



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUIMICA

" ANALISIS QUIMICOS PROXIMALES DE ALGUNOS HONGOS
COMESTIBLES SILVESTRES DE LAGUNA DE SERVIN, MUNICIPIO DE
AMEALCO, QRO "

TESIS

Que para obtener el título de
QUIMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

MARIA FABIOLA LEON GUZMAN

DIRIGIDA POR:

M. en C. CARLOS ISAAC SILVA BARRON

QUERETARO, QRO., ENERO DE 1997

Nº Adq: HSS 902

Nº. Título _____

Clas. 589.2097245

LS 78

BIBLIOTECA CENTRAL

INDICE

	Página
LISTA DE TABLAS..	i
LISTA DE FIGURAS	ii
I. RESUMEN.	1
II. INTRODUCCION.	3
III. REVISION BIBLIOGRAFICA.	5
A. GENERALIDADES	5
B. IMPORTANCIA ALIMENTICIA DE LOS HONGOS.	7
C. PRODUCCION DE HONGOS.	8
D. COMPOSICION QUIMICA PROXIMAL.	8
1. HUMEDAD Y CENIZAS	12
2. FIBRA.	12
a. Importancia de la fibra dietética.	13
3. GRASA TOTAL.	13
a. Importancia de los lípidos.	14
4. PROTEINA	14
a. Importancia de la proteína	15
5. AMINOACIDOS	15
a. Importancia de los aminoácidos.	16
b. Análisis.	18
6. ACIDOS GRASOS	23
a. Importancia de los ácidos grasos	23
b. Análisis	24
E. CROMATOGRAFIA	26
F. ESPECTROMETRIA DE MASAS.	29
G. CROMATOGRAFIA DE GASES / ESPECTROMETRIA DE MASAS (GC / EM).	31
IV. OBJETIVOS Y METAS	33

	Página
A. OBJETIVO GENERAL	33
B. OBJETIVOS ESPECIFICOS	33
C. METAS	33
V. MATERIALES Y METODOS..	34
A. MATERIAL Y EQUIPO	34
B. METODOS..	36
1. PREPARACION DE LAS MUESTRAS	36
2. DETERMINACION DE HUMEDAD Y CENIZAS.	36
3. DETERMINACION DE FIBRA DIETETICA	37
4. DETERMINACION DE GRASA TOTAL	38
5. DETERMINACION DE PROTEINA	39
6. CUANTIFICACION DE AMINOACIDOS POR EL METODO Picotag	40
7. DETERMINACION DEL PERFIL DE AMINOACIDOS LIBRES	42
a. Extracción	42
b. Purificación con resinas de intercambio iónico	43
c. Derivación de la muestra	43
8. DETERMINACION DEL PERFIL DE ACIDOS GRASOS	45
9. CUANTIFICACION DE LOS PERFILES POR CROMATOGRAFIA DE GASES Y ESPECTROMETRIA DE MASAS (GC / EM).	46
a. Aminoácidos	47
b. Ácidos grasos	47
10. CUANTIFICACION	48
VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES	49
A. DESCRIPCION DE LAS ESPECIES DE HONGOS ANALIZADOS	49
B. ANALISIS QUIMICOS PROXIMALES	51
C. PERFIL DE AMINOACIDOS (Picotag)	55
D. PERFIL DE AMINOACIDOS LIBRES.	61
E. PERFIL DE ACIDOS GRASOS LIBRES.	69

	Página
VII. CONCLUSIONES77
A. COMENTARIOS78
VIII. BIBLIOGRAFIA.79

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Producción total en el mundo de los hongos más cultivados	8
Tabla 2	Composición proximal de hongos comestibles cultivados y silvestres..	10
Tabla 3	Rango de valores químicos porcentuales en hongos comestibles cultivados y silvestres (Chang y Hayes, 1978).	11
Tabla 4	Clasificación Taxonómica de los hongos comestibles silvestres analizados.	51
Tabla 5	Valores porcentuales de los análisis químicos proximales en los hongos comestibles silvestres analizados, comparados con los valores reportados para <i>A. bisporus</i> y <i>U. maydis</i>	52
Tabla 6	Tiempos de retención promedio (minutos) para aminoácidos de origen proteico (Método Picotag) obtenidos de los hongos comestibles silvestres analizados.	57
Tabla 7	Contenido de aminoácidos (mg de aa / g de proteína cruda) en tres hongos comestibles silvestres (Método Picotag), comparados con los valores reportados para <i>A. bisporus</i> y <i>U. maydis</i>	58
Tabla 8	Tiempos de retención promedio (min) para aminoácidos libres obtenidos de los hongos comestibles silvestres analizados.	63
Tabla 9	Contenido de aminoácidos libres (mg / g de muestra) cuantificados en tres especies de hongos comestibles silvestres comparados con los valores reportados para <i>A. Bisporus</i> y <i>U. maydis</i>	66
Tabla 10	Tiempos de retención promedio (min) para ácidos grasos libres obtenidos de los hongos comestibles silvestres analizados.	71
Tabla 11	Contenido de ácidos grasos (mg / g de muestra) cuantificados en hongos comestibles silvestres, comparados con los valores reportados para <i>A. bisporus</i> y <i>U. maydis</i>	74

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Análisis proximal realizado en hongos comestibles silvestres de Laguna de Servín, municipio de Amealco, Qro. (Se incluyen los valores ya reportados para <i>A. bisporus</i> y <i>U. maydis</i>)	53
Figura 2 Cromatograma de HPLC, acoplado a UV de Rf: Asx (1), Glx (2), Gly (3), Ser (4), His (5), Arg (6), Thr (7), Ala (8), Pro (9), Tyr (11), Val (12), Ile (15), Leu (16), Phe (17) y Lis (19).	56
Figura 3 Perfil de aminoácidos obtenido en hongos comestibles silvestres utilizando el método Picotag, incluyendo los valores reportados para <i>A. bisporus</i> y <i>U. maydis</i>	59
Figura 4 Cromatograma (GC acoplado a EM) típico de aminoácidos libres para Ar.	62
Figura 5 Espectro de masas A) de la muestra (lisina) y B) de referencia (biblioteca).	64
Figura 6 Espectro de masas A) de la muestra (ornitina) y B) de referencia (biblioteca).	65
Figura 7 Perfil de aminoácidos libres obtenido para hongos comestibles silvestres, incluyendo los valores reportados para <i>A. bisporus</i> y <i>U. maydis</i>	67
Figura 8 Cromatograma (GC acoplado a EM) típico de ácidos grasos libres para Ar.	70
Figura 9 Espectro de masas A) de la muestra (ác. linoléico) y B) de referencia (biblioteca)..	72
Figura 10 Espectro de masas A) de la muestra (ác. esteárico) y B) de referencia (biblioteca).	73
Figura 11 Perfil de ácidos grasos obtenido en hongos comestibles silvestres (mg/g de muestra), incluyendo los valores reportados para <i>A. bisporus</i> y <i>U. maydis</i>	75

I. RESUMEN

La problemática socioeconómica y política en México han provocado una deficiencia alimentaria, particularmente de proteína en la población rural de nuestro país. Por lo tanto, ha sido necesaria la búsqueda de nuevas alternativas alimentarias y nutricionales (hongos, algas, extractos secos, etc.).

Desde la prehistoria, en México los hongos comestibles silvestres han formado parte de la dieta en muchas culturas indígenas.

Los hongos son de gran importancia nutricional; su contenido proteico es de 19 a 35 %, más alto que el de trigo (13.2 %) y de la leche (25.2 %); son bajos en calorías y su fracción lipídica incluye ácidos grasos libres predominantemente insaturados. También aportan vitaminas A, B (B1, B2 y B12), C, D y niacina.

Cuatro hongos comestibles silvestres (*Amanita rubescens* (Ar), *Boletus frostii* (Bf), *Lactarius indigo* (Li) y *Ramaria flava* (Rf)) fueron analizados para determinar su composición química proximal, perfil de aminoácidos (proteicos y libres) y perfil de ácidos grasos libres.

El análisis químico proximal se realizó mediante los métodos estándares de AOAC (1984 y 1990) y AACC (1983). El perfil de aminoácidos proteicos se determinó por el método Picotag y cromatografía HPLC. El perfil de aminoácidos libres mediante extracción, purificación con resinas cationicas, derivación con TFA y análisis CG / EM. Los ácidos grasos libres fueron analizados por extracción, derivación, purificación con hexano y análisis por CG / EM.

Los hongos analizados presentaron un contenido de humedad semejante entre ellos, debido a que no presentaron diferencias significativas. El material seco de Bf presentó un contenido significativo de fibra dietética (30.2 %), Ar presentó contenidos mayoritarios y significativos (pruebas de Duncan y LSD (Diferencia mínima significativa) con un 95 % de confiabilidad) de grasa y proteína; 8.3 % y 17.4%, respectivamente.

El contenido de aminoácidos proteicos de los hongos analizados fue bajo en comparación con los valores reportados para *A. bisporus* y *U. maydis*.

Todos presentaron una composición de aminoácidos libres muy semejante entre ellos, pero con diferencias significativas entre los hongos analizados. Rf presentó el contenido más abundante de N-metil Glu, N-metil Gly, Gly y Orn; con un 53.69, 7.18, 7.14 y 5.70 mg/g de muestra,

respectivamente. Ar presentó un contenido mayoritario en aminoácidos esenciales libres (Lys = 6.95, Phe = 2.2, Thr = 1.4 y Ile = 0.86 mg/g, respectivamente). Esta última especie presentó mayores diferencias significativas en comparación con los otros dos hongos analizados. Por otra parte, la composición de ácidos grasos libres fue totalmente diferente entre los hongos estudiados. Ar presentó un abundante y significativo contenido de ácidos insaturados: ác. oléico (69.3 mg/g) y ác. linoléico (21.7 mg/g). En cuanto a ácidos grasos saturados el Li presentó un alto y significativo (por Duncan y LSD con un 95 % de confiabilidad) contenido de ácido esteárico con un 32.06 mg/g de muestra.

De acuerdo a los resultados expuestos anteriormente podemos concluir que tanto *Amanita rubescens* y *Ramaria flava* pueden llegar a ser consideradas como alimento suplementario y de importancia económica para el país como alimento exótico de exportación.

II. INTRODUCCION.

Las necesidades nutritivas en aminoácidos esenciales para el hombre son conocidas, varían con la edad y con las condiciones fisiológicas en las diferentes etapas de la vida del individuo (gestación, lactancia, niñez, etc.). El déficit nutricional en proteínas es, por desgracia, muy alto para algunos segmentos de la población mundial y puede agravarse más en el futuro; de hecho, el aporte de proteínas alimentarias en cantidades suficientes para satisfacer las necesidades de la población presenta grandes problemas, especialmente por su elevado costo comparado con el de los carbohidratos o lípidos. Para satisfacer esta creciente demanda, es necesario encontrar nuevas fuentes de proteínas y desarrollar métodos tecnológicos alternativos para su aprovechamiento. Las proteínas convencionales deben además usarse de manera más eficaz. Por estas razones es importante disponer del mayor número posible de datos sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas de las proteínas alimentarias convencionales (proteína de origen animal) y no convencionales (proteína de origen vegetal) (Fennema, 1993). En varias zonas y países subdesarrollados se hacen esfuerzos para aumentar las fuentes de proteína vegetal, lo cual ha sido estimulado en alto grado por la FAO (Food and Agriculture Organization) y la UNICEF (United Nations Children's Fund) (Krause y Hunscher, 1975). Actualmente, la biotecnología participa de manera decisiva en la agricultura, para producir y reproducir vegetales que satisfagan las necesidades del hombre.

La recolección de hongos data desde aproximadamente 4 000 años en la India y 3 100 años en Europa (Grecia e Italia). En tiempos modernos en México y Guatemala la recolección de los hongos han jugado un papel religioso y mitológico. Aunque su consumo es común y se ha reportado desde tiempos prehispánicos (Martínez-Carrera y Larqué-Saavedra, 1990), entre mazatecas, chinantecas, chatino, mixes, zapotecas y mixtecos de Oaxaca; nahuas y posiblemente otomíes de Puebla y tarascos de Michoacán, en México, no fue sino hasta los años 30's cuando se llegó a una cierta comprensión del papel de los hongos, así como su identificación biológica y composición química empezaron a ser posibles (Evans y Hofmann, 1982).

Actualmente, se sabe que existen más de 200 especies de hongos comestibles que crecen en diversos tipos de vegetación; su abundancia y distribución geográfica varía año con año según la estación. Los campesinos los colectan separando los tóxicos o venenosos de los comestibles. Los informes etnomicológicos refieren con frecuencia que existe una cultura micológica en el

campesinado en torno a los hongos y éstos constituyen parte de su dieta alimenticia (Martínez-Carrera y Larqué-Saavedra, 1990). En la actualidad 80 especies, especialmente saprófitas con excepción de algunas micorrícicas, se han logrado cultivar en forma experimental en laboratorios de diversas partes del mundo. Desde el punto de vista comercial, 22 especies han sido cultivadas de las cuales sólo 10 se producen a escala industrial, dentro de los cuales se encuentran principalmente *A. bisporus*, *P. ostreatus* y *L. edodes* (Martínez-Carrera y col., 1993).

La biotecnología de hongos comestibles desarrollada en Estados Unidos, Europa y el sureste de Asia, alcanza una producción anual que supera las 1,400,000 ton (Martínez-Carrera y Larqué-Saavedra, 1990). En los últimos años ésta se ha convertido en una alternativa real en la obtención de alimentos para el consumo humano utilizando residuos agroindustriales como sustrato para su cultivo. En América Latina y específicamente en México, el cultivo de hongos comestibles se encuentra muy poco desarrollado, a pesar de la potencialidad que existe en sus diferentes regiones para cultivar algunas especies de hongos que se desarrollan en forma silvestre y que tradicionalmente son consumidos por las poblaciones rurales.

La producción de alimentos en el país es notablemente deficiente debido a la problemática socioeconómica y política que presenta el país y se enfrenta a problemas complejos de producción, manejo, conservación, abasto y comercialización, lo cual ha llevado a una creciente importación de productos básicos. Existen marcadas tendencias que indican escasez de alimentos y una menor capacidad de compra de la población rural que podría provocar una crisis grave (Martínez-Carrera y Larqué-Saavedra, 1990).

La producción de hongos comestibles puede constituir una alternativa en la producción de alimentos en el medio rural porque no afecta los valores ni las actividades centrales de la vida campesina en el entorno ecológico; además de contribuir a manejar el conflicto alimentario y nutricional, debido a las fuertes presiones económicas (Martínez-Carrera y col., 1993).

En base a lo anterior, resulta necesaria la realización de estudios bromatológicos y biotecnológicos en nuevas especies colectadas de hongos silvestres comestibles en el Estado de Querétaro. Esto acrecentará la información sobre el valor nutricional de los hongos silvestres, fortaleciendo su uso y cultivo en todos sus niveles.

III. REVISION BIBLIOGRAFICA.

A. GENERALIDADES

Según la leyenda, hace tres milenios y medio, el héroe griego Perseo, sediento bebió el agua de una seta, de ahí derivó el nombre de Micenas, gran civilización de la edad antigua creada por el hombre. La micología fue derivada de la misma palabra griega (mykes).

Las setas se cuentan entre los hongos más grandes que interesaron a los naturalistas; con la invención del microscopio por Van Leeuwenhoek en el siglo XVII comenzó el estudio sistemático de los hongos. Después, Pier Antonio Micheli (botánico italiano) contribuye con la publicación *Nova plantarum genera* en 1729, la cual contiene investigaciones sobre los hongos (Alexopoulos, 1977); C. Linnaeus contribuyó en 1758 proponiendo un sistema binomial sobre la clasificación taxonómica de plantas y animales (género - especie) y en 1735, publicó *Sistema Nature* (Oxenhor, 1979).

Los hongos constituyen un grupo de organismos vivos desprovistos de clorofila, con núcleo típico, reproducción sexual y asexual por medio de esporas, y conidios cuyas estructuras somáticas, por lo común filamentosas y ramificadas llamadas hifas, están típicamente rodeadas por una pared celular que contiene quitina y otros polisacáridos. La composición química de la pared celular no es la misma en todos los hongos. En algunas formas, la celulosa es probablemente el principal constituyente. En la mayoría de los hongos, principalmente en las formas superiores, la pared celular está compuesta principalmente por quitina, glucanas, mannanas, etc. (Alexopoulos, 1977).

La quitina es una sustancia de considerable importancia biológica, la cual consta de cadenas de β -D glucosa con todos los carbonos sustituidos por un grupo acetilamino. La forma en que se encuentra en los hongos es como α -quitina, la cual contiene dos características principales en los enlaces de hidrógeno: a) La presencia de una banda intermolecular O-O y b) los enlaces a nivel de grupos amino que son casi perpendiculares en la reducida fibra, ocasionando a nivel de NH-O=C enlaces de hidrógeno. Este último provee una gran fuerza intermolecular entre cadenas adjuntas paralelas en una dirección, mientras la próxima cadena perpendicular parece mantenerse con enlaces hidrofóbicos entre metilos en el grupo amido o por enlaces de hidrógeno de cadena cruzada, involucrando los grupos hidroximetilos. La quitina está casi siempre formada con microfibrillas cristalinas fijas en una matriz constituida por otros polisacáridos (Sandford y Matsuda, 1980).

En muchos hongos se han hallado también Callosa - un carbohidrato complejo-, sustancias parecida a la lignina, y otros materiales orgánicos (glucanas [quitina- β glucan], mannanas [quitina-mannana], etc.). Ninguna de estas sustancias se presenta sola, ni tampoco es siempre igual en una especie; factores externos tales como la composición del medio, valores de pH y la temperatura influyen profundamente sobre la composición de las paredes, así como aspectos fenológicos intrínsecos a las especies.

El estudio sistemático de los hongos cuenta solamente con 250 años, pero las manifestaciones de este grupo de organismos han sido conocidas por el hombre desde hace miles de años. Los hongos desempeñan un papel muy importante en el medio ambiente; como agentes responsables de gran parte de la descomposición de la materia orgánica; agentes causantes de enfermedades en las plantas, animales y del hombre; constituyen la base de una cantidad de procesos industriales de fermentación, responsables de la manufactura de antibióticos. Los hongos son tan dañinos como benéficos para la agricultura; por una parte perjudican las cosechas ocasionando pérdidas, mientras que por otra aumentan la fertilidad del suelo y su utilización o consumo contribuirá a acrecentar el conocimiento y bienestar del hombre (Alexopoulos, 1977).

Los hongos comestibles silvestres, así como los cultivados con el propósito de ser industrializados para la alimentación humana, quedan comprendidos en dos grandes grupos taxonómicos: **Ascomicetos y Basidiomicetos.**

Ascomicetos, hongos con pocas esporas sexuales y en número definido (típicamente 8), producidos por un esporangio llamado asco (vejiga, saco o recipiente); en su mayoría filamentosos y se reproducen asexualmente por conidios (Alexopoulos, 1977). De los Ascomicetos, los más apreciados por su delicado sabor pertenecen a los órdenes Pezizales y Tuberales, que comprenden los géneros *Morchella* (fam. Morchellaceae) y *Tuber* (fam. Tuberaceae) cuyas especies más comunes son la *M. esculenta*, *M. conica* y *M. costata*; la *T. magnatum*, *T. melanosporum*, *T. aestivum*, *T. uncinatum* y *T. brumale*. Otros hongos ascomicetos subterráneos, llamadas también trufas, son los de la familia Terfeziaceae y del género *Terfezia*, como *T. leonis*.

Basidiomicetos, hongos con esporas sexuales producidas en el exterior del basidio, cada basidio produce 4 basidiosporos y forma de una calva o maza. Se diferencian de los Ascomicetos por su transferencia de núcleos desarrollando un extenso micelio con núcleos apareados (Alexopoulos, 1977). Casi todos los hongos comestibles de importancia por su cultivo en escala industrial

pertenecen al grupo de los Basidiomicetos,. Del género *Auricularia*, del orden auriculariales (fam. Tremellaceae): *T. fuciformis*; del género *Agaricus* (fam. Agaricaceae): *A. bisporus brunnescens* y *A. bitorquis*. Los géneros *Lentinula*, *Flamulina*, *Pleurotus* y *Tricholoma* (fam. Tricholomataceae): *L. edodes* y *P. ostreatus*. Del género *Volvariella* (fam. Volvariaceae): *V. volvacea*, género *Pholiota* (fam. Cortinariaceae): *Ph. mutabilis* y *Ph. aegerita*, de los géneros *Kueheromyces* y *Stropharia* (fam. Strophariaceae) : *K. mutabilis* y *S. rugosoannulata*. Y del género *Coprinus* (fam. Coprinaceae): *C. fimentarius* y *C. comatus*. Otros géneros en el arte culinario son el *Boletus*, *Cantharellus*, *Amanita*, *Amanitopsis*, *Lactarius* y *Russula*; los cuales crecen silvestres en las áreas forestales del país (Herrera y Ulloa, 1990).

B. IMPORTANCIA ALIMENTICIA DE LOS HONGOS.

Aunque el hombre moderno está enfrentando muchos problemas relacionados con su suministro alimenticio, el interés en los hongos ha empezado a generalizarse en todo el mundo, ya que, independientemente de la temporada, se pueden estar produciendo como resultado de las técnicas de cultivo artificiales. El consumo de hongos silvestres es discutido, especialmente desde que los métodos de cultivo artificiales están siendo aplicados en un amplio rango de especies y tipos de hongos. Recientemente se ha dado mayor énfasis al valor alimenticio de los hongos. Contrariamente a las creencias populares, los hongos, aunque bajos en calorías, contienen proteínas de alta calidad nutricional, minerales y vitaminas del complejo B (B_1 , B_2 y B_{12}), vitamina C y D, niacina y ácido pantoténico. En cuanto al contenido de proteína se han citado valores entre 19 y 35 % en base seca; su alta calidad se debe a que incluyen aminoácidos esenciales para el hombre (lisina, leucina y metionina) y contienen gran cantidad de ácidos grasos insaturados. Son bajos en sodio, grasa y colesterol; además, su contenido en ácidos nucleicos no es tan alto como para limitar su uso diario (Téllez, 1995).

Una diversidad de desechos industriales, agrícolas y familiares, pueden ser utilizados como medios para cultivar varios hongos comestibles. Aunque desechos nocivos que contaminan el medio ambiente pueden convertirse en medios de cultivo en beneficio a tierras condicionadas y fertilizadas, que pueden complementar el cultivo de otras cosechas agrícolas y hortícolas (Beuchat, 1979).

Se sabe además, que los hongos contienen otras sustancias benéficas para la salud como el

Lentian obtenido del *Lentinus edodes*, está prescrito para el cáncer gástrico; Volvatonin de *Volvariella* es un tónico cardiaco; Eritadine de *Flammulina velvutipes* ayuda en la disminución del colesterol (Téllez, 1995). Y Calvacín en *Calvatia gigantea*, un posible agente antitumoral (Breene, 1990). Así como, sustancias químicas : pigmentos y ácidos que han sido encontrados en los hongos, constituyen el fundamento de estudios quimiotaxonómicos.

C. PRODUCCION DE HONGOS.

La producción anual total de hongos cultivados en 1980, se estima en 1.2 millones de toneladas métricas. En 1986 la producción de hongos cultivados fue de 2.2 millones de toneladas métricas (Breene, 1990). En 1990 la producción mundial de hongos comestibles fue de 3.7 millones de toneladas (Téllez, 1995).

Tabla 1. Producción total en el mundo de los hongos más cultivados (Téllez, 1995).

Especies de hongos	(%)/Año		
	1979	1986	1990
<i>Agaricus bisporus</i>	74.5	58	39
<i>Lentinus edodes</i>	2,5	8	25
<i>Pleurotus sp.</i>	15.0	15	12
<i>Auricularia sp.</i>	2.0	8	14
<i>Volvariella volvacea</i>	3.5	10	8

D. COMPOSICION QUIMICA PROXIMAL.

Varias opiniones han sido expresadas en relación al valor nutricional de los hongos silvestres. Históricamente, los hongos han sido considerados como "bistec vegetal" por algunos autores, otros los consideran sin algún valor o de menor significado nutricional. Desde entonces, pocos estudios realizados por nutriólogos competentes están disponibles, por lo que poco se conoce sobre el verdadero valor nutricional de los hongos.

La mayoría de los datos sobre la contribución nutricional de los hongos en la dieta humana han sido sacados por determinaciones empíricas de la composición de los hongos, específicamente en el contenido de la proteína. En 1935 Quackenbush (citado por Chang y Hayes, 1978) dió ha conocer : " que aunque el mayor interés ha sido dirigido sobre la función proteíca, poco se puede todavía decirse con seguridad respecto a la proteína actual presente, su digestibilidad y propiedades nutritivas ", desafortunadamente este informe permanece todavía.

La información sobre la composición de los hongos es difícil de obtener a partir de temas de nutrición. Es a menudo imposible comparar los resultados obtenidos por trabajos de diferentes investigadores con especies similares de hongos, en donde aún la composición de una determinada especie es afectada por muchas variables, incluyendo diferencias básicas entre especies, composición del sustrato de cultivo, método de cultivo, inexactitudes inherentes en los métodos de análisis y la relativa precisión del analista.

Los datos publicados en tablas de composición de alimentos son a menudo presentados en diferentes unidades de medición basados en el variable peso fresco o seco, por lo que la comparación de datos semejantes se vuelve difícil.

Las características intrínsecas, fisiológicas y bioquímicas de los hongos inducen a una variación adicional entre los datos composicionales. La naturaleza genética de una determinada especie o cepa junto con su metabolismo típicamente heterotrófico determinará el tipo de sustrato y por lo tanto, el sustrato tendrá su efecto sobre la composición nutricional. Dado que los hongos son organismos vivos, y permanecen así hasta ser preparados para el consumo, su composición está en un continuo estado de flujo durante su crecimiento y después de ser cosechados. Los cambios composicionales significativos pueden ocurrir con los años o en cierta etapa de su desarrollo y bajo condiciones de almacenamiento después de la cosecha.

En la Tabla 2 se muestra la composición de varios hongos comestibles cultivados y silvestres. Usando estos datos es posible hacer algunas estimaciones del probable valor nutricional de los hongos. La información así presentada puede servir como un antecedente para más estudios nutricionales definitivos (Chang y Hayes, 1978).

En la Tabla 3 se muestra el rango de valores en base a la composición proximal presentada

Tabla 2 Composición proximal de hongos comestibles cultivados y silvestres.

Especies de hongos	Tipo de muestra	Humedad	Proteína (Nx4.38)	Grasa	Carbohidratos totales	Fibra	Cenizas	Kcal / 100mg
<i>Agaricus bisporus</i>	Fresca	90.4	28.1	3.1	59.4	8.3	9.4	353
<i>Agaricus bisporus</i>	Seca	9.1	27.8	3.9	52.6	6.6	15.7	337
<i>Auricularia sp.</i>	Seca	12.9	4.7	2.1	88.3	2.1	4.9	398
<i>Boletus edulis</i>	Fresca	87.3	29.7	3.1	59.7	8	7.5	362
<i>Clavaria botrytis</i>	Fresca	89.4	8.7	2.7	82.4	nd	6.2	344
<i>Clitocybe multiceps</i>	Fresca	93.5	23.5	6	59	9.6	11.5	352
<i>Coprinus comatus</i>	Fresca	92.2	25.4	3.3	58.8	7.3	12.5	346
<i>Flammulina velutipes</i>	Fresca	89.2	17.6	1.9	73.1	3.7	7.4	378
<i>Lactarius deliciosus</i>	Fresca	88.8	18.8	7.1	67.8	nd	6.3	371
<i>Lentinus edodes</i>	Fresca	91.8	13.4	4.9	78	7.3	3.7	392
<i>Lentinus edodes</i>	Seca	15.8	10.3	1.9	82.3	6.5	5.5	375
<i>Morchella esculenta</i>	Fresca	90	22.8	4.3	62.9	8.4	10	356
<i>Plerotus ostreatus</i>	Fresca	90.8	30.4	2.2	57.6	8.7	9.8	345
<i>Tuber melanosporum</i>	Fresca	77.1	23.3	2.2	66.2	27.9	8.3	272
<i>Volvariella volvacea</i>	Fresca	90.1	21.2	10.1	58.6	11.1	10.1	369

Datos obtenidos de Chang y Hayes (1978)

nd: No determinado

por Chang y Hayes (1978) de los hongos comestibles cultivados y silvestres, útil en un posterior análisis comparativo.

Tabla 3 Rango de valores químicos porcentuales en hongos comestibles cultivados y silvestres.

Análisis proximal	(%)
Humedad	85-95 ^a 5.0-20 ^b
Cenizas	5.0-11 ^b
Fibra cruda	3.0-30 ^a
Grasa total	2.0-8.0 ^b
Proteína	4.2-44
Aminoácidos totales	25-40

^a Fresco

^b Base seca

Una revisión completa del valor nutricional de los hongos fue presentada por Crisan y Sands (citados por Chang y Hayes, 1978). Ellos mencionan el problema de evaluación de datos publicados por diferentes investigadores al analizar la misma especie de hongo, concluyendo que la composición no puede ser traducida directamente en valor nutricional debido a las diferencias (60 a 70 %) de la digestibilidad de los componentes, a la relativa disponibilidad de nutrientes y a las inherentes inexactitudes de procedimientos analíticos (Breene, 1990).

En muchos casos, los investigadores han usado métodos estandarizados de análisis como los publicados por la Asociación Oficial de Análisis Químicos (AOAC, 1984) para determinar el contenido de humedad, proteína cruda, grasa, fibra y ceniza en hongos.

La proteína cruda es normalmente calculada por el contenido de nitrógeno, determinado por el método Kjeldahl, usando el factor de conversión ($N \times 6.25$). Por razones bajo discusión, los valores de proteína cruda para hongos han sido recalculados como ($N \times 4.38$). El contenido de grasa es determinado por extracción con solventes; la fibra es calculada como fibra dietética y las cenizas como residuo después de la incineración. El contenido de carbohidratos es calculado por diferencia, como carbohidratos totales. Es de suponer que el nitrógeno no protéico en hongos está en la forma de quitina en la fibra. Aunque puede el nitrógeno estar presente en pequeñas cantidades en otros compuestos nitrogenados como urea o amonía (Chang y Hayes, 1978).

1. HUMEDAD Y CENIZAS

Los hongos frescos contienen generalmente entre 85 y 95 % de humedad mientras que los secados por aire disponibles comercialmente, contienen 5 - 20 %. Estos valores son totalmente arbitrarios y variables dependiendo de sí el análisis de la muestra fresca que realizado inmediatamente después de la cosecha o a partir de muestras que fueron almacenadas bajo varias condiciones. El contenido de humedad en una determinada especie de hongo seco, es afectado significativamente por factores del medio ambiente como temperatura y humedad relativa.

El promedio del contenido aproximado en hongos frescos es de 90 % de humedad y de aquellos secados por aire es de 10 - 12 % (Chang y Hayes, 1978).

Basados en la propuesta de Crisan y Sands (1978), se asume que el 10 % de sustancia seca contenida en hongos frescos, expresado sobre un peso en base seca pueden ser convertidos de peso fresco a peso en base seca y viceversa multiplicando o dividiendo por 10, respectivamente.

El contenido total de cenizas es de un 5 - 11 % en base seca. Los hongos probablemente contienen todos los minerales presentes en el sustrato de cultivo; incluyendo cantidades sustanciales de fósforo, potasio, una menor cantidad de calcio y una muy pequeña cantidad de hierro. Es decir, sustratos altos en minerales proporcionan hongos con contenidos relativamente altos en minerales (Breene, 1990).

2. FIBRA

Los hongos frescos contienen relativamente gran cantidad de carbohidratos (3 - 28 %) y de fibra cruda (3 - 32 %).

Los carbohidratos poliméricos incluyen al glucógeno como componente de almacenamiento de energía comparable al almidón (plantas superiores) y a la quitina (un polímero de N-acetilglucosamina). La quitina es un componente estructural de la pared celular fúngica, considerado como el mejor constituyente del contenido de fibra en los hongos y contiene una cantidad significativa de nitrógeno no proteico; el cual, contribuye a que se presenten errores en la determinación del contenido de proteína cruda en análisis estándares, usando el factor de conversión $N \times 6.25$ (Chang y Hayes, 1978).

Durante la extracción secuencial con solventes y el tratamiento con ácido diluido y álcali que forman la metodología para analizar fibra cruda puede perderse un 80 % de las hemicelulosas, del 50

al 90 % de lignina y del 20 al 50 % de la celulosa.

El AOAC define a la fibra cruda como el residuo de un alimento o producto alimenticio después que se ha tratado con ácido sulfúrico en ebullición, hidróxido de sodio, agua, alcohol y éter. Como esta definición es ambigua y el análisis con frecuencia da resultados desviados, se han propuesto algunas modificaciones a la nomenclatura, sugiriéndose que se hable de fibra dietética la cual incluye la suma de celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina (Desrosier, 1990). El proceso de determinación de fibra dietética total es una ligera modificación de el método de Prosky y col. (Técnica : Total Dietary Fiber. SIGMA, 1991. AOAC, 1990).

a. Importancia de la fibra dietética : Los polisacáridos diferentes al almidón y al glucógeno no son hidrolizados por las enzimas gastrointestinales y pasan por lo tanto al intestino grueso más o menos intactos, tras una insignificante hidrólisis ácida en el estómago. Normalmente, estos polisacáridos, tales como celulosa, hemicelulosa y pectina, de las paredes celulares vegetales, ejercen un efecto altamente beneficioso, puesto que proporcionan volumen para la acción peristáltica y facilitan el paso del material a través del sistema digestivo. Este incremento del movimiento del intestino ocasiona una rápida eliminación de los productos de desecho no absorbidos, que podrían, de otro modo, producir irritación y quizás, las condiciones propicias para el desarrollo de cáncer. De forma adicional, estos polisacáridos se asocian con ácidos biliares, decreciendo así su reabsorción; como consecuencia, tienden a disminuir el colesterol en sangre y presumiblemente retrasan la aparición de arteriosclerosis. El grupo polisacárido no digerible en la dieta es denominado fibra dietética. Algunos de los componentes de la fibra, como pectinas y otras gomas vegetales, si se ingieren en cantidades excesivas, pueden ocasionar diarrea debido a su absorción de grandes cantidades de agua para producir un hidrocoloide. Algunos de estos polisacáridos son atacados por la microflora intestinal degradándola en fragmentos moleculares más pequeños, que por lo general no son metabolizados (Fennema, 1993).

3. GRASA TOTAL

La grasa cruda en hongos contiene toda clase de compuestos lipídicos incluyendo ácidos grasos libres, mono-, di-, y triacilglicéridos, esteroides, esteroles, esteroles esterificados y fosfolípidos; cuyo contenido varía desde 1 % hasta 15 - 20 % en peso seco. Sin embargo, los hongos contienen en promedio de 2 - 8 % de grasa.

La fracción lipídica es una fracción cuantitativa baja en hongos y, por lo tanto, es de poca importancia nutricional. Desde un punto de vista cualitativo, los ácidos grasos son predominantemente de naturaleza insaturada (Breene, 1990).

a. Importancia de los lípidos : Los lípidos son los principales componentes del tejido adiposo y junto con las proteínas y los carbohidratos constituyen el grueso de los componentes estructurales de todas las células vivas. Los lípidos de la dieta juegan un importante papel en la nutrición, ya que aportan calorías y ácidos grasos esenciales, actúan como transportadores de vitaminas y aumentan la palatabilidad de los alimentos (Fennema, 1993).

Las grasas neutras y, sobre todo, los lípidos compuestos, tienen propiedades estructurales y realizan funciones de gran importancia para el sostenimiento del metabolismo (Laguna, 1967).

4. P R O T E I N A

La proteína es el componente crítico que contribuye al valor nutricional de un alimento. El contenido de proteína en la mayoría de los alimentos es calculado por el contenido de nitrógeno usando un factor de conversión ($N \times 6.25$) basado en la suposición de que la mayoría de la proteína contiene 16 % de nitrógeno, la cual, es aproximadamente 100 % digestible y la cantidad de nitrógeno no proteico presente es insignificante.

Sin embargo, estudios realizados sobre la proteína en hongos sugieren que solo el 34 - 89 % de la proteína ($N \times 6.25$) es digerible. Otros estudios indican una probable digestibilidad de 60 - 70 %, por lo que el bajo coeficiente de digestibilidad puede explicarse por el hecho de que estos hongos contienen una cantidad significativa de nitrógeno no proteico en su pared celular en forma de quitina, cuyo nitrógeno será calculado como proteína cruda después del nitrógeno estándar.

Una aproximación cercana del contenido de proteína en hongos puede ser obtenida usando un factor de conversión equivalente ($70 \% N \times 6.25$) o ($N \times 4.38$). Aunque este factor de corrección de la proteína cruda no puede ser exacta para todas las especies de hongos. Sin embargo, este factor de corrección ha sido adoptado para hongos en varias tablas de composición de alimentos. Cuando se considera el potencial nutricional de los aminoácidos libres en un hongo, la proteína cruda calculada como ($N \times 4.38$) puede ser un gran indicador del valor nutricional aunque un indicador menos exacto de proteína verdadera.

El contenido de proteína y en general la composición en hongos es variable entre diferentes

muestras de la misma especie, esto puede ser particularmente atribuible al proceso de análisis usado o a la precisión del analista (Chang y Hayes, 1978).

a. Importancia de la proteína : Las proteínas representan el grupo de sustancias químicas de mayor importancia en la estructura y la fisiología celulares (como constituyentes indispensables del núcleo y de la matriz citoplasmática de todas las células y representan casi la única forma en que el hombre recupere el nitrógeno) (Laguna, 1967; Krause y Hunscher, 1975).

Tienen funciones energéticas secundarias, que contribuyen al funcionamiento del organismo (4.1 kcal/g). Las proteínas exógenas aportan los aminoácidos que se emplean para restituir las proteínas tisulares usadas por el empleo continuo en el cuerpo, para diversas funciones metabólicas y son componentes o precursores de muchas sustancias nitrogenadas no proteicas (Krause y Hunscher, 1975).

Las proteínas forman el componente principal de las células y de todos los tejidos; realizan cometidos definidos en relación con actividades específicas de los diferentes tipos celulares (la reproducción de células, las características hereditarias, la actividad enzimática, el transporte de oxígeno, hormonales, contráctiles, etc.).

Desde el punto de vista químico, las proteínas se definen como sustancias cuaternarias complejas, de alto peso molecular, formadas principalmente, por α -aminoácidos ligados por enlaces peptídicos. Están compuestas por carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno y azufre; muy a menudo, se encuentran otros elementos como fósforo, zinc, hierro y cobalto.

Las características físicas y químicas de los aminoácidos que constituyen la estructura proteica, determinan muchas de las propiedades importantes de las proteínas.

La hidrólisis de las proteínas termina por fragmentarlas hasta obtener α -aminoácidos libres. Existe un grupo de aminoácidos que habitualmente no forman parte de los productos de hidrólisis de las proteínas, aún cuando su importancia biológica suele ser considerable (β -alanina, ácido γ -aminobutírico, ornitina, citrulina y tiroxina) (Laguna, 1967).

5. AMINOACIDOS

Contrario a los reportes de los primeros investigadores que indicaron la ausencia de ciertos aminoácidos, se ha reportado que los hongos contienen todos los aminoácidos esenciales así como los no esenciales además de amidas. Del contenido total de aminoácidos, entre el 25 y el 40 % está

comprendido entre los aminoácidos esenciales dentro de un rango de 10 - 50 %. Y aproximadamente del 25 -35 % de los aminoácidos totales, se encuentran como aminoácidos libres; el resto está combinado en la proteína. Además de los aminoácidos y amidas comunes, han sido detectados aminoácidos inusuales y compuestos nitrogenados en varias especies de hongos. Estos incluyen compuestos como la metionina sulfoxide, β -alanina, ácido cisteico, hidroxiprolina, hidroxilisina, ácido α -aminoadípico, ácidos α -, β - y γ -aminobutírico, ácido pipercolico, fosfoserina, cistationa, canavanina, creatinina, citrulina, ornitina, glucosamina y etanolamina.

Como con otros componentes bioquímicos presentes en los hongos, la composición de aminoácidos está en constante cambio. Bajo cortos períodos de almacenamiento, el contenido de aminoácidos libres puede incrementarse al 5 %. La composición del sustrato de cultivo puede además tener un efecto significativo sobre la composición de aminoácidos en hongos, sin cambios aparentes en el contenido de proteína cruda (Chang y Hayes, 1978).

El valor nutricional de los hongos varía entre especies, cabe mencionar que generalmente son limitados en aminoácidos sulfurados y esenciales, sin embargo, contienen una proporción sustancial de aminoácidos libres, por lo cual se han considerado como condimentos importantes que pueden mejorar el valor nutricional de la dieta (Breene, 1990).

a. Importancia de los aminoácidos : Los aminoácidos contienen en su estructura molecular al menos un grupo amino primario (-NH₂) y un grupo carboxilo (-COOH), por lo que tienen capacidad amortiguadora. En los aminoácidos de las proteínas, el grupo amino primario y grupo carboxilo ocupan una posición α . Cada aminoácido tiene una cadena lateral, R, característica que influye en sus propiedades fisicoquímicas y por lo tanto en las de la proteína de la que forman parte.

Según la polaridad de esta cadena lateral es posible agrupar a los aminoácidos en cuatro clases: 1) *Con cadenas laterales no polares o hidrófobas* : alanina (Ala), isoleucina (Ile), leucina (Leu), metionina (Met), fenilalanina (Phe) y valina (Val); son menos solubles en agua que los polares y su hidrofobia aumenta con la longitud de la cadena. 2) *Con cadena lateral polar no cargada (hidrófila)* : poseen grupos funcionales neutros, polares, capaces de establecer puentes de hidrógeno con moléculas adecuadas, como el agua. La polaridad de la serina (Ser), treonina (Thr) y tirosina (Tyr) está relacionada con sus grupos hidroxilo; de la asparagina (Asp) y glutamina (Glu) lo está en su grupo amida y de la cisteína (Cis) con su grupo tiol. 3) *Con cadena lateral cargada positivamente (a pH próximo a 7)* : lisina (Lys) (por su grupo ϵ -NH₂), arginina (Arg) y histidina (His) (por su

grupo guanidino). 4) *Con cadena lateral cargada negativamente (a pH próximo a 7)* : constituido por los ácidos aspártico y glutámico (Fennema, 1993).

La hidrólisis total (ácida, alcalina o enzimática) de las proteínas proporciona aminoácidos de configuración L, que se diferencian entre sí por la naturaleza de sus cadenas laterales. Los aminoácidos de la mayor parte de las proteínas pertenecen a un grupo reducido, constituido por veinte de estos compuestos. Los aminoácidos se unen para formar las proteínas mediante enlaces amida, llamados enlaces peptídicos, formando cadenas polipeptídicas (Lehninger, 1991).

La función fundamental de la proteína en la dieta es la de proporcionar nitrógeno aminoacídico para la síntesis de las proteínas en que intervienen RNAr y RNAt, en el citoplasma celular; y otras sustancias nitrogenadas que intervienen en la composición corporal. Las proteínas de los alimentos son digeridas por las enzimas proteolíticas del tracto gastro intestinal. Los aminoácidos libres y los pequeños péptidos se absorben a través de las células intestinales, pasan luego a la vena porta para su transporte al hígado. La concentración de aminoácidos libres en los tejidos depende, no sólo del catabolismo y anabolismo proteicos, y de la proteína ingerida, sino de la presencia de algunos aminoácidos no esenciales: Glutamina + ácido glutámico (Glx), Ala, ácido aspártico y Ser, que participan en numerosas rutas metabólicas.

El valor nutritivo de un alimento como fuente proteica refleja su capacidad para satisfacer las necesidades de nitrógeno y aminoácidos del consumidor y para asegurar un crecimiento y un mantenimiento adecuados; lo cual está determinado por varios factores (Fennema, 1993).

Hay ocho aminoácidos esenciales, que deben ser suministrados en los alimentos. Su síntesis en el organismo es nula o deficiente, incapaz de satisfacer las necesidades metabólicas. Ellos son la valina, lisina, treonina, leucina, isoleucina, triptófano, fenilalanina y metionina. Otros dos aminoácidos, la arginina y la histidina, son requeridos por los niños durante el período de crecimiento. Sin un suministro adecuado de los aminoácidos esenciales no pueden ser sintetizadas las proteínas ni mantenerse los tejidos corporales (Krause y Hunscher, 1975).

Acido glutámico : Contribuye a proporcionar el sabor salado y delicioso (Umami) de los alimentos, cuando se utilizan a niveles que sobrepasan su umbral de detección propio y simplemente aumentan los sabores a niveles por debajo de sus umbrales de detección propios. Sus efectos son notables y deseables para el sabor de hortalizas, productos lácteos, carnes, aves, pescados y alimentos

marinos. La ornitina (Orn) y el ácido gama-aminobutírico son productos de la descarboxilación del ácido glutámico (Fennema, 1993).

Ornitina : Participa en la síntesis de enlaces proteína-prolina (Barrett, 1985). Compuesto antiolesterolémico usado en el tratamiento de hiperamonemia (Chapman, 1994). Homólogo inferior siguiente de la lisina, no es utilizado para formación de proteínas. La arginina, ornitina y citrulina son aminoácidos no indispensables que intervienen en la síntesis de la urea en el hígado (Krause y Hunscher, 1975). Puede originarse por transaminación a partir del semialdehído γ -glutámico, seguida de la desacilación o transferencia de un grupo acetilo al ácido glutámico (Mahler y Cordes, 1971).

Cuando hay una extensa pérdida funcional del hígado o una degeneración hepática se produce una disminución en la capacidad de eliminación de amoníaco; la cual es mejorada por administración de glutamato u ornitina que aceleran la velocidad de dicha eliminación (Mcgilvery, 1972).

Ácido gama-aminobutírico : En el cerebro es un posible mediador de la actividad cerebral (Laguna, 1967). Componente de tejidos vegetales y del cerebro de mamíferos, algunos anfibios y aves (Mahler y Cordes, 1971).

Es una sustancia transmisora inhibitoria que es metabolizada en forma de ácido succínico; además es un transmisor sináptico para neuronas inhibitorias (Staunton y col., 1969).

Las células nerviosas se comunican unas con otras usando como sustancias químicas transmisoras a algunos aminoácidos [como ácido γ -aminobutírico (GABA), glicina, ac. glutámico y ácido aspártico], pudiendo actuar como transmisores inhibitorios o excitatorios en diferentes regiones cerebrales (Ratenbury, 1981).

b. Análisis : La estimación cuantitativa de la proteína puede ser determinada por varios métodos: determinaciones colorimétricas y de densidad óptica, las cuales son bastantes inciertas; la última debido a que el contenido en triptófano y tirosina, de los que dependen los valores de absorbancia de las proporciones proteicas, varían mucho de unas proteínas a otras.

Un método de determinación de proteínas más seguro, pero también más complicado, es el que se basa en la estimación cuantitativa del nitrógeno proteico. El análisis se realiza convirtiendo el nitrógeno proteico en amoníaco mediante la digestión de la proteína por ácido sulfúrico concentrado en presencia de un catalizador, después el amoníaco formado se separa entonces de la proteína digerida por destilación en corriente de vapor; se titula o se le adiciona reactivo de Nessler, que permita determinar el amoníaco colorimétricamente.

La reacción de biuret puede utilizarse también en la estimación cuantitativa de la concentración proteica, puesto que detecta los enlaces peptídicos. En la mayor parte de las proteínas la frecuencia con que aparecen enlaces peptídicos, por gramo de las priméras, viene a ser la misma.

Entre otros métodos está la determinación de los índices de refracción, la estimación de la turbidez tras su precipitación con ácido tricloroacético, etc. (Mahler y Cordes, 1971).

La determinación exacta de la composición en aminoácidos de las proteínas es de gran interés para caracterizarlas, comprender su estructura y su función. Consta de dos etapas: hidrólisis de la proteína obteniendo los aminoácidos que la constituyen y estimación cuantitativa de los productos de la hidrólisis.

La hidrólisis completa de las proteínas puede llevarse a cabo con ácidos fuertes, bases fuertes ó con enzimas proteolíticas. En el caso de una hidrólisis ácida se emplea ácido clorhídrico 6 N y generalmente dicha hidrólisis se lleva a cabo en tubos cerrados al vacío y sometidos a temperaturas de 110 °C durante períodos de tiempo comprendidos entre 12 y 96 horas, después de la cual se elimina el exceso de ácido. En estas condiciones los enlaces peptídicos se hidrolizan cuantitativamente, dando los correspondientes clorhidratos de aminoácidos (la liberación completa de la valina, leucina e isoleucina requiere tiempos de hidrólisis más largos).

De los aminoácidos normalmente existentes en las proteínas, el triptófano se destruye en su totalidad mediante este tratamiento y la serina y treonina sufren pequeñas pérdidas, lo que obliga a determinadas correcciones. Los aminoácidos así obtenidos no sufren racemización. Los aminoácidos de la mezcla se pueden poner de manifiesto por diferentes técnicas. Una de las técnicas más antiguas consiste en esterificar los grupos carboxílicos con metanol y etanol y efectuar una destilación fraccionada de sus ésteres. Algunos aminoácidos naturales reaccionan cuantitativamente en reacciones químicas específicas por lo que su análisis se puede efectuar en la mezcla de aminoácidos que se obtiene al hidrolizar la proteína. Este procedimiento es útil cuando no existen en el hidrolizado otros compuestos que reaccionen en forma similar con otros reactivos.

También puede obtenerse una hidrólisis completa de las proteínas sometiéndolas, con hidróxido sódico 2 - 4 N, durante 4 a 8 horas, a una temperatura de 100 °C. Esta hidrólisis tiene un valor limitado en el análisis rutinario porque durante este proceso se descomponen la cisteína, cistina, serina, treonina y arginina; otros aminoácidos se destruyen parcialmente por desaminación, y se produce también la racemización de los aminoácidos. La principal utilidad de la hidrólisis alcalina es

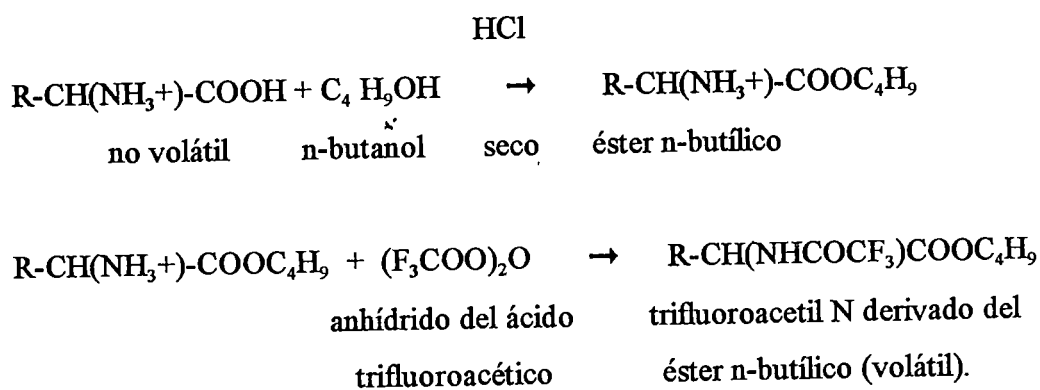
la determinación del triptófano.

La hidrólisis total de las proteínas por acción enzimática es muy difícil, puesto que la mayoría de los enzimas sólo atacan rápidamente a determinados tipos de enlaces específicos; a menudo se emplean combinaciones de enzimas que exigen períodos de tiempo mayores (Mahler y Cordes, 1971).

Dos métodos importantes utilizados por rutina en la química de las proteínas son: 1) El uso de resinas de intercambio iónico, las cuales separan aminoácidos de mezclas, dando patrones de elución característicos bajo condiciones cuidadosamente controladas. Progresos técnicos recientes han permitido construir analizadores automáticos de aminoácidos, empleando columnas de resinas de intercambio iónico sobre las que se sitúan los hidrolizados de proteína; a las tres horas pueden registrarse determinaciones cuantitativas de todos los aminoácidos presentes.

2) Otro método para cuantificar hidrolizados proteicos comprende la síntesis de derivados estables y volátiles de los aminoácidos básicos, neutros y ácidos. Estos derivados se inyectan en un aparato de cromatografía de gases; con una columna de temperatura regulada y pueden obtenerse resultados una hora después de la inyección.

Reacción de los derivados :



(Conn y Stumpf, 1974).

La separación cuantitativa y la valoración de cada aminoácido en una mezcla compleja, como lo sería el hidrolizado de una proteína, constituye un problema cuando se ataca por los métodos clásicos de separación, tales como la precipitación fraccionada, la cristalización o la destilación. Hace 25 años el análisis cuantitativo de un sólo aminoácido en una mezcla, podría representar varios meses de trabajo. Hasta que los métodos cromatográficos no fueron aplicados sistemáticamente al análisis

de mezclas de los aminoácidos, no pudieron lograrse progresos significativos en el estudio detallado de la composición de las proteínas. Desde entonces, los métodos analíticos basados en estos principios se han mejorado y son capaces de obtener gran velocidad, precisión y sensibilidad; además de que han sido automatizados.

Los métodos cromatográficos pueden aplicarse no solamente a la separación, identificación y análisis cuantitativo de mezclas de aminoácidos, sino también de péptidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos, lípidos e hidratos de carbono.

Los principios físicos básicos, empleados en el análisis de los aminoácidos por métodos cromatográficos y electroforéticos se funda en el conocimiento de la solubilidad relativa y de la conducta ácido-base de los distintos aminoácidos.

1) Cromatografía de reparto.- Es la separación de mezclas a contracorriente, esencialmente mediante el principio de distribución, en el que se distribuye un soluto entre volúmenes iguales de dos líquidos inmiscibles, la relación de concentraciones del soluto entre las dos fases en equilibrio a una temperatura determinada. Tiene lugar sobre gránulos microscópicos de una sustancia inerte, insoluble e hidratada, como el almidón o el gel de sílice, empaquetados en una columna de 10 a 100 cm.

2) Cromatografía de papel.- Sigue el mismo principio que la de reparto. Donde a un soporte de papel se le aplica un disolvente con la mezcla de aminoácidos, los cuales ascienden por capilaridad por éste; produciéndose una multitud de distribuciones microscópicas de los aminoácidos entre la fase que fluye y la fase estacionaria acuosa, ligadas a las fibras de papel.

3) Cromatografía de intercambio iónico.- En este método las moléculas de soluto se separan basándose en las diferencias de comportamiento ácido-base. Para este proceso la columna se llena con una resina sintética que contiene grupos cargados fijos, es decir, formada por polímeros con grupos químicos activos (poliestireno sulfonadas) que al ionizarse permiten hacer el intercambio por otros iones presentes en la solución (resinas de intercambiadores catiónicos e intercambiadores aniónicos) (Lehninger, 1991; Laguna, 1967).

Los intercambiadores catiónicos que tienen grupos ácidos tipo $-SO_3H$, $-COOH$, o el $-OH$ fenólico y que son tanto más activos cuanto más fácilmente pierde el H^+ , y por lo tanto intercambian con otro catión; una resina en forma hidrógeno, cuando contiene H^+ , se cambia a la forma sódica si pierde el H^+ y capta Na^+ . Las resinas de intercambio aniónico tienen grupos amino, modificados o no que actúan como intercambiadores de estructuras de carga negativa. Como los aminoácidos son iones

dipolares y la actividad de sus cargas negativas y positivas varía de acuerdo con su estructura, el número de ellas, el pH en que se encuentran, etc., las resinas de intercambio (Amberlitas, Dowex - 50, etc.) han sido de gran utilidad para separarlos (Laguna, 1967).

Los aminoácidos se separan mediante columnas de intercambio catiónico rellenas con partículas sólidas de una resina de poliestireno sulfonada que se ha equilibrado previamente con una disolución de NaOH, para que sus grupos sulfónicos ácidos se hallen totalmente cargados con Na^+ . Esta forma de resina es la forma sódica; la resina puede también prepararse en forma protonizada o forma hidrogenada, mediante un lavado con ácido. A la forma sódica de la resina lavada se le añade una disolución ácida (pH= 3) de la mezcla de aminoácidos; a dicho pH los aminoácidos se encuentran principalmente en forma de cationes, con carga positiva neta. Los aminoácidos catiónicos tienden a desplazar algunos de los iones sodio ligados a las partículas de resina; la cantidad de desplazamiento variará ligeramente entre los distintos aminoácidos a causa de las pequeñas diferencias en el grado de ionización. A pH 3 los aminoácidos más básicos (lisina, arginina, e histidina) se unirán a la resina muy estrechamente por fuerzas electrostáticas y los ácidos (ácido glutámico y aspártico) serán los que se unan menos. A continuación la columna se lava con sustancias amortiguadoras de pH y fuerza iónica gradualmente mayores, con lo que se neutralizan progresivamente las cargas positivas de los aminoácidos y al mismo tiempo se debilitan los enlaces salinos. A medida que se aumentan gradualmente el pH y la concentración de cloruro de sodio del medio eluyente acuoso, los aminoácidos descienden en la columna a velocidades diferentes y pueden recogerse en muchas fracciones pequeñas; es decir, a medida que tiene lugar el desarrollo de la columna, los aminoácidos ácidos son los primeros en separarse de la columna (a pH 3.1 y 30°C), luego siguen los aminoácidos neutros (treonina, serina, isoleucina, etc.) y finalmente los básicos (lisina, arginina, histidina). Las diversas fracciones pueden analizarse cuantitativamente mediante la reacción de ninhidrina. Esta técnica de análisis de aminoácidos fue iniciada por W. Stein y S. Moore en 1949 (Mahler y Cordes, 1971; Lehninger, 1991). Sin embargo, también pueden cuantificarse por cromatografía de gases.

4) Electroforesis sobre papel.- En este proceso se coloca una gota de una disolución de la mezcla de aminoácidos sobre una hoja de papel filtro adecuada, la cual se humedece con un amortiguadora de pH adecuado. Los extremos de la hoja se sumergen en los recipientes que contienen los electrodos y se aplica un campo eléctrico.

El conocimiento de las propiedades ácido-básicas de los aminoácidos permiten seleccionar

las condiciones de tal modo que se logre la separación de cualquier mezcla de aminoácidos (Lehninger, 1991).

Todos los aminoácidos poseen, por lo menos, dos grupos que están implicados en las relaciones protolíticas en soluciones acuosas. El grupo α -carboxilo de los aminoácidos se caracteriza por un valor de pka que varía entre 2 y 3. El grupo α -amino se caracteriza por un pka (ácido conjugado), próximo a 10. Por lo tanto, a valores de pH comprendidos entre 4 y 9 el aminoácido se presentará como un ion dipolar o en forma zwitteriónica, estando disociado el grupo carboxilo y sin disociar el amino. A lo largo de este intervalo de pH, existe un valor llamado punto isoeléctrico (pI) que carece incluso de carga neta.

Las cadenas laterales de varios aminoácidos, como el ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, histidina, arginina, cisteína y tirosina tienen propiedades claramente ácidas o básicas. Las estructuras isoeléctricas de estos aminoácidos varían de acuerdo con el carácter básico o ácido del grupo de la cadena lateral.

Las estructuras iónicas dipolares de los aminoácidos son suficientes para explicarnos muchas de sus propiedades, como: una solubilidad en agua relativamente grande; escasa solubilidad en solventes orgánicos; momentos dipolos grandes, y puntos de fusión elevados. Esta última propiedad se debe quizá a atracciones electrostáticas significativas entre grupos de la red cristalina distintamente cargados (Mahler y Cordes, 1971).

6. ACIDOS GRASOS

a. **Importancia de los ácidos grasos :** Los ácidos grasos son todos los ácidos alifáticos monocarboxílicos que pueda ser liberado mediante hidrólisis de cualquier producto que lo contenga. Se dividen en saturados (ácido palmítico, mirístico, esteárico y araquídico) e insaturados (ácido palmitoleico, oléico, linoléico, linolénico y araquidónico). Los ácidos grasos esenciales son el ácido oléico y linoléico (Fennema, 1993). Los ácidos grasos libres constituyen habitualmente la reserva lipídica de los tejidos. Aportan 9.2 kcal/g (Chapman, 1973).

Desde hace algún tiempo, se sabe que los ácidos grasos (linoléico, linolénico y araquidónico) son esenciales para la vida de los animales, necesarios para el crecimiento, tienen importantes papeles en el transporte de grasas y en su metabolismo, en el mantenimiento de su función y de la integridad de las membranas celulares. También son parte de los ácidos grasos que esterifican al colesterol y de

los fosfolípidos de las lipoproteínas del plasma y de las lipoproteínas de las mitocondrias. Algunas especies animales no pueden existir sin un aporte de ácido linoléico en la dieta. Se ha demostrado que este ácido es indispensable en la dieta de los infantes, además se ha encontrado que puede prevenir o curar una dermatitis característica (eccema). Cantidades excesivas de ácidos polinsaturados se ha observado que reducen el nivel de vitamina E en los tejidos animales hasta un nivel peligrosamente bajo (Krause y Hunscher, 1975). El ácido linoléico favorece el crecimiento y la salud de la piel; no es sintetizable en el organismo (Scheider, 1983).

Los ácidos grasos esenciales intervienen en la síntesis de compuestos análogos a las hormonas (prostaglandinas), que se encuentran en los tejidos animales, particularmente en las glándulas vesiculares de la oveja y en el líquido seminal de la oveja y del hombre, y que son poseedoras de importantes propiedades fisiológicas (como en la regulación de la presión sanguínea, ritmo cardíaco, lipólisis y actividad del sistema nervioso central) (Chapman, 1973 ; Krause y Hunscher, 1975).

De la misma forma, ha sido demostrado que el ácido araquidónico se transforma mediante un sistema de enzimas en prostaglandinas. Algunas investigaciones han concluido que el ácido esteárico, ácido láurico, ácido mirístico y ácido palmítico son agentes hipercolesterolémico (Fennema, 1993).

b. Análisis : En una grasa natural existen, entre los glicéridos, todas las variantes en las que se pueden sustituir los grupos del glicerol con una, dos o tres combinaciones de diversos ácidos grasos, saturados o con distintos grados de insaturación. Por estas razones, se estudian los lípidos atendiendo a algunas de sus propiedades generales que representan el promedio de características derivadas de la composición de la grasa en estudio (Laguna, 1967).

Los últimos avances en las técnicas analíticas de separación han permitido conocer la composición detallada de los lípidos que constituyen los tejidos animales y vegetales. Como cada tejido puede tener diversas clases de lípidos, el análisis no puede realizarse por medios directos. La extracción de los lípidos suele hacerse con un disolvente adecuado (Chapman, 1973).

Los fosfolípidos y lípidos polares pueden estar enlazados a proteínas, por lo que deben de utilizarse en estos casos solventes tales como metanol, etanol o acetona, que puedan romper dichos enlaces. Los sistemas etanol caliente-éter y cloroformo-metanol son muy utilizados para la extracción de los lípidos; el alcohol seca los tejidos, desnaturaliza las proteínas y facilita el proceso de extracción. Una vez terminada la extracción, el disolvente puede eliminarse por evaporación al vacío (Laguna, 1967; Chapman, 1973).

Muchos de los pasos analíticos en el fraccionamiento de una mezcla de lípidos se basan en las diferentes solubilidades de éstos en los solventes orgánicos. La acetona fría precipita los fosfolípidos, los que, a su vez, se distinguen entre sí por su solubilidad en cloroformo, alcohol, etc.

Una división importante de los lípidos es la que distingue entre el material saponificable y el no saponificable. En el material o fracción saponificable se consideran las sustancias que después de la saponificación, con NaOH o KOH, son solubles en agua e insolubles en los solventes de las grasas; entre éstas están los ácidos grasos y el ácido glicerofosfórico, que forma sales solubles de sodio o potasio, el glicerol, la colina, la etanolamina, etc. La fracción no saponificable está formada principalmente por sustancias asociadas a los lípidos, o sea los esteroides, los carotenoides, etc. Los ácidos grasos saponificados, al ser acidificados, se convierten en ácidos grasos insolubles en agua, lo que permite aislarlos para hacer un análisis directo (Laguna, 1967).

Los procedimientos precisos para el análisis cuantitativo de la composición lipídica exigen el mínimo manejo de los extractos lipídicos, para evitar su descomposición y contaminación (Chapman, 1973).

La introducción de diversas técnicas para el análisis de los lípidos, principalmente cromatográficas (en columna, en capa delgada y la más reciente de fase gaseosa) han cambiado el panorama de su estudio. A pesar de estos avances, el análisis de los lípidos es aún muy difícil, pues las formas naturales son mezclas variables de diversos componentes.

En la cromatografía en columna se utilizan como soporte al sílice, al que se fijan los lípidos; su extracción se lleva a cabo con solventes de la polaridad requerida; por ejemplo el cloroformo de escasa polaridad extrae lípidos poco polares (grasas neutras) fijados por el ácido de la columna y por el contrario, el metanol, muy polar, puede extraer los diversos fosfolípidos, de carácter muy polar.

La cromatografía en papel con distintas mezclas de solventes ha sido de gran utilidad para la identificación de los principales componentes de las mezclas lipídicas.

La cromatografía de gases ha revolucionado el estudio de los lípidos y, en general, de cualquier sustancia volátil. El aparato se basa en la introducción, en una columna adecuada, de un material que puede gasificarse y volatilizarse. La columna está empacada con un soporte (tierra de diatomeas, ladrillo refractario, gel de sílice, etc.) cubierta por un líquido no volátil (aceites de silicona, poliésteres de elevado peso molecular, etc.) que actúa como adsorbente del material a analizar. La separación, de hecho, se establece entre la fase líquida y el gas que pasa por la columna y que arrastra

más fácilmente a las sustancias mientras menos se disuelven en dicha fase líquida. Para esto, se calienta la columna, alrededor de 200°C, y se hace pasar por ella un gas inerte (helio, nitrógeno, etc.) que debe arrastrar las sustancias gasificadas. Las sustancias por separarse (que en el caso de los ácidos grasos son habitualmente sus ésteres metílicos) se volatilizan con más o menos facilidad de acuerdo con su coeficiente de partición entre la fase gaseosa y la fase líquida; los componentes con menos afinidad por la fase estacionaria se mueven más aprisa en la columna y salen más pronto por el otro extremo. El gas acarreador pasa, por fin, a un sistema que traduce la presencia de la sustancia volatilizada en un registrador adecuado.

El empleo de la cromatografía de gases, método analítico de gran utilidad para el análisis de los lípidos ha revolucionado otras áreas de la tecnología, como la del estudio de olores y sabores, de mezclas de gases y, en principio, de cualquier sustancia que pueda gasificarse; así, existen métodos para convertir compuestos no volátiles en sus derivados volátiles correspondientes que se analizan en el cromatógrafo. La sensibilidad del método es tan grande que puede registrar hasta 1µg de una sustancia, que se gráfica como un pico bien definido en el cromatograma (Laguna, 1967).

El análisis de los ácidos grasos que existen en las moléculas lipídicas suele hacerse preparando los ésteres metílicos y sometiéndolos a cromatografía gas-líquido. La cantidad de la muestra requerida es pequeña, de 0.5 a 30 µg. Los sólidos se introducen ya sea en solución o fundidos, utilizándose una gran variedad de detectores. La distribución de los ácidos grasos en el cerebro, mitocondria, microsomas, lipoproteínas del suero de hígado, insectos y muchos otros sistemas lipídicos, han sido analizados por este método (Chapman, 1973).

E. CROMATOGRAFIA

La cromatografía puede definirse como la técnica de separación de una mezcla de solutos, basándose esta separación en la diferente velocidad con que se mueve cada uno de los solutos a través de un medio poroso, arrastrados por un disolvente en movimiento. Es una técnica tan importante en la química inorgánica como en la orgánica (Abbott y Andrews, 1973).

La cromatografía de gases (CG) es particularmente apropiada para la separación de gases y líquidos volátiles o sólidos en estado gaseoso, para ello es posible calentar la muestra inyectada y realizar así el análisis de sólidos o líquidos, sin embargo de todos modos esto resulta una limitante

al método. Sólo es posible analizar por CG aquellos compuestos que pueden ser volatilizados en condiciones de operación de los equipos; a pesar de ello, el número de compuestos que pueden ser analizados por CG es enorme.

El principio bajo el cual operan la CG es la afinidad de dos compuestos (sea esta solubilidad, adsorción o absorción). En el caso de la CG uno de los compuestos se encuentra inmovilizado en un lecho fijo (fase estacionaria) y puede ser un sólido o un líquido soportado sobre un sólido inerte, el otro compuesto se desplaza sobre la fase estacionaria arrastrado por una corriente de un gas (fase móvil). El compuesto en la fase móvil interacciona con la fase estacionaria adsorbiéndose, para un instante después desorberse, estableciendo así un equilibrio adsorción-desorción; sin embargo el momento que el compuesto en la fase móvil, pasa adsorbido en la fase estacionaria, hace que su viaje se retrase con respecto al frente del gas portador. Si se establecen varios de estos equilibrios a lo largo del trayecto, el retraso del compuesto en la fase móvil será considerable.

Cuando se tiene una mezcla de dos componentes, que poseen una afinidad diferente por una misma fase estacionaria, cada uno establecerá con ésta, un equilibrio diferente y por lo tanto el retraso de cada uno. Si el largo del lecho es lo suficientemente grande, después de un cierto tiempo (número de equilibrios que se pueden establecer) se habrá logrado la separación total de los dos componentes.

De igual forma, cuando la mezcla está constituida por más de dos componentes, cada uno de ellos establecerá un mecanismo de retención diferente ante una misma fase (selectividad), lo que permitirá su separación. Resulta evidente que mientras más compleja sea la muestra, más difícil será encontrar una fase estacionaria que presente una selectividad distinta para cada uno de los compuestos de la mezcla. Sin embargo existen muchos compuestos, que se emplean como fases líquidas, entre los cuales se puede escoger aquél que permita la mejor separación. Quizás el mayor problema para realizar un buen análisis por CG, es la adecuada selección de la fase estacionaria y existen varias formas de realizar esto, sin embargo una buena opción sería la regla de "lo similar disuelve a lo similar". Esto significa si los componentes a separar son polares se escogerá para separarlos una fase estacionaria polar.

En función de lo anterior, podemos decir que la CG requiere de un equipo que deberá contener un elemento que permita soportar un compuesto inmovilizado y a su vez permita el paso de una corriente de gas por él; éste es la columna cromatográfica y es el elemento principal de la CG (Gómez Ruiz y García, 1989).

Además, presenta una fase móvil que está integrada por la mezcla a resolver y, en la mayoría de los casos, por un gas no retenible o inerte adicional (gas portador); tales como nitrógeno, hidrógeno, dióxido de carbono, argón o helio, que sirve para llevar en sí o para empujar la mezcla y los componentes después de su separación. De una fase estacionaria que puede ser un sólido (Storch de García, 1968).

La cantidad de muestra que se debe introducir depende de la naturaleza de la misma, del tamaño de la columna y del tipo de detector; pero, generalmente, en la cromatografía de gases se utilizan muestras pequeñas. Los volúmenes de muestra varían entre 0.1 y 10 μl para gases y líquidos, y fracciones de miligramos. Una dificultad que existe con las sustancias relativamente no volátiles, es el peligro de condensación de la muestra en el punto de inyección o a la salida de la columna. Esto se soslaya asegurando que la muestra se evapore rápidamente en la entrada. Lo más usual es calentar la entrada y la salida con una resistencia eléctrica. Por lo general es suficiente una temperatura de unos 50 °C por debajo del punto de ebullición del componente menos volátil. Muchas muestras no se analizan directamente, sino que primero se transforman en sustancias volátiles. Por ejemplo, los ácidos grasos se transforman en sus éteres metílicos respectivos (Abbott y Andrews, 1973).

La separación de los componentes de la mezcla a resolver se realiza en el tiempo, en la cromatografía de gases, emergiendo de la columna por separado. A la salida de la columna cromatográfica se encuentra un dispositivo de análisis o uno de recolección, capaces de realizar sus funciones respectivas también en el tiempo (llamado detector).

La cromatografía analítica directa realiza el análisis de los componentes resueltos por la columna haciéndolos pasar por un detector apropiado que, midiendo una propiedad del gas que lo atraviesa, proporciona alguna respuesta o señal indicadora de la concentración del componente que en un momento dado pase arrastrando por el gas portador.

En el aspecto cuantitativo el detector mide la concentración de cada componente en el gas portador, o bien la cantidad del mismo a lo largo del tiempo, proporcionando una señal, determinada en su magnitud por tal concentración o tal cantidad; es decir, indica los momentos de emersión de los componentes y proporciona una indicación cuantitativa de los mismos. La acción del detector se traduce en una señal de tipo eléctrico, que posteriormente se amplificará e interpretará mediante un registrador gráfico o un integrador, que pondrán de manifiesto los aspectos cualitativo y cuantitativo de dicha señal.

Considerando el destino posterior que se dé a los componentes detectados (bien para su análisis posterior, bien con fines preparativos), los detectores se clasifican en destructores o no destructores, según se consuma o no el componente al realizar la detección del mismo. O bien al poner de manifiesto el componente que en un momento dado analizan, éstos se clasifican en instantáneos o diferenciales y acumulativos o integrales (Storch de García, 1968).

Como las condiciones de separación en muchos cromatógrafos son reproducibles, es posible convertir directamente las áreas descritas por los picos de un cromatograma en medidas cuantitativas, comparándolas sencillamente con gráficos estándar del compuesto apropiado (Abbott y Andrews, 1973).

La principal desventaja de los equipos de CG es la identificación cualitativa de los componentes que logra separar, ya que esta no es absoluta y tan sólo tiene como parámetros el tiempo de retención (t_r), las características de operación y la fase estacionaria. En esta situación no es difícil imaginar que pueden existir más de dos compuestos que en una columna dada y a ciertas condiciones de operación, tengan el mismo t_r .

Comúnmente la identificación por CG se hace midiendo los t_r y comparándolos con los t_r de compuestos conocidos (patrones), o bien compuestos "puros". Aún procediendo en la forma antes descrita, la identificación no puede ser absoluta y es por ello que se requiere de técnicas espectroscópicas (UV, IR, RMN y EM) para su realización (Gómez Ruiz y García, 1989).

F. ESPECTROMETRIA DE MASAS

La espectrometría de masas (EM), es una metodología espectrométrica en la cual se generan espectros característicos y únicos para las moléculas de distintos compuestos.

El principio bajo el cual operan los EM es el de promover la ionización de las moléculas de un compuesto y posteriormente separar y cuantificar los distintos iones que se han producido.

Cuando a una molécula la hacemos interactuar con una fuente de alta energía (ca. 70 eV) provocamos la salida de un electrón del orbital molecular, con ello se genera un ion que denominamos ion molecular; si el ion queda con un exceso de energía que no es capaz de estabilizar, se fragmenta expulsando un fragmento neutro y formando un ion fragmento de menor masa, si el ion fragmentado aún posee un exceso de energía que no pueda estabilizar, éste continuará fragmentándose, expulsando

más fragmentos neutros y produciendo iones de masas cada vez menores, cuando en un espectro de masas se puede definir uno de estos procesos, se le denomina "mecanismo de fragmentación".

Cualquiera de los iones formados puede seguir distintos mecanismos de fragmentación y esto, tan sólo depende de la cantidad de energía que recibió la molécula durante la ionización, todos los mecanismos de fragmentación que pueda seguir una molécula constituyen un patrón de fragmentación y este es característico y único para una molécula.

Los procesos en EM son unimoleculares, consecutivos y competitivos, esto quiere decir que cada molécula de un compuesto se comportará en una forma distinta e independiente de las demás.

En la ionización, cada molécula podrá adquirir una energía diferente que la conducirá, a través de diferentes mecanismos de fragmentación, produciendo diferentes iones; sin embargo para un compuesto determinado existirán ciertas estructuras iónicas que son más estables y que por lo tanto generan iones fragmentados preferentes. Esto da lugar a la fragmentación de un mayor número de iones de una masa determinada.

Los EM están diseñados para separar los iones de distinta masa que se producen en la ionización según su relación masa a carga (m/z); sin embargo la mayoría de los iones producidos en este tipo de ionización se forman con una sola carga ($z=1$), por lo que la relación masa a carga es igual a la masa y se tiene una resolución másica. El otro valor que registran los EM, es el del número de iones de un mismo valor m/z que se generan y se define como la intensidad de las señales, el valor de intensidad está en relación directa con la estabilidad del ion formado y esto es un reflejo de la estructura del mismo. Una señal intensa debe corresponder a un ion estable, lo que a su vez implica una estructura estable.

El EM está constituido de una fuente de producción de iones y un separador de iones por su relación m/z , un detector o multiplicador de iones que permita registrar los iones, su intensidad, y un registrador (oscilógrafo u osciloscopio); en equipos modernos es suplido por ordenadores. 1) Un sistema de vacío que impide que los iones sufran cambio (1×10^{-6} a 1×10^{-7} torr de vacío). 2) Una cámara de ionización, donde de una buena ionización depende un buen espectro. La cámara es activada por impacto electrónico en la que fluyen las moléculas de muestra gasificada y dentro de ella, interaccionan con una haz de electrones, producido por el paso de corriente a través de un filamento de renio o tungsteno, la energía de los electrones se establece por la diferencia de potencial en el filamento; el sistema óptico (repeladores, acelerador, etc.) logra expulsar y acelerar a los iones

producidos. 3) Introducción de muestras. 4) Separador másico o analizador (magnéticos y filtros cuadrupolares), el cual separa el haz iónico en todos sus componentes según se relación m/z .

El espectro de masas de un compuesto puro, es una gráfica que contiene una serie de señales en un sistema de dos ejes uno de m/z y otro de intensidad; y el número de señales en teoría sería una por cada unidad de masa que la molécula posea. Sin embargo no todas las señales poseen la misma intensidad y un buen número de ellas es muy pequeña.

Los espectros con los que se realiza la interpretación están normalizados, la cual toma la intensidad del pico más grande se le asigna el valor de 100% (ion padre) y las demás señales se refieren a él, descartando las señales menores a un determinado valor (Gómez Ruiz y García Osuna, 1989).

G. CROMATOGRAFIA DE GASES / ESPECTROMETRIA DE MASAS (GC / EM)

El sistema acoplado CG / EM conjunta dos de las herramientas más poderosas para el análisis de compuestos orgánicos. Bien pudiera pensarse que con el acoplamiento tan sólo se tiene eso, dos instrumentos juntos; sin embargo, lo que se ha conseguido es el desarrollo de una nueva metodología, mucho más poderosa, que permite ahora realizar análisis que antes resultaban imposibles de resolver.

En la actualidad los sistemas CG / EM se encuentran ampliamente difundidos a nivel mundial, de hecho, son varios los sistemas internacionales que la incluyen como una metodología de rutina para la realización de algunos ensayos. Esta nueva metodología, ha encontrado aplicación en los más diversos campos como pueden ser los de proceso industriales de productos químicos, petroquímicos y farmacéuticos, en las ciencias de la salud específicamente en toxicología y farmacología, etc. En México, el uso de estos equipos comienza ya a difundirse y no es difícil imaginar que en algunos años estos sean equipos de uso tan generalizado, como lo es ahora el cromatógrafo de gases.

Un aspecto importante es el que este tipo de instrumentos se encuentran acoplados también a modernos equipos de cómputo y no tan sólo como una respuesta a la modernidad, sino que son en realidad una necesidad instrumental.

La CG es una importante herramienta para separar y cuantificar mezclas complejas, pero deja mucho que desear en cuanto a la identificación de los compuestos que logra separar.

La EM es una importante metodología para la identificación de compuestos, sin embargo con

ella no es posible el análisis de mezclas.

Como se ve ambas técnicas resultan complementarias, una permite la separación de mezclas pero no su identificación, la otra permite la identificación pero no es capaz de operar con mezclas. El problema es que mientras el CG opera con la presión de salida de 1 atm, el EM no puede operar a presiones por arriba de 1×10^{-5} torr. El gas portador usado en el CG/EM es el helio con un flujo máximo de tolerancia de 0.1 a 2 cc/min (Stock y Rice, 1974).

El resultado de este acoplamiento ha dado como resultado una herramienta analítica de compuestos orgánicos, con ella se realizan fácilmente análisis que antes requerían de mucho tiempo, grandes cantidades de muestra y mucha paciencia, y aún más, se pueden realizar análisis que antes eran imposibles. Por otro lado está demostrado que con el acoplamiento de equipos los niveles de sensibilidad se incrementan notablemente. La principal ventaja de los equipos CG / EM radica en el poder identificar y cuantificar los componentes de una mezcla compleja, en un corto tiempo y con cantidades muy pequeñas de muestra.

A pesar de que la técnica es reciente, se han desarrollado muchas modificaciones y opciones que han hecho de ella una herramienta por demás completa; como es el caso de técnicas de captura de datos que han permitido alcanzar niveles de detección sumamente bajos, como es la técnica de monitoreo selectivo de iones. En esta técnica en lugar de obtener espectros completos para su identificación, a través del ordenador se controla el EM para que sólo registre ciertos iones previamente seleccionados, estos iones deben ser característicos de un compuesto o grupo de compuestos con ello, sólo se obtiene el registro de él o los compuestos que generan dicha señal.

Otra posibilidad analítica que se tiene para los CG / EM es la de acoplar una fuente de ionización química (CI). Dado que la energía de ionización (EI), es muy alta, existen un buen número de compuestos que no generan un ión molecular detectable por ser poco estable. Debido a la gran importancia de registrar el ión molecular para poder interpretar un espectro; se diseñó esta fuente, que permite obtener una ionización menos energética, con lo que se evita la fragmentación excesiva y por consiguiente se logra un aumento en la intensidad del ion molecular que nos proporciona información sobre el peso molecular del compuesto de interés (Gómez Ruiz y García, 1989).

IV. OBJETIVOS Y METAS.

A. OBJETIVO GENERAL

Analizar la calidad nutricional de algunas especies de hongos comestibles silvestres del Estado de Querétaro, mediante análisis químicos proximales.

B. OBJETIVOS ESPECIFICOS

* Realizar los análisis químicos proximales de cuatro diferentes hongos comestibles silvestres, colectados de Laguna de Servín, municipio de Amealco, Querétaro.

* Identificar y cuantificar los aminoácidos de origen proteico por el método Picotag (picomoles de muestra) de los cuatro hongos comestibles silvestres colectados.

* Caracterizar y cuantificar los aminoácidos libres de los cuatro hongos comestibles silvestres colectados.

* Determinar y cuantificar de ácidos grasos totales de los cuatro hongos comestibles silvestres colectados.

C. METAS

- Tratar de comprobar, si existen diferencias en la calidad nutricional entre las especies analizadas, basándose en la cuantificación de lípidos, aminoácidos, humedad, fibra dietética, proteína, cenizas y ácidos grasos.

- Sugerir en base a su valor nutricional, su posible utilización en procesos alimenticios, ya sea a través de su consumo directo ó mediante la utilización de métodos biotecnológicos y agroindustriales.

V. MATERIALES Y METODOS.

A. MATERIAL Y EQUIPO

Hongos colectados en Laguna de Servín : *Amanita rubescens*, *Boletus frostii*, *Lactarius indigo* y *Ramaria flava*.

Acetona (Mallinckrodt A.R. Spectrar).

HCl (Producto químico Monterrey S.A. Reactivo analítico).

Acido Sulfúrico (Baker analyzed reactivo).

Ácido heptadecanoico (metil éster) Estándar interno (Grado 1 SIGMA).

Agua destilada. Agua desionizada.

Alfa-amilasa (Tipo VI-B # A-3176 páncreas de cerdo SIGMA chemical).

Anhídrido trifluoracético (SIGMA grado reactivo).

Arena ácida (Mesh estándar, arena de Ottawa).

Borato de sodio (Baker analyzed reactivo).

Cloroformo (Baker analyzed reactivo).

Cloruro de acetilo (SIGMA grado reactivo).

Cloruro de calcio (Baker analyzed reactivo).

Diclorometano (Fisher chemical).

Fosfato de sodio dibásico (Baker analyzed reactivo).

Hexano (Baker analyzed reactivo) y (Mallinckrodt A.R.).

Hidróxido de amonio (Grado analytical. Mallinckrodt A.R.).

Hidróxido de sodio (Producto químico Monterrey S.A. Reactivo analítico).

Isoctano (Certified A.C.S. Fisher chemical scientific).

KJELTABS, 3.5 g de sulfato de potasio y 0.4 g de sulfato de cobre

Lauril sulfato de sodio (SIGMA grado reactivo).

Metanol (Baker analyzed reactivo).

Monofosfato de potasio (Grado analytical. Mallinckrodt A.R.).

Nitrógeno

Norvalina L- (Aldrich 99% SIGMA).

Octanol (Kabo Lab A.B. Antiespumante).

Sulfato de sodio (Baker analyzed reactivo).
Tolueno (Baker analyzed reactivo).
Trifluoruro de boro (SIGMA).
Biblioteca de cromatogramas (sistema computacional, Hewlett Packard 486/33VL).
Cartuchos para extracción (24.5 mm X 26 mm X 60 mm).
Centrifuga (Andreas Hettich Universal 3000rpm).
Crisoles de porcelana.
Cromatógrafo de gases 5890 (Hewlett Packard serie II).
Detector Selectivo de Masas (serie 5972 de impacto electrónico, Deskjet 500, Vectra 486/33VL).
Estufa (Felisa Horno de 30° a 180°C).
Extractor de calor (1010 Heat extractor).
IEC Centra-4B centrifuge.
Incubadora termoline 41900 type.
Liofilizador (155rc-x VIRTIS, The VIRTIS Company Inc., Gardiner NY 12525).
Matraz Bola (Pirex England 14/20 25 ml).
Mufla termoline (Sybron Corporation type 1500 Furnace, mufla de 0° a 1200°C).
Pesa crisol (Tecator de porosidad media).
pHmetro Chemcadet. (Model 5986-60 pH/mV meter).
Rotavapor (Caframo VV 2000, OB 2000).
Sonicador (Benson 1200).
Sistema Fibertec (1021 cold extractor, 1010 heat extractor TECATOR).
Sistema Kjeltex (1007 digester, 1026 distilling unit. Tecator).
Sistema Soxtec (1046 service unit, 1043 extraction unit).
Sistema Soxtec HT (1044 service unit, 1043 extraction unit).
Sistema de control de temperatura (Bath and circulator model 2067 CH/P).
Tamizador (No. 35 con apertura de 500 um).
Trampa para rotavapor (Duran Schott Germany 250 ml).
Tubos de digestión.
Vortex (Génie 2).
Viales de reacción (Pierce Alltech 2 ml).

B. METODOS.

1. PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Una porción de cada muestra fue cortada en trocitos y puesta en charolas de aluminio y en un recipiente para ser llevadas al ultracongelador donde se mantuvieron a una temperatura de -80°C por un día, después se colocaron en un Liofilizador VIRTIS 5L por 5 h durante dos días. Cada muestra ya liofilizada fue molida en un mortero de porcelana y puesta la muestra en frascos ámbar para su posterior almacenamiento en desecador al vacío y -20°C .

Otras porciones de cada muestra, fueron puestas en matraces kitazato de 125 ml y de 250 ml y fueron liofilizadas a -55°C y 60 militorr durante 48 h; molidas en morteros tratados con HCl 6 N y tamizados, para posteriormente ser usadas para el análisis de aminoácidos y ácidos grasos.

Los matraces kitazato conteniendo una muestra, fueron usados para el análisis de aminoácidos tratándose previamente con HCl 6 N sumergiéndolos entre 2 y 3 h; después fueron lavados con agua destilada, metanol grado HPLC y secados en estufa.

2. DETERMINACION DE HUMEDAD Y CENIZAS

El análisis de humedad y cenizas se realizó de la siguiente manera :

Una vez tarados los crisoles se les adicionó aproximadamente 1 g de muestra liofilizada por triplicado y fueron desecados en una estufa a una temperatura entre 98° y 100°C durante 5 h hasta peso constante. Una vez desecadas las muestras y anotado el peso; se colocaron los crisoles en una mufla a 600°C por 2 h. Se dejó enfriar la mufla hasta una temperatura de 300°C , se retiraron los crisoles, se enfriaron en desecador y se pesaron (AOAC, 1984).

Los resultados fueron multiplicados por 10 en vez de 100, para pasar de un resultado en peso seco a peso fresco (Breene, 1990).

El calculo del porciento de humedad y de ceniza se realizó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{W_2 - W_1}{W_m} * 100$$

$$\% \text{ de Ceniza} = \frac{W_3 - W_1}{W_m} * 100$$

donde :

W_1 .- Peso del crisol tarado.

W_2 .- Peso del crisol y muestra ya desecada.

W_3 .- Peso del crisol y cenizas.

W_m .- Peso de la muestra liofilizada.

3. DETERMINACION DE FIBRA DIETETICA

Se siguió el método del AOAC (1990), con las siguientes modificaciones :

Una vez tarados los crisoles Gooch (tecolor de porosidad media) se anota el número y se pesan aproximadamente 2 g de arena ácida (malla de 20 a 30 estándar, arena de Ottawa). Se anota el peso y se le adiciona aproximadamente 1 g de muestra, además se realiza un control (arena + all-
bran) y un blanco (arena).

Si las muestras contienen un porcentaje mayor del 5 % de grasa, los crisoles con muestra son colocados en un extractor frío (1021 Cold extractor) para ser lavados 3 veces con 15 ml de acetona. Se secan las muestras desengrasadas en estufa a 103°C por 30 min y se enfrían a temperatura ambiente. En la parte del fondo de los crisoles se les colocan tapones de plástico #7, después se les adiciona 20 ml de solución enzimática y 6 ml de tolueno. Los crisoles se incuban a 37°C de 12 a 18 h.

La solución enzimática se preparó con 1.36 g de fosfato de potasio, 100 ml de agua destilada, se agitó y se ajustó el pH a 7 con NaOH al 40 %, agregándose 1.7093 g de alfa-amilasa. La solución se centrifugó a 12000 rpm 15 min y se filtra con papel whatman #42 a temperatura de refrigeración.

Se retiraron los tapones de los crisoles después de la incubación y se colocaron el extractor de calor para enjuagar de 3 a 4 veces con 15 ml de agua destilada y 3 ó 4 veces con 15 ml de metanol al vacío y con presión en caso de que se tape el crisol. Después se les agregó 100 ml de solución detergente. Cuando empezó la ebullición se les adicionó 4 gotas de octanol (antiespumante) y se dejaron en ebullición 1 h; cada 15 min se les agregó de agua destilada para bajar los residuos de muestra evitando que éstos se peguen en las paredes del sistema fibertec. Posteriormente se extrajo

la solución detergente con vacío y presión. Se enjuagaron 3 veces con agua destilada y con 15 ml de metanol aplicando vacío y presión. Se retiraron los crisoles del sistema con cuidado de no quebrarlos y se colocaron en charolas para ser secados 130°C por 30 min. Se enfriaron en desecador y se pesaron.

La solución detergente se preparó en 500 ml de agua destilada con 30 g de lauril sulfato de sodio, 18.61 g de EDTA deshidratado, 6.81 g de borato de sodio decahidratado, 4.56 g de fosfato de sodio dibásico; agitar hasta completa disolución, ajustar a pH 7 con NaOH al 40 % y diluir a 1 lt.

$$\% F D m = \frac{W_f - (W_c + W_a)}{W_m} * 100$$

$$\% F D b c o = \frac{\% F D a * W_m}{W_a}$$

$$\% \text{ de Fibra Dietética} = \% F D m - \% F D b c o$$

donde :

W_f .- Peso final del crisol + arena + muestra.

W_c .- Peso del crisol solo.

W_a .- Peso del crisol + arena.

W_m .- Peso de la muestra.

% F D m.- Porcentaje de fibra dietética en cada muestra.

% F D b c o.- Porcentaje de fibra dietética en blanco.

% F D a.- Porcentaje de fibra dietética de la arena.

4. DETERMINACION DE GRASA TOTAL

Se siguió el método Soxtec (AOAC, 1984), que consiste en :

La determinación de grasa se realizó en un equipo SOXTEC, el cual constó de una unidad de servicio (1046 service unit), una unidad de extracción (1043 extraction unit) y un recirculador de

agua como medio de enfriamiento. Y cuyas condiciones fueron a temperatura de ebullición de 60°C.

Se pesaron 2 g de muestra en cartuchos para extracción (24.5 mm de diámetro interno X 26 mm de diámetro externo X 60 mm de longitud). En la unidad de extracción se colocaron los cartuchos y los vasos de acero inoxidable previamente tarados con 50 ml de hexano.

Para las extracción se colocaron los cartuchos con la muestra en ebullición 30 min con el solvente y 30 min en reflujo; una vez terminado el reflujo se dejaron 10 min más con la llave de la unidad cerrada para recuperar el hexano. Posteriormente se retiraron los vasos y se dejaron 30 min en la estufa a 103°C para evaporar completamente el solvente. Se sacaron y se enfriaron en desecador. Una vez fríos se volvieron a pesar.

$$\% \text{ de Grasa} = \frac{W_f - W_o}{W_m} * 100$$

donde :

W_f : Peso del vaso con la muestra.

W_o : Peso del vaso tarado.

W_m : Peso de la muestra.

5. DETERMINACION DE PROTEINA

Se siguió el método Microkjeldhal (AACC, 1983), que consiste en :

Se pesaron de 0.2 a 1 g de muestra liofilizada y molida, por triplicado. La muestra se colocaron en tubos digestión; a cada tubo se le adicionó 10 ml de ácido sulfúrico concentrado y una tableta (KJELTABS, 3.5 g de sulfato de potasio y 0.4 g de sulfato de cobre). Una carga completa de 6 tubos fueron colocados en el sistema de digestión (Digestión system 6, 1007 digester. Tecator) a una temperatura ente 420° y 425°C (de 7 a 8 watts) por 3 h y dentro de una campana de extracción. Se dejaron enfriar y se colocaron en el sistema de destilación (KJELTEC system, 1026 distilling unit. Tecator). El destilado recolectado en matraz de 250 ml con 25 ml de ácido bórico al 4 % e indicador verde de bromocresol-rojo de metilo; fue titulado con HCl de 0.02 - 0.05 N, pasando de una coloración verde a rojo. Junto con las muestras se prepara un blanco de muestra con ácido sulfúrico

concentrado y una tableta; cuyo destilado también fue recolectado en ácido bórico 4 % e indicador, para su titulación posterior.

El sistema KJELTEC constó de un sistema de inyección de NaOH de 35 a 40 %, de agua destilada, de vapor de agua, de una plataforma para el matraz recolector, tubería de desagüe y un destilador con refrigerante; integrados y automatizados (Manual Kjeltec, 1987).

El análisis cuantitativo se realizó de la siguiente manera :

$$\% \text{ de Nitrógeno} = \frac{(V_m - V_{bco}) (14.01) (N \text{ de HCl valorado})}{g \text{ de muestra} * 10}$$

$$\% \text{ de Proteína} = \% \text{ de Nitrógeno} * 4.38$$

donde :

V_m .- ml gastados de HCl en la titulación de la muestra.

V_{bco} .- ml gastados de HCl en la titulación del blanco.

14.01 = Peso equivalente del nitrógeno.

Factor proteínico específico para los hongos = 4.38.

6. CUANTIFICACION DE AMINOACIDOS POR EL METODO Picotag

Se siguió el método Picotag (Waters Chromatograph Div.), que consiste en :

Se pesaron 1-1.5 mg de muestra liofilizada, macerada y tamizada; en tubos pequeños (marcados con lápiz de vidrio). Los tubos fueron puestos en reactiviales (nota a) por duplicado, se les adicionó 20 μ l de HCl 6 N con 1 % de fenol (licuado) a cada tubo y 200 μ l fuera de los tubos. Antes de la digestión, a los viales abiertos se sometieron a un vacío suave y en seguida se realizó la adición de N_2 para eliminar el agua y oxígeno que interfieren durante la hidrólisis; esto se hace de 3 a 4 veces y se termina con vacío cerrando el vial. Posteriormente los viales se dejaron a digestión a 110°C por 24 h. Una vez terminada la digestión se sacaron los reactiviales de la estación (Picotag) y se enfriaron a temperatura ambiente 30 seg en campana de extracción. Se pasaron a un desecador de vidrio sellado al vacío con trampa en hielo seco hasta secar los vapores ácidos completamente. Después de 20 min en el desecador, los tubos limpios fueron puestos en el savat (sistema de

centrifugación-vacío) que consta de doble trampa de vacío con hielo seco; por 30 min. Luego los tubos se colocaron en los reactivales originales y se volvieron a poner en la estación para un vacío de hasta 65 militorr (nota a). Una vez conseguido el vacío se les adicionó a cada tubo 20 µl de reactivo de resecado (nota b) para subir el pH de la microsolución y se agitaron perfectamente en un vortex. Se llevaron al savat, después a la estación para un vacío de 65 militorr. Una vez llegado al vacío deseado, los reactivales fueron almacenados a -4°C a refrigeración.

Posteriormente se atemperaron los reactivales y se les adicionó 40 µl de reactivo de derivatización (nota b) en cada tubo, se agitaron en vortex y se dejaron en el savat a secar durante 30 min con vacío. Los tubos se colocaron en los reactivales para colocarlos en la estación y realizar un vacío de hasta 65 militorr.

Para eliminar el exceso de reactivo de derivatización se adicionó 30 µl de metanol grado HPLC, se agitan en vortex y se colocaron los tubos en el savat; este tratamiento se hace 3 veces para asegurar la eliminación del reactivo. Después del lavado los tubos se colocaron en los reactivales y se llevaron a la estación (Picotag) para aplicarles un vacío de 65 militorr. Después del vacío los tubos se sacaron de los reactivales y se marcaron. Se les adicionó 20 µl de buffer muestra (nota b) para resuspender la muestra (la muestra puede ser almacenada a -40°C antes de ser resuspendida), se agitaron los tubos en vortex, se dejaron en reposo 20 min, se volvieron a agitar y se centrifugaron en el savat. El sobrenadante se colocó en viales especiales que constan de espirales que amortiguan al inyector automático. Los viales especiales fueron colocados en el inyector el cual adiciona 4 µl de la solución para ser analizada en el HPLC Picotag (Manual Picotag. Valverde y Paredes-López, 1993).

NOTAS.- a : Los reactivales constaron de una carga completa {100 µl std hidrolizado y no hidrolizado PIERCE, 250 pmol prolina pura, 250 pmol de amoníaco conc., un blanco y 1 mg por cada muestra}; cada carga se realizó por duplicado, donde todos los reactivos se encuentran en tubos pequeños por separado.

Se aseguró que la muestra quede en el fondo de los tubos. Para la hidrólisis se usó una ampollita Pierce constant boiling HCl 6 M.

Para realizar el vacío en la estación Picotag, los reactivales abiertos (tapón en verde) se colocaron en la estación donde se les burbujea nitrógeno y vacío por 4 veces terminando con vacío y se cierra el reactival (tapón en rojo).

b : REACTIVO DE RESECADO .- Dos partes de agua desionizada, 2 partes de etanol grado HPLC y una parte de trietil amina (TEA); se mezcla con agitación en vortex y se adiciona 20 µl a cada vial con el fin de subir el pH.

REACTIVO DE DERIVATIZACION .- Consta de una parte de fenilisotiocianato (PITC), 6 partes de etanol absoluto grado HPLC, una parte de TEA y 2 partes de agua desionizada gota a gota ; se mezcla con agitación en vortex y se adiciona 40 µl a cada muestra; 20 µl a prolina, estándares, amoníacos y proteínas puras.

BUFFER DE MUESTRA .- Consta de 8 partes de buffer (142 mg de fosfato de sodio en 200 ml de agua; se ajusta el pH a 7.3 con ácido fosfórico al 10 % y 10 ml de acetonitrilo) y 2 partes de metanol grado HPLC.

Para el cromatógrafo HPLC Picotag se usaron dos eluyentes A (19 g de acetato de sodio trihidratado, 0.5 ml de TEA, ajustar el pH a 6.4 con ácido acético glacial y aforar a 1 lt de agua. Filtrar la solución, a 940 ml de esta solución mezclarla con 60 ml de acetonitrilo) y B (600 ml de acetonitrilo y 400 ml de Milli-Q quality agua). Sonicarla en vacío por 20 seg.

7. DETERMINACION DEL PERFIL DE AMINOACIDOS LIBRES

Se siguió el método empleado por Lizárraga (1995), que consiste en :

a. Extracción .

Se pesaron muestras de 0.25 g de hongos liofilizados, se adicionaron 0.07 mg de norvalina como estándar interno para la determinación de aminoácidos. La norvalina se adicionó de una solución stock en HCl 0.01 N (Walton y col., 1991). Las muestras liofilizadas se almacenaron en desecador al vacío a -20°C.

La extracción se realizó con 4 ml de la mezcla metanol:cloroformo:agua (12:5:3 v/v) (nota 1), a temperatura ambiente y con agitación constante durante 12 h (Lazarus, 1973). En seguida se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min.; el primer sobrenadante se separó del remanente sólido y

fué puesto en un tubo. Este último fue reextraído con 4 ml de agua desionizada por 4 h, centrifugado bajo las condiciones anteriores y filtrado bajo vacío en un embudo Buchner y papel filtro del No. 1, para separar el sobrenadante. Los dos sobrenadantes se juntaron (nota 2), fueron puestos en un embudo de separación de 125 ml, con 10 ml de cloroformo para eliminar lípidos y pigmentos apolares (Mandeville y col., 1992). La fase acuosa se recolectó para ser ajustada a un pH entre 2.5 y 3 con una solución de HCl 3 M, para mantener positivas las cargas de los aminoácidos. Posteriormente se purificaron en resinas de intercambio iónico para separar los aminoácidos y carbohidratos, además de limpiar las muestras de otros contaminantes que interfieren en la derivación (Bieliski y Turner, 1966; Redgwell, 1980).

b. Purificación con resinas de intercambio iónico .

La purificación de la muestra se realizó en una resina de intercambio catiónico Bio-Rad grado analítico (AG 50W-X4, 200-400 mesh) contenida en una columna de 15 cm x 2 cm de diámetro interno, preparada de la siguiente manera: Dos gramos de resina húmeda se mezclaron con agua desionizada, la resina se colocó cuidadosamente en la columna para evitar la formación de burbujas de aire o deformaciones, sucesivamente se lavó con 10 ml de HCl 1N, 40 ml de 0.2 M NaOH y 10 ml de HCl 1N, hasta que el flujo saliera transparente (Lazarus, 1973; Walton y col., 1991). Posteriormente a la resina se le adicionó la muestra previamente acidificada, separando los carbohidratos con 50 ml de HCl 0.01 N y 10 ml de agua desionizada, y eluyendo los aminoácidos con 60 ml de NH₄OH al 80% (nota 3).

Las fracciones obtenidas fueron evaporadas hasta sequedad en rotaevaporador a una temperatura entre 45° y 55°C, y presión reducida (nota 3), se redisolvieron en 3 ml de HCl 0.01 N y puestos en viales; se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

c. Derivación de la muestra .

Las muestras almacenadas se atemperaron, y siendo necesario agitar con ultrasonido (Sonicador Benson 1200) hasta homogenizar las muestras; se adicionó una alícuota de 200 µl a viales de reacción ó reactivales, por separado. Se agregan 200 µl de diclorometano y se evapora la mezcla azeotrópica con el agua en corriente de nitrógeno a 50°C. Esta operación se repite 3 veces para eliminar bien el agua.

Las muestras son esterificadas con 500 μ l de agente esterificante (600 μ l cloruro de acetilo en 2 ml metanol seco (nota 4)), se reflujo nitrógeno y se sella el reactivial; después se agitan en vortex y se colocan en un block de calentamiento (PIERCE Reacti-Therm, heating module) a 75°C por 1 h. Después de enfriar los reactiviales, es evaporado el exceso de agente esterificante con nitrógeno a temperatura ambiente.

La acilación se lleva a cabo adicionando 250 μ l de TFAA (anhídrido trifluoroacético) y 200 μ l de diclorometano seco (nota 4), calentándolos en block de calentamiento a 75°C por 1 h. Se enfrían y se llevan a sequedad bajo corriente de nitrógeno; finalmente se redissuelven en 100 μ l de diclorometano seco y destilado. Se inyecta un μ l en el GC-EM para la caracterización y cuantificación de los aminoácidos presentes en las muestras.

NOTAS : 1.- La muestra extraída del hongo *Boletus frostii* (Bf), presentó un extracto de consistencia muy viscosa y gomosa de difícil filtración.

2.- Al juntar los dos sobrenadantes para separar la fase acuosa de la orgánica se fue tornando mucilaginosa semejante a una clara de huevo color amarillo claro, disolviéndose con el ajuste de pH.

3.- Durante la purificación en resinas, la muestra Bf la coloreó de café al separar los aminoácidos. De las soluciones obtenidas, Rf (*Ramaria flava*) fue de color anaranjado, mientras que Ar (*Amanita rubescens*) y Bf fueron de color amarillo-limón.

Para la evaporación de las muestras se utilizaron una trampa de 250 ml para prevenir el sifoneo de la muestra y un matraz bola de 25 ml, durando la operación 4 h por muestra. Primero la muestra hirvió con los vapores del baño maría, para evitar un calentamiento violento; después que se estabilizó la muestra, ésta fue introducida en el baño para su posterior sequedad.

4.- El metanol debe de estar previamente seco, esto se logra a través de un reflejo y destilado sobre cloruro de calcio anhidro. Para la preparación del agente esterificante, primero se pone el metanol sobre un tubo en hielo y en una campana de extracción antes de adicionar gota a gota y por las paredes. El cloruro de acetilo, debido a que es muy sensible a la humedad produce explosiones al entrar en contacto con pequeñísimas cantidades de agua que pudiera tener el metanol.

El diclorometano utilizado es previamente refluado y destilado sobre cloruro de calcio anhidro.

8. DETERMINACION DEL PERFIL DE ACIDOS GRASOS

Se siguió el método empleado por García (1995), que consiste en :

Se pesaron 150 mg de muestra liofilizada y molida en una licuadora, los cuales se sometieron a extracción de lípidos en SOXTEC (Soxtec system HT, 1043 extractor unit y 1044 service unit) con una mezcla de solventes cloroformo:metanol (2:1 v/v) (Folch, 1957). El estándar interno (C17) se adicionó junto con la muestra en una cantidad de 250 μ l.

La extracción se llevó a cabo a 60°C, con una ebullición de 30 min con dedal abajo y un reflujo de 30 min con dedal arriba. La temperatura máxima del recirculador [Bath and circulator model 2067 CH/P temperature control system] (T de refrigeración) fue de 3°C.

El extracto obtenido fue aforado a 5 ml (nota 1), después se toma una alícuota de 150 μ l del extracto crudo para derivar (hidrólisis:metilesterificación) y ser puestos en viales de reacción. A dichos viales se les adicionó 100 μ l de diclorometano seco (nota 1) y 1 ml de NaOH-metanol al 0.5 N; fueron sometidos a calentamiento a 90°C por 10 min en un block de calentamiento (PIERCE Reacti-Therm, heating module). Una vez fríos, se les adicionó 1 ml de BF₃ (reactivo sensible a la humedad y de rápida evaporación) y se volvieron a calentar a 90°C durante 10 min. Los reactivales se enfriaron y se vertió todo el contenido (nota 1) a tubos de ensaye.

Al extracto derivatizado se le adicionó 1 ml de agua destilada y 1 ml de hexano para la extracción de los metilésteres. Los tubos se agitaron en vortex por 5 seg (#4) y se dejaron en reposo. Después con una pipeta pasteur se extrajo la fase orgánica y se colocó en otro tubo. El extracto del primer tubo fue lavado tres veces con 1 ml de hexano, cada uno; en cada lavado se agitó, se dejó en reposo y se extrajo la fase orgánica. Se juntaron todos los extractos en el segundo tubo y después se les adicionó 1 ml de agua destilada. Se agitaron los tubos, se dejaron en reposo y se eliminó la parte más pequeña que es el agua e impurezas con una pipeta pasteur. Los tubos se desecaron con reflujo de nitrógeno hasta 1 ml de fase orgánica. Posteriormente esta fase fue purificada en una columna de 15 cm X 2 cm de diámetro interno con sulfato de sodio anhidro. Por último la columna fue lavada

con 1 ml de hexano y el extracto purificado se recolectó en viales.

Los metilésteres purificados fueron evaporados hasta sequedad con reflujo de nitrógeno. Los viales se sellaron herméticamente y se cubrieron con papel aluminio; posteriormente fueron almacenados en refrigeración.

Para su análisis los metilésteres fueron resuspendidos con 100 µl de isooctano e inyectado 2 µl en el GC-EM y se analizaron los perfiles.

NOTAS : 1.- El extracto crudo obtenido de cada especie de hongo presenta las siguientes características :

- *Lactarius indigo* .- El extracto fue de color verde bandera.
- *Boletus Frostii* .- El extracto fue de color rojo rosado.
- *Amanita rubescens* y *Ramaria flava* presentaron un extracto de color amarillo muy claro.

Todos los extractos se colocaron en refrigeración antes de su derivación; debido al choque térmico al que fueron sometidos, los extractos presentaron formación de cristales en forma de agujas o como fue el caso del *Boletus frostii* que presentó cristales pequeños (de consistencia arenosa), y además se formó un polvo blanco en las paredes de los vasos de extracción.

Después de la derivación, en los reactivales se formó un precipitado blanco, debido a la formación de sales de los ácidos durante la hidrólisis básica que no se llegaron a esterificar. Son solubles en agua e insolubles en solventes no polares.

9. CUANTIFICACION DE LOS PERFILES POR CROMATOGRAFIA DE GASES Y ESPECTROMETRIA DE MASAS (GC / EM)

La cromatografía de gases y la cromatografía de gases-espectrometría de masas se usó para separar, identificar y cuantificar los derivados de carbohidratos, aminoácidos y ácidos grasos presentes en las cuatro muestras de hongos liofilizados.

Primero se identificaron los compuestos separados por cromatografía de gases, mediante los tiempos de retención de los estándares utilizados para cada análisis. Después, se realizó la

confirmación de la identificación por GC / EM, mediante el uso de una biblioteca de cromatogramas (sistema computacional Vectra Hewlett Packard 486/33VL), de los cuales ya ha sido identificado su espectro de masas.

a. Aminoácidos .

Para el análisis de aminoácidos se utilizaron las siguientes condiciones :

En el cromatógrafo de gases 5890 (Hewlett Packard serie II) con una columna HP-1 (25 m X 0.2 mm X 0.33 μ m), cuya fase estacionaria es metil silicona; se usó una temperatura inicial del horno de 150°C por 3 min, un incremento de temperatura de 6°C/min hasta una temperatura final de 240°C por 30 min de tiempo final, un flujo en la columna de 0.44 ml/min de nitrógeno grado cromatográfico, una relación de split de 1:100, una temperatura de inyector de 300°C, una temperatura del detector de 250°C y una presión de 3 psi. Para el GC / EM (detector selectivo de masas serie 5972 de impacto electrónico, Deskjet 500, Vectra 486/33VL) se usaron las mismas condiciones, pero con una columna HP-5 MS de 30 m X 0.2 mm X 0.25 μ m de 5 % metil fenil silicona y helio grado ultra alta pureza como gas acarreador.

Se usó una sensibilidad de 10 en el sistema computacional de los cromatógrafos (Lizárraga, 1995).

b. Ácidos grasos .

Para el análisis de ácidos grasos se utilizaron las siguientes condiciones :

En el cromatógrafo de gases 5890 (Hewlett Packard serie II) con una columna HP-5MS, Crosslinked (30 m X 0.32 mm X 0.025 μ m); se usó una temperatura inicial del horno de 130°C/3 min con un incremento de 3°C/min hasta llegar a una temperatura final de 270°C por 5 min de tiempo final, un flujo en la columna de 56 ml/min de nitrógeno grado cromatográfico, una temperatura de inyector de 200°C, una temperatura de detector de 250°C y una presión de 10 psi. Para el GC / EM (detector selectivo de masas serie 5972 de impacto electrónico, Deskjet 500, Vectra 486/33VL) se usaron las mismas condiciones, pero con una columna HP-5 MS de 30 m X 0.2 mm X 0.25 m de 5 % metil fenil silicona y helio grado ultra alta pureza como gas acarreador.

Se usó un sensibilidad de 12 en el sistema computacional de los cromatógrafos (García, 1995).

Bajo estas condiciones se corrieron la mezcla de estándares de aminoácidos y ácidos grasos de cada muestra (García, 1995).

10. CUANTIFICACION

Para la cuantificación de cada aminoácido en la muestra se usó el método del estándar interno (Lizárraga, 1995). Mediante las áreas bajo la curva de los compuestos encontrados en las muestras, así como el área y la cantidad de estándar interno adicionado. Y aplicando la siguiente relación:

$$C_x = \frac{(A_x) (C_i)}{(F_{xri}) (A_i)} * 100$$

donde :

C_x .- Concentración del compuesto x en la muestra.

A_x .- Área del compuesto x en el cromatograma de la muestra.

F_{xri} .- Factor de respuesta del compuesto x relativo al estándar interno.

C_i .- Concentración del estándar interno en la muestra.

A_i .- Área del estándar interno en la muestra.

El análisis se realizó por triplicado de cada muestra, por lo que se sacó un promedio de C_x para cada aminoácido en cada muestra (Lizárraga, 1995).

Para el análisis cuantitativo de cada ácido graso se usó el mismo mecanismo y método de estándar interno, pero eliminando el uso del factor de respuesta (F_{xri}).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

A. DESCRIPCION DE LAS ESPECIES DE HONGOS ANALIZADOS



Ramaria flava (Rf).- Hongo en forma de coral, cuyas ramificaciones son delgadas de color amarillo paja y puntas ligeramente café. Este hongo se encuentra en el mantillo de los bosques de pino y encino. Es una especie micorrícica comestible.



Boletus frostii (Bf).- Hongo con sombrero o píleo de 8 a 12 cm de diámetro, superficie lisa, viscosa (pegajosa), de color rojo intenso. Poros deprimidos y medianos, de color naranja rojizo y la carne es de color blanquecina amarillenta; ambos se manchan de verde-azul al tocarlos o cortarlos. El pie es cilíndrico, con la superficie prominentemente reticulada, de color rojo fuerte, también se mancha de azul al tocarse. Este hongo se encuentra en el mantillo del bosque de encino. Es una especie micorrícica comestible.



Amanita rubescens (Ar).- Hongo con sombrero o píleo de 5 a 15 cm de diámetro, con la superficie cubierta con escamas planas de color blanco rosada, de color café-rojizo y con manchas rosáceas. Láminas libres blancas. Pie subbulboso, liso blancuzco, manchado de rosa a rojo. Con anillo blanco y manchas rosas. Se encuentra en el mantillo del bosque de encino y pino. Especie micorrícica y comestible.



Lactarius indigo (Lí).- Hongo con sombrero o píleo de color azul añil, en cuya superficie se encuentran líneas concéntricas, ligeramente pálidas. Pie liso y laminas de color azul añil o azul verdoso pálido. Presenta una secreción lechosa de color azul. Se encuentra en el mantillo del bosque de pino; es micorrícico y comestible.

Las descripciones realizadas de los hongos colectados concuerdan con las descripciones reportadas por Pedraza y col. (1994) ; Guzmán (1978) e Ibar (1980).

La clasificación taxonómica de los hongos analizados se presenta en el Tabla 4

Tabla 4 Clasificación Taxonómica de los hongos comestibles silvestres analizados.

Clase	Familia	Género y especie	Nombre común	Símbolos usados
B A S I D I O M Y C E T E S	<i>Russulaceae</i>	<i>Lactarius indigo</i>	Hongo azul o añil	Li
	<i>Boletaceae</i>	<i>Boletus frostii</i>	Hongo viejo	Bf
	<i>Clavariaceae</i>	<i>Ramaria flava</i>	Escobetas o patas de pájaro	Rf
	<i>Amanitaceae</i>	<i>Amanita rubescens</i>	Mantecado o Juan Diego	Ar

B. ANALISIS QUIMICOS PROXIMALES

Para los análisis químicos proximales se utilizaron métodos convencionales del A.O.A.C (1984, 1990) y A.A.C.C (1983) en la mayoría de los casos, donde los análisis para cada uno de los compuestos nutricionales se realizaron por triplicado, empleándose el valor promedio.

A lo largo de los resultados descritos, generalmente se hace una comparación con valores propuestos por otros autores para *U. maydis*, *A. bisporus*, y en algunas ocasiones con *L. edodes* y *P. ostreatus*.

En la Tabla 5 y figura 1, se encuentran resultados de los análisis proximales de los valores porcentuales reportados. Los cuales son la base de la discusión y presentados a continuación, para cada uno de los análisis realizados :

Humedad y cenizas.- Los resultados de humedad, no presentaron diferencias estadísticas significativas mediante las pruebas de Duncan y LSD (Diferencia Mínima Significativa) con un 95 % de confiabilidad, en relación a los hongos silvestres utilizados para el análisis en fresco; asimismo encontrándose dentro del rango de 92.9 a 95.15 %. De acuerdo a lo reportado en la literatura por Chang y Hayes (1978), los resultados obtenidos se encontraron dentro de los rangos normales de humedad en base fresca.

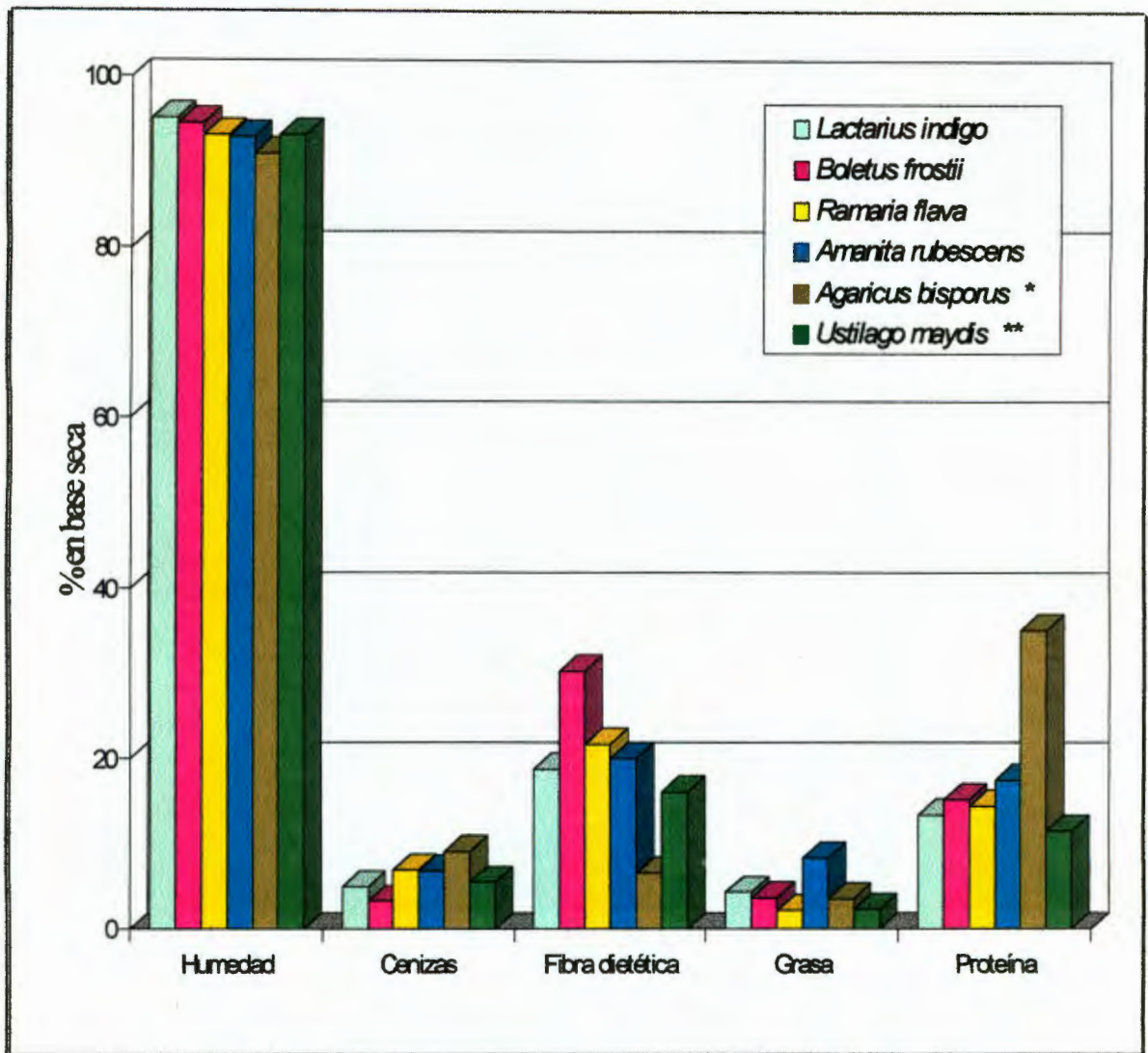
Tabla 5 Valores químicos porcentuales de los análisis proximales en los hongos comestibles silvestres analizados, comparados con los valores reportados para *A. bisporus* y *U. maydis*.

Análisis proximal	Especies de hongos					
	<i>Lactarius indigo</i> (Li)	<i>Boletus frostii</i> (Bf)	<i>Ramaria flava</i> (Rf)	<i>Amanita rubescens</i> (Ar)	<i>Agaricus bisporus</i> ^a (Ab)	<i>Ustilago maydis</i> ^b (Um)
% Humedad (en fresco)	95.15	94.53	93.13	92.90	91	93.2
% Cenizas	4.92	3.23	6.90	6.78	9.1	5.5
% Fibra dietética	18.73	30.24	21.60	19.96	6.6 ^c	16 ^c
% Grasa total	4.25	3.68	2.07	8.31	3.54	2.3
% Proteína (N x 4.38)	13.45	15.81	14.47	17.39	35	11.5

^a Beuchat y col. (1993)

^b Valverde y Paredes-López (1993)

^c Fibra cruda



* Beuchat y col. (1992).

** Valverde y Paredes-López (1992).

Figura 1 Análisis proximal realizado en hongos comestibles silvestres de Laguna de Servín, municipio de Amealco, Qro. (Se incluyen los valores ya reportados para *A. bisporus* y *U. Maydis*).

El porcentaje de ceniza entre los hongos analizados fue mayor en Rf y Ar (6.9 y 6.8 %, respectivamente) en comparación con el reportado para Um (5.5 %) por Valverde y Paredes-López (1993), pero menor comparado con el reportado para Ab (9.1 %) por Beuchat y col. (1993). Sin embargo, los hongos analizados denotaron diferencias significativas (95 % de confiabilidad por Duncan y LSD) entre ellos, excepto entre los contenidos de ceniza de Rf y Ar.

De los cuatro hongos silvestres analizados, la mayoría de los valores porcentuales de cenizas obtenidos, se encontraron dentro del rango de 5 - 11 % reportado en la literatura por Chang y Hayes (1978), exceptuando el Bf con un 3.2 %, cuyo valor de ceniza es el más bajo, incluso en comparación con el reportado para *L. edodes* de 3.7 % (Chang y Hayes, 1978).

Fibra .- Los resultados de fibra obtenidos se realizaron en base a la fibra dietética, debido a que las pérdidas que se producen en la determinación de fibra cruda, pueden llegar a proporcionar resultados poco confiables (Desrosier, 1986). Bf con un 30.24 % y Rf con 21.6 % presentaron las mayores proporciones de fibra dietética en comparación con los otros dos hongos silvestres analizados. Breene (1990) reportó que la fibra dietética total (FDT) en *L. edodes* (shiitake) es de 37.5 % y en *P. ostreatus* de 47.5 %. En comparación con estos hongos el porcentaje de fibra dietética en Bf fue menor.

El análisis comparativo también se realizó en base a los reportes de fibra cruda de Ab (6.6 %) y Um (16 %) realizados por Beuchat y col. (1993); Valverde y Paredes-López (1993), cuyos porcentajes reportados son muy inferiores de los hongos estudiados. En cuanto al análisis estadístico los resultados de fibra entre los hongos analizados denotaron diferencias significativas con un 95 % de confiabilidad (Duncan y LSD).

Grasa o lípidos totales .- Dentro del contenido de lípidos en los hongos analizados, el Rf presentó un rendimiento bajo de sólo 2.09 %; mientras que el valor de Ar fue de 8.3 %, el de Bf de 3.68% y el de Li con un 4.25 %; presentaron valores porcentuales altos en comparación con los reportados para Ab (3.5 %) y Um (2.3 %) por Beuchat y col. (1993), Valverde y Paredes-López (1993), respectivamente.

Los cuatro hongos analizados se ajustan al rango reportado en la Tabla 3, sobre la composición general de algunos hongos comestibles cultivados y silvestres; en el caso de Ar, su contenido sobrepasa el límite de dicho rango. Además, presentaron diferencias estadísticas significativas entre los resultados de cada uno de los hongos.

Proteína .- Las cuatro especies de hongos que se analizaron tienen un contenido proteico mayor (Ar con un 17.4 %, Bf con 15.8 % y Li con 13.4 %), respecto al reportado para Um (11.5 %) por Valverde y Paredes-López (1993). Por el contrario, en comparación con el valor de 35 % para Ab reportado por Beuchat y col. (1992), los resultados fueron menores.

Mediante el análisis estadístico por Duncan y LSD los resultados obtenidos presentaron diferencias significativas entre las cuatro especies.

En relación a los estándares reportados de proteína de trigo (13.2%) y leche (25.2%), los resultados obtenidos fueron significativos en comparación con el primero; pero menores al segundo reportados por Martínez-Carrera y Larqué-Saavedra (1990).

Asimismo, todas las especies se encontraron dentro del rango mencionado en la Tabla 3 para los valores porcentuales de proteína de los hongos comestibles cultivados y silvestres.

Dado que se utilizó el mismo factor de conversión de (N X 4.38) en la determinación del contenido de proteína, propuesto por Chang y Hayes (1978) tanto para las especies analizadas (Ar, Bf, Rf y Li) como para las especies de referencia (Um y Ab), cuya digestibilidad es de 70%, podemos sugerir que los resultados de un mayor o menor contenido proteico, se deba principalmente a la especie analizada, aunque no podemos descartar que la diferencia con Ab pudiera deberse a que ésta es una especie cultivada, susceptible a las condiciones empleadas en su cultivo.

Sin embargo, con el fin de lograr un análisis más completo, se realizaron determinaciones de los perfiles de aminoácidos de origen proteico, aminoácidos libres y ácidos grasos en los hongos colectados.

C. PERFIL DE AMINOACIDOS (Picotag)

La figura 2 muestra un cromatograma de gases del perfil típico de aminoácidos para los hongos analizados y en la tabla 6 muestra los tiempos de retención de cada uno de los aminoácidos proteicos para los 3 hongos, con el fin de observar la variabilidad en la repetibilidad de los datos obtenidos para cada aminoácido y en cada hongo analizado. Obteniendo un % CV (coeficiente de variabilidad) total promedio de 0.24 a 3.83 %.

En la Tabla 7 y figura 3 muestran los valores y el perfil del análisis de aminoácidos encontrados en los 3 hongos analizados mediante el método Picotag, el cual se fundamenta en una hidrólisis ácida completa (hidrólisis proteica), una derivación con fenilisocianato (PITC) y un análisis

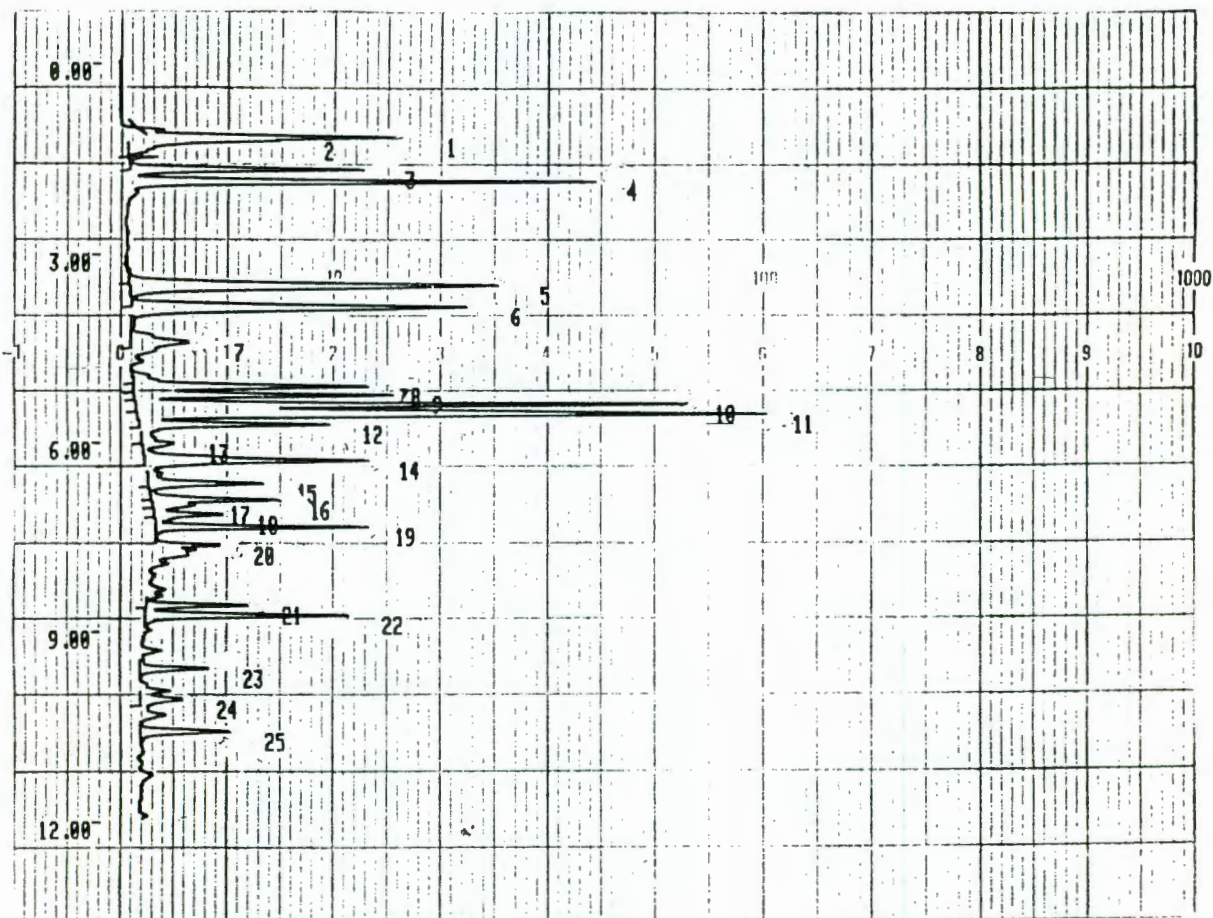


Figura 2 Cromatograma de HPLC, acoplado a UV de Rf: Asx (1), Glx (2), Ser (3), Gly (4), His (5), Arg (6), Thr (7), Ala (8), Pro (9), Tyr (11), Val (12), Ile (15), Leu (16), Phe (17) y Lys (19).

Tabla 6 Tiempos de retención promedio (minutos) para aminoácidos de origen proteico (Método Picotag) obtenidos de los hongos comestibles silvestres analizados.

Aminoácidos	Especies de hongos		
	<i>Ramaria flava</i>	<i>Boletus frostii</i>	<i>Lactarius indigo</i>
Ala	5.320	5.441	5.466
Gly	3.871	3.870	3.895
Thr ^a	5.284	5.294	5.322
His ^a	4.450	4.455	4.513
Ser	3.530	3.523	3.540
ILe ^a	8.635	8.647	8.644
Asx	1.688	1.684	1.676
Pro	5.600	5.602	5.638
Arg	5.151	5.155	5.200
Phe ^a	9.647	9.660	9.654
Tyr ^a	6.964	6.975	6.982
Lys ^a	10.635	10.650	10.634
Glx	1.875	1.873	1.870
Val	7.384	7.395	7.400
Leu ^a	8.790	8.802	8.807

^a Aminoácido esencial

Tabla 7 Contenido de aminoácidos (mg de aa / g de proteína cruda) en tres hongos comestibles silvestres (Método Picotag), comparados con los valores reportados para *A. bisporus* y *U. maydis*.

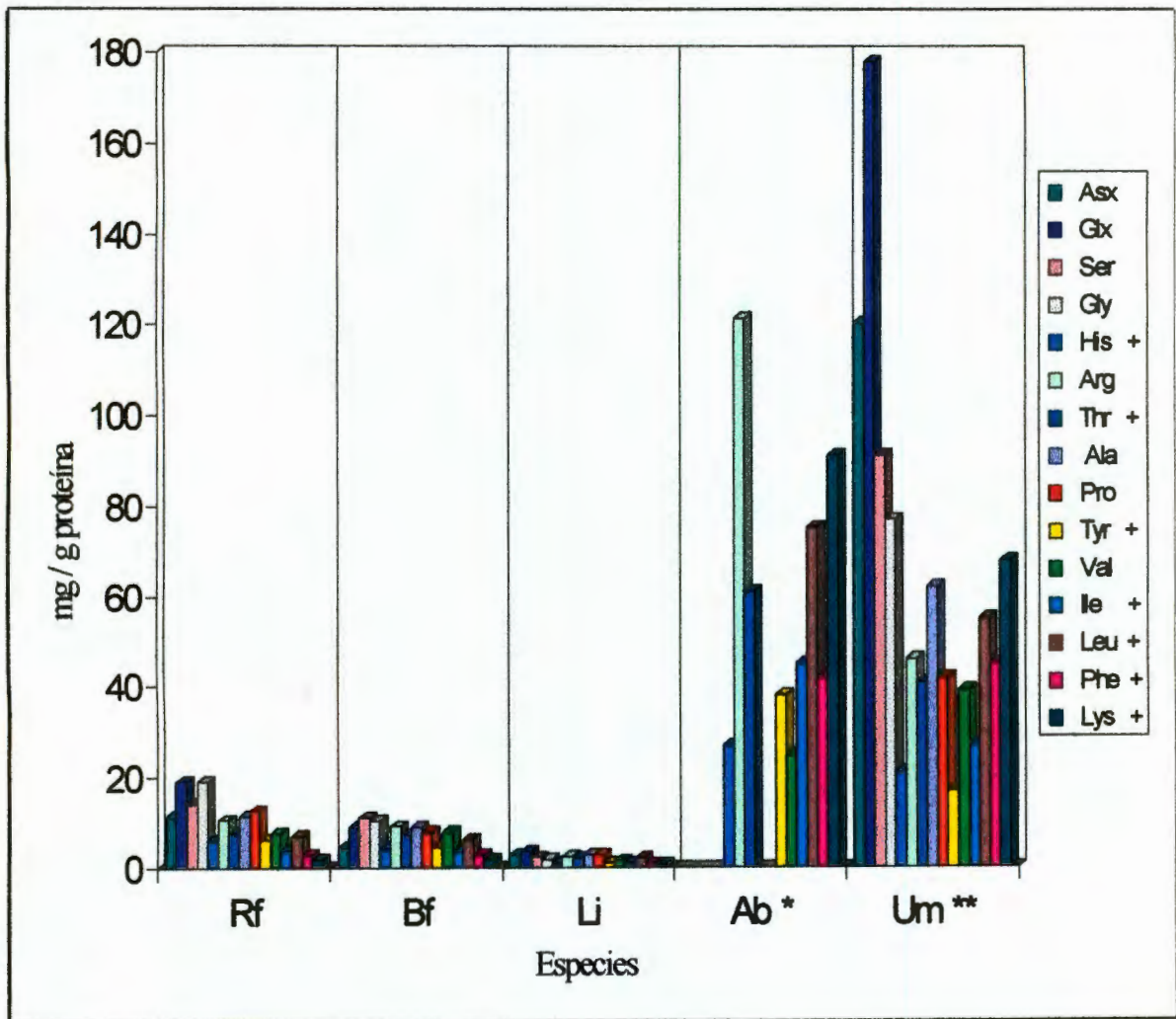
Aminoácidos	Especies de hongos				
	<i>Ramaria flava</i>	<i>Boletus frostii</i>	<i>Lactarius indigo</i>	<i>Agaricus bisporus</i> ^b	<i>Ustilago maydis</i> ^c
Ala	11.322	9.025	2.849	nr	62
Gly	19.048	10.29	1.81	nr	77
Thr ^a	7.736	7.261	1.947	61	41
His ^a	6.058	4.108	1.041	27	21
Ser	14.251	11.203	2.266	nr	91
ILe ^a	3.826	3.606	0.916	45	27
Asx	11.529	4.531	2.666	nr	120
Pro	12.637	7.913	2.634	nr	42
Arg	10.58	9.174	2.493	121	46
Phe ^a	2.805	2.904	0.875	42	45
Tyr ^a	6.133	4.553	0.984	38	17
Lys ^a	1.885	1.874	0.839	91	68
Glx	19.048	8.905	3.622	nr	178
Val	7.709	7.935	1.563	25	39
Leu ^a	6.877	6.228	1.943	75	55
Aminoácidos totales	141.444	99.51	28.448	525	929

^a Aminoácido esencial

^b Bano y Rajarathnam (1988)

^c Valverde González (1992)

nr: No reportado



Ramaria flava (Rf), *Boletus frostii* (Bf), *Lactarius indigo* (Li), *A. bisporus* (Ab) y *U. Maydis* (Um).

* Bono y Rajarathnam (1988).

** Valverde González (1992).

+ Aminoácido esencial.

Figura 3 Perfil de aminoácidos obtenido en hongos comestibles silvestres utilizando el método Picotag, incluyendo los valores reportados para *A. bisporus* y *U. Maydis*.

por cromatografía de HPLC.

Cabe destacar que los datos reportados para Ab por Bano y Rajarathnam (1988) solamente se refieren al contenido de sus aminoácidos esenciales, no así para los datos reportados para Um por Valverde González (1992) que además de los esenciales incluyó los no esenciales.

Mediante este método en el perfil de aminoácidos; el ácido glutámico y la glutamina se reportan juntos, lo mismo sucede con el ácido aspártico y asparagina. La ornitina y el ácido γ -aminobutírico no fueron reportados debido a que estos aminoácidos son de origen no proteico. Para los tres hongos silvestres analizados los aminoácidos más abundantes fueron: en Li el Glx (ácido glutámico + glutamina = 3.62 mg/g), alanina (Ala = 2.85 mg/g), Asx (asparagina + ácido aspártico = 2.67 mg/g), prolina (Pro = 2.63 mg/g) y arginina (Arg = 2.49 mg/g); del contenido de aminoácidos esenciales destaca la treonina con 1.95 mg/g de proteína y la leucina con 1.94 mg/g de proteína. Este hongo presentó el más bajo contenido de aminoácidos totales en comparación con los demás hongos silvestres analizados y para Um y Ab por Valverde González (1992), Bano y Rajarathnam (1988), respectivamente. Sin embargo, estadísticamente presentó diferencias significativas en el contenido de aminoácidos con respecto a los otros dos hongos analizados.

Bf los aminoácidos más abundantes fueron: serina (Ser = 11.2 mg/g), glicina (Gly = 10.29 mg/g), Arg (9.17 mg/g), Ala (9.03 mg/g), Glx (8.91 mg/g), valina (Val = 7.94 mg/g) y Pro (7.91 mg/g). En cuanto a diferencias significativas relevantes, se presentaron en Gly, Glx y Pro con una confiabilidad del 95 % por Duncan y LSD, con respecto a Rf. El contenido de aminoácidos esenciales los más sobresalientes fueron treonina (Thr) y leucina (Leu) con un 7.26 y 6.23 mg de aa / g de proteína cruda, respectivamente, sin embargo sólo la His fue estadísticamente significativa en comparación con Rf.

Por último, en Rf los aminoácidos más distintivos fueron : Glx (19.05 mg/g), Ser (14.25 mg/g), Pro (12.64 mg/g), Asx (11.53 mg/g), Ala (11.32 mg/g) y Arg (10.58 mg/g). En cuanto al contenido de aminoácidos esenciales destacan la Thr (7.74 mg/g), Val (7.71 mg/g), Leu (6.88 mg/g), Tyr (6.13 mg/g) e His (6.06 mg/g). Estadísticamente, Gly, His, Asx, Pro y Glx presentaron diferencias significativas con un 95 % de confiabilidad por Duncan y LSD.

Comparando los resultados obtenidos únicamente entre los tres hongos analizados por este método. Rf presentó un mayor contenido de aminoácidos; excepto en el contenido de valina (7.94 mg/g de proteína) y fenilalanina (2.9 mg/g de proteína), cuyos altos contenidos corresponden al Bf,

además de presentar un mayor contenido de aminoácidos totales en comparación con los otros dos hongos; aún así, no se aproximan a los valores reportados para Ab y Um.

En general la composición de aminoácidos reportada para Ab y Um por Bano y Rajarathnam (1988), y Valverde González (1992) fue más alta a la obtenida para los tres hongos analizados mediante este método.

El valor porcentual de aminoácidos totales (libres y proteicos) en los hongos analizados fue bajo en comparación con el valor reportado en la Tabla 3. Aunque Rf presentó un contenido de 23.178 % de aminoácidos totales, este valor sigue siendo bajo en comparación con el rango de 25-40% de aminoácidos totales.

D. PERFIL DE AMINOACIDOS LIBRES

La figura 4 muestra un cromatograma típico de los aminoácidos libres para los 3 hongos analizados y la Tabla 8 muestra respectivamente sus tiempos de retención, con el fin de observar la variabilidad en la repetibilidad de los datos obtenidos para cada aminoácido y en cada hongo analizado. Obteniendo un % CV (coeficiente de variabilidad) de 0.03 a 0.76 %. La figura 5 y 6 muestra un espectro de masas, tanto para la muestra de hongo analizado como él usado para referencia.

Los resultados del análisis de aminoácidos libres encontrados en los hongos por medio de la cromatografía de GC / EM, se fundamentan en las propiedades ácido-básicas, útiles durante la purificación con resinas catiónicas, y en las reacciones de acilación - esterificación para incrementar la volatilidad de los aminoácidos.

Para Li no se pudo cuantificar su perfil de aminoácidos, dado que su tiempo de aparición dentro del período de lluvias se restringe a la parte media del mismo, por lo que no fue posible colectarse en fechas posteriores, limitando la cantidad de muestra.

La Tabla 9 y figura 7 muestran los valores y el perfil de aminoácidos libres para las tres especies de hongos analizados. Además, se compararon con los valores ya reportados para Ab y Um (Lizárraga, 1995) que se encuentran concentrados en el Tabla 9.

Por lo general, la concentración de los aminoácidos en las tres especies analizadas fue mayor que la reportada para el Ab y Um en la tesis de maestría realizada por Lizárraga (1995); a excepción de la alanina (Ala = 4.2 mg/g de muestra), ácido γ -aminobutírico o GABA (3.3 mg/g de muestra),

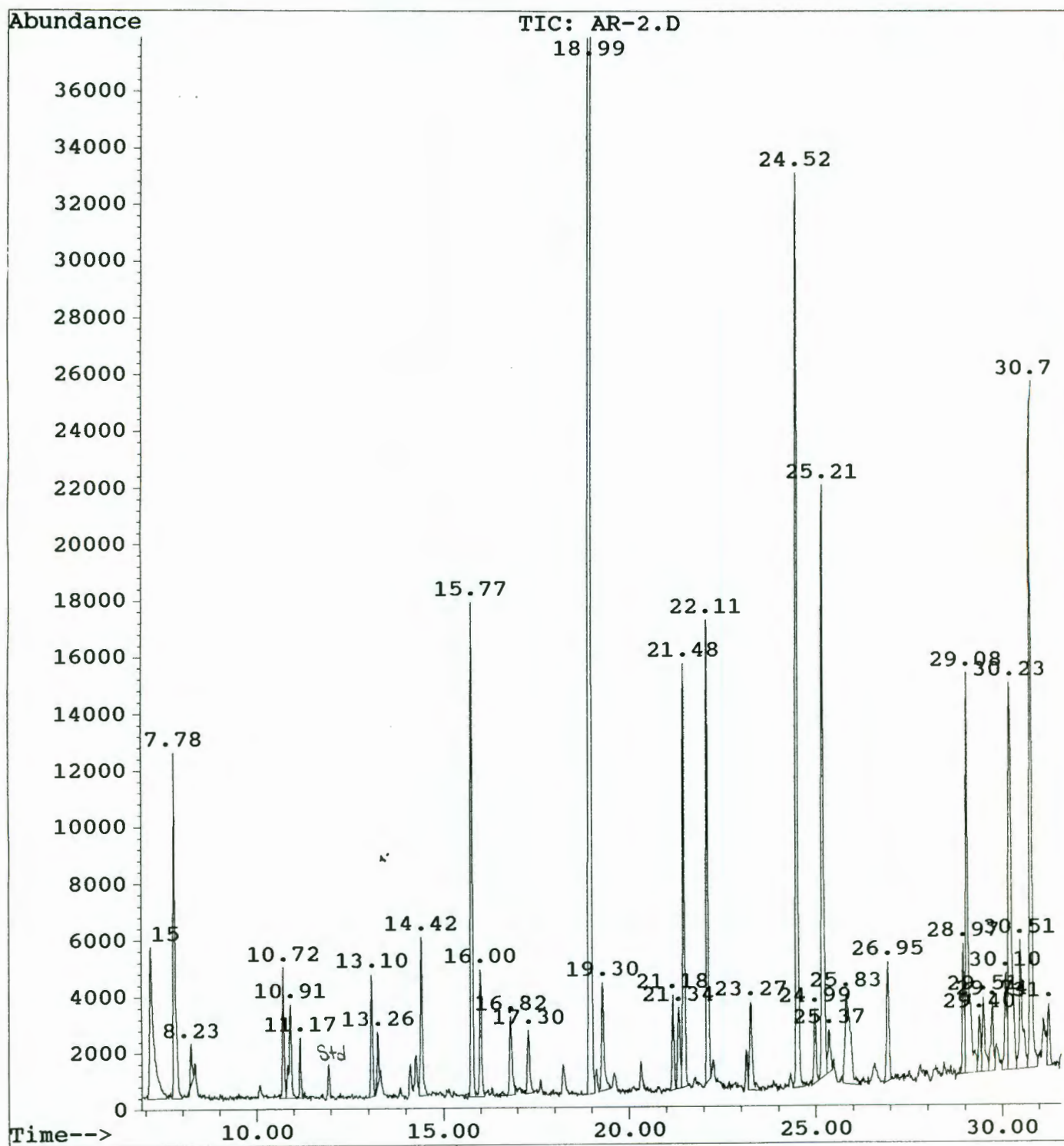


Figura 4 Cromatograma (GC acoplado a EM) típico de aminoácidos libres para Ar.

Tabla 8 Tiempos de retención promedio (min) para aminoácidos libres obtenidos de los hongos comestibles silvestres analizados.

Aminoácidos	Especies de hongos		
	<i>Ramaria flava</i>	<i>Boletus frostii</i>	<i>Amanita rubescens</i>
N-metil Gly	7.08	7.10	7.13
Ala	7.75	7.76	7.78
Gly	8.18	8.20	8.23
Thr ^a	10.68	10.70	10.71
β-aminoisobutírico	10.87	10.88	10.90
Ser	11.13	11.14	11.16
Norvalina (std)	11.90	11.91	11.92
Met	nr	nr	nr
Leu	13.05	13.06	13.08
ILe ^a	13.2	13.22	13.24
γ-aminobutírico	14.37	14.40	14.40
Asp	15.72	15.74	15.75
Pro	15.95	15.97	15.98
Glu	18.91	18.94	19.96
Phe ^a	21.42	21.44	21.46
Orn	22.06	22.07	22.09
Lys ^a	24.45	24.47	24.50
Ac. Glu	30.79	30.77	30.78
Try	nr	nr	nr
Tricolómico	nr	nr	nr

^a Aminoácido esencial

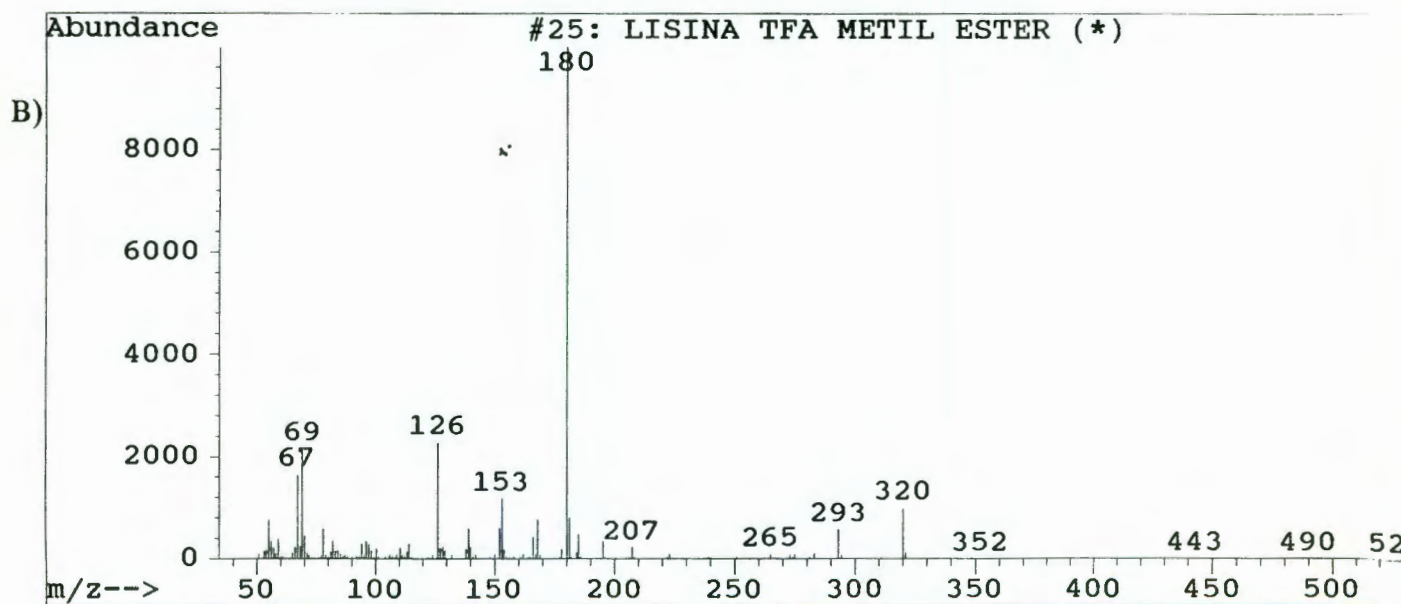
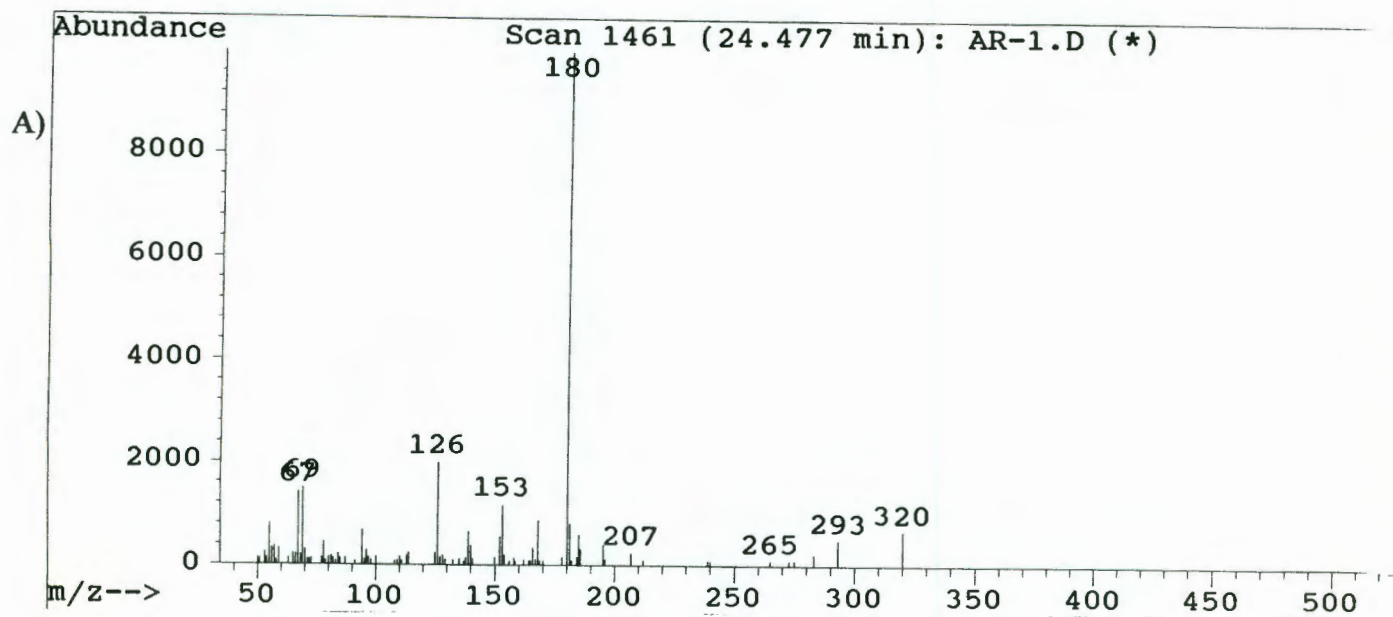


Figura 5 Espectro de masas A) de la muestra (lisina) y B) de referencia (biblioteca).

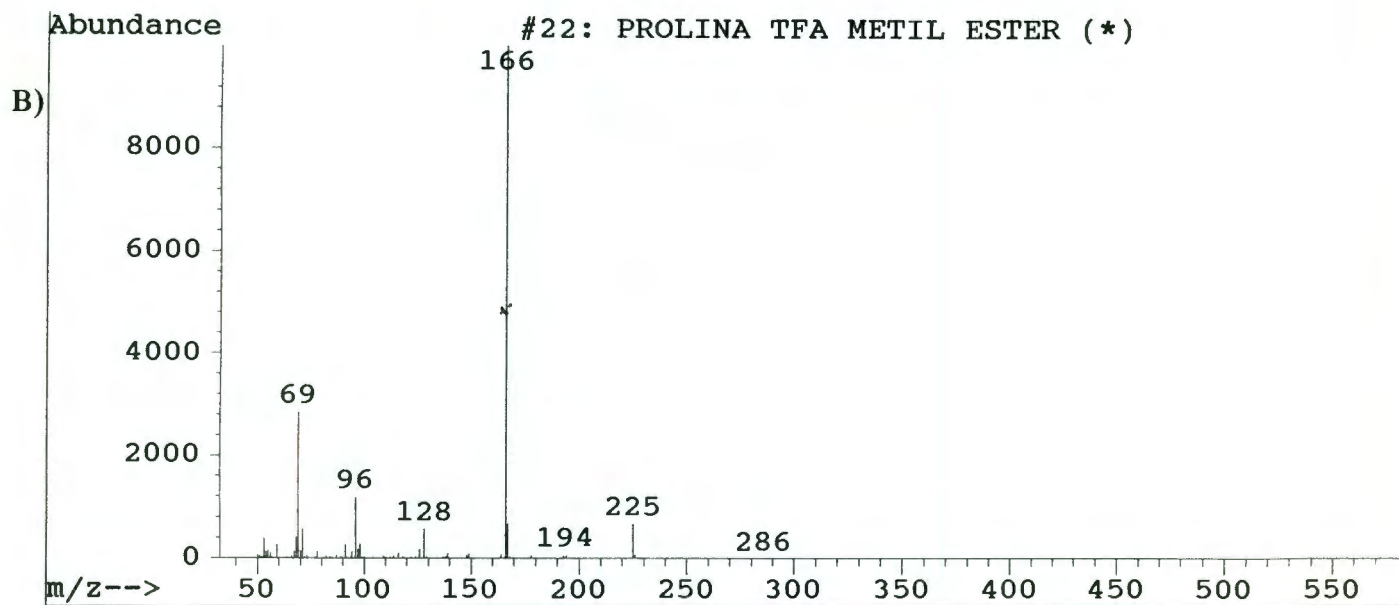
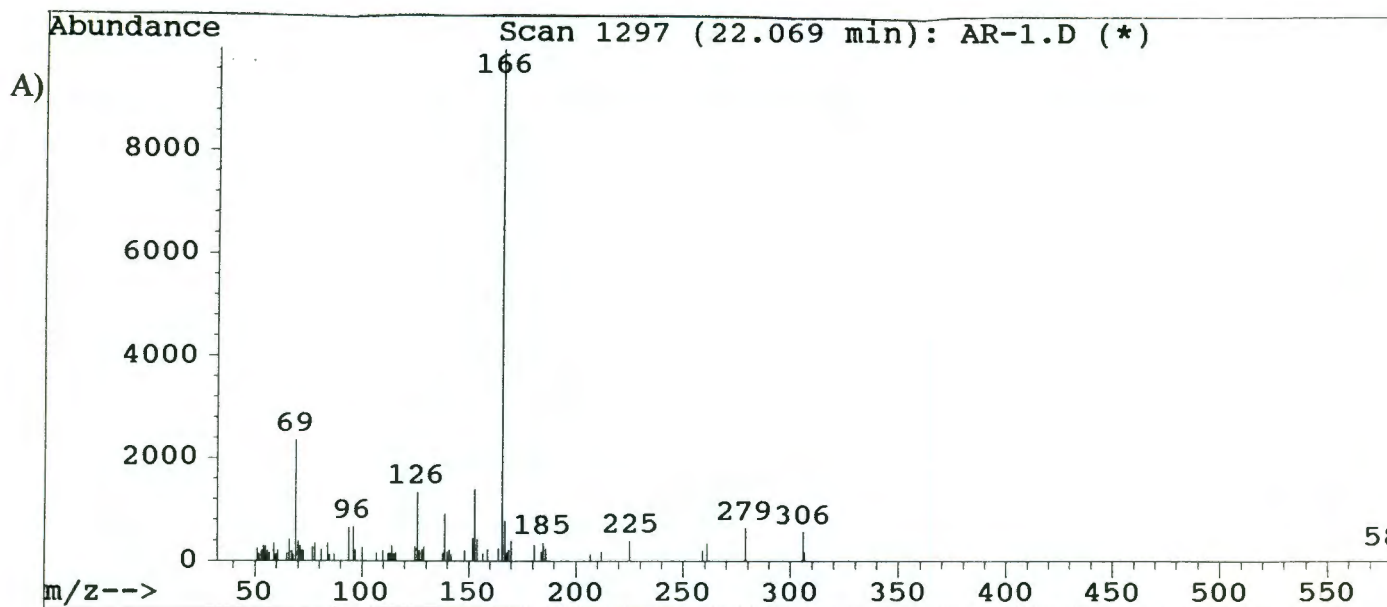


Figura 6 Espectro de masas A) de la muestra (Ornitina) y B) de referencia (biblioteca).

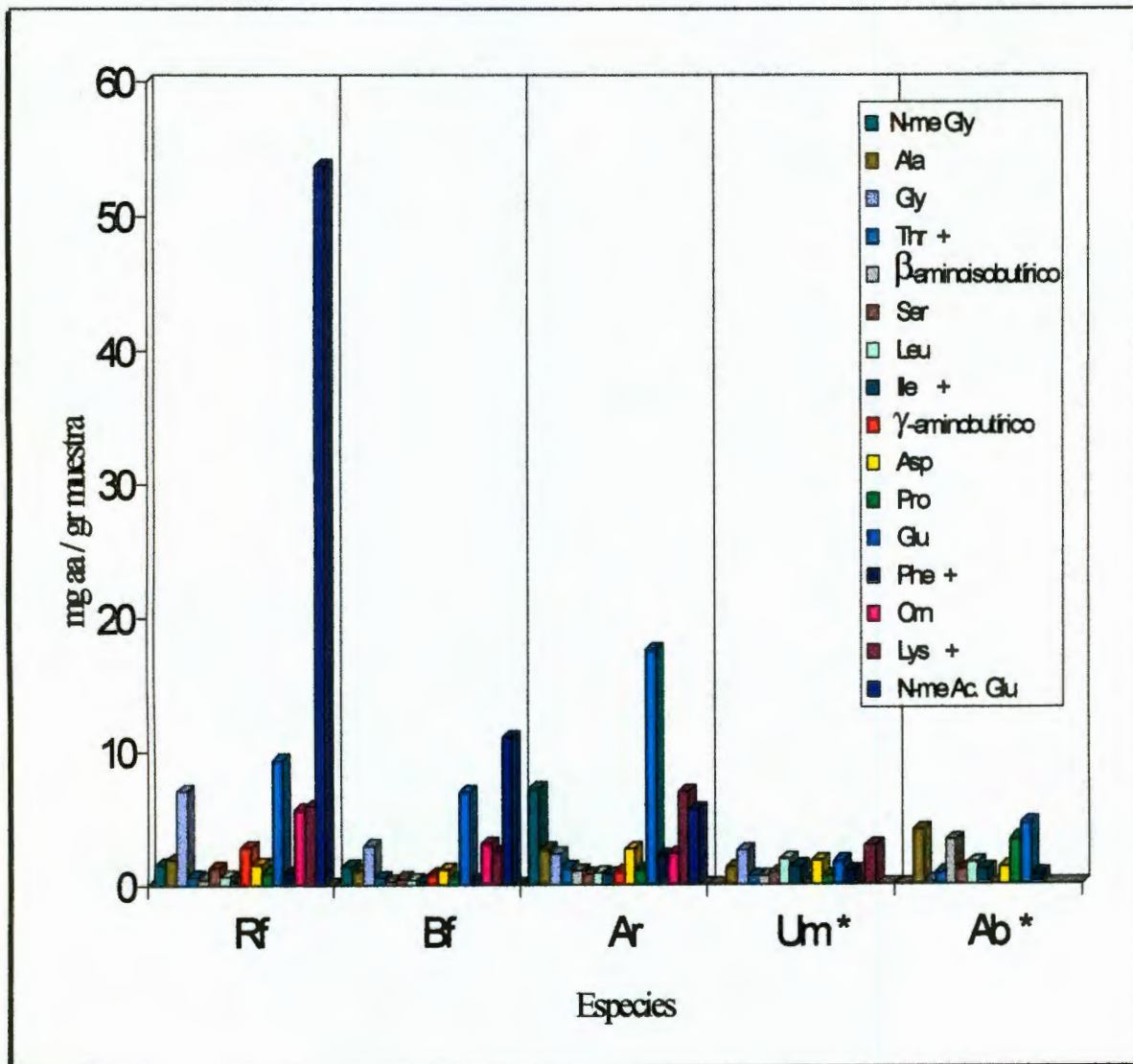
Tabla 9 Contenido de aminoácidos libres (mg / g de muestra) cuantificados en tres especies de hongos comestibles silvestres comparados con los valores reportados para *A. Bisporus* y *U. maydis*.

Aminoácidos	Especies de hongos				
	<i>Ramaria flava</i>	<i>Boletus frostii</i>	<i>Amanita rubescens</i>	<i>Ustilago maydis</i> ^b	<i>Agaricus bisporus</i> ^b
N-metil Gly	1.57	1.42	7.18	nr	nr
Ala	1.96	1.04	2.79	1.31	4.20
Gly	7.14	3.03	2.39	2.63	0.35
Thr ^a	0.66	0.60	1.36	0.65	0.96
β-amino isobutírico	0.51	0.34	1.05	0.75	3.33
Ser	1.34	0.51	0.88	0.98	1.18
Val	nr	nr	nr	1.59	1.09
Leu	0.68	0.42	0.92	2.00	1.78
ILe ^a	0.36	0.27	0.86	1.40	1.20
γ-aminobutírico	2.91	0.82	1.03	nr	nr
Asp	1.63	1.21	2.77	1.83	1.33
Pro	1.02	0.57	1.19	0.66	3.45
Glu	9.42	6.92	17.53	1.79	4.71
Met ^a	nr	nr	nr	nr	0.06
Phe ^a	0.96	0.46	2.23	1.06	0.76
Orn	5.70	3.10	2.38	0.08	nr
Lys ^a	5.94	2.46	6.95	2.97	nr
N-metil Ac. Glu	53.69	11.01	5.64	nr	nr
Try	nr	nr	nr	0.80	nr
Tricolómico	nr	nr	nr	0.36	nr
Aminoácidos totales	101.01	34.18	51.54	21.62	24.34

^a Aminoácido esencial

^b Lizárraga (1995)

nr: No reportado



Ramaria flava (Rf), *Boletus frostii* (Bf), *Amanita rubescens* (Ar), *A. bisporus* (Ab) y *U. Maydis* (Um).

* Lizárraga (1995).

+ Aminoácido esencial.

Figura 7 Perfil de aminoácidos libres obtenido para hongos comestibles silvestres, incluyendo los valores reportados para *A. bisporus* y *U. Maydis*.

leucina (Leu = 2.0 mg/g de muestra), isoleucina (Ile = 1.4 mg/g de muestra) y prolina (Pro = 3.45 mg/g de muestra) en la que Ab y Um tienen una mayor concentración que los hongos silvestres analizados.

Tomando arbitrariamente aquellas concentraciones mayores de 5 mg por g de muestra como valores significativos del perfil de aminoácidos en los hongos analizados, se obtuvieron los siguientes aminoácidos más abundantes para cada uno de los hongos: para Ar fueron glutamina + ác. glutámico (17.53 mg/ g de muestra), lisina (6.95 mg/ g de muestra) y N-metil ácido glutámico con un 5.64 mg/g de muestra; para Rf fueron el N-metil ácido glutámico (53.7 mg/ g de muestra), glutamina + ác. glutámico (Glu = 9.42 mg/ g de muestra), glicina (Gly = 7.14 mg/ g de muestra), N-metil glicina (7.18 mg/g de muestra), lisina (Lys = 5.94 mg/ g de muestra) y ornitina (Orn = 5.7 mg/ g de muestra). Por último, en Bf fueron el N-metil ácido glutámico (11.01 mg/ g de muestra) y glutamina + ác. glutámico (Glu = 6.92 mg/ g de muestra). Estadísticamente, Ar presentó mayores diferencias significativas en sus resultados obtenidos, comparados con los valores de los otros hongos analizados.

Por este método se pudieron analizar los siguientes aminoácidos esenciales: treonina (Thr), isoleucina (Ile), fenilalanina (Phe) y lisina (Lys)). De los tres hongos colectados, solamente el Ar presentó cantidades considerables de Lys (6.95 mg/g de muestra), Phe (2.23 mg/g de muestra) y Thr (1.36 mg/g de muestra), las cuales superan los valores reportados de estos aminoácidos esenciales para Ab y Um por Lizárraga (1995). Sin embargo, cabe destacar que solamente Phe y Thr presentaron diferencias significativas en comparación con los resultados de aminoácidos esenciales de los otros hongos.

Por otra parte, se sabe que los hongos son deficientes en aminoácidos sulfurados y que además sufren de racemización debido a una hidrólisis ácida, muy probablemente por esta razón no fueron observados.

Tomando en cuenta el contenido total de aminoácidos libres en los tres hongos analizados; Rf (101.1 mg/g de muestra), Ar (51.54 mg/g de muestra) y Bf (34.18 mg/g de muestra) superaron al Ab (24.34 mg/g de muestra) y Um (21.62 mg/g de muestra) reportados por Lizárraga (1995). Entre los tres hongos, se destaca al Rf por su alto y significativo contenido de Orn (5.7 mg/g de muestra), Gly (7.14 mg/g de muestra), Glu (9.42 mg/g) y sobre todo de N-metil ácido glutámico (53.7 mg/g de muestra), y Ar por su contenido de Glu (17.53 mg/g). Esto es de gran trascendencia ya que el ácido glutámico es precursor del sabor umami. Yamaguchi y col. (1971); Yojiro y Morely

(1987) reportaron al glutamato monosódico o ácido L-glutámico y al 5'-nucleótido con un efecto sinergista, donde la característica del sabor de estas sustancias son llamadas umami en japonés. Además, junto con el ácido γ -aminobutírico, pueden ser utilizados como compuestos importantes en procesos de neurotransmisión (Ratenbury, 1981), o bien en el cerebro de mamíferos como posibles moduladores de la actividad cerebral (Laguna, 1976).

Dentro de los resultados obtenidos se observó la presencia de ornitina y ácido γ -aminobutírico, ácido N-metil Gly, ácido N-metil glutámico y ácido β -aminoisobutírico (compuestos nitrogenados no proteicos). En relación al contenido del ácido γ -aminobutírico de los hongos analizados (0.3-1.05 mg/g de muestra) fue menor en comparación con el reportado para Ab (3.33 mg/g de muestra), pero si se compara el valor reportado para Um (0.75 mg/g de muestra) con el valor encontrado para Ar (1.05 mg/g), este último fue mayor. La cantidad presente de Orn (de 2.4 a 5.7 mg/g de muestra) en los tres hongos analizados fue mayor a la reportada para Um de 0.08 mg/g por Lizárraga (1995). La importancia de éste compuesto reside en que forma parte del ciclo de la urea en el hígado.

E. PERFIL DE ACIDOS GRASOS LIBRES

La figura 8 muestra un cromatograma típico del perfil de ácidos grasos libres por GC para los 4 hongos analizados y la Tabla 10 muestra los valores de sus respectivos tiempos de retención, con el fin de observar la variabilidad en la repetibilidad de los datos obtenidos para cada aminoácido y en cada hongo analizado. Obteniendo un % CV (coeficiente de variabilidad) de 0.02 a 0.43 %. La figura 9 y 10 muestra un espectro de masas típico (muestra y referencia) de ácidos grasos obtenidos de los hongos analizados.

Pese al poco contenido de lípidos presentes en hongos, cabe destacar que los cuatro hongos analizados presentaron un buen contenido de ácidos grasos esenciales, mostrados en la Tabla 11; también muestra otros ácidos grasos no esenciales y el ácido benzoico. En la figura 11 se muestra el perfil de los ácidos grasos, obtenido de los 4 hongos analizados.

Los hongos analizados se destacaron por sus altos contenidos de ácido oléico (C 18:1) con un rango entre 10.7 y 69.3 mg de ác. graso/g de muestra, destacándose la Ar con un 69.3 mg/g de muestra en comparación con el reportado en Ab de 0.64 mg/g de muestra (Beuchat y col. 1993). En

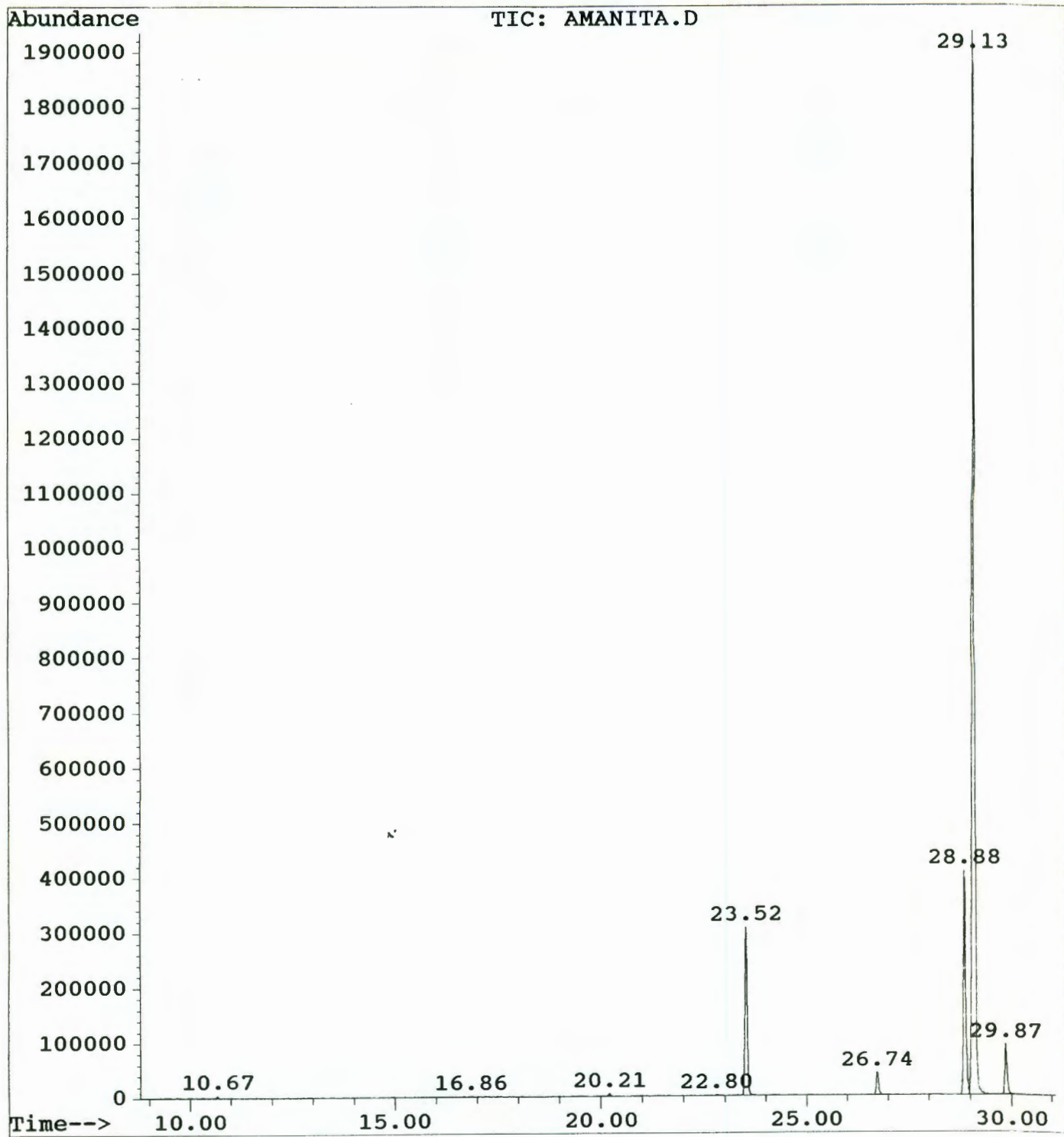


Figura 8 Cromatograma (GC acoplado a EM) típico de ácidos grasos libres para Ar.

Tabla 10 Tiempos de retención promedio (min) para ácidos grasos libres obtenidos de los hongos comestibles silvestres analizados.

Acidos grasos	Especies de hongo			
	<i>Lactarius indigo</i>	<i>Boletus frostii</i>	<i>Ramaria flava</i>	<i>Amanita rubescens</i>
Ac. Benzóico	nr	nr	10.687	10.68
Mirístico (C 14)	nr	16.86	nr	16.866
Pentadecanoico (C 15)	nr	nr	nr	20.202
C 14-9Me ^c	20.2	20.18	nr	nr
Palmitoléico (C 16:1)	nr	22.78	nr	22.805
Palmitico (C 16)	23.505	23.49	23.499	23.520
Heptadecanoico (C 17)	26.728	26.713	26.721	26.728
Linoléico ^d (C 18:2)	28.853	28.851	28.858	28.883
Oléico ^d (C 18:1)	29.1	29.05	29.05	29.134
Estearico (C 18)	29.889	29.838	29.841	29.862
Araquídico (C 20)	35.766	nr	nr	35.765
Lignocérico (C 24)	nr	37.74	nr	nr
Behénico (C 22)	nr	41.234	nr	41.24

^c Derivado del ácido mirístico

^d Acido graso esencial

nr: No reportado

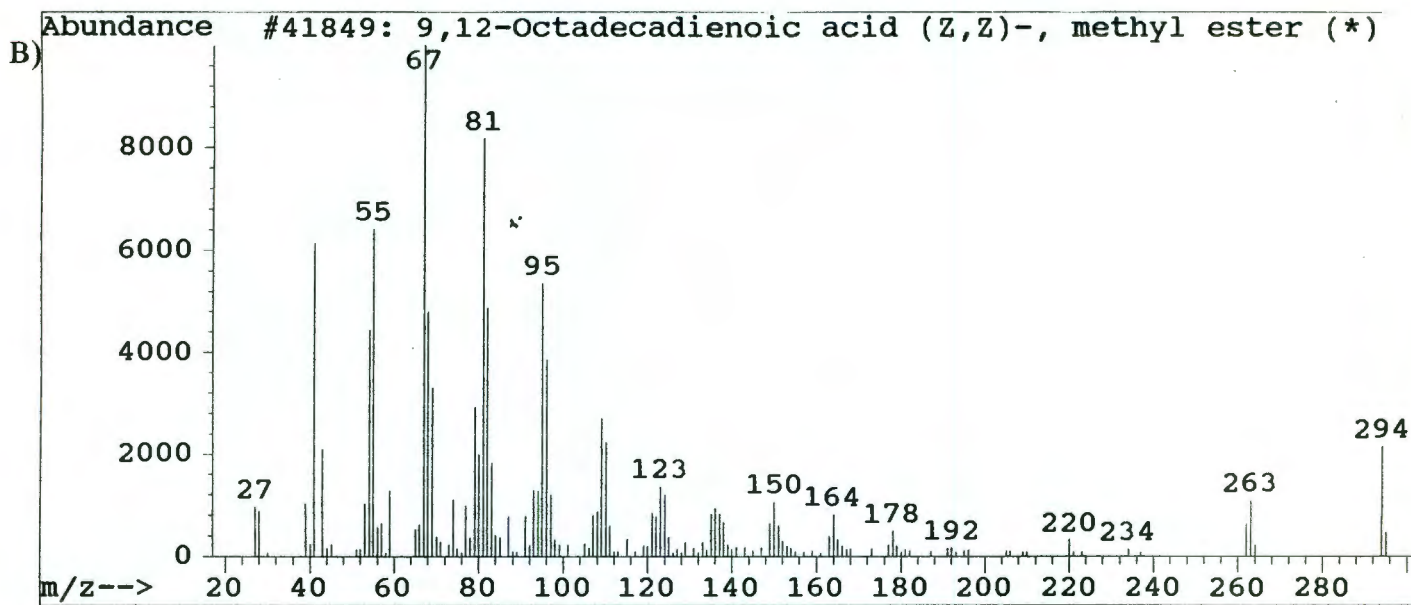
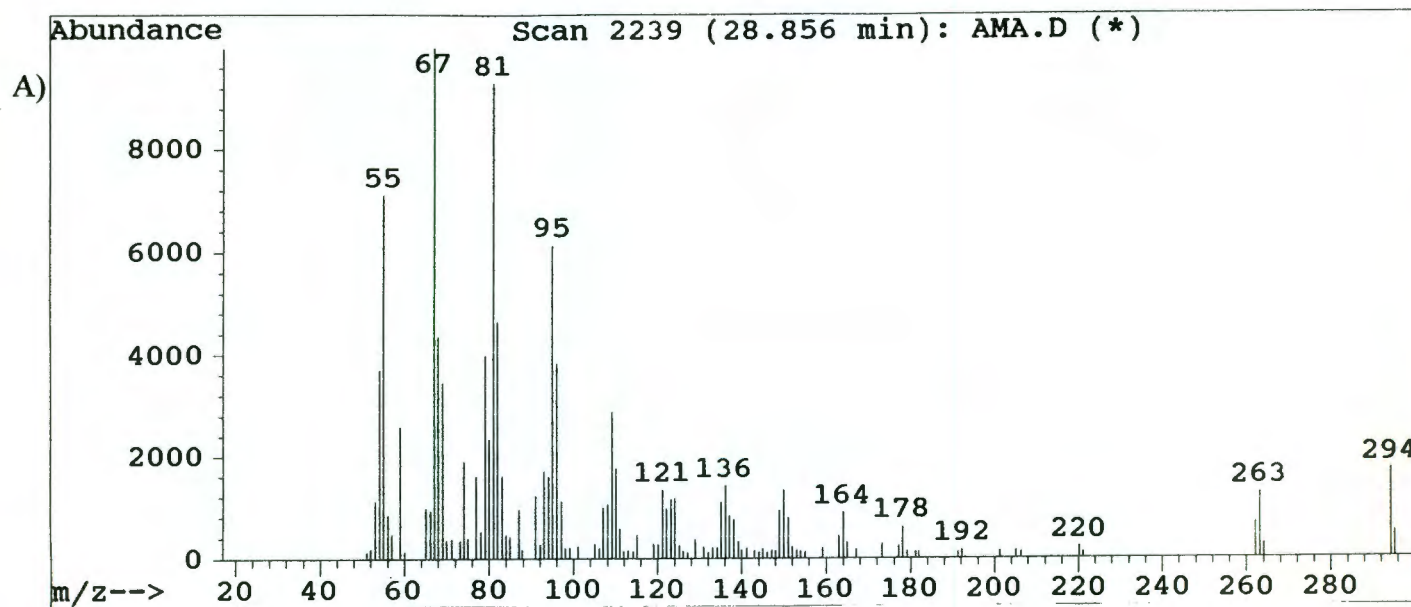


Figura 9 Espectro de masas A) de la muestra (ác. linoléico) y B) de referencia (biblioteca).

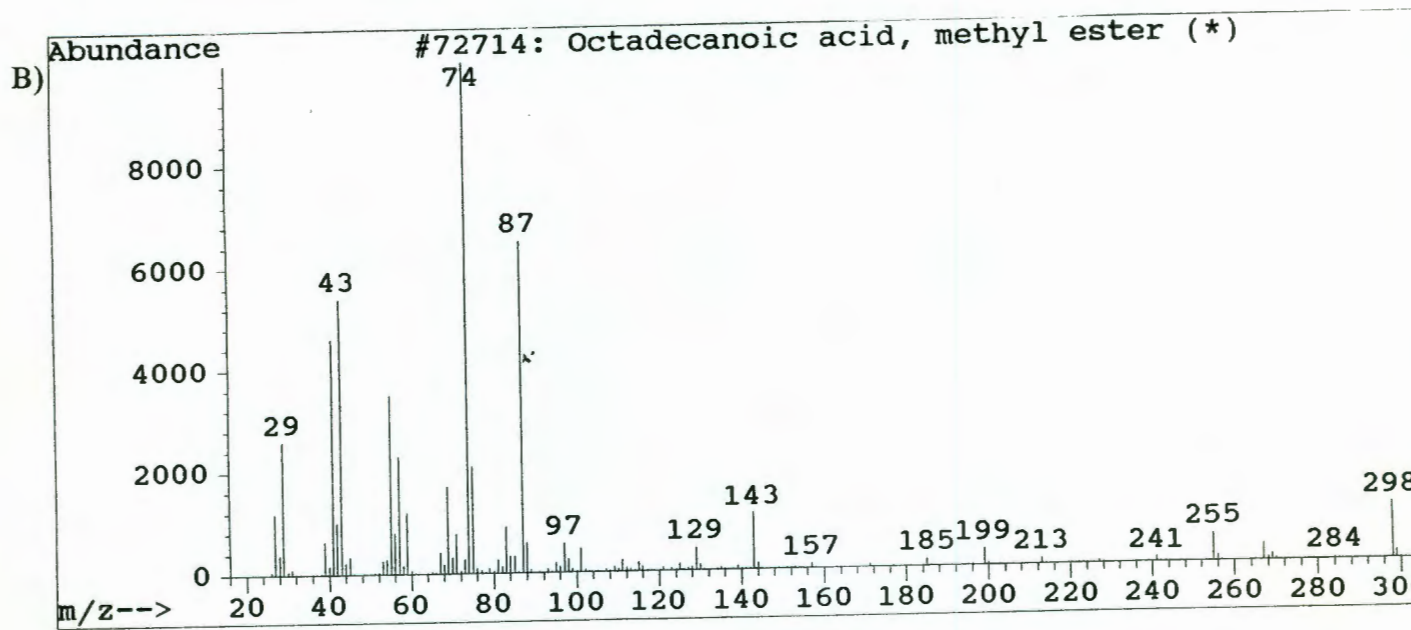
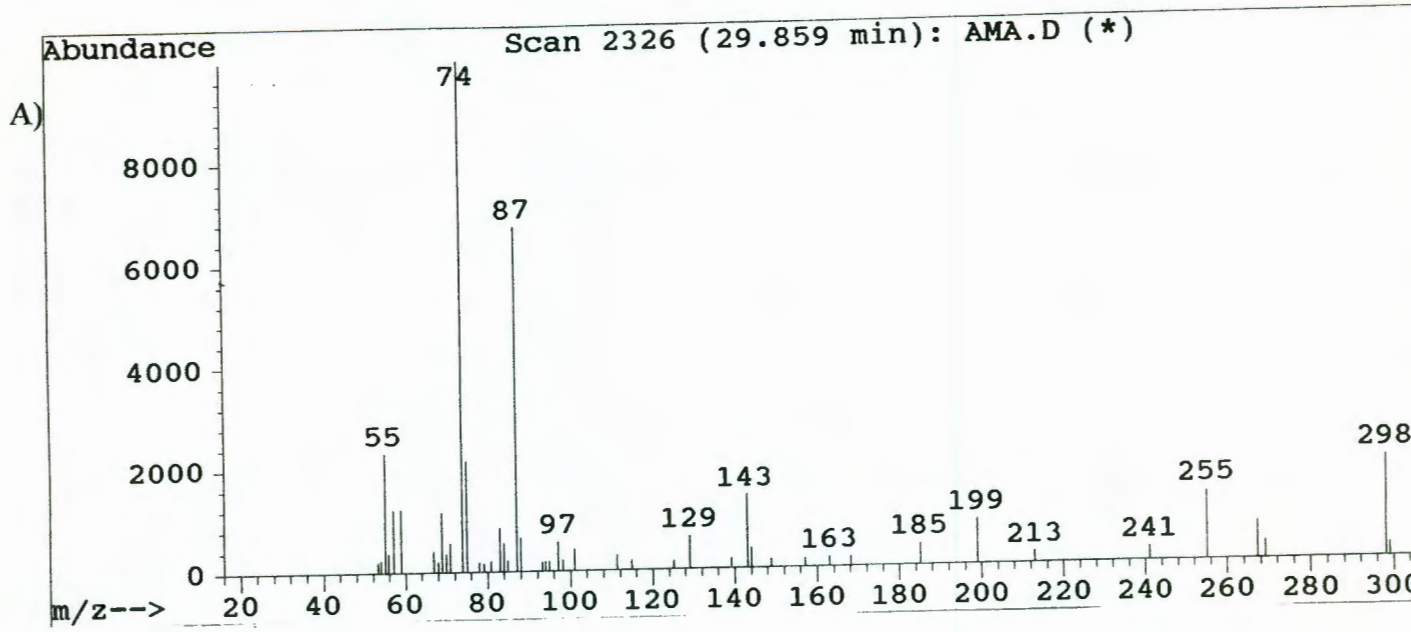


Figura 10 Espectro de masas A) de la muestra (ác. esteárico) y B) de referencia (biblioteca).

Tabla 11 Contenido de ácidos grasos (mg / g de muestra) cuantificados en hongos comestibles silvestres, comparados con los valores reportados para *A. bisporus* y *U. maydis*.

Acidos grasos	Especies de hongo					
	<i>Lactarius indigo</i>	<i>Boletus frostii</i>	<i>Ramaria flava</i>	<i>Amanita rubescens</i>	<i>Agaricus bisporus</i> ^a	<i>Ustilago maydis</i> ^b
Ac. Benzóico	nr	nr	0.258	0.074	nr	nr
Mirístico (C 14)	nr	0.052	nr	0.067	0.1416	0.145
Pentadecanóico (C 15)	nr	nr	nr	0.226	nr	0.0874
C 14-9Me ^c	0.134	0.106	nr	nr	nr	nr
Palmitoléico (C 16:1)	nr	0.171	nr	0.147	nr	0.874
Palmítico (C 16)	3.491	6.167	4.041	11.301	4.3896	2.99
Linoléico ^d (C 18:2)	13.276	16.847	15.714	21.745	27.6474	9.085
Oléico ^d (C 18:1)	10.757	19.527	12.032	69.304	0.6372	7.843
Estearico (C 18)	32.057	1.754	0.91	6.254	1.2744	0.552
Araquídico (C 20)	0.213	nr	nr	0.329	1.1328	0.481
Lignocérico (C 24)	nr	0.717	nr	nr	nr	0.207
Behénico (C 22)	nr	0.331	nr	0.245	nr	0.322
Ac. grasos totales	59.928	45.672	32.955	109.692	35.223	22.5864

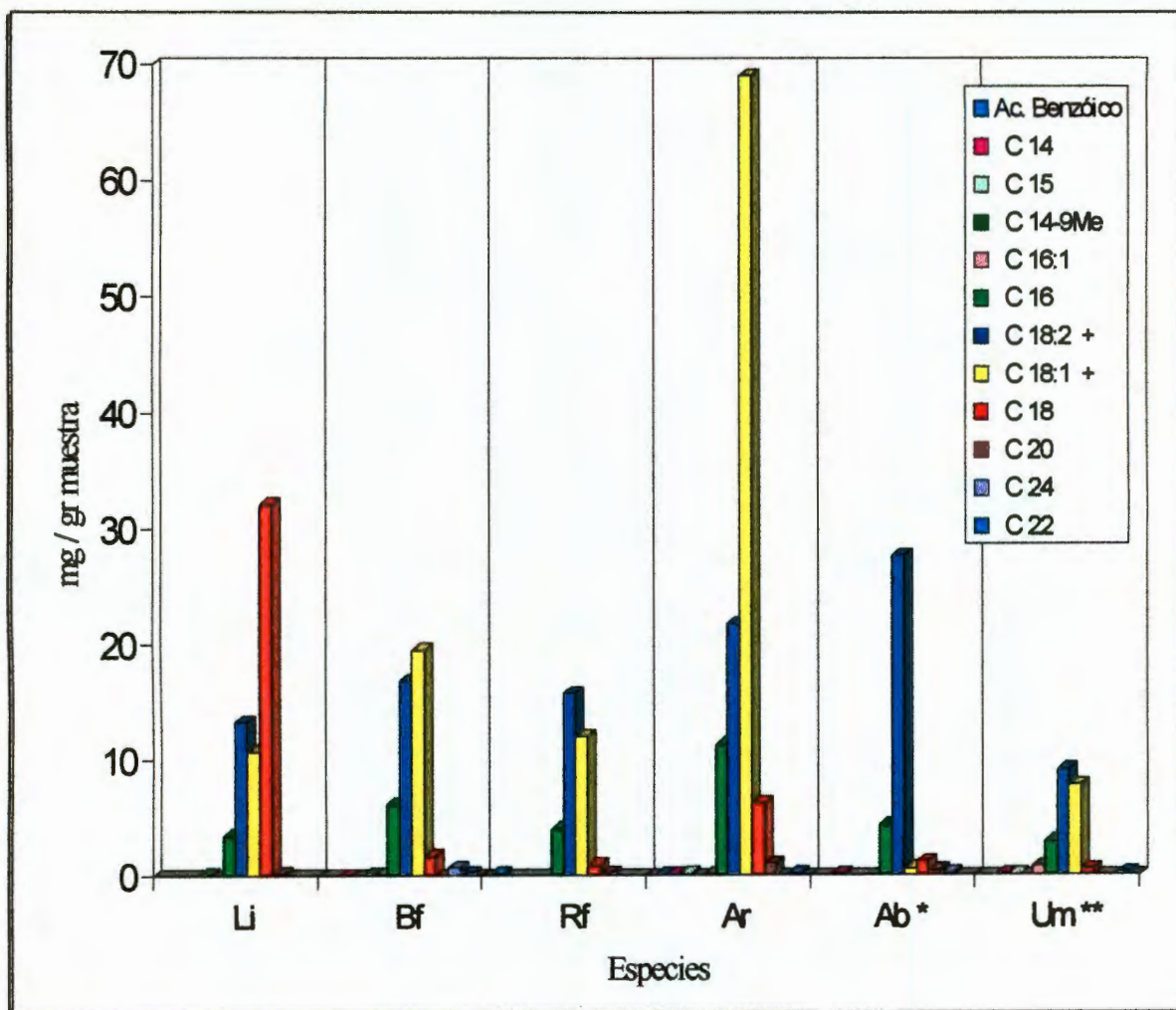
^a Beuchat y col. (1993)

^b Valverde y Paredes-López (1993)

^c Derivado del ácido mirístico

^d Acido graso esencial

nr: No reportado



Lactarius indigo (Li), *Ramaria flava* (Rf), *Boletus frostii* (Bf), *Amanita rubescens* (Ar), *A. bisporus* (Ab) y *U. Maydis* (Um).

* Beuchat y col (1992).

** Valverde y Paredes-López (1992).

+ Ácido graso esencial.

Figura 3 Perfil de ácidos grasos obtenido en hongos comestibles silvestres (mg/g de muestra), incluyendo los valores reportados para *A. bisporus* y *U. Maydis*.

Um no es reportado este ácido graso por Valverde y Paredes-López (1993).

En cuanto al segundo ácido graso esencial (C 18:2) los hongos analizados presentaron un contenido de ácido linoléico entre 13 y 22 mg/g de muestra, destacándose Ar con un contenido mayor de ácido linoléico (aproximadamente 21.7 mg/g) al reportado en Um (9.1 mg/g) por Valverde y Paredes-López (1993), pero menor en comparación con Ab reportado por Beuchat y col. (1993) con un contenido de 27.65 mg/g de muestra.

Li se destaca por su contenido de ácido esteárico (C 18, ácido graso saturado no esencial) con 32.06 mg/g, sobrepasando en cantidad a los otros hongos analizados y además a los reportados en Ab y Um por Beuchat y col. (1993); Valverde y Paredes-López (1993), cuyos valores se encuentran en un rango de 0.5 a 1.3 mg/g.

El ácido esteárico (C 18) y el ácido palmítico (C 16) fueron también sobresalientes en Ar con un contenido de 6.25 mg/g de muestra y 11.3 mg/g, respectivamente, en comparación con Ab (1.3 mg de C 18/g de muestra y 4.4 mg de C 16/g de muestra) y Um (0.5 mg de C 18/g de muestra y 3 mg de C 16/g de muestra) reportados por Beuchat y col. (1993); Valverde y Paredes-López (1993), respectivamente.

En el perfil de ácidos grasos, además de los ácidos grasos comunes se obtuvieron otros tipos de compuestos inusuales en algunos de los hongos analizados como: ácido benzóico (acción antifúngica, ácido carboxílico), ácido mirístico (C 14), un derivado del ácido anterior (ác. 9-metil-mirístico = 9Me-C14), ácido pentadecanoico (C 15), ácido araquídico (C 20), ácido lignocérico (C 24) y ácido behénico (C 22), cuyo contenido en algunos casos y entre los mismos hongos puede ser mayor que los ácidos grasos comunes, no así para los ácidos grasos esenciales.

El contenido de ácidos grasos totales mostrados en la Tabla 11, muestra que Ar contiene un alto índice de ácidos grasos (109.7 mg/g), seguida del Li (60 mg/g), Bf (45.7 mg/g) y Rf (33 mg/g), sobrepasando en contenido a los reportados en Ab y Um por Beuchat y col. (1993); Valverde y Paredes-López (1993).

Desde el punto de vista estadístico entre las especies analizadas, el contenido de los ácidos grasos (C16, C18:2 y C18:1) presentados en los hongos, denotaron diferencias significativas entre ellos, excepto entre Li y Rf. En cuanto al contenido de C18 no se presentaron diferencias significativas entre Bf y Rf.

VII. CONCLUSIONES

El estudio comparativo y proximal realizado en hongos comestibles silvestres colectados en Laguna de Servín, municipio de Amealco, Qro., permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

- Bf, Rf, Ar, y Li presentaron un contenido significativo de fibra dietética de 30.2, 21.6, 20 y 18.7 %, respectivamente.

- Aunque el contenido de lípidos es de poca importancia nutricional en hongos, cabe destacar que en la mayoría de los hongos colectados, el contenido de lípidos es de buena calidad y indicaron diferencias significativas entre ellos; destacando Ar con un alto contenido de lípidos totales (8.3 % en base seca).

- Ar presentó un porcentaje sobresaliente y significativo de proteína de 17.4 %, al estándar de proteína de trigo con un 13.2 %.

- Rf presentó un contenido significativo de aminoácidos totales de origen proteico (141.4 mg de aminoácido / g de proteína cruda) en comparación con Li, y cuyos contenidos de aminoácidos esenciales (Thr = 7.7 mg/g, Leu = 6.9 mg/g, His = 6.06 mg/g y Tyr = 6.1 mg de aminoácido / g de proteína cruda) sobresalen entre los demás hongos analizados. Aunque solamente, His presentó diferencias significativas en comparación con las otras especies.

- Rf indicó un contenido muy significativo de aminoácidos libres totales de 101.1 mg/g de muestra, esto es debido principalmente al abundante contenido de N-metil ácido glutámico (53.7 mg/g de muestra).

En cambio Ar contiene sólo un 51.54 mg de aminoácidos libres totales por g de muestra, esto es debido principalmente a la abundancia de glutamina + ác. glutámico (17.5 mg/g de muestra). Pero se caracteriza por sus altas proporciones de aminoácidos esenciales : treonina con un 1.36 mg/g de muestra, isoleucina con 0.86 mg/g de muestra, fenilalanina con 2.23 mg/g de muestra y lisina con un

6.95 mg/g de muestra; de los cuales sólo los contenidos de Lys presentados en los tres hongos no indicaron diferencias significativas.

- Ar también presentó un contenido muy significativo de ácidos grasos esenciales en base seca de 21.7 mg de ácido oléico / g de muestra y 69.3 mg de ácido linoléico / g de muestra; y un contenido de ácidos grasos totales de 109.7 mg/g de muestra. El Bf se caracterizó por sus contenidos significativos de ác. oléico (19.53 mg/g) y ác. linoléico (16.85 mg/g); y con un contenido de 45.7 mg de ác. grasos totales / g de muestra. El Li presentó un contenido de 59.93 mg de ácidos grasos totales / g de muestra; sobresaliendo por su contenido significativo de ácido esteárico (32.06 mg/g de muestra).

Los resultados obtenidos en éste estudio indican que de las cuatro especies de hongos silvestres analizadas, Rf y Ar son las que más sobresalen por su calidad tanto en aminoácidos libres como aminoácidos esenciales, los cuales juegan un papel importante asociado a la calidad nutricional de los hongos. Por el contrario, Bf y Ar sobresalen por su calidad en ácidos grasos esenciales.

A. COMENTARIOS

Se sugiere la realización de estudios más específicos de los cuatro hongos analizados, debido a la aparición de compuestos tales como el ácido 9metil-mirístico durante el análisis del perfil de ácidos grasos; y el N-metil glicina, N-metil ácido glutámico, β -aminoisobutírico durante el análisis del perfil de aminoácidos, cuyos papeles nutricionales y medicinales no ha sido establecido.

Dichos estudios además de proporcionar información sobre el valor nutricional de los hongos silvestres del estado de Querétaro. Refuerza la utilización de ésta fuente alimenticia poco convencional, al suministrar nutrientes que suplementan a los ya existentes.

6.95 mg/g de muestra; de los cuales sólo los contenidos de Lys presentados en los tres hongos no indicaron diferencias significativas.

- Ar también presentó un contenido muy significativo de ácidos grasos esenciales en base seca de 21.7 mg de ácido oléico / g de muestra y 69.3 mg de ácido linoléico / g de muestra; y un contenido de ácidos grasos totales de 109.7 mg/g de muestra. El Bf se caracterizó por sus contenidos significativos de ác. oléico (19.53 mg/g) y ác. linoléico (16.85 mg/g); y con un contenido de 45.7 mg de ác. grasos totales / g de muestra. El Li presentó un contenido de 59.93 mg de ácidos grasos totales / g de muestra; sobresaliendo por su contenido significativo de ácido esteárico (32.06 mg/g de muestra).

Los resultados obtenidos en éste estudio indican que de las cuatro especies de hongos silvestres analizadas, Rf y Ar son las que más sobresalen por su calidad tanto en aminoácidos libres como aminoácidos esenciales, los cuales juegan un papel importante asociado a la calidad nutricional de los hongos. Por el contrario, Bf y Ar sobresalen por su calidad en ácidos grasos esenciales.

A. COMENTARIOS

Se sugiere la realización de estudios más específicos de los cuatro hongos analizados, debido a la aparición de compuestos tales como el ácido 9metil-mirístico durante el análisis del perfil de ácidos grasos; y el N-metil glicina, N-metil ácido glutámico, β -aminoisobutírico durante el análisis del perfil de aminoácidos, cuyos papeles nutricionales y medicinales no ha sido establecido.

Dichos estudios además de proporcionar información sobre el valor nutricional de los hongos silvestres del estado de Querétaro. Refuerza la utilización de ésta fuente alimenticia poco convencional, al suministrar nutrientes que suplementan a los ya existentes.

VIII. BIBLIOGRAFIA.

- Abbott, D., y Andrews, R. S., 1973. Introducción a la Cromatografía. Editorial Alhambra. Tercera edición. pp. 1, 73-79, 85.
- Alexopoulos, C. J., 1977. Introducción a la Micología. Editorial Universitaria. pp. 3-10, 325,414.
- A.O.A.C., 1984. 1990. Official Methods of Analysis. Décimo cuarta edición. Décimo quinta edición. Association of Official Analytical Chemist. Seccion 14.004, 14.006, 14.019 y 985.29. pp. 17, 18, 1105, 1106.
- A.A.C.C., 1983. Aproved Methods of the American Association of Cereal Chemists. Octava edición. vol. II. Sección 46-13. pp. 1-2
- Bano, Z., y Rajarathnam, S., 1988. Pleurotus Mushrooms. Part II. Chemical Composition, Nutritional Value, Post-harvest Phisiology, Preservation, and Role as Human Food. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 27(2): 87-91, 116-118 y 136.
- Barrett, G. C., 1985. Chemistry and Biochemistry of the Amino acids. Chapman and Hall. Primera edición . pp. 204 -205.
- Beuchat, L., Brennehan, T., y Dove, C., 1993. Composition of the Pecan Truffle (*Tuber texense*). Food Chemist. 46 :189-192.
- Breene, W. M., 1990. Nutritional and Medicinal value of Specialty Mushrooms. Journal of Food Protection. 53 (10) : 883-894.
- Conn, E. E., y Stumpf, P. K., 1974. Bioquímica Fundamental. Editorial Limusa. Segunda edición. pp. 96-97, 444-445.
- Chang, S. T., y Hayes, W. A., 1978. The Biology and Cultivation of edible Mushrooms. Editorial Academic Press. pp. 137-165.
- Chapman, D., 1973. Lípidos. Editorial Alhambra. Primera edición Española. pp. 1-45.
- Desrosier, N. W., 1986. Elementos de Tecnología de Alimentos. Compañía editorial Continental S. A. de C. V. México. Cuarta impresión. pp. 50-51.
- Evans Shaltes, R., y Hofman, A., 1982. Planta de los Dioses. Fondo de Cultura Económica, México. Primera edición. pp. 84-84, 144-147, 150-151.
- Fennema, O. R., 1993. Química de los Alimentos. Editorial Acribia, S. A. Segunda edición. pp. 158-160, 184, 257, 265-266, 276-280, 300, 351-355.
- Folch, J., Lees, M., y Stanley G., 1957. J. of Biological Chemistry. 226 : 497-509.

- García Saucedo, P. A., 1995. Caracterización de las diferentes clases de lípidos en Huitlacoche. Tesis de Licenciatura, CINVESTAV, Irapuato. pp. 55 -57, 61, 62, 70.
- Gómez Ruíz, H., y García Osuna, A., 1989. Curso de Espectroscopía Aplicada. UNAM, Facultad de Química. pp. 1-14.
- Guzmán, G., 1978. Identificación de Hongos Comestibles. Editorial Limusa. Primera edición. pp. 26, 47, 44 y 77.
- Herrera, T., y Ulloa, M., 1990. Reino de los Hongos. UNAM. Primera edición. pp. 31, 32, 443-445, 451-461.
- Ibar, L., 1980. Setas. Editorial Aedos. Primera edición. pp. 30, 32 y 39.
- Kjeltec 1026, 1987. MANUAL. (Kjeltec 1026, Dist. Unit, Manual part No. 1000 2790, T8806, Probin, CoAB, Klippen).
- Krause, M. V., y Hunscher, M. A., 1975. Nutrición y Dietética en Clínica. Editorial Interamericana. Novena edición. pp. 56-85.
- Laguna, J., 1967. Bioquímica. Editorial Fournier, S. A. Segunda edición. pp. 244-247, 259-262, 319-320, 324, 337.
- Lazarus, W., 1973. Purification of Plant Extract for Ion Exchange Chromatography of Free Amino Acids. J. Chromatogr. 87 : 169-178.
- Lehninger, A. L., 1991. Bioquímica. Ediciones Omega, S. A. pp. 59-60, 74-78, 89-93, 97-105.
- Lizárraga, G. R., 1995. Extracción y Caracterización de Compuestos Saborizantes en Huitlacoche. Tesis de Maestría, CINVESTAV, Irapuato. pp. 45, 59-62, 66-70, 99, 118.
- Mahler, H. R., y Cordes, E. H., 1971. Química Biológica. Ediciones Omega. pp. 15-17, 31-34, 69.
- Mcgilvery, R. M., 1972. Bioquímica. Editorial Internacional. Primera edición. pp. 365.
- Manderville, S., Yaylayan, V., y Simpson, B. K., 1992. Proximate Analysis, Isolation and Identification of Amino acids and Sugar from Raw and Cooke Comercial Shrimp waste. Food Biotechnol. 6 : 51-64.
- Martínez-Carrera, D., y Larqué-Saavedra, A., 1990. Biotecnología en la Producción de Hongos Comestibles. Ciencia y Desarrollo, CONACYT. XVI (95) : 53-64.
- Martínez-Carrera, D., Larqué-Saavedra, A., Morales, P., Sobal, M., Martínez, W., y Aguilar A., 1993. Los Hongos Comestibles en México : Biotecnología de su Reproducción. Ciencia y Desarrollo, CONACYT. XVIII (108) : 41-48.

- Morrison, H. W., 1990. An Evaluation of the Soxtec System For Oil Determination in Soybeans. J. A.O.A.C. 67 (7) : 431-432.
- Oxenhör J., 1979. Biología. Publicaciones cultural S.A. pp. 430.
- Pedraza, D., Silva, L, y García, J., 1994. Algunos Hongos Comestibles y Tóxicos del Estado de Qro. SEDESOL. pp. 28, 30, 40 y 51-52.
- Pico-tag Amino acid Analysis System. MANUAL.
- Ratenbury, J. M., 1981. Amino Acid Analysis. B. S. Ellis Horwood Limited. Primera edición. pp. 238, 239.
- Sandford, P. A., y Matsuda, K., 1980. Fungal Polysaccharides. ACS Symposium Series 126. American Chemical Society. pp. 234-235.
- Scheider, W. L., 1983. Nutrición, Conceptos Básicos y Aplicaciones. Mc Graw-Hill. pp. 75.
- Staunton, W. E., Todd, R. W., Somason, H., y Van Broggen, J. T., 1969. Bioquímica Medica. Editorial Interamericana. Cuarta edición. pp. 952, 1014 y 1017.
- Stock, R., y Rice, C. B., 1974. Chromatographic Methods. Editorial Chapman y Halland Science paperbacks. Tercera edición. pp. 179-181, 213-218.
- Storch de García, J. M., 1968. Fundamentos de Cromatografía de Gases. Editorial Alhambra. Primera edición. pp. 1, 6, 9, 54-55.
- Técnica de Fibra Dietética, 1991. Total Dietary Fiber Assay Kit. SIGMA, Chemical Company.
- Téllez Mora, P., 1995. Cultivo de Setas: Alternativa Comercial. Tecnoindustria. pp. 33-34.
- Valverde González, M. E., 1992. Estudios sobre la Infección de *Ustilago maydis* (Huitlacoche) y sus Características Alimentarias. Tesis de Maestría. pp. 59-61, 85-87, 90-93.
- Valverde, M. E., y Paredes-López, O., 1993. Production and Evaluation of Some Food Properties of Huitlacoche (*Ustilago maydis*). Food Biotechnology. 7(3) : 207-219.
- Walton, E. F., Clark, C. J., y Boldingh, H. L., 1991. Effect of Hidrogen Cynamide on Amino Acid Profiles in Kiwifruit Buds during Budbreak. Plant. Phisiol. 97 : 1256-1259.
- Yamaguchi, S., Yoshikawa, T., Ikeda, S., y Ninomiya, T., 1971. Measurement of the Relative Taste Intensity of Some L- α -Amino Acids and 5'-nucleotides. Journal of Food Science. 36 : 846-849.

Yojiro, K., y Morely, R., 1987. Physiology Biochemistry Nutrition Food Science. Marcel Dekker, Inc.
pp. 3-642.