



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**"EVALUACIÓN NUTRITIVA Y TOXICOLÓGICA DE LA
FLOR DE MORINGA (*Moringa Oleífera*) CONSUMIDA
EN EL MUNICIPIO DE SANTA MARIA COLOTEPEC,
OAXACA"**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

LORENA DEL CARMEN LOMELÍ RAMÍREZ



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Profesor: Bernardo Lucas Florentino

VOCAL: Profesor: Lucia Cornejo Barrera

SECRETARIO: Profesor: Inocencia María de Lourdes Flores Téllez

1er. SUPLENTE: Profesor: Argelia Sánchez Chinchillas

2do. SUPLENTE: Profesor: Liliana Rocío González Osnaya

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

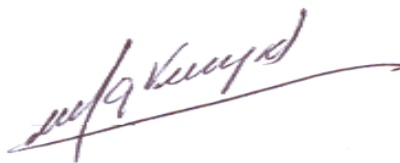
Laboratorio 111, Depto. de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA



Bernardo Lucas Florentino

SUPERVISOR TÉCNICO



Leticia Gil Vieyra

SUSTENTANTE



Lorena del Carmen Lomelí Ramírez

Quiero expresar mi más profundo y sincero agradecimiento

A mi Universidad

Que me ha dado la oportunidad
de crecer como ser humano y profesional.

Al M. en C. Bernardo Lucas Florentino

Por su valiosa dirección, confianza y apoyo.

A la Q.F.B. Leticia Gil Vieyra

Por su entrega, amistad y valiosa aportación
en la realización de este trabajo.

A la M. en C. Lucia Cornejo Barrera

Por sus sugerencias y observaciones
para mejorar este trabajo.

A la profesora Rosa María Argote Espinosa

Por su buen humor, atenciones
y apoyo brindado.

A todos mis maestros

Porque han dejado una profunda huella en mi,
contribuyendo en mi formación académica y personal.

Al laboratorio 111

Especialmente a Aneli, Gretel, Carlos, Yesenia, Paulina
y a la señora Viky por su compañerismo, buena vibra,
buena disposición, apoyo, amistad y sus buenas pláticas.

**“La vida no se mide por la cantidad de respiros que se dan
sino por los momentos que te quitan el aliento”**

DEDICATORIAS

A DIOS

Agradezco por la maravilla de existir,
por la familia tan hermosa que me regalo y por
haberme dado la dicha de concluir esta etapa de mi vida.

A MI FAMILIA

A mis papas

Por todo el amor, apoyo y confianza
incondicional que me han dado. Gracias a ustedes
he llegado a ser quien soy. Los admiro, los respeto y los amo mucho.

A mis hermanas

Por su amistad, paciencia, complicidad, apoyo
y cariño. Estoy orgullosa de ustedes, las amo mucho.

A mis abues Carmelita, Yola y Rafa

Por transmitirme su sabiduría de la vida y por
los gratos momentos que me han dado, las quiero mucho.

A la familia Perusquía Cabañas

Por su apoyo, comprensión y cariño, especialmente a
Jas por ser para mí un ejemplo de fortaleza y lealtad.

A la familia Lomelí Iturbe

Por los bellos y divertidos momentos que me han regalado,
así como a la familia que vive en Puerto Escondido por su apoyo
en este proyecto, en especial a tío Miguel y tía Mary de quien surgió
la idea y a tío Gustavo por su gran apoyo en la recolección, los quiero

A la familia Cabañas

Por tantos momentos de diversión,
por esa gran picardía que los caracteriza,
pero sobre todo por esa unión tan linda que tienen,
los quiero.

A MIS AMIGOS

A Roma y Yess

Por su amistad incondicional, apoyo, cariño,
los muy divertidos momentos y por siempre
impulsarme a seguir adelante, las adoro mis nenas.

A Daniel

Por su maravillosa amistad, por apoyarme, escucharme
y estar siempre ahí cuando lo necesito, te quiero mucho.

A Pablo

Por ser la persona con la que mas tiempo pase durante la carrera, por
su apoyo y por hacer de nuestra facultad un lugar muy divertido.

A David

Por su tan particular manera de ser, por su apoyo, cariño, confianza y
buen humor que llenaron de alegría muchos momentos
durante mi estancia en la facultad, te quiero mucho.

A Olga y Jaime

Por brindarme su amistad, confianza y compañerismo,
así mismo compartir conmigo gratos momentos.

A Luis

Por su amor, apoyo, confianza, comprensión y sobre todo por
haberme alentando tantas veces para llegar hasta aquí, te amo.

A las Citlalminas

Villa, Mariana, Paty y Mafer por haber crecido conmigo, por su
amistad, apoyo, comprensión y por haber vivido tantas
emocionantes experiencias juntas, las adoro.

A Talina, Bere y Lupe

por ser mis grandes amigas, mis cómplices de muchas aventuras, por
ayudarme a crecer como ser humano y sobre todo
porque han estado conmigo siempre, las adoro.

INDÍCE

	página
Resumen	4
1. Introducción	6
2. Objetivos	8
2.1 Objetivo general	8
2.2 Objetivos específicos	8
3. Antecedentes	10
3.1 Moringa oleífera	10
3.1.1 Características Físicas y su composición	11
3.1.2 Comparación del Análisis de las	
Hojas de Moringa con otras pasturas	13
3.1.3 Plantación	16
3.1.4 Aceite de almendra	17
3.1.5 Otras aplicaciones del Árbol de	
Moringa oleífera	17
3.1.6 Propiedades medicinales	18
3.2 Composición química de los alimentos	
y su importancia	19
3.2.1 Agua	19
3.2.2 Hidratos de carbono	20
3.2.3 Fibra	20
3.2.4 Grasa	21
3.2.5 Proteínas	22

3.3 Factores tóxicos y antinutricionales	22
3.3.1 Taninos	23
3.3.2 Inhibidores de tripsina	24
3.3.3 Hemaglutininas	25
3.3.4 Ácido fítico	26
3.3.5 Glucósidos cianogénicos.	27
3.3.6 Saponinas	28
3.3.7 Nitratos	29
3.4 Ensayos biológicos	31
3.4.1 Determinación de la Relación de Eficiencia Proteínica (REP)	32
3.4.2 Digestibilidad proteínica <i>in vivo</i>	34
4. Metodología	37
4.1 Información de la muestra biológica	37
4.2 Conservación de la muestra	37
4.3 Descripción de la metodología	40
Análisis Proximal	
4.3.1 Determinación de humedad analítica	40
4.3.2 Determinación de cenizas	42
4.3.3 Determinación de grasa	44
4.3.4 Determinación de fibra cruda	46
4.3.5 Determinación de proteína cruda	49

Identificación y cuantificación de factores tóxicos y antinutricionales	
4.3.6 Taninos	53
4.3.7 Inhibidores de tripsina	57
4.3.8 Hemaglutininas	61
4.3.9 Ácido fítico	66
4.3.10 Glucósidos cianogénicos.	71
4.3.11 Saponinas	76
4.3.12 Nitratos	83
4.3.13 Determinación del perfil de aminoácidos por HPLC	87
4.3.14 Determinación de triptofano por hidrólisis alcalina	102
4.3.15 Determinación de la Relación de Eficiencia Proteínica (REP)	108
4.3.16 Determinación de la Digestibilidad de una proteína mediante un método <i>in vivo</i>	117
5. Resultados y Discusión	120
6. Conclusiones	139
7. Bibliografía	141
8. Anexos	148

RESUMEN

La presente investigación evaluó el contenido nutricional de la flor de Moringa (***Moringa oleífera***), ya que se utiliza como parte de la dieta en diversas comunidades como lo es Santa María Colotepec, Oaxaca; las flores tienen diferentes preparaciones como ensaladas, sopas, quesadillas, entre muchas otras. Sin embargo no existía información sobre la composición química de las flores de este árbol, las cuales son una de las partes de mayor consumo. Las flores se recolectaron en el municipio de Santa María Colotepec, Oaxaca, se mantuvieron en refrigeración para conservar su frescura durante su traslado, y posteriormente fueron sometidas a un proceso de secado, seguido de una molienda para obtener una harina y así asegurar la homogeneidad de la muestra. Se determinó su composición bromatológica por medio de un análisis proximal. Dentro de la composición reportada para otras flores comestibles como: colorín, yuca, calabaza, pacaya y maguey, se encontró que la cantidad de proteína en la flor de ***M. oleífera*** se situaba dentro de un rango intermedio con 18.2%. Se realizó la composición de aminoácidos para determinar la calidad de dicha proteína, resultando ser deficiente en los aminoácidos azufrados. Así mismo se analizaron los factores tóxicos y antinutricionales que con mayor frecuencia se presentan en los vegetales, como resultado de la toxicología analítica no se presentaron niveles significativos de los tóxicos estudiados, de

acuerdo a la cantidad de proteína y su composición de aminoácidos, se llevo a cabo la evaluación biológica de este macronutriente por medio de una prueba de Relación de Eficiencia Proteica (PER) así mismo se evaluó la Digestibilidad de la proteína ***in vivo***, las cuales arrojaron resultados de -2.06 y 64.27 respectivamente, mismos que indicaron que la calidad de la proteína fue mala.

1. INTRODUCCIÓN

En México, así como en otros países, el hambre y la desnutrición son un problema ancestral, el cual se presenta en un alto porcentaje de desnutrición a un nivel proteínico y energético, particularmente en la población ubicada en las zonas rurales marginadas. Una solución a corto plazo es aumentar la producción de alimentos de origen vegetal y la búsqueda de nuevas alternativas de recursos naturales que tengan una buena calidad nutritiva así como la difusión de las ventajas en el consumo de los mismos.

La aplicación culinaria de las flores, no solo es una antigua costumbre mexicana, sino también de muchas otras culturas del mundo. Por ejemplo en China el uso de crisantemos en sopas y dalias usadas generalmente secas. En Roma se utilizan flores cultivadas como son rosas y violetas. La cocina árabe utiliza la alcaparra, los pétalos de rosas, la flor de azahar. En México se utilizan las nochebuenas, flor de calabaza y cempaxuchitl se usan en sopas y ensaladas, así como las bugambilias y otras muchas flores se aplican en una variedad de platillos y postres. ⁽¹⁾

Muchas de las flores comestibles son de plantas silvestres que se colectan y consumen en temporada de floración únicamente o incluso gran parte del año. Estas flores se consumen en diferentes

localidades con diversos usos dentro de los cuales esta como ingrediente en la dieta.

Tal es el caso de la ***Moringa Oleífera*** que es un árbol que crece en climas calidos y húmedos principalmente, sin embargo es muy bondadoso en su crecimiento relativamente rápido.

La importancia de esta investigación radica en que la ***Moringa oleífera*** (flores, hojas y vainas) es consumida como un ingrediente importante en la dieta de ciertas poblaciones ubicadas en la Sierra de Oaxaca principalmente, debido a que cuentan con bajos recursos para tener acceso a alimentos de alto valor nutritivo. Se ha informado en artículos científicos que esta planta tiene una composición química muy interesante, pero cabe mencionar que estos se enfocan generalmente a las semillas y hojas de la planta, y respecto a la flor hay muy poca información. Por lo tanto se propone realizar un análisis más detallado sobre la flor, ya que es fuente de alimentación en diversas preparaciones culinarias.

Así mismo es necesario realizar la determinación de tóxicos naturales y factores antinutricionales con el objetivo de determinar la seguridad alimenticia de este recurso vegetal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar la calidad nutrimental, composición bromatológica, factores tóxicos y antinutrimientales naturales en la flor de ***Moringa oleífera***.

2.2 Objetivos específicos

- × Conocer la composición bromatológica de las flores de ***Moringa oleífera*** por medio de un análisis proximal, el cual incluye la determinación de Humedad, Cenizas, Proteína, Grasa cruda, Fibra cruda e Hidratos de Carbono asimilables por diferencia.
- × Determinar la presencia de tóxicos naturales así como factores antinutricionales que con mayor frecuencia se presentan en los recursos vegetales.
- × Ampliar la información sobre las flores de árbol de ***Moringa oleífera***, ya que diferentes partes del árbol tienen un alto potencial alimenticio y medicinal como son las hojas y la semilla, pero no existe información de la flor.
- × Determinar de la composición de aminoácidos de la fracción proteínica y calcular su calificación química (CQ).

- × Realizar un ensayo biológico para evaluar la calidad de la proteína de la flor por medio de la Determinación de la Relación de la Eficiencia Proteínica (REP).
- × Determinar la Digestibilidad de la proteína de ***M. oleífera*** mediante un método ***in vivo***.

3. ANTECEDENTES

En México existen costumbres que datan de hace muchos años y que en la actualidad continúan arraigadas a través del tiempo. Como por ejemplo los indígenas comían principalmente la flor de calabaza o *ayoxóchitl*, la flor de *izote* o yuca, la flor de maguey llamada gualungo, la flor de biznaga que al fructificar se llama *borrachita*, la flor de nopal *nopalxochitl* o *pocha*, la flor del tule o espadaña, flor del frijol o la del colorín o *pichoco*.

La llegada de los europeos influyó en el uso de otros géneros de flores como las rosas, bugambilias, el crisantemo, el azahar, entre otras más. ⁽²⁾

3.1 MORINGA OLEÍFERA

Desde a mediados del siglo XX, este árbol comenzó a despertar el interés en México. También llamada Perla, Paraíso Blaneo, Árbol del las Perlas, Árbol de los Espárragos y Chinto Borrego (en Oaxaca). Pero su nombre botánico es ***Moringa oleífera*** de la familia de las moringáceas. Es originario de Asia y del Norte de África que se cultiva en países tropicales. En México, a mediados del siglo XX, era relativamente escaso y poco conocido. ⁽³⁾

3.1.1 Características físicas y composición

El árbol de ***Moringa oleífera*** alcanza 5-10m de altura, con un tronco de 25-30cm de diámetro, corteza blanquizca y raíces ligeras y gruesas; hojas alternas, pequeñas, doble o triple pinadas. Las flores se producen en panículas y son aromáticas; tienen 5 pétalos blancos o blanco amarillentos y 5 estambres. El fruto es alargado y triangular, de 20-30cm, con tres valvas esponjosas por dentro y contienen de 13 a 18 semillas subglobosas, de color moreno, de un centímetro de diámetro, provistas de tres alas blancas. La madera es suave y ligera.

Las vainas tiernas son comestibles y se usan en sopa o se preparan a manera de espárragos. Las raíces tienen sabor picante como el rábano rústico y se usan como condimento en lugar de este, las semillas maduras se tuestan y consumen como nueces, siendo su sabor dulce ligeramente amargo y agradable. Las hojas se comen como verdura y también pueden servir como forraje. Fueron analizadas en 1939 en el Instituto Biotécnico con el que se obtuvo los resultados expuestos en la tabla 1, que se presenta a continuación:

Tabla 1. Composición de hojas de *Moringa oleífera* analizadas en 1939.⁽³⁾

Humedad	8.36%
Cenizas	12.50%
Nitrógeno total (N)	3.30%
Proteínas	20.63%
Fibra cruda	3.86%
Extracto etéreo	9.00%
Extracto no nitrogenado	45.65%

En la figura 1 se podrá ver una imagen de la flor de ***M. oleífera***, así mismo de sus hojas y vaina.



Figura 1. Imágenes de *M. oleífera*.

Existe en la literatura un estudio por medio de cromatografía de líquidos para determinar el contenido de α y γ -tocoferol en muestras de hojas, flores y frijoles frescos de la especie de ***Moringa oleífera***

como parte de los estudios nutricionales en plantas comestibles cultivadas en el Noroeste de México. ⁽⁴⁾

El α , γ y δ -tocoferol fueron detectados arriba de niveles de 15.38, 25.40 y 15.51 mg/kg de aceite, respectivamente. ⁽⁸⁾

3.1.2 Comparación del Análisis de las Hojas de Moringa con otras pasturas

Se realizó una comparación del análisis de hojas de este árbol con el de las hojas de otros productos como son Garbanzo, Soya, Trigo y Avena. Encontrando que la Moringa es superior en su contenido de cenizas, % de proteína total, extracto nitrógeno y grasa.

Tabla 2. Comparación de hojas de Moringa con otras pasturas.

Forraje	Cenizas (%)	Proteína	Fibra	Extracto	Grasas
		total (%)		Nitrógeno	
Moringa	12.50	20.63	3.68	45.65	9.00
Garbanzo	6.5	22.05	40.0	25.04	2.4
Soya	7.5	8.5	34.6	41.1	2.8
Trigo	4.2	3.8	38.1	43.4	1.3
Avena	5.1	5.2	37.0	42.4	2.3

Se puede ver en la tabla 2 que la proporción de ceniza es superior a la que existe en la paja de garbanzo, soya, trigo y avena. En proteína total, la moringa llega muy cerca de la del garbanzo y es muy superior a las pajas de trigo, soya y avena. Como el análisis fue hecho en hojas, el porcentaje de fibra cruda resultó menor, pero el árbol de Moringa tiene muchas partes leñosas y fibrosas. Y el ganado no solamente come las hojas sino también la materia fibrosa de las ramas tiernas. En grasa es muy superior la paja de **Moringa oleífera** a la de avena, soya, garbanzo y trigo. Además, la moringa tiene más grasa que el forraje de alfalfa, chícharo de vaca y chícharo de árbol.

(3)

Las semillas de **Moringa oleífera**, pertenecientes a la familia de Moringaceae, fueron analizadas para determinar el contenido nutrimental y antinutrimental, así como las propiedades de los aceites extraídos también.

Las concentraciones de elementos esenciales encontradas (en mg/g) fueron de potasio (77.4) , calcio (20.50), magnesio (1.19), sodio (3.0), azufre (3.75), fósforo (1.37) y Hierro (1.4).

La semillas de **Moringa oleífera** tienen un contenido mayor de proteínas y lípidos (40.19 y 41.58% respectivamente) que **Detarium microcarpum** (el cual contiene 11.24 y 35.94% de proteína y lípidos respectivamente).

En cuanto a carbohidratos se determino que la ***M. oleífera*** tiene 9.11% mientras que ***D. microcarpum*** presento 42.20%. Cabe señalar que la comparación anterior se realizó debido al contenido alto de lípidos en ambas especies.

También se determinó que la ***Moringa oleífera*** tiene mayor concentración de fitatos (10.18 mg/100 g), ácido cianhidrico (0.58 mg/100 g) y saponinas (2.52%) que ***D. microcarpum***. Los valores de yodo en los aceites para ***M. oleífera*** y ***D. microcarpum*** fueron de 59.48 y 58.02% respectivamente, en la saponificación los valores están dentro de un rango de 179-220.66. En cuanto al valor de ácidos grasos libres y peróxidos fueron bajos. ⁽⁵⁾

Por su alto contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos contenidos en las dos semillas mencionadas anteriormente, estas podrían servir como suplemento de origen de nutrimentos esenciales para consumo humano y animal; ya que los factores antinutricionales en estas semillas son considerablemente reducidos o eliminados. ⁽⁵⁾

En un estudio más reciente, encontrando concordancia, se determinó que las hojas de ***M. oleífera*** contienen 43.7% de proteína cruda. El contenido de proteína verdadera de esas hojas fue de 93.8% del total de proteína cruda. Así mismo se encontraron cantidades insignificantes de taninos en estas hojas; en cuanto a saponinas 5%

similar al detectado en harina de fríjol de soya; inhibidores de tripsina y lectinas no fueron identificados; el contenido de fitatos fue de 3.1%.

En cuanto a la composición de aminoácidos de la hojas de ***M. oleífera*** se determinó que todos los aminoácidos esenciales que contienen azufre se encuentran en una concentración mayor que la adecuada al compararla con los estándares de FAO/WHO/UNO referida a la proteína de 2 a 5 años. ⁽⁶⁾

3.1.3 Plantación

El Ferrocarril del Sud Pacífico por conducto de su Departamento Industrial y Agrícola hizo algunos trabajos de introducción y aclimatación en Sinaloa y Sonora. La Moringa se adapta a diversos terrenos, pero prefiere los suaves. Se colocan las semillas en Almácigas, transplantando cuando las plantas tienen de 30 a 50 cm o bien se plantan en un lugar definitivo a 5 m de distancia. Es de rápido crecimiento y resistente a las sequías. Comienza a producir a los 3 años, dando de 800-1600 vainas por árbol. ⁽³⁾

3.1.4 Aceite de la Almendra

El aceite de la almendra, llamado aceite del ben, es transparente y de sabor ligeramente dulce. Existe en una proporción de 30-35% y su densidad es de 0.912. Si se extrae en frío produce un 30% y resulta de mejor calidad y es propio para perfumería, siendo muy estimado como fijador. Extraído en caliente la proporción es mayor, pero de menor calidad, y se destina para lubricación de maquinaria fina y para otros usos industriales. No se enrancia fácilmente.

Además la Moringa produce una goma que puede utilizarse. Por ejemplo se extraen taninos de la goma y la corteza los cuales son útiles en la Industria de Curtido de Pieles. ⁽³⁾

El aceite extraído de semillas de ***M. oleífera*** fue refinado y analizado. Encontrando que el ácido graso mayoritario en el aceite es ácido oleico (76.8%) del total de los ácidos grasos en el aceite. Seguido por el palmítico (12%), esteárico (4%) y trazas de linoleico, linolenico y ácido araquidonico. ⁽⁷⁾

3.1.5 Otras aplicaciones del Árbol de Moringa oleífera

Para el caso de las semillas y hojas se ha corroborado su alto valor nutritivo y algunas propiedades terapéuticas, mientras que para las flores hay muy poca investigación y solo se han realizado algunos

estudios donde se demuestra tanto **in vivo** como **in vitro** su propiedad de disminuir el estrés oxidativo, ya que incrementa los factores antioxidantes y a la vez disminuye las sustancias reactivas de oxígeno (**ROS**). ^(9,10)

La **Moringa oleífera** esta relacionada con propiedades rejuvenecedoras y se justifican con el contenido de elementos traza de la misma. ⁽¹¹⁾

En los campos de Sudan, el poder de las semillas de **Moringa oleífera** fue utilizado para purificar el agua potable mediante floculación. ⁽¹²⁾

3.1.6 Propiedades medicinales

La **Moringa oleífera** es una planta muy valiosa, distribuida en muchos países del trópico y subtrópico, tiene propiedades impresionantes medicinales y uso de alto valor nutricional.

La **Moringa oleífera** es muy importante por su valor medicinal. Varias partes de la planta como sus hojas, semillas, corteza, flores, raíz y tallo se les relaciona con propiedades como: estimulante circulatorio, antiinflamatoria, antiepiléptica, hipocolesterolémica,

antitumoral, antiulceras, antiespasmódico, diurético, antioxidante, antidiabético, antibacterial y antifungal, entre otras. ⁽¹³⁾

3.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ALIMENTOS Y SU IMPORTANCIA

Los animales requieren de la ingesta permanente de alimentos para el funcionamiento de los procesos vitales.

El agua es el componente mayoritario en el organismo animal. La mayor parte de la materia seca de plantas y animales esta formada por tres grandes grupos: la materia orgánica (proteínas, grasa e hidratos de carbono), así como de materia inorgánica (minerales) y componentes presentes en cantidades reducidas como vitaminas, ácidos nucleicos y otros compuestos. ⁽¹⁴⁾

3.2.1 Agua

La mayoría de las funciones biológicas del agua están relacionadas con su propiedad de actuar como disolvente de numerosos compuestos. Participa en la digestión (hidrólisis de proteínas, grasa e hidratos de carbono), la absorción de nutrimentos digeridos, el transporte de metabolitos en el organismo y la excreción de los

productos de desecho así como medio donde se llevan a cabo las reacciones metabólicas de un organismo.

Un contenido de humedad mayor al 15% en los alimentos secos no es admisible, ya que se supone una disminución del valor nutritivo y la predisposición de los mismos para el desarrollo de hongos. ⁽¹⁵⁾

3.2.2 Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono constituyen una de las tres principales partes de nutrimentos y suele proporcionar la mayor parte de la energía en las dietas ⁽¹⁶⁾. Se hallan en los alimentos como azúcares y almidones, mismos que representan una de las principales fuentes de energía de la dieta, como celulosa, que representa una de los componentes más importantes de la fibra dietética. ⁽¹⁷⁾

En términos químicos, los hidratos de carbono están compuestos por carbono, hidrogeno y oxigeno, con dos átomos de hidrogeno por cada uno de oxigeno. El grupo corresponde a los azúcares (mono, di y trisacáridos), así como almidones y celulosa que son polisacáridos.

3.2.3 Fibra

La fibra es un residuo orgánico insoluble constituido principalmente por celulosa, pectina, lignina, hemicelulosa, gomas y mucilagos.

La celulosa es el hidrato de carbono más abundante en la naturaleza y es uno de los componentes estructurales de las células vegetales, representando un 20-40% de la materia seca de las plantas verdes. La unión de las moléculas de glucosa, mediante un enlace β -glucósido hace a la celulosa esencialmente insoluble y resistente a la degradación por enzimas digestivas. ⁽¹⁸⁾

3.2.4 Grasas

Las grasas son un importante combustible contenido en los alimentos debido al alto aporte calórico que suministran y representan una reserva importante de energía. Considerados químicamente como ésteres de ácidos grasos y glicerol. Entre las funciones más importantes de las grasas son el mantenimiento de la temperatura corporal, reserva energética y vehículo de vitaminas liposolubles.

Los ácidos grasos pueden ser sintetizados en el organismo mediante vías metabólicas específicas, sin embargo existen ácidos grasos de importancia nutricional, ya que son indispensables, es decir necesaria su ingesta, ya que el organismo no los produce; tal es el caso de ácido linoleico, linolénico y araquidónico, los cuales son necesarios para realizar funciones importantes en los organismos. ⁽¹⁸⁾

3.2.5 Proteínas

Las proteínas son el componente fundamental de los tejidos animales, siendo necesario un aporte continuo a lo largo de la vida. Se consideran moléculas complejas compuestas por aminoácidos unidos a través de un enlace peptídico, que contiene un grupo carboxílico y un grupo amino en posición α y un grupo R que varía en los distintos aminoácidos. Con excepción de la glicina que dos de sus sustituyentes son hidrógeno.

Existen aminoácidos que el organismo no puede sintetizar (indispensables), este hecho determina pues, la calidad de una proteína, la cual a su vez determina la calidad de una proteína alimenticia para el crecimiento y mantenimiento de los tejidos. Se consideran aminoácidos indispensables: leucina, isoleucina, lisina, metionina, valina, treonina, triptófano, fenilalanina e histidina. ⁽¹⁸⁾

3.3 FACTORES TÓXICOS Y ANTINUTRICIONALES

Es importante determinar la presencia de sustancias tóxicas en las plantas y sobre todo en muchas de las variedades que constituyen una parte importante en la dieta de grandes grupos de la población o que se utilizan en la alimentación animal. Sus efectos tóxicos se pueden producir a diferentes niveles, algunas sustancias actúan como

factores antinutricionales y otros alteran funciones fisiológicas vitales de los organismos que los ingieren.

En las plantas se han encontrado diversos compuestos con actividad tóxica los cuales limitan su uso; sin embargo, es posible su inactivación o disminución y así reducirse a límites seguros mediante una preparación y cocción adecuada. ⁽¹⁹⁾

3.3.1 Taninos

Los taninos son compuestos polifenólicos solubles en agua con un peso molecular en un rango de 500-3000Da, están distribuidos en alimentos de origen vegetal. Se clasifican en condensados o hidrolizables, en base a su tipo estructural y su reactividad contra agentes hidrolíticos, particularmente ácidos. Ellos pueden formar complejos solubles e insolubles con proteínas, los cuales pueden ser responsables del efecto antinutricional.

Se consideran indeseables pues la oxidación de los grupos fenólicos de los taninos a quinonas puede formar enlaces covalentes entre los grupos ϵ -amino de los restos de arginina y lisina en las cadenas peptídicas lo que produce la precipitación de las proteínas y en consecuencia una reducción del valor nutricional del alimento. La unión de los taninos a las enzimas digestivas impide su acción; el enlace con las proteínas del alimento dificulta su digestión y su

contacto con la mucosa intestinal disminuye la absorción de los alimentos. ⁽¹⁸⁾

3.3.2 Inhibidores de tripsina

Los inhibidores de tripsina son sustancias que tienen la capacidad de inhibir la actividad proteolítica de ciertas enzimas. Estos son, probablemente, los más distribuidos en el reino vegetal y particularmente en las leguminosas. Actúan inhibiendo la tripsina, la cual es una enzima proteolítica que se libera del páncreas al intestino del hombre y animales.

La estructura y propiedades de estos factores varían ampliamente, presentan resistencia a la proteólisis y frecuentemente son resistentes a factores ambientales como el calor.

En cuanto al mecanismo de inhibición existen varias corrientes entre los investigadores.

- Los inhibidores de enzimas proteolíticas forman fuertes complejos con las enzimas que ellos inhiben.
- La enzima e inhibidor experimentan algún tipo de intersección enzima-sustrato.

- Los inhibidores son resistentes a la proteólisis, aunque en la interacción puede ocurrir la ruptura de algunos enlaces peptídicos.

La mayoría de inhibidores de tripsina en las leguminosas pueden ser destruidos mediante el tratamiento térmico con lo que se logra mejorar el valor nutritivo de la proteína.

3.3.3 Hemagglutininas

También conocidas como lectinas, son un grupo de proteínas o glicoproteínas, algunas de ellas son enterotóxicas, se encuentran presentes comúnmente en las leguminosas comestibles, que suelen presentar la propiedad de aglutinar los glóbulos rojos sanguíneos. Todas la lectinas tóxicas producen síntomas parecidos, entre los que resalta la intensa inflamación de la mucosa intestinal, con la posterior destrucción de los epitelios, edema y de la hemorragia del tejido linfático. Las lectinas se unen a las microvellosidades de los enterocitos del yeyuno y obstaculizan su función. Hay entonces destrucción de las células de la mucosa, disminución de la actividad enzimática, aumenta la descamación de las células de la mucosa y las vellosidades disminuyen de tamaño, con lo que se disminuye la superficie de absorción.

La presencia de hidratos de carbono en la molécula de las lectinas, les da especificidad hacia las células lo que repercute de manera importante en su acción, pues de no ser específicas no pueden unirse ni causar daño, además para que el efecto vía oral de las lectinas surta efecto, estas deben soportar las condiciones del tracto digestivo.

Estas suelen destruirse por métodos de calentamiento como el secado y la cocción. ⁽¹⁸⁾

3.3.4 Ácido fítico

Se encuentran en concentraciones elevadas en diversos alimentos como ácido inositol hexafosfórico, es una estructura altamente reactiva, debido a que la molécula posee varios grupos fosfatos reactivos, capaces de formar complejos con cationes. Su acción principal es la disminución o biodisponibilidad de minerales divalentes como Ca, Co, Cu, Mg, Mo, Mn, Fe, y Zn con los que forman sales insolubles. Además forma compuestos insolubles fitato-mineral-proteína provocando la disminución de la solubilidad y digestibilidad de las proteínas en el organismo así como la inhibición de enzimas digestivas, bajo condiciones fisiológicas, como la pepsina, tripsina y α -amilasa. ⁽¹⁸⁾

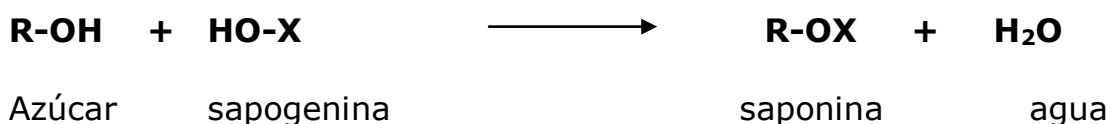
3.3.5 Glucósidos cianogénicos

Los glucósidos cianogénicos son compuestos con una parte polar (azúcar) y el aglucón que es el que tiene el efecto tóxico, el azúcar no causa daño, sino el aglucón pues produce la liberación de ácido cianhídrico. La ingestión de glucósido no es venenosa, ya que en el tracto digestivo no existe ninguna enzima como la β -glucosidasa que lo libere, pero algunas bacterias intestinales pueden descomponer el glucósido dejando en libertad el ácido cianhídrico. En las plantas que contienen estos glucósidos, la β -glucosidasa es extracelular y solamente por destrucción física o química de la pared celular puede llegar a ponerse en contacto con el compuesto; es decir esta enzima se encuentra en el interior de la semilla y se requiere de una maceración, por ejemplo, para su liberación. Además del peligro del envenenamiento agudo hay que considerar el del envenenamiento crónico. ⁽¹⁸⁾

La dosis letal de HCN para un individuo, cuando se ingiere por vía oral se ha estimado entre 0.5-3.5 mg/kg de peso. Con estas dosis se describen síntomas iniciales como adormecimiento periférico y ligeros mareos, seguidos por confusión mental, temblores, convulsiones, coma y finalmente la muerte. En caso de que la dosis no sea fatal pueden presentarse dolor de cabeza, sensación de opresión en garganta, palpitaciones y debilidad muscular. ⁽¹⁹⁾

3.3.6 Saponinas

Las saponinas son glucósidos anfifílicos, en los cuales la parte polar la constituyen los azúcares (pentosas, hexosas o ácidos urónicos) que se encuentran enlazados a un grupo no polar llamado aglicona o sapogenina, el cual puede ser de naturaleza esteroidea o triterpenoide, aunque la mayoría de las saponinas que han sido identificadas son triterpenoides.



Las saponinas se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal en hojas, raíces, tallos y flores.

Las saponinas son sustancias en su mayor parte amorfas, de sabor amargo en general inodoras, de difícil cristalización; sus soluciones coloidales al producir espuma, reducen fuertemente la tensión superficial por lo que pueden estabilizar las emulsiones grasa-aceite, irritan los ojos y la piel cuando se frota, son termoresistentes, forman complejos con colesterol, son medianamente solubles en agua y muy solubles en alcohol.

Algunas saponinas inhiben el crecimiento de ciertos microorganismos y hongos, ya que actúan precipitando esteroides en la pared celular.

En cuanto al contenido de saponinas para el hombre en ciertos productos alimenticios, el estratus de Merk Index (1976) indica que algunas especies de saponinas prácticamente no son tóxicas por ingestión oral. Sin embargo este hecho aun esta en discusión y se sabe que de producir intoxicación estarían presentes los siguientes síntomas: crean lesiones gastrointestinales y si pasan a la corriente sanguínea pueden hemolizar la células de los glóbulos rojos, pueden producir fallas en la respiración, convulsiones y coma.

La toxicidad de las saponinas esta a discusión como se menciona anteriormente, ya que en algunos países se limita su uso, mientras que en otros se utilizan como aditivos. ⁽²⁰⁾

3.3.7 Nitratos

El ión nitrato es una molécula plana y simétrica formada por un átomo de nitrógeno y tres de oxígeno, con carga negativa y fórmula NO_3^- . Los nitratos se encuentran presentes en los alimentos de origen vegetal como componentes inherentes a las plantas, en el aire que respiramos y como contaminante de agua potable debido al uso de fertilizantes nitrogenados.

Solo en dos condiciones se puede tener una toxicidad por nitratos: en primer lugar por una ingestión masiva de estos compuestos y en segundo lugar si los mismos se transforman en nitritos por la microflora digestiva.

Durante muchos años se ha sabido que los nitratos tienen la capacidad de formar compuestos cancerígenos. Los nitratos por si solos no son cancerígenos, pero actúan como pro-cancerígenos, lo cual quiere decir que reaccionan con otras sustancias para formar compuestos que sí lo son, a través de un proceso de numerosas etapas: primero el nitrato es reducido a nitrito después de la ingestión; en segundo lugar el nitrito reacciona con compuestos orgánicos conocidos como aminas secundarias o amidas, presentes en los alimentos, para formar nuevas entidades químicas conocidas como compuestos de N-nitroso, muchos de los cuales son cancerígenos. Algunas verduras tienen simultáneamente cantidades elevadas de aminas secundarias y nitratos como por ejemplo las espinacas, los rábanos y la lechuga, lo que favorece la aparición de nitrosaminas.

Se ha demostrado que el lavado y cocción de vegetales reduce la concentración de nitratos desde un 2% hasta un 50%, encontrándose en el agua de cocción una cantidad considerable de estos compuestos.

Las sales de nitrato y nitrito se emplean como aditivos en carnes y productos cárnicos, ya que desarrolla un color rosado característico de dichos productos cuando forman la nitromioglobina, y porque actúan como inhibidores del crecimiento de ***Clostridium botulinum***, microorganismo anaerobio altamente peligrosos por las toxinas que sintetiza (produce Botulismo, enfermedad que afecta el funcionamiento de los músculos respiratorios). ⁽³¹⁾

3.4 ENSAYOS BIOLÓGICOS

Existen dos grandes categorías de ensayos biológicos para evaluar la calidad de una proteína, aquellas que se basan en el incremento de peso de los animales y las que se basan en el balance de nitrógeno (nitrógeno absorbido o retenido).

Fue hasta el siglo XX en que se mostró interés en averiguar la influencia de la composición de los aminoácidos de una proteína y por los estudios hechos en ese tiempo se llegó a conocer que el factor determinante del valor nutritivo de una proteína lo constituye la composición y proporción de los aminoácidos indispensables contenidos en ella. En estudios realizados por Rosse y colaboradores que llegaron a establecer las necesidades de proteínas por el hombre y los requerimientos de aminoácidos en hombres y mujeres jóvenes, calculando la cantidad y proporción de aminoácidos indispensables

necesitados a una determinada edad para el mantenimiento del cuerpo en adultos y niños en crecimiento. El cálculo de proteína y aminoácidos necesarios por el hombre se publican periódicamente por la Organización de Agricultura y Alimentos (FAO por sus siglas en inglés) y la Organización Mundial de la Salud y más recientemente National Research Council (NRC).

Dentro de los ensayos para evaluar la calidad de una proteína se tienen métodos químicos y biológicos, de los cuales los últimos son hasta el momento los más confiables especialmente en el estudio de las funciones de la nutrición. Se han realizado interesantes intentos para reemplazar a los animales utilizados en los ensayos biológicos por microorganismos; sin embargo, para ello es necesario disponer de cepas de microorganismos. Con los mismos requerimientos nutritivos que los del hombre; además, su manejo y cultivo es complicado sobretodo en el manejo de protozoarios.

3.4.1 Determinación de la Relación de Eficiencia Proteínica (REP)

El grado de crecimiento de un animal bajo condiciones bien definidas, provee la información para evaluar la calidad nutritiva de una proteína, ya que si ésta tiene una deficiencia en uno o más aminoácidos indispensables, el crecimiento del animal se verá

reducido al compararse con una proteína patrón utilizada al mismo tiempo que la que está en prueba.

En 1915 Osborne, Mendel, McCollum y Davis introdujeron el concepto de PER que corresponden a la siglas del término en inglés Protein Efficiency Ratio, que se podría traducir como Relación de Eficiencia Proteínica (REP), el cual ha sido varias veces modificado y constituye el procedimiento más utilizado para la evaluación de la calidad nutritiva de una proteína en el área de la ciencia de los alimentos.

Para que este método tenga reproducibilidad es necesario que la dieta de prueba tenga la misma concentración de proteína que la dieta testigo, en que su aporte este ajustado para cubrir las necesidades mínimas del organismo, la eficiencia en su utilización para garantizar que se aprovechará la proteína en su totalidad, confirmándose experimentalmente que un nivel de 10% de proteína es el aconsejable; es decir, que la dieta sea isoproteínica e isoenergética además de llevar los otros micronutrientes requeridos como vitaminas y minerales, de tal manera que la única variable sea la proteína del alimento en estudio.

3.4.2 Digestibilidad proteínica *in vivo*

La digestibilidad es un indicador inicial de la calidad nutritiva de un alimento, aunque no siempre se cumple, y es definida como “la disponibilidad de los aminoácidos constituyentes de la proteína para ser absorbidos por el organismo de prueba”. Cualquier método con el objeto de evaluar la calidad nutritiva de una proteína alimenticia, debe estimar directa o indirectamente la biodisponibilidad de los aminoácidos para la biosíntesis de las proteínas estructurales y de su mantenimiento.

En animales monogástricos, en la digestión de las proteínas los enlaces peptídicos son hidrolizados rápidamente por la acción de enzimas proteolíticas específicas, mismas que son secretadas por el estómago, la mucosa intestinal y el páncreas. De esta manera se liberan aminoácidos y péptidos pequeños los cuales pasan a aminoácidos libres en la mucosa intestinal para posteriormente ser absorbidos en el intestino delgado (principalmente yeyuno e íleon), donde pasa la vena porta para distribuirse a través del sistema cardiovascular a todo el organismo.

Los alimentos proteínicos de origen animal son más digeribles que los de origen vegetal lo cual se puede deber a que los alimentos de origen animal tienen un menor contenido de fibra y como

consecuencia, hay una menor velocidad de tránsito en el tracto intestinal, que provoca una mayor absorción de los nutrientes, a diferencia de los alimentos de origen vegetal, los cuales tienen un contenido de fibra significativa, en especial los alimentos vegetales no procesados. Sin embargo, como puede verse hay algunos alimentos (maíz) que tienen la misma digestibilidad que la carne. Otros factores que pueden contribuir en la digestibilidad de la proteína dietética son los siguientes:

- La fracción proteínica dentro de los alimentos de origen vegetal, puede estar protegida de la acción enzimática por materiales celulares estructurales, como son hemicelulosa, lignina, mucopolisacáridos, etc.
- El procesamiento térmico en ocasiones puede mejorar la digestibilidad, debido a la desnaturalización de las proteínas nativas y hacerlas más susceptibles a la acción de las enzimas digestivas; sin embargo, lo anterior puede revertirse para el caso de un sobre procesamiento, ya que se puede modificar la solubilidad de las proteínas y hacerlas poco digeribles.
- Algunos alimentos naturales en particular los de origen vegetal, pueden contener factores tóxicos y antinutricionales que disminuyen la función de absorción de la mucosa intestinal o bien, disminuyen la biodisponibilidad de los aminoácidos.

La cantidad de proteína de un alimento se puede determinar por métodos químicos con bastante precisión y exactitud, pero al evaluar solo cuantificando químicamente la cantidad de aminoácidos que la componen, se puede sobrestimar la calidad de una proteína. Ya que métodos como es el análisis de la composición de aminoácidos por cromatografía, no consideran la digestibilidad de la proteína. La digestibilidad de una proteína alimenticia se puede determinar por procedimientos tanto ***in vivo*** e ***in vitro***.

Los métodos ***in vitro*** simulan las condiciones y reacciones fisiológicas que se llevan a cabo dentro del organismo; no obstante de ser más prácticas, en muchas ocasiones este tipo de métodos aunque son más precisos y reproducibles, pueden dar resultados inexactos. Por lo tanto, hasta la fecha los ensayos ***in vivo*** para la digestibilidad, son las más confiables.

4. METODOLOGÍA

4.1 Información de la muestra

Procedencia de la muestra: Se cortó y recolectó en Santa María Colotepec, Oaxaca.

Tratamientos después de la recepción: La muestra se transportó con hielo seco durante 12h, posteriormente se mantuvo en refrigeración en bolsas de papel durante 8 horas.

4.2 Conservación de la muestra

Una vez recibida la muestra, se determinó el contenido de humedad total, para referir posteriormente los resultados en la base original.

Secado

15.0 kg de flor de ***Moringa oleífera*** se sometieron a secado por un periodo de 48 horas a $55^{\circ}\text{C} \pm 3$ en una estufa de corriente de aire (Lab-Line Imperial III, Radiant Heat Oven Modelo 293 A). Terminado el tiempo de secado, la muestra fue llevada al molino para su posterior reducción de tamaño.

Operaciones de reducción de tamaño de la muestra (molienda)

La muestra seca empleada para las determinaciones del análisis proximal fue molida en un molino Tomas Wiley Laboratory Hill Mod. 4, pasadas a través de una malla de 1 mm de diámetro.

En la figura 2 se muestra un diagrama de flujo que ilustra de manera general el desarrollo experimental del presente trabajo, que posteriormente se describe en el inciso 4.3.

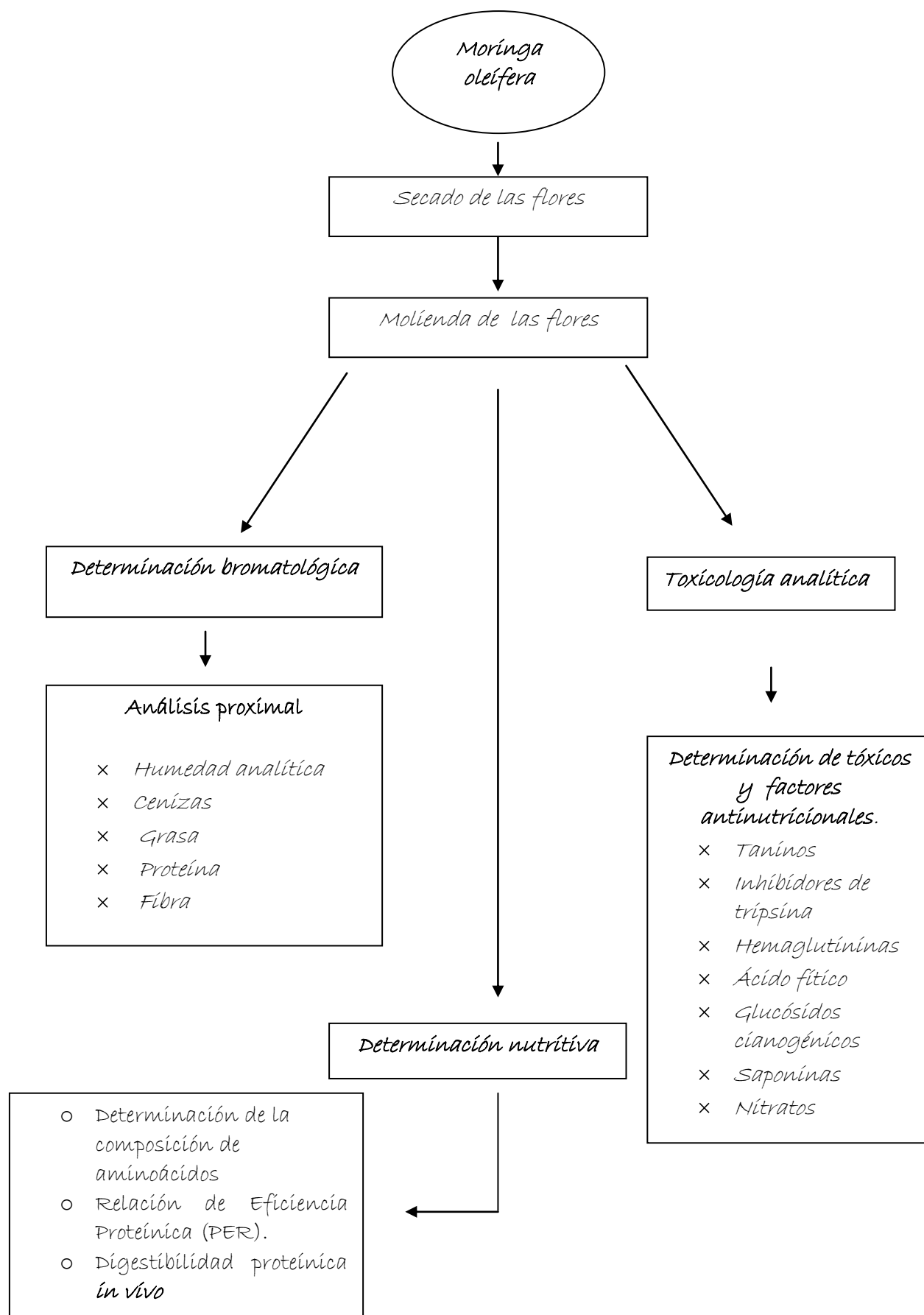


Figura 2. Diagrama general de la investigación.

4.3 Descripción de la metodología

ANÁLISIS PROXIMAL

❖ 4.3.1 Determinación de humedad analítica

Fundamento

Es un método que involucra la determinación de la pérdida de peso debida a la evaporación de agua en el punto de ebullición o temperaturas cercanas a él. La proporción de agua perdida aumenta al elevar la temperatura; por lo tanto, es importante comparar sólo los resultados obtenidos usando las mismas condiciones de secado, más aún, si es factible que ocurra alguna descomposición. A su vez, la pérdida en peso depende de diversos factores como son: el tamaño de la partícula y el peso de la muestra, el tipo de cápsula de porcelana y las variaciones de temperatura entre una y otra charola del horno.

Material

- 3 charolas de aluminio
- Balanza analítica (Sartorius Analytic)
- Estufa de vacío (Lab-Line Duo Vac Oven Mod. 3620)
- Desecador de vidrio

Procedimiento (Técnica descrita por la AOAC -14.004- 1989) ⁽²¹⁾

Las charolas de aluminio se colocan en la estufa de vacío hasta que éstas alcanzan peso constante (aproximadamente 24 horas), el cual fue registrado, se introdujeron en una estufa de vacío la cual mantuvo las siguientes condiciones: que cuente con un dispositivo para hacerle vacío y temperatura de 60-65°C hasta obtenerlas a peso constante.

Durante el tiempo en que las charolas permanecieron en la estufa de vacío, se realizaron pesadas periódicas de las mismas; sacándolas de la estufa y colocando inmediatamente en un desecador donde permanecían aproximadamente 15 minutos; para posteriormente ser pesadas en una balanza analítica.

Esta actividad se realizó hasta que se alcanzó el peso constante y fue registrado.

La determinación se hizo por triplicado

Cálculos

$$\text{Muestra seca} = \text{peso}_{\text{charolas} + \text{residuo seco}} - \text{peso}_{\text{charola}}$$

$$\text{Contenido de humedad} = \text{muestra}_{\text{húmeda}} - \text{muestra}_{\text{seca}}$$

$$\% \text{ de humedad} = (\text{contenido de humedad} / \text{muestra}_{\text{húmeda}}) \times 100$$

❖ **4.3.2 Determinación de cenizas**

Fundamento

La determinación de cenizas se basa en la destrucción de la materia orgánica contenida en una matriz alimentaria, considerándose a las cenizas como el residuo inorgánico que queda después de incinerar dicha materia orgánica en una mufla.⁽²²⁾

Material

- 3 crisoles de porcelana
- Desecador de vidrio
- Mechero Bunsen
- Campana de extracción
- Balanza analítica (Sartorius Analytic)
- Mufla (Heraew Hanau)

Procedimiento (Técnica descrita por la AOAC -7.009- 1989) ⁽²¹⁾

Los tres crisoles se colocaron en la mufla a una temperatura de 500°C, hasta alcanzar peso constante.

En cada crisol a peso constante se colocaron aproximadamente 3 gramos de la harina de ***Moringa oleífera***.

El crisol con la muestra se colocó en la flama de un mechero con el fin de carbonizarla hasta que no se observe desprendimiento de humo. Posteriormente los crisoles se introdujeron en la mufla, la cual mantenía una temperatura entre 500°C y 550°C.

Después de aproximadamente 2 horas los crisoles fueron colocados en un desecador por aproximadamente 15 minutos y fueron pesados en la balanza analítica. Posteriormente se realizaron pesadas periódicas de los crisoles hasta que éstos alcanzaron peso constante, los cuales también se registraron. La determinación se hizo por triplicado.

Cálculos

$$\text{Cantidad de cenizas} = \text{peso}_{\text{crisol} + \text{cenizas}} - \text{peso}_{\text{crisol}}$$

$$\% \text{ de cenizas} = (\text{cantidad de cenizas} / \text{peso}_{\text{muestra}}) \times 100$$

❖ **4.3.3 Determinación de grasa**

Fundamento

Los constituyentes grasos de las materias orgánicas son diversas sustancias lipídicas. El contenido de grasa es aquel que puede ser extraído por los disolventes menos polares como lo son el éter de petróleo y éter etílico. La determinación se basa en la extracción, con una fracción ligera de éter de petróleo o con éter etílico, del material seco y molido en un aparato de extracción continua en el que las gotas condensadas del disolvente caen sobre la muestra contenida en un recipiente poroso o dedal, alrededor del cual pasan los vapores calientes del disolvente.⁽²²⁾

Material y reactivos

- Aparato de extracción Goldfish (Labconco Mod 35001-00CV)
- 3 vasos de borde esmerilado (Labconco 35051)
- 3 porta dedales de vidrio
- 3 anillos metálicos para extracción Goldfish
- 3 tubos recuperadores de disolvente
- 3 cartuchos de celulosa de 22 x 80 mm
- Estufa de vacío (Lab-Line Duo Vac Oven Mod. 3620)
- Balanza analítica (Satorius Analytic)

- Bomba de recirculación (Little Grant pump Mod. 1)
- Éter de petróleo

Procedimiento (Técnica descrita por la AOAC - 7.063 - 1989) ⁽²¹⁾

Se colocaron los vasos esmerilados en la estufa de vacío hasta que éstos alcanzaron peso constante.

En los cartuchos de celulosa se colocaron aproximadamente 2.5 g de la muestra seca y previamente molida, posteriormente los cartuchos se taparon con algodón introduciéndose a los porta dedales de vidrio y se colocaron en el compartimiento de extracción de Goldfish.

En los vasos esmerilados se colocaron aproximadamente 50 mL de éter de petróleo y fueron colocados con ayuda del anillo metálico en el aparato de extracción, el cual a su vez se conectó con una bomba de recirculación de agua helada.

Finalmente se subió la parrilla de calentamiento del equipo y se trabajo con el control de calentamiento en la posición LOW durante un periodo de 8 horas. Al término de éste tiempo se bajaron las parrillas de calentamiento y se sacaron los porta dedales, sustituyéndose por el tubo recuperador de disolvente y se volvió a colocar nuevamente el vaso para iniciar de nuevo el calentamiento, cuando los vasos se encontraron libres de disolvente, fueron retirados del equipo y colocados durante unos minutos en una campana de extracción, para asegurar la completa remoción del disolvente. Los

vasos fueron colocados en la estufa de vacío hasta alcanzar peso constante, el cual se registró. La determinación fue hecha por triplicado.

Cálculos

$$\text{Cantidad de grasa} = \text{peso}_{\text{vaso} + \text{grasa}} - \text{peso}_{\text{vaso}}$$

$$\% \text{ grasa} = (\text{Peso}_{\text{grasa}} / \text{Peso}_{\text{muestra}}) \times 100$$

❖ **4.3.4 Determinación de Fibra cruda**

Fundamento

La fibra cruda es el residuo orgánico insoluble y comestible que queda después de tratar la muestra desengrasada en las condiciones descritas a continuación; hidrólisis ácida con ácido sulfúrico, seguido de una hidrólisis alcalina, lavado con alcohol con una posterior incineración del material insoluble, de tal modo que por diferencia es posible obtener el contenido de hidratos de carbono no degradables. Este tratamiento empírico proporciona la fibra cruda, que consiste principalmente en celulosa y cierta proporción de lignina y hemicelulosa contenidas en la muestra original.⁽²²⁾

Material y reactivos

- 3 vasos de Berzelius de 600 mL (Kimax)
- Estufa de vacío (Lab-Line Duo Vac Oven Mod. 3620)
- Balanza analítica (Satorius analytic)
- Mufla (Heraew Hanau)
- Mechero Bunsen
- Aparato de digestión (Labconco)
- 3 crisoles de porcelana
- 3 matraces de vidrio Kitasato (Kimax)
- Silicato de aluminio
- Embudo buchner tipo california (malla de 200 mesh)
- Solución de H_2SO_4 al 1.25% (m/v)
- Solución de NaOH al 1.25% (m/v)
- Solución antiespumante
- Alcohol etílico

Procedimiento (Técnica descrita por la AOAC - 7.074 - 1989) ⁽²¹⁾

La muestra desengrasada obtenida a partir de la determinación de grasa, se pasó cuantitativamente a los vasos de Berzelius que contenían aproximadamente 0.5 g de silicato de aluminio.

A continuación se le adicionaron 200 mL de H_2SO_4 al 1.25% (m/v), en ebullición, así como unas gotas de antiespumante y perlas de vidrio para controlar la ebullición.

Los vasos se colocaron inmediatamente en el aparato de digestión, el cual estaba previamente calentado, y se dejó digerir por un tiempo de 30 minutos exactos. Al término de éste tiempo se filtro en un embudo tipo california con ayuda de vacío, lavando el residuo con agua (destilada) caliente hasta que se eliminó el ácido.

Nuevamente el residuo fue transferido cuantitativamente al vaso Berzelius, y se adicionaron unas gotas de antiespumante y 200 mL de NaOH al 1.25% (m/v) hirviendo y se mantuvieron en el aparato de digestión por un tiempo de 30 minutos exactos. Transcurrido éste tiempo, se filtro en embudo buchner tipo california, lavando el residuo con agua caliente hasta que se logró la eliminación del álcali y finalmente se agregaron 25 mL de alcohol etílico.

El residuo se trasladó a un crisol de porcelana el cual previamente fue puesto a peso constante registrando éste valor. Se colocó en la estufa de vacío para su secado hasta que alcanzó peso constante. (se registró el peso del crisol más residuo digerido).

A continuación se carbonizó la muestra con un mechero y se introdujo en la mufla, los crisoles fueron pesados en diferentes periodos de tiempo hasta que éstos alcanzaron peso constante registrando el valor obtenido. La determinación se hizo por triplicado.

Cálculos

$$\% \text{ fibra} = [(\text{Peso}_{\text{crisol con residuo después de secado}} - \text{Peso}_{\text{crisol + cenizas}}) / \text{peso}_{\text{muestra}}] \times 100$$

❖ 4.3.5 Determinación de Proteína cruda

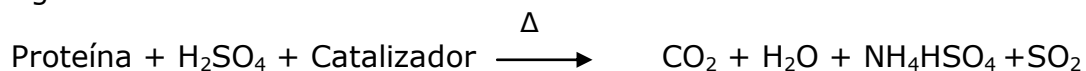
Fundamento

Para la determinación de proteína, es comúnmente empleado el método Kjeldahl, que en realidad determina el nitrógeno orgánico contenido en una matriz alimenticia. Este método se basa en la combustión en húmedo de la muestra por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado en presencia de catalizadores metálicos y de otro tipo para reducir el nitrógeno orgánico de la muestra hasta nitrógeno inorgánico en forma de amoníaco, el cual queda en solución en forma de sulfato ácido de amonio. El digerido, una vez alcalinizado (con NaOH), se destila directamente por arrastre con vapor para desprender el amoníaco, el cual es atrapado en una solución de ácido bórico y posteriormente titulado.⁽²²⁾

El contenido de proteína es 6.25 veces el contenido de nitrógeno, pues, por lo general, las proteínas tienen 16% de nitrógeno.

Las reacciones antes descritas se muestran a continuación:

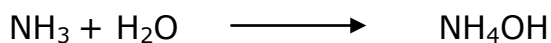
Digestión:



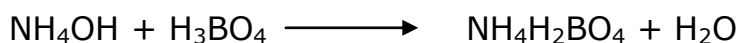
Liberación del NH_3 :



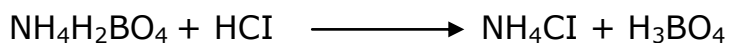
Arrastre con vapor:



Recolección:



Titulación:



Material y reactivos

- Digestor (Tecator 20 – 40)
- Equipo de microdestilación (Kjeltec Auto analyzer Tecator Mod 1030)
- 4 tubos de digestión de 75 mL (Tecator)
- Mezcla digestiva (3 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 50 mL de H_3PO_4 y 430 mL de H_2SO_4 concentrado)

- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Sulfato de potasio (reactivo analítico)
- Solución de NaOH al 40%
- Solución de ácido bórico con indicadores (se disolvieron 100 g de ácido bórico en 10 L de agua destilada, posteriormente se agregaron 100 mL de verde de bromocresol (100 mg en 100 mL de CH₃OH), después se adicionaron 70 mL de rojo de metilo (100 mg en 100 mL de CH₃OH) y finalmente se agitó vigorosamente.
- Solución de HCl 0.01 N valorada

Procedimiento

El contenido de proteína se determinó con el método 2.055 de AOAC 1989³⁷ con las siguientes modificaciones: 1) se colocaron aproximadamente 70 mg de la muestra y se agregaron 0.5 g de K₂SO₄ y 3 mL de mezcla digestiva en los tubos de digestión y se colocaron en el digestor; 2) después de 15 minutos en el digestor a 340° C, se sacaron los tubos y se mantuvieron a temperatura ambiente 5-10 minutos. Se adicionaron 1.5 mL de H₂O₂ al 30% y se colocaron nuevamente en el digestor a 370° C hasta su completa digestión y 3) se realizó la destilación, adicionando NaOH para liberar Amoniacó arrastrado por vapor y para posteriormente recibirlo en ácido bórico con indicadores, valorando con HCl 0.01 N normalizado.

El objetivo de modificar la mezcla digestiva y utilizar peróxido de hidrógeno fue lograr la completa oxidación de la materia orgánica y reducir la pérdida de nitrógeno por formación de aminos o nitrógeno libre, favoreciendo la formación de sulfato de amonio. Esta determinación se realizó por cuadruplicado.

Cálculos

$$\% \text{ de nitrógeno} = [(M - Y) \times N \times \text{meq} \times 100] / m$$

$$\% \text{ de Proteína} = \% \text{ nitrógeno} \times F$$

Donde:

M : mL titulación de la muestra

Y: mL titulación del blanco

N: Normalidad de la solución de HCl

meq: miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m : peso de la muestra en gramos

F: factor de conversión de proteína que en el caso del residuo se empleó el valor de 6.25

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FACTORES TÓXICOS Y ANTINUTRICIONALES

❖ 4.3.6 Determinación del contenido de taninos ⁽²³⁾

Fundamento

Se basa en la extracción de taninos con dimetilformamida, seguida de una centrifugación y adición de citrato férrico amoniacal a una alícuota obtenida a partir del sobrenadante obtenido de la centrifugación, de éste modo se da lugar a la formación de un complejo colorido del cual puede obtenerse espectralmente la absorbancia de dicha alícuota a una longitud de onda 525 nm. A su vez se emplea una curva de calibración utilizando un estándar de ácido tánico y de éste modo conocer el contenido de equivalentes de ácido tánico en la muestra.

Material y reactivos

- Parrilla con agitación magnética de 4 platos (Thermolyne Mod. SP -13025)
- Centrífuga (EPPENDORF 5702)
- Tubos de centrífuga con capacidad de 50 mL
- Magnetos

- Vortex (Lab-Line mod. 1290 super mixer)
- Espectrofotómetro (Sequioa-Turner Mod. 340)
- Pipetas con capacidad de 1 y 5 mL
- Pipetas graduadas con capacidad de 5 y 10 mL
- Tubos de ensaye (140 x 14 mm)
- Matraces aforados de 25 mL
- Solución patrón de ácido tánico de 2 g/L (Merck 773) (se pesaron 0.05 g de ácido tánico para ser llevados a un volumen final de 25 mL)
- Solución de amoníaco 8 g/L, como NH_3 (se tomaron 1.54 mL de hidróxido de amonio con densidad de 0.896 a 20°C y 29 % de pureza llevándose a un volumen final de 50 mL)
- Solución de dimetilformamida 75% (v/v) (se tomaron 375 mL de dimetilformamida y se llevaron a un volumen final de 500 mL con agua)
- Solución de citrato férrico de amonio 3.5 g/L (se tomaron 0.35 g de citrato férrico amoniacal y se llevaron a un volumen final de 100 mL con agua) ésta solución se preparó 24 horas antes de la determinación.

Procedimiento

- **Extracción**

Se colocó aproximadamente 1 g de la muestra dentro de un tubo de centrífuga y se añadieron 25 mL de solución de dimetilformamida al 75%. Posteriormente se sometió el tubo a agitación durante 60 minutos en una parrilla, transcurrido éste tiempo se centrifugó el tubo por 10 minutos a 3000 rpm.

- **Preparación del blanco**

Se tomó una alícuota de 1 mL del sobrenadante obtenido después de la centrifugación y se introdujo en un tubo de ensaye al cual se le agregaron 6 mL de agua desionizada y 1 mL de solución de amonio (8 g/L) y se agitó durante unos segundos en un vórtex.

- **Preparación de la muestra para el desarrollo de color**

Se tomó una alícuota de 1 mL del sobrenadante obtenido después de la centrifugación y se introdujo en un tubo de ensaye al cual se le agregaron 5 mL de agua desionizada y 1 mL de solución de citrato férrico amoniacal (3.5g/L) finalmente se agregó 1 mL de amonio y se agitó durante unos segundos en un vórtex.

El blanco y la muestra se transfirieron después de 10 minutos a una celda de vidrio y se midió la absorbancia a 525 nm en el espectrofotómetro.

Se realizaron 3 extractos y de cada uno se hicieron 3 determinaciones espectrofotométricas.

- **Preparación de la curva patrón de ácido tánico**

En 6 matraces aforados de 25 mL se colocaron respectivamente: 0, 1, 2, 3, 4 y 5 mL de la solución estándar de ácido tánico (2 g/L) y se aforó cada uno de los matraces con solución de dimetilformamida al 75%.

De cada matraz aforado se tomó 1 mL de la solución y se adicionaron 5 mL de agua desionizada, 1 mL de citrato férrico amoniacal, se agitaron durante unos segundos, después se agregó 1 mL de la solución de amoniaco y se volvió a agitar por unos segundos más.

El contenido de cada tubo se transfirió respectivamente a una celda de vidrio 10 minutos después de su preparación, y se midió la absorbancia a 525 nm en el espectrofotómetro.

Finalmente se construyó una curva patrón de la absorbancia en función de la concentración ($\text{mg}_{\text{ácido tánico}}/\text{mL}$) con los datos registrados.

De cada matraz se tomaron 3 alícuotas con el fin de tener un triplicado de cada punto de la curva patrón.

Cálculos

El valor de absorbancia se convirtió a concentración con la curva patrón realizada.

$$\% \text{ ac. tánico} = \left[\left(\frac{\text{mg}_{\text{ac. tánico}}}{\text{volumen}_{\text{alícuota}}} \times \text{volumen}_{\text{aforo}} \right) / \text{g}_{\text{muestra}} \right] \times 100$$

❖ 4.3.7 Determinación de inhibidores de tripsina ⁽²⁴⁾

Fundamento

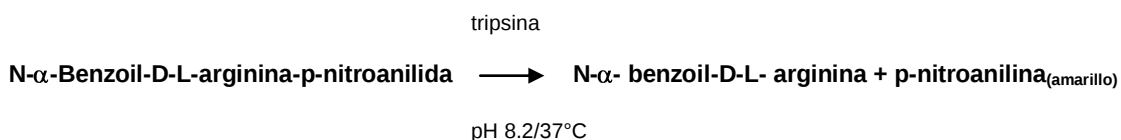
Se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso-alcalino (pH=9.6) de la muestra sobre una solución estándar de tripsina.

El extracto se pone en contacto con una solución estandarizada de tripsina y después de cierto tiempo se determina la actividad proteolítica remanente, por medio de un sustrato sintético (BAPNA), el cual producirá coloración al ser hidrolizado por la enzima, la cual se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm, donde la coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de la muestra.

La actividad de inhibidores de tripsina se expresa en términos de unidades de tripsina inhibida (U.T.I), donde una unidad de tripsina se

define arbitrariamente como un incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm.

La reacción antes mencionada es la siguiente:



Material y reactivos

- Potenciometro (Corning Mod. 10)
- Parrilla con agitación magnética (Thermoline Mod. SP-13025)
- Baño de agua a 37°C (Grant Mod. 67530)
- Espectrofotómetro (Sequoia-Turner Mod. 340)
- Vortex (Lab-Line mod. 1290 super mixer)
- Tubos de ensayo
- Solución de NaOH 0.01 N
- Solución de ácido acético al 30 %
- Solución amortiguadora TRIS pH 8.2 y 0.05M (3.025 g de hidroximetil-amino-metano y 1.47 g de CaCl₂ 2H₂O se disolvieron en 450 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 8.2 y se aforó a un volumen de 500 mL)
- Solución BAPNA (100 mg de N-α-benzoil-D-L-arginina-p-nitroanilida-HCl se disolvieron en 2.5 mL de dimetil-sulfóxido y se diluyen a 250 mL con amortiguador TRIS el cual se calentó

previamente a 37°C) esta solución se preparó el mismo día de la determinación.

- Solución estándar de tripsina 20 µg/mL (se pesaron 4 mg exactos de tripsina bovina –SIGMA T-8253) y se disolvieron en 200 mL de HCl 0.001 N)

Procedimiento

• Preparación del extracto

Se pesó aproximadamente 1 g de la muestramolida y desengrasada (<5% grasa) en un vaso de precipitados y se adicionaron 45 mL de NaOH 0.01 N, posteriormente se ajustó el pH a 9.6 ± 0.2 y se aforó con NaOH 0.01N a 50 mL, se introdujo un magneto en el vaso y se colocó en agitación por un periodo de 2 horas y media a 300 r.p.m.

Transcurrido el tiempo se quitó el magneto del vaso y se dejó reposar el extracto por 30 minutos y posteriormente por decantación se obtuvo el extracto eliminándose el residuo insoluble.

• Determinación de la actividad del extracto

Se introdujeron dentro de un tubo de ensaye 0, 0.6, 1, 1.4 y 1.8 mL del extracto obtenido y se ajustó cada tubo a un volumen final de 2 mL con agua destilada. Los tubos se introdujeron en el baño de agua a 37°C y se adicionaron 2 mL de solución estándar de tripsina a 37°C y se mantuvieron así por 10 minutos exactos. Después se

adicionaron 5 mL de BAPNA a 37°C a cada tubo, se mantuvieron así por 10 minutos exactos a 37°C, finalmente se detuvo la reacción con adición de 1 mL de ácido acético al 30% y se homogeneizó.

En el caso del blanco después de agregar la solución estándar de tripsina, se le adicionó inmediatamente 1 mL de ácido acético para detener la reacción.

Los tubos de reacción después de un tiempo de reposo de 15 minutos se filtraron a través de papel filtro Whatman # 1 ya que presentaban ligero enturbiamiento.

De cada tubo se realizó la lectura de transmitancia en el espectrofotómetro (ajustado a 100% de transmitancia con el tubo que contenía 0 mL del extracto) a una longitud de onda 410 nm.

La técnica fue ensayada previamente con un extracto de soya.

Se realizaron 3 extractos de inhibidores de tripsina.

Cálculos

El valor de transmitancia fue convertido a un valor de absorbancia la cual se multiplicó por 100, para convertir a unidades de tripsina inhibidas (UTI); se restó a cada valor obtenido el valor de la referencia que es el tubo al cual no se le agregó extracto. Después se dividió cada valor entre la cantidad de extracto empleada de tal modo que se tienen UTI/mL. A continuación se relacionó el volumen de extracto con la actividad expresada en términos de UTI/mL, con la

finalidad de encontrar una relación lineal que permitiera encontrar las UTI por mg de muestra.

$$\text{UTI/mg}_{\text{muestra}} = \text{ordenada al origen}_{\text{regresión lineal}} \times (\text{volumen}_{\text{extracto}}/\text{mg}_{\text{muestra}})$$

Nota: La ecuación anterior es utilizada siempre y cuando los inhibidores de tripsina determinados muestren una cinética de inhibidores tipo Kunitz, esto es cuando el coeficiente de correlación de la ecuación de la recta (mL de extracto vs. UTI/mL) sea $\geq |0.9|$, de no ser así se obtiene el promedio de un cuadruplicado y se reporta este valor.

❖ **4.3.8 Determinación de hemaglutininas (prueba semicuantitativa)** ⁽²⁵⁾

Fundamento

La detección de hemaglutininas o lectinas se basa en la observación de la aglutinación de glóbulos rojos provocada por un extracto de lectinas proveniente de una muestra. La técnica incluye diluciones seriadas del extracto, en la cual se determina el punto final por una estimación visual de la aglutinación de los glóbulos rojos los cuales son lavados y sensibilizados con una solución de proteasa, lo cual aumenta la sensibilidad de la aglutinación y por ultimo se hace un ajuste de la suspensión de eritrocitos.

Material y reactivos

- Parrilla con agitación magnética (Thermoline Mod. SP-13025)
- Espectrofotómetro (Sequoia-Turner Mod. 340)
- Centrífuga para tubos (EPPENDORF 5702)
- Tubos graduados de 15 mL para centrífuga
- Incubadora a 37°C (Blue-M)
- Adaptador para celdas de 10 x 75 mm (acondicionado a una abertura de 1 cm²)
- Kit de Microtitulación (Microtiter Kit cook Eng-Alexander Virginia USA)
- Placas tipo "V" para microtitulación
- Dispositivo con espejo para la lectura de las placas de microtitulación.
- Papel Whatman de filtración rápida
- Matraces aforados de 10 mL
- Solución de proteasa 0.2% en solución salina
- Solución salina al 1% (m/v)
- Solución salina al 0.9% (m/v)
- Solución anticoagulante (heparina)
- Sangre de hámster (aproximadamente 50 gotas)

Procedimiento

- **Preparación del extracto**

Se pesó 1 g de la muestra desengrasada para posteriormente suspenderse, cada uno en 10 mL de solución salina al 1%.

La suspensión se sometió a agitación mecánica durante 2 horas a 300 r.p.m. a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo de agitación, el extracto se centrifugó durante 15 minutos con el fin de eliminar el residuo insoluble. El sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de vidrio sobre un matraz aforado, llevando el extracto a un volumen final de 10 mL con solución salina al 1%.

Se realizaron 3 extractos de cada residuo y 1 extracto de frijol negro jamapa que se utilizó como control positivo.

- **Preparación del paquete de eritrocitos**

Lavado de eritrocitos

Se obtuvieron aproximadamente 50 gotas de sangre de hámster, las cuales fueron colocadas en un matraz de 25 mL que contenía heparina, posteriormente se diluyó la sangre con solución salina al 0.9% en una relación 1:5 v/v (sangre:solución salina), la sangre fue distribuida en 4 tubos graduados para centrífuga y se sometieron a

centrifugación a 1500 r.p.m. durante 10 minutos, al término de éste tiempo se separó el sobrenadante y se volvieron a diluir los eritrocitos en la misma relación para volver a ser centrifugados bajo las mismas condiciones.

Esta operación se repitió 3 veces.

Finalmente el paquete de eritrocitos se diluyó a una concentración del 4% de eritrocitos, para lo cual se agregaron por cada 1 mL de eritrocitos 24 mL de solución salina al 0.9%

Sensibilización de eritrocitos

A la solución al 4% de eritrocitos, se agregó por cada 10 mL de solución, 1 mL de solución de proteasa al 0.2% en solución salina, fueron colocados en una incubadora durante 1 hora a 37°C y al término de éste tiempo la solución de eritrocitos se distribuyó nuevamente en tubos graduados para centrífuga y se centrifugaron a 1500 r.p.m. durante 10 minutos con el fin de eliminar la proteasa. Finalmente se sometieron los eritrocitos a 3 lavados con solución salina al 0.9% de la misma manera mencionada en el lavado de la sangre.

Después del último lavado el paquete de eritrocitos fue llevado a una suspensión al 4% con solución salina al 0.9%, para lo cual se consideró que por cada 1 mL de eritrocitos se agregaron 24 mL de solución salina.

Ajuste de la suspensión de eritrocitos

Se tomaron 0.1 mL de la suspensión de eritrocitos y se agregaron 4.9 mL de solución salina en una celda de vidrio, midiéndose inmediatamente el valor de transmitancia en el espectrofotómetro a 620 nm utilizando un adaptador de celdas que permitiera el paso de 1 cm² de luz. (el espectrofotómetro fue ajustado a 100% de transmitancia utilizando como blanco solución salina al 0.9%). La lectura apreciada fue de 24.3% de transmitancia, considerándose adecuada para la determinación. (El valor de % de transmitancia debió estar en el rango de 24 – 29% T)

• Microtitulación

En las placas tipo "V" se colocaron, en cada pozo de cada hilera 50 µL de solución salina al 0.9% con un pipetero de gota (es necesario evitar tocar las paredes de los pozos).

Posteriormente se llenó el microdilutor con 50µL del extracto y se procedió a realizar 24 diluciones sucesivas en forma de culebra (ocupando 2 hileras), después se llenó el microdilutor con 50µL del extracto de referencia y se realizaron 12 diluciones sucesivas. (Ocupando 1 hilera).

Finalmente en cada pozo se colocaron 50 µL de la suspensión de eritrocitos sensibilizada y ajustada. Las placas se rotaron en forma circular y se introdujeron a la incubadora a 37°C por 1 hora.

- **Lectura de las placas**

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se colocó la placa en el dispositivo de lectura y se reportó la máxima dilución que presentó aglutinación, que corresponde al título de hemaglutininas.

❖ **4.3.9 Determinación de ácido fítico** ^(26,27)

Fundamento

Este método emplea una columna de intercambio iónico, con el fin de purificar los extractos del ácido fítico, eliminando las fracciones menores de fosfatos de inositol, permitiendo una cuantificación real del ácido fítico. A su vez, la determinación colorimétrica se basa en la medida de la disminución de la absorbancia del complejo FeCl_3 -ácido sulfosalicílico (Reactivo de Wade) debido al enlace del Fe(III) con el ácido fítico.

Material y reactivos

- Parrilla con agitación magnética (Thermoline Mod. SP-13025)
- Espectrofotómetro (Sequoia-Turner Mod. 340)
- Centrífuga para tubos (EPPENDORF 5702)

- Vórtex (Lab-Line mod. 1290 super mixer)
- Tubos para centrífuga
- Jeringas de 3 mL (plastipak)
- Gradilla metálica para las jeringas
- Probetas de 20 mL
- Vasos de precipitados de 100 mL
- Tubos de ensaye 10 x 160 mm
- Solución de NaOH 1 N
- Solución de NaCl 0.1 N
- Solución de NaCl 0.7 N
- Solución de HCl 0.65N
- Agua desionizada
- Resina de intercambio iónico Dowex AG1 X 8 (200-400 mesh, Bio Rad no. de catálogo 140-141)
- Solución estándar de ácido fítico (125 μg ácido fítico/mL), (se pesaron exactamente 0.0214 g de fitato de sodio con pureza del 92% y humedad de 11.3% y se aforaron con agua desionizada hasta un volumen de 100 mL)
- Reactivo de Wade (se pesaron 0.03 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (sigma F-2877) y 0.3 g de ácido sulfosalicílico (sigma S-0640) y se disolvieron en agua desionizada hasta un volumen de 100 mL, el reactivo fue preparado en el momento en que se hizo la determinación espectrofotométrica).

Procedimiento

- **Preparación de la muestra**

1 g de la muestra desengrasada, se colocó dentro de un vaso de precipitado, posteriormente se le adicionaron 20 mL de HCl 0.65 N (con mucha exactitud), esto con el fin de disociar al fitato de complejos con minerales y proteínas. Esta solución se sometió a agitación vigorosa por un tiempo de 2 horas a temperatura ambiente y 400 rpm, y el extracto obtenido se transfirió cuantitativamente a un tubo para centrífuga, éste se sometió a centrifugación (aproximadamente 12000 r.p.m) a temperatura ambiente por 30 minutos, y se colectó el sobrenadante.

- **Preparación de la columna de intercambio iónico**

Se pesó aproximadamente 0.5 g de resina de intercambio iónico y se hidrató con 0.6 mL de agua desionizada.

A parte a una jeringa Plastipak se le colocó un tapón de fibra de vidrio en el fondo. Posteriormente se agrego la resina hidratada sobre la jeringa (columna), es importante hacer notar que la resina debió quedar asentada uniformemente sobre la columna. Una vez que la resina se empacó bien en la columna, se hicieron pasar 15 mL de NaCl 0.7N y posteriormente se lavó con 30 mL de agua desionizada. (se dejó agua suficiente, aproximadamente 0.5 cm de altura por

encima de la resina empacada, para que ésta no se secase) y así quedó lista hasta que se llevó a cabo la determinación.

- **Purificación por columna de intercambio iónico**

Se tomó una alícuota de 5 mL de los extractos recolectados (con mucha exactitud), en la preparación de muestra anteriormente mencionada, y se diluyeron a 25 mL con agua desionizada. Esta alícuota fue ajustada a pH 6 con NaOH 1N. Posteriormente se tomaron 10 mL de la alícuota diluida y se transfirió cuantitativamente a la columna preparada como se mencionó anteriormente. La columna fue lavada con 15 mL de NaCl 0.1 N con el fin de eliminar el fosfato inorgánico y fracciones menores de inositol y se desechó el agua de lavado. Finalmente se eluyó al fitato con 15 mL de NaCl 0.7N, colectándose el extracto purificado.

- **Preparación de la curva patrón**

A partir del estándar de ácido fítico, se prepararon soluciones que fueron desde 5 hasta 50 $\mu\text{g/mL}$, esto se logró colocando 1, 2, 4, 6, 8, 10 mL del estándar concentrado, en respectivos matraces aforados de 25 mL, cada matraz con la respectiva cantidad de estándar se aforó con agua destilada, se ajusta el pH a 3 con HCl. De cada uno se tomaron 3 mL y se realizó la determinación espectrofotométrica como se indica posteriormente, a partir de la cual fue posible la construcción de una curva de calibración que relacionaba la

concentración de ácido fítico y la absorbancia obtenida para la posterior cuantificación.

- **Determinación espectrofotométrica**

Se tomaron 3 mL de agua desionizada la cual fue usada como blanco, 3 mL de los estándares (soluciones de fitato de sodio con contenido de 5 a 50 µg/mL) y 3 mL del extracto purificado del residuo previamente ajustados a pH 3.

Estas cantidades de agua, estándares y extracto fueron colocadas en respectivos tubos de ensaye y se le agregó a cada tubo 1 mL del reactivo de Wade y se sometió a agitación en un vórtex por 5 segundos leyendo inmediatamente la absorbancia a 500 nm en el espectrofotómetro.

Cálculos

El valor de absorbancia fue convertido a concentración con la siguiente fórmula

$$\mathbf{Abs_{blanco} - Abs_{muestra} = Abs_{real}}$$

Con el resultado obtenido se convirtió a concentración con la curva patrón realizada para obtener la cantidad de ácido fítico en g/mL

La cantidad de muestra se trata como sigue:

$$g_{muestra}/mL = (g_{muestra}/vol^a_{extracto})(dilución empleada^b)(Factor^c)$$

a: Volumen de HCl para la extracción 20 mL

b: dilución empleada 3 mL/25 mL

c: Factor 10 mL/15 mL, se refiere a la alícuota que se coloca en la columna de intercambio iónico y el volumen al que se lleva con la solución de NaCl 0.7N que lo eluye.

Este último valor obtenido se considera el 100%, así que se relaciona el valor de concentración de ácido fítico obtenido a partir de la absorbancia y se obtiene el porcentaje de ácido fítico en la muestra.

❖ **4.3.10 Determinación de glucósidos cianogénicos** ⁽²⁸⁾

Fundamento

El ácido cianhídrico en cantidades traza, está ampliamente distribuido en el reino vegetal y se presenta principalmente en forma de glucósidos cianogénicos; sin embargo concentraciones relativamente altas de estos tóxicos son encontradas en algunas gramíneas, leguminosas, raíces feculentas y almendras de frutas.

Este método aprovecha la reacción sensible y específica de Guignard, la cual es ampliamente utilizada en pruebas cualitativas para la detección tanto de glucósidos cianogénicos como del propio HCN.

Para poder cuantificar el HCN total que potencialmente puede ser liberado se hace uso de una hidrólisis enzimática (por medio de β -glucosidasa) del correspondiente glucósido cianogénico; y para poder cuantificar en forma precisa el HCN liberado, es conveniente trabajar algunos pasos a temperaturas bajas. Con este método es posible detectar cantidades del orden de 5 μ g de HCN, equivalentes a 46 mg de glucósidos cianogénicos referidos como linamarina.

Material y reactivos

- Incubadora (Blue -M)
- Congelador comercial
- Espectrofotómetro (Sequoia-Turner Mod. 340)
- Baño de agua con agitación (Lab-Line/Dubnoff incu-Shaker Mod. 357)
- Tubos de cultivo con tapón de rosca (PIREX)
- Papel con picrato de sodio alcalinizado (se cortaron tiras iguales de papel filtro Whatman no. 2, y se empaparon con una solución de picrato de sodio alcalinizada, éstas se dejaron escurrir y se colocaron en una estufa a secar a una temperatura de 55-60°C por 10 minutos)

- Solución de β -glucosidasa (1 mg/mL) con activador (se pesaron 0.25 g de β -glucosidasa y se disolvieron con buffer de fosfatos pH 7 agitando suavemente, ya disuelta la enzima se adicionaron 1.7 g de nitrato de sodio el cual actuó como activador de la enzima, todo lo anterior se llevó a un volumen de 250 mL con el buffer de fosfatos pH 7)
- Solución de KCN equivalente a 100 $\mu\text{gH}\text{CN}/\text{mL}$
- HCl 0.5 N
- Buffer de fosfatos pH 7
- Solución de picrato de sodio alcalinizada (se disolvieron 2.5 g de ácido pícrico seguidos de 12.5 g de carbonato de sodio en agua destilada, y se llevó a un volumen de 500 mL)
- Fécula de maíz comercial (maizena)

Procedimiento

• Elaboración de la curva patrón

Se utilizó una solución estándar de HCN (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y con el fin de simular la interacción muestra-HCN se introdujo fécula de maíz como matriz alimentaria.

Se adicionaron 0, 0.05, 0.10, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 0.6 mL de la solución estándar en los tubos con tapón de rosca, a cada tubo se adicionaron previamente 500 mg de fécula de maíz y 5 mL de buffer pH 7, se homogeneizó esta solución y se colocó en cada tubo una tira

de papel indicador (previamente humedecida con algunas gotas de agua) en la boca del tubo y se cerraron los tubos herméticamente con un tapón de rosca.

Los tubos se mantuvieron a 40°C por un tiempo de 4 horas en un baño con agitación, al término de éste tiempo se adicionó a cada tubo 1 mL de HCl 0.5N en frío.

La liberación de HCN se realizó sacando de cada tubo el papel e introduciéndolo en un tubo de ensayo, posteriormente se agregaron 20 mL de agua destilada y se sometió cada tubo a agitación por un espacio de 2 minutos, al término de éste tiempo se filtró la solución y se mide la absorbancia.

Se tomó la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm.

Esta curva patrón se presentó un rango de 5 a 60 µg de HCN.

• Preparación de la muestra

Se pesaron en tres tubos 200 mg, 300 mg y 500 mg de la muestra. A cada tubo se le adicionaron 5 mL de solución de β-glucosidasa fría, se homogeneizó esta solución en un vórtex con la muestra y se colocó la tira de papel indicador (humedecida previamente con algunas gotas de agua) en la boca del tubo y se cerró herméticamente con un tapón de rosca.

Los tubos se colocaron en el baño de agua a una temperatura de 40°C por 4 horas, con la agitación oscilatoria horizontal ajustada a

3.5. Al término de éste tiempo los tubos se sacaron del baño y se colocaron en el congelador por espacio de 30 minutos.

Transcurrido éste tiempo se sacaron los tubos y se les adicionó 1 mL de HCl (frío), los tubos se volvieron a cerrar y se homogeneizó cuidando la solución no tocara el papel indicador, se colocaron los tubos en una incubadora a una temperatura de 60°C y al término de éste tiempo se tomó la lectura cualitativa de los tubos, considerándose una mínima coloración rojiza como prueba positiva.

Para la determinación cuantitativa se debió recuperar el papel indicador y colocarlo en un tubo de cultivo, adicionarle 20 mL de agua destilada para posteriormente taparlo y agitarlo vigorosamente. Se debía recuperar el solvente, eliminando el papel con una filtración rápida. Así mismo la disolución filtrada se colocaría en una fotocelda para su lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 520nm, ajustando previamente a 100% T con el blanco correspondiente.

Una vez obtenida la curva estándar HCN vs Abs, se podría obtener una ecuación de regresión lineal para interpolar el valor de absorbancia leído en la muestra y determinar el contenido de HCN (x).

$$[(x)(D)(100)]/M = \text{mg HCN}/100\text{g de muestra}$$

Donde:

x = μg de HCN

D = numero de veces de adición de 20 mL de agua (dilución)

M = mg de muestra

❖ **4.3.11 Determinación Saponinas**⁽³⁰⁾

Fundamento

La detección de saponinas en extractos de plantas se lleva a cabo con una técnica de diluciones seriadas en la cual se determina el punto final por una estimación visual de la hemólisis de los glóbulos rojos de la sangre de conejo.

El método de microtitulación es rápido y requiere de una mínima cantidad de muestra. Se necesita sensibilizar los glóbulos rojos lavados con una solución de tripsina, ya que la sensibilidad de los eritrocitos se mejora considerablemente con este tratamiento.

Material y reactivos

- Extractor de grasa Goldfish, LABCONCO
- Cartuchos de celulosa Whatman 22x88 mm

- Rotavapor büchi, 461, modelo RE-111
- Centrifuga (EPPENDORF 5702)
- Incubadora bacteriológica, BLUE M.
- Espectrofotometro COLEMAN, Junior II-A
- Tubos de centrifuga de 15 mL con graduación
- Jeringa de 5 ó 10 mL #22
- Microtiter kit (Cook Eng-Alexander Virginia USA)
- Filtro de vidrio poroso
- Solución de metanol (RA) y agua destilada al 85% (v/v)
- Sangre de conejo desfibrinada y lavada
- Solución anticoagulante (a)
- Solución salina al 0.9%
- Tripsina de páncreas de porcino al 0.1% (Sigma t-8128)
- Solución estándar de saponinas al 0.5% en solución salina (c)

(a) Cuando la sangre se va a trabajar inmediatamente se puede utilizar ya sea solución de heparina o citrato, las cuales se usan en la siguiente relación:

Sol. Heparina:sangre= 15-20 UI:1 mL de sangre

Sol. Citrato:sangre=0.1 mL:1 mL de sangre

Sin embargo si la sangre no se va a utilizar de inmediato y se desea trabajar en refrigeración por unos días, lo más conveniente es usar como solución anticoagulante, la solución ELSEVER, en la siguiente proporción; 1:1.

(b) Se usa tripsina de páncreas de porcino(SIGMA T-8128) al 0.1% en solución salina al 0.9%, para el proceso de sensibilización.

(c) El estándar de saponinas es una mezcla 1:1 de digitonina (saponina tipo esteroidal) y un extracto de quillaza (saponina tipo triterpenoide).

Procedimiento

- **Preparación del extracto**

Una vez que se tiene la muestra molida y desengrasada se pesan 7.5 g en el cartucho de celulosa, se coloca en el portadadales y en el extractor Goldfisch, la extracción se realiza a la máxima temperatura del aparato por 2 horas, con metanol-agua(85:15)como solución extractora de las saponinas. Una vez transcurrido el tiempo de extracción, el extracto se concentra a sequedad en el rotavapor a una temperatura aproximadamente de 65°C, la muestra se redisuelve con solución salina 0.9% y se filtra con ayuda del vacio para aforar a 100 mL con la misma solución. Sino se realiza la determinación de inmediato, el extracto se debe refrigerar o congelar para evitar contaminación.

- **Preparación del paquete de eritrocitos**

Lavado de eritrocitos

Una vez que se sangró al animal se colocó la sangre en un matraz pequeño que contenga anticoagulante. Se agitó suavemente para la completa homogeneización de la sangre de conejo con la solución (no interrumpir hasta el momento de diluirla).

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

Se centrifuga a 1500 rpm durante 10 min. Después del ultimo lavado se mide en el tubo de centrifuga, la cantidad del paquete de eritrocitos y se diluyen al 4% para lo cual se agregan por cada 1 mL de glóbulos rojos 24 mL de solución salina al 0.9%.

Sensibilización de eritrocitos

A la solución al 4% de eritrocitos, se agregó por cada 10 mL de solución, 1 mL de solución de tripsina al 0.1% en solución salina, fueron colocados en una incubadora durante 1 hora a 37°C y al término de éste tiempo la solución de eritrocitos se distribuyó nuevamente en tubos graduados para centrífuga y se centrifugaron a 1500 r.p.m. durante 10 minutos con el fin de eliminar la tripsina. Finalmente se sometieron los eritrocitos a 3 lavados con solución

salina al 0.9% de la misma manera mencionada en el lavado de la sangre.

Después del último lavado el paquete de eritrocitos fue llevado a una suspensión al 4% con solución salina al 0.9%, para lo cual se consideró que por cada 1 mL de eritrocitos se agregaron 24 mL de solución salina.

Ajuste de la suspensión de eritrocitos

Se tomó 1 mL de la suspensión de eritrocitos y se agregaron 4 mL de solución salina 0.85% en una celda de vidrio, midiéndose inmediatamente el valor de transmitancia en el espectrofotómetro a 620 nm utilizando un adaptador de celdas que permitiera el paso de 1 cm² de luz. (el espectrofotómetro fue ajustado a 100% de transmitancia utilizando como blanco solución salina al 0.85%). La lectura apreciada fue de 25±1% de transmitancia, considerándose adecuada para la determinación. (El valor de % de transmitancia debió estar en el rango de 24 – 29% T).

• Microtitulación

En las placas tipo “U” se colocaron, en cada pozo de cada hilera 50 µL de solución salina al 0.9% con un pipetero de gota (es necesario evitar tocar las paredes de los pozos).

Posteriormente se llenó el microdilutor con 50 µL del extracto y se procedió a realizar 24 diluciones sucesivas en forma de culebra

(ocupando 2 hileras), después se llenó el microdilutor con 50 μ L del extracto de referencia y se realizaron 12 diluciones sucesivas. (Ocupando 1 hilera).

Finalmente en cada pozo se colocaron 50 μ L de la suspensión de eritrocitos sensibilizada y ajustada. Las placas se rotaron en forma circular y se introdujeron a la incubadora a 37°C por 1 hora.

- **Lectura de las placas**

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se colocó la placa en el dispositivo de lectura y se reportó la máxima dilución que presentó hemólisis.

Cálculos

Las unidades asignadas en el método se definieron como unidades hemolíticas por mg de muestra (U.H./mg de muestra), lo cual se explica de la siguiente forma.

La mezcla de saponinas triterpenoide y esteroide (1:1) tiene una concentración de 0.5% en la solución estándar, si en la microtitulación se toman 0.05 mL, se tiene entonces una concentración de 0.25 mg de saponina en dicho volumen.

En una dilución seriada se tiene la siguiente formula:

Concentración de extracto/ 2^t

Donde:

t=título de la hemólisis

Si la solución estándar de saponinas tiene un valor promedio de 8 para el título de hemólisis, entonces en este pozo se tiene la siguiente concentración:

$$**0.25\text{ mg}/2^8=0.001\text{ mg}=1\text{ }\mu\text{g}**$$

Por definición 1 μg del estándar de saponinas es equivalente a 10 Unidades Hemolíticas (U.H.).

El cálculo para las muestras es:

La concentración del extracto de la muestra para todos los casos es de 75mg/mL, en 0.05 mL tenemos 3.7 mg; para un título de hemólisis con valor de 1 se tiene la siguiente concentración:

$$**3.75/2^1= 1.875\text{ mg de muestra}**$$

Por definición se obtiene las Unidades Hemolíticas por mg de muestra (U.H./mg de muestra).

$$**10\text{U.H.}/1.87\text{ mg de muestra}=5.3\text{ U.H./mg de muestra}**$$

❖ **4.3.12 Determinación de Nitratos** ⁽³¹⁾

Fundamento

El método se basa en la extracción acuosa de nitratos de tejidos vegetales, con la posterior centrifugación y la formación de un complejo (en el sobrenadante) como resultado de la nitración del ácido salicílico bajo condiciones ácidas extremas, este complejo tiene su máximo de absorción a 410 nm en soluciones alcalinas. La absorbancia del cromóforo es directamente proporcional a la cantidad de nitratos presentes. Se determina el contenido de nitratos usando una curva estándar preparada con sal de nitrato químicamente pura (sodio, potasio).

Material y reactivos

- Embudos Buchner
- Matraces Kitasato
- Micropipetas de 50, 200 y 100 μ L
- Bureta de 50 mL
- Tubos de Centrifuga
- Parrilla con agitación magnética de 5 platos (Thermolyne Mod. SP-13025)
- Centrifuga (EPPENDORF 5702)

- Adaptador para filtración de jeringa millipore
- Baño de agua (Grant Mod. 67530)
- Espectrofotómetro (Sequioa-Turner Mod. 340)
- Solución Estándar de Nitrato 10 mg/mL
- Solución de ácido salicílico al 5% (m/v) en ácido sulfúrico concentrado
- Hidróxido de sodio 2M
- Carbón activado

Procedimiento

• *Preparación del extracto*

En un vaso de precipitados de 50 mL se añadieron de 0.25 a 0.9 g de muestra, 550 mg de carbón activado y 30 mL de agua. Se agitó moderadamente a 70 rpm, durante 15 min. Se filtro con ayuda de vacío sobre papel Whatman No. 41, enjuagando el caso con porciones pequeñas de agua. El filtrado se transfirió cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 mL y se llevó a la marca de aforo con agua; se homogeneizó y transfirió a un tubo de centrífuga de 50 mL. Se centrifugo una hora a 3000 rpm. Se filtro el sobrenadante con ayuda de vacío sobre papel Whatman No. 542 y se homogeneizó para hacer la determinación.

- **Preparación de la curva estándar**

En un vaso de precipitados de 50 mL se adicionó exactamente 3 mL de la solución estándar de nitratos, 550 mg de carbón activado y 30 mL de agua. Se mezclaron hasta homogeneizar. Se filtró con ayuda de vacío sobre papel Whatman No. 41, enjuagando el vaso con pequeñas porciones de agua. El filtrado se transfirió cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 mL. Se centrifugo una hora a 3000 rpm.

Se filtro el sobrenadante con ayuda de vacío sobre papel Whatman No. 542 y se homogeneizó. La solución obtenida tuvo una concentración de nitrato 0.6 mg/mL.

Se rotularon 6 tubos de ensayo, correspondiente el No. 1 al blanco de la curva. Se adicionaron 0, 10, 20, 50, 70 y 100 μg de la solución patrón de nitrato. Se añadió agua a cada tubo para llevar a un volumen final de 0.1 mL y se mezcló por 15 segundos en Vortex. Se adicionaron 0.4 mL de la solución de ácido salicílico, se mezcló por 15 segundos en el Vortex y se introdujo en baño de temperatura a 30° C por 20 min.

Transcurrido el tiempo se adicionaron lentamente con bureta 9.5 mL de solución de NaOH y se agito por 15 segundos en el Vortex. Se introdujo en baño de temperatura a 30° C durante 15 minutos. Se transfirió a celdas de medición y se leyó en el espectrofotómetro a 410 nm. Finalmente se trazó una gráfica de absorbancia vs concentración de nitrato, expresada como μg de nitrato.

- **Determinación**

Se rotularon 4 tubos de ensayo, correspondiente el No.1 al blanco de la muestra. Se adicionó una alícuota de 100 μ L de extracto a cada tubo. Se añadieron 0.4 mL de solución de ácido salicílico, excepto al blanco, al cual se le adicionó 0.4 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se mezcló por 15 segundos en vortex y se introdujo a un baño con temperatura controlada a 30° C por 20 min.

Transcurrido el tiempo, se adicionaron con bureta 9.5 mL de solución de NaOH, se mezcló por 15 segundos y se introdujo a un baño con temperatura controlada a 30° C por 15 min. Se transfirió a celdas de medición y se leyó en el espectrofotómetro a 410 nm.

Cálculos

Mediante la ecuación de la línea recta obtenida con los datos de la curva patrón se determinó el contenido de nitratos en la muestra. La determinación se hizo por triplicado.

❖ **4.3.13 Determinación del perfil de aminoácidos por HPLC de fase reversa**

Material y Reactivos

Hidrólisis

- Digestor marca TECATOR, mod. Ab. 20/40
- Potenciómetro marca CORNING, mod. 10
- Rotavapor marca BUCHI, mod. R.
- Tubos de cultivo de pared gruesa con tapón de rosca y cubierta de teflón PYRES No. 9826
- Tubos de ensayo de 4 x 50 mm, CORNING
- Agitador Vortex marca LAB-LINE INSTRUMENTS, mod. Super-mixer # 1290
- Cortador de vidrio o marcador de tinta permanente
- Micro pipeta y puntas con capacidad de 200-1000 μL , FINNPIPETTE
- Vórtex (Lab-Line mod. 1290 super mixer)
- Agua destilada y desionizada^a
- Metanol (Q.P.)
- Nitrógeno de alta pureza (99.997%), INFRA
- Solución lavadora: agua-metanol (3:1; v/v) con hidroquinona al 0.01% como agente antioxidante
- HCl 6N, 0.1% de fenol^b

Preparación de la muestra

- Micro pipeta y puntas con capacidad de 50-200 μL , FINNPIPETTE
- Pipetas Pasteur
- Vórtex (Lab-Line mod. 1290 super mixer)
- Matraces aforados de 5 mL
- Jeringas de 10 mL
- Acrodiscos de nylon, 0.2 μm de tamaño de poro y 13 mm de diámetro. GELMAN
- Tubos de ensayo de 10 x 70 mm, PIREX
- Cartucho Sep Pak C₁₈ Classic, WATERS
- Agua destilada y desionizada^a
- Norleucina 5 mM-HCl 10 mM^c
- Acetonitrilo grado HPLC, JT-BAKER

Derivatización

- Tubos de ensayo de 4 x 50 mm, CORNING
- Micro pipeta y puntas con capacidad de 5-50 μL , FINNPIPETTE
- Micro pipeta y puntas con capacidad de 50-200 μL , FINNPIPETTE

- Micro pipeta y puntas con capacidad de 100-1000 μL , FINNPIPETTE
- Vórtex (Lab-Line mod. 1290 super mixer)
- Parrilla de calentamiento, Stirrer/Hot Plate CORNING, con baño de agua a 55°C
- Parafilm
- Estándar de aminoácidos H: 2.5 mM, Cistina: 1.25, PIERCE
- Acetonitrilo (AccQ Fluor reagent diluent, vial 2B) 6-aminoquilolil-N-hidroxisuccinimidilcarbamato (AccQ Fluor reagent, vial 2A) y Buffer de boratos (AccQ Fluor Borate Buffer, reactivo 1), WATERS^c

Análisis cromatográfico

- Sistema HPLC, Agilent Technology, mod. 1100
- Horno y unidad de control de temperature mod. 111, WATERS
- Columna cromatográfica (AccQ Tag Nova Pack C₁₈ tamaño de partícula 4 μm , de 3.9 mm y 150 mm, WATERS)
- Sistema de filtración a vacío y filtros de 0.45 (tipo HA) y 0.22 (tipo GV) μm de tamaño de poro, MILLIPORE
- AccQ Tag concentrado A (Buffer acuoso de acetatos y fosfatos) de WATERS
- Acetonitrilo (grado HPLC), JT BAKER
- Agua destilada y desionizada^a

- ^a Utilizar agua destilada pasada por un filtro de 0.22 μm o agua purificada de 18 Mohm de resistencia eléctrica.
- ^b Se puede utilizar HCl 6N de punto de ebullición constante, agregando un cristal de fenol durante la preparación de la muestra a hidrolizar.
- ^c Disolución de Norleucina (c.b.p. 5 mM) en HCl 0.1M suficiente para obtener 10 mM al final.
- ^d 200 mL de acetonitrilo grado HPLC más 800 mL de agua purificada (según a)
- ^e AccQ Fluor Reagent Kit de WATERS

Procedimiento

Derivatización

- Reconstitución de AQC

Se precalento la parrilla con baño de agua a 55°C. Una vez que todo el reactivo de derivatización AQC (vial 2A) se encontró en la parte interior del vial, se enjuagó la punta de una micro pipeta de 1000 μL y cargó con 1000 μL del reactivo de dilución de AQC (vial 2B), y desechándolos para después transferir 1000 μL del mismo reactivo (vial 2B) para reconstituir el reactivo de derivatización AQC (vial 2A). Se cerró el vial 2A herméticamente y agitó (con Vórtex) por 10 s. Se calentó (no más de 10 min) en la parrilla hasta la disolución del

reactivo de derivatización AQC. El reactivo se almacenó en refrigeración cuando no fue utilizado, cuidando de exponerlo lo menos posible a la humedad del ambiente para evitar su degradación.

- Preparación de un estándar de aminoácidos

Se mezclaron 80 μ L de la solución stock de aminoácidos (2.5 mM) con 20 μ L de norleucina en 0.1 mM.HCl 10 mM y 900 μ L de agua purificada para obtener un estándar de 16 aminoácidos (Asp, Ser, Glu, Hys, Arg, Thr, Ala, Pro, Tyr, Val, Mer, Lys, Ile, Leu y Phe) de concentración 0.2 mM (cistina, 0.1 mM) con 0.1 mM de norleucina como estándar interno.

- Derivatización de aminoácidos

Se depositaron en un tubo de ensayo de 4 x 50 mm, 10 μ L de estándar de aminoácidos, evitando que la punta de la pipeta tocara las paredes del tubo; se agregaron 70 μ L de buffer de boratos y se agitó el tubo en un Vórtex por 10 s. Finalmente se añadieron 20 μ L del reactivo de derivatización ya reconstruido, vial 2A y se agitó en el Vórtex durante un minuto (tiempo durante el cual se lleva a cabo la reacción y se hidroliza el exceso de AQC).

Se cubrió con parafilm la boca del tubo y se introdujo en el baño de agua a 55°C durante 10 minutos para completar la formación del monoderivado de tirosina.

Análisis cromatográfico

- Preparación de la fase móvil

Buffer de acetatos-ácido fosfórico (Fase A), pH 5.02 ± 0.02 .

Se diluyeron 100 mL de concentrado A (AccQ Tag concentrado A) hasta 1000 mL con agua purificada utilizando un matraz volumétrico de 1000 mL. Se hizo pasar toda la fase a través de un sistema de filtración a vacío con un filtro de tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ tipo HA. La fase preparada se almacena en refrigeración conservándose hasta por un mes, filtrándole y desgasificándole cuando no fue utilizada por más de dos días. El pH debió ser de 5.02, ajustándolo con ácido fosfórico concentrado e hidróxido de sodio 5N, cuando fue necesario.

Acetonitrilo: agua 60:40 (fase B)

En una probeta de 1000 mL, se vertieron 600 mL de acetonitrilo grado HPLC y se añadieron 350 mL de agua purificada. Después de que hubo salido el aire en la probeta, se ajustó a 1000 mL con agua purificada. Se filtró y se desgasificó la fase B de la misma forma que la A pero empleando un filtro de tamaño de poro de $0.22 \mu\text{m}$ tipo GV. Se almacena en refrigeración para conservar su composición por una semana, volviendo a filtrar y desgasificar al momento de emplearla.

- Acondicionamiento del equipo

Se encendió el equipo (computadora, bombas, degasificador y detector, en ese orden), después de asegurar que había suficiente fase A y B para cada una de las bombas y que la columna se encontraba conectada en la dirección correcta. El acondicionamiento del equipo se programó en la computadora como sigue:

Acondicionamiento de equipo			
Tiempo (min)	% fase A	% fase B	Flujo (mL/min)
Inicio	0	100	0
5	0	100	1
40	0	100	1
45	100	0	1
60	100	0	1
65	100	0	0

El detector se programo a 254 nm de longitud de onda, ajustando a cero antes de tiempo en que empezara a fluir la fase A (amortiguador) pues de lo contrario, en el desarrollo del gradiente, de la línea base caería por debajo de cero al irse enriqueciendo con acetonitrilo al 60% de modo que en la computadora no podría

establecerse la línea base para la integración de cada uno de los picos.

- Gradiente de separación y cuantificación de aminoácidos

Cuando terminó el programa de acondicionamiento del equipo, se cambio el programa de acondicionamiento por el de gradiente (previamente gravado en la computadora). El programa de gradiente establecido en la técnica, tuvo que modificarse en algunos tiempos y porcentajes de las fases, debido a que los tiempos de retención de algunos aminoácidos eran muy cercanos, lo que no permitía su separación y cuantificación. A continuación se presenta el programa de gradiente empleado para esta determinación. Las modificaciones realizadas se marcaran con letra negra.

Una vez cargado el programa en la computadora, se subió poco a poco el flujo hasta 1 mL/minuto. Una vez estabilizado el flujo se inicio el programa de gradiente con el cual se efectuó la separación de los derivados de los aminoácidos.

Programa de gradiente			
Tiempo	% A	% B	Flujo (mL/min)
Inicio	100	0	1
0.5	98	2	1
11	93	7	1
19	87	13	0.7
23	72	28	1
27	72	28	1
28	70	30	1
36	67	33	1
37	0	100	1
41	0	100	1
42	100	0	1
43	100	0	1.2
64	100	0	1.2
65	100	0	1
66	0	100	1
100	0	100	1

A partir del minuto 37, el gradiente ya no tiene influencia en la separación de los derivados de los aminoácidos. A partir del minuto 66, el gradiente se diseñó para lavar la columna al finalizar cada inyección.

El orden de elución de los aminoácidos fue el siguiente:

1. Aminoquinolina (AQC)	11. Prolina
2. Aspártico	12. Cistina
3. Serina	13. Tirosina
4. Glutámico	14. Valina
5. Glicina	15. Metionina
6. Histidina	16. Lisina
7. Amoniaco	17. Isoleucina
8. Arginina	18. Leucina
9. Treonina	19. Norleucina
10. Alanina	20. Fenilalanina

Se inyectaron 10 μL de la solución estándar de aminoácidos derivatizada, durante la etapa de adecuación y 10 μL de hidrolizados de aminoácidos derivatizados en el análisis de la muestra.

Cálculos

Previamente se debe correr una solución estándar que contenga 0.2 mM de cada aminoácido con 0.1 mM de norleucina como estándar interno, para obtener de este aminograma tanto el área de cada uno de los aminoácidos como el área de la norleucina y así poder hacer los cálculos en base a los llamados equivalentes de norleucina de cada uno de los aminoácidos.

Del aminograma del hidrolizado, se debe calcular el área de cada uno de los aminoácidos, así como el área de la norleucina en el correspondiente. Para obtener el contenido en gramos del aminoácido por 16 g de nitrógeno (o 100 g de proteína) en la muestra se realiza el cálculo siguiente:

$$\text{gaa/16gN} = ((\text{Aaa} \times \text{EN} \times \text{moles} \times \text{PM} \times \text{aforo}) \times 16) / \text{ANm} \times \text{Nm}$$

Aaa = área del aminoácido en la muestra

EN = equivalentes de norleucina (Anorleucina estándar / A aminoácido estándar)

Nm = gramos de nitrógeno en muestra

ANm = área de norleucina en la muestra

Hidrólisis con HCl 6N

Se aplicaron las siguientes ecuaciones para determinar la cantidad de ácido y muestra requeridas para la hidrólisis.

$$\mathbf{A = (0.05 \times 100) / \%P}$$

$$\mathbf{B = (4 \times 100) / \%P}$$

Donde:

A = cantidad de muestra en gramos

B = cantidad de ácido (HCl 6N)

%P = porcentaje de proteína en la muestra

Se pesó dentro de un tubo de hidrólisis la cantidad de muestra requerida finamente molida y desengrasada (cuando el contenido de grasa sea mayor de 5%). Posteriormente se adicionó la cantidad de ácido requerida humedeciendo completamente la muestra.

Posteriormente se inyectó nitrógeno de altísima pureza y se cerró perfectamente con el tapón de rosca y cubierta de teflón. Se sometió a condiciones de hidrólisis en el digestor TECATOR, la cuales fueron de 145°C ± 1 y 4 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis, se dejó enfriar el tubo para posteriormente transvasar cuantitativamente a un matraz de bola de 100 mL dándole algunas lavadas con agua caliente y solución lavadora. Así mismo se adicionaron 5 mL del estándar interno de Norleucina 5 mM. El matraz de bola se colocó en el rota vapor a un

rango de temperatura de 78-80°C para eliminar el exceso de ácido clorhídrico.

El hidrolizado concentrado se filtró a través de papel filtro doble (Whatman No. 1 ó 2) sobre un buchner y kitasato y con ayuda de vacío, también se realizó un lavado con 5 mL solución lavadora. Posteriormente el hidrolizado se aforo a un volumen de 25 mL.

Preparación de hidrolizados

- Eliminación del exceso de HCl

Una vez cumplido el tiempo, se sacó el vial del horno y se dejó enfriar a temperatura ambiente dentro de una campana de extracción, deslizándolo el botón rojo a la posición de abierto para dejar escapar el ácido y los vapores que ese generan durante el proceso.

Después se abrió el vial de reacción y se sacaron los tubos con los hidrolizados, se enjuagaron de la parte exterior con agua para quitar el ácido y se depositaron en un vial de reacción seco.

Ya limpios los tubos se procedió a eliminar el exceso de ácido del interior de estos con ayuda de vacío. Para ello se tapó el vial asegurando que la tapa se encontrará en posición de abierto, se introdujo en la estación de trabajo y se abrió el vacío hasta alcanzar 1-2 Torr, se mantuvo abierto hasta que la lectura del manómetro de la estación de trabajo fue de 50-70 miliTorr. Posteriormente se cerró

el vial y el vacío, conservando así los hidrolizados en una atmósfera inerte hasta su posterior preparación.

- Preparación de muestra: re-hidratación del hidrolizado

A cada tubo con hidrolizado se agregaron 100 μ L de norleucina 5 mM-HCl 10 mM, la norleucina se emplea como estándar interno y el HCl para rehidratar y extraer los aminoácidos del tubo de hidrólisis. Se agito en vórtex durante un minuto para después agregar 100 μ L de acetonitrilo 20%, agitando un minuto más en vórtex para transferir después cuantitativamente a un matraz volumétrico de 1 ó 5 mL con ayuda de una pipeta Pasteur, se lavo con acetonitrilo al 20% (en total, 400 μ L en el caso del aforo a 1 mL y hasta 2.5 mL en le caso del volumen de aforo de 5 mL; en adiciones de 100 en 100 μ L) y se agito cuando fue necesario, hasta que la solución de lavado fue incolora, transfiriendo cuantitativamente el contenido de cada paso de lavado al matraz volumétrico de 5 ó 1 mL, según el caso.

El lavado con acetonitrilo permitió mejorar la extracción de los aminoácidos menos polares. La elección del volumen de aforo es función del contenido de proteína: 1 mL para muestras con un porcentaje menor al 20% y 5 mL para muestras con porcentajes mayores.

Se llevo el aforo con agua purificada (concentración final de norleucina: 0.1 mM y 0.5 mM para le volumen de aforo de 1 mL).

- Preparación de muestras: purificación y filtración

La muestra se purificó con ayuda de un cartucho Sep Pak C₁₈, el cual fue previamente activado de la siguiente manera:

Con ayuda de una jeringa a la parte mas larga, se hicieron pasar lentamente 6 mL de acetonitrilo grado HPLC por el caucho (1-2 mL/min) e inmediatamente después se hicieron pasar 6 mL de agua purificada.

Una vez activado el cartucho y sin que se secase, se hicieron pasar 5 mL de la muestra, desechando los primeros 2 mL (para eliminar la mezcla de hidrolizado en el agua remanente de la activación) y recolectado en un tubo de ensayo y resto de la muestra que contiene los aminoácidos.

Ya purificada la muestra, se filtró a través de un acrodisco de nylon de 0.2 µm de tamaño de poro, conectado en la punta a una jeringa con la muestra purificada desechándose las primeras 3-5 gotas y recuperándose el resto del cual fue tomada la alícuota para derivatizar los aminoácidos.

- Análisis cromatográfico

Una vez purificado y filtrado el hidrolizado de la muestra, se derivatizaron 10 µL de éste de la forma descrita. Ya derivatizado se inyectaron en el cromatógrafo, con las condiciones ya indicadas, de 5-20 µL (5 µL para muestras con porcentajes de proteína elevados y 20 µL para muestras con porcentajes de proteína bajos), con el

objeto de generar respuestas dentro del intervalo lineal, para todos los aminoácidos.

❖ **4.3.14 Determinación de triptofano por hidrólisis alcalina** ^(34,35)

Fundamento

El método se basa en la condensación del triptofano con el p-dimetilaminobenzaldehído en medio ácido. Dicho producto de condensación es tratado con solución de nitrito de sodio, produciéndose una coloración azul proporcional a la cantidad de triptofano presente en la muestra. En la figura 3, que se muestra a continuación, se presenta dicha reacción.

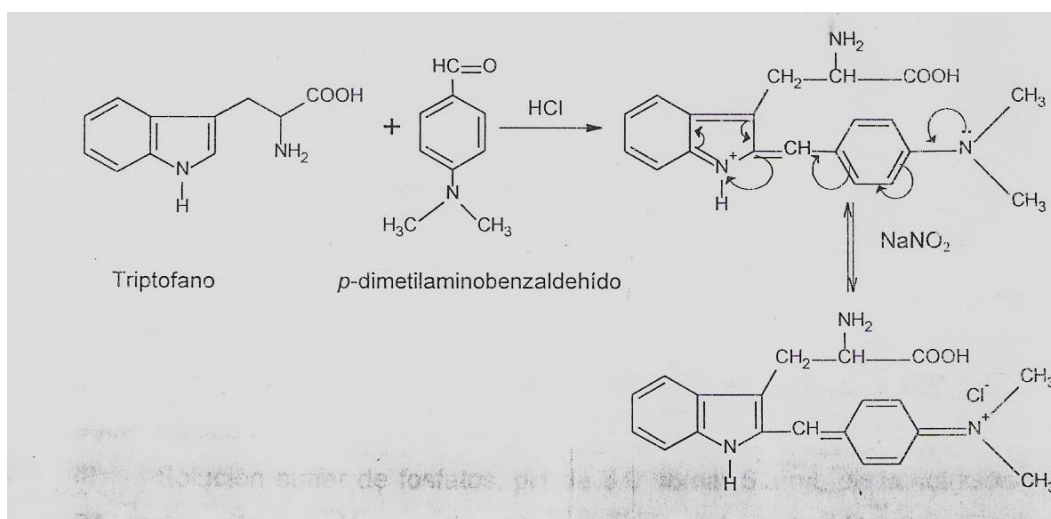


Figura 3. Reacción química para el desarrollo de color del triptofano con p-dimetilaminobenzaldehído.

Material, Equipo y Reactivos

- Digestor marca TECATOR mod. 1001-LTN
- Rotavapor marca BUCHI, mod. R.
- Potenciómetro marca CORNING, mod. 10.
- Espectrofotómetro
- Balanza analítica
- Agitador Vortex marca LAB-LINE INSTRUMENTS, mod. Super-mixer # 1290
- Pipetas graduadas de vidrio de 1, 2 y 10 mL
- Propipetas
- Tubos de ensayo de 16x150 mm
- Gradilla para tubos de 6x150 mm
- Matraces aforados de 50 mL
- Papel filtro (filtración rápida)
- Embudo de vidrio tallo corto
- Tubos de cultivo de pared gruesa con tapón de rosca y cubierta de teflón marca PYREX No. 9826.
- Hidróxido de litio 4N
- Ácido orto-fosfórico concentrado (85%)
- Solución lavadora (I)
- Ácido clorhídrico concentrado R.A. (II)
- Triptofano RA. MERCK-1 08374 (III)
- p-dimetilaminobenzaldehído R.A (IV)
- Nitrito de sodio RA. (V)

Preparación de Reactivos

- I) Solución lavadora: Agua-Etanol (3:1; v/v) con hidroquinona al 0.01% como agente antioxidante.
- II) Solución de ácido clorhídrico 0.1 N: preparar 250 mL de esta solución.
- III) Solución estándar de triptofano (0.05 mg/mL): pesar 12.5 mg de triptofano (MERCK 108374) y aforar a 250 mL con agua destilada.
- IV) Solución de p-dimetilaminobenzaldehído (PDAB) al 0.5%: pesar 0.5 g de PDAB y disolverlos con HCl concentrado, aforar a 100 mL con HCL concentrado.
- V) Nitrito de sodio al 0.2%: Pesar 200 mg de nitrito de sodio y aforar a 100 mL con agua destilada.

Procedimiento

Se pesó la cantidad de muestra finamente molida y desengrasada de un tubo de hidrólisis. Hay que hacer notar que la muestra se colocó con un contenido ligeramente mayor del 3% por lo cual se debió adicionar un antiespumante (Antiespumante Sigma "A" de 5 a 10 gotitas por tubo). A continuación se adicionó con mucho cuidado la cantidad de alcali requerida tratando de que la muestra se

humedeciera con dicho reactivo ayudándose con un agitador mecánico (Vortex).

$$A = \frac{0.1 \times 100}{\%P}$$

$$B = \frac{4 \times 100}{\%P}$$

Donde:

A = cantidad de muestra (g)

B = cantidad de alcali (LiOH 4N)

%P = porcentaje de proteína en la muestra

Se le inyecta nitrógeno de altísima pureza y se procede a cerrar perfectamente con el tapón de rosca y cubierta de teflón. Se colocaron los tubos en el digestor y la hidrólisis se realizó a 145°C, estimando el tiempo de acuerdo al contenido de proteína de muestra.

Contenido de proteína	Tiempo de hidrólisis
9-35%	8 horas
35-64%	6 horas
64-91%	4 horas

Una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis se dejó enfriar el tubo y se transvasó cuantitativamente el contenido de él a un vaso de precipitado, dándole algunas lavadas al tubo con agua caliente y solución lavadora. A continuación se procedió a ajustar el pH del hidrolizado cerca de la neutralidad con ácido orto-fosfórico concentrado, con la ayuda de un potenciómetro (6.8 ± 0.2). Se procedió a eliminar el precipitado por filtración con ayuda de vacío sobre papel Watman doble de 542 dando algunas lavadas con agua caliente y solución lavadora al vaso para que a su vez lavara el residuo del papel filtro.

El hidrolizado filtrado se pasó a un matraz de bola y con ayuda de un rotavapor se eliminó el exceso de solvente para poder llevar el volumen de hidrolizado a < 25 mL. Se volvió a filtrar el mismo residuo del paso anterior para eliminar las partículas finas que se formaron cuando se concentró el hidrolizado en el rotavapor. Por último se llevó el volumen del hidrolizado a 25 mL en un matraz aforado.

Se tomaron tres alícuotas de 2 mL cada una. Una de ellas correspondió al blanco de la muestra, al cual se le adicionaron 7.5 mL de HCl concentrado. A las dos alícuotas restantes se les agregaron 7.5 mL de PDAB, se agitaron y se dejaron en reposo por 15 minutos en la oscuridad. Después de este tiempo se les agregaron a los tres

tubos 0.5 mL de la solución de nitrito de sodio, se agitaron y se dejaron otros 15 minutos en reposo. Por ultimo se leyó la absorbancia a 590 nm.

Elaboración de la curva estándar:

Se hizo una curva estándar de 0 a 100 µg de triptofano. Se tomaron 0.0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, y 2.0 mL de la solución estándar de triptofano. Se llevó a 2 mL cada uno de los tubos con agua destilada y adicionaron 7.5 mL de PDAB. Se agitaron y dejaron 15 minutos en la oscuridad, posteriormente se agregaron 0.5 mL de la solución de nitrito de sodio, se agitaron y dejaron en reposo por 15 minutos. Y después se leyó la absorbancia a 590 nm.

Cálculos

A los tubos de la muestra se les restó la absorbancia del blanco de la muestra y el resultado se interpoló en la curva estándar, considerando el aforo y la alícuota utilizados.

Recordando que para reportar el triptofano en g/100g de proteína fue necesario conocer el porcentaje de proteína de la muestra.

$$\text{g de triptofano / 100 g muestra} = \frac{\delta \times A \times 100 \times 1}{a \times M \times (1 \times 10^6)}$$

Donde:

δ = μg de triptofano obtenido por interpolación

A = Aforo

a = alícuota

M = peso de la muestra (g) N (1×10^6)

❖ **4.3.15 Determinación de la Relación de Eficiencia Proteínica (REP)**

Preparación de la Dieta para la Prueba Biológica de REP

Con el fin de evaluar la calidad nutricia de una proteína fue necesario elaborar una dieta isoproteínica e isoenergética con respecto a la dieta de referencia, que en la mayoría de los estudios es caseína.

Para elaborar la dieta fue indispensable contar con el análisis proximal del la flor de ***M. oleífera*** para poder ajustar los nutrimentos a la composición de la dieta de referencia y hacer las comparaciones pertinentes.

Material requerido para la preparación de la dieta

- Balanza granataria
- Recipientes para pesar
- Caseína* (MP Biomedicals inc., 901293)
- Sacarosa (comercial Salwil®)
- Glucosa (USP Comercial Química BARSA)
- Dextrina (Maizena®)
- Aceite de maíz (Mazola®)
- Manteca vegetal (INCA)
- Mezcla de vitaminas* (MP Biomedicals inc., 904654)
- Mezcla de minerales* (MP Biomedicals inc., 902842)
- Celulosa (SIGMA C-8002)

*Estos ingredientes se adquieren a través de casas comerciales internacionales especializadas.

Procedimiento de preparación de dietas:

Tabla 3. Dieta de referencia (caseína)

Ingredientes	g/100g de dieta
Caseína (94.3% de proteína) ^a	10.5
sacarosa ^b	22.0
glucosa ^c	19.0
Dextrina ^d	25.0
manteca vegetal ^e	8.0
aceite de maíz o cártamo ^f	6.0
mezcla de sales ^g	4.0
mezcla de vitaminas ^h	2.0
Celulosa	3.5
total	100.0

Marcas empleadas: ^a caseína MP Biomedicals inc., 901293, ^b Sacarosa comercial Salwil®, ^c uso Comercial Química BARSA, ^d Dextrina comercial Maizena®, ^e Manteca INCA, ^f Aceite comercial Mazola, ^g minerales MP Biomedicals inc., 902842, ^h Vitaminas MP Biomedicals inc, 904654.

Se preparó la dieta con flor de ***Moringa oleífera***. Es fundamental en la prueba biológica que la dieta esté correctamente preparada. Para que la dieta sea isoproteica e isocalórica con respecto a la dieta de

referencia (caseína) fue necesario tener el análisis proximal que se presenta a continuación.

Tabla 4. Análisis proximal de ***Moringa oleífera***

Determinación	Contenido (g/100g_m)
Humedad (Pérdida por secado)	2.19 ± 0.032
Cenizas (550°C)	9.18 ± 0.046
Proteína (%N x 6.25)	16.46 ± 0.069
Grasa	3.08 ± 0.136
Fibra Cruda	9.52 ± 0.505
Carbohidratos (Por diferencia)	65.7

Se realizaron los cálculos necesarios para así obtener la siguiente formulación de la dieta para ***M. oleífera***.

Tabla 5. Dieta de *Moringa oleífera*

Ingredientes	g/100g de dieta
Fuente de proteína	60.75
Sacarosa	9.90
Glucosa	8.50
Dextrina	9.50
Manteca vegetal	6.90
Aceite de maíz o cártamo	5.10
Mezcla de sales	1.50
Mezcla de vitaminas	2.00
	Σ 104.15

Nota: se realizaron algunos ajustes para obtener resultados más óptimos, los cuales consistieron en reducir ligeramente los carbohidratos para ajustar la dieta a 100%.

Una vez elaborada la dieta fue necesario realizar la determinación de proteína en la misma por el método de microKjeldahl siguiendo la metodología descrita anteriormente.

Selección y Preparación de los Animales

Para el método de REP se acepta que la ganancia en peso de los animales de ensayo provee una medida confiable del valor nutricional de la fuente de proteína en una dieta; sin embargo, ya que factores tales como la edad, sexo, periodo de ensayo, nivel de proteína entre otros, definitivamente afectan la determinación de la REP, a continuación se mencionan los mínimos requerimientos para llevar a cabo este bioensayo.

Se deben emplear ratas macho Wistar o Sprague Dowley ya que los expertos en estos bioensayos manifiestan que en los estudios de nutrición realizados con estas especies de roedor, su crecimiento refleja fielmente la calidad nutricional de su alimentación; además, las ratas son poco sensibles a los factores ambientales e infecciosos a diferencia de otros roedores. Las ratas deben ser de 21 a 23 días de edad (recién destetadas) y el intervalo de peso de las ratas no debe rebasar los 10 gramos.

El periodo de ensayo va de 21 a 28 días y deben mantenerse con alimento y agua ***ad libitum***, en condiciones de 12 horas de iluminación por 12 horas de oscuridad con una temperatura de 23 a 24°C y una humedad relativa entre 30 a 35 %.

Reactivos y Material Especial

- Dieta de referencia (Caseína)
- Dieta de la fuente de proteína a evaluar (isoproteínica e isoenergética)
- Jaulas individuales de acero inoxidable
- Comederos y bebederos
- Balanza granataria para pesar animales pequeños de laboratorio
- Balanza analítica (Sartorius Analytic)
- Papel Manila
- Cernidor (de 2 ± 0.5 mm de abertura)
- Franela o un trapo limpio

Procedimiento

El número de ratas para cada lote de la dieta de estudio y la de control (caseína) fue de 6 ratas por lote. Todos los animales se pesaron y después se ordenaron los pesos de forma ascendente:

$$P_1, P_2, P_3, P_4, P_5, P_6, P_7, P_8, P_9, \dots, P_n$$

Se colocaron los animales en las jaulas individuales del estante metálico, siguiendo la distribución de "culebra japonesa" como se indica a continuación:

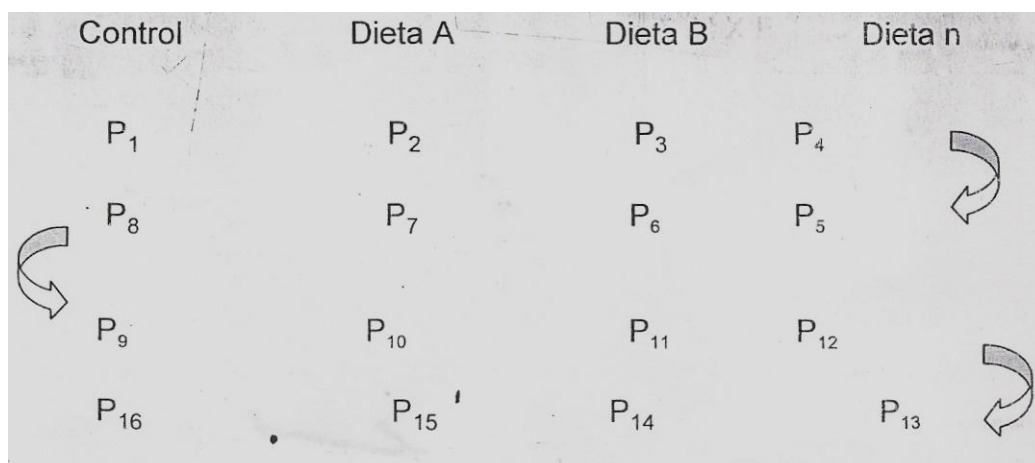


Figura 4. Culebra japonesa.

Una vez distribuidos los animales en las jaulas individuales se les colocó el comedero con la dieta correspondiente, en cantidad que siempre contuvo exceso de alimento para que su consumo fuera ***ad Libitum***, lo mismo se debe hacer con el bebedero. Como las ratas al alimentarse tienden a desperdiciar alimento, fue conveniente colocar debajo de cada jaula una charola hecha con papel manila para recuperar este alimento separándolo de las heces con la ayuda de un cernidor y considerar el alimento real ingerido. Los animales se pesaron cada tercer día (lunes, miércoles y viernes) y se registró el peso de cada rata y el alimento ingerido considerando el alimento recolectado de la charola de papel manila. Esto se realizó durante los 21 días que duró el experimento.

Para llevar a cabo el control de datos, fue necesario contar con un formato para anotar adecuadamente los resultados obtenidos a través del periodo de experimentación. (VER ANEXO: FORMATO)

Cálculos

Contando con los resultados al final del experimento, se procedió a calcular la REP de cada una de los animales, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$REP = \frac{AP}{\sum AI \times F}$$

Donde:

AP = Incremento de peso (expresado en gramos)

$\sum AI$ = Alimento ingerido acumulado o total (expresado en gramos)

F = factor de conversión unitario de alimento a proteína (% de proteína en la dieta/100)

Ya que los métodos biológicos con mucha frecuencia presentan variación interlaboratorio, no es sorprendente que exista una variación considerable entre los laboratorios, en la obtención del valor absoluto de una variable biológica y como la REP no es la excepción, algunos investigadores han sugerido expresar el valor de la REP en términos de Relación de Eficiencia Proteínica ajustada o corregida

(REP_a); para lo cual, es necesario contar con el valor experimental de este índice biológico del lote de animales alimentados con la dieta de caseína (referencia) que cumplan los requisitos mínimos de experimentación. Se le ha asignado un valor estandarizado de REP de 2.5 a la proteína de referencia; por tal motivo, es conveniente informar el resultado en términos de REP_a:

$$REP_a = REP \text{ PRUEBA } \frac{REP \text{ CASEÍNA }_{std}}{REP \text{ CASEÍNA }_{exp}}$$

Donde:

REP (PRUEBA) = REP experimental de la proteína a evaluar

REP (CASEÍNA)_{std} = REP de caseína estandarizado = 2.5

REP (CASEÍNA)_{exp} = REP de caseína obtenido en el presente
experimento

4.3.16 Determinación de la Digestibilidad Proteínica *in vivo*

Reactivos y Material Especial

Se trabajó sobre el diseño experimental del bioensayo REP; además, se contó con todo lo necesario para determinar nitrógeno por microKjeldahl y adicionalmente sólo se requirió de lo siguiente:

- Frascos de plástico de boca ancha con tapa de aproximadamente 200 mL
- Cernidor con malla de 8 ó equivalente
- Mortero con pistilo
- Estufa de circulación forzada
- Balanza analítica

Procedimiento

Dentro del mismo ensayo biológico para la evaluación de la calidad de la proteína (REP), se recolectaron las heces de forma individual de los animales durante la última semana. El total de heces de cada animal en el periodo indicado, se colocaron en un recipiente de plástico. Una vez secas, se pesaron para contar con el peso total de este material biológico y se molieron para obtener el material lo más homogéneo posible.

Con el material homogéneo de cada animal, se tomó una muestra representativa del total de heces para determinarles la concentración de nitrógeno por microKjeldahl siguiendo la metodología descrita anteriormente, para lo cual se pesó 100 mg de heces.

Para calcular la digestibilidad, se requirió conocer el contenido de nitrógeno de las heces (NF), pero además, es necesario contar con el

nitrógeno ingerido (NI) durante el mismo periodo (una semana). Lo anterior fue relativamente fácil de obtener, ya que conociendo la concentración de proteína de la dieta y la cantidad consumida en dicho periodo, se podrá obtener el nitrógeno ingerido (NI).

Cálculos

Una vez que se tuvo la concentración de nitrógeno de la dieta y de las heces de cada animal, así como del peso respectivo de heces pesadas, se pudo calcular el contenido de nitrógeno ingerido (NI) y el nitrógeno fecal (NF) de cada animal de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$NI = (\%N_{DIETA} \times \text{Dieta ingerida})/100$$

$$NF = (\%N_{HECES} \times \text{Total de heces})/100$$

Para calcular la digestibilidad in vivo se hizo uso de la siguiente

formula:

$$Da = \frac{N_{absorbido}}{N_{ingerido}} \times 100$$

$$Da = \frac{NI - NF}{NI} \times 100$$

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis Bromatológico

Las flores de moringa (*M. oleífera*), después del secado y la molienda, tenían un aspecto de harina, que presentó una buena homogenización para realizar las determinaciones anteriormente descritas.

El análisis bromatológico de la flor de *Moringa oleífera* se presenta en la tabla 6, cabe mencionar que los valores se refieren a la flor en fresco.

Tabla 6. Composición proximal de las flores de Moringa, por cada 100g de muestra en fresco.¹

Determinación	Contenido
Humedad	84.8 ± 0.18
Cenizas	1.14 ± 0.22
Proteína ²	2.77 ± 0.41
Grasa	0.50 ± 0.10
Fibra Cruda	0.89 ± 0.46
Hidratos de Carbono por diferencia ³	9.99

¹ Se muestran los valores promedio ± desviación estándar (n=3), CV < 5%

² Proteína (Nx6.25)

³ Hidratos de Carbono calculados por diferencia.

Como se puede ver en la tabla 6, el contenido de humedad bruta encontrada es muy alta, lo cual es un factor muy característico de las vegetales frescos.

Para discutir los resultados del análisis proximal en forma comparativa, se presenta en la tabla 7 los valores en base seca.

Tabla 7. Composición proximal de flores de Moringa, por cada 100g de muestra en base seca (bs).¹

Determinación	Contenido
Cenizas	7.52 ± 0.22
Proteína ²	18.2 ± 0.41
Grasa	3.32± 0.10
Fibra Cruda	5.81 ± 0.46
Hidratos de Carbono por diferencia ³	65.7

¹ Se muestran los valores promedio ± desviación estándar (n=3), CV < 5%

² Proteína (Nx6.25)

³ Hidratos de Carbono calculados por diferencia.

La flor de ***Moringa oleífera*** presentó en el análisis proximal un contenido de proteína menor al reportado para otras partes del árbol como son semillas y hojas, lo cual se debe a que las distintas partes del árbol tienen una fisiología diferente, sin embargo su valor proteínico es importante dentro de su categoría de flor, es decir tiene

un valor significativo de proteína en comparación con otras flores comestibles.

Para ubicar a la flor en cuanto a su contenido de proteína podemos compararla con el encontrado para algunas flores comestibles.

Tabla 8. Contenido proteínico de flores comestibles por cada 100g de muestra en base seca (bs).⁽¹⁹⁾

Muestra	Proteína cruda
Yuca (D.F.)	13.24
Yuca (Xalapa)	22.95
Colorín (Xalapa)	23.19
Colorín (D.F.)	21.31
Pacaya	29.20
Calabaza	26.47
Maguey	14.16
<i>Moringa oleífera</i>	18.20

Como se puede ver en el cuadro anterior la flor de ***M. oleífera*** tiene un contenido de proteína intermedio comparándola con las flores analizadas en la tabla 8, presenta mayor contenido que yuca y maguey, mientras que presenta menor contenido que la flor de calabaza, pacaya y colorín.

Así mismo el contenido graso fue muy bajo a diferencia de las semillas y hojas, mismas que han sido reportadas con un contenido muy importante de ácidos grasos insaturados principalmente.

El componente mayoritario determinado por diferencia en el análisis fueron los Hidratos de Carbono seguido por las proteínas ya mencionadas anteriormente, posteriormente están las cenizas las cuales hacen referencia al alto contenido de minerales, ya que se encontró en la bibliografía que las hojas del árbol contenían cantidades importantes de potasio, calcio, magnesio, sodio, azufre, fósforo y hierro. Por lo tanto se esperaba que el valor de cenizas fuera alto en las flores y se encontró relativamente más bajo que el reportado para hojas, sin embargo muestra un contenido importante en las flores también.

En cuanto a la fibra cruda se obtuvo un valor bajo en la determinación, el cual indica bajo contenido de materia insoluble y resistente a la degradación por enzimas digestivas.

Es importante mencionar que no existe información bibliográfica que hable de la composición bromatológica de la flor, por lo tanto no hay una referencia de comparación, por lo que las determinaciones recopiladas amplían la información sobre la flor de ***M. oleífera***.

Factores tóxicos y antinutrimientales

El contenido de factores tóxicos y factores antinutrimientales que se determinaron en la harina de la flor de ***M. oleífera*** se expone a continuación en la flor en fresco (tabla 9).

Tabla 9. Determinación de Factores tóxicos y antinutricionales en flores de Moringa (base original)¹

Determinación	Contenido
Inhibidores de tripsina	0.24 ± 0.13 ^a
Lectinas	Titulo 3
Taninos	0.28 ± 0.036 ^b
Fitatos	0.033 ± 0.015 ^b
Glucósidos cianogénicos	NEGATIVO
Nitratos	0.02 ± 0.01 ^b
Saponinas	NEGATIVO

¹ Se muestran los valores promedio ± desviación estándar (n=3), CV < 5%

^a Se reporta UTI/mg de muestra.

^b Se reporta en g/100g de muestra.

Como se puede ver en la tabla 9 los valores de tóxicos y factores antinutrimientales son muy bajos por la gran cantidad de agua que presenta la flor, así mismo se confirma su seguridad alimentaria.

Los valores de la tabla 9 se convirtieron a base seca para discutir los resultados de manera adecuada y presentarlos en una base uniforme.

Tabla 10. Determinación de Factores tóxicos y antinutricionales en flores de Moringa (base Seca)¹

Determinación	Contenido
Inhibidores de tripsina	1.67 ± 0.13 ^a
Lectinas	Titulo 3
Taninos	1.86 ± 0.036 ^b
Fitatos	0.22 ± 0.015 ^b
Glucósidos cianogénicos	NEGATIVO
Nitratos	0.12 ± 0.01 ^b
Saponinas	NEGATIVO

¹ Se muestran los valores promedio ± desviación estándar (n=3), CV < 5%

^a Se reporta UTI/mg de muestra seca.

^b Se reporta en g/100g de muestra seca.

Los factores tóxicos naturales, que están presentes con frecuencia en productos vegetales, se analizaron para la flor. Se encontró que algunos de ellos se encuentran presentes en muy bajas concentraciones o incluso por abajo del límite de detección del método como en el caso de saponinas y glucósidos cianogénicos. Esto habla de la seguridad alimentaría que tiene la flor al ser consumida dentro la dieta de ciertas poblaciones rurales.

Los inhibidores de tripsina son sustancias con la capacidad de inhibir la actividad proteolítica de ciertas enzimas y el valor encontrado de este factor en la flor de moringa, fue mucho menor al valor admisible que es de 10 UTI/mg de muestra de acuerdo a la técnica de Kakade et al.

Las lectinas que tienen la propiedad de aglutinar a los glóbulos rojos sanguíneos, se determinaron en la flor encontrando un título muy bajo lo cual es un indicativo de que no representa ningún riesgo al ingerir la flor, referente a este factor tóxico.

Los taninos han demostrado tener cierta toxicidad en dosis muy elevadas (cuando los alimentos contienen aproximadamente un 5% de taninos), se ha determinado que tienen un $DL_{50} = 2260$ mg/kg por vía oral en ratas. Por lo tanto se requiere de concentraciones grandes para causar algún efecto como formar complejos con proteínas y disminuir la biodisponibilidad de las mismas; también tienen la particularidad de ser sustancias astringentes por lo que pueden generar sensaciones indeseables al ingerirlos.

En la flor se encontró un valor relativamente significativo, por lo que sería interesante evaluar el efecto de los taninos en el aprovechamiento de proteínas, sin embargo no causa ningún riesgo a la salud al ser ingeridos en la flor de Moringa. ⁽³²⁾

En cuanto al contenido de fitatos se encontró un valor bajo, que es un indicativo de una posible buena biodisponibilidad de minerales divalentes presentes en la flor.

Los nitratos tienen la capacidad de ser precursores para formar compuestos cancerígenos, no por si mismos, pero en presencia de otras sustancias, por lo tanto es muy importante su determinación, se ha encontrado que se puede consumir 100 mg/día sin daño, pero estos niveles aun están en discusión. En el caso de la flor de ***M. oleífera*** se determinaron niveles bajos de nitratos los cuales no representan ningún riesgo a la salud. ⁽³³⁾

Perfil de aminoácidos

Se llevó a cabo la determinación del perfil de aminoácidos con la finalidad de poder predecir la calidad de la proteína de la flor de ***Moringa oleífera***, así mismo permitió mostrar la cantidad de cada aminoácido para posteriormente identificar los aminoácidos deficientes, encontrando los resultados expresados en la tabla 11. Cabe señalar que este es un método químico que puede sobrestimar la calidad de la proteína puesto que no evalúa la digestibilidad de la misma, por esta razón se realizó un ensayo biológico.

Tabla 11. Determinación del Perfil de Aminoácidos.

Aminoácido	gaa/16gN	mgaa/ gN
Aspártico	5.5991	349.94
Serina	4.7323	295.77
Glutámico	17.512	1094.5
Glicina	4.062	253.88
Histidina	2.8109	175.68
Arginina	8.8783	554.89
Treonina	3.5152	219.70
Alanina	5.5196	344,98
Prolina	4.6130	288.31
Cistina	0.5303	33.14
Tirosina	4.8858	305.36
Valina	2.1619	135.12
Metionina	0.9630	60.19
Lisina	4.376	273.5
Isoleucina	3.5745	223.41
Leucina	5.9938	374.61
Fenilalanina	4.0389	252.43
Triptofano	0.5900	36.88

En la tabla 11 se puede ver como algunos aminoácidos se encuentran en menor proporción como cistina, metionina y triptofano, los mismos que con frecuencia se encuentran en bajas concentraciones en los

alimentos. Sin embargo para evaluar mejor las cantidades de los aminoácidos se llevo a cabo la Calificación Química en base a la ingesta diaria recomendada para cada uno de ellos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 12 que se presenta a continuación:

Tabla 12. Determinación de la Calificación Química en base a los requerimientos de adultos. ¹

Aminoácidos	Calificación química
Histidina	66.7226
Isoleucina	>100
Leucina	>100
Lisina	>100
Total de Azufrados	33.363
• Metionina	
• Cistina	
Total de Aromáticos	>100
• Fenilalanina	
• Tirosina	
Treonina	>100
Triptofano	44.813
Valina	>100

¹ Referencia: FAO/NHO/ONU, 1985⁽³⁷⁾

Nota: el patrón utilizado para determinar la Calificación Química se encuentra en los anexos.

En la tabla 12 se puede ver como la mayoría de los aminoácidos cumple con los requerimientos de ingesta diaria, sin embargo la histidina, los azufrados y el triptofano se encuentran en cantidades menores. Sin embargo la histidina no es considerado un aminoácido de gran importancia en los adultos sino en niños, respecto al triptofano es un aminoácido que en la mayoría de los alimentos se encuentra en proporciones bajas, por lo tanto lo importante y que determinó la calificación química, fue identificar que la flor presentó deficiencia en los aminoácidos azufrados mismos que se pudieron suplementar con facilidad en la formulación de la dieta que se utilizó en el Ensayo Biológico.

La FAO ha hecho estudios con diferentes materiales como son el frijol y la lenteja, se ha comprobado que al suplementarlos con metionina incrementan notablemente su valor biológico. Además de que estos materiales también presentaron una calificación química muy similar a la de flor de ***M. oleífera***, mismos que son deficientes en aminoácidos azufrados, por esta razón se decidió suplementar la dieta con un 0.4% de metionina. En el siguiente cuadro se puede ver el efecto en el frijol y la lenteja.

Tabla 13. Comparación de la calificación química con dos leguminosas. ⁽³⁷⁾

	Calificación química	DL- Metionina	Efecto
Fríjol	34	0.2%	Aumenta el valor biológico de 70 a 90.
Lenteja	31	0.6%	Incrementa el REP de 0.91 a 2.51

Determinación de la Eficiencia Proteínica (REP) y Digestibilidad

Se prepararon tres dietas para evaluar la calidad de la proteína ***in vivo***. En la primera fue utilizada como única fuente de proteína la flor de ***M. oleífera*** y la segunda también pero en este caso suplementada con 0.4% de metionina con el objeto de observar el efecto que tenía en el crecimiento de las ratas. Con las dietas ya mencionadas anteriormente y la dieta control de caseína se llevo a cabo el ensayo biológico encontrándose los resultados que se muestran en la tabla 14.

Tabla 14

Relación de Eficiencia Proteínica (REP)		
Dieta Evaluada	REP	REP _{ajustado}
Caseína	3.20 ^a	2.5 ^a
<i>Moringa oleífera</i>	-0.06 ^b	-1.62 ^b
<i>Moringa oleífera</i> con metionina	0.89 ^c	0.70 ^c

Se muestran los valores promedio $\pm$ desviación estándar (n=6), CV<15%.

Diferentes letras dentro de las columnas indican diferencia estadísticamente significativa.

El REP es un ensayo biológico que se basa en el incremento de peso de los animales sometidos al ensayo biológico. Mismo que arrojo resultados como se puede ver en la tabla 14, el grupo control de caseína tuvo un REP positivo y similar al esperado, ya que la dieta de este grupo tiene una fuente de proteína de buena calidad donde hay una respuesta adecuada que sirvió como referencia para comparar con las otras dos dietas. Se observó como las ratas con esta dieta tuvieron un incremento en peso directamente proporcional al tiempo del ensayo.

La dieta de ***M. oleífera*** mostró un REP negativo (-1.62) lo cual habla de un decremento en el peso de las ratas, inicialmente por el acondicionamiento a la nueva fuente de proteína que se le suministró

a las ratas recién destetadas, sin embargo esta disminución continuó durante todo el ensayo. Una posibilidad es que las ratas no desarrollaron gusto por la dieta y al consumir pocas cantidades de alimento no lograron incrementar su peso. Sin embargo por lo anterior se puede decir que la proteína de esta flor no es de buena calidad, ya que el poco alimento ingerido no permitió el crecimiento de las mismas para así incrementar el consumo posteriormente.

De acuerdo a los resultados obtenidos del bioensayo para la dieta de ***M. oleífera*** suplementada con metionina, se puede decir que se observó un comportamiento de incremento/disminución del peso corporal de los individuos ya que se observa una tendencia de disminución de peso corporal durante la primera etapa del ensayo debido a la falta de costumbre alimenticia de las ratas, mismos que son individuos recién destetados. Posteriormente al pasar de los días finalmente se observó una tendencia generalizada a la ganancia de peso, ya que los individuos comenzaron a mostrar un ligero incremento de tamaño, lo que indicó la adaptación que tuvieron los animales frente a su nueva fuente de alimentación. Una posibilidad es que si el bioensayo hubiera continuado por más tiempo, el efecto de la dieta suplementada hubiera sido más notorio en el incremento en peso de cada individuo, ya que para el final del ensayo se observó una respuesta positiva a esta dieta. Así también se pudo haber

incrementado la proporción de metionina para potenciar el efecto en el incremento en peso de los individuos.

Respeto al valor del REP se obtuvo un valor positivo de 0.70 a diferencia de la dieta sin suplementar por lo que se puede ver claramente como la dieta al ser suplementada incrementó su valor biológico de una manera notable, sin embargo aun este valor no es tan bueno por lo que se puede decir que la calidad de la proteína no es buena.

Todo lo anterior se puede ver con mayor claridad en la figura 5, donde se observa la tendencia creciente descrita para la dieta control, la tendencia decreciente de la dieta de ***M. oleífera*** y así mismo la tendencia de disminución/incremento en peso de la dieta ***M. oleífera*** con metionina.

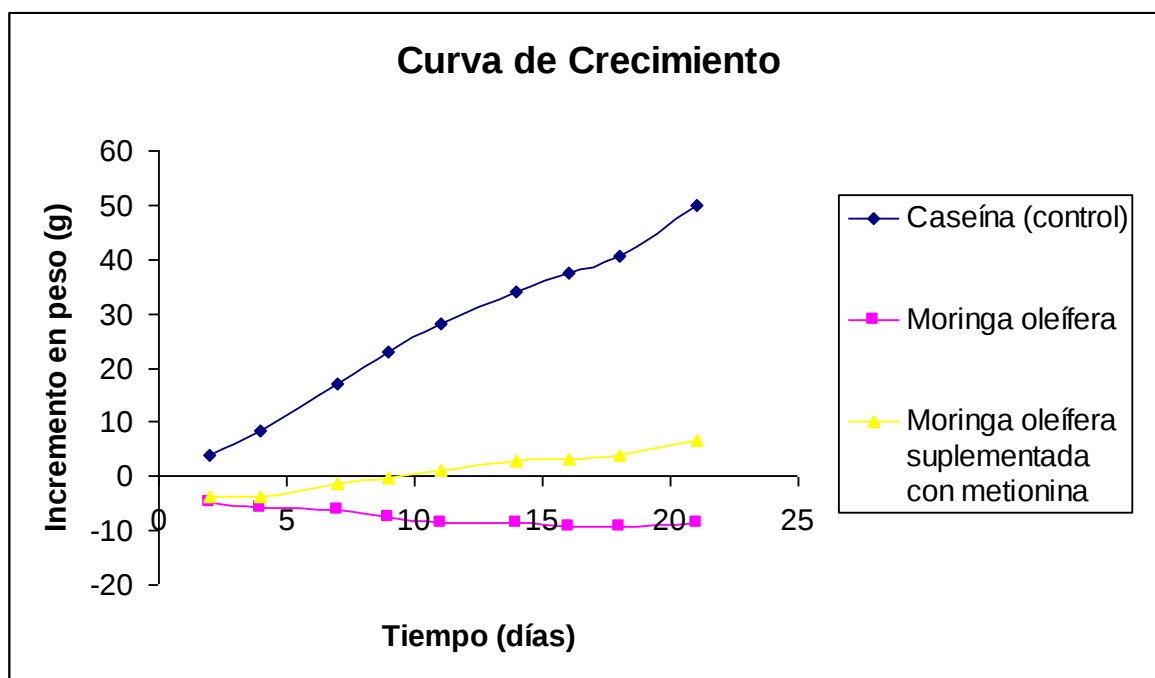


Figura 5. Curva de crecimiento.

Es importante considerar que el factor determinante del valor nutritivo de una proteína lo constituye la composición y la proporción de los aminoácidos indispensables contenidos en ella. Por lo tanto el crecimiento del animal se vio reducido por deficiencias en aminoácidos indispensables que tenga la flor de ***M. oleífera***, lo cual es muy claro al compararlo con la proteína patrón utilizada durante este ensayo biológico.

Otro factor que pudo haber interferido en la mala adaptación de los animales a la dieta fue que debido al ligeramente considerable contenido de taninos, la dieta pudo generar una sensación indeseable al ser ingerida porque se sabe que los taninos tienen la particularidad de ser sustancias astringentes.

La digestibilidad es un indicador inicial de la calidad nutritiva de un alimento que se define como: “la disponibilidad de los aminoácidos contribuyentes de la proteína para ser absorbidos por el organismo de prueba”. Por lo tanto fue indispensable su determinación para poder evaluar la calidad de la proteína de la flor. Los resultados encontrados se encuentran en la tabla 15.

Tabla 15

Digestibilidad	
Dieta Evaluada	Digestibilidad Aparente¹
Caseína	91.29 ^a
<i>Moringa</i> <i>oleífera</i> <i>Moringa</i> <i>oleífera</i> con metionina	64.27 ^b
	50.28 ^c

Se muestran los valores promedio $\pm$ desviación estándar (n=6), CV<5%.

Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas.

Digestibilidad aparente=(N₂ absorbido/N₂ retenido)x100

Como se puede ver en la tabla 15 la digestibilidad de la dieta control fue muy cercana a 100%, que se trata de una proteína de buena calidad de origen animal que tiene una excelente digestibilidad.

Por otro lado la digestibilidad observada para las otras dos dietas es mucho menor lo cual habla de una mala digestibilidad lo cual indica, como muy poco de la proteína es aprovechado por los individuos en estudio. Lo anterior pudo deberse en parte a que la fuente es de origen vegetal, por lo tanto presenta un contenido de fibra significativo y como consecuencia, presenta también una mayor velocidad de tránsito en el tracto intestinal lo que provoca una menor absorción de los nutrimentos.

También como ya se menciono antes la flor de ***M. oleífera*** presenta un contenido significativo de taninos mismo que podrían estar disminuyendo la biodisponibilidad de las proteínas, en cierta medida, al formar complejos entre si. Por la razón anterior se disminuye la digestibilidad.

Un dato curioso es que la dieta de ***M. oleífera*** presentó mejor digestibilidad que la dieta ***M. oleífera*** con metionina, lo cual no es lo que se esperaba, sin embargo lo anterior puede deberse a que la calidad de la proteína no es buena y se resalta el efecto de la variabilidad intraespecie, lo que provoca incluso una variabilidad en los datos.

Con la REP y la Digestibilidad de cada dieta se realizó un Análisis de Varianza y una prueba de Rango Múltiple (Duncan), con ayuda del

paquete estadístico SPSS V. 10.0, para determinar si había diferencia significativa entre las dietas trabajadas (en ambos casos $\alpha=0.05$).

Como se puede ver en las tablas 14 y 15 se presentan diferencias estadísticamente significativas (marcadas con letras diferentes para cada dieta) entre la dieta control, la dieta de ***M. oleífera*** y la dieta de ***M. oleífera*** suplementada con metionina. Lo cual se puede entender ya que todas las dietas provocaron un efecto muy distinto entre si en los individuos durante el estudio. Incluso entre las dos dietas de ***M. oleífera***, ya que hay una mejoría al suplementarla con metionina.

6. CONCLUSIONES

- Se aportó información de la composición química de la flor de ***Moringa oleífera***, ya que hasta el momento no existían referencias al respecto.
- La flor de ***M. oleífera*** tiene un contenido intermedio de proteína comparada con otras flores que tradicionalmente se consumen.
- Presentó cantidades muy bajas de tóxicos y factores antinutricionales naturales de acuerdo al límite de detección del método.
- La ingesta de ***M. oleífera*** no representa ningún riesgo a la salud de acuerdo a los factores tóxicos determinados, ya que la concentración de tóxicos presentes no rebasarían las dosis diarias admisibles de los xenobióticos que se encontró su IDA.
- Las flores son un alimento no tan nutritivo que forma parte de la dieta en diversas comunidades rurales, como es el caso de la Sierra de Oaxaca.

- La proteína de la flor de ***M. oleífera*** presentó deficiencias importantes en los aminoácidos azufrados y triptófano.
- Presento una mala calidad proteínica ya que el REP fue negativo para la dieta ***M. oleífera*** y bajo para la dieta ***M. oleífera*** suplementada con metionina. Aunque cabe destacar que al adicionarla con metionina se produjo un efecto positivo en la calidad de la proteína de las flores, y posiblemente si se hubiera suplementado con triptofano se hubiera mejorado la respuesta.
- La ***M. oleífera*** presento una baja digestibilidad que en parte explica la pobre calidad de las proteínas de esta fuente.
- La flor de ***M. oleífera*** no se propone como una fuente de proteína de buena calidad nutritiva y debe consumirse con otros alimentos en la dieta que suplen su deficiencia en los aminoácidos limitantes.

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1)Wilkinson, C. Edible Flowers from garden to palate. Fulcrum Publishing Goleen. Colorado, USA, pp. 135, 1993.
- (2)Sahagún, F.B. Historia General de las cosas de la Nueva España. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes, Alianza editorial Mexicana, México D.F.,pág. 56-59, 1988.
- (3)Martínez, Maximino. "Plantas Útiles de Flora Mexicana". Ediciones Botas. México D.F., pág. 414-416, 1959.
- (4)Sánchez- Machado, D.I., López-Cervantes, J., Ríos Vazquez, N.J. High-Performance liquid chromatography method to measure a-and-g.tocopherol in leaves, flowers and fresh beans from ***Moringa oleífera***. Journal of Cromatography. 1105 (1-2), 111-114, 2006.
- (5)Anhwange, B., A., Ajibola, V. O., Oniye, S.J. Chemical studies of de seeds of Moringa oleífera (LAM) and Detarium microcarpum (Guill and Sperr). Journal of Biological Sciences. 4(6), 711-715, 2004.

- (6) Makkar, H. P. S., Becker, K. Nutritional value and antinutritional components of whole and ethanol extracted ***Moringa oleífera*** leaves. *Animal feed Science and Technology*. 63 (1-4), 211-228, 1996.
- (7) Raval, D.A., Toliwal, S.D. Nutritional Study on drumstick seed (*Moringa oleífera*) oil. *Journal of the Oil Technologists Association of India (Bombay)*. 28(1), 3-5, 1996.
- (8) Lalas, Stavros; Tsaknis, John. Characterization of *Moringa oleífera* Seed Oil Variety "Periyakulam 1". *Journal of food Composition and Analysis*. 15(1), 65-77, 2002.
- (9) Richa, Gupta; Mamta Sharma. Therapeutic effects of *Moringa oleífera* on arsenic-induced toxicity in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 20, 456-464, 2005.
- (10) Gupta, Richa; Dubey, D., Kannan, G. Concomitant administration of ***Moringa oleífera*** seed powder in the remediation of arsenic-induced oxidative stress in mouse. *Cell Biology International*. 31(1), 44-56, 2007.

- (11) Kar, Ajit; Choudhary, B. A. Bio-inorganic aspects and mineral contents of *Tinospora cordifolia*, *Aegle marmelos* and **Moringa oleífera**. *Advances in Plant Sciences*. 17(2), 667-672, 2004.
- (12) Grabow, -W-O-K-; Slabbert, J. Toxicity and Mutagenicity evaluation of water coagulated with ***Moringa oleífera*** seed preparations using fish, protozoan, bacterial, coliphage, enzyme and Ames Salmonella assays. *Water-SA*. 11(1), 9-14, 1985.
- (13) Anwar, Farook; Latif, Sajid. *Moringa oleífera*: A food plant with multiple medicinal uses. *Phytotherapy- Research*. 21(1), 17-25, 2007.
- (14) Velazquez, P., Efecto del tratamiento térmico y paletizado sobre la composición química y digestibilidad de los residuos orgánicos utilizados en la alimentación de cerdos. Tesis Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México. D.F., pág. 2-3, 36, 66, 1998.
- (15) Aron, A.B. *Nutrición animal*. Acribia, 1era edición, Zaragoza., pág. 43-59. 79-106, 1988.

- (16) Fisher, P.B., Valor nutritivo de lo alimentos. Limusa. 1era Edición, México D.F., pág. 138-139, 149, 2000.
- (17) Brian, A. F., Allan, G.C., Ciencia de los alimentos, nutrición y salud. Limusa Noriega Editores, 5º edición, México D.F., pág. 113-129, 1997.
- (18) López Velasco, G. Estudio de la Composición y Valor Nutricio de los Residuos de Uva (*Vitis vinifera*) y su Posible Uso en la Alimentación Animal. Tesis Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México D.F. pág. 43, 45-47, 53, 55-56, 2003.
- (19) Gil, L. Determinación nutricional de algunas flores. Tesis Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México D.F., pág. 11-16, 68, 1993.
- (20) Lopez Estrada, M. Determinación de factores tóxicos en varias almendras no tradicionales con potencial aporte de proteína y grasa dietética. Tesis Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México D.F., pág. 22-23, 2000.
- (21) Wiliams, S. Official Métodos of Analisis of the Association of Analytical Chemists, AOAC, Washington D.C., Methods: 14.004, 7.009, 7.063, 7.074, 1989.

- (22) Kira, R.S., Sawyer, R., Egan, H. Composición y Análisis de Alimentos de Pearson. CECSA, 2da Edición, México D.F., pág. 12-29, 36-37, 199-250, 397, 671-721, 1996.
- (23) Internacional for Standarization Organization. Sorghum. Determination of tannin content (ISO 9648), 1era edición, 1998.
- (24) Kakade, M.L., Rackis, J.J., Mc Ghee, J.E., Puski, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. A collaborative analysis of on improved procedure. Cereal Chemistry. 51: 376-382, 1974.
- (25) Jaffe, W.G., Levy, A., Gonzalez, D.I. Isolation and partial characterization of bean phytohemagglutinins. Phytochemistry. 13; 2685-2693.
- (26) Frühbeck, G., Alonso, R., Marzo, F., Santillan, S.A. modified method for de indirect quantitative analysis of phytate in foodstuffs. Analytical Biochemistry. 225:206-211, 1995.
- (27) Mendoza, J.B., Validación de una metodología para la determinación de ácido fítico en alimentos. Tesis. UNAM. México D.F., pág. 50-52, 82-85, 2001.

- (28) Lucas, B., Sotelo, A. A simplified test for the quantification of cyanogenic glucosides in wild and cultivated. Nutritional Report International. 29:711-719, 1984.
- (29) Wolfgang H and Hans-Joachim L. Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. Journal of the Science of Food and Agriculture. 34, 1423-1426.
- (30) Giron, M. (1992). Determinación Semicuantitativa de Saponinas en Muestras Vegetales aprovechando su capacidad hemolítica. Tesis, Facultad de Química, UNAM, México D.F., 1983.
- (31) Guzmán, E. Evaluación Nutritiva y Toxicológica de la inflorescencia del Huauzontle (***Chenopodium nuttalliae***) cruda y cocida. Tesis Licenciatura. Facultad de Química, México D.F., pág. 38, 2007.
- (32) Lewis, Richard. Sax's Dangerous Properties of industrial materials. 8th Ed., Van Nostrand Reinhold, NY, pp. 309, 2003.
- (33) Derache, R. Toxicología y seguridad en los alimentos. Ed. Omega, Madrid, pág. 238, 1990.

- (34) Lucas, B. and Sotelo, A. "Effecto of different alkalies, temperature and hydrolysis times on tryptophano determination of pure proteins and of foods". Analytical Biochemistry. 109, 192-197, 1980.
- (35) Rao, R.M.. "Colorimetric estimation of tryptophano content of pulses". Journal of Food Science and Technology. 11,213-216 (1974).
- (36) Robinson, David S.. "Bioquímica y Valor Nutritivo de los Alimentos". Ed. Acribia, S.A., Zaragoza, pág. 123, 1991.
- (37) FAO, Contenido de aminoácidos de los alimentos y datos biológicos sobre las proteínas. Estudio de nutrición No. 24, Publicación de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación, Roma, pág. 50, 55, 222, 214-215, 1976.

8. ANEXOS

Tabla de registro de datos para los animales del bioensayo

Rata: _____ Sexo: _____ Peso inicial (P_i): _____ Dieta: _____									
Fecha: _____									
Tiempo (días)									
Peso animal ($P_{\text{día}}$)									
Incremento acumulado ($P_{\text{día}} - P_i$)									
Alimento inicial (I)									
Alimento final (F)									
Alimento ingerido ($AI = I - F$)									
Alimento acumulado ($\sum AI$) _{día}									
Observaciones: _____									

Determinación de la calificación química

Requerimientos de aminoácidos en humanos adultos sanos.

Aminoácido	Requerimiento (mg/kg/día)
Histidina	16
Isoleucina	13
Leucina	19
Lisina	16
Metionina y Cistina	17
Fenilalanina y Tirosina	19
Treonina	9
Triptófano	5
Valina	13
FAO/NHO/ONU, 1985⁽³⁵⁾	

El contenido de cada aminoácido esencial en las proteínas de un alimento (Ax) se expresa, en primer lugar, como una relación total de los aminoácidos esenciales (Ex) en el alimento. A continuación, estas relaciones se expresan como porcentajes de las relaciones entre cada aminoácido en los requerimientos para un adulto (Ae) y el total de los aminoácidos esenciales requeridos para un adulto (Ee). El menor de todos estos porcentajes es la calificación química.

$$\frac{(Ax)(Ee)}{(Ae)(Ex)} \times 100$$

Donde:

Ae: aminoácidos requeridos para un adulto sano.

Ax: aminoácidos contenidos en un alimento.

Ee: total de aminoácidos esenciales requeridos para un adulto sano.

Ex: total de aminoácidos esenciales contenidos un alimento.

Ejemplo de cálculo para la histidina (28.10 mg_{aa}):

$$\frac{(28.10)(127)}{(16)(334.40)} \times 100 = 66.69$$

Imágenes del árbol de **Moringa oleífera**





