



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN BROMATOLÓGICA Y DETERMINACIÓN DE
FACTORES TÓXICOS NATURALES EN SEIS VARIEDADES DE
VERDOLAGA (*Portulaca oleracea* L.) DE USO
ALIMENTICIO.**

TESIS

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

DIRECTOR DE TESIS

M. en C. BERNARDO LUCAS FLORENTINO



PRESENTA

JANET TERRON TIZATL

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: M. EN C. BERNARDO LUCAS FLORENTINO

VOCAL: M. EN C. LUCÍA CORNEJO BARRERA

SECRETARIO: Q.F.B. JUAN DIEGO ORTIZ PALMA PÉREZ

1er. SUPLENTE: DRA. ILIANA ELVIRA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

2° SUPLENTE: M. EN C. TANIA GÓMEZ SIERRA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**SE DESARROLLÓ EN EL ANEXO DE LOS LABORATORIOS 4B Y 4C DEL EDIFICIO A.
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

M. EN C. BERNARDO LUCAS FLORENTINO

SUPERVISOR TÉCNICO:

DR. ROBERT ARTHUR BYE BOETTLER

SUSTENTANTE:

JANET TERRON TIZATL

ÍNDICE	Página
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. OBJETIVOS.....	4
3.1 Objetivo general.....	4
3.2 Objetivos particulares.....	4
4. GENERALIDADES.....	5
4.1 Quelites.....	5
4.2 <i>Portulaca oleracea</i> L.....	7
4.3 Composición bromatológica.....	11
4.3.1 Análisis bromatológico.....	11
4.3.2 Agua.....	11
4.3.3 Proteína.....	12
4.3.4 Grasa.....	13
4.3.5 Fibra cruda.....	13
4.3.6 Cenizas.....	14
4.3.7 Hidratos de carbono.....	14
4.4 Complementación bromatológica.....	14
4.4.1 Digestibilidad proteínica <i>in vitro</i>	14
4.4.2 Calcio.....	15
4.4.3 Hierro.....	16
4.5 Factores tóxicos.....	17
4.5.1 Agentes antinutrimientales.....	17
4.5.1.1 Inhibidores de tripsina.....	17
4.5.1.2 Oxalatos.....	18
4.5.1.3 Fitatos.....	19
4.5.2 Agentes tóxicos.....	19
4.5.2.1 Nitratos.....	19
4.5.2.2 Saponinas.....	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1 Obtención del material biológico.....	22
5.1.1 Humedad original.....	25

5.2	Análisis químico bromatológico	25
5.2.1	Humedad analítica	25
5.2.2	Proteína cruda	26
5.2.3	Grasa cruda	26
5.2.4	Cenizas	26
5.2.5	Fibra cruda	27
5.3	Complementación bromatológica	27
5.3.1	Digestibilidad proteínica <i>in vitro</i>	27
5.3.2	Determinación de calcio y hierro	29
5.4	Toxicología analítica	30
5.4.1	Agentes antinutricionales	30
5.4.1.1	Inhibidores de tripsina	30
5.4.1.2	Oxalatos	33
5.4.1.3	Fitatos	36
5.4.2	Agentes tóxicos	39
5.4.2.1	Nitratos	39
5.4.2.2	Saponinas	42
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
6.1	Análisis químico bromatológico, digestibilidad proteínica <i>in vitro</i> , calcio y hierro.	47
6.1.1	Humedad	50
6.1.2	Proteína cruda	51
6.1.3	Grasa	52
6.1.4	Cenizas	53
6.1.5	Fibra cruda	54
6.1.6	Hidratos de carbono	55
6.1.7	Digestibilidad proteínica <i>in vitro</i>	56
6.1.8	Calcio y hierro	56
6.2	Factores tóxicos: inhibidores de tripsina, oxalatos, fitatos, saponinas y nitratos.	58
6.2.1	Agentes antinutrimientales.	59

6.2.1.1	Inhibidores de tripsina	59
6.2.1.2	Oxalatos	60
6.2.1.3	Fitatos	62
6.2.2	Agentes tóxicos	63
6.2.2.1	Nitratos	63
6.2.2.2	Saponinas	64
7.	CONCLUSIONES	66
8.	BIBLIOGRAFÍA	68

1. RESUMEN

En la realización de este proyecto, se evaluó la composición bromatológica y algunos factores tóxicos presentes en esta planta suculenta, así como la calidad de la proteína presente en las diferentes variedades de *Portulaca oleracea* L. cultivadas en diferentes regiones del país. *Portulaca oleracea* comúnmente conocida como verdolaga. Está reportada, por muchos autores como una planta con muchos beneficios, es el quelite de mayor consumo en México, y es una de las fuentes principales de proteína en poblaciones rurales. De acuerdo a algunos artículos, tiene muchos principios bioactivos y acumula ciertos principios tóxicos como los nitratos, fitatos y oxalatos los cuales repercuten en la asimilación de nutrimentos por el organismo. Por lo cual fue necesario caracterizar este recurso vegetal, nutrimental y toxicológicamente.

Gracias a la colaboración del Dr. Robert Bye Boettler, investigador del Instituto de Biología, se consiguieron las diferentes variedades de *Portulaca oleracea* con las que se trabajó. Dentro del análisis bromatológico realizado, se obtuvieron valores de proteína de hasta un 23.02%, un contenido de cenizas de hasta 28.18% y valores de fibra de hasta 15.94%; el contenido de grasa fue muy bajo, lo cual es un buen perfil de nutrimentos para un alimento de origen vegetal. El porcentaje de digestibilidad proteínica *in vitro* fue de hasta 71.35%, el cual fue un valor normal para un vegetal. Se determinaron calcio y hierro ya que son los minerales de mayor importancia nutrimental, siendo para calcio de hasta 1.16% y hierro de hasta 76.22 mg de hierro por 100 g de muestra. En el caso de los factores tóxicos, los inhibidores de tripsina y saponinas se encontraron por debajo del límite que representa un riesgo para la salud. Los oxalatos se encontraron con valores de hasta 8.82%, lo que implica un daño principalmente a nivel renal, y los fitatos llegaron a valores muy altos de 9.45%, lo que involucra un problema en la absorción de minerales. Los nitratos tuvieron valores altos de hasta 8.74%, que rebasan la IDA que es de 3.7 mg/kg p.c./día. Por lo anterior se realizó este proyecto para prevenir cualquier afección que se pueda generar debido a su consumo o poder consumirla de forma segura.

2. INTRODUCCIÓN

México es un país que alberga los dos problemas de salud más comunes y al mismo tiempo opuestos: la desnutrición y la obesidad. Una alimentación y nutrición adecuada son la base para la supervivencia, la salud y el crecimiento del ser humano. (Córdova, 2008)

La desnutrición a largo plazo tiene efectos negativos sobre el desarrollo cognoscitivo y motor, la inmunidad y tal vez la incidencia de enfermedades crónicas degenerativas. En México, 1.5 millones de niños la padecen y es más prevalente en la región sur así como en las zonas con población indígena. (Rivera et al, 2013)

México y Estados Unidos tienen el mayor índice de obesidad mundial en adultos. Los factores principales a los cuales se atribuyen las causas del sobrepeso y la obesidad han sido el aumento en el consumo de alimentos hipercalóricos, ricos en grasas, sal y azúcar y pobres en vitaminas, minerales y fibra; así como el descenso en la actividad física principalmente en zonas urbanizadas. (Fernández et al, 2011)

Los alimentos de origen animal son de un gran valor nutricional; sin embargo, son de difícil acceso para gran parte de la población, a comparación de los alimentos de origen vegetal los cuales son de gran importancia por su disponibilidad y bajo precio. La mayor desventaja de los últimos es que las plantas llegan a acumular distintos metabolitos secundarios principalmente para defenderse de sus depredadores naturales, conocidos como agentes tóxicos y antinutricionales que son dañinos para los humanos. (Valle y Lucas, 2000)

México es un país con alta diversidad vegetal, es uno de los centros de origen de la agricultura y de domesticación de numerosas plantas. Un claro ejemplo son los quelites; como la verdolaga, que por sus altos valores en vitaminas y minerales, así como sus elevados contenidos en proteína y fibra, constituyen un valioso complemento en la alimentación de la población rural. Es una planta que tiene mucho potencial y se utiliza en las zonas indígenas para combatir el problema de desnutrición, pero también se utiliza en la dieta de las personas con obesidad por su alto contenido de fibra, además de los múltiples beneficios que se le han atribuido en la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas como

diabetes, cáncer o enfermedades cardíacas, sin dejar de lado su contenido de compuestos bioactivos. (Mera et al, 2005; Kobb, 2011; Mera et al, 2014)

Desafortunadamente en los últimos años se han tratado de aprovechar al máximo los nutrimentos de esta planta, consumiéndola en forma cruda por un sector importante de la población, pero sin tener la información suficiente para saber si es seguro su consumo, por lo cual es importante caracterizar lo mejor posible este recurso vegetal, desde el punto de vista nutricional y toxicológico.

En el presente trabajo se evalúan algunas variedades de verdolaga cultivadas en diferentes localidades y provenientes principalmente de Morelos, Edo. de México y la Ciudad de México. Se realizó el análisis proximal, así como la complementación bromatológica que incluyó la determinación de calcio y hierro así como la digestibilidad proteínica *in vitro*; además se determinaron algunos factores tóxicos como los inhibidores de tripsina, oxalatos, fitatos, saponinas y nitratos. Finalmente con los resultados obtenidos se realizó el análisis estadístico que consistió en un análisis de varianza acoplado a la prueba de rango múltiple (Duncan) para discriminar si hay diferencia significativa estadística en la variable por analizar, de acuerdo a la variedad de las verdolagas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Determinar la composición bromatológica y algunos factores tóxicos presentes en seis variedades de *Portulaca oleracea* L. procedentes de las diferentes regiones del país, para dar a conocer su importancia alimenticia.

3.2 Objetivos particulares

- Realizar la determinación del análisis bromatológico de las seis variedades de verdolaga
- Determinar la digestibilidad *in vitro* en las seis variedades de verdolagas en las que se realizó el análisis bromatológico
- Cuantificar el contenido de calcio y hierro en las seis variedades de verdolaga
- Determinar algunos factores tóxicos como: inhibidores de tripsina, oxalatos, fitatos, saponinas y nitratos
- Realizar el análisis estadístico de los diferentes parámetros químicos y la digestibilidad proteínica *in vitro*, para observar si hay diferencia significativa estadísticamente entre las diferentes variedades de verdolagas.

4. GENERALIDADES

4.1 Quelites

Puesto que la única fuente de nutrimentos orgánicos para las especies heterótrofas son otros organismos, el ser humano los utiliza como alimentos y les da ese nombre a un conjunto de tejidos, órganos o secreciones de organismos vegetales o animales. Sólo se utilizan como alimento unos cuantos cientos de especies. Esto se debe a que contener nutrimentos no es cualidad suficiente ya que los alimentos son mucho más que fuentes de nutrimentos, son importantes estimuladores sensoriales, símbolos, vínculo con los demás y elementos de identidad cultural. El término “quelites” se utiliza genéricamente para referirse a hierbas comestibles, muchas de ellas silvestres, que para la agricultura occidental moderna son “maleza”, pero para la sabia tradición mesoamericana eran alimentos que conferían variedad y riqueza sensorial y nutrimental a la dieta y que, además, son admirablemente congruentes con el ambiente. (Bye y Linares, 2000) Además de nutrimentos, los alimentos aportan un conjunto de satisfacciones sensoriales, emocionales, intelectuales, culturales y sociales y dado que la nutrición y la alimentación son procesos bio psico sociales, el valor nutritivo de un alimento tiene por lo menos tres componentes igualmente importantes que se deben sumar e integrar:

- Su valor sensorial y emocional
- Su valor social y cultural
- Su valor nutrimental

Los valores sensorial, emocional social y cultural son cualitativos y subjetivos; en otras palabras, no son expresables en forma cuantitativa y representan un punto de vista de determinada persona o colectividad sobre el grado de satisfacción de sus necesidades en estos terrenos. Son también importantes los aspectos rituales, el lugar que ocupa el alimento en las tradiciones y en la historia de una determinada cultura, su congruencia con esa cultura y con los recursos naturales del lugar, su valor para la ecología y hasta su eficiencia económica. (Bourges et al, 2013)

El valor nutrimental es el resultado de la combinación de dos variables, la composición nutrimental que es una característica intrínseca del alimento en cuestión y la cantidad que se ingiera de él, la cual difiere de una persona a otra y varía de un día a otro y es el resultado de varias circunstancias ajenas al alimento mismo como su disponibilidad y precio, lo atractivo y aceptable. En el caso de quelites, los valores sensorial, emocional, social y cultural son elevados para la población que los incluye en su cultura alimentaria. (Bourges et al, 2013)

En México, el consumo de quelites se remonta a la época prehispánica en la que se conocían y consumían cerca de 500 especies. Los quelites son característicos de zonas templadas, donde crecen de manera espontánea en los campos de cultivo y también a orillas de caminos durante la época de lluvias. En la cosecha de la verdolaga se corta la planta con todo y raíz. El manejo culinario de los quelites en nuestro país es muy diverso en algunos platillos constituyen el componente principal, pero también pueden ser el condimento que proporciona diferentes sabores y aromas. La composición nutrimental de los quelites es, en términos generales, similar a la de otras verduras de hoja. Contienen poca energía y cantidades considerables de agua (más del 75%) y entre los sólidos (25%) se encuentran hidratos de carbono, fibras y pequeñas cantidades de lípidos. Como ocurre en el caso de otras verduras, cada día hay mayor interés por las sustancias “bioactivas” que no forman parte del análisis bromatológico clásico, pero a las que se atribuyen efectos benéficos; si bien este terreno es complejo y poco conocido, entre estas sustancias figuran: (Bourges et al, 2013)

- Polifenoles: antioxidantes que se asocian con la prevención de enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades degenerativas ligadas al estrés oxidativo y que se encuentran en los quelites.
- Ácidos grasos poliinsaturados de las series n-3 y n-6, que pueden tener efectos antitrombóticos reduciendo la adherencia de plaquetas en las arterias y las concentraciones de colesterol y triglicéridos en el plasma.

Tabla 1. Contenido de ácidos grasos omega 3 y omega 6 en quelites frescos (mg por 100 gramos de porción comestible)

Quelite	Omega 3		Omega 6	
	Primavera	Otoño	Primavera	Otoño
Acelga	21.06	174.25	98.14	49.34
Espinaca	24.85	238.6	117.59	27.21
Flor calabaza	6.26	92.69	11.25	36.45
Huauzontle	35.17	295.34	35.51	127.85
Quelite cenizo	26.55	93.6	99.97	21.34
Quintonil	36.49	77.61	96.34	18.06
Verdolaga	22.6	115.31	86.56	22.88

- Flavonoides: presentan actividad antioxidante. (Bourges et al, 2013)

4.2 *Portulaca oleracea* L.

El género *Portulaca* es el género tipo de la familia de las Portulacáceas y comprende unas 100 especies, cuyos centros de distribución se encuentran en el oeste de Norteamérica, el sur de Sudamérica, África del Sur y en Australia; con un centro de diversidad en Norteamérica, regiones tropicales. En América se encuentra representada poco más o menos una quinta parte del total del número de especies. Al interior del género se encuentran plantas con importancia ornamental y alimenticia, cuya diferencia principal radica en la forma de las hojas, siendo las especies de hoja plana las alimenticias. (Bye y Linares, 2000; Fernández et al, 2007)

Portulaca oleracea, conocida vulgarmente como verdolaga aun cuando se desconoce su sitio de origen, se considera que México es su centro de diversidad. Su elevada capacidad adaptativa le permite vivir en condiciones muy diversas en cuanto a intensidades de luz, fotoperiodo, regímenes de temperaturas y tipos de

suelos. Es una planta comestible que se distribuye ampliamente en las regiones templadas y tropicales del mundo. (Kobt, 2011)

La verdolaga es una planta anual, herbácea, suculenta, carnosa, rastrera, con hábito de crecimiento decumbente o erecto, glabra, de 5 a 40 cm de largo; tallos cilíndricos a veces rojizos, ramificados, con las ramas extendidas radialmente; hojas alternas, obovado-cuneadas a espatuladas, de 0.5 a 3 cm de largo por 0.2 a 1.5 cm de ancho, ápice redondeado o truncado y base cuneada; flores sésiles, solitarias o agrupadas por pocas; pétalos amarillos, de 3 a 5 mm de largo; los frutos son cápsulas de 5 a 9 mm de largo, circuncísil cerca de la mitad; semillas negras, de casi 1 mm de ancho, son reniformes y mantienen su germinación de 8 a 10 años. Esta planta se reproduce por autofertilización, las semillas se forman en una cápsula con una tapa que sólo se abre en condiciones soleadas de mayo a septiembre. (Calderón, 2001)

Es una arvense decumbente que prospera en hábitats abiertos y perturbados por el hombre principalmente. Algunas de las características por las que se considera arvense son las que han permitido su presencia en ambientes con climas muy diferentes. Debido a que su ciclo de vida es corto, y si la germinación se presenta en periodos donde la temperatura ambiente se acerque a los 25°C, la mayoría de las plántulas tendrán mayor oportunidad de alcanzar la madurez reproductiva. Su sistema reproductivo autocompatible facilita que *P. oleracea* se expanda inmediatamente en ambientes abiertos e inicie una nueva población. Como arvense, la verdolaga es una opción para recuperar suelos ya que como maleza impide la erosión y participa en la formación de humus al final de su ciclo biológico. (Tapia y Rita, 2009)

La verdolaga presenta una alta competitividad con los cultivos, sobre todo con las hortalizas, debido a su forma de vida, y hábito de crecimiento decumbente, se desarrolla tan rápido y en diferentes direcciones que parece se dirige hacia sus vecinos, condición dada por su alta capacidad de adaptación a ambientes perturbados que obtiene gracias a su alta fertilidad, latencia prolongada de sus semillas, reproducción vegetativa y su ciclo biológico corto. Cuando existe una alta infestación en un cultivo, a las cuatro semanas ya se nota el efecto inhibitorio del

desarrollo y producción del cultivo y a las doce semanas puede llegar a ocupar 100% del espacio relativo. La característica de maleza le confiere una capacidad de regeneración natural muy amplia, como colonizadora de hábitats perturbados en las primeras etapas de sucesión ecológica.

Las flores son hermafroditas y sésiles, sin embargo; la baja producción de néctar en las flores de verdolaga hace que pocos insectos las visiten para ayudar a la polinización. Por ello se cree que la polinización cruzada tiene cierta importancia, sobre todo la anemófila. (Egea et al, 2014)

Las semillas cuando se encuentran en viveros son recolectadas por los propios agricultores. La longevidad y supervivencia de las semillas de verdolaga es excelente: hasta 19 años en almacenaje seco y 40 años al ser enterradas en el suelo. La verdolaga es una planta muy productiva cuyas semillas pueden permanecer viables en el suelo por muchos años teniendo con ello un amplio periodo de germinación.

En el país se reportan en plantaciones datos de producción en tres entidades: Baja California, Morelos y la Ciudad de México. El manejo en cada uno de ellos depende de los intereses del productor; se puede hacer siembra directa o por almácigo, al aire libre o en invernadero, con densidades altas de siembra. La planta completa se aprovecha en la alimentación del ser humano. El género involucra especies con uso ornamental o comestible. De manera particular, el consumo de la verdolaga comestible es muy amplio y cosmopolita, su adecuación a los diferentes tipos de clima le permite crecer en regiones templadas y tropicales del mundo. Crece como maleza, a orillas de los caminos, ríos y canales de riego. Debido a la gran demanda que existe actualmente se ha acrecentado su cultivo. En este caso, una planta recolectada se puede distinguir de la cultivada por su tamaño; generalmente la cultivada es más grande. (Mera et al, 2011)

En México, el consumo de plantas no cultivadas, como hortalizas o verduras, se mantiene desde épocas precolombinas. Los habitantes prehispánicos, empleaban los llamados quelites, plantas recolectadas al interior o alrededor de los campos de cultivo, para integrarlos a su dieta, ya que son importantes fuentes de vitaminas y minerales. Al igual que en Europa y Estados Unidos, se encuentra

entre los quelites (hortalizas tradicionales) de mayor consumo, que incluso se ha iniciado su cultivo a mayor escala debido a su demanda en el mercado, que en la zona centro del país ha alcanzado a las principales cadenas comerciales. Es de esperarse una demanda creciente, ya que se ha encontrado que es rica en ácidos grasos antioxidantes del grupo omega. Las verdolagas casi siempre se consumen cocidas y acompañadas con carne. En algunos países europeos, como Francia, existen variedades mejoradas de verdolaga para consumo como hortaliza; pese a ello, han sido pocas las contribuciones mexicanas orientadas a conjuntar y sistematizar los conocimientos disponibles sobre la especie, para valorar su potencial alimenticio, económico, medicinal y ornamental. (Mera et al, 2005)

El consumo actual de la verdolaga es mayor en la zona centro del país; sin embargo, su adaptación a los diferentes tipos de clima y su cultivo, en altas densidades, permitiría considerarla como una fuente alternativa ante la actual crisis de producción de alimentos, al incrementarse su disponibilidad como hortaliza fresca durante todo el año. En México, España y en países del este del Mediterráneo, es consumida como verdura en sopas y ensaladas, ya que la consideran una fuente alternativa de omega 3. (Mera et al, 2014)

Se ha utilizado en la medicina tradicional en varios países para tratar distintas enfermedades humanas, ya que contiene numerosos compuestos bioprotectores como: antioxidantes y vitaminas, ácidos grasos omega 3, aminoácidos esenciales y minerales, también se han encontrado que tiene bioactividad como: actividades hipoglicémica e hipolipidémica, así como actividad antitumoral ya que actúa como un dietético natural que posee la actividad de inhibir el crecimiento de células cancerosas. Mejora la hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia. Sus semillas y hojas tienen muchas aplicaciones terapéuticas de uso diurético, antiescorbútico, antipirético, antiasma, antiinflamatorio y antitusivo. (Obied et al, 2003; Santos et al, 2012; Zhao et al, 2013; SINAREFI, 2014; Zidan et al, 2014)

4.3 Composición bromatológica

4.3.1 Análisis bromatológico

De acuerdo al esquema de Weende las determinaciones que se realizan en los alimentos son: humedad, proteína cruda, grasa cruda, fibra cruda, cenizas e hidratos de carbono. Se utiliza porque es el análisis empleado en todo el mundo para descripciones de alimentos, y además la mayoría de los requisitos legales se basan en éste. (Helrich, 1990; Horwitz y Latimer, 2005)

4.3.2 Agua

El agua es el único componente químico de los alimentos que se puede considerar presente en todos ellos. Su ubicuidad en los productos alimenticios es una consecuencia de su carácter indispensable para la vida de los organismos vivos, suministra el medio físico ambiental para que se puedan desarrollar las reacciones bioquímicas más esenciales; sirve como medio de transporte para los nutrientes celulares y sus metabolitos de desecho, facilita el transporte de los gases implicados en la respiración celular (CO_2 y O_2), participa en la digestión y regula la temperatura corporal.

Desde siempre se ha sabido que el contenido en humedad de un alimento tiene una marcada influencia sobre su estabilidad y buena conservación. El agua que toma parte en la composición de un alimento puede estar ampliamente distribuida a través del mismo y actuar como sistema disolvente de una gran cantidad de estructuras moleculares específicas: azúcares, sales, ácidos orgánicos, polisacáridos hidrofílicos o incluso proteínas. (Aron, 1988; Aragón y Villa, 1994)

En los vegetales y frutas, la textura está estrechamente relacionada con la turgencia, que es función de la presión osmótica dentro de la célula vegetal. El contenido acuoso puede ser un índice del grado de maduración del producto vegetal y un criterio de calidad para juzgar acerca de su textura. El contenido de agua en la mayoría de los alimentos frescos se encuentra entre 60 a 70%.

Por otro lado, el dato de la humedad está relacionado con la edad y el estado de conservación del mismo. Un contenido de humedad mayor al 15% en alimentos secos no es admisible, ya que se supone una disminución del valor nutrimental y la predisposición de los mismos para el desarrollo de microorganismos. (Bello, 2000)

4.3.3 Proteína

Las proteínas forman parte de la composición química de casi todos los alimentos. Las tres funciones esenciales de la materia viva (nutrición, crecimiento y reproducción) están vinculadas a las moléculas proteínicas y a las estructuras que las integran: péptidos y aminoácidos. Además de desempeñar funciones biológicas importantes en el organismo humano tales como: regeneración y formación de tejidos, síntesis de enzimas, anticuerpos y hormonas. Su carácter de componente indispensable para la materia viviente, convierte en fundamental su presencia en la dieta del ser humano. Las proteínas están formadas de nitrógeno, carbono, hidrógeno y oxígeno, algunas contienen azufre, fósforo. La molécula de proteína se compone de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, que contienen un grupo carboxílico y un grupo amino en posición α y un grupo R que varía en los distintos aminoácidos. Dentro de los veinte aminoácidos conocidos, algunos son esenciales ya que el organismo no los puede sintetizar: arginina, lisina, treonina, triptófano, fenilalanina, metionina, histidina, leucina, isoleucina y valina. (Feldman, 1988; Bello, 2000)

Desde el punto de vista de la composición de una dieta, no sólo puede tener interés el contenido proteínico ofrecido por un alimento determinado, sino también su aporte en aminoácidos, puesto que una dieta se puede considerar completa en lo que se refiere al aporte proteínico solamente cuando es capaz de asegurar los requerimientos aminoacídicos necesarios para el crecimiento normal y el mantenimiento del organismo vivo. Las fuentes proteínicas de origen vegetal suelen carecer de algún aminoácido indispensable. (Sánchez, 1989)

4.3.4 Grasa

La mayoría de las grasas son ésteres de ácidos grasos y un alcohol: glicerol, alcohol alifático de cadena larga, esterol. Son destacados componentes estructurales y funcionales de los alimentos.

Desde un punto de vista nutritivo, ofrecen el beneficio adicional de cumplir funciones importantes. Todo organismo aprovecha las grasas de la dieta para alcanzar los objetivos más variados:

- Como una fuente energética metabólica fácilmente disponible.
- Como vehículo de vitaminas liposolubles o de ácidos grasos poliinsaturados esenciales.
- Para la síntesis de sustancias químicas biológicamente importantes, dentro de un perfecto equilibrio bioquímico y fisiológico entre las grasas que llegan a los centros metabólicos y las grasas que son metabolizadas.

Por su importancia nutricional y biológica destacan entre todos ellos los siguientes: ácido linoleico, alfa-linolénico, gamma-linolénico, mayoritario en los lípidos de hojas verdes, el ácido araquidónico, eicosapentanoico, estos dos últimos desempeñan funciones hormonales y tienen un papel importante en los procesos inflamatorios. (Bello, 2000; López, 2000)

4.3.5 Fibra cruda

La fibra cruda es una mezcla de componentes de origen vegetal resistentes a las enzimas del tracto gastrointestinal del hombre, es un residuo orgánico insoluble construido principalmente por celulosa, hemicelulosa, gomas y mucilagos. La celulosa es el polisacárido más abundante en la naturaleza e integra la estructura de las paredes vegetales, la unión de las moléculas de glucosa, mediante un enlace β -glucósido hace a la celulosa especialmente insoluble y resistente a la degradación por enzimas digestivas. (Miranda, 2006)

Se considera que la presencia de cantidades moderadas de fibra cruda o insoluble en la dieta favorece un mejor desarrollo del órgano digestivo, incremento en la secreción de ácido clorhídrico, sales biliares y enzimas digestivas, y todos estos cambios permitirían una mejor salud intestinal, mejora en la digestibilidad de

nutrimentos, reducción del tiempo de tránsito de los alimentos y el aumento de la masa fecal. (Sursan y Dreher, 2001)

4.3.6 Cenizas

Las cenizas nos dan una idea de la cantidad de minerales presentes en la muestra, provienen de las sales minerales que incluyen todos los compuestos inorgánicos en la muestra después de incinerarla, es decir es la eliminación del agua y de la materia orgánica. Las sales metálicas se convierten en óxidos o carbonatos y reaccionan durante la incineración para formar fosfatos, sulfatos o haluros. Entre los minerales que se pueden encontrar están: hierro, calcio, cobre, magnesio, sodio, fósforo azufre y zinc. (Helrich, 1990; Aragón y Villa, 1994)

4.3.7 Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono son la fuente principal de energía para nuestro organismo, además de ser necesarios para llevar a cabo funciones biológicas, como una mejor utilización de grasa y proteína.

Están compuestos de carbono, hidrógeno y oxígeno, químicamente son polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas y sus derivados, comúnmente son de origen vegetal como glucosa, sacarosa, al igual que los polisacáridos almidón y celulosa. Son comúnmente encontrados en frutas y vegetales en forma de azúcares y almidones, mismos que representan la principal fuente de energía en la dieta. (Bello, 2000)

4.4 Complementación bromatológica

4.4.1 Digestibilidad proteínica *in vitro*

Los aminoácidos presentes en las proteínas no están disponibles en su totalidad, debido a que la digestión y absorción de estos puede ser incompleta. Generalmente las proteínas de origen animal son absorbidas con mayor facilidad ya que no existe ningún factor que pueda obstruir con su asimilación por el contrario la asimilación de las proteínas de origen vegetal es menor ya que

pueden existir algunos factores tóxicos que interfieran con su asimilación y disponibilidad. La digestibilidad de la proteína vegetal se encuentra entre un 60-80%. Para medirla se han desarrollado procedimientos *in vitro* en los cuales se trata de simular en lo más posible la digestión natural, para determinar la biodisponibilidad de las proteínas sin recurrir a ensayos biológicos. (Fox y Cameron, 2006)

4.4.2 Calcio

El calcio es uno de los minerales más abundantes en el organismo, desempeña un papel esencial en numerosos procesos bioquímicos y fisiológicos.

Algunos nutrimentos de los alimentos pueden influir en la absorción o la excreción del calcio. La vitamina D facilita la absorción, mientras que los fitatos y oxalatos de las verduras de hoja verde, pueden disminuir su absorción. (William, 2002)

La fibra dietética reduce la absorción de calcio pero también reduce su excreción por los riñones, de manera que su efecto sobre el equilibrio del calcio es en cierta manera neutro. El consumo excesivo de sodio incrementa la excreción de calcio, al igual que una ingesta excesiva de proteínas. (Dvorkin et al 2003)

Algunas de las funciones del calcio son:

- Formación de huesos
- Activación enzimática
- Transmisión del impulso nervioso
- Contracción muscular
- Potencial de membrana celular
- Mecanismo de coagulación de la sangre
- Mecanismo de secreción de algunas hormonas

La deficiencia de ese mineral puede ocasionar:

- Osteoporosis
- Raquitismo
- Alteraciones de la contracción muscular
- Calambres musculares

4.4.3 Hierro

El hierro en la dieta se presenta de dos formas:

- 1) Hierro hemo, asociado a la hemoglobina y mioglobina, sólo se encuentra en alimento de origen animal.
- 2) Hierro no hemo se encuentra en alimentos de origen animal y vegetal, el 100% del hierro contenido en los vegetales se encuentra en forma no hemo. El hierro ingerido mediante alimentos se absorbe sólo bajo la forma de ión ferroso, y se absorbe principalmente en el duodeno y la parte alta del yeyuno.

Algunas sustancias que se encuentran de manera natural en algunos alimentos, como fosfatos, taninos, oxalatos, fitatos y un exceso de fibra pueden reducir la biodisponibilidad del hierro no hemo y formar sales insolubles o potenciar el rápido transporte a través de los intestinos.

El hierro tiene funciones muy importantes para el organismo como:

- Formación de compuestos esenciales para el transporte y la utilización del oxígeno (hemoglobina y mioglobina)
- Transferencia de electrones
- Esencial en los procesos oxidativos

La deficiencia de este mineral puede causar:

- Fatiga
- Anemia
- Alteración del control de la temperatura
- Reducción de la resistencia a las infecciones
- Falta de atención

El hierro ingerido con los alimentos se absorbe sólo bajo la forma de ion ferroso, porque la forma férrica tiende a formar compuestos insolubles que precipitan. A nivel del estómago, una proteína, la gastroferrina se une al hierro y lo protege de la acción de los agentes oxidantes, lo transporta hasta el intestino delgado donde existen receptores específicos para su absorción. (William, 2002; Dvorkin et al, 2003)

4.5 Factores tóxicos

En algunos alimentos podemos encontrar factores tóxicos los cuales se dividen en agentes tóxicos y antinutrimientales los cuales pueden causar daños al organismo. En el caso de las plantas estos factores son importantes como mecanismo de defensa contra sus depredadores naturales. Los agentes tóxicos son sustancias presentes en los alimentos capaces de producir a corto plazo efectos dañinos, alguna anomalía fisiológica, que no puede ser atenuada por una suplementación de nutrimentos. Generalmente son xenobióticos de alto grado de toxicidad que afectan a un órgano blanco. Los agentes antinutrimientales son capaces de disminuir la disponibilidad o provocar una pérdida suplementaria de los nutrientes esenciales. (Derache, 1990; Linder, 1995; López, 2000)

4.5.1 Agentes antinutrimientales

4.5.1.1 Inhibidores de tripsina

Son sustancias antinutrimientales que tienen la capacidad de inhibir la capacidad proteolítica de algunas enzimas, específicamente la tripsina, la cual es una enzima de suma importancia en la digestión humana y en animales monogástricos. Se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, especialmente en los órganos reproductores de los vegetales, principalmente en las leguminosas. (Derache, 1990)

Debido al complejo enzima-inhibidor, el páncreas se ve forzado a excretar un exceso de enzimas proteolíticas debido a la falta de enzimas libres, lo que aumenta la demanda de la enzima por el órgano. (Martínez y Rincon, 1997)

Nutritionalmente causan un retraso en el crecimiento o un índice bajo de la eficiencia proteínica, son resistentes a la proteólisis, pero al ser de naturaleza proteínica, un tratamiento térmico adecuado, puede disminuir su actividad. De acuerdo a Kakade et al, 1974, existe un límite máximo permisible, cuando la concentración de inhibidores de tripsina sobrepasa las 10 UTI/mg se considera un alimento no apto para la alimentación humana ya que no permiten la

biodisponibilidad de la proteína dietética. (Valle y Lucas, 2000; Guillamón et al 2008)

4.5.1.2 Oxalatos

Los oxalatos son sales o ésteres formados a partir del ácido oxálico, el ácido oxálico está presente en numerosas plantas en forma libre o en forma de sales de sodio, potasio y calcio, estas últimas insolubles en agua. El riesgo en el consumo de este radica en que actúa como agente quelante y reductor directamente en el metabolismo del ion calcio disminuyendo su concentración plasmática e interviniendo en la formación de cristales de calcio (cálculos renales). Los efectos negativos del ácido oxálico en la absorción de calcio se pueden predecir mediante una relación meq oxalato/ meq calcio. Los alimentos con una relación mayor a 1 pueden disminuir la disponibilidad del calcio. En cambio alimentos con valores de 1 o inferiores no interfieren con su absorción. Debido a que el calcio se enlaza irreversiblemente con el ácido oxálico, al obtener un valor de 1 en la relación no es una buena fuente de calcio. Por lo tanto si el valor es mucho mayor a 1 puede ser descalcificante, ya que además de secuestrar todo el calcio presente en el alimento, tiene la capacidad de secuestrar este mineral proveniente de otras fuentes y dejarlo sin disponibilidad para el organismo. (Moreau y Savage, 2009; Vanhanen y Savage, 2015)

Generalmente los oxalatos incrementan durante la vida de la planta. Con la temperatura y con el tratamiento con cationes, disminuyen si la planta se mantiene en la obscuridad. (Committe, 1973)

La ingestión de oxalatos a través de la dieta rica en vegetales produce síntomas de envenenamiento, efectos dañinos en el tracto gastrointestinal e hipocalcemia. Se ha establecido que las plantas que contienen más de 10% de oxalatos en base seca pueden ser dañinas para la salud. El precipitado insoluble bloquea los túbulos renales causando uremia, nefritis y cálculos renales. (De Vries, 1997; Palaniswamy et al, 2004)

4.5.1.3 Fitatos

El fitato es la forma principal de almacenamiento de fósforo e inositol en las semillas de las plantas y tejidos vegetales. Forma complejos con algunos minerales, cationes divalentes y trivalentes, especialmente hierro y causa una deficiencia del mineral en humanos. Afecta negativamente la utilización de lípidos y proteínas. Además de inhibir la unión entre el hierro y la gastroferrina. La gastroferrina es una proteína secretada por las células parietales, la cual se une al hierro y lo protege de la acción de agentes oxidantes. La gastroferrina transporta al hierro hasta el duodeno, donde existen receptores específicos para su absorción. El remojo, fermentación y germinación reducen su contenido de fitatos. (Frühbeck et al, 1994)

El ácido fólico forma sales insolubles, lo que conlleva un efecto adverso en la digestión y absorción de minerales en el organismo. La capacidad de interacción con los minerales depende del pH. En humanos, la digestión de los alimentos pasa de un pH bajo en el estómago, a un pH neutro en el intestino delgado, que se caracteriza por la máxima absorción de minerales, por lo que los compuestos insolubles no se absorberán. Las sales formadas se denominan fitatos, los cuales también forman complejos con las proteínas, los cuales son resistentes a la proteólisis y alteran su estructura ocasionando que su solubilidad disminuya además de su actividad enzimática y su digestibilidad proteínica. (Kumar et al 2010; Sandberg y Scheers, 2010)

Los grupos más susceptibles son mujeres fértiles, niños y embarazadas, teniendo como resultado nacimientos prematuros, desarrollo cerebral retardado y reduce las funciones inmunitarias y cognitivas. (Sandberg y Scheers, 2010)

4.5.2 Agentes tóxicos

4.5.2.1 Nitratos

Los nitratos se encuentran presentes en los alimentos de origen vegetal como componentes inherentes a las plantas y como contaminante en el agua debido al uso de fertilizante nitrogenados. La acumulación de nitratos en el suelo es muy

importante para las plantas, ya que toman el nitrógeno del suelo por medio de la raíz y lo transforma en amoniaco para transportarlo a las hojas e intervenir en la síntesis de proteínas. (Zidan et al 2014)

El proceso de acumulación puede estar influenciado por varios factores como la variedad y especie de la planta, el grado de maduración contenido de humedad, tipo de suelo y la luz recibida. El contenido de nitratos también varía dependiendo en que parte de la planta se encuentren, los niveles más altos se encuentran en los tallos y hojas, en comparación con las flores, en las cuales son menores, y su presencia es nula en las semillas. (Prasad y Avinesh, 2008)

La toxicidad de los nitratos se presenta si existe una ingestión masiva de estos y si la microflora los transforma a nitritos. El ion nitrito es inestable, por lo que es muy reactivo y esta dotado de numerosos efectos tóxicos. Existen dos grupos que corren riesgo, ya que transforman rápidamente el ion nitrato a nitrito: bebés de hasta 6 meses de edad y animales poligástricos. Además los nitratos tienen efectos procancerígenos, lo que significa que en conjunto con otras sustancias forman compuestos que si lo son, en varias etapas: primero el nitrato se reduce a nitrito, posteriormente el nitrito reacciona con aminos secundarias para formar nitrosaminas, las cuales son cancerígenas, todo este proceso se lleva a cabo en el estómago ya que reúne las condiciones necesarias para su síntesis. (Shao-ting et al 2007; Tamme et al 2010)

Se ha demostrado que el lavado y la cocción de los vegetales reduce considerablemente la concentración de estos, ya que son solubles en agua. (Corré y Breimer, 1979; Bryan et al 2012)

De acuerdo a la OMS y la FDA, la IDA es de 3.7 mg/kg p.c./día, lo que equivale a 222 mg del compuesto al día para una persona adulta de 60 kg.

4.5.2.2 Saponinas

Las saponinas son glucósidos anfifílicos constituidos por azúcares en la parte polar. Se encuentran enlazados a un grupo no polar llamado aglicón o sapogenina, el cual puede ser un esteroide o un triterpeno. Se encuentran

ampliamente distribuidas en el reino vegetal, principalmente en hojas, raíces, tallos y flores. (Clavert et al 1967; López, 2000)

Las saponinas crean lesiones gastrointestinales y si pasan a la corriente sanguínea pueden hemolizar las células de los glóbulos rojos, es decir, destruyen los glóbulos rojos produciendo liberación de hemoglobina. El punto de ataque en la hemólisis es el colesterol de la membrana de los eritrocitos, al unirse la saponina al colesterol se da lugar a la formación de canales en la membrana y/o una desnaturalización. Se necesita una mínima cantidad de saponinas para producir hemólisis. Además pueden producir fallas en la respiración, convulsiones y coma. (Girón, 1992; Savage, 2003)

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención del material biológico

Gracias a la colaboración del Dr. Robert Arthur Bye Boettler del Instituto de Biología de la UNAM, quien tiene una amplia experiencia trabajando con recursos vegetales y nos proporcionó 6 variedades de verdolagas cultivadas en el campo así como en la Universidad Autónoma de Chapingo como parte del proyecto Red Verdolaga SINAREFI. Una vez obtenidas las plantas se procedió a secarlas y fraccionarlas en un molino de laboratorio (Tomas Wiley Laboratory Hill Mod. 4), pasando a través de una malla de 1 mm de diámetro, y así obtener las harinas respectivas del material biológico.

Las semillas originales se sembraron, se obtuvo la semilla y se volvieron a sembrar, así por lo menos en 6 ocasiones. Para medir diferentes características morfológicas en diferentes ciclos y llegar a definir las como variedades. En la tabla 1 se muestra la procedencia de las distintas variedades.

Tabla 1. Datos de las 6 variedades de verdolagas

Variedad	Estado	Municipio	Comunidad	Sitio
Americana	Morelos	Cuautla	Las Lomas	Casa del Sr. José Bocanegra
Chapingo	Edo. de México	Texcoco	ISSSTE Chapingo	Invernadero de Chapingo
Mixquic	Cd. de México	Mixquic	Chila	Parcela del Sr. Jorge San Miguel
Mixquic 2	Cd. de México	Mixquic	-	-
Queretana	Morelos	Cuautla	Las Lomas	Casa del Sr. José Bocanegra
Tláhuac	Edo. de México	Texcoco	ISSSTE Chapingo	Invernadero de Chapingo

Aunque algunas variedades provengan de los mismos lugares, tienen características particulares que las diferencian entre si esto se encuentra en la siguiente tabla.

Tabla 2. Observaciones

Verdolaga	Observaciones
Americana	Se trata de una especie cultivada en melgas, la semilla es criolla de Cuautla, Morelos.
Chapingo	Se trata de una especie cultivada en invernadero, que presento resistencia al “dumping off”
Mixquic	Se trata de una especie cultivada en melgas, la semilla es local de San Andrés, Mixquic, Ciudad de México.
Mixquic 2	Ésta muestra creció en campo abierto
Queretana	Se trata de una especie cultivada en melgas, la semilla es una variedad lograda después de varios ciclos de cultivo. Es una mezcla de semillas de San Juan del Río Querétaro y la semilla criolla de Cuautla, Morelos.
Tláhuac	Se trata de una especie cultivada en invernadero, colectada en Tláhuac

Todas las variedades de verdolaga se sembraron el día 5 de mayo del 2014 y se recolectaron el 8 de junio del 2014, a excepción de Mixquic 2 que se sembró el 1 de enero del 2014 y se recolectó el 6 de junio del 2014 y desde un inicio fue diferente a las demás, por su color (más oscuro) y la edad de la planta.

Como se observa en la tabla 1 y 2, Mixquic 2 no se cultivó en invernadero, se cultivó a campo abierto y su siembra y cosecha no corresponden a las demás variedades. Esto se debe a que fue una variedad que no estaba contemplada al inicio.

En la figura 1 se muestra el diagrama de flujo que ilustra el desarrollo del trabajo experimental.

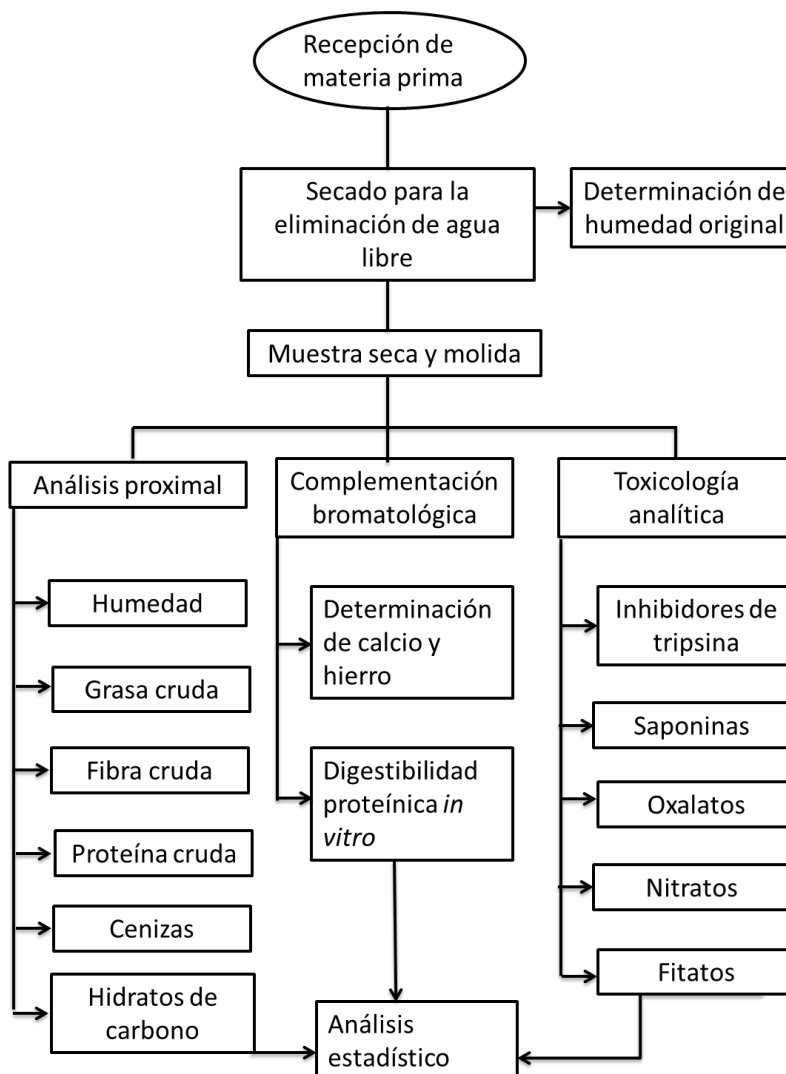


Figura 1. Diagrama general de trabajo.

5.1.1 Determinación de humedad original

Con el material fresco ajustar previamente los hornos de secado con circulación forzada bajo las siguientes condiciones: 55 ± 2 °C; introducir las verdolagas en los hornos de secado llevándose un control de peso de éstas, por espacio de 48 horas aproximadamente, hasta peso constante en balanza granataria (± 0.1 g), con el objetivo de calcular la humedad original del material fresco. (Bateman, 1970)

5.2 Análisis químico bromatológico

Con la harina de las verdolagas se realizó el análisis proximal de acuerdo al esquema Weende con ligeras modificaciones; y en la figura 2 se ilustran los puntos más relevantes de esta metodología. (Helrich, 1990; Horwitz y Latimer, 2005)

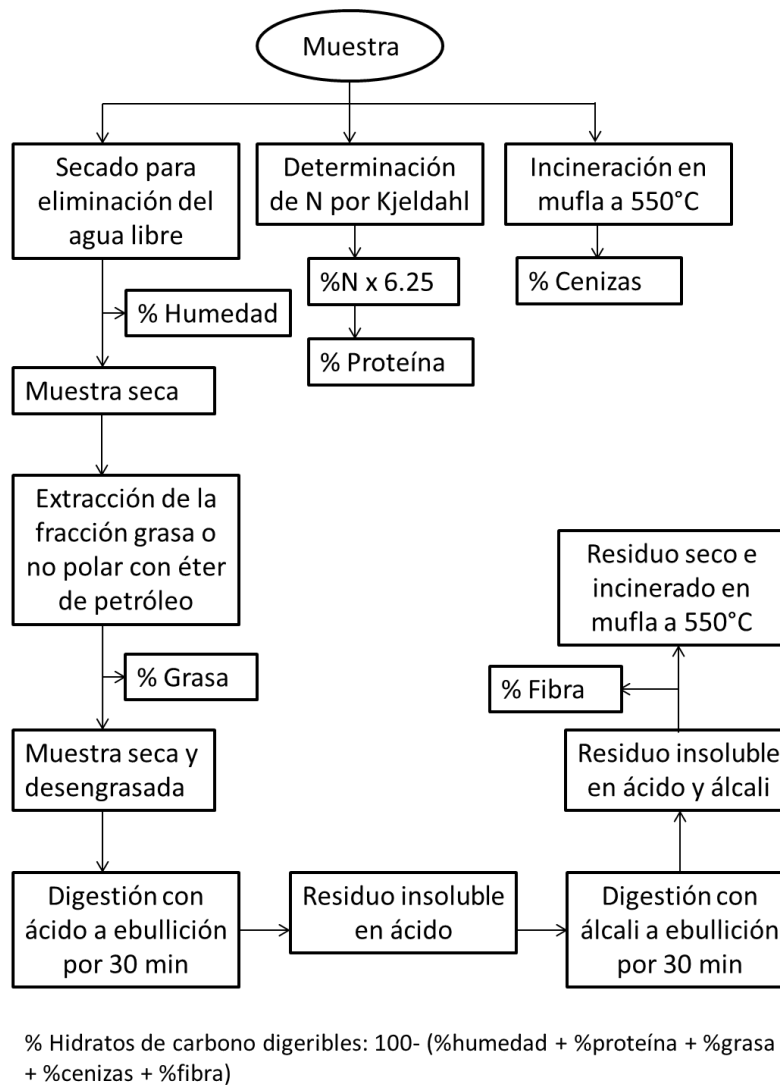


Figura 2. Diagrama del análisis proximal según el esquema de Weende.

5.2.1 Humedad analítica

Se basa en la eliminación del agua libre de un alimento, por evaporación bajo condiciones controladas de presión y temperatura. Realizar en un horno de

secado a presión reducida (254 mm Hg/ 75 a 80°C), llevando un control de peso en el secado, hasta peso constante, con una precisión de balanza analítica (± 0.0001 g).

5.2.2 Proteína cruda

Se fundamenta en obtener el nitrógeno orgánico de un alimento, por una digestión de la muestra con ácido sulfúrico concentrado a alta temperatura (350 a 370 °C), catalizadores y coadyuvantes de oxidación, para obtener el nitrógeno en forma de sulfato ácido de amonio; ésta sal de amonio se le adiciona hidróxido de sodio para liberar amoníaco, el cual se recibe en una solución de ácido bórico, y posteriormente se titula con una solución valorada de ácido clorhídrico, para expresar el resultado en porcentaje de nitrógeno y utilizando el factor general de conversión de nitrógeno a proteína de 6.25 (100 g proteína/ 16 g de N), se obtiene lo que se denomina % de proteína cruda.

5.2.3 Grasa cruda

Se define como el material heterogéneo de compuestos insolubles en agua y solubles en disolventes no polares como es el éter de petróleo, donde la mayor proporción corresponde a la grasa o aceite en un recurso vegetal. Es una determinación gravimétrica, ya que se requiere pesar el residuo etéreo con una precisión en balanza analítica de (± 0.0001 g).

5.2.4 Cenizas

Representa la fracción del material inorgánico que posee el alimento, para lo cual es necesario eliminar la materia orgánica por medio de la combustión completa de ésta. Para lograrlo, el material biológico se coloca en un crisol de porcelana y se carboniza y posteriormente se calcina con ayuda de una mufla hasta una temperatura de 550 ± 10 °C. Por último se realiza el pesado del crisol con las cenizas hasta peso constante, con una precisión de balanza analítica (± 0.0001 g).

5.2.5 Fibra cruda

Una vez que se cuenta con la muestra seca y desengrasada se trasvasa cuantitativamente a un vaso Berzelius, donde se somete a digestión con ácido sulfúrico (1.25%) y posteriormente con hidróxido de sodio (1.25%). En un digestor marca Labconco y la filtración del material digerido se realiza con ayuda de vacío a través de un filtro tipo “California”, para obtener el material indigerible que corresponde a la fibra junto con las cenizas insolubles, el cual se seca y calcina en una mufla a 540 ± 10 °C, hasta peso constante en balanza analítica (± 0.0001 g), para que por diferencia de peso en balanza analítica, se obtenga la fibra cruda.

5.3 Complementación bromatológica

5.3.1 Digestibilidad proteínica *in vitro*

Se basa en crear un medio muy similar al del organismo, digiriendo a las proteínas con un sistema multienzimático, y al llevarse a cabo la digestión de éstas por proteólisis se libera al medio un protón $[H^+]$ por la ruptura del enlace peptídico, disminuyendo así el pH. La digestibilidad de la proteína se puede evaluar con el registro de la disminución del pH asumiendo una correlación con la liberación de protones, entre más bajo sea el pH más digerible será la proteína. (Helrich, 1990)

Materiales

Balanza analítica Sartorius extend	Matraz aforado de 10 mL
Baño de agua Polyscience a $37^\circ\text{C} \pm 0.5$	Agitadores magnéticos de arroz de media pulgada
Baño de agua Polystat 12002 a $55^\circ\text{C} \pm 0.5$	Parrilla de agitación Daithan Scientific Wisestir
Potenciómetro Thermo Scientific Orion 3 Star	Cronómetro digital de triple tiempo Cole-Parmer
Contenedor de vidrio con camisa de recirculación de agua atemperada	Buffers de referencia (USA)

Reactivos

Solución enzimática A (aforar a 10 mL con agua destilada)

Tripsina pancreática porcina tipo (IX)

Sigma (T-0303) **227,040 unidades BAEE de tripsina**

Peptidasa intestinal porcina (Grado I)

Sigma (P-7000) **2,321 unidades BAEE de tripsina**

α -quimotripsina pancreática bovina (tipo II) sigma (C-4129) **1,860 unidades BAEE de tripsina**

Solución enzimática B (aforar a 10 mL con agua destilada)

Proteasa de *Streptomyces griseus* Sigma (P-5147) **65 unidades BAEE de tripsina**

Estándar de caseína liofilizada

Donde BAEE es el sustrato N- α -benzoil-L-arginina etil éster.

Una unidad de tripsina pancreática porcina contiene 17,953 unidades BAEE por mg de proteína. Por lo tanto para disolver 227,040 unidades BAEE de enzima se requiere:

$$\frac{(227,040 \text{ unidades BAEE} \times 1 \text{ mg de enzima})}{17,953 \text{ unidades BAEE}} = 12.646 \text{ mg de enzima}$$

Una unidad de α -quimotripsina contiene 65,622 unidades BAEE por mg de proteína de 94.1% de pureza. Por lo tanto para disolver 1,860 unidades BAEE de enzima se requiere:

$$\frac{(1,860 \text{ unidades BAEE} \times 1 \text{ mg de enzima} \times 100 \text{ mg sólido})}{65,622 \text{ unidades BAEE} \times 94.1 \text{ mg proteína}} = 30.121 \text{ mg de enzima}$$

Una unidad de peptidasa intestinal porcina contiene 902 unidades BAEE por mg de proteína de 47% de pureza. Por lo tanto para disolver 2,321 unidades BAEE de enzima se requiere:

$$\frac{(2,321 \text{ unidades BAEE} \times 1 \text{ mg de enzima} \times 100 \text{ mg sólido})}{902 \text{ unidades BAEE} \times 47 \text{ mg proteína}} = 5.475 \text{ mg de enzima}$$

Una unidad de proteasa de *Streptomyces griseus* contiene 5 unidades BAEE por mg de proteína. Por lo tanto para disolver 65 unidades BAEE de tripsina se requiere:

$$\frac{(65 \text{ unidades BAEE} \times 1 \text{ mg de enzima})}{5 \text{ unidades BAEE}} = 13 \text{ mg de enzima}$$

Procedimiento

Calcular un contenido de 10 mg de N₂ en la muestra, colocar en un vaso de digestibilidad con 10 mL de agua destilada y agitación continua a una temperatura de 37°C durante 1 hora, a continuación ajustar el pH de la solución a 8.00 ± 0.3 con NaOH o HCl según sea el caso y agregar 1 mL de la solución enzimática A, la cual debe permanecer en agitación continua por 10 minutos exactos, transcurrido el tiempo agregar 1 mL de la solución enzimática B que permanece a 55°C por 9 minutos, finalmente a los 9 minutos exactos cambiar de nuevo el baño al de 37°C por 1 minuto, y medir el pH de la muestra digerida. Es importante enfatizar que las soluciones enzimáticas deben estar a pH de 8.00 ± 0.03.

El pH de la referencia de caseína deberá ser 6.42 ± 0.05 y sólo hasta que se obtenga éste pH en la serie de referencia se podrá realizar la determinación en las muestras problema.

Cálculos

El porcentaje de digestibilidad se obtiene al sustituir el pH en la siguiente ecuación:

$$\% \text{Digestibilidad} = 234.84 - 22.56 (\text{lectura pH})$$

5.3.2 Determinación de calcio y hierro

Se tuvo la oportunidad de que se nos facilitaran los resultados de dichas determinaciones, para todas las muestras de verdolagas. Los análisis se realizaron en el laboratorio 209 del Conjunto D cuyo responsable es el Dr. Ciro Márquez, por lo cual se le extiende un agradecimiento. Para el desarrollo de esta

metodología su utilizó la técnica de espectroscopía de emisión atómica con plasma por acoplamiento inductivo (ICP-OES). (Hansen et al, 2013)

Materiales

Liofilizadora Labconco Freezone 4.5
Mortero de ágata
Equipo de digestión con microondas
Perkin Elmer modelo Titan MPS
Espectrómetro de emisión atómica
marca Perkin Elmer modelo 4300 DV

Reactivos

Ácido nítrico
Peróxido de hidrógeno
Ácido fluorhídrico

Procedimiento

Liofilizar 60 g de las muestras (previamente lavadas con agua desionizada) a -50°C y 0.010 mm de Hg de presión, moler manualmente en un mortero de ágata, someter a un proceso de digestión con 5 mL de HNO_3 + 0.2 mL de H_2O_2 + 0.2 mL de HF, se afora a 50 mL con agua desionizada (la muestra se digiere en un equipo de digestión con microondas), posteriormente llevar a cabo la determinación de calcio y hierro en un equipo de emisión atómica el cual emplea gas argón de alta pureza para su operación; así como estándares en solución acuosa de los diferentes elementos a determinar de la marca Perkin Elmer.

5.4 Toxicología analítica

5.4.1 Agentes antinutricionales

5.4.1.1 Inhibidores de tripsina

La técnica de Kakade se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso de la muestra sobre una solución estándar de tripsina. El extracto directo o diluido se pone en contacto con una solución estandarizada de tripsina (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y después de un cierto tiempo se determina la actividad proteolítica

remanente, por medio de un sustrato sintético (BAPNA), el cual producirá una coloración que se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm. Dicha coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de la muestra. (Kakade et al, 1974)

Materiales

Balanza analítica Sartorius extend
Potenciómetro Thermo Scientific Orion 3 Star
Agitador magnético múltiple Daithan Scientific Wisestir
Baño de agua Grant modelo 5E-10 a $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5$
Vortex LabLine modelo super-mixer 1290
Espectrofotómetro Thermo Scientific Genesis 10 UV

Reactivos

NaOH 0.01N
Solución amortiguadora de TRIS, pH 8.2 y 0.05M(a)
Solución BAPNA (b)
Ácido acético al 30%
Solución estándar de tripsina (c)
HCl 0.001N
Soya desengrasada como control

- (a) Pesar 6.05 g de TRIS (hidrocimetil-amino-metano) y 2.94 g de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Disolver en 900 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 8.2 y aforar a un volumen de 1L.
- (b) Pesar 100 mg de benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida-HCl (BAPNA). Disolver en 2.5 mL de dimetil-sulfóxido y diluir a 250 mL con amortiguador TRIS previamente calentado a 37°C (ésta solución debe ser preparada el mismo día y cuando este en uso deben mantenerse a 37°C).
- (c) Pesar con mucha exactitud 4 mg de tripsina bovina y disolver en 200 mL de HCl 0.001N. Ésta solución contiene 20 μg de tripsina por mililitro y debe ser almacenada en refrigeración donde puede durar de 2 a 3 semanas sin pérdida apreciable de actividad.

Procedimiento

Preparación del extracto

Pesar 1 g de la muestra molida y desengrasada (< 5% grasa) en un vaso de precipitado y adicionar 45 mL de una solución de NaOH 0.01N, posteriormente ajustar el pH a 9.6 ± 0.2 y aforar a 50 mL. Trasvasar a un vaso que contenga un magneto para agitar la suspensión por 2:30 horas a 300 rpm. Transcurrido el tiempo dejar sedimentar 30 min, por decantación obtener el sobrenadante desechando el residuo insoluble. El sobrenadante debe diluirse hasta el punto de que 1 mL produzca una inhibición de 40 a 60%; este requisito es indispensable para reducir la desviación estándar relativa.

Determinación de la actividad

Pipetear porciones de 0.0, 0.6, 1.0, 1.4 y 1.8 mL de extracto directo o diluido a tubos de ensaye por duplicado y ajustar el volumen a 2.0 mL con agua destilada. Introducir a baño maría a 37°C.

A una serie de tubos adicionar 2 mL de la solución de tripsina bovina (previamente atemperada a 37°C) y agitar muy bien con ayuda del Vortex posteriormente introducirlos a un baño de agua a 37°C por 10 minutos. A continuación adicionar 5 mL de la solución BAPNA dejando que la reacción se mantenga durante 10 minutos a 37°C y, a los 10 min exactos adicionar 1 mL de ácido acético 30% para detener la reacción.

Finalmente centrifugar el precipitado a 6000 rpm por 15 minutos y leer la absorbancia a 410 nm, con ayuda de un espectrofotómetro.

Realiza el blanco de cada tubo adicionando el ácido antes de la solución BAPNA.

Cálculos

Una unidad de tripsina (U.T.) es arbitrariamente definida como un incremento de 0.01 unidades de absorbancia (A) a 410 nm por 10 mL de mezcla de reacción. Así la lectura de absorbancia (A) se puede pasar directamente a U.T. ($U.T.=A*100$).

Debido a que se tiene una serie de alícuotas del extracto, se tendrían entonces una serie de valores de U.T., estos valores deben ser restados al valor de referencia (0.0 mL de extracto), para así obtener el valor de unidades de tripsina inhibida (U.T.I.).

Después de calcular el valor de U.T.I./mL a partir del volumen de extracto utilizado para la serie (0.6, 1.0, 1.4 y 1.8 mL), se grafica mL de extracto vs U.T.I./mL, se obtiene la ordenada al origen.

Finalmente la actividad de inhibidores de tripsina se expresa en términos de U.T.I./mg de muestra, tomando en cuenta el volumen inicial de extracto, las diluciones y el peso de la muestra.

$$\frac{\text{U. T. I.}}{\text{mg}} \text{ de muestra} = B \times F \times \frac{50}{\text{mg de muestra}}$$

Dónde:

B: Valor de la ordenada de la curva

F: Factor de dilución (aforo/alícuota)

5.4.1.2 Oxalatos

Se basa en la extracción del ácido oxálico en medio ácido y con agitación mecánica, posteriormente se precipita el oxalato como oxalato de calcio y se cuantifica por medio de una determinación permanganométrica donde se titula el ácido oxálico con una solución valorada de KMnO_4 0.01N; donde el ácido oxálico se oxida hasta CO_2 .

Materiales

Balanza analítica Sartorius Extend

Vaso Berzelius de 600 mL

Potenciometro Thermo Scientific

Orion 3 Star

Parrilla con agitación CORNING

stirrer modelo 440826

Papel Whatman # 4 y # 40

Centrifuga Eppendorf modelo 5702

Fibra de vidrio

Reactivos

HCl 6N	NH ₄ OH
Reactivo de ácido tungstofosfórico (1)	H ₂ SO ₄ (1:9)
Buffer de acetato (2)	Antiespumante
Líquido de lavado (3)	Na ₂ C ₂ O ₄ (anhidro)
KMnO ₄ 0.01N (4)	

- (1) Disolver 2.5 g de tungstato de sodio dihidratado (Na₂WO₄ * 2H₂O) en la mezcla de 4 mL de ácido fosfórico y 50 mL de agua destilada y aforar a 100 mL con agua destilada.
- (2) Disolver 2.5 g de cloruro de calcio anhidro en 50 mL de una solución de ácido acético y agua (50: 50). Preparar una solución de 33 g de acetato de sodio trihidratado (CH₃COONa * 3H₂O) diluido a 50 mL con agua destilada y mezclar.
- (3) Diluir 12.5 mL de ácido acético concentrado con 250 mL de agua destilada y añadir polvo de oxalato de calcio, agitar y dejar reposar. Repetir la adición y la agitación hasta la saturación. Enfriar a 4°C antes de su uso filtrar en papel Whatman # 4. Mantenerla en frío durante su uso.
- (4) Solución de KMnO₄ 0.1N: Pesar 3.2 g aproximados de KMnO₄ y disolver en 1 L de agua destilada. Calentar la solución hasta que hierva durante 1 hora, evitando que la ebullición sea tumultosa, enfriar y completar al volumen. Dejar reposar toda la noche y filtrar por fibra de vidrio. Recibir en un frasco ámbar limpio.

Estandarización de la solución de KMnO₄ 0.1N: Se titula pesando con exactitud 0.2 a 0.3 g de Na₂C₂O₄ previamente secado 100 a 110°C/ 2 horas y colocar en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Disolver en agua (50 a 70 mL) y agregar 15 a 20 mL de H₂SO₄ diluido 1:8. La solución se calienta a 70 °C y se titula con agitación dejando caer la solución de permanganato de potasio lentamente hasta una coloración rosa permanente. Como blanco medir el mismo volumen de H₂SO₄ diluido (5 + 95) previamente hervido por

10 a 15 minutos y después enfriado a $27 \pm 3^\circ\text{C}$. Restar el volumen del blanco al de la titulación, este valor se utiliza en los cálculos. Para obtener la normalidad.

$$N = \frac{\text{g Na}_2\text{C}_2\text{O}_4 \times 1000}{\text{mL KMnO}_4 \times 67}$$

Solución de KMnO_4 0.01N: Diluir 100 mL de la solución de KMnO_4 0.1N a 1 L de agua destilada. Es importante que esta solución se prepare al momento, para evitar su descomposición.

Procedimiento

Preparación de la muestra

Se pesan de 5 a 10 g de harina del material en estudio, se coloca dentro de un vaso Berzelius de 600 mL, se agregan 200 mL de agua destilada y se agita en la parrilla por 15 minutos. Llevar a 300 mL enjuagando las paredes, añadir 55 mL de HCl 6N, dos gotas de antiespumante y llevar a ebullición y reflujo por 15 minutos, después de dicho tiempo dejar enfriar.

Aforar a 500 mL con agua destilada enjuagando las paredes del vaso, agitar y dejar reposar toda la noche. Filtrar a través de papel filtro Whatman # 4 y desechar los primeros 100 mL, (con la finalidad de acondicionar nuestro sistema).

Precipitación de ácido oxálico

Tomar una alícuota de 25 mL del filtrado con una pipeta y colocar en un matraz Erlenmeyer de 50 mL, agregar 5 mL de ácido tungstofosfórico, mezclar y dejar reposar al menos 5 horas. Filtrar a través de papel Whatman # 40. Pasar 20 mL del filtrado con pipeta en un tubo para centrífuga y adicionar NH_4OH gota a gota con cuidado hasta un pH 4 a 4.5, utilizando un potenciómetro. Adicionar 5 mL de la solución amortiguadora de acetato y mezclar con una varilla de vidrio.

Enjuagar la varilla de vidrio dentro del tubo de centrífuga con un pequeño chorro de agua destilada y dejar reposar toda la noche. Centrifugar durante 15

minutos a 1700 rpm para compactar el precipitado. Decantar el sobrenadante con una inversión suave del tubo de centrifuga teniendo cuidado de no romper o agitar el precipitado de oxalato. Voltar el tubo hacia abajo y dejar que el sobrenadante gotee completamente en un papel filtro limpio. Lavar el precipitado con 20 mL de líquido de lavado frío en un chorro fino rompiendo completamente el precipitado. Repetir los pasos de centrifugación y decantado, añadir 5 mL de H₂SO₄ (1:9) al precipitado. Proceder con la titulación con permanganato.

Titulación

Titular las soluciones calientes con KMnO₄ 0.01N hasta que persista una coloración rosa durante 30 segundos. Restar el volumen del blanco al de la titulación de la muestra y con este valor realizar los cálculos para obtener la concentración de ácido oxálico en las muestras.

Cálculos

Para conocer el contenido de ácido oxálico (%) en la muestra problema, se utiliza la siguiente fórmula:

$$(\text{mL KMnO}_4 \text{ gastados} - \text{mL KMnO}_4 \text{ blanco}) \times \frac{\text{meq KMnO}_4}{\text{mL}} \times \frac{\text{g ác.oxálico}}{\text{meq}} \times F \times \frac{100 \text{ g}}{\text{g muestra}}$$

Dónde:

meq: 0.045 para ácido oxálico

F: factor de dilución $\frac{500 \text{ mL}}{25 \text{ mL}} \times \frac{30 \text{ mL}}{20 \text{ mL}}$

5.4.1.3 Fitatos

En este método se 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. (Sotelo et al, 2003)

Materiales

Balanza analítica Sartorius extend
Columnas de intercambio iónico (a)
Potenciómetro Thermo Scientific
Orion 3 Star
Agitador magnético múltiple Daithan
Scientific Wisestir
Centrifuga Thermo electron
corporation IEC MULTI RF
Vortex LabLine modelo 1290
Espectrofotómetro Thermo Scientific
Genesis 10 UV

Reactivos

Resina de intercambio aniónico BIO
RAD AG 2-X8 (200-400 mesh)
Solución salina 0.7N
Solución salina 0.1N
NaOH 0.1N
HCl 0.65N
Reactivo de Wade (b)
Sal de fitato de sodio

- (a) Pesar aproximadamente 0.5 g de resina e hidratarla con 3 mL de agua desionizada, enjuagar con un volumen máximo de 3 mL para que no quede residuo de resina en el vaso. Preparar las columnas utilizando jeringas de 3 mL e introducir en el fondo de la misma un tapón de fibra de vidrio y colocarla sobre un soporte. Agregar a la columna la resina hidratada cuidando que quede asentada uniformemente, una vez que la resina esté bien empacada en la columna, adicionar 15 mL de NaCl 0.7N. Posteriormente lavar con 30 mL de agua desionizada, dejar líquido en la superficie para que no se seque la resina y quede lista para usarse.
- (b) Pesar 0.03 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0.3 g de ácido sulfosalicílico, y disolverlos en agua desionizada hasta un volumen de 100 mL. El reactivo debe ser preparado al momento de hacer la determinación espectrofotométrica, una vez adicionado a las muestras debe leerse en menos de 30 minutos.

Procedimiento

Preparación de los estándares

Preparar una solución concentrada de ácido fítico que contenga 1 mg de ácido por mililitro. Pesar exactamente 0.080 g de la sal de fitato de sodio, considerando la pureza y humedad del reactivo. Aforar con agua desionizada hasta un volumen de 50 mL y a partir de la solución concentrada preparar las soluciones de los estándares de 5, 10, 20, 30, 40 y 50 µg/mL.

Extracción del ácido fítico

Pesar 1 g de muestra desengrasada (< 5% grasa), colocarla en un vaso de precipitado de 50 mL y adicionarle 20 mL de HCl 0.65N, el pH de la suspensión debe estar entre 0 y 1, someter a agitación vigorosa durante 2 horas a temperatura ambiente, transferir cuantitativamente el extracto obtenido a tubos de centrifuga para centrifugarlos a 12000 rpm a temperatura ambiente por 30 minutos, transcurrido este tiempo colectar el sobrenadante.

Purificación por columna de intercambio iónico

Tomar una alícuota de los sobrenadantes colectados y diluir con agua desionizada para disminuir la concentración total del anión. Para este caso se recomienda en muestras que se espera un contenido alto de ácido fítico 1:25 y 5:25 en muestras que se espera menos del 1%. Posteriormente ajustar el pH de la alícuota diluida a 6.00 con NaOH 1N. Tomar 10 mL de la alícuota diluida y transferir cuantitativamente a la columna (previamente preparada). Lavar la columna con 15 mL de NaCl 0.1N y desechar el agua de lavado. Finalmente eluir el fitato con 15 mL de NaCl 0.7N y colectar el extracto purificado.

Determinación espectrofotométrica

Tomar 3 mL de agua desionizada (blanco), 3 mL de los estándares y 3 mL de los extractos purificados a través de la columna y ajustar previamente a pH 3.00, adicionarles 1 mL de reactivo de Wade y someter a agitación en el vortex por 5 segundos. Posteriormente leer la absorbancia a 500 nm.

Utilizar una celda con agua desionizada para calibrar el espectrofotómetro en cero y leer la absorbancia del blanco, los estándares y la muestra problema, a cada una de estas se le resta por separado el blanco para así obtener la absorbancia corregida respectiva.

Realizar la curva patrón con regresión lineal, interpolar los datos y realizar los datos necesarios para obtener la concentración de ácido fítico en las muestras.

Cálculos

Con la ecuación de la recta calcular los μg de ácido fítico/ mL de NaCl, con la siguiente ecuación:

$$\frac{\mu\text{g ácido fítico}}{\text{mL NaCl}} = \frac{\text{absorbancia corregida} - b}{m}$$

Se obtienen los g de muestra con la ecuación:

$$\frac{\text{g muestra}}{\text{mL NaCl}} = \frac{\text{g muestra}}{20 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ mL HCl}}{\text{mL H}_2\text{O aforados}} \times \frac{10 \text{ mL H}_2\text{O}}{15 \text{ mL NaCl}}$$

El % de ácido fítico se obtiene:

$$\% \text{ ácido fítico} = \frac{\mu\text{g ácido fítico}}{\text{mL NaCl}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000000 \mu\text{g}} \times \frac{\text{mL NaCl}}{\text{g muestra}} \times 100$$

5.4.2 Agentes tóxicos

5.4.2.1 Nitratos

El método se basa en la extracción acuosa de nitratos de tejidos vegetales, con la posterior centrifugación y la formación de un complejo como resultado de la nitración del ácido salicílico bajo condiciones 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 la sal de nitrato químicamente pura. (Cataldo et al 1975).

Materiales

Agitador magnético Daithan Scientific
Wisestir

Centrifuga Eppendorf modelo 5702

Vortex labLine super-mixer 1290

Baño de agua Polystat modelo 12002
a $30^{\circ}\text{C} \pm 0.5$

Espectrofotómetro Thermo Scientific

Genesis 10 UV

Papel Whatman # 41 y # 542

Reactivos

Solución estándar de nitrato 0.6
mg/mL

Solución estándar de nitrato 10
mg/mL

Solución de ácido salicílico al 5%
(m/v) en ácido sulfúrico concentrado

NaOH 2M

Carbón activado

Procedimiento

Preparación de la curva estándar

En un vaso de precipitado de 50 mL adicionar exactamente 3.0 mL de la solución estándar de nitrato de 10 mg/mL, 550 mg de carbón activado y aproximadamente 30 mL de agua. Mezclar hasta homogeneizar y filtrar con ayuda de vacío sobre papel Whatman # 41, transferir el filtrado y aforar a 50 mL, homogeneizar y transferir a un tubo de centrifuga de 50 mL, centrifugar 1 hora a 2700 a 3000 rpm. Filtrar el sobrenadante con ayuda de vacío sobre papel Whatman # 542 y homogeneizar. La solución obtenida tiene una concentración de 0.6 mg/mL.

Rotular 6 tubos de ensayo y adicionar volúmenes de 0.0, 10, 20, 50, 70, 100 μL de la solución estándar. Añadir agua a cada tubo para llevar a un volumen final de 0.1 mL y mezclar 15 segundos en vortex. Adicionar 0.4 mL de solución de ácido salicílico, mezclar por 15 segundos en vortex e introducir en baño de temperatura a 30°C por 20 ± 1 minutos. Transcurridos los 20 minutos, adicionar lentamente con bureta 9.5 mL de la solución de NaOH y agitar por 15 segundos en vortex, introducir en baño de temperatura a 30°C por 15 ± 1 minutos.

Transferir a celdas de medición y leer en espectrofotómetro a 410 nm. Trazar gráfica de absorbancia vs concentración de nitrato, expresada como μg de nitrato.

Obtención del extracto

En un vaso de precipitado de 50 mL añadir de 0.25 a 0.9 g de muestra, 550 mg de carbón activado y 30 mL de agua aproximadamente. Agitar moderadamente, de 500 a 700 rpm con agitador magnético por 15 ± 1 minutos. Filtrar con ayuda de vacío sobre papel Whatman # 41, transferir el filtrado y aforar a 50 mL, homogeneizar y transferir a un tubo de centrifuga de 50 mL; centrifugar 1 hora a 2700 a 3000 rpm. Filtrar el sobrenadante con ayuda de vacío sobre papel Whatman # 542 y homogeneizar para efectuar la determinación.

Desarrollo de color

Una vez obtenido el extracto de la muestra problema rotular 4 tubos de ensayo, correspondiendo el N°1 al blanco de la muestra y a los demás adicionar una alícuota de 100 μL . Adicionar 0.4 mL de solución de ácido salicílico, mezclar por 15 segundos en vortex e introducir en baño de temperatura a 30°C por 20 ± 1 minutos. Transcurridos los 20 minutos, adicionar lentamente con bureta 9.5 mL de la solución de NaOH y agitar por 15 segundos en vortex, introducir en baño de temperatura a 30°C por 15 ± 1 minutos.

Transferir a celdas de medición y leer en espectrofotómetro a 410 nm. Mediante la ecuación de la línea recta obtenida con los datos de la curva patrón determinar el contenido de nitratos.

Cálculos

Una vez obtenido el contenido de nitratos (NO_3^-) en μg se sustituyen en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ nitratos} = \frac{\mu\text{g nitratos}}{0.1 \text{ mL}} \times 50 \text{ mL} \times \frac{1 \text{ g nitratos}}{1000000 \mu\text{g nitratos}} \times \frac{100}{\text{g de muestra}}$$

5.4.2.2 Saponinas

La determinación está basada en el aprovechamiento de la capacidad hemolítica de las saponinas sobre los eritrocitos. Se emplea un método de microtitulación en el cual se pone en contacto un extracto metanólico de la muestra resuspendido en solución salina, con los eritrocitos sensibilizados de hombre O positivo. (Giron, 1992)

Materiales

Balanza analítica Sartorius extend
Extractor de grasa Goldfish,
LABCONCO
Cartuchos de celulosa Whatman
22x88m
Rotavapor Büchi 461, modelo RE-11
Centrifuga International Clinical
modelo CL A3076X-2
Incubadora Bacteriológica Precision
ECONOMY, modelo 2 EG
Espectrofotómetro COLEMAN, Junior
II-A modelo 6/20 A
Tubos de centrifuga de 15 mL con
graduación
Microtiter kit (Cook Eng-Alexander
Virginia USA)
Espectrofotómetro a 535 nm
Parrilla de agitación y calentamiento
Gasa
Filtros de vidrio de poro grueso

Reactivos

Tubo Vacutainer de 6 mL con EDTA o
citrato de sodio 0.1 M
Aguja tipo mariposa para el set de
colección de sangre 21G ¾
Solución anticoagulante
Solución salina al 0.9% preparada
con agua desionizada
Solución de etanol (R.A.) y agua
destilada al 85% (v/v)
Sangre humana tipo O
Alcohol etílico desnaturalizado
Tripsina de páncreas de bovino
(Sigma T-8128 Tipo II) (a)
Solución estándar de saponinas al
0.5% en solución salina (b)

(a) Tripsina de páncreas de porcino (Sigma T-8128 tipo II), al 0.1% en solución salina al 0.9% para el proceso de sensibilización.

- (b) El estándar de saponinas en una mezcla 1:1 de digitonina (saponina tipo esteroideal) y un extracto de quijalla (saponina tipo triterpenoide), al 0.5% en solución salina.

Procedimiento

Preparación del extracto

Una vez que la muestra se encuentre molida y desengrasada (<5% de grasa), pesar 3.75 g y colocarlos en un cartucho de celulosa en el portapedales del extractor de Goldfish, realizar una extracción por 2 horas a una temperatura donde se observe un goteo constante, empleando 50 mL de metanol: agua como solución extractora de las saponinas. Después de transcurrido el tiempo de extracción, concentrar a sequedad en el rotavapor, a una temperatura no mayor de 65°C, predisolver la muestra en solución salina 0.9% y filtrar con ayuda de vacío, empleando filtros de vidrio de poro grueso, aforar a 50 mL con la misma solución al 0.9%. Si no se va a realizar la determinación inmediatamente, guardar los extractos en refrigeración o congelación para su conservación.

Lavado de eritrocitos

Una vez obtenida la sangre colocarla en un matraz pequeño con solución anticoagulante, trasvasarla a tubos de centrifuga para lavarla 3 veces con solución salina al 0.9%. Centrifugar a 1500 rpm durante 15 min y decantar el líquido sobrenadante, al finalizar el tercer lavado diluir el paquete de eritrocitos al 4%, es decir por cada mL de eritrocitos adicionar 24 mL de solución salina 0.9%, en caso de la presencia de coágulos filtrar a través de una gasa.

Sensibilización de glóbulos rojos

A cada 10 mL de suspensión de glóbulos rojos al 4%, agregar 1 mL de tripsina al 0.1% y colocar en incubadora por espacio de 1 hora a 37°C. Transcurrido el tiempo, centrifugar para eliminar la enzima sobrenadante y efectuar 3 lavados con solución salina 0.9% a 1500 rpm por 15 min, decantar el líquido sobrenadante. Después del último lavado medir el paquete de eritrocitos y resuspender al 5% por

lo que por cada mL de paquete se añaden 19 mL de solución salina 0.9%, colocar la suspensión en un matraz Erlenmeyer de 125 mL previamente efectuando una filtración con gasa.

Ajuste de la suspensión de eritrocitos

Ajustar el espectrofotómetro COLEMAN al 100% de T con solución salina al 0.9%, a una longitud de onda de 620 nm, en el ajuste de la suspensión de eritrocitos tomar 0.5 mL con pipeta volumétrica, colocar en una celda y adicionar 2 mL de solución salina al 0.9% con pipeta volumétrica, homogeneizar antes de introducir al espectrofotómetro COLEMAN, diluir lo necesario, hasta obtener una lectura de $26 \pm 0.5\%$ de T.

Microtitulación

Realizarla en placa de tipo "U" y en cada pozo colocar 50 μ L de solución salina al 0.9%. Llenar el microdilitor con 50 μ L del extracto problema o del estándar de saponinas y realizar las diluciones sucesivas desde el primer pozo (siguiendo la hilera horizontal hasta donde se desee) y eliminar el residuo de la última dilución. Realizadas las diluciones pertinentes colocar con el pipeteador de gota 50 μ L de la suspensión de eritrocitos sensibilizados y ajustados, se recomienda que en cada placa se tenga una hilera de control negativo (solución salina: sangre ajustada) y otra positiva de solución salina 0.9% con estándar de saponinas al 0.5%. Terminada la placa rotar en forma circular, para homogeneizar y colocar en la incubadora por 1 hora en la incubadora a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Lectura de placas

Para obtener el título de hemólisis observar empleando un espejo adaptado al dispositivo y localizar en la hilera horizontal de la placa, el número que corresponde al último pozo donde se aprecia la hemólisis, y que resulta ser la mínima cantidad de muestra que produce prueba positiva de hemólisis.

Cálculos

Las unidades asignadas en el método se definen como unidades hemolíticas por mg de muestra (U.H./mg de muestra), lo cual se explica a continuación .

La mezcla de saponinas triterpenoide y esteroideal (1:1) tiene una concentración de 0.5% en la solución estándar, si en la microtitulación se toman 0.05 mL, se tiene una concentración de 0.25 mg de saponinas en dicho volumen. En una dilución seriada se tiene la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Concentración de extracto}}{2^t}$$

Dónde:

t: título de la hemólisis

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

$$\frac{0.25 \text{ mg}}{2^8} = 0.00097 \text{ mg} = 0.97 \text{ } \mu\text{g}$$

Por definición 1 μg del estándar de saponinas es equivalente a 10 unidades hemolíticas (U.H.), por lo que $0.97 \text{ } \mu\text{g} = 9.77 \text{ U.H.}$

La concentración del extracto de la muestra para todos los casos es de 75 mg/mL, entonces; en 0.05 mL tenemos 3.75 mg; para cada título de hemólisis con valor de 1 se tiene la siguiente concentración:

$$\frac{3.75 \text{ mg}}{2^1} = 1.87 \text{ mg de muestra}$$

Por definición se obtiene:

$$\frac{9.77 \text{ U.H.}}{1.87 \text{ mg de muestra}} = 5.21 \text{ U.H./mg de muestra}$$

Cálculos para el porcentaje de saponinas:

$$\frac{5.21 \text{ U.H.}}{\text{mg de muestra}} \times \frac{1 \mu\text{g}}{10 \text{ U.H.}} \times \frac{1 \text{ mg}}{1000 \mu\text{g}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g muestra}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \times 100 = 0.05\%$$

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Análisis químico bromatológico, digestibilidad proteínica *in vitro*, calcio y hierro.

A continuación se presentan los resultados del análisis químico proximal y la complementación bromatológica de las diferentes variedades de verdolagas.

En la tabla 3 se observa que la humedad en todas las variedades se encuentra por arriba del 90%, con excepción de Mixquic 2, que fue la más baja.

Tabla 3. Humedad original (%)^a

Variedad	Americana	Chapingo	Mixquic	Mixquic 2	Queretana	Tláhuac
Humedad	94.79 ± 0.23	94.43 ± 0.16	94.23 ± 0.01	85.74 ± 2.09	94.43 ± 0.01	94.44 ± 0.10

^a Se presenta el valor promedio ± desviación estándar (n=3)

En la tabla 4 la variedad Mixquic 2 obtuvo valores mayores en proteína y ceniza, mientras que Mixquic 2 fue la que mostró los valores más bajos.

Tabla 4. Análisis proximal de las seis variedades de *Portulaca oleracea* L.^a

Variedad	Humedad (%)	Proteína cruda (%)	Grasa cruda (%)	Cenizas (%)	Fibra cruda (%)	HC (%) ^b
Americana	4.39 ± 0.06	22.89 ± 2.04	1.36 ± 0.17	24.18 ± 0.12	12.69 ± 0.62	34.49
Chapingo	4.57 ± 0.17	20.79 ± 0.24	1.37 ± 0.12	21.71 ± 0.33	15.94 ± 1.14	35.63
Mixquic	4.36 ± 0.15	20.24 ± 0.43	1.26 ± 0.06	19.98 ± 0.00	14.70 ± 0.62	39.46
Mixquic 2	3.39 ± 0.13	23.02 ± 0.95	1.36 ± 0.02	28.18 ± 0.33	12.39 ± 1.16	31.66
Queretana	4.10 ± 0.10	21.01 ± 0.91	1.13 ± 0.05	19.96 ± 0.16	14.79 ± 0.15	39.01
Tláhuac	4.74 ± 0.14	20.54 ± 0.63	1.54 ± 0.07	20.71 ± 0.29	14.12 ± 0.25	38.35

^a Se presenta el valor promedio ± desviación estándar (n=3)

^b Hidratos de carbono, determinados por diferencia de acuerdo al esquema de Weende

En la tabla 5 se muestran los resultados en muestra fresca para realizar una comparación equitativa con algunos quelites encontrados en la bibliografía (tabla 6).

Tabla 5. Análisis proximal en muestra fresca

Variedad	Humedad (%)	Proteína cruda (%)	Grasa cruda (%)	Cenizas (%)	Fibra cruda (%)	HC (%)
Americana	94.79	1.24	0.07	1.31	0.69	1.87
Chapingo	94.43	1.21	0.08	1.27	0.93	2.08
Mixquic	94.23	1.22	0.07	1.20	0.89	2.38
Mixquic 2	85.74	3.39	0.19	4.15	1.82	4.67
Queretana	94.43	1.22	0.06	1.16	0.86	2.26
Tláhuac	94.44	1.19	0.09	1.21	0.82	2.24

En la tabla 6 se muestra la composición nutrimental de algunos quelites en material fresco.

Tabla 6. Composición nutrimental de algunos quelites

Quelite	Humedad (%)	Proteína cruda (%)	Grasa cruda (%)	Cenizas (%)	Fibra cruda (%)	HC (%)
Berro	90.60	2.81	0.50	1.20	1.45	3.44
Chivitos	92.80	2.12	0.28	1.80	0.87	2.13
Epazote	89.80	2.57	0.20	1.90	0.81	4.72
Flor de chocho	91.58	2.70	0.21	1.33	1.15	3.01
Gasparito	91.58	2.46	0.17	0.89	1.68	3.19
Guías chayote	89.70	3.59	0.12	1.58	1.95	3.03
Lengua de vaca	92.20	1.87	0.29	1.20	0.93	3.51
Pápalo quelite	93.20	1.75	0.33	0.90	0.93	2.89
Tomalquilitl	86.90	3.77	0.20	1.91	2.50	4.70

Fuente: Bourges et al, 2013.

Al compararlos con el de las verdolagas en las tablas 3 y 5 se observa que estas últimas se encuentran en un rango similar al de los demás quelites, y son las que contienen en general, una mayor cantidad de humedad siendo de un 95% con

respecto a los demás quelites que están alrededor de un 90%, además son las que presentan un menor contenido de grasa, en cuanto a los demás parámetros todas las variedades presentaron valores dentro de los rangos de los demás quelites.

El análisis proximal de la tabla 4 se realizó en las muestras en forma de harina, encontrándose que el mayor macronutriente son los hidratos de carbono digeribles y se realizó por diferencia, seguido de cenizas y proteína que se encuentran en cantidades similares, después se encuentra la fibra y finalmente la grasa que es el componente minoritario.

Debido al contenido de proteína en las muestras se realizó la determinación de digestibilidad proteínica *in vitro*, cuyos resultados se muestran en la tabla 7 y se observa que para todas las muestras: la digestibilidad *in vitro* se encuentra en un rango del 66 a 71%.

Tabla 7. Digestibilidad *in vitro*

Variedad	Digestibilidad proteínica <i>in vitro</i> ^a
Americana	69.92 ± 2.66
Chapingo	69.02 ± 2.15
Mixquic	69.39 ± 1.27
Mixquic 2	71.35 ± 1.16
Queretana	70.38 ± 2.59
Tláhuac	66.16 ± 1.50

^a Se presenta el valor promedio ± desviación estándar (n=3)

A continuación se muestran los resultados del análisis de varianza para el análisis proximal, para digestibilidad proteínica *in vitro*; como para esta última no influye el contenido de agua, se realizó el análisis estadístico con el parámetro directamente.

Con los datos de digestibilidad *in vitro* y los parámetros químicos del material biológico se realizó el análisis estadístico con el programa de computación de estadística STATGRAPHICS versión 5.1, realizándose el análisis de varianza

acoplado a la prueba de Duncan, para discriminar si existía o no diferencia significativa de cada variable analizada.

Los datos de las tablas 8 a 13, se calcularon en % en base seca, o sea expresar la concentración del componente en 100 g de sólidos totales, para que el contenido de agua no interfiera en la prueba estadística y sea más equitativa la comparación entre las diferentes muestras.

6.1.1 Humedad

A continuación se muestra la tabla 8 con los resultados obtenidos en el análisis de varianza sobre el contenido de sólidos totales, expresados en base seca que indirectamente nos permite analizar la concentración de humedad en el material biológico en forma de harina.

Tabla 8. Resultados del análisis de varianza acoplado a la prueba de rango múltiple (Duncan) para el contenido de sólidos totales *.

Variedad	Sólidos totales (%)
Tláhuac	95.26 ^a
Chapingo	95.43 ^{ab}
Americana	95.61 ^{bc}
Mixquic	95.64 ^{bc}
Queretana	95.75 ^c
Mixquic 2	96.61 ^d

* Se presenta el valor promedio (n=3), CV<5%
Diferente letra dentro de la columna indican diferencia estadísticamente significativa.

Los valores de la humedad analítica van de 3.39 hasta un 4.74%, lo cual es muy importante en la industria de alimentos, ya que la humedad de un alimento es una parte crucial en su conservación. Un contenido mayor al 15% de agua no es recomendable, ya que favorece el desarrollo de microorganismos, razón por la que es importante que este contenido sea bajo.

Todas las muestras se encontraron por debajo de este valor, es decir con una humedad baja y debido a que llegaron frescas se sometieron inmediatamente a un

proceso de secado, esto además con la finalidad de realizarle las determinaciones analíticas y facilitar su manipulación.

En la tabla 8 se observan los resultados de sólidos totales los cuales son inversamente proporcionales al contenido de humedad en la muestra, siendo Tláhuac la muestra con mayor contenido de humedad y Mixquic 2 la de menor valor, un factor que pudo influir en esto fue la edad de la planta ya que tiende a perder agua, lo que disminuye el contenido de humedad.

El contenido de las demás variedades es similar, ya que todas se encuentran alrededor de un 4% de humedad. No se encuentra diferencia significativa entre las variedades de Tláhuac y Chapingo, así como entre las de Chapingo, Americana y Mixquic, ni para Americana, Mixquic y Queretana, y como se mencionó anteriormente Mixquic 2 es la única que es completamente diferente a las demás.

6.1.2 Proteína cruda

A continuación se muestra la tabla 9 con los resultados obtenidos en el análisis de varianza, expresados en base seca.

Tabla 9. Resultados del análisis de varianza acoplado a la prueba de rango múltiple (Duncan) para el contenido de proteína *.

Variedad	Proteína (%)
Mixquic	21.17 ^a
Tláhuac	21.57 ^a
Chapingo	21.77 ^a
Queretana	21.94 ^{ab}
Mixquic 2	23.83 ^b
Americana	23.93 ^b

* Se presenta el valor promedio (n=3), CV<5%
Diferente letra dentro de la columna indican diferencia estadísticamente significativa.

Después de los hidratos de carbono, junto con cenizas son el componente mayoritario de las verdolagas. Siendo el componente más importante desde el punto de vista nutrimental debido a que la desnutrición en nuestro país,

principalmente en zonas marginadas; es causada por una deficiencia energético proteínica y la verdolaga constituye una fuente importante de proteína para la alimentación en estas zonas.

En la tabla 9 observamos dos grupos, el grupo A (Mixquic, Tláhuac, Chapingo y Queretana) y el grupo B (Queretana, Mixquic 2 y Americana) y la variedad Queretana intermedia entre estos dos grupos, donde el grupo A presenta una menor cantidad de proteína y el grupo B pertenece a la mayor cantidad de proteína. Con valores arriba al 20%, lo que es elevado y lo hace ser una potencial fuente de este nutrimento.

6.1.3 Grasa

A continuación se muestra la tabla 10 con los resultados obtenidos en el análisis de varianza, expresados en base seca.

Tabla 10. Resultados del análisis de varianza acoplado a la prueba de rango múltiple (Duncan) para el contenido de grasa *.

Variedad	Grasa (%)
Queretana	1.25 ^a
Mixquic	1.32 ^a
Americana	1.42 ^{ab}
Chapingo	1.44 ^{ab}
Mixquic 2	1.45 ^{ab}
Tláhuac	1.62 ^b

* Se presenta el valor promedio (n=3), CV<5%
Diferente letra dentro de la columna indican diferencia estadísticamente significativa.

El contenido de grasa en las muestras es el más bajo dentro del análisis proximal y no existe mucha variabilidad en las muestras, ya que las variedades Queretana, Mixquic, Americana, Chapingo y Mixquic 2 no muestran diferencia significativa, así como tampoco la Americana, Chapingo, Mixquic 2 y Tláhuac. Los valores se mantienen en un rango del 1 al 2%, lo cual hizo que algunas

determinaciones en las cuales fue necesario desengrasar la muestra fueran más rápidas.

Para conocer más acerca de la composición de la grasa en las verdolagas es necesaria su caracterización, en la cual se pueden conocer los ácidos grasos presentes importantes nutricionalmente hablando. Esto debido a la presencia de compuestos bioactivos entre los que se encuentran ácidos grasos poliinsaturados de las series n-3 y n-6.

6.1.4 Cenizas

A continuación se muestra la tabla 11 con los resultados obtenidos en el análisis de varianza, expresados en base seca.

Tabla 11. Resultados del análisis de varianza acoplado a la prueba de rango múltiple (Duncan) para el contenido de cenizas *.

Variedad	Cenizas (%)
Queretana	20.75 ^a
Mixquic	20.94 ^a
Tláhuac	21.94 ^b
Chapingo	22.75 ^c
Americana	25.29 ^d
Mixquic 2	29.17 ^e

* Se presenta el valor promedio (n=3), CV<5%
Diferente letra dentro de la columna indican diferencia estadísticamente significativa.

Como se mencionó anteriormente las cenizas son el segundo componente mayoritario en las muestras y son un elemento importante ya que indican la presencia de algunos elementos inorgánicos importantes, por lo que la verdolaga es fuente importante de minerales en las poblaciones rurales.

La variedad con menos contenido de cenizas es la Queretana, y el mayor valor lo obtuvo Mixquic 2, en este caso la cantidad de cenizas se encuentra en un rango muy amplio, es decir; que variaron mucho los valores lo cual se refleja en el

análisis estadístico, con excepción de la Queretana y Mixquic, este parámetro es un buen discriminador de la variedad de verdolaga (a, b, c, d y e).

6.1.5 Fibra cruda

A continuación se muestra la tabla 12 con los resultados obtenidos en el análisis de varianza, expresados en base seca.

Tabla 12. Resultados del análisis de varianza acoplado a la prueba de rango múltiple (Duncan) para el contenido de fibra *.

Variedad	Fibra (%)
Mixquic 2	12.83 ^a
Americana	13.36 ^a
Tláhuac	15.13 ^b
Mixquic	15.38 ^{bc}
Queretana	15.44 ^c
Chapingo	16.71 ^c

* Se presenta el valor promedio (n=3), CV<5%
Diferente letra dentro de la columna indican diferencia estadísticamente significativa.

En el caso de la fibra se obtuvieron valores altos, debido a que el análisis se realizó en toda la planta, es decir en hojas y tallos, lo cual aumenta el contenido de fibra.

La fibra es un elemento muy importante ya que su consumo ayuda en el tratamiento de enfermedades como obesidad, previene y ayuda a eliminar el estreñimiento, dan sensación de saciedad, pero su consumo excesivo puede interferir en la digestión de proteínas y la absorción de algunos nutrientes inorgánicos, también puede ocasionar diarreas.

Los valores se encuentran en un rango de 12 a 16% lo cual muestra tanta variabilidad, y al ver los resultados del análisis estadístico se divide en 3 grupos el grupo A (Mixquic 2 y Americana), el grupo B (Tláhuac y Mixquic), finalmente el grupo C (Mixquic, Queretana y Chapingo). Donde el grupo con mayor contenido

de fibra es el grupo C y el grupo con el menor contenido es el A, mientras que en el grupo B el contenido de fibra es intermedio.

Además tenemos que tomar en cuenta que la fibra cruda no es la fibra total, ya que es un valor subestimado, es importante conocer el contenido de fibra dietética total.

6.1.6 Hidratos de carbono

A continuación se muestra la tabla 13 con los resultados obtenidos en el análisis de varianza, expresados en base seca.

Tabla 13. Resultados del análisis de varianza acoplado a la prueba de rango múltiple (Duncan) para el contenido de hidratos de carbono*.

Variedad	HC (%)
Mixquic 2	32.73 ^a
Americana	35.99 ^b
Chapingo	37.32 ^{bc}
Tláhuac	39.76 ^{cd}
Queretana	40.62 ^d
Mixquic	41.21 ^d

* Se presenta el valor promedio (n=3), CV<5%
Diferente letra dentro de la columna indican diferencia estadísticamente significativa.

Los hidratos de carbono se obtuvieron por diferencia, son el componente mayoritario pero se debe de tomar en cuenta que es un valor sobreestimado ya que engloba parte de la fibra dietética total.

En la tabla 13, se observa que los valores son muy variables, y que no existe una diferencia significativa entre las variedades Americana y Chapingo, así como entre Chapingo y Tláhuac y tampoco entre Tláhuac, Queretana y Mixquic, siendo la variedad Mixquic 2 la única diferente a las demás y obteniendo el valor más bajo.

6.1.7 Digestibilidad proteínica *in vitro*

A continuación se muestra la tabla 14 con los resultados obtenidos en el análisis de varianza, de la disponibilidad de la fracción proteínica.

Tabla 14. Resultados del análisis de varianza acoplado a la prueba de rango múltiple (Duncan) para la determinación de digestibilidad proteínica *in vitro* *.

Variedad	Digestibilidad (%)
Tláhuac	66.16 ^a
Chapingo	69.02 ^{ab}
Mixquic	69.39 ^{ab}
Americana	69.92 ^{ab}
Queretana	70.30 ^b
Mixquic 2	71.35 ^b

* Se presenta el valor promedio (n=3), CV<5%
Diferente letra dentro de la columna indican diferencia estadísticamente significativa.

Es muy importante saber cuál es el contenido de proteína en nuestro alimento, pero también es importante saber la disponibilidad de este nutrimento para ser aprovechada por el organismo, por esta razón se realizó ésta determinación.

En la tabla 14 el rango va de 66 a 71% lo que indica una digestibilidad aceptable, ya que el rango adecuado para alimentos de origen vegetal es de 60 a 80%, mientras que para los de origen animal es mayor a 80%, lo cual se puede explicar en parte por la presencia de factores tóxicos.

6.1.8 Calcio y hierro

En cuanto al contenido de calcio y hierro, en la bibliografía se ha reportado que la verdolaga cuenta con un alto contenido de cenizas, alrededor de un 20.3%, un alto valor de cenizas indica un alto contenido de minerales tales como el calcio y el hierro, entre otros, como se puede observar en la tabla 4, el contenido de cenizas es muy alto y en la tabla 15 se muestran los resultados de calcio y hierro con valores de 600 a 1160 mg de calcio/ 100 g de muestra lo que equivale a un alto contenido, es decir alrededor de 1.16% que, comparado con lo reportado en la

literatura (1.8%) es similar , el calcio es importante para las funciones en el organismo, ya que es el mineral más abundante en nuestro organismo, encontrándose en mayor proporción en los huesos en forma de fosfato de calcio y básicamente desempeña un papel esencial en numerosos fenómenos bioquímicos y fisiológicos.

Tabla 15. Determinación de calcio y hierro

Variedad	Calcio ^a	Hierro ^b
Americana	1.16	433.2
Chapingo	1.12	392.7
Mixquic	1.05	29.3
Mixquic 2	0.60	764.2
Queretana	1.16	259.2
Tláhuac	1.03	359.6

^a Expresados en g de elemento/ 100 g de harina (%)

^b Expresados en mg de elemento/ kg de harina (ppm)

En la tabla 15 el hierro se encuentra, en general; de 2 a 70 mg de hierro / 100 g de muestra, que es un contenido elevado, el cual; al igual que el calcio es un elemento muy importante para el organismo, participa en el proceso de respiración celular, al igual que en reacciones como la oxidación del ácido ascórbico y lípidos insaturados.

Los altos contenido de calcio y hierro, al igual que su variación entre las muestras se debe a la composición del suelo, ya que las plantas aprovechan los minerales de éste durante su desarrollo.

En este caso las determinaciones se realizaron en el laboratorio 209 del conjunto D por el Dr. Ciro Márquez, por lo cual se le extiende un agradecimiento, por el apoyo en esta parte analítica.

6.2 Factores tóxicos: inhibidores de tripsina, oxalatos, fitatos, saponinas y nitratos.

En algunos alimentos se pueden encontrar agentes tóxicos y/o antinutrimientales los cuales pueden causar daños al organismo ya que son capaces de disminuir la disponibilidad o provocar una pérdida suplementaria de los nutrimentos esenciales.

A continuación se presentan los siguientes: inhibidores de tripsina, oxalatos, fitatos, saponinas y nitratos. Se analizaron los factores tóxicos encontrados comúnmente en las plantas no convencionales, como la verdolaga y en la tabla 16 se observa que la mayoría de los factores tóxicos son elevados, lo que significa posibles riesgos a la salud si éste alimento se consume en exceso.

Tabla 16. Factores tóxicos presentes en las verdolagas ^a B.H.

Variedad	Inhibidores de tripsina ^b	Oxalatos (%)	Fitatos (%)	Saponinas (%)	Nitratos (%)
Americana	1.20 ± 0.21	8.82 ± 0.23	9.39 ± 0.02	<0.05 ± 0.00	6.39 ± 0.02
Chapingo	1.15 ± 0.16	4.76 ± 0.24	8.64 ± 0.04	<0.05 ± 0.00	6.59 ± 0.04
Mixquic	1.03 ± 0.11	5.33 ± 0.16	7.96 ± 0.02	<0.05 ± 0.00	6.17 ± 0.07
Mixquic 2	5.05 ± 0.07	5.39 ± 0.08	7.92 ± 0.07	0.05 ± 0.00	8.74 ± 0.03
Queretana	0.87 ± 0.19	5.79 ± 0.18	8.00 ± 0.05	<0.05 ± 0.00	5.52 ± 0.03
Tláhuac	0.86 ± 0.06	6.42 ± 0.02	9.03 ± 0.03	<0.05 ± 0.00	6.26 ± 0.02

^a Se presenta el valor promedio ± desviación estándar (n=3)

^b Unidades de Tripsina Inhibida/ mg de muestra

B.H. Base húmeda

A continuación se muestran los análisis estadísticos para cada uno de los agentes tóxicos y antinutrimientales de acuerdo a la variedad de la verdolaga. Los datos originales de las tablas 17 a 21 se calcularon en % de base seca, o sea expresar la concentración del componente en 100 g de sólidos totales, para que el contenido de agua no interfiera en la prueba estadística y sea más equitativa la comparación entre las diferentes muestras.

Los factores tóxicos engloban a los agentes antinutrimientales como los inhibidores de tripsina, oxalatos y fitatos y agentes tóxicos como lo son los nitratos y saponinas.

6.2.1 Agentes antinutrimientales.

A continuación se muestran los agentes antinutrimientales: inhibidores de tripsina, oxalatos y fitatos.

6.2.1.1 Inhibidores de tripsina

A continuación se muestra la tabla 17 con los resultados obtenidos en el análisis de varianza, expresados en base seca.

Tabla 17. Resultados del análisis de varianza acoplado a la prueba de rango múltiple (Duncan) para el contenido de inhibidores de tripsina *.

Variedad	Inhibidores (UTI/mg muestra)
Queretana	0.90 ^a
Tláhuac	0.91 ^a
Mixquic	1.07 ^a
Chapingo	1.20 ^a
Americana	1.25 ^a
Mixquic 2	5.22 ^b

* Se presenta el valor promedio (n=3), CV<5%
Diferente letra dentro de la columna indican diferencia estadísticamente significativa.

De acuerdo al alto contenido de proteína y a los valores de digestibilidad, se sabe que la verdolaga es una buena fuente de proteína, por lo cual es importante saber si esta proteína será aprovechada por el organismo, por lo cual se realizó la cuantificación de inhibidores de tripsina.

Los inhibidores de tripsina son capaces de inhibir la actividad proteolítica de la tripsina y se considera de acuerdo a la metodología aplicada que a partir de 10 UTI/mg de muestra representa un riesgo importante en la salud ya que no permite la disponibilidad de la proteína dietética, además que al formar su complejo enzima- inhibidor el páncreas se ve estimulado a secretar un exceso de enzimas proteolíticas debido a la falta de estas enzimas libres, lo que agranda e incrementa la demanda de la enzima por el órgano. Estos se encuentran ampliamente

distribuidos en el reino vegetal, localizados en los órganos reproductores de los vegetales, particularmente en las leguminosas. En la tabla 16 se observa que todas las muestras se encuentran abajo del LMP, lo cual indica que no existe un riesgo desde el punto de vista de éste factor antinutricional. Además, todas las muestras indican que los inhibidores de tripsina encontrados son de tipo Kunitz, de acuerdo a la metodología aplicada.

En la tabla 17 se observa que estadísticamente no existe diferencia significativa entre ellas, con excepción de la muestra Mixquic 2, que a pesar de ser la muestra que contiene mayor presencia de inhibidores de tripsina, no representa riesgo alguno ya que se encuentra por debajo del límite máximo permitido (LMP).

6.2.1.2 Oxalatos

Es importante señalar que en esta determinación se realizó un ajuste, al realizar la metodología, en vez de tomarse una alícuota de 25 mL, sólo se tomó 1 mL, ya que fue necesaria esta modificación para obtener el contenido de oxalatos presente en la muestra. A continuación se muestra la tabla 18 con los resultados obtenidos en el análisis de varianza, expresados en base seca.

Tabla 18. Resultados del análisis de varianza acoplado a la prueba de rango múltiple (Duncan) para el contenido de oxalatos *.

Variedad	Oxalatos (%)
Chapingo	4.98 ^a
Mixquic	5.57 ^b
Mixquic 2	5.58 ^b
Queretana	6.03 ^c
Tláhuac	6.74 ^d
Americana	9.22 ^e

* Se presenta el valor promedio (n=3), CV<5%
Diferente letra dentro de la columna indican diferencia estadísticamente significativa.

Los oxalatos actúan como agentes quelantes y reductores directamente del metabolismo del calcio, alterando sus funciones en el organismo. Debido al alto

contenido de calcio encontrado en las diferentes variedades de verdolagas es importante saber si éste calcio estará disponible para su uso por lo cual se determinó el contenido de oxalatos.

Los valores de oxalatos reportados en la literatura van de 2.5 a 8%, en la tabla 16 se tienen valores de 4.7 a 8.9%, los niveles son muy elevados y pueden llevarnos a la producción de cálculos renales, al interactuar con el calcio o a padecer hipocalcemia.

En el análisis estadístico de la tabla 18 se observan valores que van desde 4 a 9% los cuales son muy variables y explica porque todas las muestras tienen una diferencia significativa, con excepción de las muestras Mixquic y Mixquic 2, lo que se debe a que provienen de la misma región. La variación en los resultados se debe a muchos factores, principalmente las condiciones de cultivo y la temperatura.

Al obtenerse valores altos tanto en la determinación de calcio, como en la de ácido oxálico se debe de realizar una relación oxalato/ calcio, y así saber si la verdolaga es fuente de calcio o no. La bibliografía nos dice que si la relación de meq oxalato/ meq calcio es mayor a 1, no se puede considerar como fuente calcio. Los valores fueron los siguientes:

Tabla 19. Relación oxalato/ calcio en las muestras

Variedad	Relación
Americana	7.60
Chapingo	4.25
Mixquic	5.07
Mixquic 2	8.98
Queretana	4.99
Tláhuac	6.23

De acuerdo a los valores obtenidos todas las muestras tienen mayor contenido de oxalato que de calcio, por lo que en vez de ser una fuente de calcio podría resultar dañino, ya que hay más oxalato disponible y puede atrapar iones calcio

provenientes de la muestra y además al haber tanto ácido oxálico disponible también puede quelar iones calcio provenientes de otros alimentos de la dieta, reduciendo su absorción y causando daños a la salud.

En la bibliografía se encontraron valores de 4.6 a 8.5 para esta relación, y de acuerdo a la tabla 19 los valores van de 4 a 9, lo cual; está dentro del rango reportado.

6.2.1.3 Fitatos

A continuación se muestra la tabla 20 con los resultados obtenidos en el análisis de varianza, expresados en base seca.

Es importante señalar que en esta determinación se realizó un ajuste, al momento de realizar la metodología, en vez de hacer una dilución de 1:25, la cual es para las muestras con mayor contenido de ácido fítico, se realizó una dilución de 1:70, ya que fue necesaria esta modificación debido al alto contenido de ácido fítico en la muestra.

Tabla 20. Resultados del análisis de varianza acoplado a la prueba de rango múltiple (Duncan) para el fitatos *.

Variedad	Fitatos (%)
Mixquic 2	8.23 ^a
Mixquic	8.32 ^b
Queretana	8.34 ^b
Chapingo	9.05 ^c
Tláhuac	9.47 ^d
Americana	9.82 ^e

* Se presenta el valor promedio (n=3), CV<5%
Diferente letra dentro de la columna indican diferencia estadísticamente significativa.

El consumo de ácido fítico es más alto en dietas de países que están en desarrollo, como México, las plantas son los alimentos básicos, lo que hace que la gente consuma más de ellos y por lo tanto que obtengan más ácido fítico. Se encuentra naturalmente en diferentes alimentos de origen vegetal, como un

complejo de fitato-mineral-proteína, incluso se ha sugerido que también pueden formar complejos con los hidratos de carbono. Este compuesto decrece la unión de gastroferrina (Fe^{2+} , Fe^{3+}), disminuyendo así la absorción del hierro principalmente, así como calcio, magnesio, fósforo, zinc y molibdeno en el intestino. Además tiene la capacidad de formar quelatos con iones divalentes como son: hierro, calcio, magnesio, zinc y cobre.

De acuerdo a la tabla 16 los valores de ácido fítico son muy elevados lo cual, de acuerdo con lo anterior causará que el hierro principalmente, no esté disponible en nuestro alimento, esto representa un problema, ya que en la tabla 15 se encontró que los valores de hierro son elevados. Finalmente de acuerdo a la tabla 20 debido al rango de valores, se encontró que en todas las variedades existe una diferencia significativa, con excepción de las variedades Mixquic y Queretana.

6.2.2 Agentes tóxicos

A continuación se muestran los agentes tóxicos: nitratos y saponinas.

6.2.2.1 Nitratos

A continuación se muestra la tabla 21 con los resultados obtenidos en el análisis de varianza, expresados en base seca.

Tabla 21. Resultados del análisis de varianza acoplado a la prueba de rango múltiple (Duncan) para el contenido de nitratos *

Variedad	Nitratos (%)
Queretana	5.75 ^a
Mixquic	6.45 ^b
Tláhuac	6.57 ^c
Americana	6.68 ^d
Chapingo	6.90 ^e
Mixquic 2	9.04 ^f

* Se presenta el valor promedio (n=3), CV<5%

Diferente letra dentro de la columna indican diferencia estadísticamente significativa.

Existe una relación entre el contenido de nitratos y oxalatos, todavía no se explica completamente el mecanismo de interacción pero se ha observado que el incremento de los nitratos promueve una mejora en la síntesis de oxalatos. Por lo cual, al existir un elevado contenido de oxalatos, se esperaba un alto contenido de nitratos.

Según la FDA la IDA es de 3.7 mg/kg p.c./día, por lo que un adulto de 60 kg sólo puede consumir de 2.54 a 4.02 g de muestra/ día, y si sobrepasa este valor su consumo representa un riesgo además de que se reducen a nitritos y son un problema de toxicidad en niños ya que forman nitrosaminas y causan hipoxia.

En la tabla 16 los valores de nitratos son muy altos y variables, razón por la cual en la tabla 21 se observa que todas las muestras son diferentes entre sí.

La variación en los resultados se debe a muchos factores, principalmente las condiciones de cultivo, la temperatura además de la edad de la planta. Existe otro factor de relevancia, que es el uso de fertilizantes nitrogenados, los cuales se usan para el crecimiento de las plantas en la mayoría de las prácticas agrícolas.

6.2.2.2 Saponinas

En el caso de las saponinas como se observa en la tabla 16, se obtuvieron valores muy bajos, o por debajo del límite de detección de la técnica utilizada que fue de 0.05%, por los que no representa un riesgo para la salud.

No se pudo realizar un análisis estadístico de la muestra ya que todas las muestras obtuvieron los mismos valores.

En lo que respecta a las demás determinaciones, en todas se observa que existen diferencias significativas entre las muestras.

Cabe recordar que todas las determinaciones se realizaron en la harina de la muestra. Tomando en cuenta el contenido de agua en las verdolagas se calculó el contenido de los factores tóxicos en la muestra fresca y los resultados se encuentran en la tabla 22.

Comparando la tabla 16 con la tabla 22, todos los valores se reducen, ya que el contenido de agua es muy alto, como se observa en la tabla 3 y esto hace que los sólidos disminuyan y por consiguiente el contenido de factores tóxicos.

Tabla 22. Toxicología analítica en las muestras frescas.

Variedad	Inhibidores de tripsina (UTI/mg mtra)	Oxalatos (%)	Fitatos (%)	Saponinas (%)	Nitratos (%)
Americana	0.06	0.48	0.51	<0.003	0.35
Chapingo	0.06	0.27	0.50	<0.003	0.38
Mixquic	0.06	0.32	0.48	<0.003	0.37
Mixquic 2	0.74	0.79	1.17	<0.003	1.29
Queretana	0.05	0.33	0.46	<0.003	0.32
Tláhuac	0.05	0.37	0.53	<0.003	0.36

Cabe destacar que en general para la mayoría de los factores tóxicos la variedad Mixquic 2 obtuvo los valores más altos que, a pesar de disminuir drásticamente al calcular el contenido en material fresco, los factores como fitatos y nitratos, siguen siendo muy elevados lo que se atribuye principalmente a su forma de cultivo, como se mencionó en un inicio. Siguen representando un riesgo importante para la salud, ya que al ser tan elevados pueden tener efectos perjudiciales al consumirse poca cantidad de muestra.

7. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados presentados con anterioridad se concluye que:

- Se aportó información sobre la composición química de las variedades de *Portulaca oleracea* L. que no existía y de acuerdo al análisis bromatológico el componente mayoritario de la *P. oleracea* son los hidratos de carbono, seguidos de cenizas, proteína, fibra cruda y grasa cruda, éste último es el componente minoritario.
- Todas las muestras se encuentran dentro del rango de digestibilidad proteínica reportado para los alimentos de origen vegetal.
- En general todas las muestras presentan un alto contenido de calcio y hierro.
- En todas las muestras, la cantidad de inhibidores de tripsina y saponinas no representa un riesgo para la salud. Con los valores de digestibilidad e inhibidores de tripsina, se puede afirmar que es una fuente importante de proteína disponible.
- Todas las muestras tienen niveles muy elevados de ácido oxálico lo que representa un riesgo el consumirlas, principalmente por la formación de cálculos renales. De acuerdo a la relación oxalato/ calcio, la verdolaga no es una buena fuente de calcio y su consumo en crudo puede impedir la absorción de calcio en nuestro cuerpo.
- Presenta un alto contenido de nitratos, lo cual puede atribuirse a su cultivo y al posible uso de fertilizantes.
- De acuerdo al contenido de ácido fítico, las verdolagas no son una buena fuente de hierro, ya que al existir un alto contenido de éste secuestra al mineral de interés.
- Los factores tóxicos se realizaron en las harinas, sin embargo la verdolaga tiene un alto contenido de humedad (aprox. 90%) lo que reduce sustancialmente la cantidad de todas las sustancias químicas incluyendo los factores tóxicos.

- La humedad final de la muestra depende de la forma de preparación y el contenido de factores tóxicos depende de la forma de consumo, ya que algunos son solubles y se pueden eliminar mediante un proceso de cocción. Sin embargo de acuerdo al contenido de algunos factores tóxicos, se recomienda no consumirla en abundancia ni con mucha frecuencia en forma cruda.
- La forma y tiempo de cultivo de las plantas es un factor importante ya que influye en el contenido de humedad, y en la concentración de algunos factores tóxicos.
- Es importante seguir estudiando al ácido fítico en estas variedades, debido a que no existen estudios que vinculen a este factor tóxico con la verdolaga.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Aragón, M., Villa, N., 1994. Prácticas de laboratorio de análisis de alimentos, México, D.F. Pp. 2-19.
2. Aron, A., 1988. Nutrición Animal, 1° edición. Acribia, Zaragoza. Pp. 43-59, 79-106.
3. Bateman, J., 1970. Nutrición animal. Manual de métodos analíticos. Centro Regional de Ayuda Técnica. Turrialba, Costa Rica. Pp. 176-178.
4. Bello, J., 2000. Ciencia bromatológica: Principios generales de los alimentos. Ediciones Díaz de Santos, Madrid. Pp. 41-123.
5. Bourges, H., Morales, J., Vázquez, N., 2013. Quelites: ¿un alimento de segunda?. Composición nutrimental de los quelites. Cuadernos de Nutrición 36 (1), México, D.F.: 17-30.
6. Bryan, N., Alexander, D., Coughlin, J., Milkowski, A., Bofetta, P., 2012. Ingested nitrate and nitrite and stomach cancer risk: An updated review. Food and Chemical Toxicology 50, 3646-3665.
7. Bye, R., Linares, E., 2000. Los quelites, plantas comestibles de México: una reflexión sobre intercambio cultural. Biodiversitas 31, 11,13.
8. Calderón, G., 2001. Portulacaceae. G.C. de Rezedowski, J. Rzedowski y colaboradores, Flora fanerogámica del Valle de México, 2° edición. Instituto de Ecología A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, México. 1460 p.
9. Cataldo, D., Haroon, M., Schrader, L., Youngs, V., 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Soil Science Plant Anual 6, 71-80.
10. Clavert, M., Dinole, J., Lucy, J., 1967. Actions of saponnins on biological cell membranes. Nature 196, 952-955.
11. Committee on Food Protection, 1973. Toxicants occurring naturally in foods. 2° edition. National Academy of Science. Washington, DC. P. 349.

12. Córdova, J., Barriguete, J., Lara, A., Barquera, S., Rosas, M., Hernández, M., 2008. Chronic noncommunicable diseases in Mexico: epidemiologic synopsis and integral prevention. *Salud Publica* 50. Pp. 419-427.
13. Corré, W.J., Breimer, T., 1979. Nitrate and Nitrite in Vegetables. Pudoc, Wageningen. Pp. 85, 32-35.
14. De Vries, J., 1997. Food safety and toxicity. CRC Press, Boca Raton. Pp. 43, 44.
15. Derache, R., 1990. Toxicología y seguridad de los alimentos. Ediciones Omega, Barcelona, 109-132.
16. Dvorkin, M., Cardinalli, D., Iermoli, R., 2003. Best and Taylor: Bases fisiológicas de la práctica médica. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Pp. 625-627.
17. Egea-Gilabert, C., Ruiz-Hernández, M., Parra, M., Fernández J., 2014. Characterization of purslane (*Portulaca oleracea* L.) accessions: Suitability as ready-to-eat product. *Scientia Horticulturae* 172, 73-81.
18. Feldman, E., 1988. Principios de nutrición clínica. El Manual Moderno, México, D.F. Pp. 46-48.
19. Fernández, S., Montoya, Y., Viguri, R., 2011. Sobrepeso y obesidad en menores de 20 años de edad en México. *Boletín Médico del Hospital Infantil de Mexico* 68 (1): 12-17.
20. Fernández, J., Niñirola, D., Vicente, M., Conesa, E., López, J., González, A., 2007. Efecto de la densidad de plantación y del tipo de sustrato sobre la producción de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) en un cultivo hidropónico de bandejas flotantes. *Magrama, Murcia* 15, 707-708.
21. Fox, B., Cameron, A., 2006. Ciencia de los alimentos, nutrición y salud. 7° edición Taylor & Francis Group, Boca Raton. P. 198.
22. Frühbeck, G., Alonso, R., Marzo, F., Santidrián, S., 1994. A modified method for the indirect quantitative analysis of phytate in foodstuffs. *Analytical Biochemistry* 225, 206-212.

23. Giron, M., 1992. Determinación semicuantitativa de saponinas en muestras vegetales aprovechando su capacidad hemolítica. Tesis de la Facultad de Química, UNAM. México D.F. Pp. 35-40.
24. Guillamón, E., Pedrosa, M., Burbano, C., Cuadrado, C., Sánchez, M., Muzquiz, M., 2008. The trypsin inhibitors present in seed of different grain legume species and cultivar. *Food Chemistry* 107, 68-74.
25. Hansen, T., De Bang, T., Laursen, K., Pedas, P., Husted, S., Schjoerring, J., 2013. Multielement plant tissue analysis using ICP spectrometry. In: *Plant mineral nutrients (methods and protocols)*. Maathius, F. (Ed.) Human Press, London. Pp. 121-141.
26. Helrich, K., 1990. Official Methods of Analysis of the Association Official Analytical Chemists 16° edition, Vol. 2, AOAC, Arlington. 12 p.
27. Horwitz, W., Latimer, G., 2005. Official methods of analysis of the Association Official Analytical Chemists, 17° edition, AOAC International, Gaithersburg, Pp. 1-8, 33-36, 42-47.
28. Kakade, M., Rackis, J., Maghee, J., Puski, G., 1974. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. *Cereal Chemistry* 51, 376-382.
29. Kobt, M., 2011. Effects of *Portulaca oleracea* L. seeds in treatment of type-2 diabetes mellitus patients as adjunctive and alternative therapy. *Journal of Ethnopharmacology* 137, 643-651.
30. Kumar, V., Sinha, A., Makkar, H., Becker, K., 2010. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chemistry* 120, 945-969.
31. Lindner, E., 1995. Toxicología de los alimentos, 2° edición. Acribia, Zaragoza. Pp. 82-84, 176, 184.
32. López, M., 2000. Determinación de factores tóxicos en varias almendras no tradicionales con potencial aporte de proteína y grasa dietética. Tesis de la Facultad de Química, UNAM. México D.F. Pp. 28-33.
33. Martínez, B, Rincon, F., 1997. Trypsin inhibitors, 2 Effects of processing and determination methods. *Alimentaria* 279, 33-38.
34. Mera, L., Bye, R., Castro, D., Villanueva, C., 2011. Documento de diagnóstico de *Portulaca oleracea* L. SINAREFI. Pp. 10-19.

35. Mera, Luz María y et al, 2005. De quelites me como un taco. *Ciencias* 77, 36-38. (<http://www.revistacienciasunam.com/es/76-revistas/revista-ciencias-77/598-de-quelites-me-como-un-taco.html>) [Último acceso: 24 de mayo 2015].
36. Mera-Ovando, L., Bye-Boettler, R., Solano, M., 2014. La verdolaga (*Portulaca oleracea* L.). Fuente vegetal de omega 3 y omega 6. *Agroproductividad* 7, 3-7.
37. Miranda R., 2006. La fibra dietaria en la alimentación. Determinación del contenido de fibra soluble e insoluble en 60 alimentos. Tesis de la U.A.E.M., Toluca. Pp. 60-68.
38. Moreau, A., Savage, G., 2009. Oxalate content of purslane leaves and the effect of combining them with yoghurt or coconut products. *Journal of Food Composition and Analysis* 22, 303-306.
39. Obied, W., Mohamoud, E., Mohamed, O., 2003. *Portulaca oleracea* (purslane): nutritive composition and clinic-pathological effects on Nubian goats. *Small Ruminant Research* 48, 31-36.
40. Palaniswamy, U., Bible, B., McAvoy, R., 2004. Oxalic acid concentrations in purslane (*Portulaca oleracea* L.) is altered by storage of harvest and the nitrate to ammonium ratios in hydroponics. *Scientia Horticulturae* 102, 267-275.
41. Prasad, S., Avinesh, A., 2008. Nitrate-N determination in leafy vegetables: study of the effects of cooking and freezing. *Food Chemistry* 106, 772-780.
42. Rivera, J., Cuevas, L., González, T., Shamah, T., García, R., 2013. Desnutrición crónica en México en el último cuarto de siglo: análisis de cuatro encuestas nacionales. *Salud Pública de México* 55, 161-169.
43. Sánchez, M., 1989. Vida y nutrición. Siglo XXI Editores, México, D.F. Pp. 46-50.
44. Sandberg, A., Scheers, N., 2010. Phytic acid: Properties, uses and determination. *Encyclopedia of Food and Health*. Chalmers University of Technology, Gothenburg, Sweden. Pp. 365-368.

45. Santos, T., Torres, I, Nieves, D., 2012. Verdolaga, planta de interés farmacéutico: extracción, aislamiento y caracterización de la *Portulaca oleracea* L. a partir de un extracto hidroalcohólico. Editorial Académica Española, Madrid. Pp. 55-61.
46. Savage, G.P., 2003. Saponins. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition 8, Lyncoln University, Canterbury, New Zealand. 5095-5097.
47. Shao-ting, D.U., Yong-song, Z., Xian-yong, L.; 2007. Accumulation of nitrate in vegetables and its possible implications to human health. Agricultural Sciences in China 10, 1246-1255.
48. Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura, 2014. Red verdolaga. [En línea]. Disponible en: http://www.sinarefi.org.mx/redes/red_verdolaga.html [Último acceso: 16 de marzo 2015].
49. Sotelo, A., Mendoza, J., Argote, R., 2003. Contenido de ácido fítico en algunos alimentos crudos y procesados. Validación de un método colorimétrico. Revista de la Sociedad Química de México, 46 (4), 301-306.
50. Sursan, S.S.C., Dreher, M.L., 2001. Handbook of dietary fiber. Marcer Dekker Inc, New York. Pp. 835-840.
51. Tamme, T., Reinik, M., Roasto, M., 2010. Nitrates and nitrites in vegetables occurrence and health risks. Vegetables on Health 21, 307-321.
52. Tapia, L., Rita, J., 2009. Posibilidades de cultivo y aprovechamiento *Portulaca oleracea* L. ARXIUS, Barcelona, 67-69.
53. Valle, P., Lucas, B., 2000. Toxicología de alimentos. Instituto Nacionl de Salud Pública. México, D.F. Pp. 77-90, 159.
54. Vanhanen, L., Savage, G., 2015. Comparison of oxalate contents and recovery from two green juices prepared using a masticating juicer or a high speed blender. NFS Journal 1, 20-23.
55. William, M.H., 2002. Nutrición. Para la sallud, la condición física y el deporte. Editorial Paidotribo, Madrid. Pp. 244, 245, 254-256.
56. Zhao, R., Gao, X., Cai, Y., Shao, X., Jia, G., Huang, Y., Qin, X., Wang, J., Zheng, X., 2013. Antitumor activity of *Portulaca oleracea* L. polysaccharides

against cervical carcinoma *in vitro* and *in vivo*. Carbohydrate Polymers 96, 376-383.

57. Zidan, Y., Bouderbala, S., Djelloui, F., Lacaille-Dubois, M., Bouchenak, M., 2014. *Portulaca oleracea* reduces triglyceridemia, cholesterolemia and improves lecithin cholesterol acyltransferase activity in rats fed enriched cholesterol diet. Phytomedicine 21, 1504-1508.