



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Evaluación nutritiva proteínica-energética de tres cepas de hojas de moringa
(*Moringa oleífera*) con potencial uso alimenticio que se cultivan en el país.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

DANIEL ALEJANDRO PABLO HERNÁNDEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX 2017



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. LUCIA CORNEJO BARRERA

SECRETARIO: M. EN C. ARGELIA SANCHEZ CHINCHILLAS

1er. SUPLENTE: DRA. ILIANA ELVIRA GONZALEZ HERNANDEZ

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

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: ANEXOS 1 DE LOS LABORATORIOS 4A Y 4C DEL DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGIA, EDIFICIO A, FACULTAD DE QUIMICA, CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

ASESOR DEL TEMA:

M. EN C. BERNARDO LUCAS FLORENTINO

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.A. ANTONIO BEAZ RIVERA

SUSTENTANTE:

DANIEL ALEJANDRO PABLO HERNANDEZ

INDICE

	Página
1- Introducción	1
2- Objetivos	3
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivos particulares	3
3- Antecedentes	4
3.1 Aspectos generales de la desnutrición	4
3.2 Causas de la desnutrición	4
3.3 Clasificación	5
3.3.1 Clasificación de la desnutrición según su etiología	5
3.3.2 Clasificación de la desnutrición según su gravedad	5
3.3.3 Clasificación de la desnutrición según su evolución	6
3.3.4 Clasificación de la desnutrición según el tipo de carencia	6
3.4 Desnutrición proteínico – energética	6
3.5 Situación actual de la desnutrición en México	7
3.6 Proteínas	9
3.7 Aminoácidos	10
3.7.1 Aminoácidos indispensables en humanos	10
3.8 Requerimiento de proteínas y aminoácidos indispensables	12
3.9 Calidad de la proteína	14
3.9.1 Evaluación de la calidad proteínica	15
3.9.1.1 Métodos biológicos	16
3.9.1.2 Métodos Químicos	16

3.10 Complementación proteínica	18
3.11 Digestibilidad aparente	19
3.12 Calificación química corregida por digestibilidad (PDCAAS)	19
3.13 Requerimientos energéticos	19
3.13.1 Densidad energética de los alimentos	20
3.14 Moringa (<i>Moringa oleífera</i>)	21
3.14.1 Taxonomía y descripción botánica	21
3.14.2 Condiciones de cultivo	23
3.14.3 Aspectos nutrimentales	23
3.14.4 Formas de consumo	23
3.14.5 Introducción y cultivo en México	24
4. Metodología	25
4.1 Acondicionamiento de la muestra	26
4.2 Análisis químico proximal	26
4.2.1 Humedad analítica	26
4.2.2 Extracto etéreo	26
4.2.3 Fibra cruda	26
4.2.4 Cenizas	27
4.2.5 Nitrógeno total	27
4.2.6 Perfil de aminoácidos	28
4.2.7 Determinación de Triptófano	28
4.2.8 Calificación química (C.Q.)	29
4.2.9 Ensayo biológico	29
4.2.9.1 Ganancia en peso de los animales	29

4.2.9.2 Balance de nitrógeno y energético	29
5. Resultados y Discusión	31
5.1 Análisis químico proximal	31
5.2 Perfil de aminoácidos y calificación química	33
5.3 Ensayos biológicos: RPN y REP	36
6 Conclusiones	46
7 Perspectivas	47
8 Bibliografía	48
8.1 Anexos	54

1- INTRODUCCIÓN

La falta de disposición de alimentos con adecuado contenido proteínico, los bajos ingresos de una parte de la población, entre otros factores, han originado problemas graves de desnutrición proteínico-energética en zonas rurales de México (Instituto Nacional de Salud Pública, 2012); situación similar ocurre en la mayoría de los países de América Latina y el Caribe afectando principalmente a niños que ingieren una cantidad insuficiente de alimentos para satisfacer sus necesidades de energía y nutrimentos, siendo la principal manifestación el detrimento del crecimiento; es decir, los niños son más pequeños en estatura y tienen menor peso que otros niños de la misma edad (FAO, 2013).

Los alimentos no convencionales de origen vegetal son recursos naturales subutilizados que pueden ser nuevos recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. Tal es el caso del árbol conocido como moringa (***Moringa oleífera***), ya que numerosos artículos de investigación han detallado los beneficios de este árbol reportando que las hojas son comestibles y con un alto contenido proteínico, con un perfil de aminoácidos indispensables balanceado; además, ofrece un forraje nutrimental para los animales de granja (Makkar, 1996; Reyes-Sánchez, 2006; Yameogo, 2011).

En el mercado nacional se encuentran productos a base de hojas de moringa, que se expenden aduciendo atribuciones excepcionales, tanto nutricionales como terapéuticas; por lo cual se realizó un trabajo sobre la moringa intitulado “Composición bromatológica, potencial nutrimental y contenido de factores tóxicos, entre las hojas de diferentes cepas de moringa (***Moringa oleífera***) que se cultivan en el país” (Herrera, 2012).

Dentro de los resultados más relevantes se obtuvo un contenido de grasa mayor del 5% y se confirmó el alto contenido de proteína (>20%); además de resultados prometedores sobre la predicción en la disponibilidad de la proteína, ya que en todas las muestras se encontró una digestibilidad *in vitro* mayor del 70%. Referente a los

nutrimentos inorgánicos y vitaminas, la mayoría de muestras tuvo un alto contenido de calcio, hierro, vitamina C y un adecuado valor energético lo cual predice una buena calidad nutrimental (Bamishaiye, 2011; Yameógo, 2011; Herrera, 2012).

Si bien el trabajo previo mencionado indica que la moringa de acuerdo a los factores tóxicos evaluados, no presenta un riesgo a la salud para su consumo e incluso tuvo una digestibilidad *in vitro* adecuada, es importante valorar la calidad nutrimental con ensayos biológicos *in vivo*, ya que no se encuentran reportados en la literatura.

Por esta razón se evaluará la eficiencia proteínica de las muestras mediante métodos químicos como son perfil de aminoácidos y calificación química, y mediante métodos biológicos como relación de proteína neta, relación de eficiencia proteínica, energía digerible y digestibilidad aparente. Dichos parámetros nos proporcionaran la información necesaria para poder recomendar su uso como fuente de proteína.

2 - OBJETIVOS

2.1- Objetivo general

El objetivo del presente proyecto es evaluar la calidad nutrimental proteínico-energética de tres muestras de hojas de moringa (*Moringa oleífera*) que se cultivan en distintas zonas del país, utilizando métodos químicos como son: perfil de aminoácidos y calificación química y métodos biológicos como: relación de proteína neta, relación de eficiencia proteica, digestibilidad aparente y energía digerible. Para su posible uso como fuente de proteína.

2.2- Objetivos particulares

- ✓ Determinar el perfil de aminoácidos de la proteína de moringa (*Moringa oleífera*) mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para obtener la calificación química (CQ).
- ✓ Realizar dos ensayos biológicos: relación de proteína neta (RPN) y relación de eficiencia proteínica (REP) para utilizar ambos parámetros como criterio de evaluación de la calidad proteínica de las muestras de moringa.
- ✓ Determinar el balance de nitrógeno y energético, utilizando las heces recolectadas en la última semana del REP para obtener los parámetros: energía digerible (%ED) y digestibilidad aparente (Da) en las muestras de moringa.

3- ANTECEDENTES

3.1- Aspectos generales de la desnutrición

De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), el hambre es la falta de uno o cualquiera de los elementos nutritivos que son indispensables para salvaguardar la salud. La ausencia de uno de ellos puede producir la muerte, esta definición deja de lado al estado fisiológico relacionado al déficit alimentario, en donde se presenta el deseo de ansía de consumir alimentos para satisfacción del individuo y se enfoca a la satisfacción de las necesidades nutritivas para mantener un buen estado de salud (FAO, 1970).

La mayoría de los autores, se refieren al hambre y a la desnutrición como una misma enfermedad, por lo que no es posible establecer alguna diferencia en el significado. En la actualidad el concepto de desnutrición se refiere al resultado de la subalimentación, o de absorción y/o uso biológico deficiente de los nutrientes consumidos como resultado de repetidas enfermedades infecciosas. Comprende la insuficiencia ponderal en relación con la edad, la estatura demasiado baja para la edad (retraso del crecimiento), la delgadez peligrosa en relación con la estatura (emaciación) y el déficit de vitaminas y minerales (malnutrición por carencia de micronutrientes) (FAO 2015).

3.2- Causas de la desnutrición

La desnutrición no es sólo el producto de una insuficiente ingesta alimentaria, sino el resultado de una combinación de factores socio – ambientales, como son: pobreza extrema, falta de trabajo, analfabetismo, baja cobertura de saneamiento ambiental, malas condiciones de vivienda, medio ambiente contaminado, inequidades sociales, políticas sanitarias ineficaces entre otras (OMS, 1998).

Todos estos factores son particularmente prevalentes en países que se encuentran en vías de desarrollo, en donde también se ha observado incremento de esta

situación en la población infantil, debido a que el gasto requerido por el crecimiento es muy alto y por ende muy difícil de satisfacer (Latham, 2002).

3.3- Clasificación

3.3.1- Clasificación de la desnutrición según su etiología

Desnutrición primaria: Es producida por una ingesta insuficiente, inadecuada, desequilibrada o incompleta de nutrimentos. Este tipo de desnutrición es típica en los países en vías de desarrollo y representa un problema grave debido a que causa más de catorce millones de muertes anuales en niños menores de 5 años (Muñoz, 2007).

Desnutrición secundaria: Es originada en alteraciones fisiopatológicas que interfieren cualquiera de los procesos de la nutrición, este tipo de desnutrición es más frecuente en países industrializados y su característica general es que se mejora cuando se cura la enfermedad que le dio origen.

3.3.2- Clasificación de la desnutrición según su gravedad

En esta clasificación se evalúan y establecen parámetros con base a principios clínicos:

- Magnitud de déficit ponderoestatural: Definida por distintos criterios en donde se obtienen relaciones peso/ talla de los individuos en estudio y son comparados con la media de la población.
- Velocidad de pérdida de peso: Es la variación de peso en un lapso de tiempo conocido y se expresa como un porcentaje del peso habitual o como descenso de peso, se debe relacionar con el tiempo en el que ocurre.
- Signos y síntomas que presenta: La desnutrición es medida por una escala de signos y síntomas clínicos tales como edema, dermatosis, hígado agrandado, alteraciones de los cabellos, valores de albúmina sérica y

proteínas totales (Besada, 1999).

3.3.3- Clasificación de la desnutrición según su evolución

Según su evolución, una desnutrición puede ser aguda o crónica, desde el punto de vista clínico la desnutrición aguda es definida como procesos emancipados con déficit de peso y la desnutrición crónica como procesos con déficit en talla (Roggeiro, 2007).

3.3.4- Clasificación de la desnutrición según el tipo de carencia

Este tipo de clasificación se puede aplicar cuando se puedan identificar dos cuadros clínicos bien definidos según sea el déficit: energético – proteínico (marasmo) o sólo proteínico (kwashiorkor) (Carmueg, 2000).

3.4- Desnutrición proteínico – energética

La deficiencia de proteínas produce en los niños la enfermedad conocida como el síndrome de kwashiorkor, que se presenta cuando, después de un periodo de lactancia materna, los niños son destetados y pasan a una dieta deficiente en proteína, ocasionando que se hinche el cuerpo y se produzca despigmentación en la piel y el cabello (Monckeberg, 1995).

La falta de alimento para satisfacción de los requerimientos energéticos produce en los niños semiinanición, niños encogidos con músculos enflaquecidos y grave deshidratación producto de la diarrea crónica (Muñoz, 2007).

3.5- Situación actual de la desnutrición en México

Existe una regla general sin excepción: cuando hay desnutrición en una comunidad, siempre hay niños menores de cinco años, y es que además de la alta demanda energética inherente al crecimiento, para su alimentación dependen de otras

personas, quienes la mayoría de las veces no tienen recursos económicos suficientes o carecen de un nivel cultural suficiente para cumplir adecuadamente con este rol (Roggeiro, 2007).

Se estima que en el mundo 178 millones de niños menores de cinco años tienen desnutrición crónica (baja talla para la edad) que ha ocasionado 3.5 millones de muertes (35% de la población mundial infantil) (ENSANUT, 2012). La desnutrición durante el periodo crítico de la gestación y los primeros dos años de vida tienen efectos adversos en el crecimiento, desarrollo mental, desempeño intelectual y desarrollo de capacidades y origina retraso en crecimiento a través de las generaciones como se observa en la **Figura 1**.

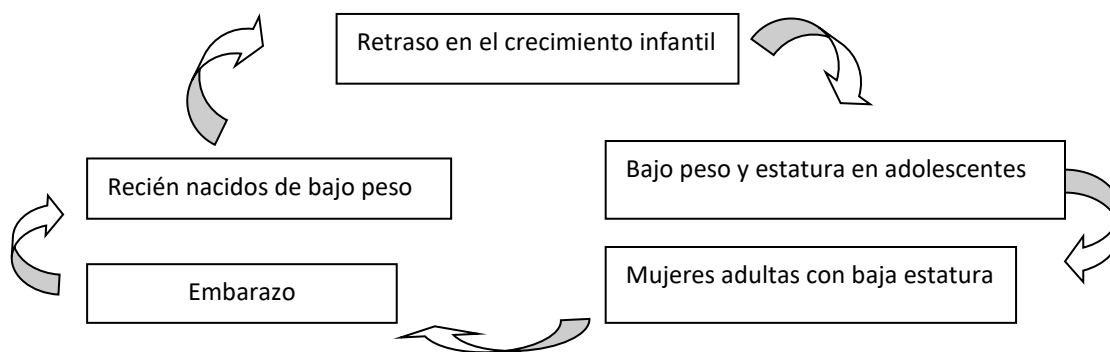


Figura 1. Factores de retraso de crecimiento a través de las generaciones.
(Roggeiro, 2007)

A pesar del desarrollo que se ha logrado en México, la desnutrición continúa siendo un problema de salud pública que debe atender el gobierno por sus efectos adversos en la salud y en el desarrollo de las capacidades.

La **Figura 2** presenta los resultados de las encuestas de salud nutrimental, en México del periodo comprendido entre 1988 y 2012. Se observa la prevalencia de tres formas de desnutrición: bajo peso, baja talla y emaciación afectando principalmente a la población indígena infantil menor de 5 años, como se observa en la **Figura 3** la baja talla es el principal reto a combatir.

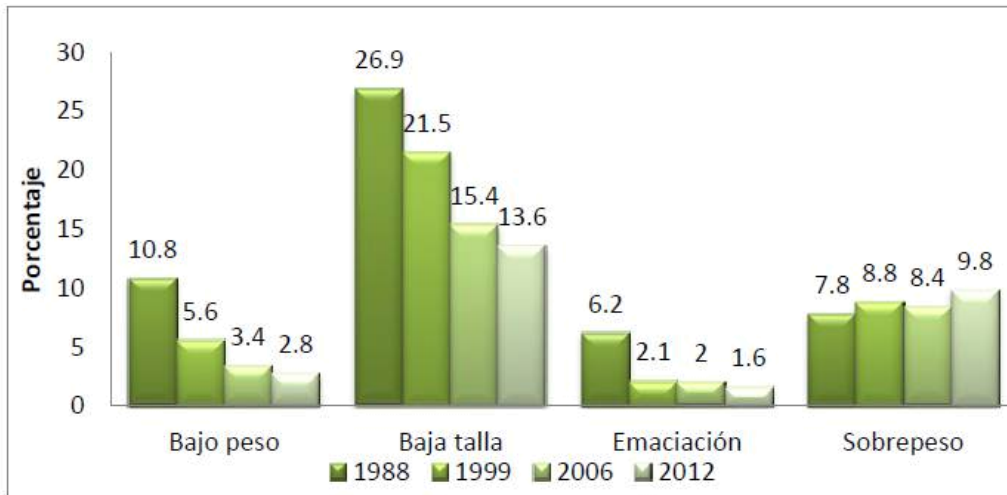


Figura 2. Prevalencia de las tres formas de desnutrición y sobrepeso en menores de 5 años en México 1988, 1999, 2006 y 2012. (ENSANUT, 2012).

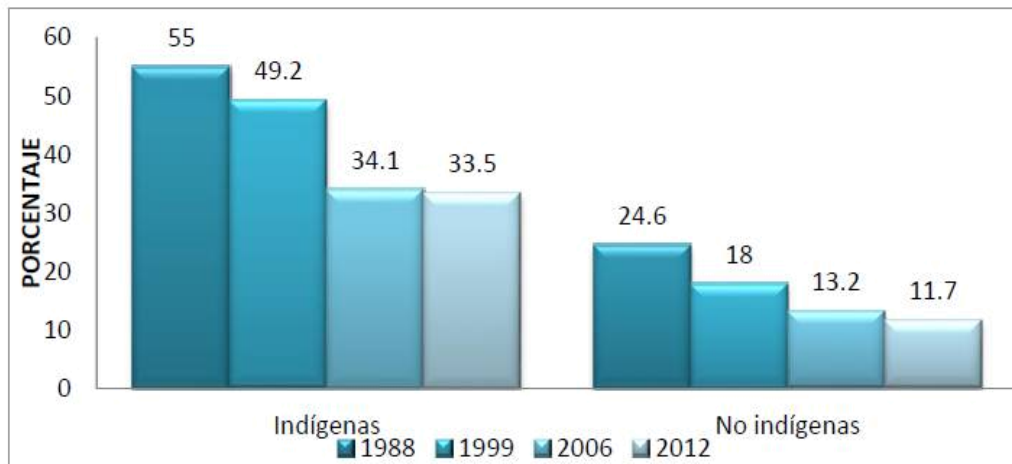


Figura 3. Prevalencia de desnutrición en menores de 5 años, en hogares indígenas y no indígenas de México 1988, 1999, 2006 y 2012. (ENSANUT, 2012).

3.6- Proteínas

Las proteínas son cadenas de hasta 20 α -aminoácidos, los cuales le confieren diferentes propiedades físicas y químicas. Las unidades de aminoácidos individuales están unidas mediante enlaces amida conocidos como enlaces peptídicos. El nombre “proteína” con que se conoce a estas sustancias, es derivado de la palabra griega proteois, que significa de primera clase, pretende poner de manifiesto su enorme importancia biológica (Brownsell, 1999).

La escasez y la importancia que tienen como nutrimento han convertido a estos compuestos en un gran foco de atención; a pesar de la gran cantidad de nitrógeno que se encuentra en el ambiente, el ser humano no es capaz de asimilarlo debido a que se encuentra en forma elemental, y para la satisfacción de sus necesidades biológicas sólo utiliza el nitrógeno orgánico proveniente de los polipéptidos que obtiene de su dieta (Fox, 2006).

La importancia que tienen estas moléculas radica en las distintas funciones biológicas en el organismo, dicha actividad permite clasificarlas en catalizadores enzimáticos, proteínas estructurales, proteínas contráctiles, hormonas, anticuerpos, proteínas de reserva y proteínas protectoras (Brownsell, 1999).

Tabla 1. Análisis bromatológico de alimentos y forrajes expresado en base seca (g/100 g de alimento)

Alimento/ Nutrimento	Proteína	Grasa	Hidratos de Carbono Totales	Fibra Bruta	Cenizas Totales
Carne de Cerdo magra (promedio: lomo, espaldilla)	55.0	41.5	0.0	0.0	3.5
Leche de vaca (pasteurizada o cruda)	27.3	27.3	38.8	0.0	6.6
Huevo (entero fresco)	47.6	43.7	4.7	0.0	3.9
Teosinte (pulido)	24.4	2.8	71.4	0.5	0.9
Avena (grano entero)	12.9	3.4	78.1	3.9	1.7
Maíz (amarillo grano entero)	10.5	4.8	81.2	2.0	1.5
Amaranto (grano entero)	14.7	8.2	66.6	7.6	2.9
Coliflor (fresca)	24.1	3.4	56.0	8.6	7.8
Haba (fresca)	26.7	1.1	58.3	10.9	2.9
Moringa (hojas)	27.5	5.7	47.3	9.5	10.1

Fuente: Woot - tsuen, 2001.

Las proteínas en los alimentos se pueden definir como aquellas que son: no tóxicas, nutricionalmente adecuadas, funcionalmente útiles y abundantes. Tradicionalmente, la leche, la carne, los huevos, los cereales, las leguminosas, y algunas semillas han constituido las fuentes principales de proteínas alimentarias. Sin embargo, la sobrepoblación aunado a los graves problemas de desnutrición ha impulsado la búsqueda de fuentes no tradicionales de proteína para la alimentación humana. La **Tabla 1** presenta algunos alimentos y forrajes propuestos como fuente de proteína.

3.7 - Aminoácidos

Los aminoácidos son compuestos orgánicos nitrogenados relativamente sencillos, cada aminoácido contiene un grupo amino ($-NH_2$) y un grupo carboxilo ($-COOH$). Los aminoácidos poseen una estructura que se representan por la fórmula general $CH-R-NH_2-COOH$, en donde la naturaleza de R determina las propiedades del aminoácido. Los aminoácidos neutros son aquellos que contienen un grupo amino y un grupo carboxilo, los aminoácidos básicos contienen más de un grupo amino; mientras que los aminoácidos ácidos contienen un grupo amino y dos grupos carboxilo (Fox, 2006).

Otra clasificación es de acuerdo a la capacidad de síntesis del organismo, así los aminoácidos dispensables son aquellos que el organismo es capaz de sintetizar mientras que los aminoácidos indispensables son aquellos que no pueden ser sintetizados por el organismo y en consecuencia deben ser adquiridos por los alimentos. En el caso de los adultos se conocen ocho aminoácidos indispensables, mientras que en el caso de lactantes y niños se incluye la histidina como noveno aminoácido indispensable.

3.7.1- Aminoácidos indispensables en humanos (Belitz, 2004; Fox, 2006)

Histidina: Extraído en 1986 por Kossel and Hedin a partir de péptidos presentes en pescado, la mayoría de las proteínas contienen aproximadamente 2 a 3% de histidina, mientras que las proteínas de la sangre contienen 6%. La síntesis de este

aminoácido por el cuerpo es limitada, de manera que en los periodos de rápido crecimiento como en la niñez o infancia este aminoácido debe ser adquirido por la dieta, aunque es considerado indispensable solo para niños e infantes, existen pruebas de la importancia para adultos. En el cuerpo la histidina se convierte en histamina compuesto que dilata los vasos capilares y estimula la producción de ácido en el estómago.

Isoleucina: Extraído a partir de la proteína fibrina en 1904 por Erlich, se encuentra presente en las proteínas de la carne y algunos cereales aproximadamente del 4 al 5 % y en las proteínas de la leche y el huevo en un 6 a 7%, participa en la síntesis de hemoglobina y forma parte del músculo esquelético.

Leucina: Aislado de la lana y el músculo por Braconot en 1820, se encuentra en un 7 a 10% en proteínas de origen animal (carne, leche y huevo). Las proteínas de los cereales contienen cantidades variables (maíz: 12.7%, trigo: 6.9%), interactúa con los aminoácidos isoleucina y valina para promover la cicatrización del tejido muscular y óseo.

Lisina: Aislado por E. Drechsel en 1889, a partir de la caseína, se encuentra presente en un 7 a 9% en las proteínas de la carne, leche y huevo, las proteínas de pescados y mariscos, tienen el contenido más alto 10 a 11%. Este aminoácido se encuentra en concentración baja 2 a 4% en la mayoría de los cereales y es un aminoácido limitante del valor biológico de la mayoría de los vegetales. Se utiliza para producir carnitina en el cuerpo, un aminoácido que transporta los ácidos grasos dentro de las células.

Metionina: Obtenido a partir de la caseína en 1922 por J. Müller, se encuentra presente en proteínas de origen animal en concentración del 2 al 4% y en las de origen vegetal en un 1 a 2%, es un donador de grupos metilo en los procesos bioquímicos. Constituye la principal fuente de azufre, el organismo puede sintetizar cisteína a partir de metionina; la cual se utiliza para producir cistina que es uno de los aminoácidos principales de la insulina.

Fenilalanina: Aislado en 1881 por E. Schulze a partir del altramuz, se encuentra presente en la mayoría de las proteínas 4 a 5%, en el organismo es biotransformado a tirosina; de tal modo que este aminoácidos se puede sustituir en la alimentación por la fenilalanina. En el organismo se utiliza para la síntesis de hormonas adrenalina y tiroxina.

Treonina: Descubierta en 1935 por W. Rose, se encuentra presente en carne, leche y huevo en concentración del 4.5 a 5% y en los cereales 2.7 a 4.7%. Para las proteínas de valor biológico muy bajo la treonina es con frecuencia el aminoácido limitante, participa en la formación de colágeno y elastina.

Triptófano: Aislado en 1902 por F. Hopkins a partir de un hidrolizado de caseína obtenido con enzimas pancreáticas. Se encuentra presente en cantidades relativamente pequeñas en las proteínas animales 1 a 2%, siendo aún menores en los cereales < 1%. Desde el punto de vista biológico el triptófano es de suma importancia; ante todo como precursor del ácido nicótico.

Valina: Aislado en 1879 por Schutzenberger, se encuentra presente en la proteína de la carne y los cereales en un 5 a 7% y en la leche y el huevo en un 7 a 8%, es utilizado como fuente de energía por el tejido muscular y promueve la reparación de tejidos.

3.8- Requerimiento de aminoácidos indispensables y proteínas

De acuerdo a la FAO y a la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1985; el requerimiento de proteínas de un individuo se define cómo: el nivel más bajo de ingestión de proteínas que equilibra las pérdidas de nitrógeno del cuerpo en personas que mantienen el balance de energía en niveles moderados de actividad física. En el caso de niños, mujeres embarazadas o lactantes, se considera que los requerimientos de proteína incluyen las necesidades asociadas con la formación de tejidos o la secreción de leche en proporciones compatibles con una buena salud.

Cuando la definición anterior se generaliza a un sector de la población, entonces se denomina nivel seguro de ingestión y se expresa como la cantidad de proteína que satisface o excede los requerimientos de casi todos los individuos del grupo (FAO/OMS, 1985; Fox, 2006).

Tabla 2. Requerimientos de aminoácidos indispensables para distintos grupos de población (mg amino ácido/ g proteína ingerido)

Aminoácido/ Grupo de población	Lactantes 3-4 meses	Infantes 2-5 años	Jóvenes 10-12 años	Adultos
Histidina	28	19	---	8 – 12
Isoleucina	70	28	28	10
Leucina	161	66	44	14
Lisina	103	58	44	12
Metionina + cistina	58	25	22	13
Fenilalanina + tirosina	125	63	22	14
Treonina	87	34	28	7
Triptófano	17	11	3	3
Valina	93	35	25	10
Totales	742	339	216	91 – 95

Fuente: FAO, 1985

Actualmente se considera que una ingestión diaria de proteína de 45 g o alrededor de 0.75 g/kg de peso corporal de proteína de buena calidad con una utilización neta de la proteína (UNP) de cuando menos 70%, debe mantener el equilibrio de nitrógeno en la mayoría de los adultos. Las mujeres embarazadas requieren 6 g adicionales de proteína por día, mientras que los lactantes requieren de 11 a 16 g adicionales por día. Así mismo se han determinado los requerimientos de aminoácidos indispensables para distintos grupos poblacionales y éstos se presentan en la **Tabla 2** (FAO/OMS, 1985).

3.9 - Calidad de la proteína

Tabla 3. Contenido de aminoácidos indispensables en algunos alimentos de origen animal y vegetal (mg aminoácido/g de proteína)

Aminoácido	Huevo (Gallina)	Leche (Vaca)	Carne (Res)	<i>Moringa</i> <i>oleífera</i> (hojas)	Berro (<i>Nasturtium</i> <i>officinale</i>)	Yuca (<i>Manihot</i> <i>sculenta</i>)	Maíz (<i>Zea</i> <i>mays</i>)	Soya (<i>Glycine</i> <i>max</i>)
Histidina	22	27	34	29	30	24	36	N.D
Isoleucina	54	47	48	45	22	39	35	62
Leucina	86	95	81	87	68	82	87	79
Lisina	70	78	89	56	62	51	44	53
Metionina (+ cistina)	57	33	40	32	7	18	37	16
Fenilalanina (+ tirosina)	93	102	80	116	64	120	78	49
Treonina	47	44	46	46	28	42	3.7	37
Triptófano	17	14	12	21	3	7	1.0	11
Valina	66	64	50	56	49	50	5.3	53

Fuente: Makkar *et. al.*, 1997; Fox, 2006; Atamgba *et. al.*, 2015; Latif *et. al.*, 2015

N.D.= No Determinado

La calidad de los alimentos que contienen proteínas se establece en función del contenido, cantidad y concentración de aminoácidos indispensables que contienen y la biodisponibilidad de éstas (el grado en el que las proteínas son digeridas y absorbidas por el cuerpo). Los alimentos proteínicos de mayor calidad son aquellos que proveen todos los aminoácidos indispensables en las proporciones que necesita el ser humano. La **Tabla 3**, presenta el contenido de aminoácidos indispensables en algunos alimentos. La proteína de origen animal (carne, leche, huevo) se encuentra catalogada como de buena calidad; sin embargo su escasez y costo en la mayoría de los países en desarrollo ha originado la búsqueda de

alternativas viables para el consumo humano como recursos naturales vegetales, levaduras y hongos (Fox, 2006).

3.9.1- Evaluación de la calidad proteínica

Los métodos para evaluar la calidad de la proteína predicen su calidad nutricional así como su biodisponibilidad (digestibilidad y absorción) para el crecimiento y el mantenimiento celular mediante protocolos diseñados para medir directamente o estimar el contenido de aminoácidos indispensables en la proteína de prueba. Dichos métodos se clasifican en: biológicos (*in vivo*) y químicos (*in vitro*).

Los ensayos biológicos evalúan la calidad de la proteína mediante el seguimiento del crecimiento y balance de nitrógeno en animales de experimentación, indicando que tan bien es metabolizada y utilizada por el cuerpo, mientras que los métodos químicos determinan la calidad proteínica mediante el análisis composicional de aminoácidos indispensables en la proteína y la comparación con algún patrón de referencia, la digestibilidad se calcula utilizando enzimas y condiciones similares a la digestión en mamíferos (Dimes et al., 1994).

3.9.1.1- Métodos biológicos

Los métodos biológicos se dividen en aquellos que miden el crecimiento (aumento en peso) o bien, aquellos que evalúan el balance de nitrógeno. Los métodos: REP y RPN son los más utilizados en la evaluación de balance de peso corporal, estos métodos tienen la ventaja de observar la facilidad de digestión de la proteína de prueba e indican indirectamente de la presencia de cualquier factor tóxico en el material a prueba (Pérez, 1998).

Para el balance de nitrógeno (N) los métodos más utilizados son el valor biológico (VB) y la UPN. Para estos métodos se necesitan estudios de balance de nitrógeno, en los que se hace una comparación de la proteína consumida en un periodo de

tiempo determinado y la pérdida corporal de nitrógeno durante el mismo tiempo (Brownsell, 1999; Fox, 2006).

3.9.1.2- Métodos químicos

Perfil de aminoácidos

Existen distintos métodos para la determinación de aminoácidos en las proteínas alimenticias, todos ellos requieren la hidrólisis de sus enlaces peptídicos seguido de un análisis de la mezcla de aminoácidos resultante.

La hidrólisis de las proteínas se realiza comúnmente por tratamiento con ácidos o bases concentradas a temperaturas elevadas y tiempo prolongados. El análisis de los aminoácidos se realiza mediante CLAR debido a la reproducibilidad y exactitud del método (Brownsell, 1999).

Calificación Química

En la calificación CQ, se compara la cantidad de cada aminoácido indispensable presente en la proteína en estudio con la cantidad del mismo aminoácido presente en la proteína de referencia (composición de aminoácidos de la leche humana o el patrón de referencia de la FAO) con base a los requerimientos de preescolares de 2 a 5 años (FAO/OMS/ONU), 1985 (**Tabla 4**).

La CQ será designada por el aminoácido indispensable presente en menor proporción, el cual se conoce como aminoácido limitante. En la **Tabla 5** se presentan la CQ y el primer aminoácido limitante de algunos alimentos (Fox, 2006).

**Tabla 4. Requerimiento de aminoácidos indispensables para preescolares de 2 a 5 años
(mg/ g de proteína)**

Aminoácido esencial	Requerimiento (mg/g de proteína ingerida)
Histidina	19
Isoleucina	28
Leucina	66
Lisina	58
Metionina + Cistina	25
Fenilalanina + Tirosina	63
Treonina	34
Triptófano	11
Valina	35

Fuente: FAO/OMS/ONU, 1985.

Tabla 5. Calificación química y primer aminoácido limitante de algunos alimentos

Alimento	CQ	Aminoácido limitante
Leche materna	100	Ninguno
Huevo entero	100	Ninguno
Soya	74	Metionina
Trigo	53	Lisina
Maíz	49	Triptófano
Arroz	67	Metionina
Gelatina	0	Triptófano

Fuente: Fox, 2006.

3.10- Complementación proteínica

La eficacia nutricional de las proteínas alimenticias no sólo depende del equilibrio entre los diferentes nutrientes del régimen alimentario, sino también y de un modo especial de la presencia de proteínas que sean complementarias entre sí, es decir que puedan compensar la deficiencia de aminoácidos indispensables presente entre ellas.

Se considera que los aminoácidos azufrados son muy deficitarios en las leguminosas, la lisina es el principal aminoácido limitante del conjunto de cereales y el maíz es deficiente en triptófano.

Cuando se conocen los aminoácidos limitantes de una proteína es posible corregir éste déficit mediante la complementación de proteínas entre sí, el principio consiste en asociar proteínas alimenticias que se complementen mutuamente, por ejemplo: los cereales pueden ser suplementados eficazmente por pequeñas cantidades ricas en lisina: es decir proteínas de animales y leguminosas, la proteína de la soya complementa de buena manera la deficiencia de lisina en el trigo (ver **Tabla 5**) (Badui, 2006).

3.11- Digestibilidad aparente

La disponibilidad de las proteínas representa el grado de absorción de los aminoácidos constituyentes de la proteína por el organismo, los alimentos de origen animal generalmente poseen buena disponibilidad mientras que los alimentos de origen vegetal pueden tener un valor menor.

Está relacionada con su contenido de fibra dietética, este compuesto aumenta la excreción de nitrógeno y reduce la biodisponibilidad aparente. En la **Tabla 6** se presenta la disponibilidad de algunos alimentos consumidos en México (Fox, 2006).

Tabla 6. Digestibilidad aparente de algunos alimentos consumidos en México

Alimento	Digestibilidad aparente (%)
Referencia (huevo, leche materna)	100
Trigo refinado	101
Mantequilla de cacahuete	100
Chícharos	93
Arroz	93
Harina de avena	90
Trigo entero	90
Maíz	89
Frijoles	82

Fuente: Fox, 2006.

3.12- Calificación de aminoácidos corregida por digestibilidad de la proteína

La calificación de aminoácidos corregida por digestibilidad de la proteína (PDCAAS por sus siglas en inglés) de una proteína en la dieta se calcula mediante la comparación de los aminoácidos de la proteína de prueba con un patrón de referencia. Cada aminoácido es evaluado en relación con el patrón, y la consiguiente calificación se corrige con un coeficiente de digestibilidad de la proteína. Él o los aminoácidos limitantes en la proteína prueba, que se reflejan en el menor valor del PDCAAS, determinan el resultado final.

El PDCAAS de la proteína de un alimento se obtiene de multiplicar el valor químico por su digestibilidad verdadera. El valor máximo del PDCAAS es 1 y corresponde a la proteína de la leche, el huevo y la soya (Darragh, 2000).

3.13- Requerimientos energéticos

La estimación del contenido energético en los alimentos o dietas es indispensable para estudios de metabolismo y balance de energía. Los nutrimentos se requieren en primera instancia para aportar la energía necesaria en el mantenimiento normal de las funciones vitales, como son: tasa metabólica basal (TMB), termorregulación

y acción dinámica específica (ADE), también denominada como termogénesis alimentaria; además, deben suministrar la energía para la actividad física diaria (Moreno, 2000).

El valor energético de los alimentos se mide en término de kilo Joule (kJ) o kilocalorías (kcal) o, son unidades físicas de calor, cada macronutriente (proteínas, grasas e hidratos de carbono) presente en el alimento aporta energía para la utilización por el organismo; los valores experimentales se presentan en la **Tabla 7.**

Experimentalmente se ha determinado que la cantidad de energía requerida es de aproximadamente 1 kcal por kg de peso corporal y hora o de 1500 a 2000 kcal por día. No obstante la cantidad varía de acuerdo con el metabolismo de cada individuo. Además de satisfacer las necesidades energéticas del cuerpo es necesaria energía adicional para realizar el trabajo físico- mental que la jornada de trabajo requiere.

Tabla 7. Valores de energía de Atwater

Nutriente	(kcal/g nutriente)	(kJ/g nutriente)
Proteína	4.0	17
Grasa	9.0	37
Hidrato de Carbono	4.0	17

Fuente: Kuklinski, 2003.

3.13.1- Densidad energética de los alimentos

Una forma práctica de obtener la densidad energética de un alimento o dieta, es utilizando el método directo con una bomba calorimétrica; sin embargo, hay que tomar en cuenta que este dispositivo determina la energía liberada por la oxidación completa del alimento, mientras que en el cuerpo humano se realiza la oxidación en forma incompleta, en especial para el caso de las proteínas, ya que parte del nitrógeno de las proteínas ingeridas es excretado como urea, ácido úrico y

creatinina en la orina. Por lo tanto se puede asumir que la energía determinada en la bomba calorimétrica, otorga el máximo potencial energético de un alimento (calor de combustión), que por convención se conoce como energía gruesa (EG) o bruta.

Actualmente se cuenta con dos tipos de bombas calorimétricas (balísticas y adiabáticas) cada una con ventajas y desventajas. La bomba adiabática es recomendada para estudios finos que requieren exactitud, mientras que la balística es de uso práctico, ya que la determinación es relativamente rápida y sencilla. Ambos equipos se fundamentan en la primera ley de la termodinámica: “La energía en cualquier proceso físico o químico no se crea ni se destruye” en donde la energía total será la suma de las energías parciales (Bowman, 2003).

3.14- Moringa (*Moringa oleífera*)

3.14.1- Taxonomía y descripción botánica

Este árbol es nativo de Asia y el norte de África, ha sido introducido y naturalizado en algunas partes de la India, Pakistán, Afganistán, México, Perú, Paraguay y Brasil. En algunas regiones del mundo la planta es conocida como: “árbol del rábano picante”, “palillo de tambor”, “el mejor amigo de mamá”, árbol del bien”, “marango”, “árbol milagroso”, “árbol maravilloso”, “árbol de reseda”, “Ángela”, “árbol de los espárragos”, “árbol de purificación”, (**Figura 4**) entre otros. Su taxonomía se presenta en la **Tabla 8**.



Figura 4. Arbol de Moringa oleífera

Tabla 8- Taxonomía de *Moringa Oleífera*

Especie	<i>Moringa oleífera</i>
Género	<i>Moringa</i>
Familia	<i>Moringaceae</i>
Orden	Brassicales
Clase	Magnolipsida
Subclase	Diileniidae
División	Magnoliophyta

Fuente: Anwer *et. al.*, 2007

El árbol alcanza alturas desde los 5 hasta los 15 m. El tronco alcanza diámetros desde los 25 hasta los 30 cm, su corteza es blanquizca y sus raíces ligeras y gruesas; hojas alternas, pequeñas, doble y triple pinnadas. Las flores se producen en panículos y son aromáticas. El fruto es alargado y triangular, contiene de 13 a 18 semillas. Las flores y los frutos aparecen dos veces al año (**Figura 5**) (Anwar *et al.*, 2007).

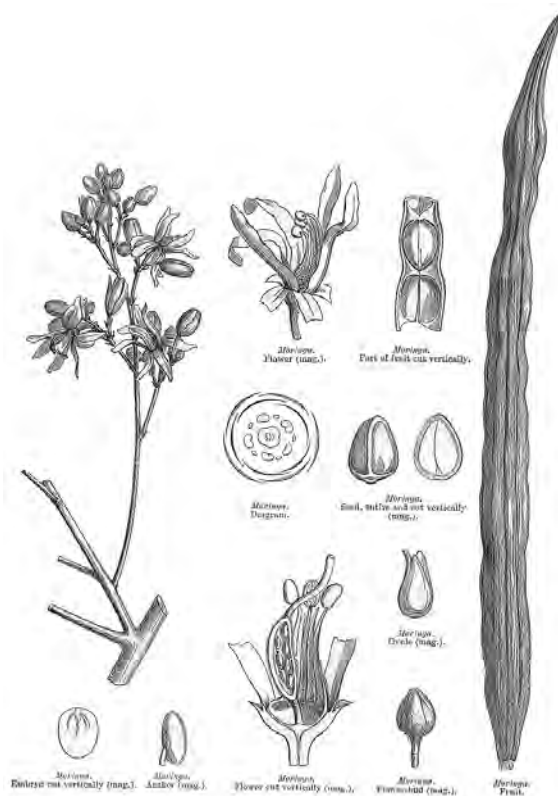


Figura 5. Ilustración botánica de *Moringa oleífera*

3.14.2- Condiciones de cultivo

La moringa es una planta adaptativa, de fácil cultivo, que se reproduce en cualquier tipo de terreno (alcalinos hasta pH de 9), clima desde tropical hasta seco, alcanza una altitud hasta de 12 metros, los tallos se desarrollan después de 6 a 8 meses de haber sido plantada. (Ferreira et al., 2008).

3.14.3- Aspectos nutrimentales

Se ha reportado que casi todas las partes del árbol son buena fuente de proteína, vitaminas (A, B, C, D, E y K), nutrimentos inorgánicos (calcio, cobre, hierro, potasio, magnesio, manganeso y zinc). Otras sustancias fitoquímicas como taninos, esteroides y triptenoides, flavonoides, saponinas, antraquinonas, alcaloides y azúcares reductores, también se encuentran presentes en la planta (Anwar et al., 2007; Ferreira et al., 2008). En la actualidad las hojas de moringa han despertado especial interés debido a que se reporta una cantidad considerable de proteína (>20%) con aminoácidos indispensables como metionina, lisina y triptófano, grasa (>6%), antioxidantes (flavonoides y carotenoides), sustancias estrogénicas (β -sitosterol), vitaminas (A, B, C) y nutrimentos inorgánicos (fósforo, calcio, cobre y hierro). (Anwer et al., 2007, Bamishaiye, 2011).

3.14.4- Formas de consumo

Las hojas de moringa, son comúnmente consumidas como verduras en: sopas, ensaladas, salsas y como encurtidos; pueden comerse frescas, cocidas o almacenadas en forma de polvo seco, durante muchos meses, sin refrigeración y al parecer sin pérdida de valor nutritivo. En la India y Filipinas las hojas frescas son usadas para preparar alimentos ricos en grasa, ya que al ser una buena fuente natural de antioxidantes, es posible aumentar la vida útil de los alimentos grasos. (Bamishaiye, 2011; Shih et al., 2011).

3.14.5- Introducción y cultivo en México

El árbol de moringa forma parte de la horticultura nacional y se encuentra presente en la costa del océano pacífico del país en donde se utiliza con fines ornamentales, sin embargo, con el desarrollo creciente del cultivo de moringa a nivel mundial por sus atributos agroforestales, nutritivos y medicinales, se han traído especies provenientes de Asia y África para su cultivo intensivo (Makkar et al., 1996, Anwer et al., 2007).

4- METODOLOGÍA

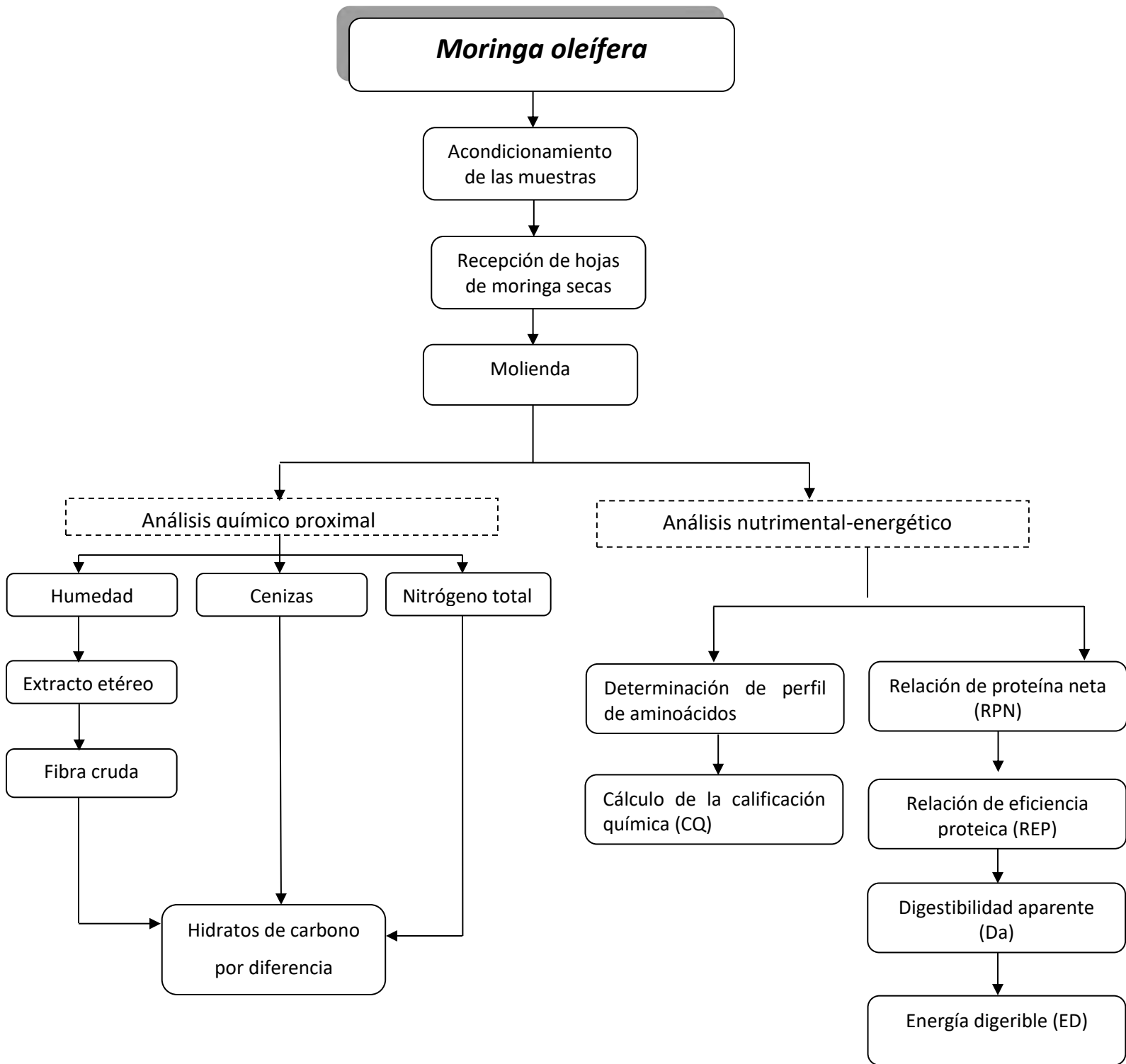


Figura 6. Diagrama experimental del estudio

4.1- Acondicionamiento de la muestra

Se recibieron aproximadamente 3 kg de hojas secas de moringa provenientes de los estados de Puebla, Michoacán y Oaxaca. Posteriormente se sometieron a molienda fina en un molino Tomas Wiley Laboratory Hill Mod. 4 empleando una malla de 1 mm de diámetro.

4.2- Análisis químico proximal

4.2.1- Humedad analítica (Anexo 9.1.1)

La técnica se fundamenta en el seguimiento del peso de la muestra sometida a condiciones establecidas de presión y temperatura; la pérdida de peso será debido a la evaporación del agua contenida en la muestra, utilizando presión reducida para abatir el punto de ebullición del agua con el fin de evitar que se dañe la muestra (AOAC 14.004, 1989).

4.2.2- Extracto estéreo (Anexo 9.1.2)

Los constituyentes grasos de las materias orgánicas son diversas sustancias lipídicas. El contenido de grasa es aquel que puede ser extraído por los disolventes menos polares como lo son el éter etílico, éter de petróleo o hexano. La técnica se fundamenta en la extracción del material graso seco y molido con una fracción de disolvente, mediante un aparato de extracción continua en el que las gotas condensadas de disolvente caen sobre la muestra contenida en un recipiente poroso o dedal, alrededor del cual pasan los vapores calientes del disolvente. El extracto seco sin disolvente obtenido se determina gravimétricamente (AOAC 7.063, 1989).

4.2.3- Fibra cruda (Anexo 9.1.3)

La técnica se fundamenta en la obtención de la fibra cruda (residuo insoluble), mediante la ignición del residuo seco remanente después de la digestión ácida,

seguida de una digestión alcalina de la muestra previamente desengrasada (AOAC 7.074, 1989)

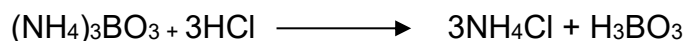
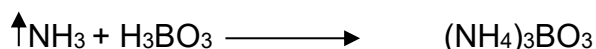
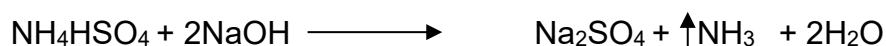
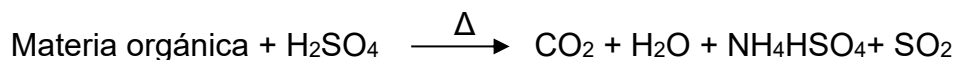
4.2.4- Cenizas (Anexo 9.1.4)

La técnica se fundamenta en la diferencia en peso entre el residuo inorgánico obtenido tras la combustión completa de los componentes orgánicos contenidos en una matriz alimenticia y el peso inicial de la muestra (AOAC 7.009, 1989).

4.2.5- Nitrógeno total (Anexo 9.1.5)

El método comúnmente utilizado para determinar proteína es el método Kjeldhal, el cual determina el contenido de nitrógeno total de una matriz alimenticia; utilizando un factor (generalmente 6.25) para su conversión a proteína. Es una técnica indirecta y se fundamenta en el seguimiento del nitrógeno presente en la muestra a través de una serie de reacciones químicas mediante un tratamiento ácido/alcalino, utilizando ácido bórico como titulante. El objetivo de modificar la mezcla digestiva y utilizar peróxido de hidrógeno es lograr la completa oxidación de la materia orgánica y reducir la pérdida de nitrógeno por formación de aminas volátiles o nitrógeno libre, favoreciendo la formación de sulfato de amonio. (AOAC 2.055, 1989).

Las reacciones se describen a continuación:



4.2.6- Determinación del perfil de aminoácidos (Anexo 9.1.6)

La técnica se fundamenta en la identificación y la cuantificación de los aminoácidos constituyentes de las proteínas mediante CLAR previa hidrólisis de los aminoácidos. Éstos últimos son separados al ser sometidos a gradientes de pH en función de su polaridad.

El procedimiento generalizado para esta determinación es la hidrólisis ácida, donde las muestras son tratadas con HCl 6 N, manteniéndolas a 145 °C por espacio de 4 horas (Lucas, 1982). Después de la hidrólisis, es necesaria la prederivatización de los aminoácidos utilizando un cromóforo (6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilcarbamato) para su identificación por CLAR de fase reversa (partición de un soluto entre una fase estacionaria no polar una fase móvil polar), utilizando norleucina como estándar interno (Cohen et al, 1993; Romero, 2003).

4.2.7 Determinación de triptófano (Anexo 9.1.7)

El triptófano es uno de los aminoácidos que no puede determinarse después de la hidrólisis ácida, debido a que dichas condiciones son generalmente destructivas. El fundamento del método consiste en liberar el enlace peptídico mediante una hidrólisis enzimática, una vez liberado se aprovecha la reactividad del anillo indólico de este aminoácido para reaccionar con p-dimetilaminobenzaldehído (DMAB) y nitrito de sodio, que formará un compuesto cromogénico, proporcional al contenido de este aminoácido que se lee a una longitud de onda de 590 nm (Lucas et al., 1980).

4.2.8- Calificación química (Anexo 9.1.8)

La CQ) es el método comúnmente utilizado para evaluar la calidad de una proteína alimenticia se fundamenta en la comparación de cada aminoácido indispensable presente en la proteína en estudio con la cantidad del mismo aminoácido presente en la proteína de referencia (composición de aminoácidos de la leche humana o el

patrón de referencia de la FAO) con base a los requerimientos de preescolares de 2 a 5 años FAO/OMS/ONU, 2012 (Fox, 2006) (ver **Tabla 4**).

4.2.9- Ensayos biológicos

Existen dos tipos de métodos biológicos, aquellos que se basan en la ganancia en peso de los animales y aquellos que se basan en el balance de nitrógeno.

4.2.9.1- Ganancia en peso de los animales (Anexo 9.1.9)

La REP se fundamenta en el crecimiento debido a la ganancia en peso de un grupo de ratas macho recién destetadas, causado únicamente por la calidad de la proteína consumida; teniendo como control a un grupo de ratas alimentadas con una dieta de caseína, como grupo control, este grupo nos indicará que el estudio se llevó a cabo de forma correcta. La proteína con mejor calidad nutrimental será la que provoque mayor ganancia en peso de los animales.

La RPN es un ensayo fundamentado en el crecimiento de los animales, que predice el valor de la proteína de mantenimiento con una dieta libre de proteína. La proteína puede tener un suficiente valor de aminoácidos indispensables para el mantenimiento celular aunque no sea necesario para soportar el crecimiento de los animales.

4.2.9.2- Balance de nitrógeno y energético (Anexo 9.1.9.1 y 9.1.9.2)

La Da se fundamenta en la determinación de la cantidad de nitrógeno absorbido mediante la diferencia del nitrógeno ingerido (suministrado en la dieta en estudio) y el eliminado por heces y no considera el nitrógeno endógeno.

El % ED se fundamenta en la determinación de la cantidad de energía absorbida mediante la diferencia de la energía ingerida (suministrada en la dieta) y la energía presente en las heces, no se consideran las interacciones posibles de los

componentes de los alimentos con el organismo debido a que la determinación de la energía presente en la dieta se evalúa por la oxidación completa de la misma.

5-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1- Análisis químico proximal

Se caracterizó bromatológicamente a los lotes de las muestras de hojas de moringa siguiendo el esquema Weende; los resultados se presentan en la **Tabla 8**, en donde se observa que los valores experimentales obtenidos para cenizas, grasa cruda y fibra cruda son similares en las tres muestras. Sin embargo, presentaron diferencias en el contenido de proteína cruda, siendo la muestra de Michoacán la de menor concentración (22.54% BS) en comparación con las muestras de Oaxaca y Puebla (30.20%, 29.34% BS respectivamente). En general, los valores experimentales del análisis bromatológico son muy parecidos a los reportados en la literatura **Tabla 9** (Herrera, 2012) lo que indica que se realizó de forma adecuada y la homogeneidad de las muestras por su origen.

Tabla 8- Resultados del análisis químico proximal en base húmeda (BH) y en base seca (BS) de las muestras de hojas de moringa (*Moringa oleifera*) de la República mexicana (g/100g de muestra).

	Moringa Oaxaca (BH)	Moringa Puebla (BH)	Moringa Michoacán (BH)	Moringa Oaxaca (BS)	Moringa Puebla (BS)	Moringa Michoacán (BS)
Humedad	7.82	5.55	7.25	-----	-----	-----
Cenizas	8.53	7.83	9.17	9.25	8.29	9.89
Grasa cruda	6.02	6.54	6.48	6.53	6.92	13.96
Fibra cruda	7.48	5.5	7.27	8.11	5.82	7.84
Proteína cruda ^b	27.84	27.71	20.91	30.20	29.34	22.54
Hidratos de carbono ^c	42.31	46.86	48.92	45.90	49.61	52.74

^a Corresponde al promedio de la determinación por duplicado n=2

^b Determinado %N x 6.25

^c Determinado por diferencia de acuerdo al sistema Weende

Tabla 9- Comparación de los resultados del análisis químico proximal de las muestras de hojas de moringa (*Moringa oleífera*) experimental y los reportados en la literatura.

Localidad/ Determinación	Humedad	Cenizas	Grasa Cruda	Fibra Cruda	Proteína Cruda ^b	Hidratos de carbono ^c
Oaxaca	7.82	8.53	6.02	7.48	27.84	42.31
Puebla	5.55	7.83	6.54	5.50	27.71	46.86
Michoacán	7.25	9.17	6.48	7.27	20.91	48.92
Valores reportados ^d	Humedad	Cenizas	Grasa Cruda	Fibra Cruda	Proteína cruda	Hidratos de carbono
Oaxaca	4.85	9.22	3.47	9.70	24.35	48.41
Puebla	6.84	8.68	6.09	5.91	22.56	49.92
Michoacán	6.16	10.92	8.93	12.85	23.08	38.06

^a Corresponde al promedio de la determinación por duplicado n=2

^b Determinado %N x 6.25

^c Determinado por diferencia de acuerdo al sistema Weende

^d Fuente: Herrera, 2012

En la **Tabla 10** se presentan los resultados promedio del análisis bromatológico en base seca de las tres muestras de moringa, donde se observa que el valor de proteína cruda es similar al de las hojas de los árboles de yuca (*Manihot sculenta*) y piñón de la India (*Matropha curcas*) (33.80% y 29.52% respectivamente), los cuales son explotados de forma intensiva en África y oeste de Asia como un alimento no convencional (Latif et al., 2015; Atamgba et al., 2015). Cabe señalar el bajo contenido de fibra cruda de las muestras de moringa (6.75% en promedio) en comparación con alimentos de origen vegetal consumidos en algunas regiones de México como el berro (*Nasturtium officinale*) (11.95%).

En comparación con algunos cereales, base de alimentación mexicana, como el maíz y la avena **Tabla 1**, las hojas de moringa presentan una concentración mayor de proteína y grasa.

Tabla 10- Resultados del análisis bromatológico en base seca de las muestras de moringa (Moringa oleífera) de la República mexicana (g/100g de muestra)

Determinación/localidad	Cenizas	Grasa Cruda	Fibra Cruda	Proteína Cruda	Hidratos de carbono
Moringa (<i>Moringa oleífera</i>) ^a					
Valor experimental	9.14	6.81	7.26	27.36	49.42
Hojas de yuca (<i>Manihot sculenta</i>) ^b	5.68	6.30	19.50	33.80	34.72
Hojas de piñón de la india (<i>Matropha curcas</i>) ^c	16.00	13.96	20.06	29.52	20.45
Berro (<i>Nasturtium officinale</i>) ^d	18.71	4.44	11.95	29.18	35.73

^a Corresponde al promedio de los valores experimentales de las muestras de Moringa Oleífera de Oaxaca, Puebla y Michoacán

^b Valor teórico (Latif *et. al.*, 2015)

^c Valor teórico (Atamgba *et. al.*, 2015)

^d Valor teórico (Mohammad *et. al.*, 2007).

5.2- Perfil de aminoácidos y Calificación Química (CQ)

Los resultados del perfil de aminoácidos se presentan en la **Tabla 11**, en donde se observa que las muestras de Oaxaca y Michoacán no presentan diferencia en la concentración de la mayoría de los aminoácidos excepto en valina (15.1 y 12.3 mg de aminoácido/ g de proteína respectivamente). Sin embargo la muestra de Puebla presenta diferencias en valina, total de azufrados (metionina y cistina), lisina y total de aromáticos (fenilalanina y tirosina) respecto a las muestras de Oaxaca y Michoacán.

Tabla 11- Composición de aminoácidos indispensables de las hojas de moringa (mg de aminoácido/ g de proteína) ^a

Aminoácido/ Muestra	<i>Moringa O.</i> Oaxaca	<i>Moringa O.</i> Puebla	<i>Moringa O.</i> Michoacán	Proteína de referencia (FAO) ^b
Histidina	32.1 ± 0.1	30.1 ± 0.1	28.2 ± 0.1	19
Treonina	38.3 ± 0.1	39.3 ± 0.2	41.4 ± 0.1	28
Valina	15.1 ± 0.2	74.2 ± 0.3	12.3 ± 0.1	66
(Metionina + Cistina)	25.0 ± 0.2	6.6 ± 0.2	25.4 ± 0.1	58
Lisina	65.4 ± 0.3	73.3 ± 0.2	68.2 ± 0.3	25
Isoleucina	64.2 ± 0.1	64.1 ± 0.2	68.2 ± 0.2	63
Leucina	103.1 ± 0.1	101.2 ± 0.2	106.1 ± 0.5	34
Fenilalanina + Tirosina	181.2 ± 0.3	119.0 ± 0.3	185.1 ± 0.1	11
Triptófano ^c	8.1 ± 0.3	9.0 ± 0.2	6.1 ± 0.4	35
Calificación Química (C.Q.) ^d	42.6	26.8	34.4	-----
Aminoácido limitante (1°)	Valina	Azufrados	Valina	-----
Aminoácido limitante (2°)	Triptófano	Triptófano	Triptófano	-----

^a Aminoácidos determinados mediante CLAR fase reversa, se presenta el valor promedio n= 3, CV<6%

^b Valores teóricos FAO, 1985 (requerimiento 2- 5 años).

^c Aminoácido determinado mediante hidrólisis enzimática y espectrometría, se presenta el valor promedio n=3, CV<6%

^d Calificación química (CQ) = $\frac{\frac{\text{mg aa indispensable en el alimento}}{\text{g de proteína en el alimento}}}{\frac{\text{mg aa indispensable en la referencia}}{\text{g proteína en el patrón de referencia}}} * 100$

En la **Tabla 11**, se observa que en comparación con la proteína de referencia de la FAO la concentración de los aminoácidos: histidina, treonina, lisina, isoleucina, leucina y aromáticos (fenilalanina y tirosina) es igual e incluso mayor en las tres muestras de moringa. Sin embargo, presenta deficiencias en los aminoácidos: valina (Oaxaca y Michoacán), triptófano (Oaxaca, Puebla y Michoacán) y total de azufrados (Puebla), siendo los aminoácidos azufrados los de mayor carencia en las muestras de moringa.

En comparación con otros alimentos; como el berro (*Nasturtium officinale*), la concentración de aminoácidos indispensables (Isoleucina, leucina, treonina, metionina y valina) es mayor en las muestras de moringa lo que indica que a pesar de tener un contenido similar de proteína cruda, la proteína de la moringa es de mejor calidad.

Makkar & Becker 1997 **Tabla 3** y Freiburger et al. 1998 han reportado el contenido de aminoácidos presentes en hojas de moringa en diferentes regiones del continente africano, en comparación con las muestras analizadas, la moringa de Puebla presenta una muy baja concentración de aminoácidos azufrados (6.6 mg de aminoácidos/ g proteína), la diferencia en la composición de aminoácidos es debida a las características genéticas aunada a factores agroecológicos bajo las que fueron cultivadas.

Se calculó la CQ con los resultados obtenidos en el perfil de aminoácidos con base a los requerimientos de aminoácidos esenciales de preescolares (2 a 5 años) (FAO 1985). Se seleccionó dicho patrón debido a que el nivel de desnutrición en las zonas rurales y marginadas de México es mayor en este sector de la población (FAO 2013), los resultados se presentan en la **Tabla 11**.

De acuerdo a la **Tabla 11**, las CQ más bajas corresponden a las muestras de Michoacán (34.4) y Puebla (26.8), mientras que la muestra proveniente de Oaxaca obtuvo la mejor CQ (42.6), esto es debido a la diferencia en la composición de aminoácidos entre las muestras. A partir de la CQ, se encontró que los aminoácidos limitantes son: valina (Oaxaca y Michoacán), metionina y cistina (Puebla). El triptófano es el segundo aminoácido limitante para las tres muestras de moringa.

En comparación con la CQ de alimentos como la quinua (81.8), el trigo (53.4), la soya (74.0) y las hojas del árbol de yuca (63.6) las muestras de moringa poseen una calificación química baja (34.6 en promedio), esto debido a la deficiencia en los aminoácidos antes mencionados para cada muestra. Sin embargo poseen mejor calificación química que las hojas de berro (28) alimento consumido en diversas regiones de la república mexicana. Se observa en la **Tabla 12** que al igual que las muestras de moringa, el berro y las hojas del árbol de yuca presentan deficiencia en triptófano, esto puede ser debido a la naturaleza de las muestras.

Tabla 12- Comparación de calificación química y disponibilidad de aminoácidos indispensables de distintos alimentos vegetales ^a

Aminoácido	Moringa O. Oaxaca	Moringa O. Puebla	Moringa O. Michoacán	Berro (<i>Nasturtium officinale</i>) ^b	Yuca (<i>Manihot sculenta</i>) ^c	QUINÚA*	TRIGO*	SOYA*
Histidina	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Isoleucina	>100	>100	>100	78.6	>100	>100	>100	>100
Leucina	>100	>100	>100	>100	>100	95.5	>100	>100
Lisina	>100	>100	>100	>100	87.9	>100	53.4	>100
Azufrados (Metionina +Cisteína)	>100	26.8	>100	28	72	>100	>100	74.0
Aromáticos (Fenilalanina + Tirosina)	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Treonina	>100	>100	>100	82.4	>100	>100	91.2	>100
Triptofano	71.8	80.00	53.62	54.6	63.6	81.8	>100	>100
Valina	42.6	>100	42.6	>100	>100	>100	>100	>100
CQ	42.6	26.8	42.6	28	63.6	81.8	53.4	74.0

^a Se presenta la CQ en base a los requerimiento de preescolares (2-5 años) FAO 1985.

* Valores teóricos (FAO, 1985 contenido de aminoácidos en los alimentos)

^b Valor teórico (Fox, 2007)

^c Valor teórico (Atamgba et. al., 2015)

Una alternativa ante la deficiencia de aminoácidos que la moringa presenta es la búsqueda de otro alimento con alto contenido proteínico y fácil acceso, que en conjunto satisfagan las necesidades que la población requiera, es decir la complementación proteínica. De acuerdo a la **Tabla 12**, la complementación de moringa y trigo (cereal), cumple con los requerimientos de todos los aminoácidos indispensables pues la deficiencia en valina presente en la moringa de Oaxaca y Michoacán es compensada con el trigo, y la deficiencia en lisina presente en el trigo es compensada por la moringa; lo anterior es una propuesta de adecuada complementación que debería evaluarse con un ensayo biológico.

5.3- Ensayos biológicos: RPN y REP

Si bien la calidad nutrimental de una proteína depende de la composición de aminoácidos indispensables es necesario realizar estudios para conocer su

biodisponibilidad que implica su absorción, digestión y utilización de éstos entre otros factores.

En la **Tabla 13** se presentan los valores experimentales de RPN y REP ajustados, así como el porcentaje de DA, para el RPN_a se observan diferencias entre los valores de las dietas a base de moringa comparados con la caseína son bajos e incluso negativos (Puebla y Michoacán).

Tabla 13- Valores experimentales de RPN, REP ajustados, y digestibilidad aparente (%)^b

Muestra analizada	RPN _a	REP _a	D _a (%)
Control (caseína)	4.16	3.40	92.59 ± 1.82
Moringa Oaxaca	1.02 ± 0.41	0.05 ± 0.60	96.23 ± 0.47
Moringa Puebla	-0.71 ± 0.23	N.D. ^c	N.D. ^c
Moringa Michoacán	-0.30 ± 0.32	-0.84 ± 0.44	91.09 ± 1.23

^a Valores promedio de RPN y REP experimentales ± desviación estándar. n= 6.

^b Vales experimentales de digestibilidad ± desviación estándar, CV<6%.

^c N.D. no determinado

Los valores más bajos de RPN_a se obtuvieron en las dietas de Puebla y Michoacán. Dichos valores indican que la proteína no posee los requerimientos suficientes para el mantenimiento celular, puesto que la ganancia en peso fue negativa. Al igual que en el RPN_a, en el REP_a se obtuvieron valores bajos para las dietas de Oaxaca y Michoacán (la dieta de Puebla no se analizó debido a que alcanzó el 100% de mortalidad en la tercera semana del ensayo). La dieta de Michoacán presentó el valor más bajo (-0.84), el valor negativo indica la pérdida en peso de los animales alimentados con esta dieta, este resultado era esperado de acuerdo al obtenido durante el RPN, puesto que si la proteína no satisface los requerimientos para el mantenimiento celular, mucho menos lo hará para el crecimiento.

Para el RPN_a y REP_a se esperaban valores bajos en comparación a la dieta control, debido a que la caseína se encuentra catalogada como una proteína de alto valor biológico por su adecuado balance de aminoácidos indispensables (Alais, 2003).

Los mejores resultados para RPN_a y REP_a de las dietas ensayadas se obtuvieron con la dieta de moringa de Oaxaca con valores de 1.02 y 0.5 respectivamente. Esto indica que la proteína de esta muestra satisface los requerimientos de nitrógeno para el mantenimiento celular y en baja proporción es capaz de soportar los requerimientos para el crecimiento, lo cual se relaciona con la calificación química obtenida (42.6).

En general los bajos resultados obtenidos para el RPN_a y el REP_a pueden deberse a varios factores, por ejemplo; la deficiencia de aminoácidos indispensables. Se observa que al igual que en la CQ el valor de RPN más bajo se obtuvo en la dieta de moringa de Puebla, alimento deficiente en aminoácidos azufrados, se reporta en la literatura que dicha deficiencia altera la formación de proteínas estructurales, tales como la queratina e inactiva la función de enzimas en donde estos aminoácidos son el centro activo, mientras que el valor más bajo para el REP, se obtuvo con la muestra de Michoacán, en la cual el aminoácido limitante es la valina, se ha publicado que la deficiencia en este aminoácido disminuye la capacidad de síntesis de proteínas (Robinson, 1991; Scott, 1994).

Otro de los factores que se tienen que contemplar es la cantidad de alimento consumido. En la **Figura 7** se presenta la cantidad de alimento ingerido por cada dieta suministrada, y se observa un bajo consumo de las dietas de moringa en comparación con la dieta de referencia. Una de las causas que provocaron el bajo consumo de las dietas, pudo ser el resabio astringente y amargo que las hojas de moringa poseen. Se asocian a los taninos como los responsables de este sabor, dichos compuestos se encuentran presentes en cantidades significativas en las hojas de moringa; 1.57% (Herrera, 2012).

La **Figura 8** presenta las curvas de crecimiento de los animales alimentados con las diferentes dietas ensayadas, en ella se observa el constante detrimento en el crecimiento de los animales alimentados con las dietas de moringa de Puebla y Michoacán, así mismo se observa un decremento inicial en el peso de los animales alimentados con la dieta de moringa de Oaxaca, sin embargo la proteína de ésta

muestra fue capaz de mantener e incluso aumentar el peso de los animales al final del ensayo pero en comparación con la dieta de referencia el crecimiento fue muy bajo (1:100).

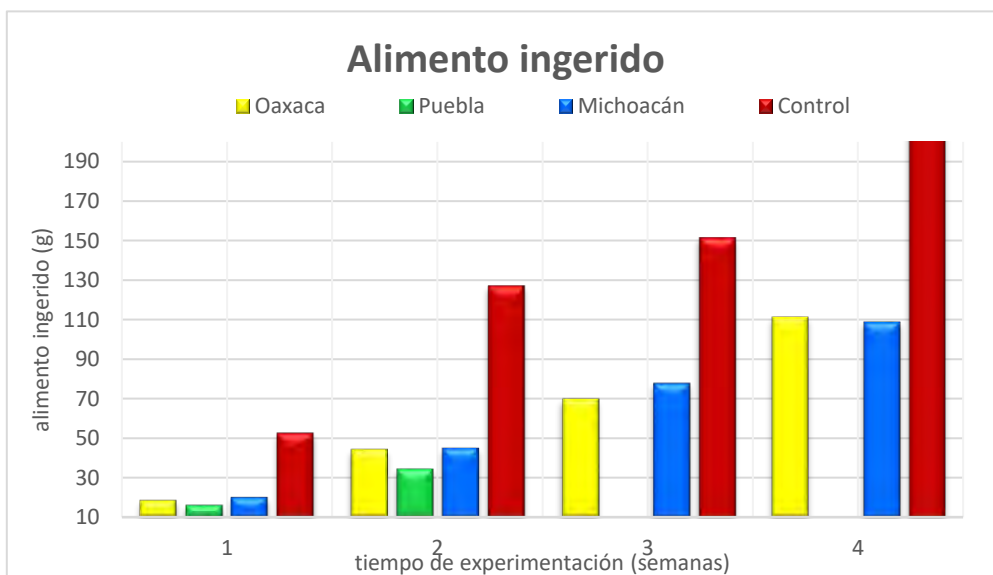


Figura 7. Cantidad de alimento ingerido (g)

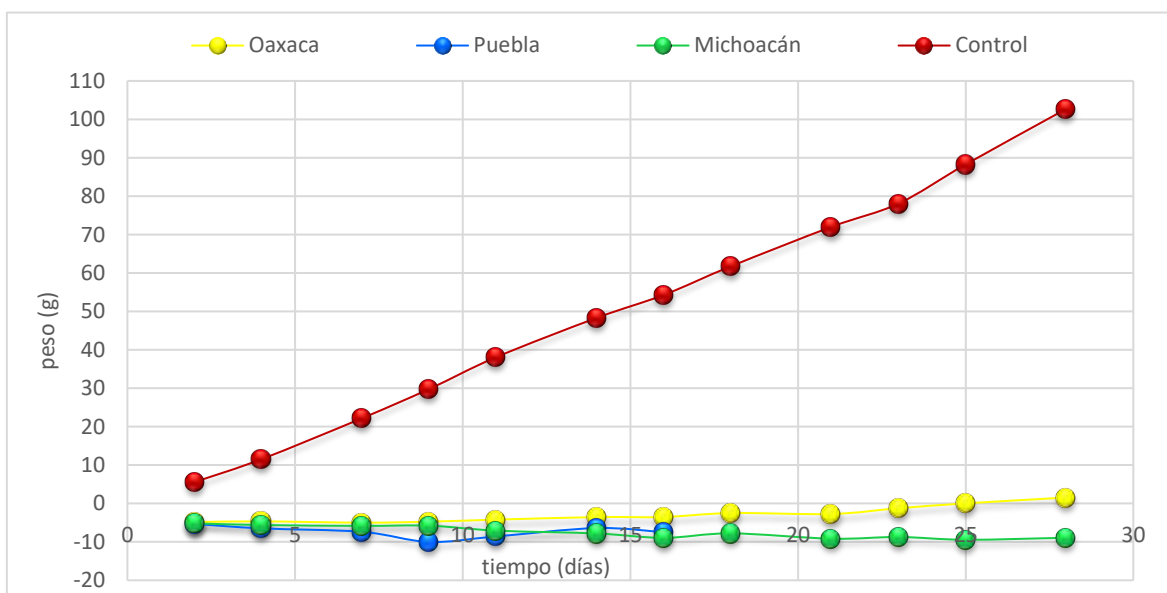


Figura 8. Gráfica de curvas de crecimiento

Cabe señalar la alta tasa de mortalidad de los animales alimentados con las dietas de moringa a través del ensayo **Figura 9** siendo la muestra de moringa de Puebla la de mayor índice, alcanzando el 100% de mortalidad en la semana 3 del experimento. Por esta razón no se determinó el REP, %Da y %ED para esta muestra, el ensayo concluyó con una mortalidad del 40% para la muestra de Michoacán y 30% para la muestra de Oaxaca, lo que puede indicar la presencia de algún factor tóxico. En el estudio previo de estas muestras no se encontraron cantidades significativas de inhibidores de tripsina, nitratos, oxalatos y saponinas, tales factores tóxicos son comúnmente encontrados en esta especie vegetal y los bajos niveles son reportados en diversos estudios (Makkar, 1996; Ferreira, 2008; Herrera, 2012).

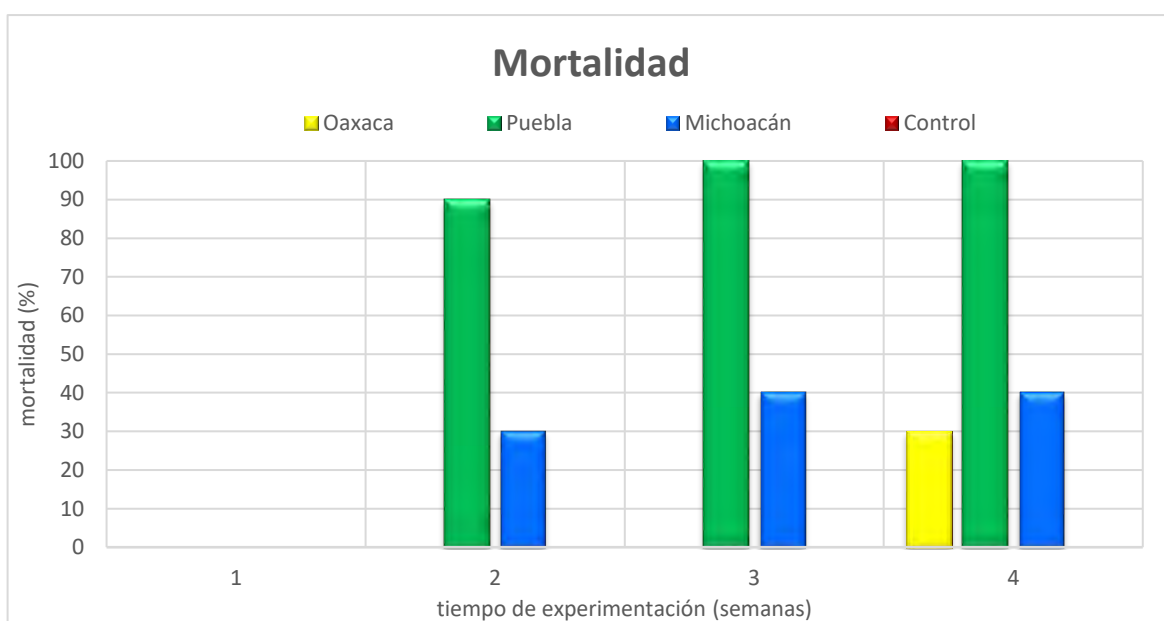


Figura 9. Gráfica de mortalidad en los animales de experimentación

Una variedad de compuestos que han llamado la atención por su “presencia” en la moringa y que junto a los taninos poseen actividad antioxidante son los isotiocianatos, compuestos a los cuales se les atribuyen propiedades anticancerígenas, hipotensoras, hipoglucemiantes y antibióticas. Sin embargo estos compuestos no se encuentran de forma “natural” en la moringa, ya que son el

producto de la hidrólisis de diversos glucosinolatos por acción de la enzima mirosinasa (Bharali, 2003; Mehta, 2003; Kar, 2003; Rincón, 2014).

El término glucosinato, químicamente hace referencia a la fracción del glucosilo (“gluco”), la presencia de un grupo sulfato (“ate”), y la propiedad de ser un precursor de un aceite de mostaza (sinol) **Figura 10**, la estructura química del radical R varía dando lugar a los distintos glucosinolatos; son el producto de metabolitos secundarios de las plantas de las familias de las crucíferas, y en especial las del género **Brassicaceae**, parientes no tan lejanos de la **Moringaceae** (familia a la que pertenece **M. oleífera**), entre las que destacan la col de Bruselas, brócoli, coliflor, repollo y la mostaza, la cantidad de glucosinolatos varía de una especie a otra (Shahidi, 1997).

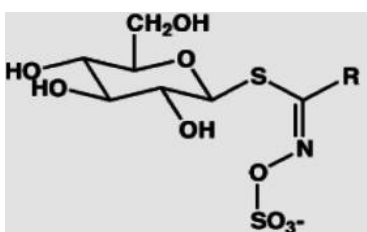


Figura 10. Fórmula general de glucosinolatos (Cameán A., Reppeto M., 2012)

Desde el punto de vista toxicológico, la presencia de estos compuestos en los alimentos limita su consumo debido a que son factores asociados al bocio, enfermedad causada por el déficit de yodo, algunos estudios señalan a los glucosinolatos sinigrina y progoitrina como los responsables de la actividad bociogéna, ambos glucósidos producen tiooxazolaínas, moléculas que poseen un grupo tioamina que interfiere en la fijación del yodo en la tiroides.

En estudios del contenido fitoquímico de la moringa, se han encontrado bajos niveles de progoitrina y glucosinolatos (0.10 y 0.15% respectivamente), sin embargo se contempla la posibilidad de que algunos de los tiocianatos e isotiocinatos producidos en las cepas de moringa presenten actividad bociógena en cantidades altas, debido a que son iones del tamaño similar al yodo y pueden inhibir

competitivamente el transporte activo de éste a nivel de la glándula tiroides y otros tejidos; aumentando la pérdida renal del mismo (Faizi, 1994; Guevara, 1999).

A pesar del bajo contenido de glucosinolatos y progoitrina reportado en la literatura, su presencia en las muestras de moringa utilizadas (Oaxaca, Puebla y Michoacán) en este estudio es desconocida. Cabe mencionar que el contenido de glucosinolatos varía de una especie a otra y dentro de una misma especie se pueden encontrar diferentes concentraciones debido a factores genéticos y agronómicos. Por lo que posiblemente este factor tóxico junto a la deficiencia de aminoácidos que las muestras de moringa presentan pueden ser las principales causas de los bajos valores de REP y RPN obtenidos así como de la alta mortalidad, recordando que el modelo biológico utilizado es sumamente sensible a los factores externos como es su alimentación (Shahidi, 1997).

Otro de los parámetros evaluados para determinar la calidad proteínica que la moringa puede ofrecer fue la digestibilidad *in vivo (Da)*, la cual está definida como la disponibilidad de los aminoácidos contribuyentes de la proteína para ser absorbidos por el organismo de prueba, los resultados se presentan en la **Tabla 13**.

Para las dos muestras de moringa (Oaxaca y Michoacán) se obtuvieron resultados de digestibilidad aparente aceptables (> 90%) incluso mayores al control de caseína **Figura 11** y superiores a diversos alimentos consumidos en México como el maíz, trigo, avena, entre otros **Tabla 6**. Sin embargo estos valores de digestibilidad son aparentes, es decir, incluyen en las heces: aportes metabólicos y endógenos provenientes de enzimas, células epiteliales, células microbiales, metabolitos, entre otros, que llegan a la luz intestinal y que no forman parte del alimento (Maynard, 1986; Stein, 2007).

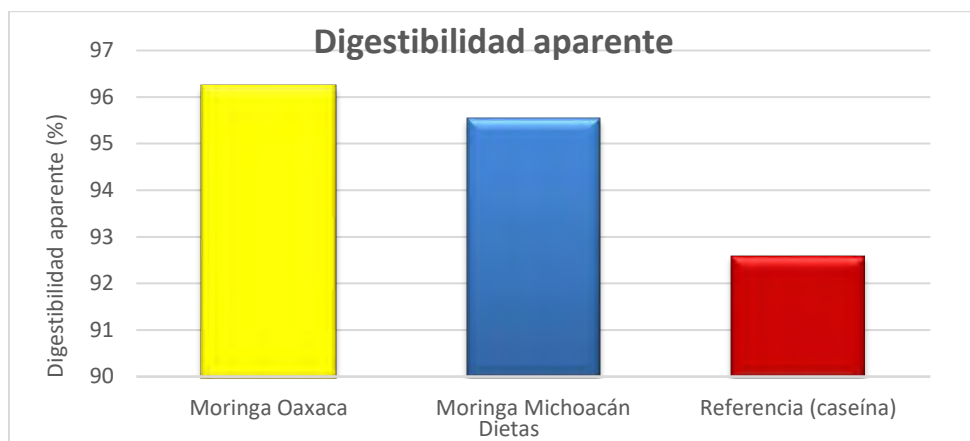


Figura 11. Digestibilidad aparente (%) de las dietas ensayadas

En general se esperaba que existiera correlación con el valor de digestibilidad proteica *in vitro*, las muestras de moringa de Oaxaca y Michoacán presentaron un valor de digestibilidad > 75%, encontrándose un 20% mayor considerado como normal y adecuado (Herrera, 2012).

Sin embargo, no es posible catalogar a la proteína como “de buena eficiencia de conversión” sólo con este parámetro, se debe considerar además la composición de aminoácidos indispensables de la proteína en prueba, parámetros que no van de acuerdo con los resultados de digestibilidad. Esto es debido a que en los bioensayos se evalúa a la proteína con base a la ganancia en peso de los animales y no determina la proteína que éstos absorben.

La **Tabla 14** presenta los valores del PDCAAS, en ambas muestras (Michoacán y Oaxaca) se observan valores bajos (0.32 y 0.40 respectivamente) en comparación con alimentos como el arroz (0.62) e incluso hojas del árbol de yuca (0.5), dado que este parámetro relaciona la CQ y la Da, se puede asumir que la proteína de las hojas del árbol de moringa de Michoacán y Oaxaca es de menor eficiencia de conversión proteínica. Lo cual corrobora los resultados obtenidos en los ensayos biológicos.

Tabla 14. PDCAAS de las muestras de moringa

Muestra analizada	C.Q.	Digestibilidad (%)	PDCAAS
Referencia (leche)	1	100	1
Hojas de Yuca (Manihot sculenta)	0.63	80	0.5
Maíz	0.49	89	0.43
Arroz	0.67	93	0.62
Moringa Oaxaca	0.42	96	0.40
Moringa Michoacán	0.34	95	0.32

La estimación del contenido energético en los alimentos es indispensable para conocer la energía que se aporta para la satisfacción y mantenimiento de las necesidades vitales, en el presente estudio se evaluó el **%ED**, es decir, la cantidad de energía absorbida por el organismo a prueba a partir de la dieta suministrada y los resultados se presentan en la **Figura 12**.

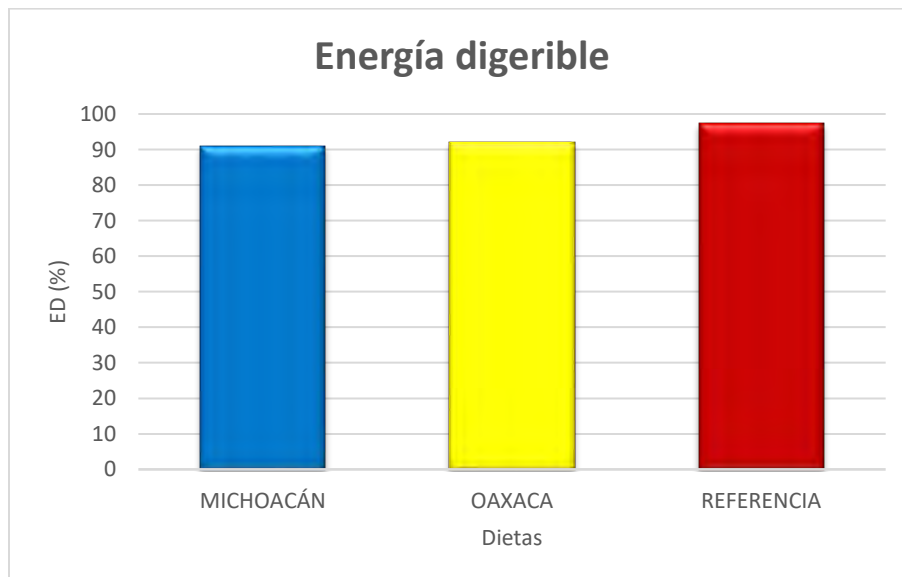


Figura 12. Energía digerible (%)

Se obtuvieron resultados similares al del control, con valores de 91.9% y 91% para Oaxaca y Michoacán respectivamente en comparación al 97% del control de caseína. Es posible sobre todo por el contenido de proteína y fibra que este parámetro se encuentre sobreestimado, debido a que en el organismo los alimentos no se oxidan completamente como se realiza en la determinación por bomba calorimétrica (Bowman, 1998).

A pesar del buen valor de energía que la dieta pueda contener es necesario su adecuado consumo para la satisfacción de las necesidades fisiológicas de los animales, sin embargo se observó a lo largo del ensayo un bajo consumo de las dietas a base de moringa en comparación a la dieta control de caseína, lo que provocó una disminución en peso de los animales.

Si bien los resultados obtenidos en los métodos químicos como el perfil de aminoácidos y la CQ predecían buena calidad de proteína en las muestras de moringa, los resultados de los ensayos biológicos: RPN_a, REP_a y PDCAAS indican la baja eficiencia de conversión proteínica. La diferencia entre los resultados obtenidos con cada grupo metodológico es debido a que como alimento todos los macro componentes incluyendo a la proteína sufren cambios debido a las interacciones con el organismo, las cuales no se pueden observar con los métodos químicos.

Sin embargo es una alternativa viable para la complementación proteínica debido al buen resultado de digestibilidad que presentan; además es necesario investigar la presencia de algunos factores tóxicos que no se contemplaron en el estudio previo.

6- CONCLUSIONES

- ❖ Las muestras de moringa analizadas no poseen un adecuado perfil de aminoácidos indispensables, presentan deficiencias en: valina (Oaxaca y Michoacán), y total de azufrados (Puebla). Con bajas CQ en particular la muestra de Puebla.
- ❖ De acuerdo a los ensayos biológicos, las muestras de moringa presentan una baja eficiencia de conversión proteínica con resultados negativos (Puebla y Michoacán) y bajos (Oaxaca) para RPN_a y REP_a .
- ❖ Las muestras de moringa de Oaxaca y Michoacán presentaron buena Da, así como un alto valor de % ED.
- ❖ En general, las muestras de moringa poseen una baja eficiencia de conversión proteínica; con notables deficiencias de aminoácidos indispensables y bajas CQ. Sin embargo poseen buena Da y un alto valor de % ED.

7- PERSPECTIVAS

- ❖ Conociendo la composición y deficiencia en algunos aminoácidos indispensables de las muestras de moringa y debido al buen valor de digestibilidad, es posible proponer este alimento no tradicional como complementación con otras fuentes de proteína; sin embargo debido al alto índice de mortalidad se sugiere descartar la presencia de algún factor tóxico en cantidad significativa.

8- BIBLIOGRAFÍA

- Alais. C., (2003). Ciencia de la leche. Editorial Reverté. pág 817- 818. Madrid
- Anwar, F., Ltif, S., Ashraf, M., Gilani, A. (2007). Moringa oleifera: A Food Plant with Multiple Medicinal Uses. *Phytotherapy Research*. 21,17-25.
- Atamgba A., Akpana M., Dasofunjo K., James A., (2015). The biomedical significance of the phytochemical, proximate and mineral compositions of the leaf, stem bark and root of *Jatropha curcas*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 5(8), 650- 657.
- Badui, S. (2006). Química de los Alimentos. Ed. Pearson Addison Wesley. 4a. Edición. pág. 205-209. D.F-
- Besada, S., Castro, L. (1999). Desnutrición. Editorial Panamericana, pág. 141-154. Bogotá.
- Belitz, H., Grosch W., Schieberle, P. (2004). Food Chemistry. Springer. pág 207-224. Munich.
- Bamishaiye, E., Olayemi, F., Awagu, E., Bamshaiye, O. (2011) Proximate and Phytochemical Composition of *Moringa oleifera* Leaves at Three Stages of Maturation. *Advance Journal in Food Science and Technology*. 3(4), 233-237.
- Bharali, R., Tabassum, J., Azad, M. (2003). Chemomodulatory effect of *Moringa oleifera*, Lam, on hepatic carcinogen metabolizing enzymes, antioxidant parameters and skin papillomagenesis in mice. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 4, 131–139.
- Bowman, B., Rusell R. (2003). Conocimientos actuales sobre nutrición. Instituto Internacional de Ciencias de la Vida. pág 7-11. Washington, D.C.

- Carmuega, E., Duran, P. (2000), Valoración del estado nutricional en niños y adolescentes, Editorial Panamericana, pág. 3-24, Sucre.
- Cohen S., Michaud, D. (1993). Synthesis of a Fluorescent Derivatizing Reagent, 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate, and its Application for the Analysis of Hydrolyzable Amino Acids Via High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry*. 211, 271-287
- Darragh J., A., Hodgkinson M., S., (2000). Quantifying the Digestibility of Dietary Protein. *Journal Nutritional*. 130, 1850-1856.
- Dimes, L.E., Haard, N.F., Dong, F.M., Rasco, B.A., Forster, F.T., Fairgrieve, W.T., Arndt, R., Hardy, R.W., Barrows, F., Higgs, D., (1994). Estimation of protein digestibility: II In vitro assay of protein in salmonid feeds, *Comparative Biochemistry and Physiology* 108, 363- 370.
- Faizi, S., Siddiqui S., Saleem R., Siddiqui S., Aftab K., Gilani H. (1994). Isolation and structure elucidation of new nitrile and mustard oil glycosides from *Moringa oleifera* and their effect on blood pressure. *Journal of Natural Products*. 57, 1256–1261.
- Ferreira, P., Farias D., Oliveira, J., Carvalho, A. (2008). *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritional potential, *Review Nutrition*, (Campinas), 21(4), 431-437.
- Freiburger, N. (1998). Nutrient content of the edible leaves of seven wild plants from Niger, *Plant Foods for Human Nutrition*. 53, 57-69.
- Fox, B., Cameron, A. (2006). *Ciencia de los alimentos nutrición y salud*. Editorial Limusa. pág 231- 239. D.F.
- Guevara, A., Vargas, C., Sakurai, H., Fujiwara, Y., Hashimoto, K., Maoka, T., Kozuka, M., Ito, Y., Tokuda, H. y Nishino, H. (1999). An antitumor promoter

from *Moringa oleifera* Lam. Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 440, 181–188.

- Herrera, R. (2012). Composición bromatológica, potencial nutritivo y contenido de factores tóxicos, entre las hojas de diferentes cepas de moringa (*Moringa oleifera*) que se cultivan en el país”. Tesis de la Facultad de Química, UNAM. pág. 59-61. D.F.
- Horwitz, W., Latimer, G. (2005). Official methods of analysis of the Association Official Analytical Chemists. Published of AOAC International, 17th edition, Chapter 4 pp. 1-8, 33-36, 42-47, Gaithersburg.
- Horwitz, W., Latimer, G. (2006). Official methods of analysis of the Association Official Analytical Chemists. Published of AOAC International, 18th edition, Chapter 45 pp. 75-80, Gaithersburg.
- Instituto Nacional de Salud Pública. (2012). Encuesta Nacional de Salud Pública 2012 (resultados nacionales). Subdirección de comunicación científica y publicaciones del INSP, pág. 129-194, Cuernavaca.
- Kar, A., Choudhary, B.; Bandyopahyay, N. (2003). Comparative evaluation of hypoglycaemic activity of some Indian medicinal plants in alloxan diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology. 84, 105–108.
- Kuklinski, E. (2003), Nutrición y Bromatología de los alimentos, Editorial Omega, pág. 40-50, Barcelona.
- Latham, M. (2002) Nutrición Humana en el mundo en desarrollo, Organización Nacional de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación colección FAO, pág. 513-540, Roma.

- Latif S., Müller J., (2015). Potential of cassava leaves in human nutrition: A review. *Food science and technology*. 44, 147-158.
- Lucas, B. and Sotelo, A. (1980). Effects of diferents alkalies, temperature, and hydrolysis times on Tryptophan determination of pure proteins and feeds. *Analytical Biochemistry*. 109, 192-197.
- Lucas, B. and Sotelo, A. (1982). Amino acid determination in pure proteins, foods, and feeds using two different acid hydrolysis methods. *Analytical Biochemistry*. 123, 349-356.
- Maynard, L. (1986). *Animal Nutrition*, McGraw-Hill, pág. 223-228. Colorado.
- Makkar, H. and Becker, K. (1996). Nutritional value and antinutritional components of whole and ethanol extracted Moringa oleifera leaves. *Animal Feed Scientific Technology*. 63, 211-228.
- Makkar, H., Becker, K. (1997). Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the Moringa oleifera tree. *Journal of Agricultural Science*. 128, 311-322.
- Mehta, L., Balaraman, R., Amin, A., Bafna, P., Gulati, O. (2003). Effects of fruits of Moringa oleifera on the lipid profile of normal and hypercholesterolaemic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*. 86,191–195.
- Mohammad, I., Farahnaz, T., Muhammad, I., Asifullah, K., Ikhtiar, K. (2007). Analysis of nutritional components of some wild edible plants. *Journal Chemical Pakystan*. 29(5), 500-506.
- Monckeberg, F. (1997), *Desnutrición calórico – proteíca, marasmo y kwashiorkor en la infancia.*, Editorial Panamericana, pág. 320-335, Buenos Aires.

- Moreno, R. Nutrición y dietética para tecnólogos de alimentos (2000). Editorial Díaz de Santos. pág 166-172. Madrid.
- Muñoz, M., Chávez, A. (2007), Desnutrición: su impacto en la salud humana y en la capacidad funcional, Editorial Grama, pág. 1-13, 157-180, D.F.
- National Research Council. (2002). Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (traducción en español bajo auspicio de la Academia Nacional de Medicina). National Academy Press, pág. 1-8, 24-65, Washington, D. C.
- Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación. Los recursos fitogenéticas para la alimentación y la agricultura en el mundo.2010 [En línea], disponible en: <http://www.fao.org/docrep/meeting/022/k9375s.pdf> [Último día de acceso 25/09/2013]
- Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación. Depósito de documentos de la FAO. Problemas de la alimentación y nutrición. .2010 [En línea], disponible en: <http://www.fao.org/docrep/v5290s/v5290s16.htm> [Último día de acceso 25/09/2013]
- Pérez, F. (1998). Calidad nutritiva de los alimentos. Nutrición Hospitalaria. 13, 621-627.
- Reyes-Sánchez, N., Spörndly, E., Ledin, I. (2006). Effect of feeding different levels of foliage of Moringa oleífera to creole dairy cows on intake, digestibility, milk production and composition. Livestock Science. 101, 21-31.
- Rincón, A. (2014) Biosíntesis de los glucosinolatos e importancia nutricional humana y funciones de protección a las plantas. Revista Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 22, 64-80.

- Roa, R., Tara, M., Krishnan, C. (1974). Colorimetric estimation of tryptophan content of pulses. *Journal Food Science Technology*. 11, 213-216.
- Robinson, D. (1991). *Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos*. Editorial Acribia, pág. 123, Zaragoza.
- Roggeiro, E. (2007). *Desnutrición Infantil Fisiopatología, Clínica y Tratamiento Dietoterápico*. Rosario Corpus Editorial, pág. 5-18, Buenos Aires.
- Romero, C. J. (2003). Validación de un método para cuantificar aminoácidos en cereales y leguminosas por HPLC. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. 20-23, 29-31, 35-44, 67-69. D.F.
- Shahidi, F., De Clercq, D. (1997). Glucosinolates in Brassica oilseeds: Processing effects and extraction. *Antinutrients Phytochemicals in Food*. 622, 152-170.
- Shih, M., Chang, C., Kang, S., Tsai, M., (2011). Effect of Different Parts (Summer and Winter) on the Chemical Compositions and Antioxidant Activity of *Moringa oleifera*. *International Journal Molecular Science*. 12, 6077-6088.
- Scott, B. (1994). Histopatología de amino acid deficiencie: valine. *Experimental and Molecular Pathology*. 3, 610-621,
- Stein, H.H., Fuller M.F., Moughan P.J. (2007). Definition of apparent, true, and standardized ideal digestibility of amino acids in pigs. *Livestock Science*. 109, 282-285.
- Woot-tuen, W., Flores, M. (2001). *Tablas de composición de alimentos para uso en América Latina*. Editorial Interamericana. pág 342-345. D.F.

9- ANEXOS

9.1- Materiales y métodos

9.1.1 - Determinación de humedad (AOAC 14.004, 1989)

Equipo:

- ❖ Estufa de vacío Lab-Line Duo Vac Oven Mod. 3620
- ❖ Balanza analítica Sartorius analytic

Materiales:

- ❖ Charolas de aluminio
- ❖ Desecador de vidrio

Procedimiento:

Las charolas de aluminio se colocaron en la estufa de vacío hasta alcanzar el peso constante. Posteriormente, se pesaron en ellas aproximadamente 3 g de muestra y se introdujeron en la estufa de vacío a las siguientes condiciones: Presión ≤ 15 inch Hg y temperatura de 70-80 °C. La muestra se secó por espacio de 6 h, después de este tiempo se retiró de la estufa y se dejó enfriar en un desecador de vidrio. La charola con la muestra fue pesada tan pronto como se equilibró con la temperatura ambiente (aproximadamente 30 min). Este procedimiento se repitió hasta alcanzar peso constante.

Cálculos:

Contenido de humedad = peso muestra húmeda (g) – peso muestra seca (g)

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{contenido de humedad (g)}}{\text{peso muestra húmeda (g)}} * 100$$

9.1.2- Determinación de grasa cruda (AOAC 7.063, 1989)

Equipo:

- ❖ Aparato de extracción Goldfish Labconco Mod. 35001-00CV
- ❖ Balanza analítica Sartorius analytic
- ❖ Estufa de vacío Lab-Line Duo Vac Oven Mod. 3620

Materiales:

- ❖ Anillos metálicos para extracción Goldfish
- ❖ Bomba de recirculación Little Grant pump Mod. 1
- ❖ Cartuchos de celulosa de 22 x 80 mm.
- ❖ Porta dedales de vidrio
- ❖ Tubos recuperadores de disolvente
- ❖ Vasos de borde esmerilado, Labconco 35051.

Reactivos:

- ❖ Éter de petróleo

Procedimiento:

Los vasos esmerilados se introdujeron en la estufa de vacío hasta alcanzar peso constante. Se colocó la muestra seca (obtenida en la determinación de humedad) en cada cartucho de celulosa. A continuación, los cartuchos se introdujeron en los porta dedales de vidrio y se colocaron en el compartimiento de extracción de Goldfish. En los vasos esmerilados se añadieron 40 mL de éter de petróleo y con el anillo metálico se colocaron en el aparato de extracción, el cual estaba conectado a una bomba de recirculación de agua fría. Finalmente se subieron las parrillas de calentamiento del equipo, se encendió la bomba de recirculación para que el agua circulara sobre los refrigerantes y se trabajó con el control de calentamiento en la posición de LOW durante 2 horas. Después de este tiempo se bajaron las parrillas de calentamiento y se verificó la completa extracción de la grasa, para ello se dejó caer una gota de la descarga sobre un trozo de papel filtro; al evaporarse el éter no

debe dejar residuo de grasa. Un vez finalizada la extracción, se sacaron los porta dedales y se sustituyeron por los tubos recuperadores de disolvente.

Se volvieron a colocar los vasos esmerilados y subieron nuevamente las parrillas para iniciar el calentamiento. Cuando los vasos se encontraron casi libres de disolvente, se retiraron del equipo y fueron colocados por unos minutos en una campana de extracción, para asegurar la completa evaporación del disolvente. Posteriormente, los vasos fueron conservados en la estufa de vacío hasta alcanzar peso constante.

Cálculos:

$$\text{Cantidad de grasa} = \text{peso (vaso + grasa) (g)} - \text{peso vaso (g)}$$

$$\% \text{ Grasa} = \frac{\text{cantidad de grasa (g)}}{\text{peso muestra humeda(g)}} * 100$$

9.1.3- Determinación de fibra cruda (AOAC 7.074, 1989)

Equipo:

- ❖ Aparato de digestión Labconco
- ❖ Balanza analítica Sartorius analytic
- ❖ Estufa de vacío Lab-Line Duo Vac Oven Mod. 3620
- ❖ Mufla Heraew Hanau

Materiales:

- ❖ Crisoles de porcelana tipo gooch
- ❖ Embudos Buchner con alargadera
- ❖ Filtro de vidrio
- ❖ Matraces de vidrio Kitasato, Kimax
- ❖ Mechero Fisher
- ❖ Pinzas para crisol
- ❖ Vasos de Berzelius de 600 mL, Kimax

Reactivos:

- ❖ Alcohol etílico
- ❖ Silicato de aluminio
- ❖ Solución antiespumante
- ❖ Disolución de NaOH al 1.25 % (m/v)
- ❖ Disolución de H₂SO₄ al 1.25 % (m/v)

Procedimiento

Se colocó la muestra desengrasada (obtenida en la determinación de grasa cruda), en un vaso Berzelius que contenía perlas de ebullición. A continuación, se adicionaron 200 mL de H₂SO₄ al 1.25 % (m/v) hirviendo, así como unas gotas de antiespumante para controlar la ebullición. Los vasos se colocaron inmediatamente en el aparato de digestión previamente calentado y se dejó digerir la muestra por exactamente 30 minutos. Al término de este tiempo se vació el contenido sobre un embudo California y se filtró con ayuda de vacío, lavando el residuo con agua destilada caliente hasta eliminar el ácido (aproximadamente 500 mL).

Una vez lavado el residuo se transfirió nuevamente al vaso Berzelius de forma cuantitativa y se adicionaron 200 mL de NaOH al 1.25% (m/v) hirviendo y unas gotas de antiespumante. Se dejó digerir por 30 minutos exactos. Al término de este tiempo se vació el contenido sobre un embudo California y se filtró con ayuda de vacío, lavando el residuo con agua destilada caliente hasta eliminar el álcali. Las perlas de ebullición se lavaron para recuperar el material adherido y retirarlas del residuo. El residuo se transfirió a un crisol de porcelana tipo gooch con 0.5g de silicato de aluminio que previamente se llevó a peso constante en una mufla a 500°C, se disminuyó la humedad con 12.5 mL de alcohol etílico y se colocó en la estufa de vacío para su secado hasta que alcanzó peso constante. Posteriormente, se carbonizó el residuo seco en la flama de un mechero Fisher en la campana de extracción y se introdujo en la mufla a 500°C para su incineración. Los crisoles fueron pesados periódicamente hasta que alcanzaron peso constante.

Cálculos:

$$\% \text{ Fibra cruda} = \frac{\text{peso}_{\text{crisol con residuo seco}}(g) - \text{peso}_{\text{crisol + cenizas}}(g)}{\text{peso muestra húmeda}}(g) * 100$$

9.1.4- Determinación de cenizas (AOAC 7.009, 1989).

Equipo:

- ❖ Balanza analítica Sartorius analytic
- ❖ Campana de extracción
- ❖ Mufla Heraew Hanau

Material:

- ❖ Crisoles de porcelana
- ❖ Desecador de vidrio
- ❖ Mechero Fisher
- ❖ Pinzas para crisol

Procedimiento

Los crisoles se colocaron en la mufla a una temperatura de 500 °C hasta alcanzar peso constante. Se pesaron 3 g de muestra húmeda en cada uno de ellos y se calcinaron a fuego directo en la flama de un mechero Fisher, en la campana de extracción hasta que el desprendimiento de humo fue nulo o mínimo. Posteriormente, los crisoles se introdujeron en la mufla por 3 horas a una temperatura constante de 500 °C. Transcurrido el tiempo se dejaron enfriar en un desecador por 45 minutos y se pesaron. Posteriormente, se volvieron a introducir en la mufla y se realizaron pesadas periódicas hasta alcanzar el peso constante.

Cálculos:

Cantidad de ceniza = peso (crisol + ceniza) – peso crisol

$$\% \text{Cenizas} = \frac{\text{cantidad de ceniza}}{\text{peso muestra húmeda}}(g) * 10$$

9.1.5- Determinación de nitrógeno total por microkjeldhal (AOAC 2.055, 1989).

Equipo:

- ❖ Balanza analítica Sartorius analytic
- ❖ Digestor TECATOR Modelo 20/40
- ❖ Equipo de microdestilación Kjeltex Auto Analyzer Tecator Mod. 1030

Material:

- ❖ Tubos de digestión de 75 mL, TECATOR.

Reactivos:

- ❖ Mezcla digestiva (Disolver 3 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 20 mL de agua destilada, ya disuelta la sal, añadir 50 mL de H_3PO_4 , adicionar 430 mL de H_2SO_4 concentrado, agitar por 30 min.)
- ❖ Disolución de ácido bórico al 1 % con indicadores (Pesar 20 g de ácido bórico y disolver en 1.8 L de agua destilada. Anadir 20 mL de verde de bromocresol (al 0.1 % en metanol) y 14 mL de rojo de metilo (al 0.1 % en metanol). Agitar vigorosamente y llevar al aforo con agua destilada a un volumen de 2 L.
- ❖ Disolución de H_2O_2 al 30%
- ❖ Disolución de HCl 0.01 N valorada
- ❖ Disolución de K_2SO_4 (R.A.)
- ❖ Disolución de NaOH al 40% (p/v)

Procedimiento:

Se pesaron aproximadamente 100 mg de muestra en un trozo de papel, se depositaron dentro de un tubo de digestión y se añadieron 0.5 g de sulfato de potasio y 3 mL de mezcla digestiva. Los tubos se colocaron en el digestor a 340°C durante

15 minutos. Después de este tiempo, se retiraron del digestor, se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 20 minutos y se les añadió 1.5 mL de H₂O₂ al 30%. A continuación, se colocaron nuevamente en el digestor a 370 °C hasta la total destrucción de la materia orgánica, es decir, hasta que la mezcla fuese transparente y de color azul verdosa. Una vez realizada la digestión, se dejaron enfriar los tubos y se destilaron recibiendo el amoníaco liberado en la disolución de ácido bórico con indicadores. Finalmente, los destilados fueron valorados con HCl 0.01 N. Se realizó el mismo tratamiento con un estándar de caseína (88.88% de proteína) para corregir el valor obtenido. Paralelamente se corre un experimento utilizando un blanco de dextrosa para considerar el aporte de nitrógeno proveniente de los reactivos.

Cálculos:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(M - B) \times N \times meq}{m} * 100$$

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Nitrógeno} \times F$$

En donde:

M = mL de reactivo de titulación de la muestra

B = mL de reactivo de titulación del blanco

N = Normalidad de la solución de HCl

meq = Miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m = Peso de la muestra húmeda en gramos

F = Factor de conversión de proteína que en el caso del residuo se empleó el valor de 6.25.

Determinación de hidratos de carbono por diferencia (Weende, 1860)

El porcentaje de hidratos de carbono se calculó por diferencia restando al 100% la suma de los porcentajes de humedad, grasa cruda, proteína cruda, cenizas y fibra cruda.

Cálculos:

$$CD = 100 - (\% \text{ Humedad} + \% \text{ Grasa cruda} + \% \text{ Proteína} + \% \text{ Fibra cruda} + \% \text{ Cenizas})$$

9.1.6- Determinación del perfil de aminoácidos por CLAR

Equipo:

- ❖ Balanza analítica Sartorius analytic
- ❖ Detector uv-vis Waters Mod. 2487
- ❖ Digestor TECATOR Modelo 20/40
- ❖ Potenciómetro Thermo Scientific Mod. Orion 5- star
- ❖ Rotavapor BUCHI modelo R
- ❖ Sistema CLAR Alliance Mod. 2695
- ❖ Vórtex Lab-Line Mod. 1290 super mixer

Materiales:

- ❖ Acrodiscos de nylon, 0.2 μm de tamaño de poro y 13 mm de diámetro, GELMAN
- ❖ Agitadores magnéticos
- ❖ Columna cromatográfica AccQ Tag Nova Pack C18 tamaño de partícula 4 μm , de 3.9 mm x 150 mm, WATERS
- ❖ Embudos Buchner con alargadera
- ❖ Matraces aforados de 25 mL
- ❖ Matraces bola de 100 mL
- ❖ Matraces Kitasato, Kimax
- ❖ Micro pipeta y puntas con capacidad de 5- 50 μL , Eppendorf
- ❖ Micro pipeta y puntas con capacidad de 50- 200 μL , Eppendorf
- ❖ Micro pipeta y puntas con capacidad de 200- 1000 μL , Eppendorf
- ❖ Jeringas de 10 mL
- ❖ Papel WHATMAN 542
- ❖ Baño de agua a 55°C, Stirrer/Hot Plate CORNING
- ❖ Pipetas Pasteur
- ❖ Sistema de filtración a vacío y filtros de 0.45 (tipo HA) y 0.22 (tipo GV) μm de tamaño de poro, MILLIPORE

- ❖ Tubos de cultivo de pared gruesa con tapón de rosca y cubierta de teflón, PYREX
- ❖ Vasos de precipitados de 25 mL
- ❖ Viales Waters

Reactivos:

- ❖ AccQ Tag concentrado A (buffer acuoso de acetatos y fosfatos) WATERS
- ❖ Acetonitrilo grado HPLC, JT-BAKER
- ❖ Agua ultrapurificada: destilada y desionizada
- ❖ Estándar de aminoácidos H: 2.5 mM, Cistina: 1.25 mM WATERS
- ❖ Nitrógeno gaseoso de alta pureza (99.997%), INFRA
- ❖ Disolución de Norleucina 5 mM- HCl 10 mM
- ❖ Disolución de HCl 6 N, 0.1 % de fenol
- ❖ Disolución de NaOH 5 N
- ❖ Disolución lavadora (Agua:Etanol 3:1, v/v con 0.01 % de hidroquinona como antioxidante)
- ❖ Reactivo de derivatización (AccQ Fluor reagent diluent, vial 2B), 6-aminoquinolil N-hidroxisuccinimidil carbamato (AccQ Fluor reagent, vial 2A) y Buffer de boratos (AccQ Fluor Borate Buffer, reactivo 1), WATERS.

Procedimiento:

9.1.6.1- Hidrólisis de la muestra

Se pesó un tubo de vidrio con tapón de rosca y cubierta de teflón la cantidad de muestra desengrasada de acuerdo al contenido de proteína (g muestra = 0.05 x % proteína). A continuación, se adicionó 25 mL de HCl 6N con 0.1% fenol y se burbujeó un poco de nitrógeno dentro del tubo con el fin de crear una atmósfera inerte. Cada tubo con muestra a hidrolizar se mantuvo en el digestor por 4 horas a 145 °C. Transcurrido el tiempo, se dejó enfriar los tubos hasta alcanzar temperatura ambiente. El contenido del tubo se transvasó en un matraz bola de 100 mL,

enjuagando el tubo con la mínima cantidad posible de disolución lavadora. Se adicionaron después 5 mL de norleucina 5 mM- HCl 10 mM y llevó a casi sequedad en el rotavapor (70-75 °C), para eliminar el exceso de HCl.

Se retiró el matraz bola del rotavapor y se añadió disolución lavadora para resuspender los sólidos (alrededor de 5 mL). Posteriormente, se filtró el hidrolizado con ayuda de vacío a través de papel WHATMAN 542, recibiendo el filtrado en un vaso de precipitados de 25 mL. Se continuó lavando el matraz con pequeñas cantidades de disolución lavadora hasta asegurarse de haber transvasado todo el hidrolizado. Se ajustó el pH a 6.8 ± 0.2 con NaOH 5 N y se aforó a 25 mL con agua destilada. Los hidrolizados se transvasaron en frascos de plástico, donde se les burbujeó nitrógeno y fueron conservados en congelación hasta su inyección.

9.1.6.2- Preparación de las muestras para su inyección en el cromatógrafo de líquidos

Con ayuda de una jeringa se filtró la muestra, pasándola a través de un acrodisco de nylon de 0.2 μm de tamaño de poro, desechando las 5 primeras gotas y recuperando el resto en un tubo eppendorf o un vial. Los hidrolizados se derivatizaron de la misma forma que el estándar de aminoácidos.

9.1.6.3- Derivatización del estándar de aminoácidos y de los hidrolizados de la muestra

Reconstitución de AQC

Se precalentó un baño con agua a 55 °C. Una vez que todo el reactivo de derivatización AQC (vial 2A) se encontró en la parte inferior del vial, se enjuagó la punta de una micro pipeta tomando 1000 μL del reactivo de dilución de AQC (vial 2B) y desechándolos para volver a tomar el mismo volumen y transferirlo al vial 2A y reconstituir el reactivo de derivatización AQC. Una vez añadido el reactivo de dilución, el vial 2A fue cerrado herméticamente y agitado (con vórtex) por 10 s. El reactivo se almacenó en ultracongelación cuando no fue utilizado, cuidando de

exponerlo lo menos posible a la humedad del ambiente para retardar su degradación.

Preparación de un estándar de aminoácidos

Se mezclaron 80 μL de la disolución stock de aminoácidos (2.5 mM) con 20 μL de norleucina 5 mM-HCl 10 mM y 900 μL de agua purificada para obtener un estándar de 16 aminoácidos (Asp, Ser, Glu, Gly, Hys, Arg, Thr, Ala, Pro, Tyr, Val, Met, Lys, Ile, Leu y Phe) de concentración 0.2 mM; cistina, 0.1 mM y norleucina 0.1 mM (como estándar interno).

Derivatización del estándar de aminoácidos

En un vial para CLAR se depositaron 10 μL del estándar de aminoácidos (procurando que la punta de la pipeta no tocará las paredes del vial) y 80 μL del buffer de boratos (vial 2B). El contenido del vial se mezcló en un vórtex por 10 s y a continuación, se añadieron 10 μL del reactivo de derivatización ya reconstituido (vial 2A) y el contenido del vial se agitó nuevamente en el vórtex durante un minuto (tiempo durante el cual se lleva a cabo la reacción y se hidroliza el exceso de AQC). Se cerró el vial y se introdujo en el baño de agua a 55 °C durante 10 minutos. Una vez obtenidos los derivatizados de los aminoácidos, se inyectaron en el sistema cromatográfico como se describe a continuación.

9.1.6.4- Análisis cromatográfico

Preparación de la fase móvil

Buffer de acetatos-ácido fosfórico, pH 5.02 ± 0.02 (fase A). Se diluyeron 100 mL de concentrado A (AccQ Tag concentrado A) hasta 1000 mL con agua purificada utilizando un matraz volumétrico de 1000 mL. La disolución fue pasada a través de un sistema de filtración a vacío con un filtro de tamaño de poro de 0.45 μm tipo HA y almacenada en refrigeración, filtrándola y desgasificándola ajustando el pH todos los días. El pH se ajustó con ácido fosfórico concentrado o hidróxido de sodio 5 N, cuando fue necesario.

Acetonitrilo grado HPLC (fase B)

Agua ultrapurificada: destilada y desionizada (Fase C)

Acondicionamiento del equipo

Una vez estabilizado el sistema y acondicionada la columna a flujo de 1 mL, se inició el programa de elución el cual fue ajustado previamente a 254 nm. El volumen de inyección de la disolución estándar de aminoácidos y los hidrolizados de aminoácidos ya derivatizados fue de 10 µL. La determinación del perfil de aminoácidos de cada muestra se realizó por triplicado.

Gradiente de separación y cuantificación de aminoácidos

Se utilizó el programa de gradiente de separación proporcionado por Waters, indicado en el manual Waters AccQ Tag system **Tabla 15**.

Tabla 15- Programa de gradiente

Tiempo (min)	Flujo	% A	%B	%C
0.0	1.0	100	0	0
0.5	1.0	99	1	0
18.0	1.0	95	5	0
19.0	1.0	91	9	0
29.5	1.0	83	17	0
33.0	1.0	0	60	40
36.0	1.0	100	0	0
65.0	1.0	0	60	40
100.0	0.0	0	60	40

Tabla 16- Orden de elución

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

Cálculos:

Se realizó el cálculo con base a los equivalentes de norleucina de cada uno de los aminoácidos en las muestras y el estándar. Para obtener el contenido expresado en gramos de cada aminoácido por 100 gramos de proteína en la muestra, se realizó el cálculo siguiente:

$$\frac{\text{mg aminoácido}}{\text{g proteína}} = \frac{\text{Respuesta}_{\text{muestra}} * \left(\frac{1}{\text{Respuesta}_{\text{estándar}}} \right) * \text{Caa}'s_{\text{estándar}} * P.M.* V * C_{\text{norl}_{\text{muestra}}}}{\text{pm} * C_{\text{norl}_{\text{estándar}}} * \%P_{\text{muestra}}} * 100000$$

En donde:

Respuesta muestra = relación de áreas aminoácido a norleucina en la muestra

Respuesta estándar = relación de áreas aminoácido a norleucina en el estándar

Caa estándar = concentración del aminoácido en el estándar (mM)

PM. = peso molecular del aminoácido

V = volumen de aforo (L)

C_{norl muestra} = concentración de la norleucina en la muestra (mM)

pm = peso de la muestra (mg)

Cnorl estándar = concentración de la norleucina en el estándar (mM)

%Pmuestra = porcentaje de proteína en la muestra (g prot/ 100 g muestra)

100000 = Factor de conversión mg de aminoácido en 1g de proteína.

9.1.7- Determinación de Triptófano por método enzimático (Lucas *et. al.*, 1982)

Equipo:

- ❖ Espectrofotómetro GENESYS MOD. 10-S.
- ❖ Incubadora a $37 \pm 1^\circ\text{C}$
- ❖ Vórtex Lab-Line Mod. 1290 super mixer

Materiales:

- ❖ Cronometro
- ❖ Matraz aforado de 50 mL
- ❖ Matraz aforado de 100 mL
- ❖ Matraz aforado de 200 mL
- ❖ Matraz aforado de 500 mL
- ❖ Matraz Erlenmeyer de 50 mL
- ❖ Tapón de hule del # 1
- ❖ Termómetros de -20 a 110°C
- ❖ Tubos de ensaye

Reactivos:

- ❖ Ácido clorhídrico (HCl) 0.1 N
- ❖ Ácido clorhídrico (HCl) 11N: añadir el 70% de agua destilada y adicionar el volumen de HCl concentrado calculado de acuerdo a la pureza y densidad.

NOTA: hacer este reactivo con la protección necesaria y bajo campana de extracción, ya que el HCl es volátil y muy corrosivo

- ❖ Buffer de fosfatos (pH: 8.0)

- ❖ DMAB 0.5%: Pesar 0.5 g de p-dimetilamino-benzaldehído (Merck No. 3058) y disolverlos con HCl 11N, aforar a 100 mL con el mismo ácido concentrado.
- ❖ Disolución de Hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N
- ❖ Disolución de NaNO₂ 0.2%: Pesar 0.2 g de nitrito de sodio cristalino (Sigma S-2252) y se lleva a 100 mL con agua destilada
- ❖ Disolución de Pancreatina 0.4%: Pesar 400 mg ± 1 mg de pancreatina (Sigma P-1500) y aforar a 100 mL con buffer de fosfatos pH 8.00.
- ❖ Disolución de Pepsina 0.3%: se pesan 300 ± 1 mg de pepsina (Sigma P-700) y se aforan a 100 mL con HCl 0.1N
- ❖ Disolución A: Pesar 2.78g de NaH₂PO₄ H₂O (Merck No. 6346) y aforar a 100 mL.
- ❖ Disolución B: Pesar 35.81g de NaH₂PO₄ .12H₂O (Merck No. 206579) y aforar a 500 mL Se toman 5.3 mL de la solución A y 94.7 mL de la solución B y se llevan a un volumen de aprox. 185 mL, se coloca en un potenciómetro para medir el pH, que debe ser de 8:0 ± 0.1, ajustando con unas gotas de solución A o B y finalmente se afora a 200 mL con agua destilada.
- ❖ Disolución estándar de triptófano (50 µg/mL): Se prepara una solución stock de 50 ± 0.5 mg de triptófano (Fluka No. 93659) y se afora a 100 mL con agua destilada, y de esta solución stock se realice un dilución 1:10, para tener la solución deseada.

Procedimiento:

Se pesaron 0.25 g de proteína de acuerdo al porcentaje de proteína contenido en la muestra, en un matraz erlenmeyer de 50 mL, se adicionaron 10 mL de pepsina cerrando el matraz con un tapón de hule y se colocó en un baño de agua a 37 ± 1 °C con agitación durante tres horas; posteriormente se retiró del baño y se adicionaron 10 mL de de NaOH 0.1N agitando suavemente, se añadieron 10 mL de disolución de pancreatina, se cerró el matraz con tapón de hule y se dejó durante 24 horas en baño con agitación constante a 37 ± 1 °C . Se retiró el matraz del baño y se transvasó cuantitativamente a un matraz aforado de 50 mL y se aforó con agua destilada. Se filtró a través de papel filtro de poro cerrado (Whatman #5) y se tomaron tres alícuotas de 2 mL colocándolas en tubos de ensaye, uno de ellos fue

el blanco al cual se le adicionó 7.5 mL de HCl 11N, a los otros dos se les agregó 7.5 mL de DMAB, se agitaron vigorosamente utilizando el vórtex y se dejaron en reposo 15 minutos en la oscuridad.

Transcurrido el tiempo se le adicionó a cada uno de los tubos 0.5 mL de NaNO₂, se agitaron en vórtex y se dejaron 15 minutos en reposo (en oscuridad). Se leyó la absorbancia a 590 nm, usando el tubo de blanco de la muestra para ajustar a cero. Para calcular la concentración de triptófano en la muestra, se elaboró una curva de calibración, con la finalidad de poder interpolar las lecturas de las muestras en donde la concentración de triptófano va de 0 a 100 µg de triptófano **Figura 13**.

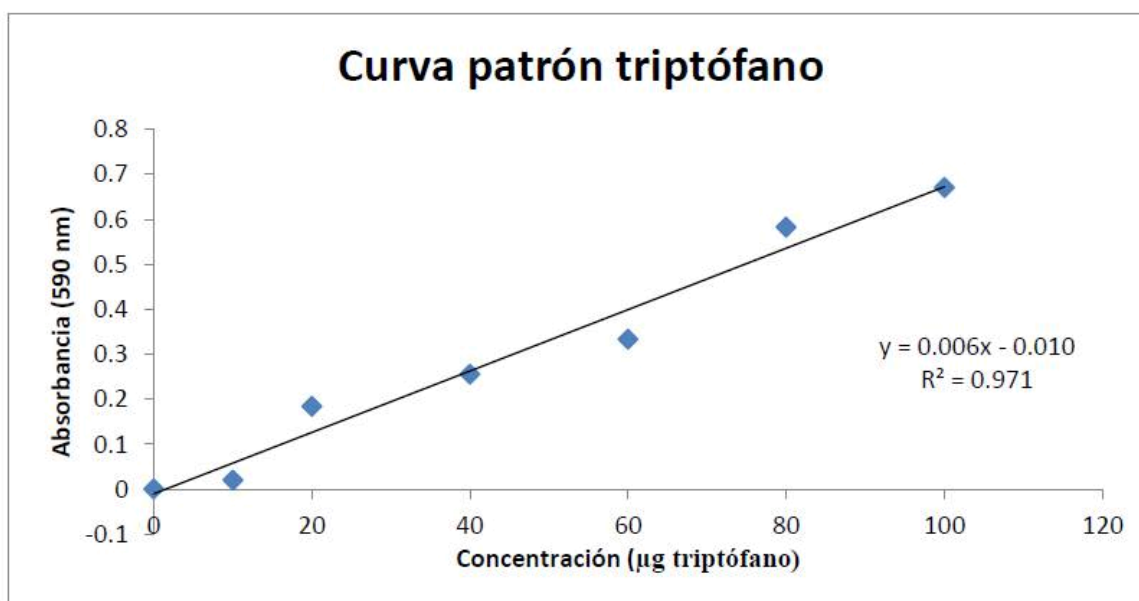


Figura 13. Curva de calibración para la determinación de Triptófano

Cálculos:

Se ajustaron las lecturas de las muestras restando el blanco respectivo, la lectura obtenida se interpoló en la curva estándar de triptófano para obtener la cantidad de

triptófano en la alícuota (CM) y a ésta se le restó el valor obtenido del blanco de reactivos (valor promedio de la gelatina CG).

Se calculó la concentración de triptófano en la muestra expresada en g de triptófano 100 g de proteína, mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{g \text{ Trp}}{100 g \text{ Proteína}} = \frac{[(CM - CG) * A]}{(M * a * \%P * 100)}$$

En donde:

CM = Cantidad de triptófano en la alícuota de la muestra (g)

CG = Cantidad promedio de triptófano en la alícuota del blanco de reactivos (gelatina) (g)

A = Aforo del hidrolizado (mL)

M = Cantidad de muestra (g)

a = Alícuota del hidrolizado para desarrollar color (mL)

%P = porcentaje de proteína de la muestra.

9.1.8- Determinación de la calificación química (CQ)

La calificación química se calculó comparando el perfil de aminoácidos indispensables de cada material con el reportado de la FAO/WHO (1985), para niños de preescolar de 2 a 5 años, de la siguiente manera:

$$\text{Calificación química} = \frac{\frac{mg \text{ aa indispensable en el alimento}}{g \text{ de proteína en el alimento}}}{\frac{mg \text{ aa indispensable en la referencia}}{g \text{ proteína en el patrón de referencia}}} * 100$$

9.1.9- Ensayo Biológico

Equipo:

- ❖ Balanza analítica Sartorius analytic
- ❖ Balanza granataria para animales de laboratorio

- ❖ Balanza granataria de un platillo

Materiales:

- ❖ Bebederos
- ❖ Cernidor (de 2 ± 0.05 mm de abertura)
- ❖ Charolas de papel
- ❖ Comederos para ratas
- ❖ Envases de plástico de boca ancha con tapa de 200 mL aprox.
- ❖ Mortero con pistilo
- ❖ Rack de jaulas individuales

Reactivos:

- ❖ Caseína (MP Biomedicals inc., 901293)
- ❖ Dextrosa (USP Comercial Químico BARSA)
- ❖ Dextrina (Fécula de maíz, Maizena)
- ❖ Sacarosa (comercial Salwill)
- ❖ Mezcla de sales minerales (MP Biomedical inc., 902842)
- ❖ Mezcla de Vitaminas (MP Biomedical inc., 902842)
- ❖ Celulosa (SIGMA C- 8002)
- ❖ Colina (disolución al 50%)
- ❖ Manteca vegetal (INCA)

Condiciones experimentales:

- ❖ Alimentación: Dieta respectiva a cada lote y agua ad libitum
- ❖ Humedad relativa: 40 – 70%
- ❖ Iluminación. 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad
- ❖ Temperatura. 20-25 °C
- ❖ Tiempo de experimentación: 28 días para el bioensayo PER , 11 para el bioensayo NPR

Procedimiento:

Se emplearon 40 ratas macho, de la cepa Wistar con una edad de 21 días, recién destetadas y con un peso inicial de 40 ± 10 g. Los animales fueron pesados y distribuidos en cuatro lotes de diez ratas cada uno por el método de la culebra japonesa. El cual consiste en ordenar los pesos de menor a mayor y posteriormente distribuirlos en forma de culebra japonesa entre los grupos verificando al final que la diferencia del peso promedio entre los lotes no sea mayor a 10 g. Una vez distribuidas se colocaron individualmente en jaulas de acero inoxidable con agua y comida ad libitum, se llevó a cabo un registro del alimento consumido así como del incremento de peso de cada animal de experimentación cada tercer día durante el tiempo indicado para los bioensayos PER Y RPN.

El alimento suministrado se elaboró a partir de las hojas de moringa, obteniendo dietas isoproteínicas e isoenergéticas con una dieta control de caseína con 10% de proteína y aproximadamente 335 kcal/100 g de dieta.

Cálculos:

Relación de eficiencia proteica REP:

$$REP = \frac{\Delta P}{\Sigma AI * F}$$

En donde:

ΔP = Incremento en peso del animal a prueba (g).

ΣAI = Total de alimento ingerido después de 28 días (g).

F= g de proteína en la dieta/ en 100g de dieta

Posteriormente se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (CV) de cada lote, si el CV es mayor a 15%, se elimina el valor más alto y el más bajo y se vuelve a recalcular hasta obtener un CV < 15%.

Relación de eficiencia proteica ajustado REP_a :

$$REP_a = REP_{(prueba)} \times \frac{REP_{caseína (referencia)}}{REP_{caseína (experimental)}}$$

En donde:

$$REP_{caseína (referencia)} = 2.5$$

Relación de Proteína Neta RPN

$$RPN = \frac{[\Delta P_{prueba} - \Delta P_{DLN}]}{\Sigma AI * F}$$

En donde:

ΔP_{prueba} = Incremento en peso del animal a prueba (g)

ΔP_{DLN} = Incremento en peso del promedio del lote alimentado con la dieta libre de nitrógeno (DLN) (g)

ΣAI = Total de alimento ingerido después de 11 días (g)

F = g de proteína en la dieta/ en 100g de dieta

Posteriormente se calcula el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (CV) de cada lote, si el CV es mayor a 15%, se elimina el valor más alto y el más bajo y se vuelve a recalcular hasta obtener un CV < 15%.

Relación de proteína neta ajustado RPN_a :

$$RPN_a = RPN_{(prueba)} \times \frac{RPN_{caseína (referencia)}}{RPN_{caseína (experimental)}}$$

En donde:

$$RPN_{caseína (referencia)} = 4.16$$

9.1.9.1 Digestibilidad aparente (%Da)

La digestibilidad aparente se determinó utilizando las heces recolectadas durante la última semana del REP, las heces fueron secadas, pesadas y molidas para obtener un material lo más homogéneo posible, de este polvo se tomó una muestra para determinar la concentración de nitrógeno total por el método Kjeldahl. Se determinó la concentración de nitrógeno en las dietas evaluadas para poder realizar los cálculos.

Cálculos:

$$\%Da = \frac{NI - Nf}{NI} * 100$$

En donde:

NI= Σ AI (alimento ingerido)* F (g de proteína en la dieta/ 100g de dieta)

Nf= Σ H (heces)* F (g de proteína en la dieta/ 100g de dieta)

Se realiza el mismo cálculo para cada rata y posteriormente se calcula el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (CV); el cual debe ser < 5%.

9.1.9.2 Energía digerible (%ED)

Equipo:

- ❖ Balanza analítica, Sartorius analitic
- ❖ Bomba calorimétrica balística GALLENKAMP, mod. CBB-330-010L

Materiales:

- ❖ Crisol de acero inoxidable de 25.4 mm de diámetro (1 pulgada)
- ❖ Desecador de vidrio
- ❖ Mango metálico compactador
- ❖ Mecha de algodón de 75 mm de longitud

Reactivos:

- ❖ Ácido benzoico (valor calórico certificado de preferencia de la British Chemical Standards). 1g de ácido benzoico= 26.45 kJ

Procedimiento:

Acondicionamiento de la muestra

La densidad energética se determinó utilizando las heces recolectadas durante la última semana del REP así como las dietas a prueba; las heces fueron secadas, pesadas y molidas para obtener un material lo más homogéneo posible. Se tomaron aproximadamente 0.5 g de muestra que se colocaron en un crisol metálico especial, previamente tarado junto con la mecha de algodón, de tal manera que un extremo de hilo quedó introducido dentro de la muestra, este peso corresponde al peso preliminar (pp). Se compactó la muestra con el mango metálico procurando que sea lo más uniforme posible y que un extremo de la mecha quede introducido dentro de la muestra, el crisol con la muestra compactada se pesa nuevamente para obtener el peso final (pf). Los crisoles con muestra se colocan en un desecador de vidrio.

Combustión de la muestra:

Una vez que se tuvo el crisol con la muestra, se colocó en la base superior del pilar central de la bomba y con mucho cuidado se introdujo la punta suelta de la mecha de algodón en el alambre de ignición como se ilustra en la Figura 14.

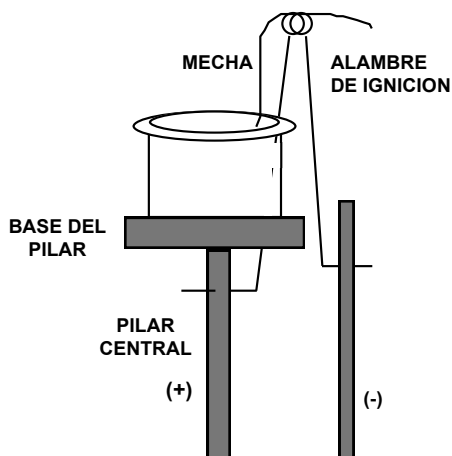


Figura 14. Colocación del crisol en el dispositivo de combustión

Se procedió a cerrar herméticamente el capuchón a la base de la bomba de combustión **Figura 14**. Con ayuda del anillo metálico, una vez cerrado se colocó el sensor del termopar en el orificio del capuchón. Se abrió el cilindro con oxígeno para dejar pasar el gas hacia el manómetro principal. Se abrió la válvula de paso girando de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ la perilla y se alcanzó una presión dentro de la bomba balística de 25 bars. Una vez alcanzada la presión, se cerró la válvula de paso y se ajustó el indicador del galvanómetro a cero con ayuda primero del ajuste grueso y posteriormente con el dispositivo de ajuste fino. Se verificó que las condiciones anteriores se mantuvieran por aproximadamente 10 segundos y se oprimió el botón de ignición.

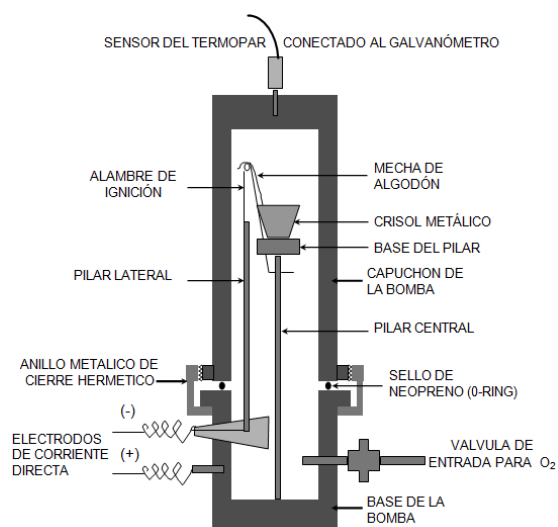


Figura 15. Diagrama esquemático de bomba balística

Llevada a cabo la combustión indicado por un máximo en la lectura del galvanómetro, se tomaron exactamente 3 minutos, después de los cuales se midió la lectura obtenida en el galvanómetro, y es directamente proporcional al calor liberado en la combustión. Tomada la lectura del galvanómetro, se abrió la válvula de salida de los gases de combustión, se desconectó el sensor del termopar y una vez liberados por completo los gases de combustión, se quitó el capuchón de la bomba girando el anillo metálico en sentido inverso al cierre. Por último, se cerró la válvula de liberación de gases y se atemperó el capuchón de la bomba en un baño de agua fría hasta temperatura ambiente para realizar una nueva determinación. Se realizó la determinación mínimo por triplicado para cada muestra.

Cálculos:

Para calcular la densidad energética de la muestra, es necesario contar con una curva de calibración, para lo cual se realizó la combustión de diferentes pesos de ácido benzoico **Tabla 17** y anotó la respectiva lectura obtenida de la escala del galvanómetro. Una vez obtenidas las lecturas, se convirtió los gramos de ácido benzoico de cada punto de la curva en kJ, para lo cual se utilizó el valor de certificación del proveedor.

Tabla 17- Lecturas para la elaboración de la curva patrón de Ácido Benzoico.

Ác. Benzoico (g)	Densidad energética (kJ)	Lectura
0.1536	4.0633	2.275
0.3098	8.1954	4.150
0.5242	13.8672	7.300
0.6183	16.3565	8.500
0.7138	18.8829	9.600

Con los datos anteriores se trazó la curva de calibración **Figura 15** de contenido calórico con la cual se pudo obtener por interpolación la densidad energética de la muestra en el crisol.

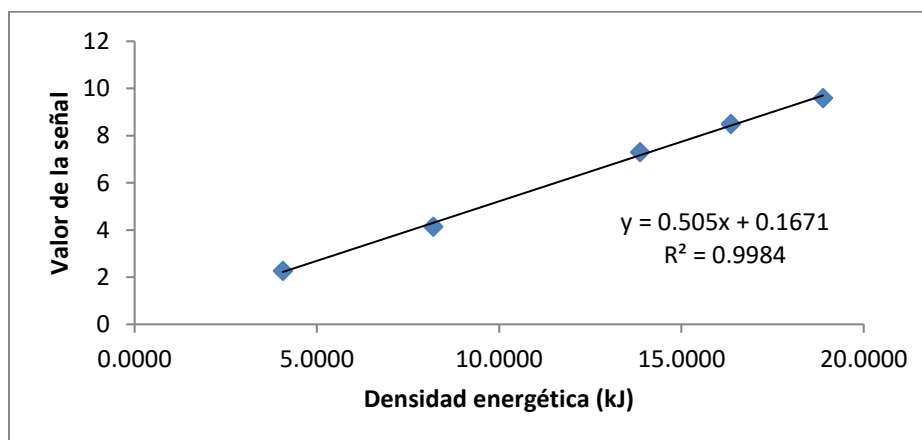


Figura 16. Curva patrón de ácido benzoico

La densidad energética de las heces y las dietas se calcularon con la fórmula siguiente:

$$\text{Densidad energética (kJ) / g de muestra} = \frac{\text{Densidad energética por interpolación (kJ)}}{\text{Peso de la muestra (g)}}$$

Una vez obtenido el valor de densidad energética tanto en las dietas como en las heces, se calculó el porcentaje de energía digerible mediante el siguiente algoritmo:

$$\%ED = \frac{E_i - E_f}{E_i} * 100$$

En donde:

E_i = peso alimento ingerido (g)* densidad energética dieta (kJ/g)

E_f = peso heces (g)* densidad energética dieta (kJ/g)

9.2 FORMULACIÓN DE DIETAS

Tabla 18- Composición de dietas utilizadas en el bioensayo (g/100 g de dieta)

Materia prima	Dietas (g/100 g)			
	Referencia	Oaxaca	Michoacán	Puebla
Caseína (94.3%)	11.8	-----	-----	-----
Moringa Oaxaca	-----	35.92	-----	-----
Moringa Michoacán	-----	-----	47.82	-----
Moringa Puebla	-----	-----	-----	36.09
Sacarosa	22.0	16.93	14.20	16.36
Glucosa	19.0	14.62	12.27	14.13
Dextrina	25.0	16.29	13.41	17.38
Manteca vegetal	8.0	6.76	6.23	6.65
Aceite de maíz	6.0	5.08	4.67	4.99
Mezcla de sales	4.0	2.0	2.0	2.0
Mezcla de vitaminas	2.0	2.0	2.0	2.0
Colina (50% p/v)	0.4	0.4	0.4	0.4
Celulosa	1.8	-----	-----	-----

