



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN BROMATOLÓGICA COMPLEMENTADA Y DETERMINACIÓN
DE FACTORES TÓXICOS PRESENTES EN DOS VARIEDADES DE VERDOLAGA
(*Portulaca oleracea* L.) CRUDA Y COCIDA.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

JURASSI LUNA OSUNA



CIUDAD DE MÉXICO

2018



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: Q.F.B. JUAN DIEGO ORTIZ PALMA PÉREZ

SECRETARIA: M. EN C. ARGELIA SÁNCHEZ CHINCHILLAS

1er. SUPLENTE: M. EN C. TANIA GÓMEZ SIERRA

2° SUPLENTE: DRA. SOFÍA MORÁN RAMOS

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

SE DESARROLLÓ EN EL ANEXO DE LOS LABORATORIOS 4B Y 4C DEL EDIFICIO A.

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA: _____

M. EN C. BERNARDO LUCAS FLORENTINO

SUPERVISOR TÉCNICO: _____

DR. ROBERT ARTHUR BYE BOETTLER

SUSTENTANTE: _____

JURASSI LUNA OSUNA

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. OBJETIVOS.....	4
4. GENERALIDADES.....	6
4.1. Alimento.....	6
4.2. Quelites.....	7
4.3. <i>Portulaca oleracea</i>	8
4.4. Composición bromatológica.....	9
4.4.1. Análisis bromatológico.....	9
4.4.1.1. Agua.....	10
4.4.1.2. Grasa	10
4.4.1.3. Fibra cruda.....	11
4.4.1.4. Cenizas.....	11
4.4.1.5. Proteínas	12
4.4.1.6. Hidratos de carbono.....	12
4.4.2. Complementación bromatológica.....	13
4.4.2.1. Digestibilidad proteínica <i>in vitro</i>	13
4.4.2.2. Vitamina C.....	14
4.4.2.3. Calcio.....	15
4.4.2.4. Hierro.....	15
4.4.2.5. Zinc.....	16
4.4.2.6. Cobre.....	16
4.5. Factores tóxicos.....	17
4.5.1. Agentes antinutrimientales.....	17
4.5.1.1. Oxalatos.....	17
4.5.1.2. Fitatos.....	18
4.5.2. Agente tóxico.....	19
4.5.2.1. Nitratos.....	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
5.1. Obtención y preparación del material biológico.....	21
5.2. Determinación de humedad original.....	22
5.3. Análisis bromatológico.....	22
5.3.1. Humedad analítica.....	23

5.3.2. Grasa cruda.....	23
5.3.3. Fibra cruda.....	25
5.3.4. Cenizas.....	26
5.3.5. Proteína cruda.....	27
5.3.6. Hidratos de carbono.....	28
5.4. Complementación bromatológica.....	29
5.4.1. Digestibilidad proteínica <i>in vitro</i>	29
5.4.2. Determinación de nutrientes inorgánicos.....	30
5.4.3. Vitamina C.....	31
5.5. Factores tóxicos.....	32
5.5.1. Agentes antinutrientales.....	32
5.5.1.1. Oxalatos.....	32
5.5.1.2. Fitatos.....	35
5.5.2. Agente tóxico.....	37
5.5.2.1. Nitratos.....	37
5.6. Análisis estadístico.....	39
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
6.1. Análisis bromatológico.....	40
6.2. Complementación bromatológica.....	44
6.2.1. Digestibilidad proteínica <i>in vitro</i>	44
6.2.2. Determinación de nutrientes inorgánicos.....	44
6.2.3. Vitamina C.....	46
6.3. Factores tóxicos.....	46
6.3.1. Agentes antinutrientales.....	47
6.3.1.1. Oxalatos.....	47
6.3.1.2. Fitatos.....	48
6.3.2. Agente tóxico.....	49
6.3.2.1. Nitratos.....	49
7. CONCLUSIONES.....	51
8. BIBLIOGRAFÍA.....	52
9. BANCO DE IMÁGENES.....	55

1. RESUMEN

La verdolaga es una hierba comestible de amplia extensión en México. Se desarrolla bien en climas cálidos y templados, crece como maleza y sus semillas permanecen latentes tras largos periodos. Se sabe que su forma de consumo típico es tras someterla a cocción, pero se ha popularizado la idea de consumirla en crudo con el fin de aprovechar al máximo sus aportaciones nutrimentales. Durante el desarrollo de este proyecto se caracterizaron dos variedades de verdolaga en dos condiciones: cruda y sometida al tratamiento convencional de preparación como es la cocción, con el fin de corroborar información previa acerca de esta planta en crudo y aportar más datos en lo referente a los componentes de la planta después de someterse a cocción. Hay estudios que señalan a *Portulaca oleracea* L. como un sustrato vegetal benéfico, pues es una importante fuente de sustancias bioactivas, antioxidantes, proteína y nutrimentos inorgánicos. Sin embargo también aporta sustancias tóxicas, principalmente oxalatos, fitatos y nitratos. Todos estos componentes de la verdolaga sufren cambios derivados de la cocción y se propuso darles seguimiento.

El Dr. Robert Bye y colaboradores facilitaron ambas variedades mexicanas de *Portulaca oleracea*; provenientes de Nepantla, Estado de México y Mixquic, delegación Tláhuac, Ciudad de México. El análisis bromatológico determinó que la cocción tuvo efecto significativo en el contenido de grasa cruda, la cual aumentó tras la cocción, y las cenizas, que disminuyeron. El cambio reportado sobre los hidratos de carbono se observó debido a las diferencias en las cenizas principalmente. Los demás componentes analizados, fibra cruda y proteína, no presentaron diferencias significativas entre las formas cruda y cocida. La disponibilidad de proteína se encontró alta, cercana al 71% y se afectó positivamente tras la cocción, aumentando en una unidad. El contenido de nutrimentos inorgánicos fue alto; sin embargo el efecto de la cocción sobre los nutrimentos inorgánicos no fue contundente. La exposición, sobre todo al calor, de las muestras tuvo resultados negativos en el contenido de Vitamina C la cual se oxidó casi por completo, mientras que en crudo se encontraron altas concentraciones de ácido ascórbico. Los factores tóxicos evaluados, que con anterioridad se señalaron como altos en verdolagas, se encontraron de nuevo altos incluso por encima de lo reportado en otros estudios. El efecto de la cocción fue significativo para los tres factores tóxicos: oxalatos, fitatos y nitratos. Oxalatos y fitatos tuvieron una menor reducción en sus cantidades por efecto de la cocción que los nitratos; estos disminuyeron en gran medida, debido al tratamiento térmico y a la exposición en medio acuoso. Pese a la cocción aplicada, las verdolagas se mantuvieron con concentraciones importantes de tóxicos, lo que las vuelve, entre otros, malas fuentes de nutrimentos inorgánicos. Sin embargo, si se consumen de manera moderada, puede tolerarse su ingesta cocidas, a reserva de la dieta complementaria.

2. INTRODUCCIÓN

Desde sus inicios el hombre ha sustentado una lucha continua por satisfacer sus necesidades primarias, dentro de las cuales destaca la alimentación, actividad que seguirá siendo una de las principales del presente y futuro. En México, la dieta de aproximadamente el 70% de la población está fundamentada en alimentos de origen vegetal. Sin embargo, especies no convencionales han quedado marginadas y ahora son subvaloradas, aunque muchas de ellas posean un gran potencial alimenticio (1).

México es un gran centro de diversificación vegetal. Es de los más importantes centros de domesticación vegetal y es rico en climas y suelos. La producción agrícola no tiene ninguna desventaja natural; sin embargo, la globalización, la exigencia en tiempo y la disponibilidad de alimentos procesados han promovido que el consumo de alimentos de origen natural disminuya (2).

Se sabe que la mejor fuente proteica es la de origen animal. Sin embargo no todas las poblaciones tienen acceso a estos alimentos, por lo que buscar alternativas se vuelve una necesidad imperante. La deficiencia en el aporte energético-proteínico es uno de los mayores problemas del país y requiere que se realicen acciones que aporten alternativas a la problemática (3).

Portulaca oleracea L., o verdolaga, es un quelite sumamente versátil. De fácil cultivo, crece bajo condiciones en las que otras hortalizas no se desarrollan y sus semillas se mantienen latentes por largos periodos en condiciones extremas (4)

Actualmente hay estudios que la señalan como hierba medicinal, como coadyuvante en el tratamiento de enfermedades degenerativas, crónicas o en heridas (5 y 6).

La creciente ola de consciencia que busca aumentar el consumo de alimentos de origen natural tan poco procesados como sea posible ha impulsado a algunas poblaciones a consumir este tipo de alimentos de origen vegetal en forma cruda, con el fin de aprovechar al máximo sus aportaciones nutrimentales. Sin embargo no hay que perder de vista que estos alimentos suelen ser ricos tanto en nutrimentos como en factores tóxicos, e ignorarlos sólo supone un riesgo (7).

Entonces se destaca la necesidad de caracterizar estos tóxicos presentes en la planta de forma natural. Dependiendo de la cantidad y frecuencia del consumo de estos recursos vegetales, se puede presentar un efecto adverso a la salud de quien los ingiera.

Referente a lo anterior, hay un trabajo previo donde se estudiaron seis variedades de verdolagas que, si bien se encontró que son fuente de proteína y nutrimentos inorgánicos como calcio y hierro, también se corroboró la alta concentración de ácido oxálico, ácido fítico y nitratos; todos estos considerados factores tóxicos, que pueden poner en riesgo al consumidor de esta planta (8).

El trabajo que se presenta tiene la intención de observar el efecto de la cocción en las verdolagas, ya que puede tener un efecto benéfico por la disminución de los factores tóxicos mencionados, así como un efecto negativo al disminuir algún nutrimento inestable a las condiciones del tratamiento convencional.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la composición bromatológica, complementarla con análisis de digestibilidad proteínica, vitamina C y determinación de nutrimentos inorgánicos, así como medir el contenido de algunos factores tóxicos en dos variedades de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) en forma cruda y después de un tratamiento convencional (cocción).

Objetivos particulares

- ✿ Trabajar dos variedades de verdolaga lo más frescas posible; dividir cada variedad en tres partes. Someter a cocción una parte, mantener en crudo otra y liofilizar la tercera parte; posteriormente deshidratar y moler las partes, según corresponda, para obtener sus respectivas harinas.
- ✿ Realizar el análisis bromatológico a las muestras de verdolaga, según el diagrama de Weende por métodos aprobados por la AOAC, para evaluar los efectos de la cocción sobre la composición de éstos.
- ✿ Medir el contenido de algunos nutrimentos inorgánicos, en particular de hierro y calcio, tanto en las muestras crudas como cocidas; mediante espectroscopía de emisión atómica con plasma por acoplamiento inductivo (ICP-OES) para evaluar el efecto de la cocción sobre los nutrimentos inorgánicos.
- ✿ Realizar la determinación de digestibilidad proteínica *in vitro* en muestras crudas y cocidas, mediante el método aprobado por la AOAC, para evaluar el efecto de la cocción sobre este valor.
- ✿ Medir el contenido de vitamina C, en las muestras crudas y liofilizadas, según el método aprobado por la AOAC para evaluar los efectos de la cocción sobre su concentración.
- ✿ Medir el contenido de ácido oxálico en muestras crudas y cocidas, mediante el método aprobado por la AOAC, con el fin de evaluar los efectos de la cocción sobre este factor tóxico.
- ✿ Medir el contenido de ácido fítico en muestras crudas y cocidas, mediante un método validado, para evaluar los efectos de la cocción sobre este factor tóxico.
- ✿ Medir el contenido de nitratos en muestras crudas y cocidas, mediante un método

validado, para evaluar los efectos de la cocción sobre este factor tóxico.

- ✿ Comparar los resultados de los análisis de ambas condiciones con el fin de definir, de acuerdo con el balance de riesgo-beneficio, cual alternativa de consumo de la verdolaga es más segura para un adulto promedio.

4. GENERALIDADES

4.1. Alimento

Desde sus inicios, la principal preocupación de los organismos vivos, sin limitarnos a los humanos, ha sido la alimentación, encontrar alguna materia de la cual pudieran obtener aquello que les sea necesario para realizar sus funciones naturales; algo que les aporte las sustancias que necesita su organismo, lo que les dé nutrimentos, en resumen, un alimento.

Un alimento es una mezcla compleja de componentes, que es susceptible de ser ingerido y digerido. Cuyos atributos lo hacen apto y agradable al consumo. Se constituye de una mezcla de nutrimentos, que cumplen determinadas funciones en el organismo, componentes sensoriales y otros (9).

Este almacén dinámico de nutrimentos puede ser de origen animal o vegetal, natural o sintético. Dicho aporte nutricio es necesario para los procesos metabólicos y fisiológicos de los seres vivos, como el crecimiento, reparación y desarrollo de nuevos tejidos, conducción de impulsos nerviosos y regulación de procesos varios; ya que aportará componentes o metabolitos precursores de componentes necesarios, así como la energía para que los procesos se lleven a cabo.

Retomando el concepto de nutrimentos, estas son sustancias que aportan algo de utilidad al organismo que los consume, ya sea energía, componentes celulares o precursores de componentes, cofactores, etc. De manera muy general, se distinguen dos categorías principales: los macro y los micro nutrimentos. Las proteínas, grasas e hidratos de carbono conforman los macronutrimentos, debido a que son de éstos de los que se compone mayormente la dieta de organismos superiores; y tras su metabolismo aportan importantes cantidades energéticas; las proteínas e hidratos de carbono aportan 4 kcal/g y las grasas aportan 9 kcal/g (10).

Los nutrimentos inorgánicos y vitaminas son considerados micronutrimentos, debido a que el organismo humano requiere pocas cantidades de estos, y su utilidad es, por ejemplo, como cofactores necesarios en el metabolismo; así mismo, algunas vitaminas pueden funcionar como antioxidantes de origen natural y reguladores de procesos fisiológicos (11).

La alimentación es la actividad por la cual el alimento es proporcionado al organismo. Es un proceso voluntario y generalmente consciente. Se fundamenta en la selección del alimento, preparación e ingestión; y depende de la disponibilidad tanto económica como material del alimento, de factores psicosociales como la educación, las costumbres, gustos personales, etc. (10). La alimentación no sólo sirve para satisfacer una necesidad fisiológica y psíquica, también cumple su papel social y cultural, atribuyéndole rituales de socialización y sensaciones placenteras (12).

4.2. Quelites

Quelite proviene del término *quilitl*, término prehispánico con el cual se hacía referencia a una planta tierna comestible.

En la época prehispánica, el consumo de quelites estaba extendido, principalmente porque se sabía de sus aportaciones a la dieta, tanto nutrimental como sensorialmente. Pero la llegada de los españoles fue tan influyente que propició la aculturación y satanización de las costumbres, además de la inserción de otras plantas ya domesticadas por ellos, lo que derivó en que el consumo de estas importantes plantas, los quelites, fue disminuyendo hasta la actualidad (13).

Según Sahagún, los quelites formaban parte de la dieta cotidiana prehispánica, se producían en agroecosistemas, se consumían crudos o cocidos y en una etapa tierna de desarrollo, buscando exaltar sus características sensoriales (14).

Actualmente, los quelites son un componente marginal de la dieta mexicana, debido, principalmente, a que el conocimiento acerca de los beneficios de estas plantas, como su importante aporte nutricional y como coadyuvante en el tratamiento de ciertos trastornos son desconocidos (15 y 16).

Así mismo, el consumo de quelites se justifica en el aporte que dan sus componentes, así como por la facilidad con la que se cultivan. Los quelites están compuestos de forma no distinta a otros alimentos de origen vegetal: su contenido de agua es superior al 75% y los sólidos restantes están conformados por hidratos de carbono, proteína, fibra y una pequeña proporción de lípidos, nutrimentos inorgánicos y vitaminas. Hay estudios que señalan que parte de la pequeña fracción lipídica de los quelites está conformada por polifenoles, ácidos grasos insaturados y flavonoides (17). En la actualidad se sabe que la fibra funciona como coadyuvante para el control de obesidad y trastornos gastrointestinales, y que los lípidos anteriormente mencionados y algunas vitaminas funcionan como antioxidantes. En adición, si consideramos los problemas de desnutrición que sufre México, los quelites también aportan importantes cantidades de proteínas (15 y 16).

Pese a todos estos beneficios, una de las principales causas del decremento en el consumo de estos recursos alimenticios vegetales es la amplia desinformación acerca de su composición, la discriminación también tiene un papel muy importante en dicho decremento. Tras la conquista, los pobladores que eran observados alimentándose de yerbas eran discriminados y tachados de bestias. Así mismo, la actitud derogatoria se vio extendida hasta las personas que cultivaban dichos alimentos. Considerando todo lo anterior, se hace expresa la necesidad de rescatar a los quelites que han quedado en el olvido (15-17).

4.3. *Portulaca oleracea* L.

La verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) es una planta comestible que se distribuye en zonas templadas y tropicales. Su origen es incierto, pero se reporta desde hace 4000 años y ya era común en el antiguo Imperio Romano. Actualmente puede encontrarse en Europa, África, Australia, Asia y principalmente América, se considera que México es su centro de diversidad. Pertenece a la familia Portulacaceae, que es una pequeña familia con 21 géneros y 580 especies (4).

Es una planta anual, herbácea, suculenta, rastrera, carnosa, erecta o decumbente de hasta 30 cm de alto. Sus tallos son cilíndricos, de 2 a 3 mm de diámetro, verdes o rojizos, suaves, glabros, ramificados radialmente. Hojas planas, alternas, de forma ovalada o espatuladas, ápice redondeado o trunco y base cuneada; de 0.5 a 3 cm de largo y 0.2 a 1.5 cm de ancho; verdes o verde-rojizas. La floración inicia de mediados de mayo a septiembre, produciendo flores sésiles, solitarias o agrupadas de hasta 5 por tallo, de 5 pétalos que normalmente abren en días calurosos y soleados; su color es normalmente amarillo, pero pueden encontrarse naranja, morado o rosa tenue. Sus frutos son cápsulas redondas u ovaladas de 4 a 8 mm de largo; abren por la mitad para liberar las semillas, que son negras de hasta 1 mm de ancho, circulares u ovaladas, de color negro o café (4).

Debido a la variedad de colores en sus flores, algunas especies de *Portulaca* se mantienen como plantas ornamentales. Son hermafroditas y sésiles, pero tiene baja producción de néctar, lo cual merma la polinización por insectos. Es probablemente debido a esto que la planta evolucionó y se reproduce por auto fertilización; las semillas forman una cápsula con tapa que sólo abre en condiciones óptimas. Esto se manifiesta en la longevidad y resistencia de las semillas, hasta 19 años en seco y 40 años enterradas en suelo no óptimo, aun manteniendo su capacidad de germinación (18).

Es una planta cosmopolita de alta competitividad que prospera en ambientes abiertos y perturbados por actividad humana. Tiene un ciclo de vida corto, si la planta se encuentra en zonas donde se alcancen 25 °C en etapas tempranas del año, hay más posibilidades de que la plántula alcance la madurez reproductiva, lo que vuelve óptimos los ambientes templados y tropicales para su desarrollo. Además, al ser rastrera, es una opción para la recuperación de suelos, pues disminuye la erosión y aporta nutrimentos al suelo tras su ciclo biológico. Su alta competitividad se fundamenta en aspectos ya mencionados: su hábito de crecimiento decumbente multidireccional, latencia prolongada, auto fertilización y ciclo biológico corto; y vuelve a esta planta una preocupación para agricultores no interesados en su cultivo, pues es especialmente invasora de cultivos de hortalizas (13).

Por otra parte, se ha encontrado que la verdolaga es una de las fuentes vegetales de ácido linoléico, con aproximadamente 1%, este compuesto es útil en la prevención, control y tratamiento de enfermedades cardiovasculares. También es una importante fuente de ácido ascórbico y otros antioxidantes. Hay evidencia de su efectividad en el tratamiento de cefaleas, quemaduras, enfermedades gastrointestinales, hepatopatías, relajante muscular, antiinflamatorio, diurético. Actualmente se investiga el efecto hipoglucémico del polisacárido de la verdolaga (5, 19 y 20).

La producción nacional se centra en tres entidades principales: Baja California Norte, Morelos y Ciudad de México, de aquí las regiones Xochimilco-San Gregorio-Mixquic. Debido a que la población está más informada acerca de los beneficios de la verdolaga, la demanda de este recurso ha incrementado en los recientes años. En respuesta a esta demanda, los productores han optado por distintos manejos, por siembra directa o almácigo, en invernadero o al aire libre. Por su adaptabilidad, el rendimiento es alto. Incluso se puede encontrar a orillas de caminos, ríos y canales de riego, sin necesidad expresa de sembrarla. En la mayoría de los casos, la verdolaga cultivada tiende a ser más grande y tupida que cuando crece de manera silvestre (13).

Para la mayor parte de los consumidores, la verdolaga se ingiere después de ser sometida a un tratamiento térmico de cocción. Aunque se presentan sectores de la población que la consumen cruda o, incluso, al consumirla cocida, también consumen el agua de cocción. Hay estudios previos que la caracterizaron bromatológicamente y determinaron la toxicología básica de algunas variedades de verdolaga cruda. Como resultado se obtuvo, además de la caracterización, que la verdolaga tiene valores importantes en ciertos factores tóxicos: nitratos (5.5- 8.7 %), ácido fítico (7.9-9.4 %) y ácido oxálico (7.8-8.8 %) (8). Sin embargo, como ya se mencionó, este estudio se llevó a cabo en el recurso vegetal crudo. Entonces se hace obvio el interés en conocer si el tratamiento térmico tiene efecto sobre estos valores ya conocidos.

4.4. Composición bromatológica

4.4.1. Análisis bromatológico

El análisis proximal o análisis bromatológico, en este caso, se basa en el esquema de Weende, ya que en este tienen su fundamento legal las descripciones de alimentos mundialmente. El esquema de Weende comprende las siguientes determinaciones: humedad, proteína cruda, grasa cruda, fibra cruda, cenizas e hidratos de carbono (21).

4.4.1.1. Agua

El contenido de agua tiene efecto directo en la estabilidad de los alimentos. Al ser un medio de reacción, la presencia de humedad facilita las reacciones químicas de deterioro, ya sea endógenas del alimento o exógenas, promovidas por microorganismos externos u otros contaminantes. También, si el contenido de agua disminuye en un alimento, se concentran los sólidos presentes en este (proteínas, sales, polisacáridos, grasas, etc.) y las nuevas interacciones de dichos sólidos afectan directamente a la textura del alimento.

Considerando lo anterior, no es de extrañar que uno de los tratamientos de conservación más efectivo sea la deshidratación de los alimentos. Un alimento deshidratado intencionadamente se considera “seco” y no debe rebasar el 15% de humedad para ser considerado tal. De manera contraria, la humedad presente sería suficiente para permitir reacciones indeseadas.

En alimentos frescos como la carne y vegetales el contenido de agua va desde 60% hasta 75% o, incluso, 90% en frutas; conforme la presencia de solutos se incrementa, de manera natural o por procesamiento, se encuentran valores evidentemente menores, como 20% típico de la miel, o el apenas 4% de alimentos en polvo, como la leche (22 y 23).

4.4.1.2. Grasa

En alimentos y en el organismo humano en general se encuentran tres tipos de lípidos: triglicéridos, fosfolípidos y esteroides. Pese a que estos tres tipos tienen claras similitudes, podemos distinguir algunas diferencias importantes. Los triglicéridos son tres cadenas de ácidos grasos unidos a un glicerol; los fosfolípidos sustituyen al ácido graso del tercer carbono por una cadena fosfatada (proporcionándole carácter anfifílico) y los esteroides son anillos de carbono.

Las funciones de las grasas en el organismo son variadas y complejas. Almacenan energía en el tejido adiposo, la cual pueden proveer después si las reservas inmediatas se agotan. Son componentes o precursores de sustancias biológicamente activas como hormonas o membranas celulares. Pueden actuar como transporte para vitaminas liposolubles. Así mismo se involucran en el proceso sináptico, entre otras funciones.

La mayoría de los alimentos humanos tiene como componente graso a los triglicéridos, y esta es la forma en que más se almacenan los lípidos en el organismo humano. Algunos de los ácidos grasos componentes de los triglicéridos pueden ser usados para síntesis de sustancias necesarias para el buen funcionamiento del organismo. Los fosfolípidos son componentes esenciales en las membranas celulares, por su carácter anfifílico ayudan a regular el intercambio de metabolitos, además le aportan soporte y fluidez, según la célula lo requiera. Los esteroides son

los precursores de sustancias indispensables, como el colesterol y algunas hormonas sexuales, adrenales, así como vitamina D.

A los alimentos le confieren características sensoriales, como textura, sabor y olores; así mismo son importantes promotores del deterioro (22 y 24).

4.4.1.3. Fibra cruda

La fibra es un conjunto de polisacáridos, oligosacáridos, lignina y otros componentes de origen vegetal, que son resistentes a la hidrólisis provocada por los procesos digestivos humanos. En los alimentos, la fibra se conforma por la celulosa, hemicelulosa, gomas, peptinas y mucílagos, principalmente. De estos, la celulosa es el componente más ubicuo, al ser un polisacárido estructural de tejidos vegetales y lo que lo vuelve tan resistente a la hidrólisis es su enlace β -glucosídico.

En diversos estudios se han demostrado los efectos benéficos de la fibra para el organismo humano. Al masticarse e iniciar el proceso de digestión, la fibra forma capas o complejos de alta viscosidad y resistencia, lo cual alarga el periodo que el alimento ingerido al mismo tiempo que la fibra se somete al proceso digestivo, aumentando su eficiencia. Con el mismo fundamento, al prolongar la estadía del bolo alimenticio en el estómago, se promueve la sensación de saciedad temprana. Es esta misma viscosidad y retención de agua la que promueve mejor movilidad dentro del intestino y aumenta la masa fecal, ayudando en afecciones gastrointestinales.

También se han observado resultados positivos al estudiar los efectos de la fibra en enfermedades cardiovasculares y diabetes.

Aunque no todo es beneficio en la fibra. Se ha observado que componentes intrínsecos de la fibra se ven directa o indirectamente involucrados en el secuestro de nutrimentos inorgánicos, la ingesta excesiva de fibra puede provocar obstrucción intestinal y fermentación microbiana, la única forma en la que el organismo humano puede aprovechar activamente a la fibra, produce volúmenes importantes de gases y malestar. Pero es precisamente esta fermentación microbiana la que libera algunos de los nutrimentos inorgánicos secuestrados (25).

4.4.1.4. Cenizas

Las cenizas son el remanente de cualquier material después de incinerarse. En este proceso se elimina el agua presente y toda la materia de origen orgánico, permaneciendo solo metales, sales y trazas de otros componentes inorgánicos.

En alimentos, las cenizas se consideran exponentes de los nutrimentos inorgánicos presentes, generalmente calcio, magnesio, potasio, sodio; en menor cantidad aluminio, hierro, cobre, zinc; incluso arsénico (21).

4.4.1.5. Proteínas

Las proteínas desempeñan funciones biológicas indispensables como la producción, reparación y mantenimiento de tejidos, síntesis de enzimas y hormonas, se involucran en el balance de fluidos y equilibrio ácido-base, son importantes componentes del sistema inmune (anticuerpos); incluso, bajo condiciones específicas de carencia, pueden transformarse en energía. También son asistentes en el transporte y almacenamiento de nutrimentos (como en el caso de las lipoproteínas y la ferritina).

Conociendo algunas de las funciones más importantes de las proteínas, se justifica la necesidad de introducirlas en la dieta.

Los componentes básicos de las proteínas son los aminoácidos. Un aminoácido está compuesto por un carbono central, unido a un grupo amino, un carboxilo, hidrogeno y una cadena lateral que es la que le da identidad al aminoácido. Se considera que en el metabolismo humano se ven involucrados 20 aminoácidos, de los cuales 10 pueden ser sintetizados por el organismo y 10 no, los que no pueden ser sintetizados por el organismo son llamados indispensables y es imperante consumirlos en la dieta.

Sin embargo, en los alimentos no suelen encontrarse aminoácidos en solitario; estos vienen unidos de a pocos por enlaces peptídicos, a este conjunto de aminoácidos se le denomina péptido. Cadenas peptídicas entrelazadas y torcidas sobre sí mismas forman las proteínas, y es así como las hallamos en los alimentos.

Tras su ingesta, las proteínas son metabolizadas durante la digestión y fraccionadas, los metabolitos resultantes son los que ingresan a otros procesos metabólicos para que el organismo los utilice como sea conveniente. Entonces, la calidad proteínica de los alimentos depende mucho de los aminoácidos que le conformen, debido a que la síntesis de componentes de origen proteico, ya dentro del organismo, se ve limitada por el material que ingresa y del cual se dispone para metabolizar. Aunque se sabe que la síntesis de componentes metabólicos está regulada por la genética del organismo, en individuos sanos la mayor limitante será la calidad proteínica de su alimentación.

Entonces, no basta con cuidar la alta ingesta de proteínas, sino también el adecuado y variado aporte de aminoácidos. Los alimentos de origen animal tienden a componerse de los aminoácidos indispensables de tal forma que hacen ver a los productos vegetales pobres en estos (22 y 24).

4.4.1.6. Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono, también denominados sacáridos, son la fuente energética más abundante en una dieta humana sana; y son la fuente preferida para células

nerviosas y cerebrales. Son moléculas conformadas por carbono, hidrogeno y oxígeno únicamente. A grandes rasgos se pueden distinguir tres clasificaciones:

- Monosacáridos como la fructosa, glucosa, ribosa, etc. Estos son los hidratos de carbono predominantes en productos vegetales. Se distinguen entre ellos por sus distintas distribuciones en el espacio en su forma cíclica. Aportan, además de la evidente energía, características sensoriales. La glucosa es el hidrato de carbono prioritario, todos los hidratos de carbono ingeridos que puedan ser metabolizados se convertirán en glucosa si su función es aportar energía inmediata.
- Oligosacáridos: disacáridos como lactosa y sucrosa, también aportan dulzor. Son oligosacáridos si se presentan de 3 a 10 monosacáridos.
- Polisacáridos: más de 10 monosacáridos. Celulosa (componente común de sostén vegetal), glucógeno (forma en la que los hidratos de carbono se almacenan en el organismo humano), almidón, etc.

La capacidad de metabolizar los hidratos de carbono depende del tipo de enlace con el que estén unidos sus monosacáridos. Los enlaces α -glucosídicos son sencillos de disociar por el metabolismo, sin embargo, los β -glucosídicos son difíciles o incluso imposibles de digerir; de ahí la aplicación de los oligo y polisacáridos como fibra dietética. La glucosa y monosacáridos de la ingesta se transportan al hígado donde se interconvierten, a glucosa y se trasladan a tejidos y células, o en glucógeno si van a almacenarse (22, 24 y 25).

4.4.2. Complementación bromatológica

Además de la información del análisis bromatológico, se realizaron algunas determinaciones más: digestibilidad proteínica *in vitro*, determinación de vitamina C y cuantificación de algunos nutrimentos inorgánicos (Ca, Fe, Zn y Cu), para ampliar la información de las muestras y condiciones analizadas.

4.4.2.1. Digestibilidad proteínica *in vitro*

La digestión es un conjunto de reacciones químicas que, en términos muy simples, descompone a los alimentos para propiciar que el organismo se quede y utilice los componentes que necesita. Pero es un proceso metabólico y, como tal, está controlado por el sistema nervioso autónomo; lo que implica que no se tiene control consciente sobre él. Esto se refleja en que la digestión no tiene un rendimiento perfecto; no todos los componentes de nuestros alimentos lograrán descomponerse en sus formas útiles para el organismo.

Las proteínas son uno de los más críticos ejemplos. No todas las proteínas están disponibles tras su correspondiente digestión y su absorción, consecuentemente, no será completa. Se han hecho estudios y ahora se sabe que la proteína de origen animal suele tener mayor rendimiento, en cuanto a digestión y absorción se refiere, que las de origen vegetal. Más aún, ya que los alimentos de origen vegetal suelen ser ricos en factores tóxicos que tienden a interferir con la asimilación de nutrimentos.

La digestibilidad proteínica *in vitro* se refiere a un proceso digestivo, cuyo rendimiento es monitoreado al final del proceso, que se lleva a cabo no en un organismo vivo, sino en un entorno con condiciones específicas y controladas. Esta determinación da información acerca de cuánta de la proteína presente en la muestra analizada es aprovechada en un proceso digestivo similar al humano, con la ventaja de no ser necesario un ensayo biológico (24, 26 y 27).

Es una digestión artificial de la muestra en un medio multienzimático, emulando un medio muy similar a la digestión humana. Dicha digestión, somete a la muestra a proteólisis, liberando iones $[H^+]$ por la ruptura del enlace peptídico, lo cual modifica el pH. Tras obtener el valor correspondiente a una muestra de referencia (Caseína), se realiza la determinación en la muestra y por determinación del pH con una precisión de centésimas se obtiene el resultado. Se asume la correlación entre la disminución de pH con el aumento de digestibilidad de la proteína (26 y 37).

4.4.2.2. Vitamina C

El ácido ascórbico, o Vitamina C, es una vitamina hidrosoluble comúnmente encontrada en alimentos de origen vegetal (con mayor presencia en alimentos ácidos), en alimentos de origen animal su presencia es mínima o nula. Y tiene múltiples funciones, entre las que destacan:

- Interviene en la síntesis de colágeno, ADN, sales biliares, serotonina y carnitina.
- Es antioxidante (protege de daño oxidativo a células y metabolitos; ayuda a regenerar otras vitaminas, como la vitamina E, y enfermedades cardiovasculares)
- Promueve la absorción de hierro.

Al ser hidrosoluble, cualquier exceso es excretado por la orina; así que prácticamente no hay riesgo de hipervitaminosis.

Tiene resistencia cuando se encuentra en medios ácidos, por lo cual su presencia en alimentos de bajos pH es mayor. Sin embargo, se trata de una molécula muy inestable: pH neutro o alcalino, presencia de oxígeno, exposición a la luz y al calor pueden oxidar al ácido ascórbico. De la oxidación de este compuesto resulta el ácido dehidroascórbico y este ya no posee propiedades antioxidantes, como se puede observar en la figura 1. Aunque el ácido dehidroascórbico puede ser reducido

de nuevo con intervención del glutatión, esta no es una reacción que se dé en una matriz alimentaria. Particularmente, las pérdidas de ácido ascórbico por tratamientos térmicos, como la cocción, se consideran hasta del 100% (22-24).

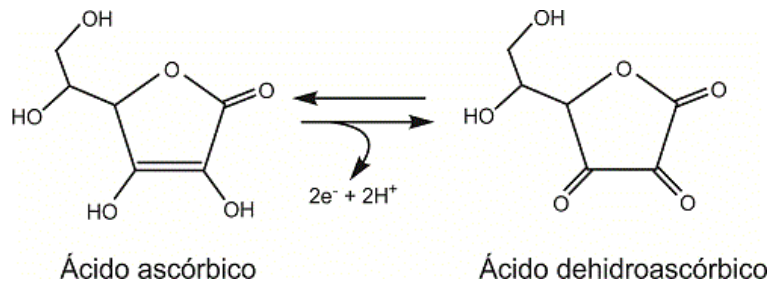


Figura 1. Estructura del ácido *L*-ascórbico (vitamina C) y reacción de oxidación de la que resulta el ácido dehidroascórbico.

4.4.2.3. Calcio

Representa el 2% del peso corporal, el calcio es el nutriente inorgánico más abundante en el cuerpo humano. Las mayores fuentes alimenticias de calcio para el ser humano son los productos lácteos y las plantas de hoja verde; y se absorbe mayormente en el duodeno.

Prácticamente todo el calcio se encuentra en los tejidos de sostén del organismo, en forma de cristales, dándole forma y elasticidad característica a huesos, cartílago y dientes. Sólo el 1%, aproximadamente, del calcio se encuentra en tejido suave, sangre, lumen, etc. Pero ese calcio tiene funciones bioquímicas y fisiológicas tan importantes que, si su concentración se ve mermada por cualquier circunstancia, el calcio de osteocitos migrará hasta donde sea requerido.

Entre sus funciones se encuentran:

- Ayuda al balance ácido-base.
- Estimula la excreción de neurotransmisores.
- Asiste en la contracción muscular.
- Regula excreción y función hormonales y enzimáticas.

Hay factores naturales presentes en los alimentos que pueden afectar la absorción de calcio. La presencia de otros metales como hierro, zinc, magnesio, además de fósforo, puede interferir con la absorción de todos los nutrientes inorgánicos de la ingesta. Otros factores presentes en la dieta, sobre todo en los vegetales de hoja verde son los fitatos y oxalatos, que merman su absorción en el intestino (24).

4.4.2.4. Hierro

El hierro es un nutriente inorgánico traza del organismo. Sin embargo, pese a la baja cantidad requerida por el organismo, el hierro es el nutriente que presenta los mayores índices de deficiencia a nivel mundial.

El hierro es necesario para el organismo ya que tiene funciones importantes, como: compone proteínas acarreadoras de oxígeno, hemoglobina y mioglobina; se involucra en el intercambio de electrones en citocromos y enzimas antioxidantes, contrarrestando la actividad de radicales libres; es cofactor de enzimas involucradas en el metabolismo de aminoácidos y lípidos; entre otras.

Hay dos estados en los que se puede presentar el hierro en los alimentos: la forma hemo y la forma no hemo.

La forma hemo se encuentra en alimentos de origen animal. Se trata del ion ferroso (Fe^{2+}), asociado a la hemoglobina y mioglobina; tiene absorción preferente.

La forma no hemo se encuentra en alimentos de origen tanto vegetal principalmente, como animal. Este estado (Fe^{3+}) tiende a formar compuestos insolubles con sustancias naturales de la matriz alimentaria como fitatos, polifenoles, oxalatos, fosfatos, fibra y calcio, lo que lo vuelve indigerible. Este estado, al ser ingerido, puede reducirse por acción de ácidos digestivos, pepsina o incluso vitamina C, a su forma ferrosa.

Pequeñas cantidades de hierro se almacenan en dos posibles formas: ferritina y hemosiderina, y estas proteínas pueden transportarse hasta donde el hierro sea requerido antes de liberarlo (24).

4.4.2.5. Zinc

El zinc es nutrimento inorgánico traza del organismo. Sus principales fuentes son las leguminosas y la carne roja. Tiene funciones enzimáticas, estructurales y reguladoras.

Como parte de sus funciones enzimáticas se puede destacar su actividad como cofactor en el metabolismo del alcohol, digestión, osteogénesis y glucólisis. Estructuralmente, ayuda a mantener la integridad a cientos de proteínas, incluida la hemoglobina; así mismo forma parte de los “dedos de zinc”, estructuras proteicas que se involucran en la expresión y regulación genética, estabiliza a la vitamina A en la retina, regula la formación de receptores para vitamina D y hormona tiroidea, además activa algunas células del sistema inmune.

Al igual que los otros nutrimentos inorgánicos mencionados anteriormente, el zinc suele acompañarse de otros factores dentro de su matriz alimentaria que disminuyen su absorción: hierro no hemo, calcio, fitatos y fibra son los más importantes (24).

4.4.2.6. Cobre

El cobre es un nutrimento inorgánico ampliamente distribuido en los alimentos. Aunado a esto, las cantidades requeridas por el organismo son trazas, por lo que su deficiencia es rara. Una de sus funciones más ampliamente conocida es

formando parte de la ferroxidasa I. Sin embargo, el cobre también es importante cofactor de rutas metabólicas de producción energética, producción de tejidos conectivos (como colágeno y elastina), forma parte de la enzima superóxido-dismutasa y regula neurotransmisores, especialmente la serotonina.

Dietas altas en zinc (naturalmente o por suplementos) y de hierro en cualquier forma, son los principales antagonistas en la absorción del cobre (24).

4.5. Factores tóxicos

Un alimento se caracteriza por ser una matriz compleja de componentes que pueden ser ingeridos y que son susceptibles a digestión, tras la cual aportarán nutrimentos, principalmente. Sin embargo un alimento también puede contener sustancias que no sólo no sean aprovechables por el organismo humano, sino que además perjudiquen al individuo. Estas sustancias se conocen como factores tóxicos.

Si el factor tóxico tiene un alto grado de toxicidad y posee la capacidad de producir una anomalía fisiológica o anatómica se reconoce como agente tóxico; causa daño a corto, mediano o largo plazo sin posibilidad de suplementarse y sólo pueden atenuarse con el antídoto específico (7).

Por otro lado, si el factor tóxico puede interferir el metabolismo de algún nutrimento, afecta la biodisponibilidad, absorción, etc., se denomina agente antinutricional y es posible atenuar sus efectos mediante la suplementación alimenticia del nutrimento en cuestión.

Los factores tóxicos pueden ser causados por alguna alteración en el alimento, pero generalmente se encuentran de manera natural en él, como parte de su propio metabolismo. En el caso de las plantas, estas producen sustancias tóxicas para los humanos que les sirve como mecanismos de defensa contra sus depredadores o como mecanismo de conservación (7).

4.5.1. Agentes antinutricionales

4.5.1.1. Oxalatos

Los oxalatos son componentes comunes en las plantas de hoja verde. Pueden encontrarse en forma de ácido libre, sales solubles de potasio, sodio y magnesio, y sales insolubles de hierro y calcio. En las plantas regulan el balance de iones, son factores estructurales y dan propiedades de defensa (28).

Las plantas cultivadas en condiciones de altas temperaturas y exposición a luz, condiciones propias de cultivos de primavera-verano, tienen mayor concentración de oxalatos que aquellas plantas cultivadas bajo condiciones de obscuridad y menor temperatura. La presencia de oxalatos se concentra en hojas y semillas, principalmente, dejando bajas cantidades en tallos. Así mismo, debido a que es un compuesto que se acumula en dichos tejidos, la concentración de oxalatos en plantas aumenta con su edad (29).

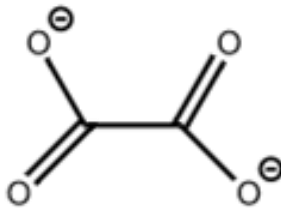


Figura 2. Estructura del oxalato.

Los oxalatos son considerados un factor antinutricional debido a su capacidad secuestradora para calcio principalmente, por la carga negativa de este compuesto que se representa según la figura 2. Disminuyen la concentración plasmática de calcio directamente y merma la biodisponibilidad de éste. Las sales solubles y el ácido libre se excretan por la orina; sin embargo, forma sales insolubles con

calcio que tienden a precipitarse en canales del tracto urinario, promoviendo la formación de cálculos renales y otras glomerulopatías (30).

Los efectos adversos de los oxalatos deben considerarse según la relación oxalato/calcio. En miliequivalentes, un alimento con valor de 1 o mayor tiene severos efectos sobre la concentración de calcio. Con coeficientes menores de 1, los oxalatos presentes no suponen un riesgo para la biodisponibilidad de calcio (31).

4.5.1.2. Fitatos

Los fitatos son sales de potasio, magnesio y calcio que se encuentra en alimentos de origen vegetal y animal, y tiende a acumularse en las semillas de plantas. El fitato es reconocido como la forma de almacenamiento principal de fósforo, inositol y de algunos cationes en plantas, así como secuestradores de cationes libres, actuando como antioxidantes (32).

Aunque los animales rumiantes, como los bovinos y caprinos, tienen enzimas específicas para biotransformar estos compuestos, otros mamíferos superiores carecen de estas enzimas (32).

Tienen mayor presencia en leguminosas, cereales y semillas en general, aunque también se encuentran en plantas de hoja verde; y aumentan su concentración conforme la planta madura (33).

El ácido fítico es considerado un agente antinutricional, principalmente por su capacidad para secuestrar cationes y proteínas. Su actividad es pH dependiente y presenta su mayor actividad dentro de los rangos de pH de digestión; actúan como secuestradores altamente negativos, por lo cual causan un gran impacto en la biodisponibilidad de cationes di y trivalentes: Cu, Zn, Fe, Ca, Mg y Mn, como se representa en la figura 3. Los complejos que forma con Zn y Ca son especialmente

insolubles y son la causa de decremento en la biodisponibilidad de estos nutrimentos inorgánicos y de su solidificación en tejidos provocando nefropatías (32).

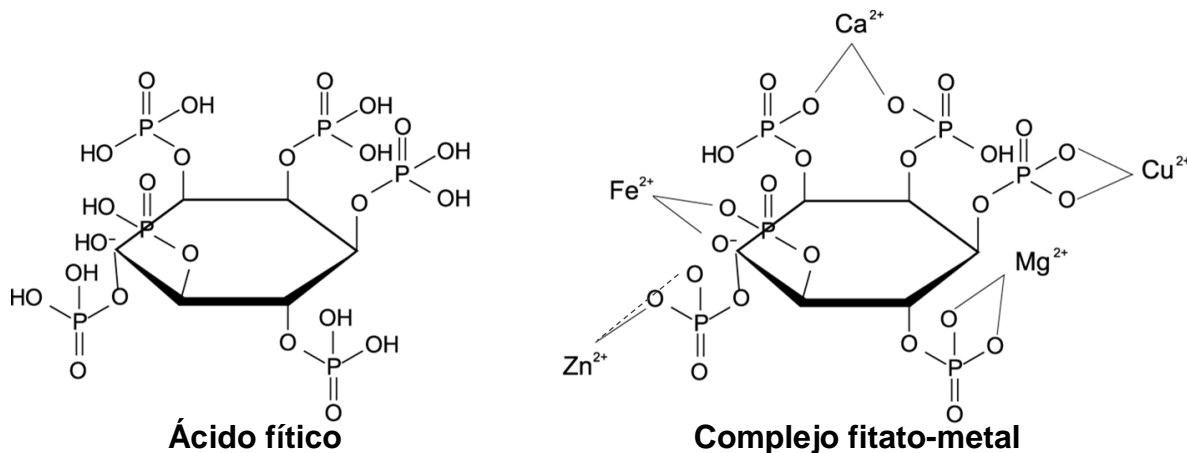


Figura 3. Estructuras del ácido fítico y un ejemplo de la capacidad secuestradora de cationes.

Al mismo tiempo, se han observado efectos hipolipidémicos e hipoglucémicos relacionados al ácido fítico. Estos efectos se deben en parte a la capacidad inhibitoria de amilasas, lo que merma la digestión y metabolismo de hidratos de carbono y disminuye las concentraciones de glucosa e insulina en torrente sanguíneo, derivando en la menor producción hepática de lípidos. Además se ha demostrado en estudios *in vivo* la disminución directa de colesterol y triglicéridos plasmáticos al introducir a la dieta ácido fítico (34).

Hoy en día, se considera que los fitatos tienen funciones de efectos ambiguos, con posibles aplicaciones para los humanos, como su capacidad para unirse a proteínas y lípidos de manera no específica e irreversible; lo que modifica estas moléculas disminuyendo su biodisponibilidad, como ocurre con los metales. Pero estos efectos también se observan en proteínas características de enfermedades neurodegenerativas, como Alzheimer y Parkinson. Tratamientos como el remojo, la germinación y fermentación han demostrado disminuir el contenido de fitatos en fuentes alimenticias humanas (6).

4.5.2. Agente tóxico

4.5.2.1. Nitratos

Las principales fuentes de nitratos son los alimentos de origen vegetal y la carne curada. El metabolismo de síntesis proteica de las plantas utiliza el nitrógeno disponible de los nitratos que obtienen del suelo y agua. El contenido de nitratos en planta se ve influenciado por el uso de fertilizantes y condiciones de crecimiento, especialmente la temperatura del suelo y la exposición a la luz; así como por

factores inherentes a la planta como variedad, especie y estado de maduración. Los nitratos se concentran en las hojas y tallos (37).

El efecto tóxico de los nitratos no es tan amplio, destacando la promoción de vasodilatación y la inhibición de la vitamina A; como la de los nitritos que son el metabolito de la biotransformación de los nitratos. El nitrato ingerido se transporta rápidamente a través de los tejidos, aunque una pequeña fracción es reducida a nitritos por las bacterias bucales; durante su trayecto por el tracto gastrointestinal los nitratos sufren también de reducción, tanto por acción bacteriana como por acción de enzimas (nitrato reductasa). La conversión de nitratos a nitritos en el organismo humano es del 70-80% (35).

Los nitritos en sangre se involucran en la oxidación de la hemoglobina perturbando su capacidad acarreadora de oxígeno. Así mismo, los nitritos han mostrado efectos procarcinogénicos al reaccionar con compuestos nitroestables, como las aminas secundarias, y generar nitrosaminas, compuestos carcinogénicos. El estómago reúne las condiciones ideales para esta conversión (36).

La mayor parte del nitrato eventualmente se excreta por vía urinaria. Se reporta que, en los últimos años la concentración de nitratos en plantas ha aumentado por el incremento en el uso de fertilizantes artificiales nitrogenados. El lavado de las plantas reduce el contenido de nitratos 10-15% (37).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Obtención y preparación de material biológico

Las muestras fueron proporcionadas por el Dr. Robert Arthur Bye Boettler y sus colaboradores, investigadores del Instituto de Biología de la UNAM. Se proporcionaron dos variedades, provenientes de: Nepantla, Estado de México; y Mixquic, delegación Tláhuac, Ciudad de México.

Cada una de las variedades fue separada en dos partes iguales y una fracción considerablemente menor. Una de las partes iguales se sometió a cocción y la otra se mantuvo “cruda” para poder realizar los posteriores análisis; la fracción menor se liofilizó inmediatamente y se reservó. La cocción del material se llevó a cabo considerando un volumen de 2 litros de agua por cada kilogramo de muestra; el material se mantuvo en ebullición hasta que presentó la consistencia típica de su consumo, aproximadamente 20 minutos. Tras el tratamiento térmico se secó y fraccionó las muestras en una estufa de circulación forzada y un molino, hasta 1 mm de diámetro, finalmente se obtuvieron las harinas respectivas.

En la figura 4 se observa el diagrama de flujo que muestra el proceso experimental que se realizó para cada variedad de verdolaga.

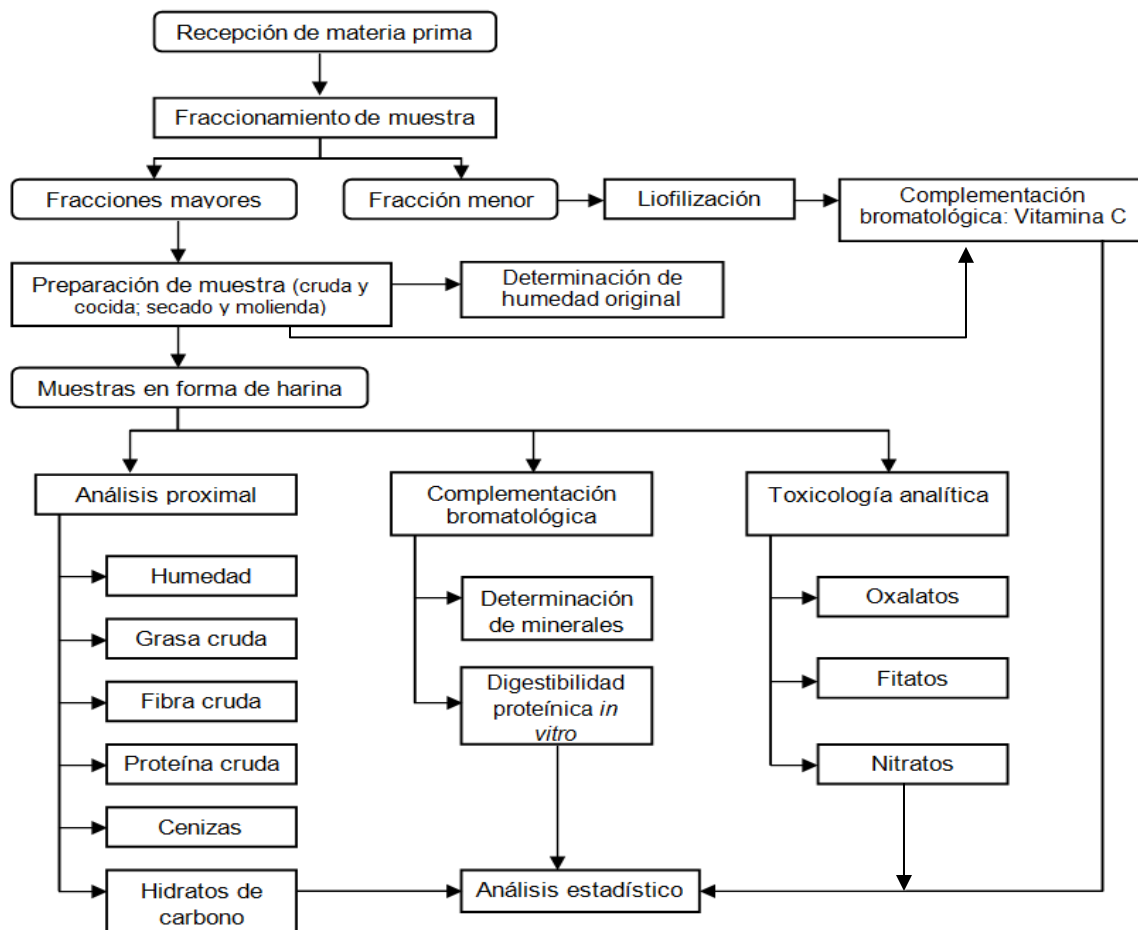


Figura 4. Diagrama general de trabajo experimental.

5.2. Determinación de humedad original

En hornos de secado con circulación forzada previamente ajustados a 55 ± 2 °C se introdujo el material fresco. El cálculo de humedad original se fundamenta en el control del peso a lo largo de 48 horas, aproximadamente, hasta obtener peso constante en balanza granataria (± 0.1 g), para considerar la pérdida de masa tras la evaporación del agua de la muestra (21).

5.3. Análisis bromatológico

Se realizó el análisis proximal de las muestras, ya en forma de harina, según el esquema de Weende, con algunas modificaciones. En la figura 5 se exponen los puntos más importantes de este análisis (38-39).

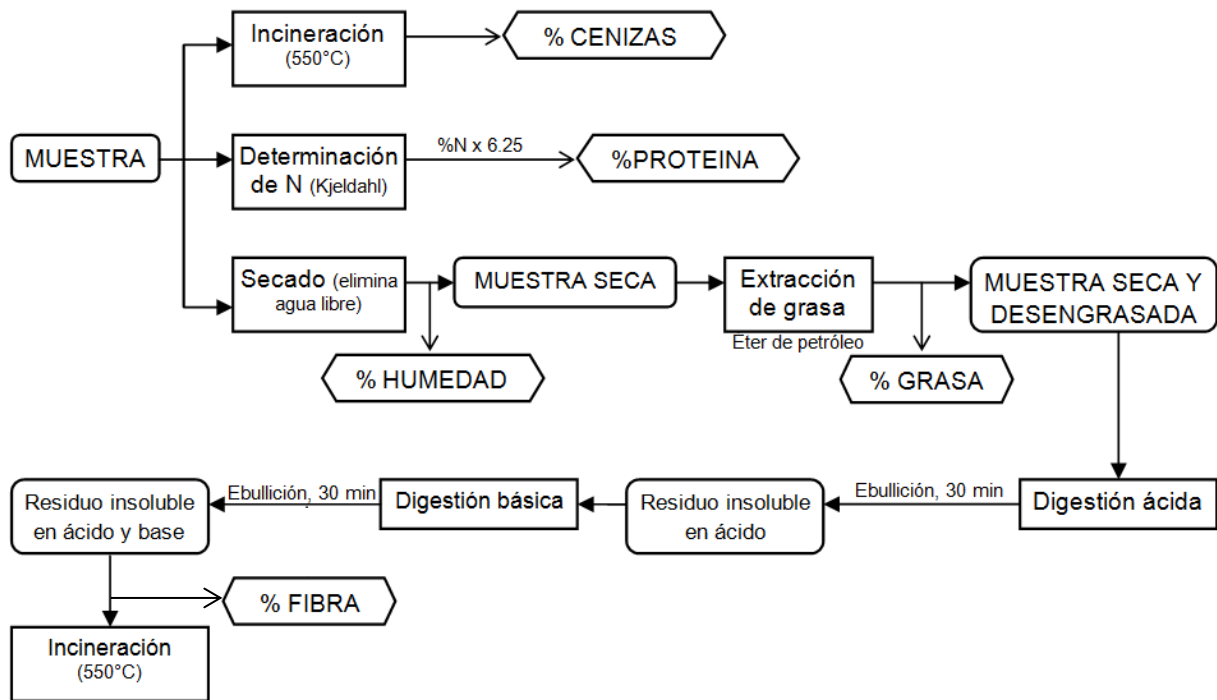


Figura 5. Diagrama de trabajo fundamentado en el esquema de Weende.

5.3.1. Humedad analítica

Es un método gravimétrico en el cual se considera la masa perdida tras la evaporación del agua libre del alimento. Se realiza bajo condiciones controladas de presión y temperatura (254 mm Hg y 75-80 °C), con la implementación de vacío se abate el punto de ebullición del agua. El monitoreo de la masa se realizó con precisión de balanza analítica (± 0.0001 g).

Materiales

- Balanza analítica Sartorius, mod. Analytic.
- Desecador de vidrio.
- Charolas de aluminio.
- Estufa de vacío Labline Duo Vac. Oven, mod. 3620.

Procedimiento

- Trabajar con charolas previamente a peso constante (secar 3-4 horas y monitorear el peso hasta peso constante).
- Pesar de 3 a 4 g de muestra, anotar y colocar en charola de peso conocido.
- Introducir las charolas con muestra a la estufa de vacío previamente ajustada a las condiciones de operación (254 mm Hg y 75-80 °C).
- Monitorear periódicamente el peso en la balanza analítica, cuidando no pesar mientras el material esté caliente, utilizar el desecador para enfriar.
- Continuar el monitoreo hasta peso constante del material.

Cálculos

Una vez registrado el peso constante se procede como a continuación se describe:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_i - P_f}{m} \times 100$$

Donde: P_i es el peso en gramos de charola y muestra antes del secado.

P_f es el peso en gramos de charola y muestra después del secado.

m es el peso en gramos de la muestra.

5.3.2. Grasa cruda

Método gravimétrico donde se obtiene la masa del residuo etéreo, después de la extracción correspondiente, y se considera con respecto a la masa original de la muestra. La grasa cruda es el material no homogéneo, compuesto por sustancias no solubles en agua y solubles en disolventes no polares (como el éter de petróleo); la mayor proporción corresponde a los lípidos, grasas y aceites del material. Se hace uso de una balanza analítica, precisión de ± 0.0001 g.

Materiales y reactivos

- Aparato de extracción Goldfish Labconco, mod. 35001-00C.
- Balanza analítica Sartorius, mod. Analytic.
- Bomba de recirculación Little Grant Pump, mod. 1. Estufa de vacío Labline Duo Vac. Oven, mod. 3620.
- Cartuchos de celulosa de 22x80 mm.
- Éter de petróleo R.A.
- Portadedales de vidrio.
- Tubos recuperadores de disolvente.
- Vaso de borde esmerilado, LABCONCO 35051.

Procedimiento

- Trabajar con vasos esmerilados previamente a peso constante (secar 3-4 horas y monitorear el peso hasta peso constante).
- Pesar de 3 a 4 g de muestra seca de la determinación de humedad, anotar y colocar en un pañuelo desechable.
- Enrollar el pañuelo sobre sí mismo e introducir en el cartucho de celulosa.
- Introducir el cartucho con muestra en el portadedales de vidrio y colocar en el extractor.
- Colocar aproximadamente 50 mL de éter de petróleo en los vasos esmerilados y acoplar al extractor.
- Conectar la bomba de recirculación con agua fría y encender el extractor en posición de calentamiento.
- Dejar en extracción por aproximadamente 2 horas.
- Retirar de extracción cuando al recuperar en un papel una gota de la descarga y evaporarse el solvente no haya residuos grasos.
- Recuperar el extracto en sus vasos correspondientes y dejar evaporar el disolvente en campana.
- Introducir los vasos a la estufa de vacío hasta peso constante.

Cálculos

Una vez registrado el peso constante se procede como a continuación se describe:

$$\% \text{ Grasa cruda} = \frac{P_f - P_o}{m} \times 100$$

Donde: P_f es el peso en gramos del recipiente después de la extracción.

P_o es el peso en gramos del recipiente antes de la extracción.

m es el peso en gramos de la muestra.

5.3.3. Fibra cruda

Se parte de la muestra seca y desengrasada. Se trasvasa a un vaso Berzelius y se somete a una digestión ácida (ácido sulfúrico 1.25%) e inmediatamente después a una básica (hidróxido de sodio 1.25%), ambas operaciones se realizan en un digestor Labconco. Posteriormente se filtra en un matraz Kitasato con vacío a través de un filtro tipo "California" para obtener la masa del material indigerible. Este dato corresponde a la fibra y cenizas, así que se debe incinerar el residuo para obtener las cenizas y por simple diferencia se obtiene la correspondiente fibra cruda.

Materiales

- Aparato de digestión Labconco.
- Balanza analítica Sartorius, mod. Analytic.
- Crisol de porcelana (peso cte.).
- Embudo Buchner tipo california con malla metálica.
- Estufa de vacío Labline Duo Vac. Oven, mod. 3620.
- Matraces de vidrio Kitasato.
- Mechero Bunsen.
- Mufla Thermolyne, mod. 1500.
- Perlas de ebullición.
- Tripié, anillo de hierro y triángulo de porcelana.
- Vasos Berzelius de 600 mL.

Reactivos

- Antiespumante.
- Alcohol etílico.
- Solución de NaOH al 1.25% m/v.
- Solución de H₂SO₄ al 1.25% m/v.
- Silicato de aluminio (limpio y calcinado).

Procedimiento

- Trasvasar cuantitativamente la muestra de la determinación de grasa cruda a los vasos Berzelius.
- Añadir 0.5 g de silicato de aluminio y perlas de ebullición a cada vaso.
- Añadir 200 mL de H₂SO₄ al 1.25% caliente, seguido de unas gotas de antiespumante.
- Colocar los vasos en el digestor previamente caliente, digerir por 30 minutos exactos.
- Transcurrido el tiempo, filtrar por un embudo California con ayuda de vacío.
- Lavar el residuo con agua destilada caliente hasta eliminar el ácido (aproximadamente 500 mL finales).
- Trasvasar cuantitativamente a vasos Berzelius.
- Añadir 200 mL de NaOH al 1.25% caliente, seguido de unas gotas de antiespumante.
- Transcurrido el tiempo, filtrar por un embudo California con ayuda de vacío.
- Lavar el residuo con agua destilada caliente hasta eliminar el álcali.

- Recuperar las perlas de ebullición y lavarlas con agua, recuperar el residuo.
- Adicionar al residuo 25 mL de alcohol etílico.
- Transferir el residuo con alcohol de forma cuantitativa a crisoles de porcelana previamente a peso constante.
- Secar los crisoles en estufa de vacío hasta peso constante.
- Incinerar en mufla.
- Monitorear hasta peso constante.

Cálculos

Una vez registrado el peso constante se procede como a continuación se describe:

$$\% \text{ Fibra cruda} = \frac{P_s - P_c}{m} \times 100$$

Donde: P_s es el peso en gramos del crisol con residuo después del secado.
 P_c es el peso en gramos del crisol con residuo después del calcinado.
 m es el peso en gramos de la muestra.

5.3.4. Cenizas

Las cenizas representan la fracción inorgánica de la muestra y para cuantificarlas se debe someter a combustión completa la materia orgánica presente. Primero se carboniza la muestra en crisoles de porcelana y después se calcina en mufla (550 ± 10 °C). En este punto se debe monitorear el peso hasta conseguir pesos constantes, siendo éste otro método gravimétrico, con apoyo de una balanza analítica (precisión de ± 0.0001 g).

Materiales

- Balanza analítica Sartorius, mod. Analytic.
- Campana de extracción.
- Crisol de porcelana (peso cte.).
- Desecador de vidrio.
- Mechero Bunsen.
- Mufla Thermolyne, mod. 1500.
- Tripié, anillo de hierro y triángulo de porcelana.

Procedimiento

- Colocar los crisoles en la mufla a 550 °C hasta obtener peso constante.
- Pesar de 2 a 3 g de muestra y colocar en los crisoles.
- En la campana de extracción, carbonizar a fuego directo del mechero hasta que no haya desprendimiento de humo.
- Calcinar las muestras: introducir los crisoles con muestra carbonizada a la mufla por 3 horas a 550 °C.

- Sacar de la mufla y dejar enfriar en desecador por lo menos 30 min. Pesar.
- Repetir la calcinación, el enfriamiento y peso hasta alcanzar pesos constantes.

Cálculos

Una vez registrado el peso constante se procede como a continuación se describe:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{Pf - Pc}{m} \times 100$$

Donde: Pf es el peso en gramos del crisol con muestra después de incinerar.

Pc es el peso en gramos del crisol a peso constante.

m es el peso en gramos de la muestra.

5.3.5. Proteína cruda

Para determinar la proteína se realiza una digestión de la muestra en ácido sulfúrico concentrado a temperatura elevada (350-370 °C), con catalizadores y peróxido de hidrógeno (que acelera la oxidación). La sal de amonio formada se trata con hidróxido de sodio, para liberar amoniaco que se recibe en una solución de ácido bórico. Posteriormente, se realiza una titulación acido-base con ácido clorhídrico y se obtiene el %N orgánico. Este valor debe multiplicarse por el factor de conversión (6.25, correspondiente a 100 g de proteína/16 g N) a proteína y así se obtendrá el porcentaje de proteína cruda.

Materiales

- Balanza analítica Sartorius, mod. Analytic.
- Digestor Tecator, mod. Ab-20740.
- Dispositivo de destilación Tecator, Kjeltex auto 1030 Analyzer.
- Tubos de digestión Tecator de 100 mL.

Reactivos

- Peróxido de hidrógenos al 30%.
- Sulfato de potasio R.A.
- Solución de NaOH al 40% m/v.
- Solución de HCl al 0.01 N valorada.
- Mezcla digestiva (a).
- Solución de ácido bórico con indicadores (b).

(a) Pesar y disolver 3 g de sulfato de cobre (CuSO₄.5H₂O) en 20 mL de agua destilada y agregar 50 mL de ácido ortofosfórico. Posteriormente adicionar con cuidado 430 mL de H₂SO₄ concentrado. Agitar por 30 minutos.

(b) Pesar 10 g de ácido bórico y disolver en el menor volumen posible de agua destilada. Posteriormente se adicionan 10 mL de verde de bromocresol al 0.1% en metanol y 7 mL de rojo de metilo al 0.1% en metanol. Se ajusta a un tono café rojizo con ácido o base según se requiera y se afora a 1 L con agua destilada.

Procedimiento

- Pesar 100 mg de muestra colocar en un tubo de digestión.
- Añadir 0.5 g de sulfato de potasio y 3 mL de mezcla digestiva (a).
- Colocar los tubos en el digestor a 340 °C por 15 min.
- Transcurrido el tiempo, retirar los tubos del digestor y dejar enfriar.
- Añadir 1.5 mL de peróxido de hidrógeno al 30%.
- Colocar los tubos en el digestor a 250 °C por 1 hora o hasta que la mezcla se encuentre traslúcida con un tono verde-azul, sin manchas oscuras.
- Dejar enfriar los tubos.
- Destilar en el equipo Kjeltex auto 1030 Analyzer utilizando las soluciones de HCl, NaOH y ácido bórico (b).

El equipo de destilación arroja automáticamente los datos de volumen de titulación. Se debe realizar el procedimiento para las muestras y para blancos de glucosa.

Cálculos

Para conocer el porcentaje de proteína cruda se realizan los siguientes cálculos:

$$\%N_2 = \frac{(P - B) \times N \times meq \times 100}{m}$$

$$\%Proteína\ cruda = \%N_2 \times F$$

Donde: P es el volumen en mL de la titulación de la muestra.

B es el volumen en mL de la titulación del blanco.

N es la normalidad de la solución de HCl.

meq son los miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m es el peso de la muestra en gramos.

F es el factor de conversión de nitrógeno (6.25)

5.3.6. Hidratos de carbono

La determinación de hidratos de carbono se realiza por diferencia. Es una estimación de los hidratos de carbono digeribles y se deben considerar los porcentajes de las determinaciones descritas previamente y restárselos a 100%. El resultado de esta diferencia corresponde al porcentaje de hidratos de carbono en la muestra correspondiente.

$$\% \text{Hidratos de carbono} = 100 - Z$$

Donde: Z es la suma de los resultados de las determinaciones previas (humedad analítica, grasa cruda, fibra cruda, cenizas y proteína cruda).

5.4. Complementación bromatológica

5.4.1. Digestibilidad proteínica *in vitro*

Es una digestión simulada de la muestra en un medio multienzimático, la humana. Dicha digestión, somete a la muestra a proteólisis, liberando iones $[H^+]$ por la ruptura del enlace peptídico, lo cual modifica el pH. Tras obtener el valor correspondiente a una muestra de referencia (Caseína), se realiza la determinación en la muestra y por determinación del pH se obtiene el resultado. Se asume la correlación entre la disminución de pH con el aumento de digestibilidad de la proteína (38 y 26).

Materiales

- Balanza analítica Sartorius, mod. Extend.
- Potenciómetro Thermo Scientific mod. Orion 3 Star.
- Baño reciclador de agua Grant mod 5E-10 a $37 \pm 0.5^\circ C$.
- Baño de agua Polystat a $55 \pm 0.5^\circ C$.
- Cronómetro digital.
- Parilla de agitación magnética Daihan Scientific Wisestir.
- Contenedor de vidrio con camisa de recirculación de agua.
- Matraz aforado de 10 mL.
- Agitadores magnéticos de media pulgada.
- Espátulas de teflón.
- Pipeta volumétrica de 10 y 1 mL.

Reactivos

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

- Tripsina pancreática porcina (tipo IX) Sigma (T-0303); **227,040 unidades BAEE de tripsina.**
- Peptidasa intestinal porcina (Grado I) Sigma (P-7000); **2,321 unidades BAEE de tripsina.**
- α -quimotripsina pancreática bovina (tipo II) Sigma (C-4129); **1,860 unidades BAEE de tripsina.**

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

- Proteasa de *Streptomyces griseus* Sigma (P-5147); **65 unidades BAEE de tripsina.**
- Buffers de referencia.
HCl 0.1N y 0.05N
NaOH 2N, 1N, 0.1N y 0.05N.
Estándar de caseína liofilizada.

Donde BAEE es el sustrato N- α -benzoil-L-arginina etil éster. BAEE es un dato proporcionado por el fabricante de estas enzimas. Se presenta a continuación un ejemplo del cálculo que debe realizarse para determinar cuántos gramos de enzima se requieren para tener las unidades BAEE necesarias en la metodología.

Ejemplo:

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

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

Procedimiento

- Considerar la cantidad de muestra que contiene 10 mg de N₂ y colocarla en un vaso de digestibilidad.
- Añadir 10 mL de agua destilada y colocar en agitación continua a una temperatura de 37°C durante 1 hora.
- Transcurrido el tiempo, ajustar el pH de la solución a 8.00 ± 0.3 con NaOH y HCl según sea el caso.
- Agregar 1 mL de la solución enzimática A, mantener en agitación continua por 10 minutos exactos.
- Transcurrido el tiempo, agregar 1 mL de la solución enzimática B, cambiar rápidamente el baño al de 55°C, mantener en agitación continua por 9 minutos.
- Finalizado el tiempo anterior, cambiar al baño de 37°C por 1 minuto.
- Medir pH de la muestra digerida.

(Las soluciones enzimáticas deben estar en pH 8.00 ± 0.3.)

El pH de la referencia de caseína deberá ser 6.42 ± 0.5 y sólo hasta que se obtenga este pH en la serie de referencia se podrá realizar la determinación en la muestra problema.

Cálculos

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

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

5.4.2. Determinación de nutrientes inorgánicos

Estos resultados fueron proporcionados, para todas las muestras, por el Dr. Ciro Márquez, responsable del laboratorio 209 del Conjunto D de la Facultad de Química. A quien se le extiende un profundo agradecimiento. Esta metodología utilizó la técnica de espectroscopía de emisión atómica con plasma por acoplamiento inductivo (ICP-OES) (40).

Materiales

- Balanza analítica Badwag, mod. XAGO/220/X).
- Cartuchos de digestión con tapón.
- Equipo de digestión con microondas Perkin Elmer modelo Titan MPS.
- Espectrómetro de emisión atómica Perkin Elmer modelo 4300DV.
- Matraces aforados de 50 mL.

Reactivos

- Ácido fluorhídrico concentrado.
- Ácido nítrico concentrado.
- Peróxido de hidrógeno 40%.

Procedimiento

- Pesar con exactitud 0.1 g de muestra y colocar dentro del cartucho de digestión.
- Añadir 5 mL de HNO_3 + 1 mL de H_2O_2 + 0.2 mL de HF, dejar reaccionar sin tapar por 10 minutos, aproximadamente.
- Cerrar el cartucho primario e introducir en el secundario.
- Colocar en el digestor.
- Digerir las muestras. (La digestión se lleva a cabo en condiciones de 170-210 °C y 80 atm de presión por 30 minutos).
- Trasvasar el residuo de digestión cuantitativamente a un matraz aforado de 50 mL.
- Aforar con agua desionizada y destilada.

El contenido de nutrientes inorgánicos se mide en el espectrómetro de emisión atómica, que emplea gas argón de alta pureza, y se compara contra estándares de la Perkin Elmer.

5.4.3. Vitamina C

La determinación de Vitamina C es una valoración volumétrica de óxido-reducción, que requiere de la previa extracción del ácido ascórbico de la muestra. Se aprovecha la capacidad reductora del ácido extraído para tornar incolora una solución valorada de 2,6-diclorofenol-indofenol al reducirlo (41).

Materiales

- Bureta de 25 mL.
- Matraz aforado 100 mL.
- Matraz Erlenmeyer 125 mL.
- Pipeta volumétrica de 10 mL.

Reactivos

- Ácido acético 5%.
- Solución estándar de Vitamina C. (a)
- Solución de diclorofenol-indofenol. (b)

(a) Pesar con exactitud 100 mg de ácido ascórbico anhidro y colocarlo en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con ácido acético al 5%. Concentración final de 1 mg/mL.

(b) Pesar 100 mg de 2,6-diclorofenol-indofenol y 50 mg de NaHCO₃, disolverlos y aforar a 1 L con agua destilada.

Para valorar la solución de diclorofenol-indofenol: colocar 1 mL de la solución estándar de Vitamina C (a) y 9 mL de ácido acético al 5% en un matraz Erlenmeyer y titular con la solución de diclorofenol-indofenol (b), hasta que persista el color rosado por 10 segundos al menos. Los mL consumidos se consideran el título que equivale a 1 mg de Vitamina C.

Procedimiento

- Pesar 5 g de muestra y homogeneizar con 50 mL de ácido acético al 5% (para inactivar la ascorbato oxidasa endógena).
- Aforar a 100 mL con agua destilada y dejar sedimentar el material insoluble.
- Filtrar por papel filtro de poro grueso.
- Tomar 10 mL del filtrado y colocar en un matraz Erlenmeyer.
- Titular con la solución valorada de diclorofenol-indofenol (DF-IF), hasta que persista el color rosa por 10 segundos al menos.

Cálculos

Para conocer los mg de Vitamina C presente en cada 100 g de muestra se realiza el siguiente cálculo:

$$\text{mL de DF - IF} \times (\text{título}) \times \left(\frac{100 \text{ mL}_{\text{aforo}}}{10 \text{ mL}_{\text{alícuota}}} \right) \times \left(\frac{100\%}{\text{g de muestra}} \right)$$

Donde: mL de DF-IF es el volumen de la solución de diclorofenol-indofenol gastado en la titulación de la muestra.

Título se refiere a la valoración.

5.5. Factores tóxicos

5.5.1. Agentes antinutrimientales

5.5.1.1. Oxalatos

Se basa en la extracción del ácido oxálico en medio ácido y con agitación mecánica; posteriormente se precipita en forma de oxalato de calcio y se cuantifica por medio de una determinación permanganométrica, donde se titula el ácido oxálico con una solución valorada de KMnO₄ 0.1 N (el ácido oxálico se oxida hasta CO₂) (39).

Materiales

- Balanza analítica Sartorius Extend.
- Centrífuga Eppendorf mod 5702
- Fibra de vidrio.
- Papel Whatman #4 y #10.
- Parrilla con agitación CORNING stirer mod 440826.
- Potenciómetro Thermo Scientific Orion 3 Star.
- Vaso Berzelius de 600 mL.

Reactivos

- HCl 6N
- Reactivo de ácido tungstofosfórico (a)
- Buffer de acetato (b)
- Líquido de lavado (c)
- KMnO_4 0.01N (d)
- NH_4OH
- H_2SO_4 (1:9) y (1:8)
- Antiespumante
- Oxalato de sodio anhidro

(a) Disolver 2.5 g de tungstato de sodio dihidratado, ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en la mezcla de 4 mL de ácido fosfórico y 50 mL de agua destilada y aforar a 100 mL con agua destilada.

(b) Disolver 2.5 g de cloruro de calcio anhidro en 50 mL de una solución de ácido acético y agua (50:50). Preparar una solución de 33 g de acetato de sodio trihidratado ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) diluido a 50 mL con agua destilada.

(c) Diluir 12.5 mL de ácido acético concentrado con 250 mL de agua destilada y añadir polvo de oxalato de calcio, agitar y dejar reposar. Repetir la adición y agitación hasta saturación. Enfriar a 4 °C, antes de su uso filtrar en papel Whatman #4. Mantener en refrigeración durante su uso.

(d) Pesar 3.2 g de KMnO_4 y disolver en 1 L de agua destilada. Calentar la solución hasta que hierva durante 1 hora, evitando que la ebullición sea tumultuosa, enfriar y completar al volumen. Dejar reposar toda la noche y filtrar por fibra de vidrio. Recibir en un frasco ámbar limpio.

Estandarización de la solución de KMnO_4 0.1 N: se titula pesando con exactitud de 0.2 a 0.3 g de Oxalato de sodio anhidro previamente secado 200-110 °C /2 horas y colocar en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Disolver en agua (50-70 mL) y agregar 15-20 mL de H_2SO_4 (1:8). La solución se calienta a 70 °C y se titula con agitación dejando caer la solución de permanganato de potasio lentamente hasta una coloración rosa permanente. Como blanco, medir el mismo volumen de H_2SO_4 (5+95) previamente hervido de 10-15 min y después enfriar a 27 ± 3 °C. Restar el volumen del blanco al de titulación, este valor se utiliza en los cálculos. Para obtener la normalidad:

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

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

Procedimiento

Preparación de muestra

- Pesar 5 a 10 g de la muestra en forma de harina, colocar dentro de un vaso Berzelius de 600 mL.
- Agregar 200 mL de agua destilada y agitar en la parrilla por 15 minutos.
- Llevar a 300 mL enjuagando las paredes, añadir 55 mL de HCl 6N, dos gotas de antiespumante y llevar a ebullición y reflujo por 15 minutos.
- Dejar enfriar.
- Aforar a 500 mL con agua destilada enjuagando las paredes del vaso, agitar y dejar reposar toda la noche.
- Filtrar a través de un papel filtro Whatman #4 y desechar los primeros 100 mL (para acondicionar el sistema).

Precipitación del ácido oxálico

- Tomar una alícuota de 25 mL del filtrado con una pipeta y colocar en un matraz Erlenmeyer de 50 mL.
- Agregar 5 mL de ácido tungstofosfórico, mezclar y dejar reposar al menos 5 horas.
- Filtrar a través de papel Whatman #40.
- Pasar 20 mL del filtrado con una pipeta a un tubo de centrifuga y adicionar NH_4OH gota a gota con cuidado hasta obtener un pH de 4-4.5, utilizando potenciómetro.
- Adicionar 5 mL de la solución amortiguadora de acetato y mezclar con varilla de vidrio.
- Enjuagar la varilla de vidrio dentro del tubo de centrifuga con un pequeño chorro de agua destilada y dejar reposar toda la noche.
- Centrifugar durante 15 minutos a 1700 rpm para compactar el precipitado.
- Decantar el sobrenadante con una inversión suave del tubo. (Tener cuidado de no romper el precipitado)
- Voltar el tubo hacia abajo y dejar que el sobrenadante gotee completamente sobre un papel filtro limpio.
- Lavar el precipitado con 20 mL de líquido de lavado frío, rompiendo completamente el precipitado.
- Repetir los pasos de centrifugación y decantado.
- Añadir 5 mL de H_2SO_4 (1:9) al precipitado y resuspender.
- Trasvasar a un matraz Erlenmeyer de 250 mL.

- Lavar el tubo de centrifuga con 20, 5 y 5 mL de agua desionizada y colectar en el matraz.
- Titular con permanganato.

Titulación

- Calentar el matraz hasta aproximadamente 65-70 °C en baño maría.
- Titular con KMnO₄ hasta que persista el color rosa por 30 segundos.
- Realizar la titulación de blanco en las mismas condiciones. (5 mL de H₂SO₄ (1:9) + 30 mL de agua desionizada a 65-70 °C)

Cálculos

La siguiente fórmula se utiliza para conocer el porcentaje de ácido oxálico en la muestra:

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

Donde: meq es 0.045 para ácido oxálico

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

5.5.1.2. Fitatos

Se utilizan columnas de intercambio iónico con el fin de purificar los extractos, eliminando fracciones pequeñas de inositol y fosfatos. Lo cual promueve que la cuantificación se realice sólo del ácido fítico (42).

Materiales

- Agitador magnético múltiple Daihan Scientific Wisestir.
- Balanza analítica Sartorius Extend.
- Centrifuga Thermo electron corporation IEC MULTI RF.
- Columnas de intercambio iónico. (a)
- Espectrómetro Thermo Scientific Genesis 10 UV.
- Potenciómetro Thermo Scientific Orion 3 Star.
- Vortex Labline mod. 1290.

Reactivos

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

(a) Pesar aproximadamente 0.5 g de resina e hidratarla con 1 mL de agua desionizada. Enjuagar con gotas para acarrear cualquier residuo del vaso.

Preparar las columnas con jeringas de 3 mL. Introducir en el fondo un tapón de fibra de vidrio y colocar en un soporte. Agregar a la columna la resina hidratada, cuidando que quede asentada uniformemente, la resina no debe secarse en ningún momento. Una vez la columna esté bien empacada, adicionar 15 mL de NaCl 0.7 N. Lavar con 30 mL de agua desionizada, dejando líquido en la superficie. Queda preparada para su uso.

(b) Pesar 0.03 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0.3 g de ácido sulfosalicílico, y disolverlos en agua desionizada, aforar a 100 mL. El reactivo debe prepararse al momento de la determinación y, una vez adicionado, debe leerse en menos de 30 minutos.

Procedimiento

Preparación de estándares

- Preparar una solución concentrada de ácido fítico (1 mg/mL).
 - Pesar exactamente 0.080 g de la sal de fitato de sodio (considerar pureza y humedad).
 - Disolver y aforar con agua desionizada a 50 mL.
- Preparar soluciones de estándares a partir de la concentrada (5, 10, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

Extracción del ácido fítico

- Pesar 1 g de muestra (<5% grasa) y colocar en un vaso de precipitados de 50 mL.
- Adicionar 20 mL de HCl 0.65 N. Checar pH 0-1.
- Agitar vigorosamente durante 2 horas a temperatura ambiente.
- Trasvasar cuantitativamente a tubos de centrifuga.
- Centrifugar a 12000 rpm a temperatura ambiente por 30 minutos.
- Colectar el sobrenadante.

Purificación por columna de intercambio iónico

- Tomar una alícuota de 1 mL del sobrenadante y aforar a 25 mL (esta dilución, 1:25, se considera para muestras que se esperan altas en fitatos; si se esperan concentraciones <1% hay que considerar 5:25).
- Ajustar pH a 6 con NaOH 1N.
- Tomar 10 mL y transferir cuantitativamente a la columna ya preparada.
- Lavar la columna con 15 mL de NaCl 0.1 N y desechar agua de lavado.
- Eluir el fitato con 15 mL de NaCl 0.7 N. Colectar extracto puro.

Determinación espectrofotométrica

- Ajustar pH de un pequeño volumen de agua desionizada (blanco), los estándares y los extractos purificados a 3.00.
- Tomar 3 mL de cada uno y colocar en tubo de ensayo.
- Añadir 1 mL de reactivo de Wade a cada tubo.
- Agitar con vortex por 5 segundos.
- Transferir a celda de vidrio.
- Leer absorbancia a 500 nm.
(calibrar el espectrómetro utilizando una celda con agua desionizada)

Cálculos

A las lecturas de los estándares y las muestras se les resta la lectura del blanco para obtener la absorbancia corregida correspondiente.

Se debe realizar la curva patrón con regresión lineal, con el fin de poder interpolar los datos de las muestras y determinar la concentración de ácido fítico en éstas.

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

$$\frac{\mu\text{g ácido fítico}}{\text{mL NaCl}} = \frac{\text{absorbancia}_{\text{corregida}} - \text{ordenada}}{\text{pendiente}}$$

Para obtener los g de muestra se aplica la siguiente ecuación:

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

Finalmente, el porcentaje de ácido fítico se obtiene de la siguiente forma:

$$\% \text{ ácido fítico} = \frac{\mu\text{g ácido fítico}}{\text{mL NaCl}} \times \frac{1 \text{ g}}{10^6 \mu\text{g}} \times \frac{\text{mL NaCl}}{\text{g muestra}} \times 100$$

5.5.2. Agente tóxico

5.5.2.1. Nitratos

La determinación de nitratos es espectrofotométrica. Aprovecha al sustrato a cuantificar, los nitratos, para promover la formación de un cromóforo cuyo máximo de absorbancia se da a 410 nm de longitud. La nitración se da en condiciones extremas; la absorbancia y la cantidad de nitratos son directamente proporcionales, esta determinación hace uso de una curva patrón de sal de nitrato pura (43).

Materiales

- Agitador magnético múltiple Daihan Scientific Wisestir.
- Balanza analítica Sartorius Extend.
- Baño de agua Polysat mod 12002.
- Centrifuga Eppendorf mod 5702.
- Espectrómetro Thermo Scientific Genesis 10 UV.
- Papel Whatman #41 y #542.
- Vortex Labline mod. 1290.

Reactivos

- Carbón activado.
- NaOH 2 M
- Solución de ácido salicílico 5% (m/v) en ácido sulfúrico concentrado.
- Solución estándar de nitrato 0.6 y 10 mg/mL.

Procedimiento

Preparación de estándares

Solución obtenida de 0.6 mg/mL de nitratos.

- Agregar 3 mL de la solución estándar de nitrato 10 mg/mL, 550 mg de carbón activado y 30 mL de agua destilada a un vaso de precipitados de 50 mL.
- Homogeneizar.
- Filtrar con papel Whatman #41.
- Aforar el filtrado a 50 mL con agua destilada.
- Centrifugar a 2700-3000 rpm por 1 hora.
- Filtrar sobrenadante con papel Whatman #542.

Curva patrón

- Preparar y rotular 6 tubos de ensayo.
- Adicionar 10, 20, 50, 70 y 100 μL de la solución de 0.6 mg/mL de nitratos, para aforar a un volumen final de 100 μL con agua destilada.
- Proceder con “desarrollo de color”.

Obtención del extracto

- Pesar 0.25-0.9 g de muestra y colocar en vaso de precipitados de 50 mL.
- Agregar 550 mg de carbón activado y 30 mL de agua destilada.
- Agitar 500-700 rpm, con agitador magnético, por 15 minutos.
- Filtrar a vacío con papel Whatman #41.
- Aforar el filtrado a 50 mL con agua destilada.
- Centrifugar a 2700-3000 rpm por 1 hora.
- Filtrar sobrenadante a vacío con papel Whatman #542.
- Rotular la cantidad de tubos pertinentes y añadir 100 μL del extracto a cada uno.
- Proceder con “desarrollo de color”.

Desarrollo de color

- Añadir 0.4 mL de la solución de ácido salicílico.
 - Agitar por 15 segundos en vortex.
 - Introducir a baño de 30 °C por 20 ± 1 minutos.
 - Añadir 9.5 mL de NaOH, con bureta.
 - Agitar por 15 segundos en vortex.
 - Introducir a baño de 30 °C por 15 ± 1 minutos.
 - Transferir a celdas de vidrio.
 - Leer absorbancia a 410 nm.
- (Tanto la serie de la curva patrón como la serie de muestras tienen sus respectivos blancos)

Cálculos

Se debe realizar la curva patrón con regresión lineal con los datos de los estándares, con el fin de poder interpolar los datos de las muestras y determinar la concentración de nitrato en estas.

Con la ecuación de la recta se pueden determinar los μg de nitratos, según la siguiente:

$$\mu\text{g nitratos} = \frac{\text{absorbancia} - \text{ordenada}}{\text{pendiente}}$$

Una vez determinados los μg de nitratos presentes, se debe aplicar el siguiente cálculo para conocer la concentración de éstos:

$$\% \text{ nitratos} = \mu\text{g nitratos} \times \frac{50 \text{ mL}}{0.1 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ g}}{10^6 \mu\text{g}} \times \frac{100}{\text{g muestra}}$$

5.6. Análisis estadístico

Con el fin de realizar un análisis más completo del efecto del tratamiento térmico, se realizó un análisis estadístico para las determinaciones descritas, excepto para la determinación de Hidratos de carbono. La prueba aplicada fue t student con el programa de computación estadística STATGRAPHICS versión 5.1. La prueba se realizó considerando el 99% y 95% de confianza; se aplicó para determinar si el tratamiento térmico generó diferencias significativas en la misma variedad de verdolaga cocida y cruda (44).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Análisis bromatológico

A continuación se presentan los resultados del análisis bromatológico, que corresponde al análisis proximal, así como de la complementación bromatológica, que comprende digestibilidad proteínica *in vitro*, vitamina C y nutrimentos inorgánicos. Los análisis se realizaron para: la fracción de la variedad proveniente de Mixquic que se mantuvo cruda, la cual se menciona como **MixCr**; la fracción de la variedad proveniente de Mixquic que se sometió a cocción, la cual se menciona como **MixCo**; la fracción de la variedad proveniente de Nepantla que se mantuvo cruda, la cual se menciona como **NepCr**; y la fracción de la variedad proveniente de Nepantla que se sometió a cocción, la cual se menciona como **NepCo**.

En la tabla 1 se presentan los datos de humedad de las dos variedades de verdolaga y sus tratamientos térmicos. Se observa que pese al tratamiento térmico aplicado la humedad no se vio afectada.

Tabla 1. Humedad original

Componente	Variedad/tratamiento			
	MixCr	MixCo	NepCr	NepCo
Humedad (%) ^a	94.37 ± 0.16	94.13 ± 0.07	93.15 ± 0.46	93.03 ± 0.23

^a Se presenta el valor promedio de la determinación ± desviación estándar.

La tabla 2 expresan los resultados del análisis proximal de ambas variedades y sus tratamientos. Se aprecia que el tratamiento térmico provocó cambios en la composición de las verdolagas.

Tabla 2. Análisis proximal de las variedades de verdolaga cruda y cocida en forma de harina.

Componente (g/100g de muestra)	Variedad/tratamiento			
	MixCr	MixCo	NepCr	NepCo
Humedad analítica ^a	5.83 ± 0.23	6.32 ± 0.02	6.57 ± 0.13	5.36 ± 0.18
Grasa cruda ^a	1.38 ± 0.06	2.11 ± 0.04	1.39 ± 0.08	2.14 ± 0.07
Fibra cruda ^a	13.42 ± 0.10	13.28 ± 0.18	15.64 ± 0.14	15.53 ± 0.16
Cenizas ^a	24.28 ± 0.32	14.34 ± 0.17	29.97 ± 0.94	15.49 ± 0.06
Proteína cruda ^a	22.38 ± 0.41	23.49 ± 0.18	17.79 ± 0.88	19.36 ± 0.58
Hidratos de Carbono ^b	32.71	40.47	28.66	42.12

^a Se presenta el valor promedio de la determinación ± desviación estándar.

^b Calculados por diferencia, según el esquema de Weende.

Lo primero que debe destacarse es que los resultados obtenidos para las muestras crudas son similares a los encontrados en diversas fuentes literarias (8 y 51). Aun así, cabe mencionar ciertos puntos de interés. Los datos de grasa se encuentran dentro de lo observado en otros estudios. La fibra también obtuvo datos previamente observados, sin embargo la variedad de Mixquic presenta ligeramente menos fibra que la variedad de Nepantla, lo que afectará observaciones posteriores. Para las cenizas, las variedades estudiadas se encuentran en los extremos del rango de datos reportados, incluso la variedad de Nepantla excede el rango. Para proteína, pese a que la variedad de Mixquic se encuentra dentro del rango, ambas variedades se observan pobres respecto a lo observado en otros estudios, la variedad de Nepantla no rebasa el mínimo. Debido a la carencia de proteína y a la superior cantidad de fibra, la variedad de Nepantla resulta exceder la cantidad de hidratos de carbono de la literatura y la variedad de Mixquic se encuentra dentro del rango (5, 8, 45 y 46).

Una vez señalado lo anterior, se procede con el análisis de datos considerando los efectos del tratamiento térmico sobre la composición de las variedades de verdolaga, lo cual es el objetivo principal de esta tesis.

Retomando la tabla 2, Se aprecia que la humedad es bastante similar entre muestras, sin embargo ya se presentan diferencias en la composición. Se aplicó el análisis estadístico para comparar los resultados entre las fracciones crudas y cocidas de ambas variedades. Así mismo, se trabajaron los datos en base seca, con la finalidad de que el contenido de agua no interfiera con el análisis, a continuación en la tabla 3 se presentan los datos mencionados en base seca, junto con los resultados del análisis estadístico.

Tabla 3. Análisis proximal de las variedades de verdolaga cruda y cocida en base seca.

Componente (g/100g de muestra)	Variedad/tratamiento			
	MixCr	MixCo	NepCr	NepCo
Grasa cruda ^a	1.46 ± 0.06 ^c	2.24 ± 0.04 ^c	1.48 ± 0.08 ^d	2.27 ± 0.07 ^d
Fibra cruda ^a	14.25 ± 0.10	14.10 ± 0.20	16.61 ± 0.15	16.49 ± 0.17
Cenizas ^a	25.78 ± 0.34 ^c	15.22 ± 0.18 ^c	31.79 ± 0.99 ^d	16.45 ± 0.06 ^d
Proteína cruda ^a	23.77 ± 0.43	24.95 ± 0.19	18.89 ± 0.94	20.55 ± 0.62
Hidratos de Carbono ^b	28.92	37.18	24.65	38.88

^a Se presenta el valor promedio de la determinación ± desviación estándar (n=3).

^b Calculados por diferencia, según el esquema de Weende.

^c Datos estadísticamente distintos, según la prueba t student al 99% de confianza, entre tratamientos (cruda y cocida) para la variedad de Mixquic.

^d Datos estadísticamente distintos, según la prueba t student al 99% de confianza, entre tratamientos (cruda y cocida) para la variedad de Nepantla.

Se determinó el contenido de grasa en las muestras y, pese a que es el componente minoritario en las verdolagas, se encontró diferencia significativa en el contenido de éste entre las verdolagas crudas y cocidas. Ambas variedades aumentaron su contenido de grasa después de haberse sometido a cocción. Esto se observa debido a que las plantas contienen lípidos, no sólo en forma libre, si no también formando estructuras complejas y resistentes. Un ejemplo son las ceras epicuticulares, que se superponen en la superficie de las hojas verdes y las protegen, y se presentan en estructuras similares a las secundarias y terciarias de las proteínas. El tratamiento térmico de cocción promovió que dichas formaciones y otros aglomerados lipídicos perdieran rigidez y, al someterse a la extracción con el disolvente, el rendimiento fuera mayor que en la extracción de las muestras crudas (46-50).

La fibra cruda no muestra diferencias significativas para las muestras crudas y cocidas. Los valores señalan que las muestras contenían una importante proporción de tallos además de hojas, lo que refleja la forma de consumo de las verdolagas pues con esos estándares se acondicionó la muestra antes de los tratamientos. Se han demostrado ampliamente los beneficios del consumo moderado de fibra en la dieta, sin embargo el método para determinar fibra cruda es drástico y no logra cuantificar los oligo y polisacáridos, componentes de la fibra dietética, que es la fracción con mayor acción benéfica sobre el organismo. Es de interés conocer el contenido de fibra dietética, sin que afecte el tratamiento de cocción.

Se observaron importantes cambios en las cenizas. En el material crudo compiten en cantidad con el componente mayoritario; sin embargo, tras la cocción disminuyen. Se confirma una diferencia estadísticamente significativa. Estos altos valores son un indicador de la riqueza de nutrimentos inorgánicos presentes en las verdolagas. Pero su disminución tras la cocción sugiere que bastante de ese material inorgánico es soluble en agua y se quedó en el agua de cocción (sales y tóxicos); además denota que aun con el lavado de la muestra antes de cualquier procedimiento analítico, cantidades significativas de contaminación física aún estaban presentes en la planta y fueron retirados en la cocción.

No se encontró diferencia significativa entre las muestras crudas y cocidas para ninguna variedad en el contenido proteico. Son de los componentes mayoritarios de las muestras y, junto con los nutrimentos inorgánicos, son el componente más importante, desde el punto de vista nutricional. Sin embargo, como ya se mencionó, las proteínas de una matriz alimentaria no están disponibles al 100%, más adelante se complementa este análisis con otra determinación.

Los hidratos de carbono son el componente mayoritario en estas muestras. Dan un panorama general del aporte de hidratos de carbono digeribles en el alimento, pero es un valor sobreestimado, pues estos valores se obtuvieron por diferencia e

incluyen la fibra dietética total. Se observan importantes diferencias entre las muestras crudas y cocidas. Ya que este no es un método de cuantificación *per se*, sino que depende de los demás datos del análisis proximal, estas diferencias se explican si se retoma lo analizado en las cenizas. La importante disminución en la cantidad de cenizas de muestras crudas a cocidas tiene efecto en la cantidad de hidratos de carbono que se calculan al final.

Para aportar un panorama más real de los resultados del análisis bromatológico de las muestras se presentan los valores expresados en muestra fresca, haciendo uso del dato de humedad original, en la tabla 4.

Tabla 4. Análisis proximal de las variedades de verdolaga cruda y cocida en forma fresca.

Componente (g/100g de muestra)	Variedad/tratamiento			
	MixCr	MixCo	NepCr	NepCo
Humedad ^a	94.37 ± 0.16	94.13 ± 0.07	93.15 ± 0.46	93.03 ± 0.23
Grasa cruda ^a	0.09 ± 0.004 ^c	0.13 ± 0.002 ^c	0.09 ± 0.005 ^d	0.14 ± 0.004 ^d
Fibra cruda ^a	0.85 ± 0.006	0.84 ± 0.012	0.99 ± 0.009	0.99 ± 0.010
Cenizas ^a	1.54 ± 0.021 ^c	0.91 ± 0.011 ^c	1.90 ± 0.060 ^d	0.98 ± 0.004 ^d
Proteína cruda ^a	1.42 ± 0.026	1.49 ± 0.012	1.13 ± 0.056	1.23 ± 0.037
Hidratos de Carbono ^b	1.73	2.49	2.74	3.64

^a Se presenta el valor promedio de la determinación ± desviación estándar.

^b Calculados por diferencia, según el esquema de Weende.

^c Datos estadísticamente distintos, según la prueba t student al 99% de confianza, entre tratamientos (cruda y cocida) para la variedad de Mixquic.

^d Datos estadísticamente distintos, según la prueba t student al 99% de confianza, entre tratamientos (cruda y cocida) para la variedad de Nepantla.

Se aprecia que los valores disminuyen, lo cual se debe a la cantidad de agua presente en el material, que disminuye la concentración de todos los componentes sólidos.

6.2. Complementación bromatológica

6.2.1. Digestibilidad proteínica *in vitro*

En seguida, en la tabla 5, se muestran los resultados de la determinación de digestibilidad junto con sus datos estadísticos correspondientes.

Tabla 5. Digestibilidad proteínica *in vitro*.

Determinación	Variedad/tratamiento			
	MixCr ^b	MixCo ^b	NepCr	NepCo
Digestibilidad <i>in vitro</i> (%) ^a	70.40 ± 0.40	72.11 ± 0.38	71.36 ± 1.25	71.58 ± 0.28

^a Se presenta el valor promedio de la determinación ± desviación estándar (n=3), CV<5%.

^b Datos estadísticamente distintos, según la prueba t student al 95% de confianza, entre tratamientos (cruda y cocida) para la variedad de Mixquic.

Las verdolagas tienen un importante potencial como fuente vegetal de proteínas. Esta determinación se llevó a cabo teniendo en cuenta la incompleta disponibilidad de estos nutrimentos para el organismo. La digestibilidad proteínica presentó ligeros cambios tras el tratamiento térmico aplicado. Para la variedad de Mixquic se encontró diferencia significativa entre la muestra cocida y la cruda, aumentó tras la cocción; sin embargo la variedad de Nepantla no mostró diferencia significativa entre tratamientos. Aunque la cocción demostró que es benéfica para biodisponibilidad de proteínas en una variedad de verdolaga, ya que el efecto no fue observado en la otra variedad no se puede declarar de manera absoluta el efecto de la cocción sobre este parámetro. Al igual que el comportamiento observado en las grasas, el calor promovió que las estructuras proteínicas perdieran resistencia y fueran más susceptibles al símil de digestión. No obstante, en este estudio no se analizaron agentes antinutrientales como inhibidores de tripsina, ya que se demostró que no son significativos en esta especie (8), se sabe que estos compuestos tienen fracciones termolábiles que se inutilizan tras el tratamiento térmico, aumentando la disponibilidad de las proteínas presentes con respecto a las muestras crudas.

Aun así los valores de todas las muestras, que rondan el 71%, son aceptables, pues la digestibilidad proteínica típica de alimentos de origen vegetal fluctúa entre 60-80%.

6.2.2. Determinación de nutrimentos inorgánicos

El contenido de nutrimentos inorgánicos presentes en la muestra podía estimarse considerando las cenizas. El valor obtenido de este parámetro señalaba un contenido alto de nutrimentos inorgánicos. A continuación en la tabla 6 se presentan

los datos obtenidos de la determinación de nutrimentos inorgánicos. Se observa que, el contenido de nutrimentos inorgánicos varía mucho tras la cocción.

Tabla 6. Determinación de nutrimentos inorgánicos.

Mineral (mg/100 g de muestra)	Variedad/tratamiento			
	MixCr	MixCo	NepCr	NepCo
Calcio	2550	3540	1640	1630
Cobre	1	1.5	2.4	2.8
Hierro	452	98	525	184
Zinc	1.4	5.9	3.4	--- ^a

^a Fuera de los límites de detección.

El contenido de cobre y zinc aumentó tras el tratamiento, mientras que las muestras perdieron hierro al someterse a cocción. El efecto de la cocción sobre el calcio es incierto, como puede observarse, en la variedad de Mixquic aumentó tras la cocción y en la variedad de Nepantla prácticamente no se vio afectado.

En la literatura se ha encontrado que el contenido de hierro para verdolaga en base seca es desde 33 mg/100 g hasta 232 mg/100g; el zinc se encuentra dentro de un rango de 1.9 a 2.84 mg/100g; el cobre no se determina con frecuencia pero se reportan 1.89 mg/100 g; y para calcio el rango es de 1000 - 1800 mg/100g (5, 45, 51 y 52).

Conociendo lo anterior, se puede considerar que las muestras no son deficientes en nutrimentos inorgánicos, pues a excepción del contenido de zinc en la muestra MixCr, los valores obtenidos se encuentran dentro de lo esperado o lo supera.

Sin embargo hay detalles importantes por señalar. Se sabe que hay factores tóxicos que secuestran cationes y los acumulan en la planta conforme ésta madura (29 y 30), por lo que se podría explicar hasta cierto punto los resultados obtenidos. Aún así, es evidente que se presentaron interferencias en la determinación de estos nutrimentos inorgánicos para la muestra MixCo, pues su contenido de calcio y zinc es alto. Es probable que, como se señaló anteriormente, la muestra se encontrara contaminada con tierra de cultivo, pese a sus lavados y acondicionamiento.

Además, no se descarta que el agua para cocción haya interferido con la determinación, tanto solubilizando y retirando nutrimentos inorgánicos de la muestra como aportándolos. El método es muy sensible (hasta ppm) pero también es muy drástico, y la digestión destruye toda materia orgánica presente, incluidos los tóxicos, y deja “desnudos” a los cationes para su posterior cuantificación, independientemente de su origen.

Es recomendable realizar más estudios al respecto, optimizando métodos de lavado y aumentando la exigencia en cuanto a la pureza del agua para cocción o considerarla en el análisis.

6.2.3. Vitamina C

Esta determinación se llevó a cabo en las muestras cocidas y en las muestras liofilizadas, debido a la baja estabilidad del ácido ascórbico que ya se discutió. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla 7.

Tabla 7. Determinación de Vitamina C.

Determinación (mg/100g)	Variedad/tratamiento			
	MixLio	MixCo	NepLio	NepCo
Vitamina C ^a	18.181 ± 0.74 ^c	4.850 ± 0.43 ^{b c}	13.965 ± 0.43 ^d	4.849 ± 0.43 ^{b d}

MixLio: fracción cruda liofilizada de la variedad proveniente de Mixquic.

NepLio: fracción cruda liofilizada de la variedad proveniente de Nepantla.

^a Se presenta el valor promedio de la determinación ± desviación estándar (n=3), CV<5%.

^b Límite de detección.

^c Datos estadísticamente distintos, según la prueba t student al 99% de confianza, entre tratamientos (cruda y cocida) para la variedad de Mixquic.

^d Datos estadísticamente distintos, según la prueba t student al 99% de confianza, entre tratamientos (cruda y cocida) para la variedad de Nepantla.

Como se esperaba, el contenido de Vitamina C en las muestras cocidas es apenas una fracción de su contenido original. El contenido de este compuesto en las muestras liofilizadas es cercano al reportado (21-27 mg/100 g) (5). La diferencia con respecto al valor reportado se debe a que se almacenó la muestra en forma de harina, en un envase no ámbar sin ningún tipo de tratamiento gaseoso, lo que aumento la superficie de contacto de la muestra con agentes oxidantes, mermando su concentración.

El tratamiento térmico disminuyó considerablemente la cantidad de ácido ascórbico presente en la muestra. Por lo que se puede considerar que las muestras sin tratamiento térmico son fuente de esta vitamina, al contrario de las muestras cocidas.

6.3. Factores tóxicos

Hay estudios previos que determinaron la toxicología analítica de las verdolagas y concluyeron que los factores tóxicos relevantes en esta planta no convencional eran los agentes antinutrimientales oxalatos y fitatos; así como un agente tóxico, los nitratos.

A continuación se presentan los resultados de las determinaciones de los factores tóxicos mencionados, en la tabla 8.

Tabla 8. Factores tóxicos en las variedades de verdolaga cruda y cocida en forma de harina.

Factor tóxico	Variedad/tratamiento			
	MixCr	MixCo	NepCr	NepCo
Oxalatos (%) ^a	10.57 ± 0.17	7.24 ± 0.29	8.49 ± 0.38	6.60 ± 0.32
Fitatos (%) ^a	2.16 ± 0.02	1.95 ± 0.01	2.25 ± 0.01	1.59 ± 0.02
Nitratos (%) ^a	6.88 ± 0.06	2.31 ± 0.01	5.75 ± 0.03	1.60 ± 0.03

^a Se presenta el valor promedio de la determinación ± desviación estándar (n=3); CV<5%.

Al igual que se realizó en el análisis proximal, el análisis de los tóxicos y el efecto del tratamiento térmico sobre estos se efectuará con base en los datos en base seca (BS). A continuación se presentarán las tablas exponiendo dichos resultados, junto con la determinación estadística, t student al 99% de confianza.

6.3.1. Agentes antinutrimientales

Se evaluaron dos agentes antinutrimientales: oxalatos y fitatos, cuyos efectos se discutieron anteriormente. A continuación se presentan sus determinaciones.

6.3.1.1. Oxalatos

En la siguiente tabla 9 se muestran los resultados para la determinación de oxalatos en base seca para ambas variedades con y sin tratamiento térmico.

Tabla 9. Determinación de oxalatos (BS).

Agente	Variedad/tratamiento			
	MixCr	MixCo	NepCr	NepCo
Oxalatos (%) ^a	11.22 ± 0.18 ^b	7.69 ± 0.31 ^b	9.02 ± 0.40 ^c	7.01 ± 0.34 ^c

^a Se presenta el valor promedio de la determinación ± desviación estándar (n=3), CV<5%.

^b Datos estadísticamente distintos, según la prueba t student al 99% de confianza, entre tratamientos (cruda y cocida) para la variedad de Mixquic.

^c Datos estadísticamente distintos, según la prueba t student al 99% de confianza, entre tratamientos (cruda y cocida) para la variedad de Nepantla.

En la literatura, los valores reportados de oxalatos se encuentran desde 2.5 hasta 15%, por lo tanto las muestras analizadas son altas en oxalatos para el promedio (5, 29 y 30).

Esto se relaciona con la cantidad de cenizas y de nutrimentos inorgánicos. Se esperaba una importante cantidad de compuestos secuestradores de nutrimentos inorgánicos dados los resultados obtenidos en la determinación de hierro y calcio principalmente. Además se aprecia que la variedad de Mixquic es considerablemente mayor en el contenido de oxalatos que la variedad de Nepantla lo que nos habla de una planta más madura y/o una muestra más contaminada, además de los inherentes efectos de las condiciones de cultivo (29 y 30).

Como se observa en la tabla 9, se encontró diferencia significativa en las muestras cocidas respecto a las crudas. El tratamiento térmico es efectivo en la reducción de este factor tóxico antinutricional, pues lo redujo cerca del 30%.

La importancia del contenido de oxalatos radica en su alta capacidad para secuestrar calcio mermando su biodisponibilidad. Generalmente se determina el efecto negativo de éstos al realizar un cálculo, relacionando la cantidad de oxalato presente y calcio de la dieta. Esto ayuda a definir si la muestra en cuestión es fuente de calcio o no. Los valores de esta relación fueron los a continuación presentes:

Tabla 10. Relación oxalato/calcio.

Variedad/tratamiento			
MixCr	MixCo	NepCr	NepCo
3.64	2.50	2.93	2.28

Todos los valores son mayores a 1, lo que significa que las muestras no son fuente de calcio y aportan suficientes oxalatos para secuestrar calcio exógeno a las verdolagas (31). La cocción disminuyó este valor, pero no lo suficiente como para considerar a las muestras seguras.

6.3.1.2. Fitatos

A continuación en la tabla 11 se muestran los resultados para la determinación de fitatos en base seca para ambas variedades con y sin tratamiento térmico.

Tabla 11. Determinación de fitatos (BS).

Agente	Variedad/tratamiento			
	MixCr	MixCo	NepCr	NepCo
Fitatos (%) ^a	2.29 ± 0.02 ^b	2.07 ± 0.01 ^b	2.39 ± 0.01 ^c	1.68 ± 0.026 ^c

^a Se presenta el valor promedio de la determinación ± desviación estándar (n=3), CV<5%.

^b Datos estadísticamente distintos, según la prueba t student al 99% de confianza, entre tratamientos (cruda y cocida) para la variedad de Mixquic.

^c Datos estadísticamente distintos, según la prueba t student al 99% de confianza, entre tratamientos (cruda y cocida) para la variedad de Nepantla.

Dado que la principal fuente de fitatos son las plantas de hojas verdes, leguminosas y cereales, su consumo en países en desarrollo es alto. Así mismo, en México la alimentación, sobre todo en poblaciones de bajos recursos se fundamenta en leguminosas y plantas, lo que aumenta el riesgo de la población de ingerir ácido fítico en la dieta.

No hay muchos estudios sobre el contenido de ácido fítico en verdolaga, pero de los pocos en los que se menciona el contenido reportado es de 0.8-0.9% (33 y 53).

Los valores determinados para las variedades de Mixquic y Nepantla se encuentran muy por encima de los pocos valores determinados hasta ahora. Estos elevados datos señalan de nuevo la madurez de las plantas (29 y 30).

Pese a que si se encontró diferencia significativa entre las muestras crudas y cocidas, el valor de las muestras cocidas, 2 y 1.7, sigue sin ser lo bastante bajo, aun rebasa los reportados. Los efectos del ácido fítico pueden ser benéficos o dañinos, dependen de la dieta completa del consumidor. Si la dieta es deficiente en nutrimentos inorgánicos y proteínas, el ácido fítico tendrá efectos adversos al secuestrar las bajas concentraciones de estos nutrimentos; en cambio si la dieta aporta las adecuadas cantidades de nutrimentos inorgánicos y además es rica en hidratos de carbono y lípidos, su efecto será benéfico por lo discutido anteriormente (19 y 34).

6.3.2. Agente tóxico

Se determinó el contenido de nitratos en las muestras de verdolaga.

6.3.2.1. Nitratos

En seguida se presenta la tabla 12 con los resultados obtenidos tras la determinación de nitratos y su análisis estadístico, para ambas variedades con y sin tratamiento térmico, expresados en base seca.

Tabla 12. Determinación de nitratos (BS).

Agente	Variedad/tratamiento			
	MixCr	MixCo	NepCr	NepCo
Nitratos (%) ^a	7.30 ± 0.07 ^b	2.45 ± 0.01 ^b	6.11 ± 0.03 ^c	1.70 ± 0.03 ^c

^a Se presenta el valor promedio de la determinación ± desviación estándar (n=3), CV<5%.

^b Datos estadísticamente distintos, según la prueba t student al 99% de confianza, entre tratamientos (cruda y cocida) para la variedad de Mixquic.

^c Datos estadísticamente distintos, según la prueba t student al 99% de confianza, entre tratamientos (cruda y cocida) para la variedad de Nepantla.

Las muestras estudiadas tienen contenidos de nitratos bastante por encima del mínimo reportado en la literatura; se reporta que la verdolaga es una planta rica en nitratos, supera normalmente el 4.21% en base seca (51).

Una vez más, los valores elevados en esta determinación son clara señal de la madurez de la planta. Así mismo, la cantidad de nitratos presentes en las plantas se ven alterados por el uso indiscriminado de fertilizantes.

Los nitratos y oxalatos están relacionados, por un mecanismo sinergista aún no muy detallado, pero se reporta que a mayor disponibilidad de nitratos, la planta incrementa su síntesis de oxalatos (29). Entonces se espera que si hay alto contenido de uno de estos factores tóxicos, se refleje en el otro. Si se retoma por un momento la tabla 8 se puede apreciar que esta observación se mantiene. La muestra procedente de Mixquic muestra mayor contenido de nitratos, así como de oxalatos, que la variedad de Nepantla, lo que concuerda con lo antes expuesto.

La cocción fue muy efectiva para disminuir este agente tóxico, pues lo disminuyó prácticamente un 70%. Según la IDA (de 3.7 mg/kg p.c./día) un adulto de 75 kg no debe consumir más de 5 g diarios de las muestras crudas en forma de harina, mientras que si están cocidas puede consumir más de 10 g.

A continuación se presentan los valores de los factores tóxicos en muestra fresca para tener un panorama real de la toxicidad de las verdolagas.

Tabla 13. Factores tóxicos en las variedades de verdolaga cruda y cocida en forma fresca.

Factor tóxico (g/100 g de muestra)	Variedad/tratamiento			
	MixCr	MixCo	NepCr	NepCo
Oxalatos ^a	0.67 ± 0.011 ^b	0.46 ± 0.018 ^b	0.54 ± 0.024 ^c	0.42 ± 0.021 ^c
Fitatos ^a	0.14 ± 0.001 ^b	0.12 ± 0.001 ^b	0.14 ± 0.001 ^c	0.10 ± 0.002 ^c
Nitratos ^a	0.44 ± 0.004 ^b	0.15 ± 0.001 ^b	0.37 ± 0.002 ^c	0.10 ± 0.002 ^c

^a Se presenta el valor promedio de la determinación ± desviación estándar (n=3); CV<5%.

^b Datos estadísticamente distintos, según la prueba t student al 99% de confianza, entre tratamientos (cruda y cocida) para la variedad de Mixquic.

^c Datos estadísticamente distintos, según la prueba t student al 99% de confianza, entre tratamientos (cruda y cocida) para la variedad de Nepantla.

Como se observó en los valores del análisis proximal en muestras frescas, en la tabla 4, los tóxicos también disminuyen si se consideran en muestra fresca, pues el contenido de agua es alto. El efecto de la cocción es menos evidente en estas cantidades, pero la disminución que promueve es importante. Las cantidades de los tóxicos analizados aún son altas y representan cierto riesgo, pero tras someterse a cocción, el riesgo por consumir estas variedades de verdolagas disminuye.

7. CONCLUSIONES

- ✿ Se trabajaron dos variedades mexicanas de verdolaga y se trataron para obtener las harinas correspondientes de muestras crudas, cocidas y liofilizadas.
- ✿ Se realizó el análisis bromatológico y se encontró que el mayor componente de esta planta fueron los hidratos de carbono, en seguida las proteínas, cenizas, fibra cruda y grasa cruda como componente minoritario.
Tras la cocción: los hidratos de carbono y la grasa cruda aumentaron, las cenizas disminuyeron, fibra y proteína crudas no sufrieron cambios.
- ✿ Se determinó la digestibilidad proteínica; tras la cocción la biodisponibilidad aumentó en la variedad de Mixquic y en la variedad de Nepantla se mantuvo igual.
- ✿ El efecto de la cocción sobre los nutrimentos inorgánicos no fue contundente. Se provocaron interferencias debido al origen del agua para cocción y el método de acondicionamiento de la muestra.
- ✿ Las muestras presentaron altos contenidos en los factores tóxicos analizados (oxalatos, fitatos y nitratos). La cocción tuvo efectos benéficos y disminuyó estos valores, particularmente los nitratos.
- ✿ Según la relación oxalato/calcio, la verdolaga demostró ser mala fuente de calcio y puede interferir con calcio exógeno a la verdolaga.
- ✿ El contenido de ácido fítico fue alto y la cocción promovió una disminución promedio del 20%. Las consecuencias de su consumo dependen de la dieta completa del individuo.
- ✿ La forma de consumo es en fresco, por lo que al considerar humedad superior al 90%, los valores de todas las determinaciones disminuyeron.
- ✿ El efecto producido por la cocción se mostró claramente, no dañó drásticamente el aporte nutricional de las muestras; se perdió la Vitamina C, pero aumentó la digestibilidad de una variedad. Y lo más importante es que disminuyó significativamente las cantidades de factores tóxicos presentes.
- ✿ No es recomendable consumir con mucha frecuencia ni en altas cantidades la verdolaga cruda, pero puede tolerarse un consumo moderado si se encuentran cocidas, a reserva de la dieta completa del individuo y su estado de salud.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Instituto Nacional de Salud Pública. 2012. Encuesta Nacional de Salud Pública 2012 (resultados nacionales). Subdirección de comunicación científica y publicaciones del INSP, Cuernavaca.
2. Mera, L. M., Castro, D. y Bye, R. 2011. Especies Vegetales poco Valoradas (Una alternativa para la seguridad alimentaria). Publicación de la Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
3. Valle, P y Lucas B. 2000. Toxicología de alimentos. Instituto Nacional de Salud Pública, Ciudad de México.
4. Mera, L. Bye R., Castro, D. y Villanueva, C. 2011. Documento diagnóstico de *Portulaca oleracea* L. Universidad Autónoma de Chapingo-SINAREFI, Texcoco.
5. Uddin, K., Juraimi, A., Hossain, S., Nahar, A., Ali, E. and Rahman, M. 2014. Purslane Weed (*Portulaca oleracea*): A prospective plant source of nutrition, omega-3 fatty-acids, and antioxidant attributes. *The Scientific World Journal*. 2014 (1), 1-6.
6. Bohn, L., Meyer, A. and Rasmussen, S. 2008. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *Journal of Zhejiang University Science B*. 9 (3), 165-191.
7. Calco, M. y Mendoza, E. 2012. Toxicología de los alimentos. McGraw-Hill, Madrid.
8. Terron, J. 2016. Caracterización bromatológica y determinación de factores tóxicos naturales en 6 variedades de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) de uso alimenticio. Tesis de la Facultad de Química, UNAM, Ciudad de México.
9. FAO: Glosario de términos. Pág. WEB: <http://www.fao.org/docrep/014/am401s/am401s07.pdf> (consultada Junio/2017)
10. Carbajal, A. 2016. Los alimentos como fuente de energía, nutrimentos y otros bioactivos. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
11. Langham, R. 2015. Macronutrimentos y micronutrimentos. FAO, Roma.
12. Espetix, E. y Gracia, M. 1999. La alimentación humana como objeto de estudio para la antropología: posibilidades y limitaciones. *Revista Internacional de Ciencias Sociales*. 19 (1), 137-152.
13. Mera, L. Bye. R. (Compiladores). 2011. Especie vegetales poco valoradas: una alternativa para la seguridad alimentaria. UNAM-SNICS-SINAREFI, Texcoco.
14. Bourges, H., Morales, J., Vázquez, N., 2013. Quelites: ¿un alimento de segunda? Composición nutrimental de los quelites. Cuadernos de Nutrición 36 (1), 17-30.
15. Bye, R. y Linares, E. 2000. Los quelites, plantas comestibles de México- una reflexión sobre el intercambio cultural. *Biodiversitas*. 31,11-14.
16. Bye, R. y Linares, E. 2010. Los principales quelites de México. En: E. Linares y J. Aguirre (Eds), Los quelites, un tesoro culinario. UNAM, Instituto de Biología e Instituto Nacional de Nutrición S.Z., Ciudad de México.

17. Bourges, H., Morales, J. y Vázquez, N., 2013. Quelites: ¿un alimento de segunda? Composición nutrimental de los quelites. *Cuadernos de Nutrición* 36 (1), 17-30.
18. Calderón, G. 2001. Portulacaceae. En: Rzedowski, G.C. de, Rzedowski y colaboradores. *Flora fanerogámica del Valle de México*. Instituto de Ecología A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro.
19. Iranshahi, M., Javadi, B., Iranshahi, M., Pardis, S., Mahyari, S., Vahdati, F. and Karimi, G. 2017. A review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Portulaca oleracea* L. *Journal of Ethnopharmacology*. 205 (2017), 158-172.
20. Oliveira, I., Valentão, P., Lopes, R., Andrade, P., Bento, A. and Pereira, J. 2009. Phytochemical characterization and radical scavenging activity of *Portulaca oleracea* L. leaves and stems. *Microchemical Journal*. 92 (2009), 129-134.
21. Greenfield, H. and Southgate, D. 2003. *Food composition data: production, management and use. Review of methods of analysis*. FAO, Roma
22. Belitz, H., Grosch, W. and Schieberle, P. 2009. *Food chemistry*. Springer, Berlin.
23. Fennema, O., Damodaran, S. y Parkin, K. 2000. *Química de alimentos*. Acribia, Zaragoza.
24. Thompson, J., Manore, M. and Vaughan, L. 2011. *The science of nutrition*. Pearson, San Francisco.
25. Escudero, E. y González, P. 2006. Fibra dietética. *Nutrición Hospitalaria*. 21 (2), 61-72.
26. Swaisgood, H. and Catignani, G. 1991. Protein digestibility: *in vitro* methods of assessment. *Advances in Food and Nutrition Research*. 35, 185-236.
27. Schaafsma, G. 2000. The Protein Digestibility. *The Journal of Nutrition*. 130 (7), 1865s- 1867s.
28. Khan, S. 1995. *Calcium oxalate in biological systems*. CRC Press, Florida.
29. Noonan, S. and Savage, G. 1999. Oxalate content of food and its effect on humans. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 8 (1), 64-74.
30. Savage, G. 2007. Oxalate content of raw and cooked purslane. *Journal of Food Agriculture and Environment*. 5 (1), 124-128.
31. Deshpande, S. 2002. *Handbook of Food Toxicology*. Marcel Dekker, Nueva York.
32. Fekadu, H. and Ratta, N. 2014. Antinutritional factors in plant foods: Potential health benefits and adverse effects. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*. 3 (4), 284-289.
33. Alam, A., Juraimi, A., Rafii, M., Hamid, A. and Hakim, A. 2014. Morpho-physiological and mineral nutrient characterization of 45 collected purslane (*Portulaca oleracea* L.) accessions. *Crop Production and Management*. 73 (4), 426-437.
34. Rickard, S. and Thompson, L. 1997. *Interactions and Biological effects of phytic acid*. In: *Antinutrients and phytochemicals in food*. Shahidi, F. (Ed.). American Chemical Society, Washington, DC.

35. Speijers, G. 2011. Nitrate and nitrite in drinking water. WHO, Genova.
36. Speijers, G. and Brandt, P. van den. 2003. Nitrate and potential endogenous formation of N-nitroso compounds. WHO, Genova.
37. Kara, M. and Sermenli, T. 2016. The studies on nitrate-nitrite accumulation and health concerns. *International Symposium on Environment and Morality*. 4 (6), 755-760.
38. Helrich, K. 1990. Official Methods of Analysis of the Association Official Analytical Chemists, 16th edition, vol. 2, AOACI, Arlington.
39. Horwitz, W. and Latimer, G. 2005. Official Methods of Analysis of the Association Official Analytical Chemists International, 17th edition, AOACI, Gaithersburg.
40. Hansen, T., Bang, D., Laursen, K., Pedas, P., Husted, S. and Schjoerring, J. 2013. Multielement plant tissue: analysis using, ICP spectrometry. In: Plant mineral nutrients (methods and protocols). Maathius, F. (Ed.). Human Press, Londres.
41. Helrich, K. 1990. Official Methods of Analysis of AOAC, 15th edition, vol. 2, AOAC, Arlington.
42. Sotelo, A., Mendoza, J. y Argote, R. 2003. Contenido de ácido fítico en algunos alimentos crudos y procesados. Validación de un método colorimétrico. *Revista de la Sociedad Química de México*. 46 (4), 301-306.
43. Cataldo, D., Haroon, M., Schrader, L. and Youngs V. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Soil Plant Annual*. 6, 71-80.
44. Coronado, J., Corral, A., López, P., Miñano, R., Ruíz, B y Villán, J. 1994. Estadística aplicada con Statgraphics. Addison-Wesley Iberoamericana, Delaware.
45. Abd El-Aziz, H., Sobhy, M., Ahmed, K., Abd El-Hameed, A., Rahman, Z. and Hassan, W. 2014. Chemical and remedial effects of purslane (*Portulaca oleracea*) plant. *Life Science Journal*. 11 (6), 31-42.
46. Vengris, J., Dunn, S. and Stacewicz-Sapuncakis, M. 1972. Life history studies as related to weed control in the northeast; common purslane. University of Massachusetts, Massachusetts.
47. Domiszewski, Z., Bienkiewicz, G. and Plust, D. 2011. Effects of different heat treatments on lipid quality of striped catfish. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*. 10 (3), 359-373.
48. Charters, S. and Evershed, R. 1997. The behavior of epicuticular leaf wax during boiling of a leafy vegetable. *Journal of Archeological Science*. 24 (1), 1-7.
49. Eglinton, G. and Hamilton, R. 1967. Leaf epicuticular waxes. *Science*. 156 (3780), 1322-1335.
50. Koch, K. and Ensikat, H. 2008. The hydrophobic coatings of plant surfaces: epicuticular wax crystals and their morphologies, crystallinity and molecular self-assembly. *Micron*. 39 (7), 759-772.

51. Gonella, M., Charfeddine, M., Conversa, G. and Santamaria, P. 2010. Purslane: a review of its potential for health and agricultural aspects. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*. 4 (1), 131-136.
52. Aberoumand, A. 2012. Screening of phytochemical compounds and toxic proteinaceous protease inhibitor in some lesser-known food based plants and their effects and potential applications in food. *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*. 2 (3), 16-20.
53. Aberoumand, A. 2011. Protein, fat, calories, minerals, phytic acid and phenolic in some plant foods based diet. *Food Processing & Technology*. 2 (3), 2-4.
54. Pinela, J., Carvalho, A. and Ferreira, I. 2017. Wild edible plants: Nutritional and toxicological characteristics, retrieval strategies and importance for today's society. *Food and Chemical Toxicology*. 110 (2017), 165-188.

9. BANCO DE IMÁGENES

- Figura 1. Estructura del ácido *L*-ascórbico (vitamina C) y reacción de oxidación de la que resulta el ácido dehidroascórbico. De: Meléndez, E. 2011. Vitamina C. Instituto del Metabolismo Celular (IMC). WEB: <http://www.metabolismo.biz/web/category/investigacion/metabolismo/> (Consultado el 03/11/2017).
- Figura 2. Estructura del oxalato. De: Rzepa, H. 2017. The mechanism of thermal decomposition of magnesium oxalate. WEB: <https://www.ch.imperial.ac.uk/rzepa/blog/?p=16619> (Consultado el 27/02/2018).
- Figura 3. Estructuras del ácido fítico y un ejemplo de la capacidad secuestradora de cationes. De: VEMOZYMEF. 2018. VEMO. WEB: <http://vemo-feedadditives.com/en/products/vemozymef> (Consultado el 27/02/2018).