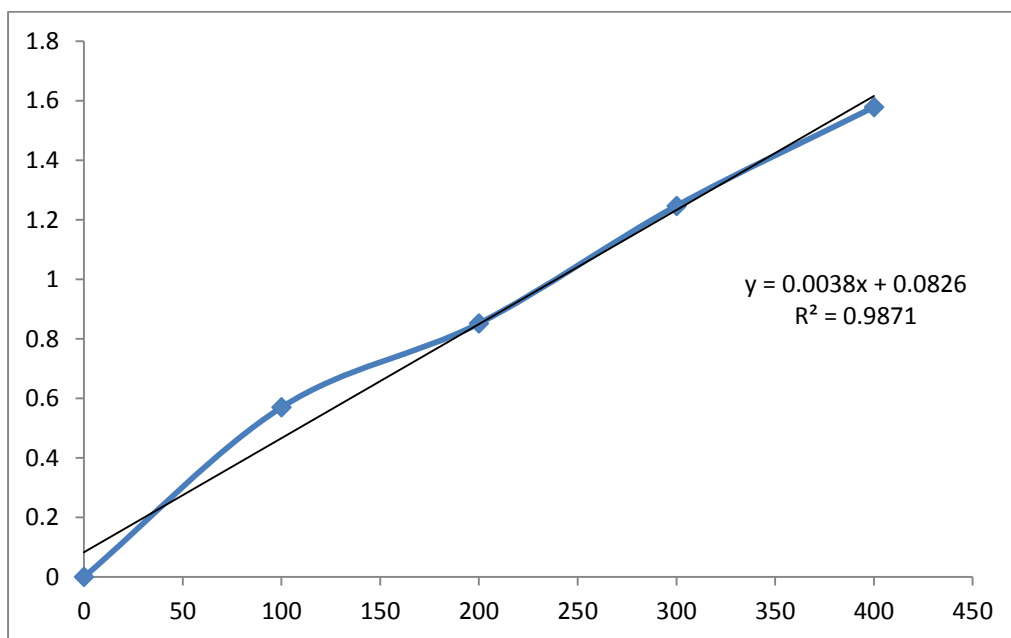


Fig.25 Curva patrón de ácido gálico 500 ppm (Makkar1993)

7.2.9.2.-Actividad antioxidante por el método DPPH

- **Preparación de nuestro radical y la muestra.**

Se preparó 1.2 mg de 2,2-Difinil-1-picril-hidracil (DPPH) a una aforación de 50 uL de etanol y se cubrió contra luz. El radical posee una coloración morada, cuando entra en contacto con H⁺, el cambio de coloración es la que nos permite cuantificar el poder antioxidante de la sustancia colocada como muestra.

- **Lectura de nuestros extractos de nuestras muestra con hexano, acetona y etanol.**

Para la lectura se utilizó una microplacala cual se le agrego a cada cubeta 7 uL de muestra y de 193 ml de sol. DPPH, dejándola reaccionar por 30 minutos a temperatura ambiente, sin que le diera la luz, esta prueba se realizó por triplicado cubeta F, G, H y se utilizó los dos tantos de extractos obtenidos de la muestra de 50 en 50 ml.(1,2 exano, 3,4 acetona, 5,6 etanol. 7 blanco y 8 control)

Como blanco de lectura se utilizó solo metanol y como absorbancia de control la de la solución DPPH + metanol.

Para finalizar se realizó una lectura a 517 nm en un espectro DPPH del software Gen 5 y registrar los datos obtenidos.

- Para expresarlo en % de inhibición se utilizó la siguiente formula

Ec.14

$$\% \text{ inhibición} = [1 - (\text{abs.muestra} / \text{abs.control})]$$

7.2.9.3.-Actividad antioxidante por el método ABTS

Preparación de una solución ABTS

Para esta técnica se preparó previamente una solución de ABTS a 7 mm y se mezcló con una solución de K₂S₂O₈ hasta que este último tenga una concentración de 2.45 mm. Ambas soluciones son en agua, dejar reposar en obscuridad por 12 h a temperatura ambiente. El radical 2,2- azino bis (3- etilbenzotiazolin-6- sulfatano) (ABTS) posee una coloración azul, cuando entra con un H⁺ con el cual complementa su estructura pierde su coloración. El cambio de

coloración es lo que permite cuantificar el poder antioxidante de la sustancia colocada como muestra.

Para muestras alimentos y fenoles diluir con etanol hasta tener una absorbancia de 0.7 ± 0.2 al llegar a esta absorbancia se utiliza como radical ABTS.

- **Preparación de la muestra**

Se preparó en cada cubeta 1ml de solución etanolica ABTS más 10 ml de muestra extraídas con las siguientes soluciones (Hexano, Etanol y Acetona) por triplicado.

Dejándolas reaccionar por 1 minuto a oscuridad para luego tomar las lecturas en un espectrofotómetro a una absorbancia de 734 nm.

Para nuestro blanco se utilizó etanol y nuestro control ABTS + Etanol.

Para para su expresión fue en % de reducción

Ec. 15

$$\% \text{ de reducción de ABTS} = \frac{(A_c - A_m)}{A_c} \times 100$$

Dónde:

A_c = es la absorbancia control (ABTS-etanol)

A_m = es la absorbancia de la muestra

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.1. Análisis bromatológico (físico-química) de la materia prima

En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos de Materia solida total, Humedad, Cenizas, Azucares, Proteína y Nitrógeno, obtenidos del análisis bromatológico de la *Crotalaria longirostrata* por el método de AOAC (1990).

Donde los resultados obtenidos en el perfil bromatológico difieren en comparación de los resultados obtenidos en otras investigaciones, y esta diferencia de acuerdo con la literatura se bene principalmente a que la materia utilizada y analizada corresponde a diferentes zonas geográficas.

Tabla.9.- Valor nutrimental de la CL obtenido con el método AOAC (1990). Valores en base húmeda.

MST (%)	Humedad (%)	Ceniza (%)	Azucares totales %	Proteína (%)	Nitrógeno (%)
82.43	17.57	7.41	2.37	40.96	6.55

Los resultados obtenidos en la tabla 9 muestran el contenido de MTS fue de 82.43% y su contenido de humedad fue 17.57%, resultado que comparado con los obtenidos por Chávez Quiñones y col., (2010) fueron mayores hasta un 50% comparado con el de ellos (8.86%).

Mientras que para el caso de cenizas, lo reportado por Arias y col., (2003) demuestran un valor mayor hasta un 1.09% en comparación con lo obtenido en la presente investigación (7.41%), esta diferencia depende principalmente de algunos otros componentes que están presente en los minerales.

Este mismo comportamiento se observa en el contenido de azucares totales de la muestra analizada que presenta un valor de 2.37%; que es mucho menor al obtenido por Alegria-Salmerón y Col., (2006) que fue de 9.1%; esta diferencia puede deberse a la naturaleza de la planta analizada, época de recolección de la

muestra, tipo de análisis o ensayo utilizado, además que de acuerdo con la literatura la zona geográfica de la planta juega un papel importante en estas diferencias del contenido bromatológico.

Por otra parte, el contenido de nitrógeno fue de 6.55%, el cual ayudará a saber el contenido proteico que se presenta en un alimento. Por lo tanto, el resultado de proteína fue de 40.96%, que en comparación con los resultados obtenidos por Arias y col., (2003) demuestran solo un 36.3% de proteína; siendo la materia prima analizada en esta investigación mayor hasta un cual resulta un contenido proteico mayor de 3.7 % arriba.

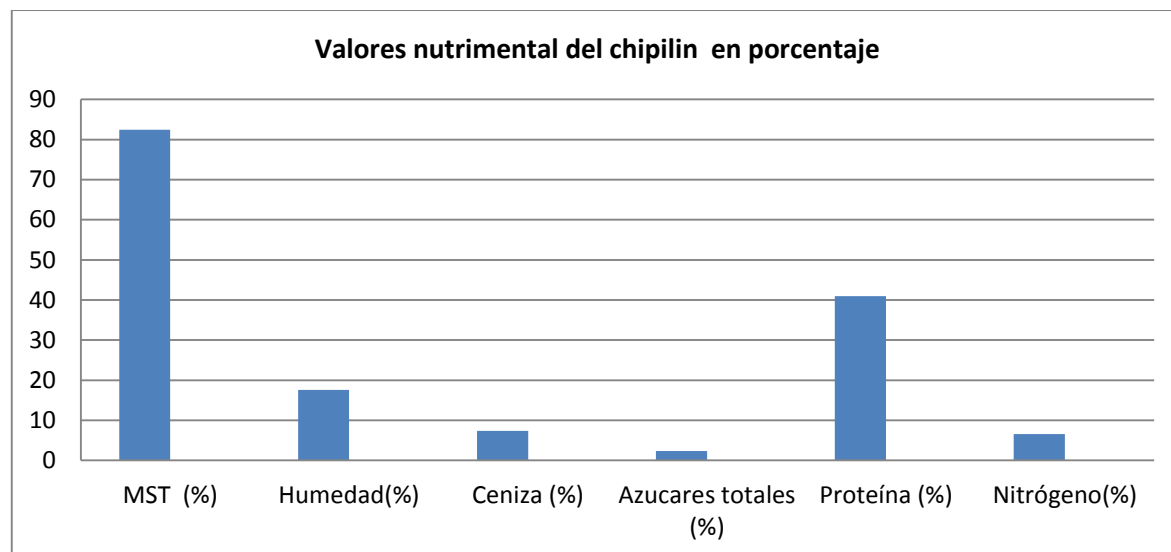


Fig.26 Valor nutrimental de la CL obtenido con el método AOAC (1990). Valores en base húmeda.

En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos de Fibra cruda, Fibra detergente neutra, Fibra detergente acida, Hemicelulosa, Celulosa, Lignina, Lípidos, Extracto libre de nitrógeno obtenidos del análisis bromatológico de *Crotalaria longirostrata* por el método de AOAC (1990).

Tabla.10.- Valor nutrimental de la CL obtenido con el método AOAC (1990). Valores en base húmeda del chipilín por (laguna y col. 2016) y (Arias y col 2003)

Fracciones de fibra	FC (%)	FDN (%)	FDA (%)	Hemicelulosa (%)	Celulosa (%)	Lignina (%)	Lípidos (%)	ELN (%)
Laguna y col. 2016	8.93	23.91	10.94	12.97	5.35	5.69	3.09	39.46
Arias y col. 2003	3.1	28.4	15.5	12.8	13.1			

Los resultados de FDA, FDN y Celulosa, se muestran en la tabla 10, siendo estos menores a los obtenidos por Arias y Col., (2003), en comparación con fibra cruda que los resultados obtenidos son mayor a los de Arias y Col., (2003), como se puede observar en la tabla anterior. En cambio la hemicelulosa presenta una diferencia no muy significativa de 0.17% en comparación con los resultados obtenidos en este trabajo,

Por otra parte el resultado de la lignina fue 5.69%, este es el principal componente de la pared celular de los vegetales ya que se encuentra unida covalentemente a la hemicelulosa y de ahí la resistencia que posee; no existen investigaciones que actualmente reporten su contenido en otras plantas de esta naturaleza y de diferentes zonas geográficas.

El único reporte científicamente conocido es el trabajo de Arias y col., (2003) del cual hemos estado hablando a lo largo de este trabajo, tal es el caso del contenido de lípidos donde Arias y col., reportan un menor valor de estos en comparación con el contenido de lípidos de este trabajo (3.09%).

Además de estos resultados el ELN fue de 39.46%, que es la suma de ceniza, proteína, lípidos y fibras al final del estudio y que representan la cantidad de carbohidratos que contiene esta planta.

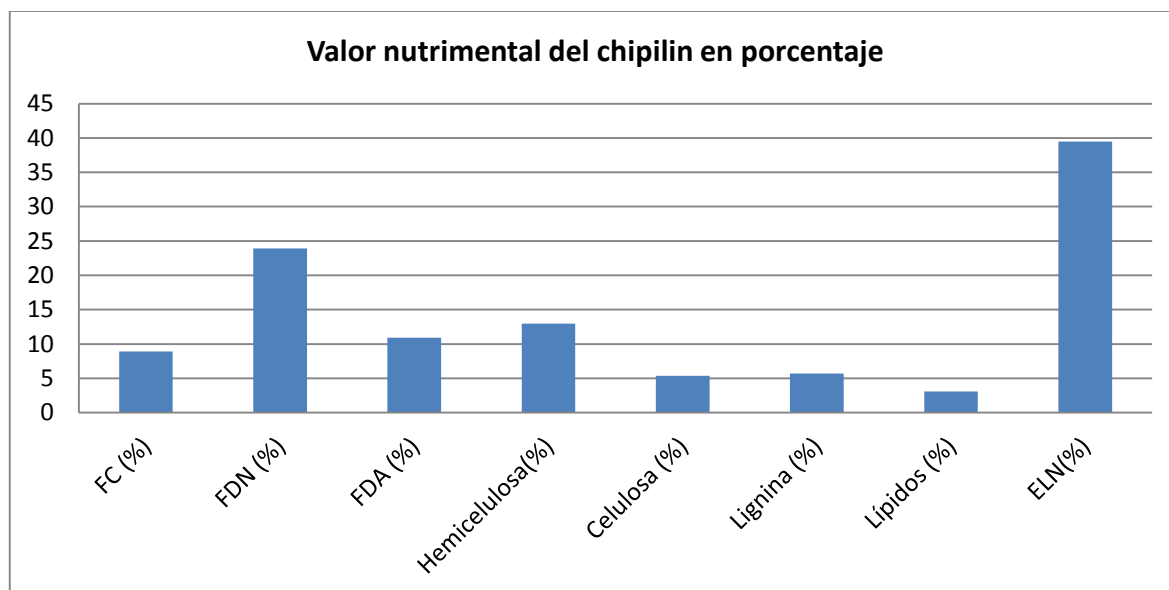


fig.27 Valor nutrimental en base húmeda del chipilín por los (Arias y col 2003)

8.2.- Cuantificación del contenido polifenólico del extracto de la *Crotalaria longirostrata* (etanol y acetona)

Los resultados de la concentración de polifenoles se presentan en miligramos equivalentes de Ácido gálico por gramo de muestra seca (mg Ac. Gal/g muestra seca) en la tabla 11, donde la mayor cantidad de compuestos polifenólicos obtenidos en los extractos de Chipilín fueron los que se obtuvieron con etanol (91.66 mg Ac. Gal/g muestra seca) en comparación con los de acetona (81.22 mg Ac. Gal/g muestra seca).

Tabla 11.- Concentración de compuestos polifenólicos de extractos de chipilín (mg Ac. Gal/g muestra seca).

Solvente	Chipilín(<i>Crotalaria Longirostrata</i>)
ETANOL	91.66+1.30 —
ACETONA	81.22+3.15 —

En comparación con los resultados obtenidos por Sánchez y col., (2009) los solventes que ellos evaluaron fueron metanol-agua donde tuvieron una mayor concentración polifenólica en muestra fresca, a la utilizada en este trabajo donde se utilizó únicamente etanol sobre la muestra seca. Esta diferencia se debe a la capacidad de los solvente de separar los compuestos presentes en el chipilín debido principalmente a la polaridad y por lo tanto a la capacidad de separarlos de la planta.

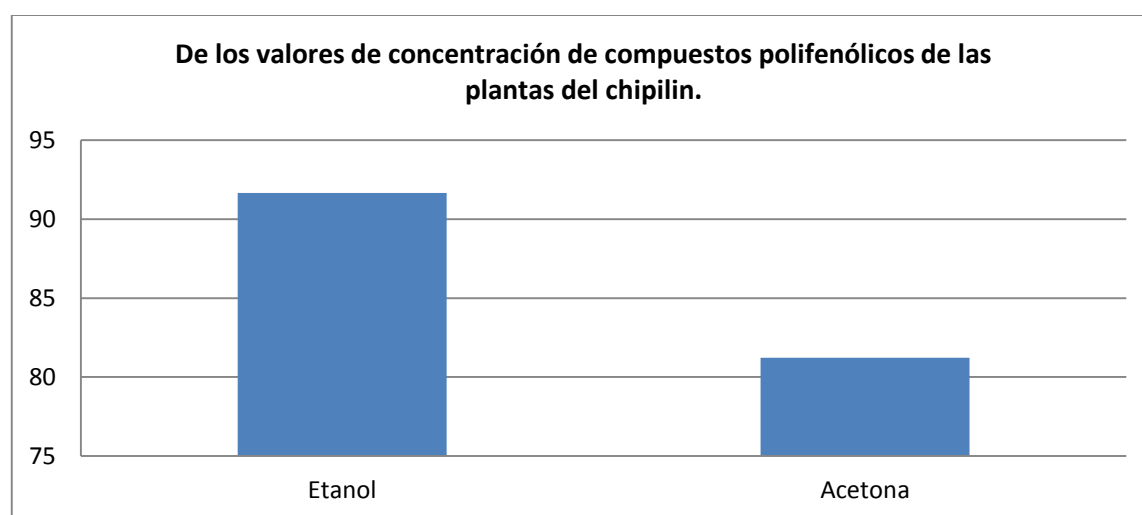


Fig.28 Concentración de compuestos polifenólicos de extractos de Chipilín (mg Ac. Gal/g muestra seca).

8.3.- Actividad antioxidante por método DPPH

En esta prueba la coloración obtenida nos dio un tono rosa lo cual indica la presencia de antioxidante en la muestra analizada, por lo que se puede constatar que los resultados obtenidos muestra un porcentaje de inhibición en los tres solventes.

Los resultados obtenidos del % de Inhibición se presentan en el extracto de acetona (25.3%) y el menor fue en el etanol (23.6%) de los extractos de chipilín, este comportamiento indica que la concentración de polifenoles es inversamente

proporcional al % de inhibición, debido a que esta actividad antioxidante no es dada únicamente por polifenoles sino por algunos otros componente de diferente naturaleza que en conjunto pueden proporcionar esta actividad como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 12. Porcentaje de inhibición de DPPH, con cada extracto.

Solvente	Actividad antioxidante
Hexano	24.5 + 1.94 —
Acetona	25.3 + 1.33 —
Etanol	23.6 + 1.42 —

En comparación con los resultados obtenidos por Sánchez y col., (2009) los resultados que ellos obtuvieron fueron mayores a los obtenidos en este trabajo, este comportamiento puede deberse a la naturaleza de la muestra, zona geográfica de obtención o al ensayo utilizado para el análisis.

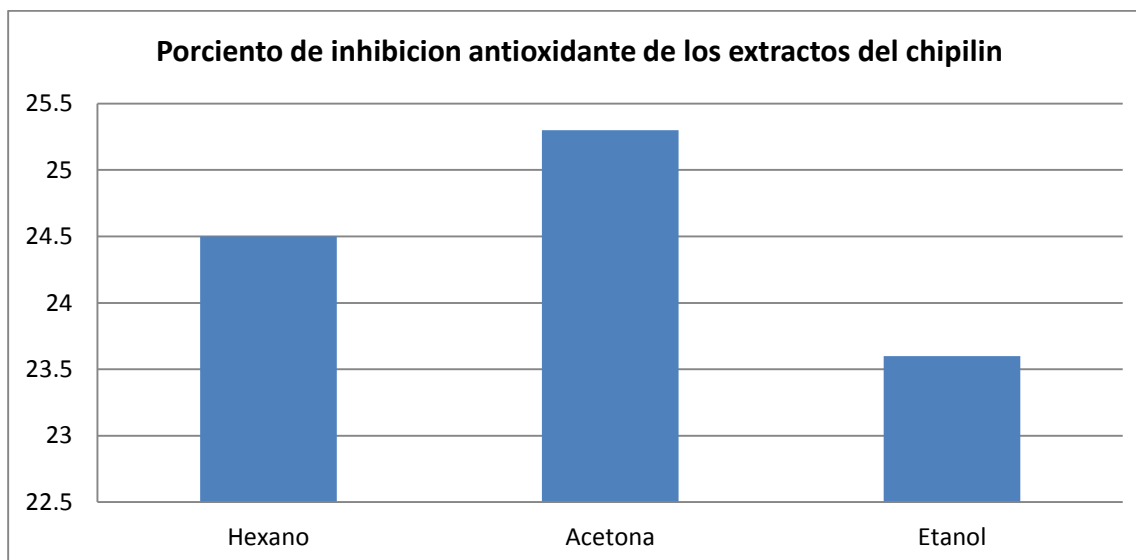


Fig.29 Porcentajes de inhibición de actividad de antioxidante, con cada extracto del chipilín por el método DPPH.

8.4.- Actividad antioxidante por el método ABTS

En esta prueba el cambio de color azul muy intenso a uno más bajo, permite cuantificar el poder antioxidante de nuestra muestra sobre el radical libre del ABTS. Ya que el ABTS tiene una coloración azul intenso, en el momento que encuentra un H⁺ para completar su estructura pierde su intensidad de coloración presentando una actividad antioxidante.

Los resultados del % de actividad antioxidante fue mayor en los extractos de acetona (10.53%) que los obtenidos con etanol (9.43%), siendo este comportamiento similar al obtenido en el ensayo de DPPH. Como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 13. Porcentaje de inhibición de ABTS, con cada extracto.

Solvente	Actividad Antioxidante
Hexano	1.95 ± 0.55
Acetona	10.53 ± 0.11
Etanol	9.43 ± 0.99

Estos resultados también pueden observarse de manera esquemática y más clara en la siguiente figura.

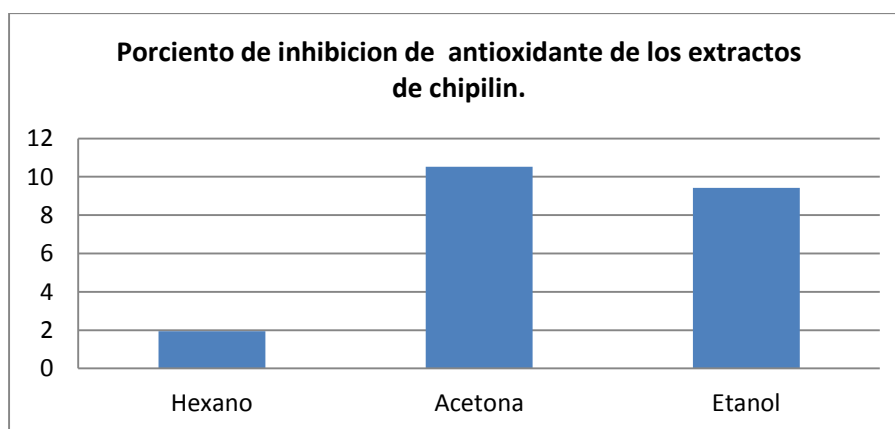


Fig.30 Porcentajes de inhibición de actividad de antioxidante, con cada extracto por el método ABTS

Como se pudo observar en la tabla 12 y 13 el porcentaje mayor de inhibición fueron del solvente de la acetona, por tal motivo los resultados de confiabilidad fueron de un 100% en los dos métodos. Dichos extractos a pesar de no contener la mayor concentración de polifenoles, si tienen una actividad antioxidante que nos ayuda a inhibir o retardar oxidación de otras moléculas inhibiendo la iniciación y/o propagación de las reacciones en cadenas de los radicales libres que podrían afectar nuestra salud.

9.- CONCLUSION

Los resultados obtenidos en la investigación muestran una diferencia en correlación con otras investigaciones, ya que los nutrientes que absorben las plantas juegan un papel muy importante en su análisis físico-químico en fresco y seco.

Como también la capacidad de antioxidante presente en un alimento va a depender de su naturaleza y la concentración de los antioxidantes que se encuentren en él, además su contenido que va a variar de un alimento a otro.

Esta diferencia, se pueden atribuir al espacio geográfico donde se obtuvo la muestra de chipilín, la forma en que se analizó, además de los factores climáticos pueden ser un factor clave en la influencia en la absorción de los nutrientes esenciales que necesita la planta, como también la disponibilidad y la calidad agua que haya en la zona, la composición del suelo donde esta crezca y su tamaño.

Como pudimos ver el chipilín cuenta con un valor nutrimental en porcentaje similares a otras plantas comestibles llamadas quelites o de algunas horatalizas populares, que son parte esencial de la dieta humana. Además de su capacidad de antioxidante que le da un valor agregado para contribuir a proteger al organismo de esos radicales libres, que son causantes del envejecimiento y de algunas enfermedades patógenas.

Por lo que podemos decir que nuestra planta de chipilín posee moléculas inactivas con actividad antioxidante y compuestos polifenólicos que pueden ser utilizados en la aplicación alimentaria.

10.- PERSPECTIVA

Contribuir a que se conozca más acerca de la composición físico-química y poder antioxidante de esta planta silvestre ya que es poco conocida.

A futuro haya más iniciativa de investigación de interés alimentario sobre el chipilín (*Crotalaria longirostrata*) no solo del estado de Chiapas zona frailesca sino de los demás estados o regiones donde se encuentre esta planta y así hacer más extensa esta investigación.

Dar usos en la industria de los alimentos mediante la aplicación del conocimiento de sus propiedades biológicas como fuente de antioxidantes para el desarrollo de nuevos productos que permitan darle un valor agregado al chipilín y una explotación más allá de un acompañamiento, que es en lo que actualmente se utiliza.

11.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Anaya, K., Solano, J., (septiembre 2016). Determinación de metales pesados (plomo y arsénico) y oligoelementos (hierro, cobre y zinc) en hojas de *Crotalaria longirostrata* (chipilín) por el método de absorción atómica, San Salvador. <http://ri.ues.edu.sv/11442/1/16103684.pdf>
- Arias, L., Losada, H., Rendon, A., Grande, D., Vieyra, J., Soriano, R.,... & Cortes, J. (2003). Evaluation of cipolin (*Crotalaria longirostrata*) as a forage resource for ruminant feeding in the tropical areas of Mexico. *Livestock Research for Rural Development*, 15(4), 104-115.
- Antonio Valadez, A., López, E., Hernández, J. , Ochoa, A., (n. d). Actividad antioxidante de chaya, (*Cnidioscolus chayamansa* Mc. Vaugh) y chipilín, (*Crotalaria maypurensis* H.B.K.) del estado de Tabasco.
- *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn., Germplasm Resources Information Network. United States Department of Agriculture. (6 de enero de 2007). Consultado el 7 de noviembre de 2016.
- Chávez, E., Roldán, J., Sotel, B., Ballinas, J., López, E., (2009) plantas comestibles no convencionales del estado de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. D. R. ©2010. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.
- Determinación de azúcares totales por el método fenol-sulfúrico (2015), consultada el 1 de noviembre 2016, página web;
- <http://documents.mx/documents/determinacion-de-azucares-totales-por-el-metodo-fenol-sulfurico.html>.
- Domínguez, K. E. D., Gordillo, P. I. M., Roque, A. C., Gutiérrez, G. V., González, J. M. L., & Sarmiento, V. D. R. B. (2011). Elaboración de producto con base en maíz (*Zea mays*) y chipilín (*Crotalaria longirostrata*) para fomentar el consumo de hojas verdes en la alimentación de niños. *Lacandonia*, 5(1), 143-148.
- El chipilín (2008). Consultada el 8 de noviembre del 2016. Web, <http://elnahual-elnahual.blogspot.mx/search?q=chipilin>.
- Gutierrez, O. (2012). Quelites, frescas hierbas mexicanas. Consultada el 8 de noviembre 2016. Wep; <http://laboratoriogourmet.blogspot.mx/2012/12/quelite-frescas-hierbas-mexicanas.html>
- Gutiérrez, Á., Ledesma L., García, I., & Grajales, O. (2007). Capacidad antioxidante total en alimentos convencionales y regionales de Chiapas, México. *Revista cubana de salud pública*, 33(1), 0-0.
- Hierbas y Especies Mexicanas (n.d) consultada el 10 de noviembre 2016, web,http://www.mexican-authentic-recipes.com/cocina-hierbas_especies.html
- Kuskoski, E., Asuero , A., Troncoso, A. , Mancini, J. , Roseane, F, (out.-dez. 2005) Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos; *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*, 25(4): 726-732.

- Mortón, J. (Apr. - Jun., 1994), Pito (*Erythrina berteroana*) and Chipilín (*Crotalaria longirostrata*), (Fabaceae), Two Soporific Vegetables of Central América; *Economic Botany*; Vol. 48, No. 2, pp. 130-138
- Nielsen, S; (2009) *Análisis de los alimentos*, NY,USA . Editorial; Kluwer Academic/ Plenum Publishers; de la edición en la lengua española, Editorial Acribia, S.A., apartado 466, 50080 Zaragoza (España).
- Pérez, A.,(2010)- VERDURAS VERDES Y HOJAS COMESTIBLES. Consultada el 8 de noviembre del 2016. Web. <http://agnesmacrobiotica.blogspot.mx/2010/12/verduras-verdes-y-hojas-comestibles.html>
- Polo, M., Velásquez, S., (2016). Determinación del contenido de compuestos fenólicos y evaluación de la actividad de antioxidante de *Myrcianthes myrsinoides*(H.B.K) Grifo. Consultada el 3 de noviembre 2016, Universidad Nacional del Trujillo, página web conmemorativa de la biblioteca, <http://dspace.unitru.edu.pe/xmlui/handle/UNITRU/1481>
- Reardon, J., (n. d). North Carolina Department of Agriculture and Consumer Services Food and Drug Protection Division, obtenida el 2, noviembre del 2016 de <http://www.ncagr.gov/fooddrug/espanol/documents/PlantasdeHojasComestibles.pdf>
- Rivas, J. (octubre de 2014) Determinación nutricional y calidad proteica de dietas a base de maíz y frijol complementadas con tres plantas autóctonas de Guatemala (chipilín, hierbamora y bleado). Estudio realizado en el bioterio del instituto de nutrición de Centroamérica y Panamá, utilizando ratas wistar, durante el periodo de mayo a agosto de 2014. Consultada el 6 de Octubre del 2016.
- Rosales, J. R. E. R. (n.d) " ESTUDIO GASTRONÓMICO Y NUTRICIONAL DE FRUTAS Y HORTALIZAS SALVADOREÑAS.
- Rodrigue, F., Campos, J, Ramos, Vargas, L., Olgúin, C-. Ayala, F., Adriano, M. Salvador, M., (1998) Efecto del extracto acuoso del chipilín (*Crotalaria longirostrata* Hook & Arnot) en el sueño de la rata. Vol.1. N°2.
- TOLEDO, F., (2013), "DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES TOTALES (ART), CONSULTADA EL 3 DE NOVIEMBRE, <http://es.slideshare.net/FranklinToledo1/determinacion-de-azucares-reductores-totales-art>