

20
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**ADAPTACION Y VALIDACION DE METODOS
CUANTITATIVOS PARA DETERMINAR NITRATOS
Y TANINOS EN MUESTRAS VEGETALES**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
GUADALUPE AIDA HIDALGO ARROYO



MEXICO, D. F.

1999



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

273941

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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:

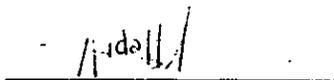
Presidente	Prof. Valle Vega Pedro
Vocal	Prof. Lucas Florentino Bernardo
Secretario	Prof. Iturbe Chiñas Francisca
1er. Suplente	Prof. Flores Tellez I. María de Lourdes
2o. Suplente	Prof. Gil Vieyra Leticia

El tema fue desarrollado en el laboratorio 111 del Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química, Ciudad Universitaria.

M. en C. Bernardo lucas Florentino



Guadalupe Aida Hidalgo Arroyo



A mis padres Jorge y Rebeca por todo su amor, dedicación, apoyo y por la formación y el maravilloso ejemplo que me han brindado.

A mis hermanos Jorge y Oliver por su estímulo, cariño y comprensión.

A Lulú por su apoyo, su paciencia y por la maravillosa amistad incondicional que me ha brindado.

A todos mis amigos que han estado junto a mí y me han entregado su cariño.

Con especial agradecimiento al M. en C. Bernardo Lucas Florentino por el invaluable apoyo y dedicación que me brindó para la realización de este trabajo.

A la UNAM y a la Facultad de Química por haberme formado profesionalmente.

Al M. en C. Miguel Hernández Infante y al Dr. Marco Soto por el amplio respaldo para la realización de los ensayos interlaboratorio.

A Lety y Rosita por su importante colaboración en los ensayos intralaboratorio y por la ayuda recibida en el laboratorio 111.

A Milton, Andrés, Aurora y Juan Carlos por la gran ayuda que representó su cooperación.

INDICE

Introducción1

Objetivos3

I.- Antecedentes

1.- Nitratos

1.1 Importancia en el reino vegetal	4
1.2 Propiedades químicas	6
1.3 Antecedentes toxicológicos	6
1.4 Propiedades terapéuticas	7
1.5 Metabolismo y efectos tóxicos en el hombre y en los animales	8
1.5.1 Metahemoglobinemia	9
1.5.2 Nitrosaminas y cáncer	12
1.5.3 Otros efectos	16
1.6 Decremento por procesos culinarios	16
1.7 Dosis diaria admisible.....	17
1.8 Usos	17
1.9 Métodos analíticos para su determinación.....	17

2.- Taninos

2.1 Importancia en el reino vegetal	19
2.2 Propiedades químicas	21
2.3 Efectos tóxicos en el hombre y en los animales	23
2.3.1 Complejación de nutrimentos.....	25
2.3.2 Inhibición enzimática	27
2.4 Efectos positivos	27
2.5 Decremento por procesos culinarios	28
2.6 Dosis diaria admisible	29
2.7 Usos	29
2.8 Métodos analíticos para su determinación	29

3.- Validación de metodologías

3.1 Especificidad	32
3.2 Linealidad	32
3.3 Precisión	33
3.4 Exactitud	33
3.5 Sensibilidad	34
3.6 Estabilidad de la muestra	34

II.- Metodología

1.- Aspectos generales	36
------------------------------	----

2.- Nitratos

2.1 Muestra de referencia	41
---------------------------------	----

2.2 Métodos

2.2.1 Método enzimático	42
2.2.2 Método colorimétrico	43
2.2.3 Cromatografía de gases	44
2.2.4 Método de Cataldo.....	45

3.- Taninos

3.1 Muestra de referencia	49
---------------------------------	----

3.2 Métodos

3.2.1 Método Azul de Prusia	50
3.2.2 Método ISO	51

4.- Validación

4.1 Linealidad del sistema	54
4.2 Precisión del sistema	54
4.3 Precisión del método	55
4.4 Linealidad del método	55
4.5 Límite de detección	56
4.6 Límite de cuantificación	56
4.7 Estabilidad del extracto	57
4.8 Ensayo de colaboración intralaboratorio	58
4.9 Ensayo de colaboración interlaboratorio	58

III.- Resultados y discusión

1.- Nitratos

1.1 Método enzimático	59
1.2 Método colorimétrico	62
1.3 Cromatografía de gases	63
1.4 Método de Cataldo	71

1.4.1 Validación

1.4.1.1 Linealidad del sistema	72
1.4.1.2 Precisión del sistema	73
1.4.1.3 Precisión del método	74
1.4.1.4 Linealidad del método	75
1.4.1.5 Límite de detección.....	76
1.4.1.6 Límite de cuantificación	78
1.4.1.7 Estabilidad del extracto	79
1.4.1.8 Ensayo de colaboración tralaboratorio.....	80
1.4.1.9 Ensayo de colaboración interlaboratorio	82
1.5 Determinación en muestras de interés.....	83

2.- Taninos

2.1 Método de Azul de Prusia	87
2.2 Método ISO	89

2.2.1 Validación

2.2.1.1 Linealidad del sistema	93
2.2.1.2 Precisión del sistema	94
2.2.1.3 Precisión del método	95
2.2.1.4 Linealidad del método.....	96
2.2.1.5 Límite de detección	97
2.2.1.6 Límite de cuantificación	98
2.2.1.7 Estabilidad del extracto	99
2.2.1.8 Ensayo de colaboración intralaboratorio	101
2.2.1.9 Ensayo de colaboración interlaboratorio	102

2.3 Determinación en muestras de interés.....	104
---	-----

IV.- Conclusiones.	107
-------------------------	-----

Anexo 1.....	109
--------------	-----

Anexo 2.....	115
--------------	-----

Anexo 3	120
---------------	-----

Anexo 4	121
---------------	-----

Anexo 5	121
---------------	-----

Anexo 6	122
---------------	-----

Bibliografía	124
--------------------	-----

INTRODUCCIÓN

Los alimentos de origen animal poseen un elevado valor nutritivo; sin embargo, son prácticamente inaccesibles para una gran parte de la población, en cambio los alimentos de origen vegetal tienen gran importancia comercial por su menor precio además de su adecuado valor nutritivo; por estas características son ampliamente usados en la alimentación humana y animal.

Las plantas producen y acumulan un extenso conjunto de metabolitos indispensables para su desarrollo así como metabolitos secundarios que juegan un papel importante en el mecanismo de defensa contra la depredación; muchas de estas sustancias son tóxicas para el hombre y los animales dependiendo de la dosis absorbida, entre éstos se encuentran los nitratos clasificados dentro del primer grupo y los taninos correspondientes al segundo grupo.

Los factores tóxicos y antinutricionales muestran diversos efectos biológicos negativos, razón por la cual se requiere elaborar estrategias para limitar su daño, por lo anterior resulta indispensable desarrollar y optimizar técnicas analíticas confiables, rápidas y sencillas que permitan determinar y cuantificar fácilmente dichas sustancias para predecir el posible riesgo potencial de los alimentos que los contienen.

Los nitratos son componentes normales de diversas plantas. Son relativamente inocuos, su importancia toxicológica radica en su transformación a nitritos por la flora bucal e intestinal. Los nitritos se combinan con la hemoglobina para formar metahemoglobina con lo que pierde su capacidad para transportar oxígeno. Por otro lado, los nitritos forman nitrosaminas, compuestos altamente cancerígenos.

Los taninos son polifenoles que se distribuyen ampliamente en la naturaleza. Dichos compuestos se consideran factores antinutricionales ya que forman complejos insolubles con proteínas, por lo que se imposibilita su digestión; además interfieren con la digestión de otros nutrimentos porque son potentes inhibidores enzimáticos.

En la actualidad se cuenta con pocas metodologías validadas para la cuantificación de nitratos y taninos presentes en los alimentos de origen vegetal, principalmente frutos y semillas, por ello es importante identificar y validar métodos que cumplan con dicho papel, con el fin de contribuir a una mejor caracterización químico toxicológica de estos alimentos.

En el presente trabajo se evaluaron cuatro métodos para la determinación de nitratos, y sólo uno de ellos, el de Cataldo, dio resultados satisfactorios de acuerdo a los criterios establecidos en los parámetros de validación. En el caso de taninos se evaluaron dos metodologías, de las cuales el método ISO 9648 cumplió con los requisitos estadísticos en el proceso de validación.

El proceso de validación consistió en evaluar los parámetros estadísticos linealidad, precisión, exactitud, reproducibilidad, entre otros; de los cuales se obtuvo la información necesaria sobre la confiabilidad de las metodologías.

Con los métodos de Cataldo para nitratos y el ISO 9648 para taninos, se complementó la validación con estudios intralaboratorio e interlaboratorio y la cuantificación de ambos tóxicos en algunas muestras de interés.

OBJETIVOS

1. Seleccionar métodos sencillos y rápidos de identificación y cuantificación de nitratos y taninos en muestras vegetales, que no requieran equipo e infraestructura sofisticados, con el fin de validarlos e implantarlos.
2. Aplicar los métodos validados en diversas muestras vegetales para cuantificar nitratos y taninos en éstas.
3. Contribuir a una mejor caracterización químico toxicológica de los alimentos de origen vegetal.

I.- ANTECEDENTES

1.- NITRATOS

Numerosas plantas y animales que el hombre emplea como alimento, tienen como constituyentes naturales sustancias químicas que a cierta concentración poseen propiedades tóxicas. La presencia de estas sustancias en los alimentos de origen vegetal y la concentración en la que se encuentran depende entre otros factores de las características del suelo en el que se cultivan (Roberts, 1981).

Los nitratos se encuentran presentes en los alimentos de origen vegetal como componentes inherentes a las plantas, en el aire que respiramos y como contaminante en el agua potable debido al uso de fertilizantes nitrogenados; cuando la planta ha satisfecho sus demandas de nitrógeno, el porcentaje restante es arrastrado por el agua a través del suelo acumulándose en los mantos freáticos, ya que los nitratos son muy solubles (Alfonso, 1988; Committee on food protection, 1973).

1.1 Importancia en el reino vegetal

La acumulación de nitratos a partir del suelo es una característica de gran importancia para las plantas, ya que es en esta forma cómo la raíz toma el nitrógeno del suelo, lo transforma a amoníaco y lo transporta a las hojas para intervenir en la síntesis de proteínas. El proceso de acumulación es muy complejo y puede estar influido por diversos factores como la variedad y especie de la planta, el grado de maduración, su estado de salud, el contenido de humedad, el tipo de suelo, la cantidad de luz recibida y la época de cosecha. En condiciones de estrés como temporadas de sequía, vientos

calientes y secos y climas fríos, se registra una gran acumulación (Alfonso, 1988; Committee on food protection, 1973; González, 1989). Durante el crecimiento inicial el nitrato tomado por la planta se emplea para el desarrollo de la raíz y la germinación, por lo cual en esta etapa las raíces toman más nitrato del que requieren, acumulándose en los tallos y hojas de la planta. Conforme se desarrolla la planta, las hojas son capaces de convertir el excedente en proteínas, por lo tanto se encuentra una menor cantidad de nitrato en la planta cuando ésta se ha desarrollado completamente. Los cultivos anuales tienden a acumular mayores cantidades de nitratos que los perennes, ya que los primeros se plantan usualmente en pasto bien fertilizado, abonado y recientemente arado y se cosechan en una etapa temprana de maduración, cuando el contenido de nitrato es mayor. El contenido de nitratos varía en diferentes partes de la planta. Los niveles mayores se encuentran en los tallos y en las hojas; en cambio en las flores son menores y las semillas usualmente se encuentran libres de éstos (URL 1, 1998).

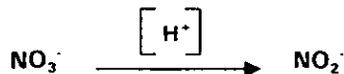
Recientemente se ha descubierto que el uso frecuente de fertilizantes con alto contenido de nitrógeno incrementa los niveles de nitratos en las plantas, ya que el nitrógeno en presencia de humedad se convierte a nitrato por acción de las bacterias que forman parte de la flora microbiana del suelo como *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*. Entre las principales plantas que los contienen se encuentran el rábano, el pepino, el nabo, el sorgo dulce, la acelga, la lechuga, el apio y la espinaca (Ockerman, 1978; Lindner, 1995). En Estados Unidos el promedio de ingesta de nitratos es aproximadamente de 75 - 100 mg por día, cerca del 80-90% de esta cantidad proviene de los vegetales. Personas con régimen alimenticio vegetariano pueden tener

una ingestión de nitratos de alrededor de 250 mg por día, el cual es un nivel muy elevado (Committee on food protection, 1973).

1.2 Propiedades químicas

Químicamente el ion nitrato es una molécula plana y simétrica formada por un átomo de nitrógeno y tres de oxígeno, con una carga negativa, cuya fórmula es NO_3^- , es pequeño con peso molecular de 62 g/mol, es estable y altamente soluble.

El ion nitrato es factible de reducirse a ion nitrito lo cual, como se verá más adelante, tiene grandes implicaciones toxicológicas.



1.3 Antecedentes toxicológicos

El primer caso de intoxicación mortal por nitratos fue descrito por Mayo en 1895, cuando ejemplares de ganado bovino murieron después de ingerir grandes cantidades de maíz verde; el autor concluyó que se trataba de un envenenamiento con potasio por que los análisis mostraban que los tallos contenían un alto porcentaje de nitrato de potasio (KNO_3). Hacia 1940 se identificó el ion nitrato como el verdadero agente tóxico inicial, ya que se observó que los nitratos se acumulaban en los forrajes verdes y eran reducidos a nitritos en el rumen al ser ingeridos por los bovinos (Committee on food protection, 1973). Hacia 1945, Colmy describió la sintomatología de la metahemoglobinemia infantil; finalmente, en 1956, Magee y Barnes evidenciaron la

síntesis, a partir del ion nitrito y de las aminas, de la dimetilnitrosamina con lo que descubrieron sus potencialidades cancerígenas (Derache, 1990).

Entre los años 1959-1965 se registraron en Alemania 15 casos de envenenamiento por nitratos en lactantes alimentados con espinacas (Lindner, 1995).

Los nitratos contenidos en la planta por lo general no son muy tóxicos; su toxicidad radica en la reducción de nitratos NO_3^- a nitritos NO_2^- , la cual no se produce de forma automática (Roberts, 1981; Reichigl, 1983). Ambos iones sólo comparten una cierta similitud química ya que el ion nitrito en contraste con el nitrato, es inestable, por lo tanto es muy reactivo y está dotado de numerosos efectos tóxicos (Roberts, 1981; Derache, 1990).

1.4 Propiedades terapéuticas

Se ha comprobado en animales de laboratorio que pueden ingerir crónicamente dosis elevadas de nitrato de sodio sin sufrir daños importantes. El único síntoma característico es su carácter diurético, esta cualidad terapéutica se ha empleado desde el siglo XII. El modo de acción diurético es de tipo osmótico: el ion nitrato desplaza una importante fracción de ion cloro y provoca paralelamente una pérdida de sodio, y por lo tanto de agua; además los cationes empleados (K^+ y Na^+) participan también en esta acción diurética, determinando también una excreción incrementada de sodio y de agua. Actualmente, el nitrato de potasio se emplea con fines terapéuticos para combatir las alteraciones debidas a una hipocalemia, pues el ion nitrato asociado al ion potasio induce diuresis y elimina las carencias potásicas (Committee on food protection, 1973; Derache, 1990). También se emplea en el tratamiento de angina de pecho para mitigar el dolor.

1.5 Metabolismo y efectos tóxicos en el hombre y en los animales

Sólo en dos condiciones se puede tener una toxicidad por nitratos: en primer lugar por una ingestión masiva de estos compuestos y en segundo lugar si los mismos se transforman en nitritos por la microflora digestiva. El metabolismo de los nitratos ingeridos es conocido, se absorben muy rápidamente a nivel del intestino delgado, una cierta fracción, difícil de estimar se recicla a nivel enterohepático y sobre todo por las glándulas salivares, los nitratos se eliminan rápidamente por vía urinaria.

Ya se mencionó anteriormente que el peligro de los nitratos reside en su eventual transformación en nitritos dentro del organismo. El paso del ion NO_3^- al ion NO_2^- no es posible de forma espontánea ya que se trata de una reducción que necesita por lo tanto energía: en los medios biológicos esta reducción sólo puede efectuarse bajo la acción de una enzima, la nitrato reductasa, presente en las plantas (formando parte de su metabolismo) y en las bacterias, pero esta enzima está totalmente ausente en los tejidos animales. Existen, sin embargo pequeñas cantidades de nitritos en la cavidad bucal (del orden de 10 ppm en la saliva), que provienen precisamente de la acción de la flora sobre los nitratos de origen alimentario o sobre aquellos reciclados por las glándulas salivares; el pH de acción de la nitrato reductasa bacteriana es del orden de 6-6.4, que encontramos a este nivel. En el resto del tubo digestivo esta reducción no parece ser posible más que en condiciones patológicas, como cuando se da una aclorhidria gástrica, y sobre todo en el caso de enteritis graves que determinan el desarrollo de una flora nitritógena muy activa.

1.5.1 Metahemoglobinemia

Existen dos categorías de organismos capaces de efectuar rápidamente esta transformación de nitratos a nitritos (Derache, 1990; Lindner, 1995):

- El bebé hasta los 6 meses aproximadamente, que es especialmente sensible a la ingestión de nitratos por varias razones específicas. La reducción de nitratos a nitritos puede tener lugar en la primera porción del intestino delgado de los lactantes, lo cual dá lugar a elevados niveles de nitritos en la sangre y ocasiona metahemoglobinemia o "síndrome del bebé azul".

La metahemoglobinemia aparece cuando la hemoglobina, encargada de transportar el oxígeno en la sangre, se oxida a metahemoglobina por acción de los nitritos, provocando que no transporte el oxígeno através del cuerpo de forma eficiente. Como resultado, los tejidos vitales incluyendo el cerebro reciben menos oxígeno del que requieren, aquellos con altas demandas de oxígeno como el sistema nervioso central y el sistema cardiovascular son los primeros en manifestar signos de intoxicación. Aparecen síntomas característicos de la cianosis, la coloración de la piel y las mucosas, especialmente en la cara y las extremidades, toman matices grisáceos que se vuelven negruzcos en formas avanzadas. Severas metahemoglobinemias producen daño cerebral e incluso la muerte.

Niveles normales de metahemoglobina en la sangre son de 0-3%, niveles mayores ocasionan los síntomas antes descritos (URL 2, 1998).

Los niños son más susceptibles a padecer la metahemoglobinemia en los primeros seis meses de vida, debido a varias razones:

En primer lugar, debido a que la acidez del estómago en los lactantes no es tan alta como en los niños mayores y en los adultos, las bacterias reductoras son más abundantes, por lo tanto se incrementan los niveles de nitrito en la sangre; en segundo lugar los lactantes poseen todavía bastante hemoglobina fetal que se oxida a metahemoglobina a doble velocidad que la hemoglobina del adulto. El sistema enzimático que reduce la metahemoglobina a hemoglobina (metahemoglobina reductasa y NADH_2) es menos activo en los lactantes que en los adultos, de forma que se puede producir una intoxicación grave (Lindner, 1995).

Además de los lactantes, algunos adultos son susceptibles a padecer metahemoglobinemia inducida por nitritos, en este grupo se encuentran mujeres embarazadas con una deficiencia enzimática particular: Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa (G6PD), aquellos con una deficiencia en el sistema enzimático reductor de la metahemoglobina, condición que obedece a patrones hereditarios y por último un grupo particularmente sensible que incluye a los pacientes sometidos a diálisis quienes son extraordinariamente susceptibles a padecer metahemoglobinemia. Aunque no se ha estimado con certeza la población sensible a nitratos, diversos estudios indican que la deficiencia en la enzima reductora de la metahemoglobina afecta a un 7% aproximadamente de los hombres afroamericanos y una cifra de 140,000 personas reciben tratamiento de diálisis cada año (URL 3, 1998).

Afortunadamente la metahemoglobinemia se diagnostica fácilmente y por lo tanto puede ser tratada con rapidez. En las formas leves o moderadas se administran dosis

elevadas de ácido ascórbico que induce la reducción lenta y directa de la metahemoglobina. En los casos límite donde el ácido ascórbico es insuficiente, se administra lentamente, por vía intravenosa azul de metileno (URL 2, 1998).

- Tratándose de animales, los monogástricos como los caballos y los cerdos son menos propensos a ser intoxicados por nitratos (González, 1989), ya que la conversión de nitratos a nitritos en el intestino se lleva acabo en la porción terminal del tracto digestivo, en donde hay una menor oportunidad de que los nitritos sean absorbidos por la sangre (URL 1, 1998). Los poligástricos como los rumiantes, generalmente son los más afectados. Los bovinos poseen el mayor índice de intoxicación documentado hasta el momento. En los rumiantes el rumen tiene un pH neutro, temperatura estable y la flora es muy abundante por lo cual es en esta zona en donde se lleva acabo la reducción. En condiciones normales el nitrito se transforma en amoniaco, el exceso de este se absorbe en la sangre y pasa a la orina como urea; sin embargo cuando los animales consumen forraje rico en nitratos, éstos no se convierten totalmente a nitritos, lo cual ocasiona que ambos iones se acumulen en el rumen. El nitrato recircula continuamente a partir del bolo que ha sido digerido en el rumen, por lo que la adición de nuevas dosis de nitrato intensifica el problema. El envenenamiento con nitrato ocurre cuando el nivel de nitrito en el rumen supera la capacidad de los microorganismos de convertirlo a amoniaco, cuando esto sucede el nitrato y el nitrito se absorben através de la pared del rumen al torrente sanguíneo causando metahemoglobinemia (González, 1989). El nitrato presente en la sangre no crea el problema inicial; sin embargo puede ser recirculado al rumen vía saliva o secreciones intestinales y así convertirse a nitrito para ser reabsorbido por el torrente sanguíneo, lo cual incrementa el riesgo.

La toxicidad crónica por nitratos se caracteriza por un envenenamiento en donde los signos clínicos de la enfermedad no se manifiestan, es más común observar una disminución en la producción de leche, pérdida de peso, pérdida de apetito y una gran susceptibilidad a infecciones; esto ocurre cuando los niveles de nitrato en el alimento se encuentran entre el 0.5 y el 1% (Alfonso, 1988; González, 1989). El envenenamiento crónico también ocasiona abortos en los primeros 100 días de gestación ya que los nitratos interfieren con la implantación del huevo en el útero.

En el caso del envenenamiento agudo se observan algunos signos típicos en el animal como incremento en el pulso cardiaco, vómito, debilidad, membranas mucosas azul grisáceas, abundante secreción de saliva y lágrimas. El animal se encuentra en condiciones críticas y puede morir en pocas horas después de la ingestión inicial de dosis mayores al 1% de nitrato en el alimento (URL 1, 1998; URL 4, 1998).

La leche por lo general contiene bajos niveles de nitratos; sin embargo la leche producida por animales alimentados con forraje rico en nitratos presenta altas concentraciones de dicho ion (URL 5, 1998).

1.5.2 Nitrosaminas y cáncer

Durante muchos años se ha sabido que los nitratos tienen la capacidad de formar compuestos cancerígenos. Los nitratos por sí solos no son cancerígenos, pero actúan como pro-cancerígenos, lo cual quiere decir que reaccionan con otras sustancias para formar compuestos que sí lo son, a través de un proceso de numerosas etapas:

Primero el nitrato es reducido a nitrito después de la ingestión. En segundo lugar el nitrito reacciona con compuestos orgánicos conocidos como aminas secundarias o

amidas, presentes en los alimentos, para formar nuevas entidades químicas conocidas como N-nitroso compuestos ya sean nitrosaminas o bien nitrosamidas, muchas de las cuales son cancerígenas.

En la figura siguiente se esquematiza la formación de estos compuestos:

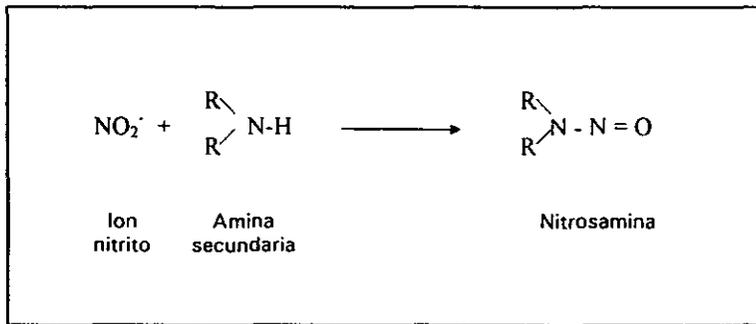


Figura 1. Síntesis química de compuestos N-nitrosados

Dentro del organismo esta síntesis se lleva a cabo en el estómago ya que se reúnen las condiciones necesarias como pH ácido, nitrito libre, aminas secundarias básicas provenientes de los alimentos o medicamentos (Taylor *et al.*, 1989). Algunas verduras tienen simultáneamente cantidades elevadas de aminas secundarias y nitratos, como por ejemplo las espinacas, los rábanos y la lechuga, lo que favorece la aparición de nitrosaminas (Lindner, 1995).

En estudios realizados con animales, esta clase de compuestos se ha asociado con 15 diferentes tipos de cánceres, incluyendo tumores en la vesícula, el estómago, el cerebro, el esófago, huesos, piel, riñones, hígado, pulmones, cavidades oral y nasal, páncreas, sistema nervioso periférico, tiroides, tráquea y linfoma de las células B y T. Una amplia gama de tumores, mayor que de cualquier otro grupo de cancerígenos. Más de cien de estos N-nitroso compuestos se han probado para determinar la carcinogenicidad en animales, y se ha encontrado que el 75-80% de éstos son cancerígenos. Existen evidencias de que muchos de estos compuestos son cancerígenos en humanos; analizando numerosos estudios epidemiológicos, la Academia Nacional de Ciencias ha establecido que no hay razón alguna para suponer que el hombre no es susceptible. En los humanos los órganos que son más propensos a ser afectados por cáncer causado por la formación de nitrosaminas son el estómago, el esófago y la vejiga, así mismo, las nitrosaminas se asocian con el cáncer nasofaríngeo (URL 3, 1998).

La gran incidencia de cáncer de estómago en muchas provincias de Chile se ha relacionado con la extracción de nitratos y la consiguiente elevada concentración de estas sustancias en los productos del campo (Derache, 1990; Lindner, 1995).

Actualmente se han identificado un gran número de compuestos N- nitrosados. Químicamente se dividen en tres categorías según su estructura: simétrica, asimétrica y cíclica. A continuación se muestran algunos ejemplos:

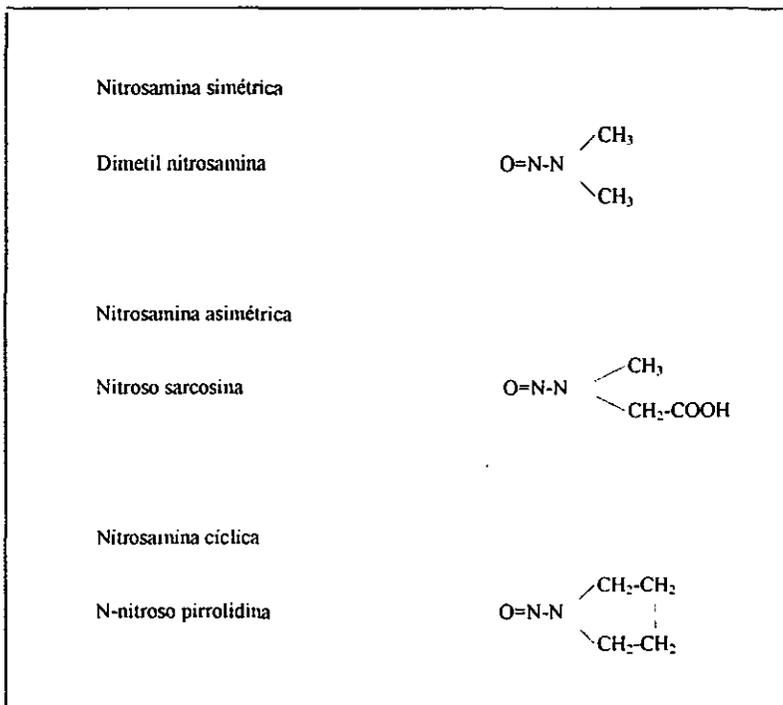


Figura 2. Ejemplos de nitrosaminas

1.5.3 Otros efectos

Estudios recientes han demostrado que existe una estrecha correlación entre el consumo de nitratos y la hipertrofia de la tiroides, glándula responsable de numerosas funciones endócrinas y hormonales del organismo (URL 3, 1998).

Estudios de toxicidad crónica llevados a cabo con animales han reportado en ratas una tolerancia de 1% de nitrato de sodio (NaNO_3) en la dieta durante dos años sin efectos y un 5% con ligera disminución del crecimiento. En perros no se mostraron efectos adversos con dosis del 2% de nitrato de sodio en la dieta por un periodo de 105-125 días. Se han hecho pocos estudios experimentales en humanos en los que se proporcionen a niños pequeños o adultos alimentos con alto contenido de nitratos; sin embargo un estudio realizado por Kübler mostró que niños pequeños toleraron una ingesta diaria de 16-21 mg/Kg de peso corporal, de nitrato durante una semana sin signos de formación de metahemoglobina, diuresis o algún otro efecto tóxico (Committee on food protection, 1973).

1.6 Decremento del contenido de nitratos como resultado de procesos culinarios

Un estudio hecho en Bélgica para evaluar el efecto de algunos procesos culinarios en la remoción de nitratos en vegetales, reporta los siguientes resultados:

El lavado de vegetales constituidos en mayor proporción por hojas como la lechuga y la endibia, reduce la concentración de nitratos en un 10-15%. Por otro lado el lavado del rábano reportó una reducción del 2% únicamente.

En papa se redujo el contenido de nitratos hasta en un 50% cuando se peló y se cocinó; encontrándose en el agua de cocción una cantidad considerable de éstos.

La cocción de la espinaca previa la remoción de los tallos centrales, constituyó una reducción de nitratos del 30% (URL 6, 1998).

1.7 Dosis Diaria Admisible

En 1974 la OMS (Organización Mundial de la Salud) en cooperación con la FAO establecieron la Dosis Diaria Admisible (DDA) de nitrato de 3.65mg/ Kg de peso corporal/ día. Lo cual corresponde a 219 mg de nitrato por día para una persona adulta de 60 Kg (Derache, 1990).

1.8 Usos

Las sales de nitrato y nitrito se emplean como aditivos permitidos por la FDA (Food & Drug Administration) en carnes y productos cárnicos, ya que éstos al formar la nitrosilmioglobina desarrollan un color rosado característico de las carnes curadas, y actúan como inhibidores específicos del crecimiento de *Clostridium botulinum*, microorganismo anaerobio altamente peligroso por las potentes neurotoxinas que sintetiza, que cuando se consumen producen botulismo con un alto grado de mortalidad debido a la afectación de los músculos respiratorios (Furia, 1981; Reichgl, 1983; Badui, 1990).

1.9 Métodos analíticos para su determinación

Existe una gran variedad de metodologías para determinar el contenido de nitratos en agua, alimentos y suelo. Los problemas analíticos son generalmente más simples en el caso del agua que en los alimentos o muestras biológicas. Uno de los métodos más

antiguos y más ampliamente usados está basado en la formación de un compuesto color amarillo cuando el ion nitrato reacciona con ácido fenoldisulfónico. De igual forma la reacción de este ion con ácido cromotrópico o brucina dá compuestos coloridos que son la base de la determinación.

La reducción de nitrato a nitrito seguida de la formación de sal de diazonio con sulfanilamida o ácido sulfanílico y el empleo de 1-naftilamina o similares como agente copulante, es el principio de los métodos oficiales establecidos para la determinación de nitratos en carnes curadas y en alimento para animales . La utilización de columnas de reducción de cadmio en donde los nitratos son pasados a través de la columna para ser reducidos a nitritos y poder ser determinados posteriormente espectrofotométricamente se ha difundido ampliamente, ya que constituye el principio del método oficial para la cuantificación de nitratos en alimentos para bebés. En el análisis de forrajes, el método oficial involucra el uso de electrodos de ion selectivo para la determinación potenciométrica de los nitratos (AOAC, 1998). Existen también métodos enzimáticos específicos que emplean la enzima nitrato reductasa y recientemente se ha difundido el uso de la cromatografía de gases y cromatografía de líquidos de alta precisión (HPLC) (Committee on food protection, 1973; Stahr, 1991).

2.- TANINOS

Los alimentos de origen vegetal son una importante fuente de proteína tanto para humanos como para los animales. El valor nutricional de éstos depende de la composición química, en la medida en la cual los nutrientes son digeridos, absorbidos y utilizados. Varios factores interfieren en la biodisponibilidad, siendo dos los principales: la carencia de enzimas específicas dentro del tracto gastrointestinal y la presencia de sustancias que impiden que se lleven a cabo las etapas de la digestión mencionadas anteriormente, que son denominadas factores antinutricionales, los cuales se definen como sustancias naturales que tienen un efecto negativo a largo plazo en el crecimiento y la salud del hombre y los animales que los consumen.

2.1 Importancia en el reino vegetal

La mayoría de los factores antinutricionales constituyen una protección natural de las plantas en contra de mohos, bacterias, insectos, pájaros y otros herbívoros. Desde el punto de vista agrícola se consideran pesticidas biológicos. El efecto defensivo de dichos factores se relaciona con alteraciones del proceso digestivo (Bressani *et al.*, 1983; Chang *et al.*, 1994).

Dentro de los factores antinutricionales se encuentran los taninos que tienen un efecto depresivo en la digestión y utilización de proteínas, por lo que influyen en el valor nutritivo de los alimentos consumidos por los humanos y el forraje de los animales.

Históricamente el término tanino se ha aplicado a cualquier compuesto con la capacidad de convertir a las fibras de colágeno, presentes en la piel de los animales, en estructuras impenetrables a ataques microbianos y resistentes a la degradación en condiciones extremas de humedad y temperatura. Este proceso comúnmente es conocido como curtido de la piel. La mayoría de estos compuestos derivados de fuentes vegetales se identificaron por ser de naturaleza fenólica; sin embargo los taninos se distinguen de los compuestos fenólicos simples y de las flavonas, definiéndose como aquellos compuestos con peso molecular mayor a 500 Daltons, que contienen un número suficiente de grupos hidroxilo (1-2 por 100 unidades de peso molecular) que les permite formar enlaces con proteínas y otras macromoléculas (Griffits, 1986).

Los taninos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal casi ubicuamente. Se encuentran principalmente en las habas, los chícharos, los frijoles y el sorgo; pero también en frutas, té y chocolate. (Naczki *et al.*, 1994). Generalmente provocan una respuesta negativa cuando se consumen, ya que son responsables de producir una sensación desagradable de astringencia debido a la unión con las proteínas de la saliva y de la mucosa bucal (Lindner, 1995).

Los taninos se localizan principalmente en las vacuolas y en la cera superficial de las plantas, sitios en donde no interfieren con el metabolismo de la planta, únicamente pueden actuar después del rompimiento celular y tener entonces efectos metabólicos. Se encuentran en varios tejidos de las plantas entre los que podemos mencionar:

- Hojas. Sirven para reducir la palatabilidad y por lo tanto constituyen una protección contra los depredadores.
- Semillas. Se han asociado con el mantenimiento de la latencia y tienen propiedades bactericidas. Se localizan principalmente en la cubierta. En las semillas utilizadas para consumo humano se recomienda eliminar la cubierta para disminuir los niveles de taninos (Ali *et al.*, 1998).
- Raíz. Actúan probablemente como una barrera química a la penetración y colonización de patógenos.
- Tallo. Juegan un papel en la regulación del crecimiento. También se encuentran en el tronco de las coníferas contribuyendo a la durabilidad natural de la madera ya que inhiben la actividad microbiana (URL 7, 1998).

El contenido de taninos está relacionado en forma directamente proporcional con el color de las semillas o las flores; es decir que en aquellas que tienen poco colorido o bien son pálidas se encuentran éstos en bajas concentraciones, mientras que las que poseen colores intensos contienen niveles significativamente mayores de taninos (Bressani *et al.*, 1983; Chang *et al.*, 1994; Makkar *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1998).

2.2 Propiedades químicas

Químicamente son compuestos oligoméricos con múltiples unidades estructurales con grupos fenólicos libres, con un peso molecular mayor a 500 Daltons, son solubles en agua, con excepción de algunas estructuras con peso molecular muy alto, tienen la propiedad de precipitar alcaloides, gnetina y otras proteínas; usualmente se dividen

en dos grupos de acuerdo a la estructura y reactividad frente a agentes hidrolíticos, en particular ácidos (Naczk *et al.*, 1994):

- Hidrolizables. Moléculas cuyo típico representante es el ácido tánico y son fácilmente hidrolizadas por ácidos, álcalis y enzimas hidrolíticas (tanasa), para formar glucosa y ácido gálico o bien otros ácidos fenólicos similares como el elágico o ácido quínico. Su estructura consiste en un centro de azúcar al cual se unen moléculas del ácido gálico mediante enlaces éster, formados entre el grupo hidroxilo del carbohidrato y el grupo carbonilo del compuesto fenólico. Aunque los taninos hidrolizables están ampliamente distribuidos en la naturaleza, su importancia en nutrición es limitada (Griffits, 1986).
- Condensados. Son comúnmente llamados proantocianidinas. Son polímeros de 2 a 50 o más unidades flavonoides unidas por enlaces carbono-carbono en la posición 4 de una unidad con la posición 6 u 8 de otra adyacente. La estabilidad de estos enlaces es considerablemente mayor que la de los enlaces éster de los taninos hidrolizables, por consecuencia sus efectos en la nutrición son mayores (Huisman *et al.*, 1992). Estos compuestos son difíciles de degradar, pero cuando se emplea una hidrólisis drástica, producen pequeñas moléculas o monómeros flavonoides incluyendo catequinas y antocianidinas. Dependiendo de la estructura química y grado de polimerización pueden o no ser solubles en solventes orgánicos (Trugo *et al.*, 1998).

Ambos grupos poseen suficientes grupos fenólicos para interactuar con sustratos mediante la formación de múltiples puentes de hidrógeno (Hagerman *et al.*, 1998).

A continuación se muestra un ejemplo representativo de cada grupo:

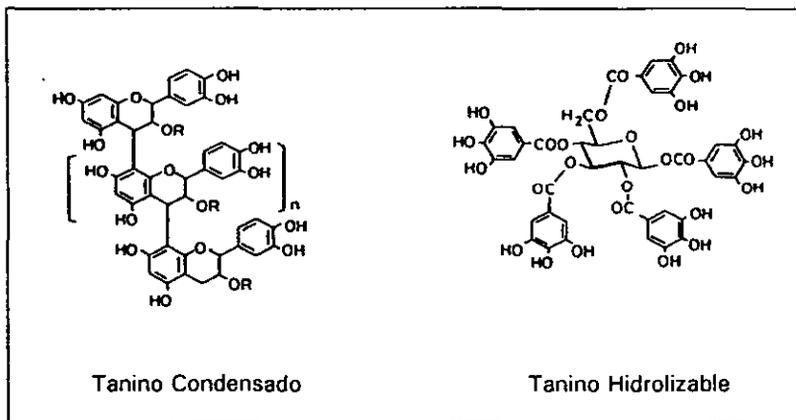


Figura 3. Tipos de Taninos

2.3 Efectos tóxicos en el hombre y en los animales

Los taninos tienen un gran impacto en la nutrición humana y animal debido a la habilidad que poseen de formar complejos con carbohidratos, proteínas y con iones metálicos di o trivalentes como el hierro, dando como resultado un decremento en la biodisponibilidad de estos. Los taninos también se consideran potentes inhibidores enzimáticos debido a su complejación con enzimas digestivas como amilasas, proteasas y lipasas retardando así el proceso de digestión (Bressani *et al.*, 1983; Chang *et al.*, 1994). Los taninos se complejan con proteínas de la mucosa intestinal, lo cual dificulta la absorción de nutrientes.

En la siguiente figura se esquematiza la formación de un complejo tanino-hierro.

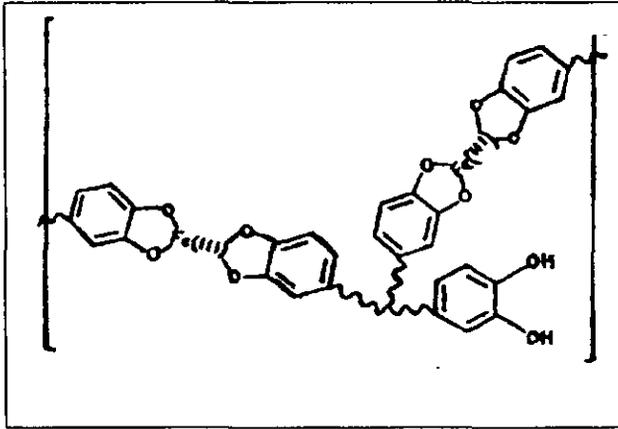


Figura 4. Complejo tanino-hierro

En animales monogástricos los taninos ocasionan una reducción en la ganancia de peso, baja utilización de proteínas, daño a la mucosa del tracto digestivo, alteración en la excreción de ciertos cationes y un incremento en la excreción de proteínas y aminoácidos esenciales (Griffits, 1986).

Estudios nutricionales en ratas, ratones, puercos y pollos han mostrado una reducción en la ganancia de peso cuando son alimentados con dietas con alto contenido de taninos, incluyendo una disminución en la producción de huevo en las gallinas ponedoras encontrándose que niveles de 0.5-2% de taninos en la dieta ocasionan decremento en el crecimiento y en la producción de huevo y niveles de 3-7% pueden ser mortales. En general niveles mayores al 5% son letales (Marquardt, 1988; Horigome *et al.*, 1988). Los taninos presentes en los alimentos y forrajes han mostrado una reducción en la digestibilidad aparente de nutrientes, particularmente de proteína cruda, en pollos, ratas y cerdos (Carbonaro *et al.*, 1996).

2.3.1 Complejación de nutrientes

Los taninos tienen efectos más complejos en la nutrición de los rumiantes. Se ha observado depresión en la ganancia de peso y disminución en la eficiencia de la conversión alimenticia; sin embargo estas alteraciones son menos intensas que en el caso de los monogástricos (Fernández *et al.*, 1985). En algunos casos los taninos ingeridos en la dieta tienen efectos benéficos ya que al formar complejos con las proteínas las protegen de la degradación en el rumen, así también contribuyen a reducir el potencial de hinchazón cuando los animales pastan plantas forrajeras (Marquardt, 1988; Reed, 1995).

Estudios en rumiantes han demostrado que los taninos ocasionan un decremento en la digestibilidad de la fibra como resultado de la interacción de éstos con enzimas celulósicas y las bacterias del rumen, en algunos casos la baja digestibilidad de la fibra es el resultado del déficit ruminal de nitrógeno fermentado debido a la complejación de las proteínas con los taninos (Terril *et al.*, 1994).

Los taninos forman complejos más fácilmente con las proteínas que con los carbohidratos debido a la capacidad de formación de puentes de hidrógeno entre el oxígeno del grupo carbonilo del enlace peptídico de las proteínas y los grupos hidroxilo de los polifenoles. Las moléculas polifuncionales de los taninos pueden formar este tipo de enlaces en diversos sitios de la superficie de la molécula proteínica, incrementando así la naturaleza hidrofóbica promoviendo la precipitación, esto es en valores de pH cercanos al punto isoelectrico de la proteína. La inhibición de la actividad enzimática es generalmente un resultado de la formación de este tipo de complejos tanino- proteína. Las interacciones tanino-proteína son específicas y dependen de la estructura de ambos. Las características de las proteínas que

estructuras abiertas y flexibles y ricas en prolina o hidroxiprolina, ya que estos aminoácidos imparten flexibilidad a la molécula de proteína y forman fuertes enlaces de hidrógeno. Las características de los taninos son: peso molecular alto y alta flexibilidad conformacional (Marquardt, 1988).

En la siguiente figura se esquematiza la formación de un complejo tanino-proteína:

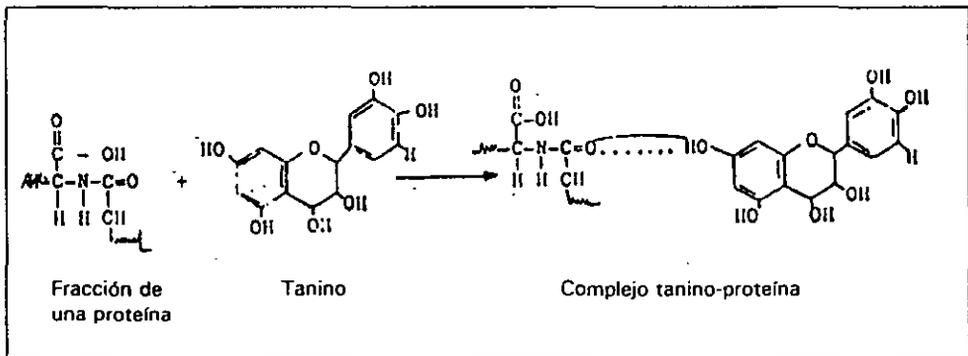


Figura 5. Complejo tanino-proteína

Estudios recientes en ratas y ratones han demostrado que cuando son alimentadas con una dieta rica en taninos experimentan un periodo de adaptación en el cual inicialmente pierden peso, pero después de 4 días aproximadamente comienzan a ganar peso aunque no tan rápido como las ratas alimentadas con dieta libre de taninos. Durante este periodo de adaptación las glándulas parótidas de la rata sufren una alteración ya que los taninos las estimulan a incrementar la síntesis de proteínas ricas en prolina, las cuales son secretadas con la saliva e interactúan en la cavidad oral con los taninos ingeridos en la dieta, protegiendo así a las proteínas provenientes

de los alimentos, de tal forma que dicha alteración reduce los efectos antinutricionales de los taninos (Marquardt, 1988; Jansman *et al.*, 1994).

2.3.2 Inhibición enzimática

Como se mencionó anteriormente, otra propiedad de los taninos es que actúan como inhibidores enzimáticos debido a la formación de complejos enzima - tanino. Al respecto se han realizado numerosos estudios para comprobar la inhibición de enzimas digestivas. Aquellos realizados *in vitro* reportan que existe una alta correlación entre la inhibición de tripsina, α -amilasa y lipasa y el grado de polimerización de los taninos (Horigome *et al.*, 1988); con taninos extraídos de frijol se observó inhibición de α -amilasa y tripsina (Griffits, 1986; Sandoval *et al.*, 1998). Estudios *in vivo* con ratas han demostrado un decremento en la actividad de tripsina y α -amilasa en diversas porciones del intestino; sin embargo la lipasa no presenta dicho comportamiento (Horigome *et al.*, 1988). Por otro lado, en pollos se observó una inhibición tanto de α -amilasa como de lipasa en el intestino y en el páncreas como resultado de la ingesta de altas concentraciones de taninos en la dieta (Longstaff *et al.*, 1991).

2.4 Efectos positivos

Los taninos sin embargo también producen efectos positivos debido a sus múltiples grupos hidroxilo, pues son considerados antioxidantes naturales ya que constituyen factores de protección contra las patologías mediadas por radicales libres en el hombre, como el cáncer y la arteriosclerosis. La capacidad de los taninos para actuar

como antioxidantes puede estar mediada por dos mecanismos: ya sea por la acción quelante de metales de transición como el cobre y el hierro inhibiendo así la formación de radicales libres en la etapa de iniciación de la oxidación, o bien por interrumpir la propagación de la cadena de radicales libres (Bonorden *et al.*, 1994); sin embargo, Carbonaro *et al.*, (1996), de acuerdo a los resultados obtenidos en un estudio realizado *in vitro* con taninos extraídos de haba, sugieren que la actividad antioxidante es debida a la interrupción de la propagación y no a la inhibición de la iniciación de la oxidación.

2.5 Decremento del contenido de taninos como resultado de procesos culinarios

La remoción de compuestos antinutricionales es esencial para mejorar la calidad nutricional de los alimentos que los contienen. Esta remoción generalmente se lleva a cabo a través de procesos simples y económicos. Diferentes autores han reportado que el remojo, el cocimiento y la germinación mejoran la calidad, aunque el uso de un solo método no reporta resultados satisfactorios, siendo necesario en ocasiones la combinación de todos ellos (Vidal *et al.*, 1994). El remojo en agua de frijoles y granos de soya han reportado una pequeña disminución del contenido de taninos (Ali *et al.*, 1998). En garbanzo se redujo el contenido de taninos en 25-50% cuando fueron remojados en agua por 18 horas, detectándose en el agua de remojo un alto contenido de éstos. El cocimiento a ebullición por 30 minutos y el asado por 10 minutos reportaron una reducción de taninos del 73% y el 17% respectivamente (Barroga *et al.*, 1985). En frijol se reportó una reducción de 80-90% después de haber sido remojados en agua y sometidos a tratamiento térmico a 100 °C por 90 minutos (Goycoolea *et al.*, 1990). En diferentes variedades de haba se observó una

disminución de 64-78% después de haber sido remojados en agua y cocinadas en el mismo caldo de remojo a 121 °C por 60 minutos (Padmaja, 1989). En las hojas de diferentes variedades de yuca se encontró una reducción de 33-50% en el contenido de taninos después de haber sido secados en estufa a 75°C por 24 horas (Moneam, 1990). En semillas de lenteja se reportó una reducción del 23% después de 6 días de germinación en condiciones de oscuridad y riego en días alternados (Ayet *et al.*, 1997).

2.6 Dosis Diaria Admisible

La dosis diaria admisible (DDA) de ácido tánico es de 500 mg/ Kg. de peso corporal/día. Lo cual corresponde a 30, 000 mg de ácido tánico por día para una persona adulta de 60 Kg (Derache, 1990).

2.7 Usos

El ácido tánico es un aditivo permitido por la FDA, es empleado como agente clarificante en vinos y cerveza, y en bajas concentraciones como saborizante y potenciador de sabor (Lewis, 1989).

2.8 Métodos analíticos para su determinación

Un problema generalizado en la investigación de taninos es la falta de un método cuantitativo estándar adecuado para la amplia variedad de semillas, forrajes y plantas que existen (Deshpande *et al.*, 1985). Numerosos métodos están disponibles para la

cuantificación de taninos; sin embargo ninguno es completamente satisfactorio ya que carecen de especificidad (Deshpande *et al.*, 1987; Makkar *et al.*, 1993; Hagerman A. E., 1995). No todos los polifenoles tienen impacto en la nutrición y los métodos disponibles no distinguen entre los que sí lo tienen y aquellos otros de bajo peso molecular que se encuentran en las muestras en cuestión. Existe mucha información bibliográfica sobre metodologías para determinar taninos, la cual es muy diversa y a veces contradictoria. Actualmente los métodos disponibles para el análisis de taninos van desde los colorimétricos simples, espectrofotométricos de UV, cromatográficos y enzimáticos hasta las técnicas más costosas y sofisticadas de resonancia magnética nuclear (Deshpande *et al.*, 1987).

Los más comúnmente usados son los métodos químicos, de los cuales existen dos tipos: aquellos que cuantifican polifenoles totales y los que son para grupos funcionales específicos. Estos ensayos son particularmente útiles para cuantificar y determinar la naturaleza química de los taninos. Los métodos basados en reacciones de óxido-reducción miden propiedades de los fenoles como su potencial redox, entre ellos se encuentran el de Azul de Prusia y el de Folin-Denis los cuales no son específicos y están sujetos a interferencias por numerosas sustancias presentes en los alimentos. Otra propiedad que se aprovecha es la habilidad para complejar ciertos metales como el hierro en condiciones alcalinas; este tipo de métodos son más específicos que los anteriores ya que el color de los complejos depende del patrón de sustitución en el anillo fenólico, por lo que constituye una mejor opción para cuantificar taninos en muestras que contengan materiales que interfieran con los métodos redox (Hagerman A.E., 1995; Hagerman *et al.*, 1998).

Dentro de los que determinan grupos funcionales específicos se encuentra el método de la vainillina que cuantifica flavonoides y por lo tanto taninos condensados, aún en

presencia de taninos hidrolizables; sin embargo se ha observado que no reporta resultados reproducibles (Deshpande *et al.*, 1987; Makkar *et al.*, 1993).

Existen también métodos basados en la capacidad de precipitar proteínas e inhibir enzimas, los cuales se emplean para determinar la actividad biológica potencial de los taninos presentes en una muestra. En éstos se mide la cantidad precipitada de una cierta proteína estándar por dichos factores. Entre estos métodos se puede mencionar la difusión radial y la precipitación de hemoglobina, la cual se puede medir espectrofotométricamente o bien radioquímicamente, análisis que es más sensible y menos susceptible a interferencias pero requiere de técnicas y equipos sofisticados. Los resultados que reporta este tipo de métodos son variables y no son completamente cuantitativos (Deshpande *et al.*, 1989; Hagerman A. E., 1995; Hagerman *et al.*, 1998).

Entre las dificultades involucradas en la química y la bioquímica de los taninos se encuentra la falta de un estándar de referencia comercial adecuado para taninos condensados. El ácido tánico se ha empleado ampliamente como el compuesto representativo de la vasta familia de los taninos, principalmente por su estrecha relación estructural con los taninos naturales ya que es una mezcla de cuatro compuestos polifenólicos que se encuentran en los alimentos en diferentes proporciones. La catequina ha sido empleada también como estándar en el método de la vainillina; sin embargo se ha observado que la curva estándar de esta sustancia no posee un comportamiento lineal, sobrestimando así el contenido de taninos presentes en una muestra (Deshpande *et al.*, 1989). El ácido tánico se considera el estándar comercial más apropiado para el análisis cuantitativo de taninos (Hagerman *et al.*, 1988).

3.- VALIDACIÓN DE MÉTODOLÓGÍAS

El objetivo principal de validar un método es proporcionar evidencias de que el método realiza aquello para lo cual fue diseñado. La validación de un método puede definirse como el proceso por el cual queda establecida, por estudios de laboratorio, la capacidad de éste para cuantificar la concentración de un analito (o series de analitos) en una matriz biológica particular con confiabilidad. La validación incluye una evaluación de los parámetros estadísticos especificidad, linealidad, precisión, exactitud y sensibilidad, y proporciona una medida del comportamiento del método. Un método está validado cuando se ha demostrado que su aplicación proporciona el grado de precisión requerido y su exactitud es satisfactoria.

3.1 Especificidad

Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

3.2 Linealidad

Se refiere a la habilidad de un sistema o método para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo determinado, denominado intervalo lineal, comprendido entre la concentración mínima y máxima del analito para el cual el método ha sido probado.

3.3 Precisión

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes alícuotas de una muestra homogénea. Usualmente se expresa en términos de Desviación Estándar o del Coeficiente de Variación.

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

- **Repetibilidad**

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, equipo, laboratorio, etc.)

- **Reproducibilidad**

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (analistas, días, en el mismo y/o diferentes laboratorios, equipos, etc.)

3.4 Exactitud

Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recuperación obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas del analito. La recuperación del mismo debe acercarse al 100%.

3.5 Sensibilidad

Corresponde a la mínima cantidad del analito que puede producir un resultado significativo.

Los parámetros a definir son los límites de detección y de cuantificación.

- **Límite de detección**

Es la mínima concentración de un analito en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

- **Límite de cuantificación**

Es la menor concentración de un analito en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud bajo las condiciones de operación establecidas. Dentro de una curva estándar es la concentración inferior dentro del intervalo lineal.

3.6 Estabilidad de la muestra

Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

Además de los parámetros mencionados anteriormente, se debe demostrar la confiabilidad del método; es decir la solidez del mismo. La solidez determina el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos en el análisis de muestras idénticas

bajo diferentes condiciones de operación. La evaluación de dicha característica en un método, mide la capacidad de los resultados de permanecer sin alteraciones cuando existen variaciones de trabajo.

La etapa final de la validación de una metodología consiste en evaluar su reproducibilidad, lo cual se lleva a cabo mediante estudios de colaboración intra e interlaboratorio (Taylor, 1983; Lang *et al.*, 1991 a, b ; Hokanson, 1994 a, b).

II.- METODOLOGÍA

1.- Aspectos generales

A continuación se presenta un diagrama de bloques para visualizar en forma gráfica las actividades desarrolladas en el presente trabajo, y seguidamente se describen brevemente.

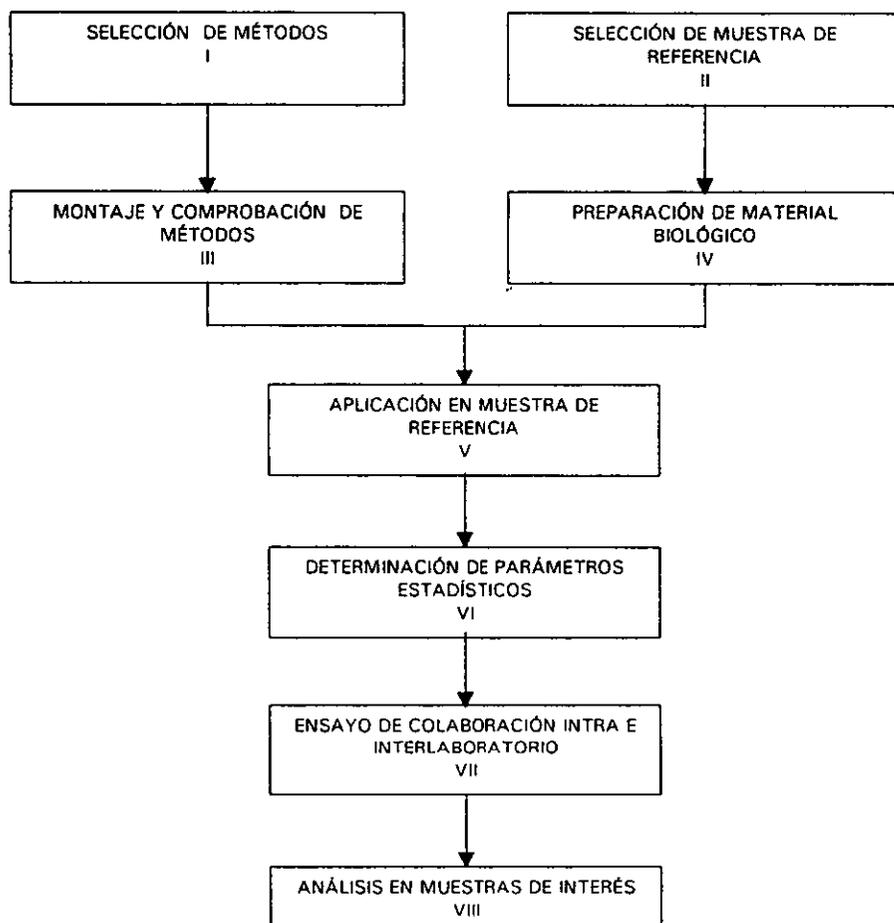


Figura 6. Secuencia de actividades

La investigación se inició con una revisión bibliográfica de nitratos y taninos, básicamente sobre aspectos toxicológicos y metodologías analíticas de cuantificación. El material se consiguió en bibliotecas y hemerotecas de diversas facultades e institutos de la UNAM, así como en la biblioteca central de la Universidad Autónoma de Chapingo.

Para el caso específico de taninos se consultó mediante teleinformática en el Centro de Información Químico-tecnológica de la Facultad de Química de la UNAM, en las bases de datos Analytical Abstracts, BIOSIS y TOXLINE. Se estableció contacto con la Dra. Ann Hagerman, autoridad en materia de taninos, del Departamento de Química y Bioquímica de la Universidad de Miami, quien proporcionó información muy completa sobre los métodos existentes para la determinación de taninos, y facilitó otras publicaciones referentes a diversos aspectos del tema.

En el caso de nitratos también se realizó una consulta a través del Centro de Información de los laboratorios Janssen y Cilag de México

1. SELECCIÓN DE MÉTODOS. De acuerdo con los objetivos planteados, para la determinación de nitratos se seleccionaron cuatro métodos: enzimático, de reducción con sulfato de hidrazina, cromatográfico y el de Cataldo; este último es el que dio resultados satisfactorios en el proceso de validación. Para taninos fueron dos, el de Azul de Prusia y el de la ISO (International Organization for Standardization) "Determinación de taninos en sorgo, 1988", el cual fue validado.

II. SELECCIÓN DE MUESTRAS DE REFERENCIA. Esta se realizó con el apoyo de bibliografía básica de toxicología de alimentos que presentaba datos cuantitativos de los tóxicos de interés presentes en diversos alimentos. La selección se hizo de una muestra de origen vegetal, ya que con las metodologías validadas se pretende caracterizar elementos representativos de este reino. Es importante mencionar que los factores tóxicos estudiados son dos entidades químicas diferentes e independientes y su presencia en los alimentos no es coincidente, por lo cual las muestras de referencia para cada uno fueron diferentes.

Para nitratos la muestra elegida fue rábano, en cambio referente a los taninos fue haba.

III. APLICACIÓN Y COMPROBACIÓN DE MÉTODOS. Una vez que el método seleccionado se aplicó sobre estándares químicos adecuados (reactivos analíticos de pureza manifestada), se verificó que en el caso de una curva estándar existiera una alta correlación entre el parámetro de detección y la concentración del tóxico; es decir un coeficiente de correlación $r = 0.99$. Se comprobó también que se obtuviera una recuperación cercana al 100% (90-110%).

IV. PREPARACIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO. Se llevó a cabo el acondicionamiento de las muestras de referencia para realizar el análisis. El rábano fue lavado, deshidratado y molido; el haba únicamente fue molida.

- V. **APLICACIÓN EN MUESTRA DE REFERENCIA.** Una vez que se cumplieron los requisitos previos con los estándares químicos y el acondicionamiento de la muestra, se prosiguió con la cuantificación del factor tóxico en la muestra de referencia correspondiente, comprobándose así la presencia y cantidad de éste en dicho material, y se comparó el resultado así obtenido con los datos reportados en la bibliografía para determinar el grado de concordancia entre ambos.
- VI. **DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS ESTADÍSTICOS.** Habiéndose caracterizado a la muestra correspondiente, se evaluaron los parámetros estadísticos de linealidad y precisión del sistema y sobre la muestra, la linealidad y precisión del método, el % de recobro, el límite de detección, el límite de cuantificación y la estabilidad del extracto; posteriormente se describirá en forma detallada la metodología empleada en la evaluación de éstos. En esta fase del estudio se contó con un margen de error no mayor del 15%.
- VII. **ENSAYO DE COLABORACIÓN INTRA E INTERLABORATORIO.** Una vez que se contó con la metodología que hubo satisfecho los criterios de los parámetros estadísticos mencionados, se comprobó la solidez de la metodología por medio de los ensayos de colaboración; esto es, se evaluó la variación en los resultados del método en cuestión en una serie de laboratorios, para así decidir si el método es apto para uso general.

VIII. ANÁLISIS EN MUESTRAS DE INTERÉS. Las metodologías validadas para ambos tóxicos fueron aplicadas en muestras de interés con el fin de contribuir a su mejor caracterización químico-toxicológica.

Se determinó el contenido de nitratos en: espinaca, zanahoria, apio, betabel y lechuga. Se cuantificaron taninos en las semillas de: napahuite, cacahuanano, colorín, pipian, mamey y capulín.

SELECCIÓN Y COMPROBACIÓN DE MÉTODOS

2.- NITRATOS

2.1 Muestra de referencia

La muestra de referencia seleccionada fue rábano (*Raphanus sativus* L.) por el alto contenido de nitratos, de 0.26% a 1.50 % en peso seco, según lo reportado en la bibliografía. También se consideraron la facilidad de adquirir la muestra en el mercado a un precio accesible y además la sencilla preparación que requiere para su análisis.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se adquirieron rábanos en el mercado local, se les eliminaron las hojas, con el fin de tener únicamente los tubérculos; se lavaron, se rebanaron y se secaron en estufa Lab Line Imperial III a 60 °C por 48 hrs, determinándose la humedad de éstos, siendo de 95%. Posteriormente se les realizó una molienda gruesa en molino Wiley mills modelo 4 standard con malla de 1 mm y después se molió finamente en molino Cyclone Sample Mill con malla de 0.5 mm para contar con harina finamente molida y perfectamente homogeneizada, que fue la muestra empleada para probar las diferentes metodologías estudiadas, validar aquella considerada idónea y la que se proporcionó a los diferentes analistas para efectuar los ensayos de colaboración.

2.2 Métodos

Para evaluar los diversos métodos para la determinación de nitratos, se utilizó una solución estándar de referencia del mismo ion, preparada a partir de una sal de Nitrato de Potasio (KNO_3), grado analítico de Merck.

2.2.1 Método enzimático

Este método enzimático específico está basado en reacciones de óxido-reducción, ya que el nitrato presente en los alimentos es reducido a nitrito por la enzima nitrato reductasa en presencia de Fosfato de Adenosín Nicotín Dinucleótido (NADPH), según se muestra en la siguiente reacción:



La cantidad de NADPH oxidada durante la reacción es estequiométrica a la cantidad de nitrato. El decremento de NADPH se mide espectrofotométricamente a 340 nm (Boehringer Mannheim, 1990).

Este método se probó con un sistema (kit) para determinación de nitratos en alimentos de BOEHRINGER MANNHEIM con número de catálogo 905-658, conteniendo los reactivos: buffer de imidazol, tabletas de NADPH y la enzima nitrato reductasa de 4 unidades liofilizada.

En la primera fase se aplicó a una solución estándar de 3 µg/ml de nitrato de potasio (KNO_3) con el fin de verificar el % de recuperación que debería estar entre 90-110%.

Para la determinación en la muestra de referencia, se obtuvo un extracto, disolviendo harina de rábano en agua desionizada a 70°C y se hizo una purificación posterior con los reactivos de Carrez.

2.2.2 Método colorimétrico

Basado en la reducción de nitratos a nitritos con sulfato de hidrazina en presencia de cobre, seguida de la formación de la sal de diazonio con ácido sulfanílico y el empleo de 1-naftilamina como agente copulante para formar un compuesto colorido y cuantificarlo espectrofotométricamente a 520 nm (Stahr, 1991).

Las condiciones de reducción de nitratos sugeridas en la bibliografía son:

Incubar por 10 minutos a 100°C el extracto que contiene nitratos, después de añadir solución de sulfato de cobre (50 µg/ml) y solución de sulfato de hidrazina al 0.1%.

2.2.3 Cromatografía de gases

Método basado en la conversión de nitratos a nitrobenzeno empleando benceno en condiciones ácidas a temperatura ambiente y su posterior separación cromatográfica. Este método es una adaptación hecha por Mario Noa en el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria de La Habana, Cuba, a la metodología original de Pentchuck J., 1986.

El estudio se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Gow Mac modelo 69-350 con detector de conductividad térmica. Columna empacada con 20% DC 200 en Chromosorb P AW DMCS 80/100 mallas. 4' x 1/4'.

Se construyó una curva estándar con un intervalo de concentraciones de nitrobenzeno de 5 a 40 µg.

La extracción de nitratos en la muestra consistió en macerar con agua cierta cantidad de harina e incubar a 80°C por 30 minutos.

2.2.4 Método de Cataldo

Método basado en la formación de un complejo como resultado de la nitración del ácido salicílico bajo condiciones ácidas extremas, este complejo tiene su máximo de absorción a 410 nm en soluciones alcalinas ($\text{pH} > 12$). La absorbancia del cromóforo es directamente proporcional a la cantidad de nitratos presente (Cataldo *et al.*, 1975).

En resumen, el procedimiento consiste en la extracción acuosa de nitratos en tejidos vegetales. Posteriormente centrifugar y llevar a cabo en el sobrenadante la nitración del ácido salicílico, desarrollar color mediante la adición de álcali y leer absorbancia de la solución así obtenida en espectrofotómetro a 410 nm.

Se determina el contenido de nitratos usando una curva estándar preparada con sal de nitrato químicamente pura (sodio, potasio, etc).

En caso de trabajar con muestras cuyo extracto esté muy pigmentado, se recomienda emplear carbón activado tanto en la curva estándar como en la obtención del extracto.

Los párrafos anteriores sintetizan el procedimiento empleado; sin embargo una descripción más detallada con respecto a éste, a los reactivos y equipos utilizados se presenta en el Anexo 1.

A continuación la metodología se muestra gráficamente por medio de un diagrama de flujo.

Preparación de curva estándar

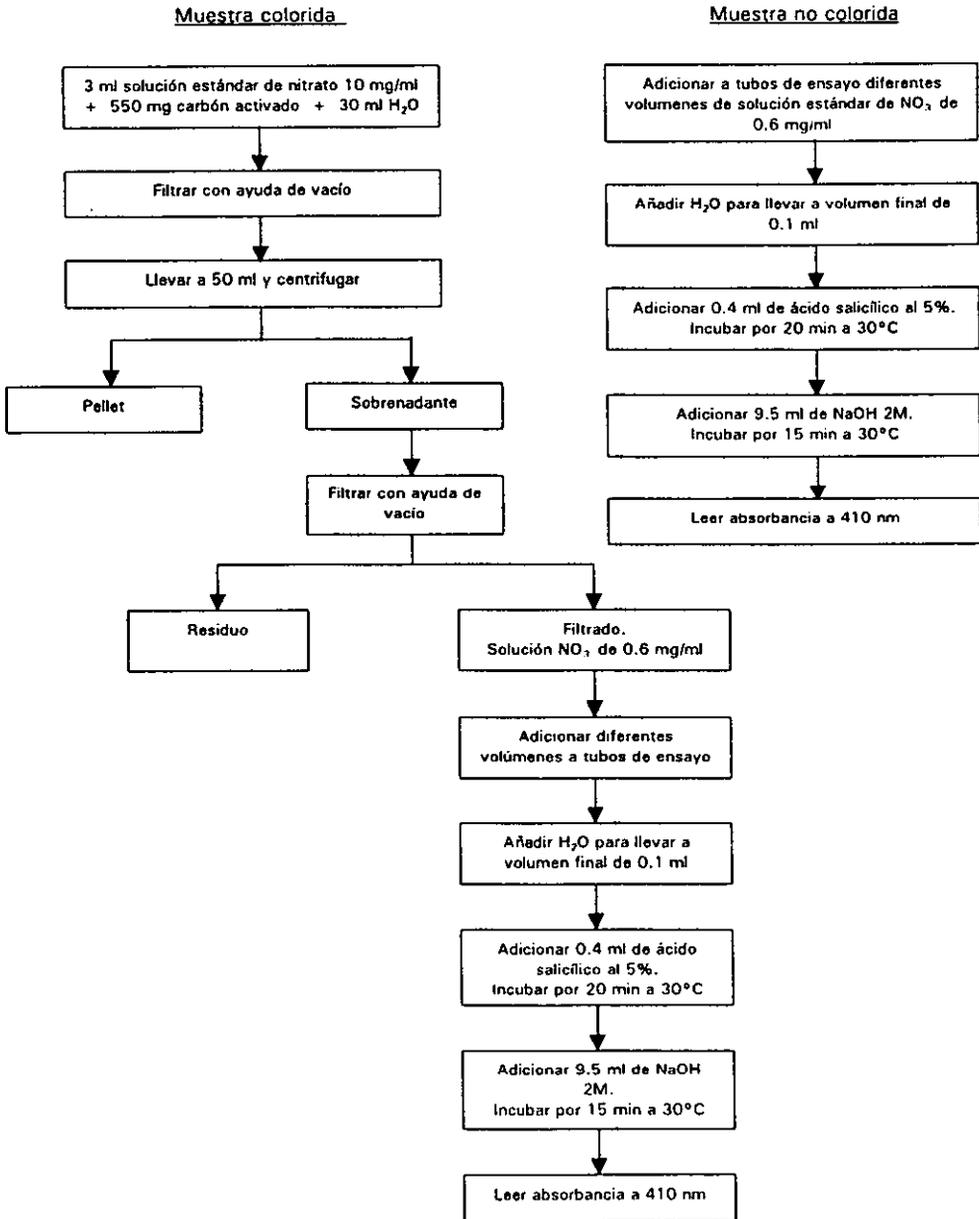


Figura 7. Esquema del procedimiento para la preparación de curva estándar

Cuantificación de nitratos

Muestra colorida

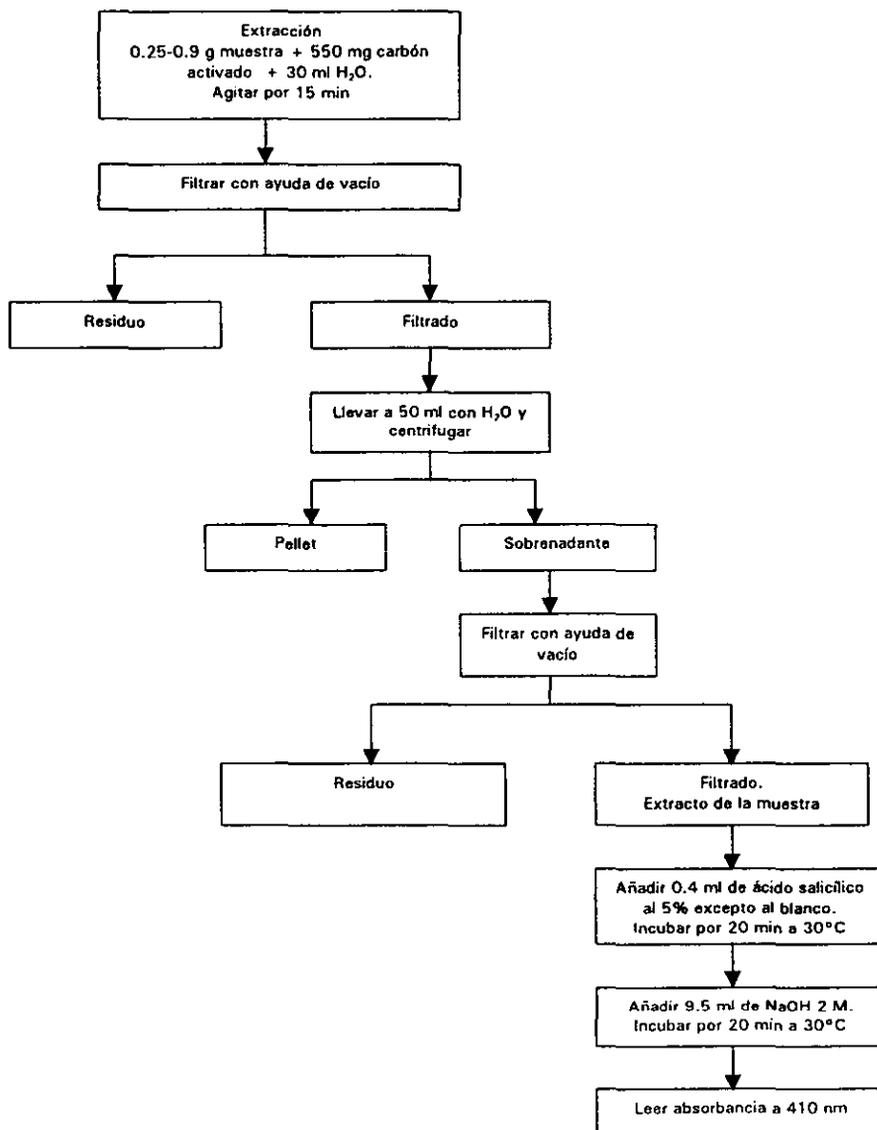


Figura 8. Esquema del procedimiento para la cuantificación de nitratos en muestra colorida

Cuantificación de nitratos

Muestra no colorida

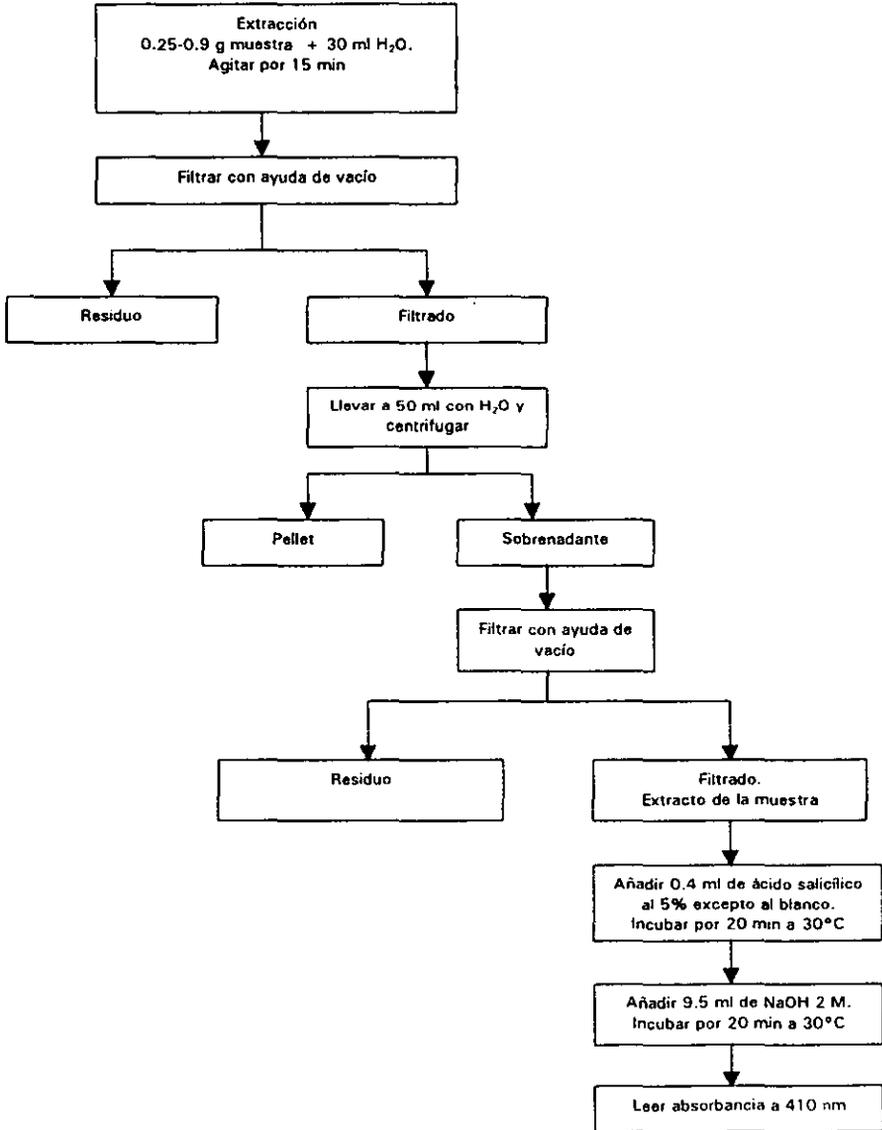


Figura 9. Esquema del procedimiento para la cuantificación de nitratos en muestra no colorida

3.- TANINOS

3.1 Muestra de referencia

Se seleccionó el haba (*Vicia faba* L.) por su elevado contenido de taninos que es de 0.50% a 2.00%, según lo reportado en la bibliografía. También se consideraron la facilidad de adquirir la muestra en el mercado a un precio accesible y la sencilla preparación que requiere para su análisis.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se adquirieron habas verdes con cáscara en el mercado local, se les realizó una molienda gruesa en molino Wiley mills modelo 4 standard con malla de 1 mm y después se molió finamente en molino Cyclone Sample Mill con malla de 0.5 mm para contar con harina finamente molida y perfectamente homogeneizada, que fue la muestra empleada para probar las diferentes metodologías estudiadas, validar aquella considerada idónea y la que se proporcionó a los diferentes analistas para efectuar los ensayos de colaboración.

3.2 Métodos

3.2.1 Método de Azul de Prusia

Método colorimétrico de Price y Butler basado en la reducción del ion férrico a ion ferroso por taninos y otros polifenoles, seguida por la formación de un complejo colorido de ferricianuro-ferroso, conocido como azul de Prusia, que tiene su máxima absorción a 720 nm.

En este método se cuantifican polifenoles tánicos, mediante la extracción acuosa de taninos y otros polifenoles y la extracción salina con NaCl 0.2 M de polifenoles no tánicos, ya que los taninos precipitan con dicha solución; se cuantifican éstos por diferencia, en forma de ácido tánico.

Al aplicar la metodología, se obtuvieron dos extractos: uno disolviendo harina de haba en agua desionizada, y el otro en solución salina de NaCl 0.2M; ambos se mantuvieron en agitación y se centrifugaron posteriormente para recuperar el sobrenadante, el cual fue analizado.

3.2.2 Método ISO 9648: 1988 Determinación de taninos en sorgo

Método basado en la reducción del ion férrico debida a los polifenoles, y la formación de un complejo colorido en condiciones alcalinas, cuantificado espectrofotométricamente a 525 nm.

Tiene el inconveniente de aquellos existentes para la determinación de taninos, ya que cuantifica polifenoles totales, expresados como ácido tánico, y no discrimina entre aquellos que tienen impacto en la nutrición y los que no lo tienen (polifenoles de peso molecular inferior a 500 Daltons).

En resumen, el procedimiento consiste en extraer los taninos por agitación con dimetilformamida. Posteriormente centrifugar y adicionar citrato férrico amoniacal y amoniaco a una alícuota de sobrenadante para desarrollar color y leer absorbancia de la solución obtenida en espectrofotómetro a 525 nm. Se determina el contenido de taninos usando una curva estándar preparada con ácido tánico.

Es importante señalar que la información que se derivó del trabajo experimental referente a reactivos y equipos utilizados, así como al procedimiento aplicado se presenta detalladamente en el Anexo 2.

El siguiente diagrama de flujo muestra gráficamente la metodología utilizada.

Preparación de curva estándar

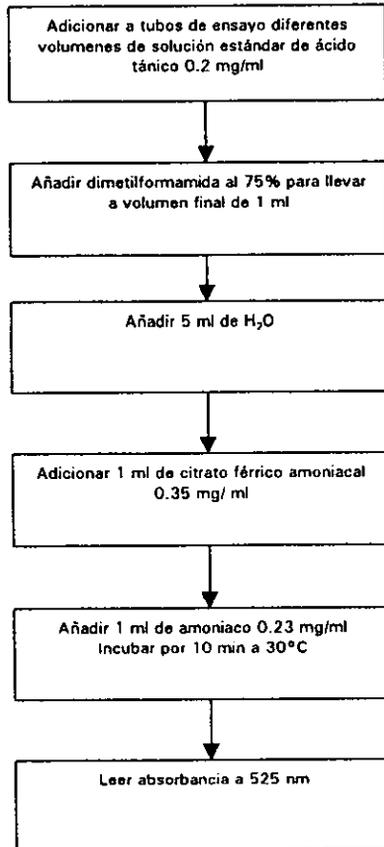


Figura 10. Esquema del procedimiento para la preparación de curva estándar

Cuantificación de taninos

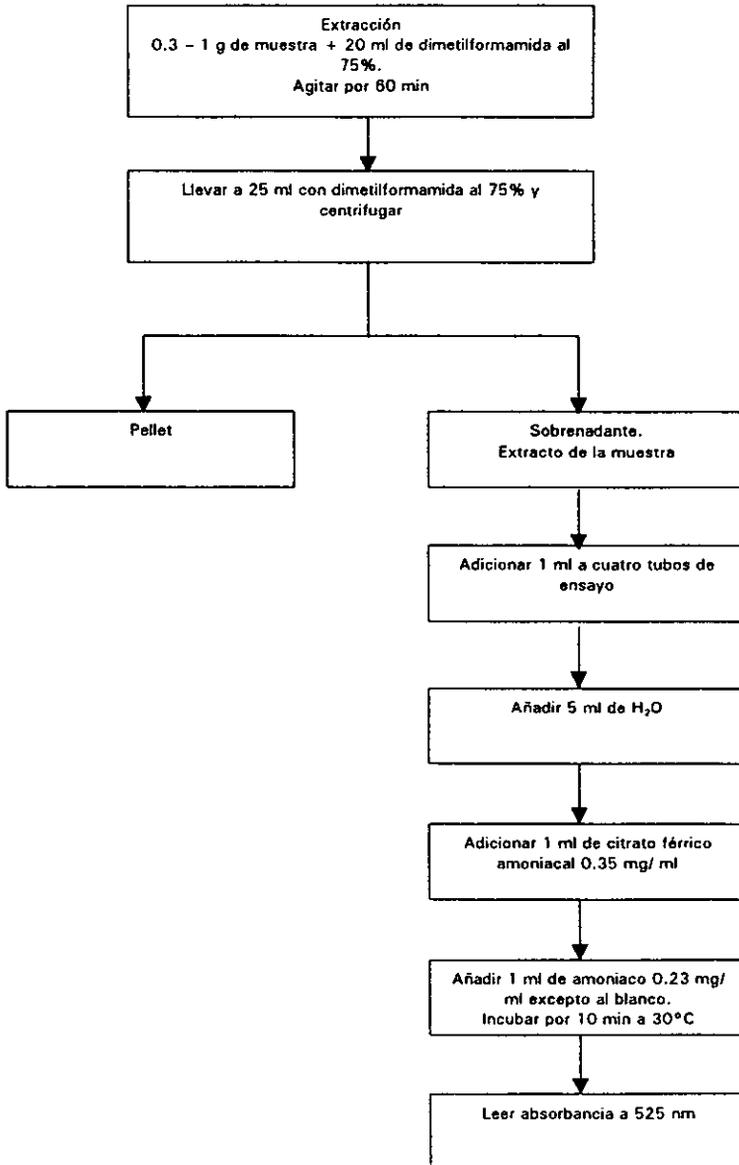


Figura 11. Esquema del procedimiento para la cuantificación de taninos

4 VALIDACIÓN

La validación se realizó de acuerdo a los lineamientos del Manual de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos de México, 1989.

4.1 Linealidad del sistema

Se determinó mediante la construcción de una curva estándar de concentración (x) vs absorbancia (y), se utilizaron cinco concentraciones diferentes, preparadas a partir de una misma solución estándar, con un análisis por duplicado o triplicado para cada dilución.

Con los datos obtenidos se determinaron el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r^2).

Se consideraron los criterios: $r \geq 0.99$ y $r^2 \geq 0.98$

Los cálculos se realizaron de acuerdo a las fórmulas presentadas en el Anexo 3.

4.2 Precisión del sistema

Se determinó por el análisis sextuplicado de una determinada concentración, preparada a partir de una misma solución estándar. Con los datos obtenidos se calculó el coeficiente de variación (CV) según la fórmula:

$$CV = \frac{\sigma}{x} \times 100$$

El criterio fue:

$$CV \leq 3\%$$

4.3 Precisión del método

Se determinó el contenido del tóxico en cuestión en la muestra de referencia seis veces por duplicado. Con los datos obtenidos se calculó el coeficiente de variación (CV).

El criterio específico fue: $CV = 10-15\%$, por tratarse de material biológico.

4.4 Linealidad del método

Se determinó a partir de la adición a la muestra de referencia de tres o cuatro cantidades conocidas de la sustancia de interés, cada una se trató de manera independiente, haciéndose los análisis por triplicado.

Con los resultados obtenidos se calcularon la pendiente (m), la ordenada al origen (b), el coeficiente de determinación (r^2), el coeficiente de variación (CV) y el % de recobro.

Los criterios para cantidad esperada (x) vs cantidad recuperada (y), fueron:

$$m=1$$

$$b=0$$

$$r^2 \geq 0.98$$

$$CV = 10 - 15\%$$

y porcentaje de recuperación de $90-110\%$ por tratarse de material biológico.

Los cálculos se realizaron de acuerdo a las fórmulas presentadas en el Anexo 4.

4.5 Límite de detección

Se construyó una curva estándar en la cual se incluyó la lectura del blanco y se registraron los valores correspondientes a cada concentración; es decir, que el equipo se ajustó a cero con agua y no con el blanco de reactivos antes de efectuar la lectura de cada una de las concentraciones.

Los cálculos se realizaron de acuerdo a la fórmula:

$$y = 3 SB + y_B$$

En donde :

y = Valor de absorbancia buscado

SB = Desviación estándar de la lectura del blanco

y_B = Absorbancia del blanco

$$SB = \left[\frac{\sum_i (y_i - \bar{y}_i)^2}{n - 2} \right]^{\frac{1}{2}}$$

Obteniéndose el límite de detección (LDD) con el valor calculado de y interpolado en dicha curva estándar.

4.6 Límite de cuantificación

Se evaluó al comparar el promedio de las respuestas de la menor concentración de la curva estándar con la Desviación Estándar calculada de las mismas. El criterio considerado fue: si el promedio es igual o mayor que el valor de tres veces la

desviación estándar ($x \geq 3\sigma$), dicha concentración se considera el límite de cuantificación (LDC).

4.7 Estabilidad del extracto

Se determinó mediante la comparación de los resultados de tres análisis iniciales de la misma muestra con los obtenidos después de permanecer por un tiempo establecido en diferentes condiciones de almacenamiento.

Las condiciones analizadas fueron:

TIEMPO	TEMPERATURA
24 horas	T. A.
24 horas	R
48 horas	T. A.
48 horas	R

T.A. = Temperatura ambiente(25-27°C)
R = Refrigeración (2°C)

Con los resultados obtenidos se determina el intervalo de confianza (IC) y el factor I de acuerdo a las fórmulas presentadas en el Anexo 5.

Los criterios para considerar estable el extracto fueron: en el IC debe estar incluido el valor cero y el valor del factor \bar{I} debe encontrarse entre

98 - 102%

4.8 Ensayo de colaboración intralaboratorio

Se llevó a cabo en el mismo laboratorio en el que se efectuó el trabajo experimental con el mismo equipo y los mismos reactivos, contando con un mínimo de tres colaboradores, quienes aplicaron la metodología por triplicado sobre la muestra de referencia caracterizada anteriormente y se analizaron los resultados por un análisis de varianza: ANDEVA de una vía, ya que con este estudio se verificó la diferencia significativa entre los resultados de los analistas partiendo de una misma muestra; los resultados así obtenidos se corroboraron con una prueba de rango múltiple LSD.

4.9 Ensayo de colaboración interlaboratorio

Se realizó en tres entidades diferentes, que a su vez tuvieron réplicas internas de tres analistas sobre la misma muestra caracterizada anteriormente, y así se analizaron los resultados reportados por cada laboratorio por medio de un ANDEVA de una vía para determinar la existencia de diferencia significativa entre laboratorios; los resultados se corroboraron con una prueba de rango múltiple LSD.

III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- NITRATOS

1.1 Método enzimático

Se aplicó el sistema (kit) a una solución estándar de 3 µg/ ml de nitrato de potasio (KNO₃). Se llevaron a cabo tres ensayos por duplicado, cuyos resultados se presentan a continuación.

Tabla 1. Contenido de nitratos en solución estándar de KNO₃

ANÁLISIS	CONCENTRACIÓN DE ION NITRATO (µg / ml)	
	Valor 1	Valor 2
Ensayo 1	2.879	2.863
Ensayo 2	2.908	2.819
Ensayo 3	2.940	3.210

Con los resultados anteriores se obtuvieron los siguientes parámetros:

PROMEDIO	2.936 ± 0.140
% de recuperación	97.88
C. V.	4.771 %

C.V. = Coeficiente de variación

Ya que los resultados fueron satisfactorios al obtenerse una recuperación de 97.88 %, se decidió aplicar éste método sobre la muestra de referencia para determinar los siguientes parámetros estadísticos.

Con el fin de determinar el contenido de nitratos en los rábanos y establecer así la precisión del método, se efectuaron tres ensayos por duplicado incluyendo la extracción y purificación, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 2. Contenido de nitratos en muestra de referencia: rábano (% en peso seco)

ANÁLISIS	CONCENTRACIÓN DE ION NITRATO (g/ 100 g de muestra)	
	Valor 1	Valor 2
Ensayo 1	0.353	0.339
Ensayo 2	0.418	0.380
Ensayo 3	0.432	0.443

Con los valores anteriores se obtuvieron los siguientes parámetros:

PROMEDIO	0.394 ± 0.043
C. V.	10.954 %

C.V. = Coeficiente de variación

Una vez que se determinó el contenido promedio de nitratos en rábano con un coeficiente de variación de 10.965%, el cual se consideró aceptable para este tipo de muestra biológica compleja de la cual no se lleva acabo una purificación total. se procedió a determinar la linealidad del método al obtener el % de recuperación a partir de una cantidad de nitratos conocida, adicionada a la muestra de referencia y llevándose a cabo todo el proceso de extracción y purificación y trabajándose bajo las

mismas condiciones. Se realizaron dos determinaciones por duplicado con diferentes concentraciones.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 3. % de Recuperación de NO_3^- en muestra de referencia: rábano

CANTIDAD INICIAL* ($\mu\text{g NO}_3^-$)	CANTIDAD AÑADIDA ($\mu\text{g NO}_3^-$)	CONCENTRACIÓN ESPERADA ($\mu\text{g NO}_3^-$)	CANTIDAD ENCONTRADA ($\mu\text{g NO}_3^-$)	% RECUPERADO
0.98	1	1.98	4.04	204.04
0.98	10	10.98	24.20	220.40

a = Considerando 0.050 g de muestra

Al obtenerse una recuperación del 204 al 220 %, significa que este método no cumple con el criterio de linealidad, ya que se considera aceptable una recuperación del orden de 90 a 110%; como los resultados fueron superiores a este intervalo, con dicha metodología se sobrestima el contenido de nitratos presente en las muestras, por lo cual no es apta para su uso en análisis, ya que de emplearse los datos que reportaría, no serían confiables. Por lo anterior se descartó esta metodología.

1.2 Método colorimétrico

Este método se probó sobre una solución estándar de nitrito de potasio (KNO_2) de Merck, grado analítico, con el fin de construir una curva estándar con intervalo de concentraciones de 0.04- 0.96 μg , para así determinar indirectamente por medio de los nitritos, la cantidad de nitratos presentes en la muestra.

Una vez que se construyó la curva estándar de nitritos con un coeficiente de correlación de 0.995, se verificó que la reducción de nitratos a nitritos fuera total, lo cual se probó en una solución estándar de nitrato de potasio (KNO_3), de concentración conocida, a temperatura ambiente y a 100 °C por 10 minutos; sin embargo los resultados no fueron satisfactorios, por lo que se decidió incrementar el tiempo de incubación a 25 minutos, pues se pensó que se aseguraría así una completa reducción.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

Tabla 4. Reducción química de nitratos

ENSAYO	TEMPERATURA (° C)	TIEMPO DE INCUBACIÓN (MIN)	RESULTADO
A	27	10	No reducción
B	100	10	60% Reducción
C	100	25	No reducción

De acuerdo a los resultados, con el incremento del tiempo de incubación no se obtuvo reducción, siendo la máxima a los 10 minutos como lo establece la metodología; sin embargo una reducción de 60% sobre una sal químicamente pura no es satisfactoria para aplicar el método sobre una muestra biológica de la cual no se tiene un estándar sino solamente un intervalo teórico de concentración, por lo tanto los resultados que se obtienen no son confiables ni aceptables ya que se subestima la concentración real del tóxico en cuestión. Dado lo anterior éste método tampoco se validó.

1.3 Cromatografía de gases

En un principio se establecieron las condiciones de trabajo empleando benceno grado cromatográfico de Merck, con el fin de verificar sus características cromatográficas y así identificarlo posteriormente en los cromatogramas siguientes.

Tabla 5. Condiciones de trabajo en cromatógrafo para determinar nitrobenceno

Temperatura del horno	140° C
Temperatura inyector	170° C
Temperatura detector	190° C
Flujo de gas portador (Helio)	76 ml/ min
Presión de entrada del gas	20 psi

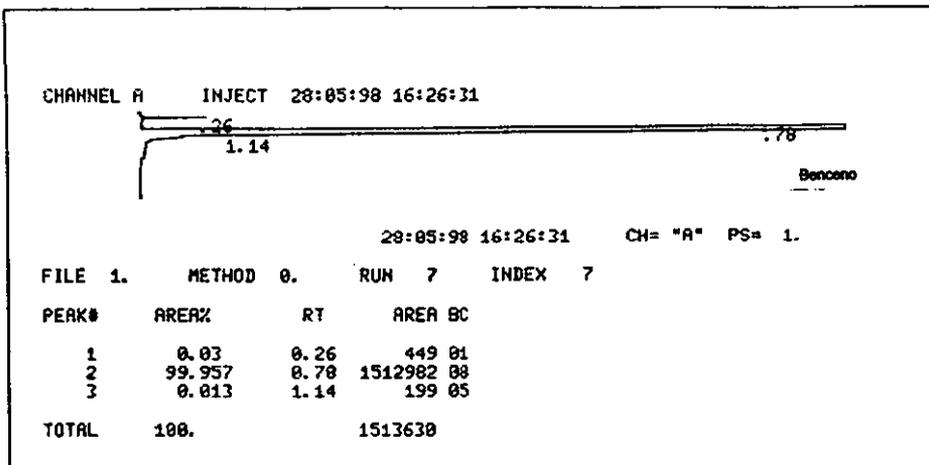


Figura 12. Cromatograma de benceno

Una vez que se establecieron las condiciones de trabajo, se inyectó una mezcla de benceno grado cromatográfico de Merck, nitrobenceno grado analítico de Productos Químicos Monterrey, equivalente a una concentración de 20 µg, y p-cloronitrobenceno grado analítico disuelto en benceno, el cual se empleó como estándar interno.

Lo anterior se efectuó con el fin de caracterizar la mezcla que se obtendría posteriormente al realizar la derivación de nitratos a nitrobenceno, a continuación se presenta el cromatograma así obtenido.

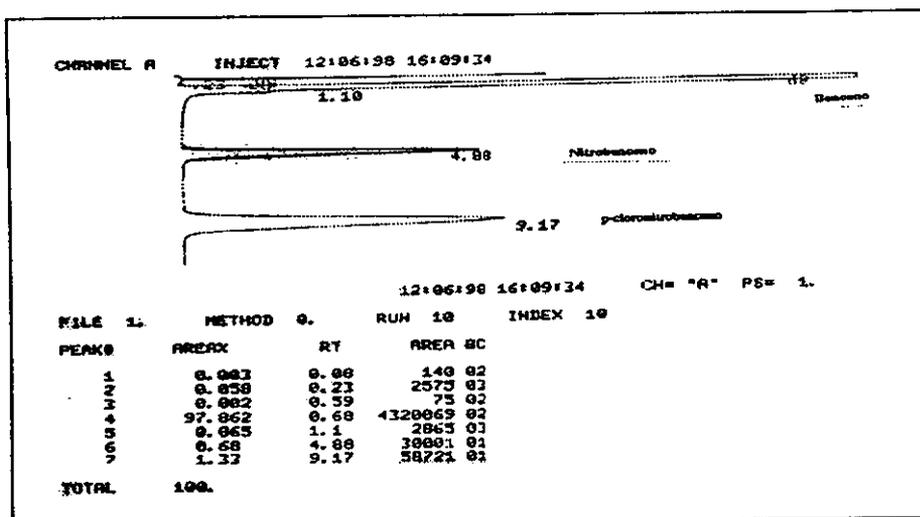


Figura 13. Cromatograma de la mezcla benceno, nitrobenzeno y p-cloronitrobenzeno

Para realizar la derivación química se empleó una solución de nitrato de potasio (KNO_3), benceno y ácido sulfúrico concentrado de J. T. Baker. Se inyectó al cromatógrafo el derivado así obtenido con el fin de verificar la eficiencia de la derivación, obteniéndose el cromatograma siguiente:

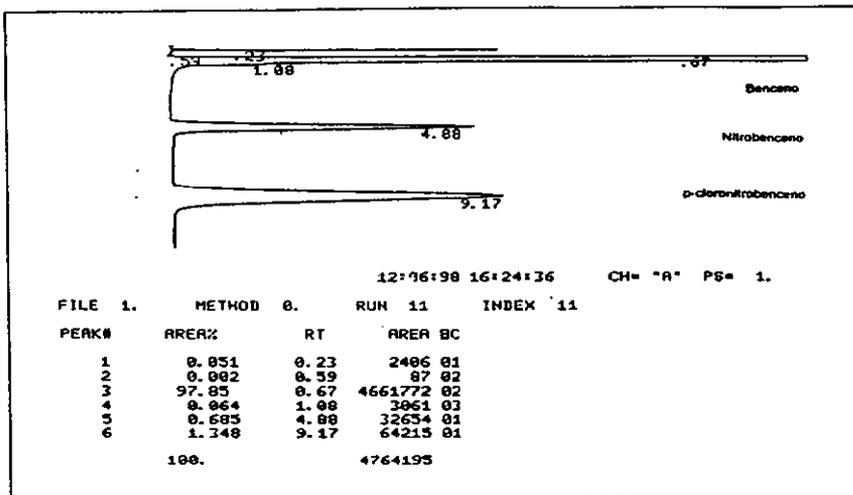


Figura 14. Cromatograma de la mezcla de derivación

La concentración de nitrobenceno obtenida es equivalente a 20 µg de nitrato como en el cromatograma anterior, lo cual permite comparar ambos.

De acuerdo al cromatograma de la figura 14 se observa que se obtiene la misma mezcla que en el cromatograma de la figura 13, con una relación de áreas muy similar de nitrobenceno, que es el compuesto de interés, por lo tanto se comprobó la conversión a nitrobenceno bajo las condiciones propuestas, con un % de recuperación del 99.62%.

Por lo anterior se decidió aplicar la metodología sobre la muestra de rábano para comprobar la presencia de nitratos en ésta y así cuantificarlos para validar posteriormente el método.

Se construyó una curva estándar con un intervalo de concentraciones de nitrobenzeno de 5 a 40 mg, la cual dio un coeficiente de correlación satisfactorio de 0.997.

La siguiente figura muestra el cromatograma obtenido cuando se cuantificaron los nitratos en rábano.

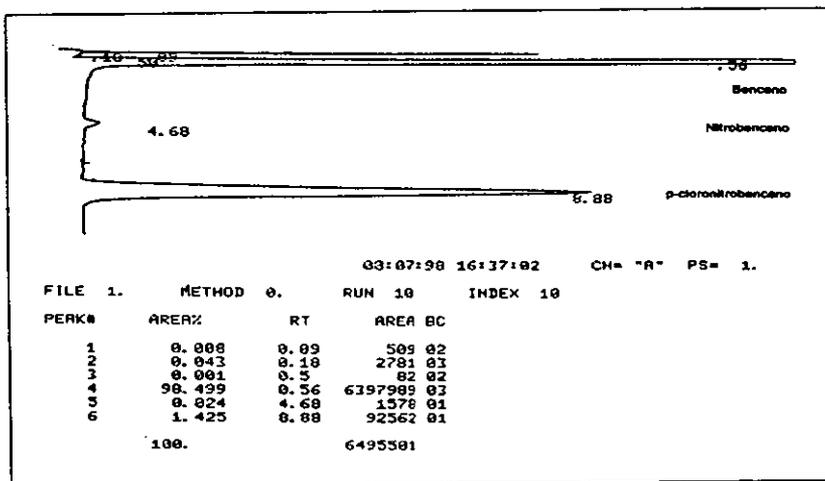


Figura 15. Cromatograma del contenido de nitratos en rábano

La cantidad de nitratos encontrada en rábano según el cromatograma de la figura 15 es de 3.587 μg , equivalente a $6.32 \times 10^{-3} \%$, cantidad extremadamente pequeña comparada con los datos de la bibliografía y con aquellos obtenidos con el método enzimático; razón por la cual se decidió modificar las condiciones de extracción, haciéndola más eficiente, lo cual se llevó a cabo extrayendo con agua en Soxhlet por 3 horas, deshidratando posteriormente en rotavapor Büchi 461 para resuspender después en un cierto volumen de agua y derivando dicho extracto bajo las mismas condiciones efectuadas anteriormente.

El derivado así obtenido se representa en la siguiente figura.

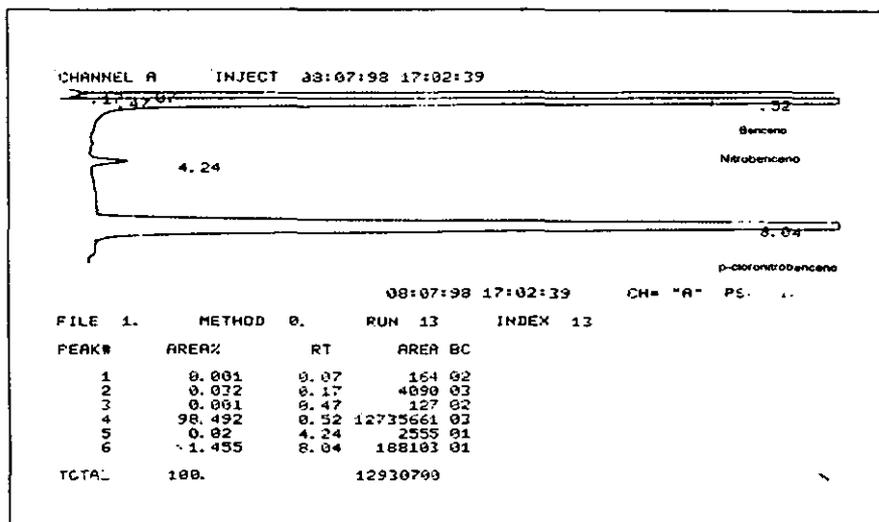


Figura 16. Cromatograma del contenido de nitratos en rábano obtenido con extracción optimizada

De acuerdo al cromatograma de la figura 16, la cantidad de nitratos encontrada es de 0.116%, la cual es mayor que la encontrada anteriormente; sin embargo es menor a la que reporta la bibliografía y el método enzimático. Con lo anterior se deduce que el proceso de extracción a partir de una matriz biológica no fue eficiente aún y para comprobarlo, se decidió inyectar al cromatógrafo un derivado de nitrobenzeno obtenido a partir de una solución estándar de KNO_3 equivalente a 30 μg , sin haber sido sometido al proceso modificado de extracción, lo cual dio como resultado el cromatograma de la figura 17.

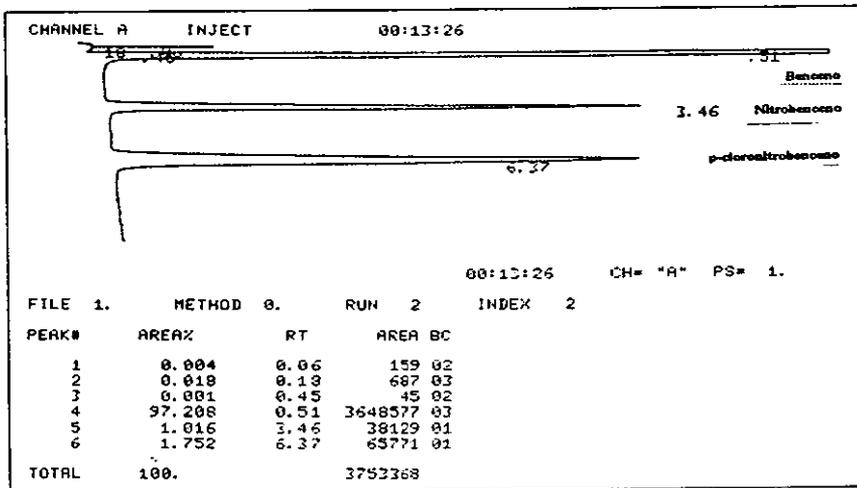


Figura 17. Cromatograma del contenido de nitratos en una solución de KNO_3 sin ser sometida al proceso de extracción

Con el fin de comprobar la eficiencia de la extracción, se inyectó el derivado obtenido a partir de la misma solución de KNO_3 , pero habiendo sido sometida al proceso modificado de extracción en una matriz de dextrina, dicho derivado se muestra en la figura 18.

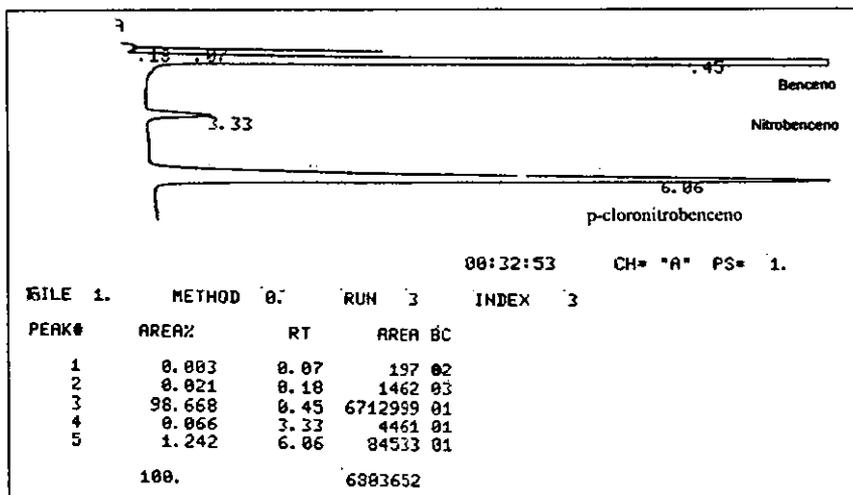


Figura 18. Cromatograma del contenido de nitratos en una solución de KNO_3 sometida al proceso de extracción

Al comparar los cromatogramas de las figuras 17 y 18, se observa que los resultados difieren en gran medida, obteniéndose en el último una recuperación del 34%, lo cual indica que la cantidad de nitratos detectada en la muestra no es real y por lo tanto los resultados no son confiables, ya que las condiciones de extracción probadas no son eficientes.

1.4 Método de Cataldo

Con este método se obtuvieron resultados satisfactorios cuando se aplicó en estándares químicos y en la muestra de referencia, por lo cual fue validada finalmente, después de incluir ciertas etapas en el manejo de la muestra que no mencionaba la metodología original y que se consideraron fundamentales de acuerdo al tipo de muestras analizadas, como es el caso del empleo de carbón activado para suprimir la pigmentación de los extractos de muestras coloridas y los pasos posteriores para su eliminación, así también el control de volúmenes con matraces volumétricos.

Con dicha metodología se determinaron los parámetros estadísticos del proceso de validación.

1.4.1 Validación

1.4.1.1 Linealidad del sistema

Se construyó una curva estándar, a partir de una solución estándar de nitrato de potasio (KNO_3) de Merck, cuyos triplicados y gráfica se presentan a continuación.

Tabla 6. Datos de curva estándar

NITRATOS		ABSORBANCIA		
X (μg)	Y_1	Y_2	Y_3	
$x_1 = 0$	0.0	0.0	0.0	
$x_2 = 6$	0.105	0.105	0.092	
$x_3 = 10$	0.149	0.147	0.163	
$x_4 = 30$	0.366	0.402	0.426	
$x_5 = 40$	0.509	0.516	0.573	
$x_6 = 60$	0.815	0.796	0.841	

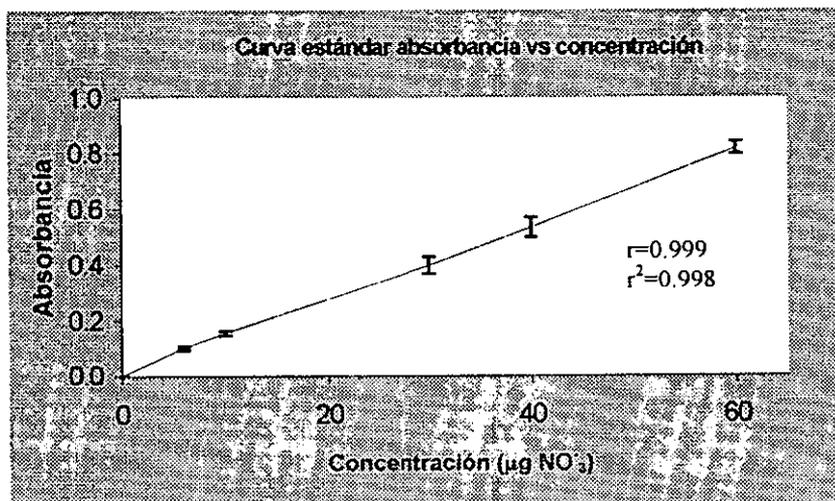


Figura 19. Curva estándar de nitratos

Ya que el coeficiente de correlación (r) es mayor a 0.99 y el coeficiente de determinación (r^2) es mayor a 0.98, se cumple con los criterios de linealidad del sistema; es decir se establece que existe una correlación lineal entre la señal obtenida (absorbancia) y la concentración.

1.4.1.2 Precisión del sistema

Para una concentración de 60 μg de nitrato se encontraron los siguientes valores de absorbancia.

Tabla 7. Valores de absorbancia leídos a 410 nm

ABSORBANCIA
0.815
0.795
0.822
0.841
0.789
0.784

Con los datos anteriores se calcularon los siguientes parámetros:

x	0.807
σ	0.021
C.V.	2.720%

Teniendo en cuenta que el coeficiente de variación (CV) resultó menor a 3%, puede afirmarse que se cumple con el criterio de precisión del sistema; es decir que el sistema reporta resultados con un alto grado de reproducibilidad.

1.4.1.3 Precisión del método

Se determinó seis veces el contenido de nitratos en la muestra de referencia (rábano), y se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 8. Contenido de nitratos presentes en rábanos (%)

% NITRATOS (ms)
2.069
2.332
2.422
1.934
2.261
1.896

ms = masa seca. Considerando 95% de humedad en rábano

Los parámetros a los que se llegó con los datos anteriores son los siguientes:

x	2.115
σ	0.221
CV	10.456 %

El coeficiente de variación (CV) está en el intervalo 10-15%, por lo que se cumple con el criterio de precisión del método.

El contenido promedio de nitratos que se encontró en rábano fue de 2.115%, valor que no se ubica dentro del intervalo reportado en la bibliografía de 0.26-1.50%; sin embargo, se consideró correcto sobretodo tomando en cuenta los múltiples factores que influyen en el contenido de nitratos en los vegetales, y que son la variedad y especie de la planta, el grado de maduración, su estado de salud, el contenido de humedad, el tipo de suelo, la cantidad de luz recibida y la época de cosecha.

1.4.1.4 Linealidad del método

A continuación se presentan los resultados que se obtuvieron después de adicionar cuatro cantidades conocidas de nitratos a la muestra de referencia.

Tabla 9. Recuperación de nitratos adicionados a una muestra de rábanos. (μg de NO_3^-)

CANTIDAD INICIAL *	CANTIDAD ADICIONADA	CANTIDAD ESPERADA	CANTIDAD ENCONTRADA		
			X	Y ₁	Y ₂
7.06	3	10.06	11.01	11.53	10.84
14.12	6	20.12	22.09	22.26	20.98
35.3	5	40.3	36.77	34.6	39.27
35.3	15	50.3	47.2	45.41	43.06

* A partir de diferentes cantidades de muestra

Los siguientes parámetros son el resultado de los cálculos efectuados con la información anterior.

m	0.827
b	3.768
r^2	0.986
CV	10.494 %
recobro	89.9 - 110.6 %

Al considerar que el valor del coeficiente de determinación (r^2) es mayor de 0.98; el coeficiente de variación (CV) se encuentra entre 10-15% y el % de recobro entre 90-110%, se cumple con los criterios para la linealidad del método; es decir se comprueba que el método es exacto ya que existe concordancia entre el valor experimental y el valor de referencia.

1.4.1.5 Límite de detección

A continuación se presentan las lecturas de absorbancia obtenidas para diferentes concentraciones de nitratos, cuando se ajustó el equipo de medición con un blanco de agua y no con el blanco de reactivos, del cual también se registró la lectura.

Tabla 10. Datos de curva estándar de Nitratos. Incluida la lectura del blanco

Concentración ($\mu\text{g de NO}_3^-$) X_i	Absorbancia Y_i
0 (blanco)	0.012
6	0.112
10	0.163
30	0.427
40	0.578
60	0.783

Con los datos anteriores se calcularon los siguientes parámetros:

SB	0.021
γ	0.095
LDD	4.955 $\mu\text{g NO}_3^-$

SB = σ del blanco; γ = absorbancia calculada;
LDD = límite de detección

Ya que el valor de γ interpolado en la curva estándar anterior dá un valor de 4.955 μg de nitratos, éste se considera la cantidad mínima de nitratos que puede ser detectada en las condiciones establecidas.

1.4.1.6 Límite de cuantificación

Se determinó por triplicado la respuesta de la mínima concentración de la curva estándar. Para una concentración de 6 μg de nitrato se encontraron los siguientes valores de absorbancia.

Tabla 11. Valores de absorbancia leídos a 410 nm

ABSORBANCIA
0.105
0.105
0.092

Parámetros obtenidos:

x	0.100
σ	0.007
3 σ	0.022

El promedio de las respuestas (x) de cada curva estándar para una concentración de 6 μg de NO_3^- , es mayor al valor de tres veces la desviación estándar (3 σ), esta concentración (que reporta resultados reproducibles y se encuentra dentro del intervalo de linealidad para el sistema), se considera el límite de cuantificación.

1.4.1.7 Estabilidad del extracto

Se obtuvieron los siguientes resultados del contenido de nitratos en el extracto de la muestra de referencia cuando fue almacenado bajo diferentes condiciones de tiempo y temperatura.

Tabla 12. Contenido de nitratos en extracto de rábano en muestra seca bajo diferentes condiciones de temperatura/ tiempo (%)

INICIAL	TA/24 hrs	R / 24 hrs	TA/48 hrs	R/48 hrs
2.498	1.996	2.504	0.321	2.524
2.582	1.850	2.605	0.699	2.643
2.718	2.158	2.763	0.450	2.710

TA = Temperatura ambiente (25-27°C) R = Refrigeración (4°C)

Con éstos datos se calcularon el intervalo de confianza y el valor del factor I para las diferentes condiciones de almacenamiento; resultados que se presentan a continuación.

Tabla 13. Valores de Intervalo de confianza y factor I para diferentes condiciones.

Temperatura/ tiempo	IC	I
TA / 24 hrs	-0.854 a -0.341	76.984
R/ 24 hrs	-0.206 a 0.255	100.926
TA/ 48 hrs	-2.408 a -1.809	18.837
R/ 48 hrs	-0.170 a 0.222	101.919

IC = Intervalo de confianza

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

El extracto es estable en condiciones de refrigeración a las 24 y a las 48 hrs ya que para ambos el IC contiene el valor cero y el factor I se encuentra dentro del intervalo 97- 100%, no así a temperatura ambiente, en la cual se observa una pérdida del 20% en 24 hrs y del 80% en 48 hrs.

Una vez que se hubieron satisfecho los criterios establecidos para cada uno de los parámetros estadísticos anteriores, se realizó el estudio intralaboratorio y cuando se obtuvieron resultados uniformes se realizó el estudio interlaboratorio con el apoyo de tres laboratorios incluyendo el propio.

1.4.1.8 Ensayo de colaboración intralaboratorio

Se realizó un análisis de varianza ANDEVA de una vía con un nivel de significancia del 95% con los datos de tres análisis por triplicado de tres analistas del laboratorio 111 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, con un total de nueve datos por analista. Se verificó la existencia de diferencia significativa de los resultados entre analistas de acuerdo a la hipótesis: *si el valor calculado de F es mayor que el valor de tablas, se establece que existe diferencia significativa al % de significancia establecido*. El resultado se comprobó mediante una prueba de rango múltiple LSD.

Tabla 14. Cuadro de análisis de varianza con nivel de significancia del 95%. Prueba LSD

Fuente de la variación	Grados de libertad	SC	CM	Fcal	Ftab
Analistas	2	0.1738	0.0869	1.418	3.37
Repeticiones	24	1.4714	0.0613		
Total	26	1.6453			

SC = Suma de cuadrados; CM = Cuadrados medios; Fcal = F calculada; Ftab = F de tabla

Ya que el valor de F de tabla es mayor al de F calculada, se establece que entre los resultados de los analistas no hay diferencia significativa con un nivel de significancia del 95%.

Tabla 15. Prueba de rango múltiple LSD

Analista	No. de Datos	Promedio	Grupos homogéneos
1	9	2.952	X
2	9	2.990	X
3	9	3.138	X

Contraste	Diferencia	Límite
1-2	-0.038	0.240
1-2	-0.186	0.240
2-3	-0.147	0.240

Se confirma que hay homogeneidad en los resultados de los analistas, por lo tanto los resultados que arroja la metodología son reproducibles.

1.4.1.9 Ensayo de colaboración interlaboratorio

Los laboratorios participantes fueron:

- el laboratorio 111 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química
- el laboratorio de botánica del Colegio de Postgraduados de la Universidad Autónoma de Chapingo contando con la valiosa colaboración del Dr. Marco Soto y.
- el laboratorio de Investigación y Nutrición del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional siglo XXI contando con la colaboración del M. en C. Miguel Hernández Infante

Se realizó un análisis de varianza ANDEVA de una vía con un nivel de significancia del 95% con los datos obtenidos de tres determinaciones por triplicado, de tres analistas, de los tres diferentes laboratorios participantes, con un total de 9 datos por analista. Se verificó la existencia de diferencia significativa de los resultados entre laboratorios de acuerdo a la misma hipótesis aplicada en el ensayo intralaboratorio. El resultado se comprobó mediante una prueba de rango múltiple LSD.

Tabla 16. Cuadro de análisis de varianza con nivel de significancia del 95%. Prueba LSD

Fuente de la variación	Grados de libertad	SC	CM	Fcal	Ftab
Laboratorio	2	7.2854	3.6427	14.378	3.12
Repeticiones	78	19.7622	0.2533		
Total	80	27.0476			

SC = Suma de cuadrados; CM = Cuadrados medios; Fcal = F calculada; Ftab = F de tabla

Ya que el valor de F de tabla es menor al de F calculada, se establece que entre los resultados de los laboratorios existe diferencia significativa con un nivel de significancia del 95%.

Tabla 17. Prueba de rango múltiple LSD

Laboratorio	No. de Datos	Promedio	Grupos homogéneos
A	27	2.764	X
B	27	3.027	X
C	27	3.490	X

Contraste	Diferencia	Limites
A-B	0.2625	0.2728
A-C	-0.4629	0.2728*
B-C	-0.7254	0.2728*

* Denota diferencia significativa

Se observa que hay homogeneidad en los resultados de los laboratorios A y B pero el laboratorio C no se comporta de igual forma; esto no quiere decir que la metodología no arroje resultados estadísticamente confiables ya que el ensayo interlaboratorio se realizó con tres participantes, que es el número mínimo requerido; sin embargo se trata de una población aún reducida para obtener resultados concluyentes, por lo cual hubiera sido deseable contar con los datos de otras entidades. Esto último no fue posible ya que es muy complejo hacer este tipo de evaluaciones.

1.5 Determinación de nitratos en muestras

Se determinó el contenido de nitratos en muestras vegetales de interés como son: espinaca, lechuga, zanahoria, betabel y apio adquiridas en el mercado local, con un

proceso de preparación idéntico al de la muestra de referencia. Se seleccionaron las muestras mencionadas debido a que la bibliografía reportaba un alto contenido de nitratos en éstas.

Las características de las muestras y los resultados obtenidos se presentan a continuación.

Tabla 18. Características de las muestras analizadas

Muestra No.	Nombre común	Nombre científico	Humedad ^a
1	Zanahoria	<i>Daucus carota</i>	89.515
2	Espinaca	<i>Spinacea oleracea</i>	91.379
3	Lechuga	<i>Lactuca sativa</i>	95.728
4	Apio	<i>Apium graveolens</i>	91.289
5	Betabel	<i>Beta vulgaris</i>	86.84

a = Expresado como %.

Tabla 19. Contenido de nitratos en producto crudo expresado en base húmeda (%)

Muestra No.	% NO ₃ ⁻
1	0.016 ± 0.037
2	0.246 ± 0.057
3	0.056 ± 0.030
4	No detectado
5	0.023 ± 0.052

Se observa que el contenido de nitratos varía para cada muestra, el valor más alto corresponde a la espinaca con un promedio de 0.246% de nitratos.

De las muestras analizadas, aquellas que están constituidas principalmente por hojas son las que presentan un contenido mayor como es el caso de la espinaca y la lechuga, este resultado coincide con lo que reporta la bibliografía al mencionar que los nitratos se acumulan en mayor proporción en las hojas que en otras partes de las plantas, aspecto que se señaló anteriormente en el capítulo correspondiente a antecedentes.

En Bélgica en los años 1992-1993 se llevó a cabo un estudio en el cual se determinó el contenido de nitratos en alimentos de origen vegetal, entre los cuales se encuentran los analizados en esta sección. A continuación se presentan los resultados obtenidos en dicho país (URL 6, 1998).

Tabla 20. Contenido de nitratos reportado en Bélgica. 1992-1993 (%)

Muestra No.	% NO ₃ ⁻
1	0.023
2	0.229
3	0.087
4 (Hojas)	0.272
5	No reportado

Existe concordancia entre los datos de ambos países para el mismo tipo de muestras, con algunas variaciones que se atribuyen a que en el presente estudio el muestreo fue insuficientemente representativo y, además a que se desconoce el grado en el que intervinieron en las muestras analizadas los múltiples factores que influyen en el contenido de nitratos en los vegetales, que son: la variedad y especie de la planta, el grado de maduración, su estado de salud, el contenido de humedad, el tipo de suelo, la cantidad de luz recibida y la época de cosecha.

Es importante resaltar que lo que se considera más relevante en esta sección es la validez del método utilizado, más que el valor numérico de los resultados.

2.- TANINOS

2.1 Método de Azul de Prusia

Este método se probó en la primera fase sobre una solución estándar de ácido tánico de Sigma No. T-0125 grado analítico, con el fin de construir una curva estándar de ácido tánico con intervalo de concentraciones de 1.5- 30 μg para así determinar su linealidad.

Una vez que se construyó la curva estándar de ácido tánico con un coeficiente de correlación de 0.997, y se comprobó su linealidad, se decidió aplicar la metodología sobre la muestra de referencia para determinar los parámetros estadísticos restantes.

Con el fin de determinar el contenido de ácido tánico en haba y establecer así la precisión del sistema, se efectuaron cinco ensayos por duplicado cada uno, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 21. Contenido de taninos en muestra de referencia: haba (% ácido tánico)

ANÁLISIS	CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO TÁNICO (g/ 100 g de muestra)	
	Valor 1	Valor 2
Ensayo 1	0.430	0.423
Ensayo 2	0.374	0.380
Ensayo 3	0.360	0.371
Ensayo 4	0.381	0.377
Ensayo 5	0.431	0.440

Con los valores anteriores se obtuvieron los siguientes parámetros:

PROMEDIO	0.396 ± 0.030
C. V.	7.649 %

C.V. = Coeficiente de variación

El coeficiente de variación obtenido de 7.65% se consideró aceptable para este tipo de muestra biológica compleja de la cual no se llevó a cabo una purificación exhaustiva. Posteriormente se determinó la linealidad del método calculando el % de recuperación a partir de una cantidad conocida de ácido tánico, adicionada a la muestra de referencia. Se realizaron tres determinaciones por duplicado con diferentes concentraciones.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 22. % de Recuperación de ácido tánico en muestra de referencia: haba

CANTIDAD ESPERADA (μg ácido tánico)	CANTIDAD ENCONTRADA (μg ácido tánico)	% RECUPERADO
6	4.398	73.30
15	11.676	77.843
24	17.896	74.566

Al obtenerse una recuperación de 73.30 a 77.843%, significa que este método no cumple con el criterio de linealidad, ya que se considera aceptable una recuperación del orden de 90% a 110%. Como los resultados fueron inferiores a este intervalo, con dicha metodología se subestima el contenido de taninos presente en las muestras, con lo que se evidencia que no es apta para su uso en análisis, ya que de emplearse los datos que reportaría, no serían confiables.

2.2 Método ISO 9648: 1988

Determinación de taninos en sorgo

Este método se aplicó sobre un estándar químico de referencia, obteniéndose resultados satisfactorios, mismos a los que se llegó también en las etapas posteriores a esta fase inicial, hasta que finalmente fue validado, sometido a los ensayos de colaboración y aplicado en las muestras de interés mencionadas anteriormente para determinar su contenido de taninos.

Cabe mencionar que durante el proceso de validación, a la metodología original se le realizaron ciertas adaptaciones en el procedimiento experimental, con el fin de optimizarla y eliminar errores sistemáticos, lo que permitió obtener resultados satisfactorios, ya que durante el proceso de validación se identificaron etapas críticas en el método que debían ser consideradas al llevar a cabo la cuantificación de taninos.

Las adaptaciones realizadas a la metodología ISO 9648 : 1988 fueron las siguientes:

- La metodología original considera un intervalo de concentraciones de 100 a 400 μg de ácido tánico en la curva estándar, y se adaptó para hacerlo de 80 a 400 μg , ya que entre más amplio sea el intervalo lineal se incrementa la sensibilidad del método.
- El método ISO sugiere preparar las concentraciones de la curva estándar de manera independiente; esto quiere decir que a partir de una solución estándar de ácido tánico se toman 6 diferentes alícuotas y se lleva a la marca de aforo en matraces volumétricos de 25 ml con solución de dimetilformamida al 75%, para obtener así 6 soluciones de distintas concentraciones de ácido tánico y a partir de éstas tomar la alícuota correspondiente para construir la curva.

Con este procedimiento se hizo una prueba y se comprobó que la cantidad empleada de disolvente es muy elevada; por lo cual se ajustó dicho punto en la metodología para economizar el uso de éste y reducir el número de etapas en el proceso ya que se sugiere partir directamente de la solución estándar de ácido tánico para construir la curva, eliminando así el uso de matraces volumétricos y por consiguiente de exceso de dimetilformamida. La respuesta fue lineal e idéntica a aquella que se obtiene cuando se lleva a cabo el procedimiento original. Por esta razón se incluye en el procedimiento propuesto en el presente trabajo.

- En la etapa correspondiente a la obtención del extracto, con el método ISO no se utilizan matraces volumétricos para controlar el volumen antes de llevar a cabo la

centrifugación para separar el extracto. En el presente trabajo se experimentó este paso adicional y se comprobó que contribuye a obtener resultados reproducibles, pues de esta manera se estandariza el volumen empleado en cada ensayo. Esta adaptación también se incorpora a la metodología propuesta.

- El método ISO propone ajustar el equipo de medición, espectrofotómetro, a cero con un blanco de agua; sin embargo debido a las características de las muestras con las cuales se trabajó en esta tesis, se sugiere emplear un blanco de muestra, ya que los extractos de algunas poseen color, lo cual interfiere con las mediciones del equipo, arrojando así resultados erróneos. Este inconveniente se corrige ajustando el equipo a cero con el color base que posee el extracto.
- El método ISO no hace alusión a la presencia de grasa en la muestra a analizar y tampoco a los efectos que ésta podría tener en la cuantificación de los taninos, por lo anterior se decidió comprobar experimentalmente en muestras con alto contenido de grasa, si ésta interfiere en la determinación. Se aplicó la metodología tanto en harina integral como en harina desengrasada de la semilla de las mismas y se analizaron los resultados así obtenidos por medio de una prueba de t pareada y posteriormente con un análisis de varianza ANDEVA multifactorial, con el apoyo del paquete estadístico Statgraphics versión 5, para comprobar si existía diferencia significativa entre ambos y establecer entonces la necesidad de trabajar con muestras desengrasadas para obtener resultados confiables.

La determinación se llevó a cabo por triplicado y los resultados obtenidos se presentan a continuación:

Tabla 23. Contenido de taninos expresado como ácido tánico (%)

Muestra	A	B
Cacahuanano	0.987 \pm 0.002	1.418 \pm 0.025
Napahuite	0.124 \pm 0.008	0.453 \pm 0.002
Colorín	0.197 \pm 0.009	0.273 \pm 0.002
Mamey	1.977 \pm 0.025	4.266 \pm 0.029

A = Harina Integral B = Harina desengrasada

Se observa que existe diferencia entre los resultados de harina integral y desengrasada, lo cual se comprobó estadísticamente mediante la prueba de t pareada, seguida de un análisis de varianza ANDEVA multifactorial y una prueba de rango múltiple LSD con un nivel de significancia del 95%.

Los datos analizados fueron los triplicados de cada una de las determinaciones. El análisis estadístico se presenta en el Anexo 6.

De acuerdo con los resultados del análisis estadístico se confirma que existe diferencia entre los resultados de ambas harinas, por lo tanto se concluye que la cantidad de grasa presente en el material biológico interfiere significativamente en la cuantificación de taninos en esta metodología, sobre todo cuando la proporción de grasa es muy grande como en el caso del napahuite, el cacahuanano, el colorín y el mamey; por lo tanto se recomienda trabajar con muestras desengrasadas, principalmente cuando éstas superan el 5% de grasa, para obtener resultados confiables sobre la cantidad de taninos presentes en éstas.

2.2.1 Validación

2.2.1.1 Linealidad del sistema

Se construyó una curva estándar, a partir de una solución estándar de ácido tánico de Sigma No. T-0125, cuyos duplicados y gráfica se presentan a continuación.

Tabla 24. Datos de curva estándar

X (μg)	Y ₁	Y ₂
x ₁ = 0	0.0	0.0
x ₂ = 80	0.1	0.092
x ₃ = 160	0.202	0.203
x ₄ = 240	0.294	0.298
x ₅ = 320	0.411	0.402
x ₆ = 400	0.490	0.494

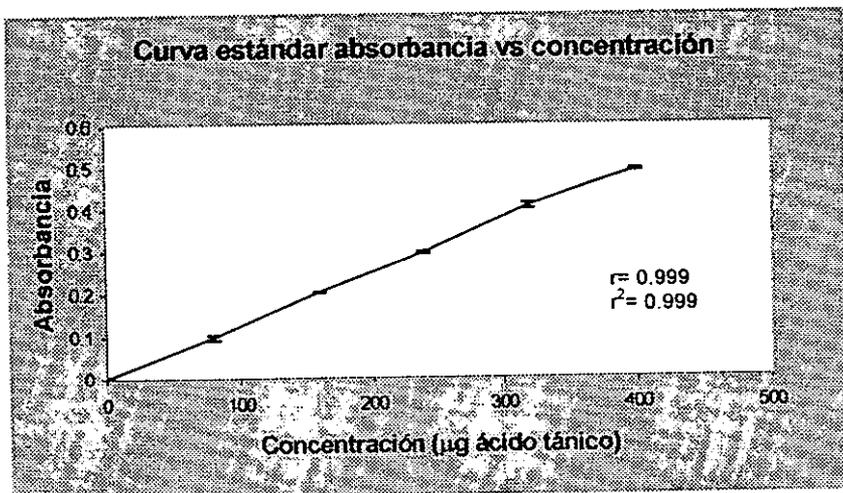


Figura 20. Curva estándar de taninos

Como el coeficiente de correlación (r) es mayor a 0.99 y el coeficiente de determinación (r^2) es mayor a 0.98, se cumple con los criterios de linealidad del sistema; en otros términos queda establecido que existe una correlación lineal entre la señal obtenida (absorbancia) y la concentración

2.2.1.2 Precisión del sistema

Para una concentración de 320 μg de ácido tánico se encontraron los siguientes valores de absorbancia, habiéndose efectuado la lectura por sextuplicado.

Tabla 25. Valores de absorbancia leídos a 525 nm

ABSORBANCIA
0.411
0.402
0.407
0.400
0.410
0.405

Estos datos permitieron calcular los siguientes parámetros:

x	0.405
σ	0.004
C.V.	1.073 %

Esta medición indica que se cumple con el criterio de precisión del sistema ya que el coeficiente de variación (CV) es menor a 3%; expresado de otra manera el sistema reporta resultados con un alto grado de reproducibilidad.

2.2.1.3 Precisión del método

Se determinó seis veces el contenido de taninos en la muestra de referencia (haba), y se encontraron los siguientes resultados:

Tabla 26. Contenido de ácido tánico presente en haba (%)

% ácido tánico
1.038
1.112
0.861
1.073
0.976
1.134

Los parámetros correspondientes se muestran a continuación:

x	1.032
σ	0.100
CV	9.779 %

Puede afirmarse que se cumple con el criterio de precisión del método, en vista de que el coeficiente de variación (CV) se encuentra en el intervalo 10-15%.

El contenido promedio de taninos encontrado en haba fue de 1.032 %, valor que concuerda con el intervalo reportado en la bibliografía que es de 0.5 – 2.0 %, lo cual contribuyó a pensar que el método arroja resultados correctos.

2.2.1.4 Linealidad del método

A continuación se presentan los resultados obtenidos después de adicionar tres cantidades de ácido tánico a la muestra de referencia.

Tabla 27. Recuperación de ácido tánico adicionado a muestra de habas.
(μg de ácido tánico)

CANTIDAD INICIAL*	CANTIDAD AÑADIDA	CANTIDAD ESPERADA	CANTIDAD ENCONTRADA		
		X	Y_1	Y_2	Y_3
59.690	50	103.690	95.269	100.320	109.210
103.250	100	203.250	188.760	186.110	188.01
206.500	200	406.500	355.540	385.230	391.62

* A partir de diferentes cantidades de muestra

Los parámetros encontrados fueron:

m	0.914
b	4.772
r^2	0.992
CV	5.259 %
Recobro	92.31 – 97.85 %

Los valores que arrojan los cálculos, permiten afirmar que se cumple con los criterios para la linealidad del método, en razón de que el coeficiente de determinación (r^2) es mayor de 0.98, el coeficiente de variación (CV) se encuentra entre 10-15% y el % de recobro entre 90-110%; esto significa la comprobación de que el método es exacto ya que existe concordancia entre el valor experimental y el valor de referencia.

2.2.1.5 Límite de detección

A continuación se presentan las lecturas de absorbancia obtenidas para diferentes concentraciones de ácido tánico, cuando se ajustó el equipo de medición con un blanco de agua y no con el blanco de reactivos, del cual también se registró la lectura.

Tabla 28. Datos de curva estándar de ácido Tánico. Incluida la lectura del blanco

CONCENTRACIÓN (μg)	ABSORBANCIA
X_1	Y_1
0	0.043
80	0.147
160	0.255
240	0.348
320	0.446
400	0.544

Con los datos anteriores se calcularon los siguientes parámetros:

SB	0.004
γ	0.061
LDD	10.79 μg ácido tánico

SB = σ del blanco; γ = absorbancia calculada;
LDD = límite de detección

El valor de γ interpolado en la curva estándar anterior dá un valor de 10.79 μg de ácido tánico, esta cantidad se considera la mínima de ácido tánico que puede ser detectada en las condiciones establecidas, sin ser cuantificada.

2.2.1.6 Límite de cuantificación

Se determinó por triplicado la respuesta de la mínima concentración de la curva estándar. Para una concentración de 80 μg de ácido tánico se encontraron los siguientes valores de absorbancia.

Tabla 29. Valores de absorbancia leídos a 525 nm

ABSORBANCIA
0.100
0.094
0.092

Los cálculos arrojaron los siguientes parámetros:

x	0.095
σ	0.004
3 σ	0.012

Ya que el promedio de las respuestas (x) de cada curva estándar para una concentración de 80 μg de ácido tánico es mayor al valor de tres veces la desviación estándar (3 σ), esta concentración, que reporta resultados reproducibles y se encuentra dentro del intervalo de linealidad para el sistema, se considera el límite de cuantificación.

2.2.1.7 Estabilidad del extracto

Se obtuvieron los siguientes resultados del contenido de taninos en el extracto de la muestra de referencia cuando fue almacenado bajo diferentes condiciones de tiempo y temperatura.

Tabla 30. Contenido de ácido tánico en haba en diferentes condiciones de temperatura/ tiempo (%)

INICIAL	TA/24 hrs	R / 24 hrs	TA/48 hrs	R/48 hrs
1.071	1.067	1.075	1.038	1.034
1.090	1.076	1.103	1.051	1.051
1.083	1.080	1.103	1.076	1.079

TA = Temperatura ambiente (25-27°C) R = Refrigeración (4°C)

Los resultados son los siguientes:

Tabla 31. valores de Intervalo de confianza y factor I bajo diferentes condiciones.

Temperatura/ tiempo	IC	I
TA / 24 hrs	-0.011 a 0.034	101.041
R/ 24 hrs	-0.013 a 0.037	101.131
TA/ 48 hrs	-0.055 a 0.002	97.577
R/ 48 hrs	-0.059 a 0.006	97.493

IC = Intervalo de confianza

El extracto es estable tanto a temperatura ambiente como en condiciones de refrigeración a las 24 y a las 48 hrs ya que para todos el IC contiene el valor cero y el factor I se encuentra dentro del intervalo 97- 100%.

Una vez que se hubieron satisfecho los criterios establecidos para cada uno de los parámetros estadísticos anteriores, se realizó el estudio intralaboratorio y cuando se obtuvieron resultados uniformes se realizó el estudio interlaboratorio con el apoyo de tres laboratorios incluyendo el propio.

2.2.18 Ensayo de colaboración intralaboratorio

Se realizó un análisis de varianza ANDEVA de una vía con un nivel de significancia del 95% y, una prueba de rango múltiple con los datos de tres análisis por duplicado de tres analistas, con un total de seis datos por analista. Se verificó la existencia de diferencia significativa de los resultados entre analistas de acuerdo a la hipótesis: *si el valor calculado de F es mayor que el valor de tablas, se establece que existe diferencia significativa al % de significancia establecido.* El resultado se comprobó mediante una prueba de rango múltiple LSD.

Tabla 32. Cuadro de análisis de varianza con nivel de significancia del 95%. Prueba LSD

Fuente de la variación	Grados de libertad	SC	CM	Fcal	Ftab
Analistas	2	0.0012	0.0006	0.078	3.55
Repeticiones	15	0.1173	0.0078		
Total	17	0.1185			

SC = Suma de cuadrados; CM = Cuadrados medios; Fcal = F calculada; Ftab = F de tabla

Ya que el valor de F de tabla es mayor al de F calculada, se establece que entre los resultados de los analistas no hay diferencia significativa con un nivel de significancia del 95%.

Tabla 33. Prueba de rango múltiple LSD

Analista	No. de Datos	Promedio	Grupos homogéneos
1	6	1.079	X
2	6	1.094	X
3	6	1.097	X

Contraste	Diferencia	Limite
1-2	-0.003	0.108
1-2	-0.015	0.108
2-3	-0.018	0.108

Se confirma que hay homogeneidad en los resultados de los analistas, por lo tanto los resultados que arroja la metodología son reproducibles.

2.2.1.9 Ensayo de colaboración interlaboratorio

Los laboratorios participantes fueron:

- el laboratorio 111 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química
- el laboratorio 115 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química
- el laboratorio de Investigación y Nutrición del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional siglo XXI contando con la colaboración del M. en C. Miguel Hernández Infante.

Se realizó un análisis de varianza ANDEVA de una vía con un nivel de significancia del 95% y una prueba de rango múltiple con los datos obtenidos de tres determinaciones por triplicado, de tres analistas, de los tres laboratorios participantes, con un total de 9 datos por analista. Se verificó la existencia de diferencia significativa de los resultados entre laboratorios de acuerdo a la misma hipótesis aplicada en el ensayo intralaboratorio. El resultado se comprobó mediante una prueba de rango múltiple LSD.

Tabla 34. Cuadro de análisis de varianza con nivel de significancia del 95%. Prueba LSD

Fuente de la variación	Grados de libertad	SC	CM	Fcal	Ftab
Laboratorio	2	0.0457	0.0228	0.717	3.13
Repeticiones	69	2.1997	0.0318		
Total	71	2.2454			

SC = Suma de cuadrados; CM = Cuadrados medios; Fcal = F calculada; Ftab = F de tabla

Como el valor de F de tabla es mayor al de F calculada, se establece que entre los resultados de los laboratorios no hay diferencia significativa a un nivel de significancia del 95%.

Tabla 35. Prueba de rango múltiple LSD

Laboratorio	No. de Datos	Promedio	Grupos homogéneos
A	27	1.082	X
B	18	1.090	X
C	27	1.137	X

Contraste	Diferencia	Límites
A-B	-0.007	0.1084
A-C	0.054	0.0969
B-C	0.046	0.1084

Se confirma que hay homogeneidad en los resultados de los laboratorios, por lo tanto los resultados que arroja la metodología son altamente reproducibles.

2.3 Determinación de taninos en muestras

Se determinó el contenido de ácido tánico en las semillas de: mamey, capulín, cacahuanano, napahuite, colorín y pipian, adquiridas en el mercado local. Se seleccionaron las muestras anteriores debido a que son de interés principalmente por el alto contenido de grasa y/o de proteína que reportan, razón por la cual son múltiples los posibles usos a los cuales pueden ser destinadas, entre ellos la alimentación humana y animal; sin embargo para ello se requiere previamente de numerosos análisis de las mismas, entre ellos los referentes a la toxicología. Con el presente trabajo se contribuye a tener una mejor caracterización químico toxicológica de las muestras analizadas, específicamente con respecto al contenido de taninos.

A continuación se presentan las características de las muestras y los resultados obtenidos.

Tabla 36. Características de las semillas analizadas

Muestra No.	Nombre común	Nombre científico	Humedad *	Grasa *	Proteína *
1	Cacahuanano	<i>Gliricidia sepium</i>	5.68	21.53	39.35
2	Napahuite	<i>Trichilia irta</i>	3.28	47.86	11.64
3	Colorín	<i>Erythrina americana</i>	6.30	18.81	26.32
4	Mamey	<i>Calocarpun sapota</i>	45.36	26.38	7.13
5	Capulín	<i>Prunus serotina</i>	4.54	44.20	31.67
6	Pipian	<i>Cucurbita pepo</i>	5.19	44.02	37.76

a = Expresado como %.

Tabla 37. Contenido de taninos en semilla integral expresado como ácido tánico

Muestra No.	% de ácido tánico
1	0.987 ± 0.002
2	0.124 ± 0.008
3	0.196 ± 0.009
4	1.976 ± 0.025
5	No detectado
6	No detectado

Debido a que la determinación de ácido tánico se llevó a cabo en las semillas de las muestras vegetales, cuando se menciona cualquiera de ellas, se hace alusión únicamente a la semilla de las mismas.

El contenido más alto de ácido tánico corresponde al mamey, siendo éste de 3.14%. El cacahuanano presenta también un contenido alto de ácido tánico de 1.112%.

Es importante recordar que el método validado en el presente trabajo cuantifica polifenoles totales expresados como ácido tánico y no discrimina entre aquellos que tienen impacto en la nutrición y los que no lo tienen (polifenoles de peso molecular inferior a 500 Daltons), por lo cual el contenido de taninos encontrado en las muestras analizadas no proporciona información definitiva del riesgo potencial que constituyen, por ello se sugiere realizar simultáneamente estudios *in vivo* para así determinar la proporción de taninos cuantificados que tienen efectos antinutricionales.

A pesar de los inconvenientes mencionados anteriormente, el valor numérico del contenido de taninos presente en una muestra, proporciona una idea general del posible peligro que ésta representa.

Una vez más se hace notar la importancia de la validez del método utilizado en esta sección.

IV.- CONCLUSIONES

Debido a los numerosos factores tóxicos que se encuentran en los alimentos y a los múltiples efectos que tienen tanto en el hombre como en los animales, es importante contar con una caracterización químico toxicológica de los alimentos.

Es necesario que los métodos analíticos empleados en la detección y cuantificación de factores tóxicos sean validados, con el fin de comprobar que emiten resultados confiables, precisos y reproducibles.

En el presente trabajo, después de haber hecho ciertas adaptaciones, e incluir etapas que se consideraron necesarias para el adecuado desarrollo experimental; se validaron dos métodos de análisis en muestras vegetales: uno para la cuantificación de nitratos y el otro para taninos. Ambos son exactos, precisos y reproducibles; características que son necesarias para establecer la confiabilidad de cualquier técnica analítica.

El proceso de validación implica múltiples pruebas estadísticas que demandan numerosas repeticiones; además llevar a cabo ensayos de colaboración es particularmente difícil ya que es necesario contar con la participación de un gran número de analistas y entidades calificados.

En los ensayos de colaboración es recomendable contar con una población representativa tanto de analistas como de laboratorios participantes con el fin de efectuar análisis estadísticos significativos y confiables.

En el caso del método validado para nitratos, los resultados del ensayo de colaboración interlaboratorio no fueron concluyentes cuando se llevó a cabo con tres entidades, por lo cual se recomienda hacerlo con un número mayor de participantes.

Los métodos aquí validados son aptos. Al aplicarse el método de nitratos en diversas muestras vegetales arrojó resultados que están en concordancia con los señalados por la bibliografía consultada.

En el caso de los taninos, el método propuesto dio una respuesta positiva en el proceso de validación, situación que comprueba igualmente su viabilidad.

Están dadas las condiciones para afirmar que los métodos validados en el presente trabajo se pueden implantar en cualquier laboratorio de análisis para aplicarlos sobre muestras vegetales, con el propósito de determinar el contenido de nitratos y taninos con la seguridad de obtener resultados confiables.

ANEXO 1

DETERMINACIÓN DE NITRATOS

Adaptación al método de Cataldo

REACTIVOS

Todos los reactivos son grado analítico y el agua empleada es destilada.

SAL DE NITRATO *

Solución estándar de nitrato de 0.6mg/ml.

Solución estándar de nitrato de 10 mg/ml (empleada en el caso de que se trabaje con carbón activado)

* Las concentraciones indicadas corresponden al ion NO_3^- que es nuestro objeto de estudio.

ÁCIDO SALICÍLICO

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

HIDRÓXIDO DE SODIO

Solución 2 M.

CARBÓN ACTIVADO *

* Grado comercial Supelco.

EQUIPOS

Equipos usuales de laboratorio, en particular los siguientes:

- AGITADOR MAGNÉTICO Thermoline Multi-stir plate 4, No 29387
- CENTRIFUGA Clay Adams DYNAC.
- ADAPTADOR PARA FILTRACIÓN EN JERINGA MILLIPORE
- MEMBRANA MILLIPORE tipo HATF-02500 (tamaño poro 0.45 μm)
- AGITADORES MECÁNICOS tipo Vortex
- BAÑO REGULADOR DE TEMPERATURA Grant con escala de 0-100 ° C.
- ESPECTROFOTÓMETRO Sequoia-Turner Modelo 340

MATERIAL

Vasos de precipitado de 50 ml

Probeta de 50 ml

Matraces volumétricos de 50 ml

Tubos de ensayo de 140 x 14 mm

Embudos Buchner

Matraces Kitasato

Micropipetas de 50, 200 y 1000 μl

Bureta de 50 ml

Tubos de centrifuga

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE ENSAYO

Se lleva acabo en la forma que se describió en la sección de muestra de referencia.

PROCEDIMIENTO

PREPARACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR (Usando carbón activado)

Preparar curva estándar con intervalo de concentraciones de 6-60 μg de nitrato (NO_3).

1. En un vaso de precipitado de 50 ml adicionar exactamente 3.0 ml de la solución estándar de nitrato de 10 mg/ ml, 550 mg de carbón activado y aproximadamente 30 ml de agua. Mezclar hasta homogeneizar.
2. Filtrar con ayuda de vacío sobre papel Whatman del # 41, enjuagando el vaso sucesivamente con pequeñas porciones de agua.
3. Transferir el filtrado cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 ml y llevar a la marca de aforo con agua, homogeneizar y transferir a un tubo de centrifuga de 50 ml. Centrifugar una hora a 2700 - 3000 rpm.
4. Filtrar el sobrenadante con ayuda de vacío sobre papel Whatman del # 542 y homogeneizar.

La solución así obtenida tiene una concentración de nitrato de 0.6 mg/ml.

Nota 1: El filtrado debe quedar perfectamente traslúcido, si se observan partículas en suspensión, se sugiere filtrar una vez más o bien filtrar con dispositivo Millipore.

5. Rotular 6 tubos de ensayo, correspondiendo el No. 1 al blanco de la curva, los restantes corresponden a los puntos de la curva. Adicionar diferentes volúmenes de la solución patrón de nitrato de acuerdo con el cuadro No. 1.
6. Añadir agua a cada tubo para llevar a un volumen final de 0.1 ml y mezclar por 15 segundos en Vortex

7. Adicionar 0.4 ml de solución de ácido salicílico, mezclar por 15 segundos en Vortex e introducir en baño de temperatura a 30°C por 20 minutos \pm 1.
8. Transcurridos los 20 minutos, adicionar lentamente con bureta 9.5 ml de la solución de NaOH y agitar por 15 segundos en Vortex. Introducir en baño de temperatura a 30°C por 15 minutos \pm 1.
9. Transferir a celdas de medición y leer en espectrofotómetro a 410 nm.
10. Trazar gráfica de absorbancia vs concentración de nitrato, expresada como μg de nitrato.

PREPARACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR (Sin carbón activado)

Partir directamente de la solución estándar de nitrato de 0.6 mg/ml. Omitir los puntos 1 al 4 de la sección anterior y proceder como se indica a partir del punto 5.

CUADRO No. 1 Datos para preparar la curva estándar

Tubo	Solución estándar de nitrato 0.6mg/ml (μl)	H ₂ O (μl)	Solución de ácido salicílico (ml)	Incubación: 20 min 30°C	Solución de NaOH (ml)	Incubación: 15 min 30°C
1 (blanco)	-	100	0.4		9.5	
2	10	90	0.4		9.5	
3	20	80	0.4		9.5	
4	50	50	0.4		9.5	
5	70	30	0.4		9.5	
6	100	-	0.4		9.5	

OBTENCIÓN DE EXTRACTO

1. En un vaso de precipitado de 50 ml añadir de 0.25 a 0.9 g de muestra, 550 mg de carbón activado y 30 ml aproximadamente de agua. Agitar moderadamente, de 500 a 700 rpm, en agitador magnético durante 15 minutos \pm 1 min.

Nota 2: El carbón activado únicamente es necesario si se tiene una muestra cuyo extracto esté muy pigmentado.

2. Filtrar con ayuda de vacío sobre papel Whatman del # 41, enjuagando el vaso sucesivamente con pequeñas porciones de agua.
3. Transferir el filtrado cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 ml y llevar a la marca de aforo con agua, homogeneizar y transferir a un tubo de centrifuga de 50 ml. Centrifugar una hora a 2700 - 3000 rpm.
4. Filtrar el sobrenadante con ayuda de vacío sobre papel Whatman del # 542 y homogeneizar para efectuar la determinación.

Nota 3: El filtrado debe quedar perfectamente traslúcido, si se observan partículas en suspensión, se sugiere filtrar una vez más o bien filtrar con dispositivo Millipore.

Nota 4: Al obtener el extracto se recomienda llevar a cabo inmediatamente la determinación, de no ser así, éste se debe guardar en refrigeración hasta que vaya a ser utilizado.

DETERMINACIÓN

Una vez obtenido el extracto de la muestra problema (Ver cuadro No. 2):

1. Rotular 4 tubos de ensayo, correspondiendo el No. 1 al blanco de la muestra
2. Adicionar alícuota de 100 μ l de sobrenadante a cada tubo.
3. Añadir 0.4 ml de la solución de ácido salicílico, excepto al blanco, al cual adicionar 0.4 ml de ácido sulfúrico concentrado. Mezclar por 15 segundos en Vortex e introducir en baño regulador de temperatura a 30°C por 20 minutos \pm 1.
4. Transcurridos los 20 minutos, adicionar con bureta 9.5 ml de solución de NaOH, mezclar por 15 segundos en Vortex e introducir en baño de temperatura a 30°C por 15 minutos \pm 1.
- 5.- Transferir a celdas de medición y leer en espectrofotómetro a 410 nm.
- 6.- Mediante la ecuación de la línea recta obtenida con los datos de la curva patrón determinar el contenido de nitratos.

Cuadro No. 2 Datos para efectuar la determinación de Nitratos

Tubo	Extracto muestra (μ l)	H ₂ SO ₄ Concentrado (ml)	Solución de ácido salicílico (ml)	Incubación: 20 minutos 30°C	Solución de NaOH (ml)	Incubación: 15 minutos 30°C
1(blanco)	100	0.4	-		9.5	
2	100	-	0.4		9.5	
3	100	-	0.4		9.5	
4	100	-	0.4		9.5	

ANEXO 2

DETERMINACIÓN DE TANINOS

Adaptación al método ISO 9648

REACTIVOS

Todos los reactivos son grado analítico, el agua empleada es destilada.

ÁCIDO TÁNICO *

Solución estándar de referencia de ácido tánico que contenga 0.2g/ 100 ml

* SIGMA no. T-0125 y dicha solución estable por una semana en refrigeración y protegida de la luz.

AMONIACO

Solución de 0.232 g de NH_3 /100 ml (a partir de Hidróxido de amonio).

Considerar pureza y densidad de hidróxido de amonio.

DIMETILFORMAMIDA

Solución al 75% (v/v)

CITRATO FÉRRICO DE AMONIO *

El contenido de hierro debe estar entre 17% - 20%. Solución de 0.35 g/ 100 ml preparada 24 horas antes de usarse.

*Almacenar en refrigeración y protegida de la luz.

EQUIPOS

Equipos usuales de laboratorio, en particular los siguientes:

- AGITADOR MAGNÉTICO Thermoline Multi-stir plate 4, No 29387
- CENTRIFUGA Clay Adams DYNAC.

- AGITADORES MECÁNICOS tipo Vortex
- BAÑO REGULADOR DE TEMPERATURA Grant con escala de 0-100 ° C.
- ESPECTROFOTÓMETRO Sequoia-Turner Modelo 340

MATERIAL

Vasos de precipitado de 50 ml

Matraces volumétricos de 25 ml

Probeta de 50 ml

Tubos de ensayo de 16 x 150 mm

Micropipetas de 1 y 5 ml

Tubos de centrifuga

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE ENSAYO

Se lleva a cabo en la forma que se describió en la sección de muestra de referencia.

En los productos triturados los taninos se oxidan rápidamente, por lo que debe realizarse el análisis inmediatamente, o bien guardar en refrigeración el producto molido.

Se recomienda desengrasar la harina en caso de que la muestra contenga más de 5% de grasa, ya que ésta interfiere en la determinación.

PROCEDIMIENTO

PREPARACIÓN DE CURVA ESTÁNDAR:

Construir curva estándar con concentraciones de 80-400 µg de ácido tánico

1. Rotular 6 tubos de ensayo, correspondiendo el No. 1 al blanco de la curva, los restantes corresponden a los puntos de la curva. Adicionar diferentes volúmenes de la solución patrón de ácido tánico de acuerdo con el cuadro No. 3.
2. Añadir dimetilformamida a cada tubo para llevar a un volumen final de 1 ml y mezclar por 15 segundos en Vortex
3. Añadir 5 ml de agua a cada tubo y mezclar por 15 segundos.
4. Adicionar 1 ml de solución de citrato férrico amoniacal, mezclar por 15 segundos en Vortex .
5. Añadir 1 ml de solución de amoniaco y mezclar en Vortex.
Introducir en baño de temperatura controlada y mantener 10 minutos ± 1 min a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ para permitir el desarrollo óptimo de color.
6. Transcurridos los 10 minutos, inmediatamente transferir a celdas de medición y leer en espectrofotómetro a 525 nm.
7. Trazar gráfica de absorbancia vs concentración de ácido tánico expresada como μg de ácido tánico.

CUADRO No. 3 Datos para preparar la curva estándar

Tubo	Sol. ácido tánico 0.2g/100 ml (ml)	Dimetilforma- mida 75% (ml)	H ₂ O (ml)	Citrato Férrico Amoniacal 0.35 g/ 100 ml (ml)	Amoniaco 0.232 g/ 100 ml (ml)
1 (Blanco)	-----	1	5	1	1
2	0.04	0.96	5	1	1
3	0.08	0.92	5	1	1
4	0.12	0.88	5	1	1
5	0.16	0.84	5	1	1
6	0.2	0.8	5	1	1

OBTENCIÓN DE EXTRACTO:

1. Pesar de 0.3 a 1g de muestra en vaso de precipitado de 50 ml
2. Disolver con 20 ml de la solución de dimetilformamida y agitar moderadamente, de 500 a 700 rpm, en agitador magnético durante 60 minutos \pm 3 min.
3. Transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 ml. Llevar a la marca de aforo con la solución de dimetilformamida, homogeneizar y transferir a un tubo de centrifuga de 50 ml, tapar el tubo y centrifugar a 2700-3000 rpm por 10 minutos \pm 1 min.
4. Decantar el sobrenadante en un vaso de precipitado y homogeneizarlo para efectuar la determinación inmediatamente después de obtener el extracto.

Nota 1: Al obtener el extracto se recomienda llevar acabo inmediatamente la determinación, de no ser así, éste se debe guardar en refrigeración hasta que vaya a ser utilizado.

DETERMINACIÓN:

Una vez obtenido el extracto de la muestra problema, rotular 4 tubos de ensayo (uno correspondiente al blanco y los restantes al problema, llevándose a cabo la lectura por triplicado)

1. Añadir los diferentes reactivos, de acuerdo al orden propuesto en el cuadro No. 4.
Mezclar perfectamente en Vortex el contenido de los tubos después de cada adición.
2. Después de la última adición, agitar e introducir en baño de temperatura controlada y mantener 10 minutos \pm 1 min a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ para permitir el desarrollo óptimo de color.
3. Inmediatamente transferir a celdas de medición y leer en espectrofotómetro a 525 nm
4. Mediante la ecuación de la línea recta obtenida con los datos de la curva patrón, determinar el contenido de taninos y reportar como % de ácido tánico.

CUADRO No. 4 Datos para efectuar la determinación de taninos

Tubo	Muestra (ml)	H ₂ O (ml)	Citrato Férrico Amoniacoal 0.35 g/ 100 ml (ml)	Amoniaco 0.232 g/ 100 ml (ml)
1 (Blanco)	1	6	1	-----
2	1	5	1	1
3	1	5	1	1
4	1	5	1	1

ANEXO3

VALIDACION. LINEALIDAD DEL SISTEMA

Fórmulas matemáticas para la determinación de coeficientes de correlación (r) y de determinación (r²)

$$r = \frac{\left[\frac{\left[nt (\Sigma xy) - (\Sigma x) (\Sigma y) \right]^2}{\left[nt (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2 \right] \left[nt (\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2 \right]} \right]^{\frac{1}{2}}}{1} \quad ; \quad y$$

$$r^2 = \frac{\left[nt (\Sigma xy) - (\Sigma x) (\Sigma y) \right]^2}{\left[nt (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2 \right] \left[nt (\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2 \right]}$$

ANEXO 4

VALIDACION. LINEALIDAD DEL METODO

Fórmulas matemáticas para la determinación de la pendiente (m) y la ordenada al origen (b)

$$m = \frac{nt (\Sigma xy) - (\Sigma x) (\Sigma y)}{nt (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2} \quad ; \quad b = \frac{\Sigma y - m (\Sigma x)}{nt}$$

ANEXO 5

VALIDACION. ESTABILIDAD DEL EXTRACTO

Fórmulas matemáticas para la determinación del intervalo de confianza (IC) y el factor (I)

$$IC = (Y_i - Y_0) \pm t^* \left[S_{pi}^2 (2/3) \right]^{1/2}$$

En donde:

t^* = valor de la t de Dunnett con c comparaciones y 2 (c+1) grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975.

$$I = \frac{(\text{análisis/ condición/ tiempo})_i}{(\text{análisis inicial})_i} \times 100 \quad - \quad I = \frac{\Sigma I (\text{condición/ tiempo})}{N}$$

ANEXO 6

ANÁLISIS ESTADÍSTICO EN MUESTRAS INTEGRALES Y DESENGRASADAS

Prueba de t pareada

Tabla 38 . Valores analizados en la prueba de t pareada

Muestra	% ácido tánico ^A	% ácido tánico ^B	Diferencia
Cacahuanano	0.986	1.407	0.421
	0.986	1.399	0.413
	0.989	1.447	0.461
Napahuite	0.116	0.450	0.334
	0.132	0.452	0.320
	0.124	0.447	0.323
Colorín	0.196	0.272	0.076
	0.196	0.271	0.075
	0.198	0.276	0.078
Mamey	1.962	4.298	2.336
	2.006	4.239	2.233
	1.962	4.267	2.305

A = Harina integral B = Harina desengrasada

H_0 = Hipótesis nula	No existe diferencia significativa
$t_{\text{tab } 0.05, 11}$	1.79
$t_{\text{cal } 0.05, 11}$	2.93

t_{cal} = t calculada; t_{tab} = t de tabla

Ya que el valor de t_{exp} es mayor que el de $t_{\text{de tablas}}$, se rechaza la hipótesis nula (H_0) y se establece que los resultados son significativamente diferentes entre la harina integral y la harina desengrasada de una misma muestra.

Los resultados anteriores se comprobaron por medio de un ANOVA multifactorial y una prueba de rango múltiple LSD con un nivel de significancia del 95% :

Tabla 39. Cuadro de análisis de varianza para taninos A vs B

Fuente de la variación	Grados de libertad	SC	CM	Fcal	Ftab
C: grasa	1	3.6597	3.6597	14.902	4.28
D: muestra	3	32.7615	10.9205	44.467	3.03
Residual	19	4.6661	0.2455		
Total	23	41.0873			

SC = Suma de cuadrados; CM = Cuadrados medios; Fcal = F calculada; Ftab = F de tabla

Ya que el valor de F de tabla es menor al de F calculada en el factor grasa, se establece que entre los resultados de las determinaciones de harina integral (A) y desengrasada (B) existe diferencia significativa con un nivel de significancia del 95%.

Tabla 40. Prueba de rango múltiple LSD

Grupo	No. de Datos	Promedio	Grupos homogéneos
A	12	0.8210	X
B	12	1.6020	X
Contraste	Diferencia		
A-B	-0.7810 *		

* Denota diferencia significativa

BIBLIOGRAFÍA

1. Alfonso A. **Algunas consideraciones sobre las plantas tóxicas para los animales domésticos.** CENSA, pág. 84-92, La Habana (1988).
2. Ali R. and Muzquiz M. **Antinutritional factors in tropical legume seeds for human nutrition.** 3rd Int. Workshop on Antinutritional Factors in Legume Seeds and Rapeseed, pp. 107-129, Wageningen (1998).
3. AOAC, **Official Methods of Analysis**, 16 th ed., Association of Official Agricultural Chemists, Washington, D.C. (1998).
4. Ayet G., Burbano C., Cuadrado C., Pedrosa M., Robredo L., Muzquiz M., de la Cuadra C., Castaño A. and Osagie A. **Effect of germination, under different environmental conditions, on saponins, phytic acid and tannins in lentils (*Lens culinaris*).** J. Sci. Food Agric. 74, 273-279 (1997).
5. Badui S. **Química de los alimentos.** Alhambra, 2^a edición, pág. 467-470, México, D.F. (1990).
6. Barroga Ch., Laurena A. C. And Mendoza E. M. **Polyphenols in mung bean (*Vigna radiata* L.): Determination and removal.** J. Agric. Food Chem. 33, 1006-1009 (1985)
7. Boehringer Mannheim. **Biochemica. Methods of enzymatic bioanalysis and food analysis.** pp. 108-110 (1990).
8. Bonorden W. R. and Pariza M. W. **Antioxidant nutrients and protection from free radicals.** In Nutritional toxicology. Kotsonis F., Mackey M. And Hjelle J. (Eds). Raven Press, pp. 19-48, Ltd. New York (1994).
9. Bressani R., Elias L. G., Wolzak A., Hagerman A.E. and Butler L. G. **Tannins in common beans: methods of analysis and effects on protein quality.** J. Food Sci. 48, 1000-1003 (1983).
10. Carbonaro M., Virgili F., Lucarini M and Carnovale E. **Role of tannins in legume containing diets: interaction to proteins and antioxidant properties.** In Effects of antinutrients on the nutritional value of legume diets. Bardocz S., Nekrep F., Pusztai A. (Eds). COST 98, pp. 65-69, Luxembourg (1996).
11. Cataldo D. A., Haroon M., Schrader L. E. And Youngs V. L. **Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid.** Commun. Soil Sci. Plant Anal. 6, 71-80 (1975).
12. Committee on Food Protection. **Toxicants occurring naturally in food.** National Academy of Sciences, 2nd edition, pp. 7-25, Washington DC (1973).

13. Chang M. J., Collins J. L., Bailey J. W. And Coffey D. L. Cowpeas tannins related to cultivar, maturity, dehulling and heating. *J. Food Sci.* 59, 1034-1036 (1994).
14. Derache R. *Toxicología y seguridad de los alimentos.* Omega, pág. 120-121, 234-247, Barcelona (1990).
15. Deshpande S. S. and Cheryan M. Evaluation of vainillin assay for tannin analysis of dry beans. *J. Food Sci.* 50, 905-910 (1985).
16. Deshpande S.S. and Cheryan M. Determination of phenolic compounds of dry beans using vainillin, redox and precipitation assays. *J. Food Sci.* 52, 332-334 (1987).
17. Deshpande S.S., Cheryan M. and Salunke D. K. Tannin analysis of food products. *CRC Critical reviews en food science and nutrition.* 24, 401-449 (1989).
18. Fernández J. C., Rosiles R. y González A. Cuantificación de taninos en muestras de sorgo (*Sorghum vulgare*) procedentes de 5 Estados de la República Mexicana. *Veterinaria Méx.* 16, 231-233 (1985).
19. Furia T. *Handbook of food additives.* 2nd edition. CRC Critical reviews of food science and nutrition, USA, 153-155 (1981).
20. González A. *Plantas tóxicas para el ganado.* Limusa, pág. 27-28, México, D.F. (1989).
21. Goycoolea F., González E., Barrón J. y Valencia M. Efecto de los tratamientos caseros en la preparación de frijol pinto (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre el contenido de taninos y valor nutritivo de las proteínas. *Arch. Lat. Nutr.* 40, 263-274 (1990).
22. Griffiths D. W. The inhibition of digestive enzymes by polyphenolic compounds. In *Nutritional and toxicological significance of enzyme inhibitors in foods.* Friedman M.(Ed). Plenum Press, pp. 509-516, New York (1986).
23. Hagerman A. E. *Booklet of methods used for tannin analysis.* Department of chemistry, Miami University, Miami (1995).
24. Hagerman A. E. and Butler L. G. Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. *J. Chem Ecol.* 15, 1795-1810 (1998).
25. Hill G. D. and Tamminga S. The effects of antinutritional factors in legume seed and rapeseed on ruminant nutrition. 3rd Int. Workshop on Antinutritional Factors in Legume Seeds and Rapeseed, pp. 157-171, Wageningen (1998).
26. Hokanson G. A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development, part I: The initial method validation process. *Pharm. Tech.* September, 118-130 (1994 a).

27. Hokanson G. **A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development, part II: Changes and the need for additional validation.** Pharm. Tech. October, 92-100 (1994 b).
28. Horigome T., Kumor R. and Okamoto K. **Effects of condensed tannins prepared from leaves of fodder plants on digestive enzymes *in vitro* and on the intestine of rats.** British J. Nutr. 60, 275-285 (1988).
29. Huisman J. and Tolman G. H. **Antinutritional factors in the plant proteins of diets for non-ruminants.** In Recent advances in animal nutrition. Gainsworthy P. C., Haresign W. (Eds). Butterworth Haineman, pp. 3-31, Wageningen (1992).
30. Jansman J. M., Fröhlich A. A. And Marquardt R. R. **Production of prolin- rich proteins by the parotid glands or fats is enhanced by feeding diets containing tannins from faba beans (*Vicia faba* L.).** J. Nutr. 124, 249-258 (1994).
31. Lang J. and Bolton S. **A comprehensive method validation strategy for bioanalytical applications in the pharmaceutical industry-1. Experimental considerations.** J. Pharm. Biom. Anal. 9, 357-361 (1991 a).
32. Lang J. and Bolton S. **A comprehensive method validation strategy for bioanalytical applications in the pharmaceutical industry-2. Statistical analyses.** J. Pharm. Biom. Anal. 9, 435-442 (1991 b).
33. Larry, B.A., Michale D.P. and Salminen S. **Food Additives.** Marcel Dekker, Inc. pp. 9-30, New York (1990).
34. Lewis R. J. **Food additives handbook.** Van Nostrand Reinhold, pp. 417, Ottawa (1989)
35. Lindner E. **Toxicología de los alimentos.** Acribia, 2ª edición, pág 82-84, 176-184, Zaragoza (1995).
36. Longstaff M. A. and Mc Nab J. M. **The effect of concentration of tannin- rich beans hulls (*Vicia faba* L.) on activities of lipase (EC 3.1.1.3) and α - amilase (EC 3.2.1.1) in digesta and pancreas and on the digestion of lipid and starch by young chicks.** British J. Nutr. 66, 139-147 (1991).
37. Makkar H., Blümmel M., Borowy N. K. and Becker K. **Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods.** J. Sci. Food Agric. 61, 161-165 (1993).
38. Makkar P. S., Becker K., Abel H. and Pawelzik E. **Nutrient contents, rumen degradability and antinutritional factors in some colour and white flowering cultivars of *Vicia faba* beans.** J. Sci. Food Agric. 75, 511-520 (1997).
39. Marquardt R. **Dietary effects of tannins, vicine and convicine.** 1st Int. Workshop on Antinutritional Factors in Legume Seeds, pp 141-155, Wageningen (1988).

40. Miller J.C and Miller J. N. **Estadística para química analítica**. Addison-wesley iberoamericana, 2ª edición, México, D.F. (1993).
41. Moneam N. M. **Effects of presoaking on faba bean enzyme inhibitors and polyphenols after cooking**. J. Agric. Food Chem. 38, 1479- 1482 (1990).
42. Naczki M., Nichols T., Pink D. and Sosulski F. **Condensed tannins in canola hulls**. J. Agric. Food Chem. 42, 2196-2200 (1994).
43. Noa M., Sánchez L. M., John C. M. y Alfonso H. A. **Determinación de nitratos y nitritos en material vegetal y suelos**. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, La Habana (1990).
44. Ockerman H. **Food science sourcebook**. An AVI book, 2nd edition, pp. 1234, New York (1978).
45. Padmaja G. **Evaluation of techniques to reduce assayable tannin and cyanide in Cassava leaves**. J. Agric. Food Chem. 37, 712-716 (1989).
46. Pentchuck, J., Haldna, Ü. And Ilmja, K. **Determination of nitrates and chloride ions in foods by single-column ion chromatography**. J. Chrom. 364, 189-192 (1986).
47. Reed J. D. **Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes**. J. Anim. Sci. 73, 1516-1528 (1995).
48. Reichigl M. **Handbook of naturally occurring food toxicants**. CRC Press, pp. 152, USA (1983).
49. Roberts H. **Food safety**. Wiley Interscience Publication. Wiley and sons. pp. 195-196, 245-246, USA (1981).
50. Sandoval W., Carmona A. **Comparative study of condensed and hydrolyzable tannin interaction with isolated proteins and enzymes**. 3rd Int. Workshop on Antinutritional Factors in Legume Seeds and Rapeseed, pp. 39-42, Wageningen, (1998).
51. Stahr H. M. **Analytical methods in toxicology**. John Wiley and Sons, Inc., pp. 15-24, Ottawa (1991).
52. Taylor J. **Validation of analytical methods**. Anal. Chem. 55, 600-608 (1983).
53. Taylor S., Scanlan R. **Food toxicology: a perspective on the relative risks**. Basic symposium series. New York and Basel, pp. 57-100, USA (1989).
54. Terrill T. H., Windham W. R., Evans J.J. and Hoveland C. S. **Effect of drying method and condensed tannin on detergent fiber analysis of *Sericea lespedeza***. J. Sci. Food Agric. 66, 337-343 (1994).

55. Trugo L. C. Von Baer D., **Analytical methods for the analysis of antinutritional factors in legume seeds.** 3rd Int. Workshop on Antinutritional Factors in Legume Seeds and Rapeseed, pp. 11-29, Wageningen (1998).
56. **Validación de Métodos Analíticos.** Comité de validación de métodos analíticos, Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, A. C. (1989).
57. Vidal C., Frías J., Estrella I., Gorospe M. J., Ruiz R. and Bacon J. **Effect of processing on some antinutritional factors of lentils.** J. Agric. Food Chem. 42, 2291-2295 (1994).
58. URL 1 · <http://www.agric.gov.ab.ca/agdex/400/0006001.html>
Yaremco B. **Nitrate poisoning and feeding nitrate feeds to livestock** (1998).
59. URL 2 <http://www.emedicine.com/emerg/topic313.htm>
Lee D. **Methemoglobinemia** (1998).
60. URL 3 <http://www.ewg.org/pub/home/Reports/Nitrate/NitrateHealth.html>
Health effects of nitrate exposure (1998).
61. URL 4
<http://www.forages.css.orst.edu/Topics/Pastures/Species/Grasses/Animal issues/Nitrate.html> **Nitrate poisoning** (1998).
62. URL 5 <http://leviathan.tamu.edu:70/0/pubs/humnutr/fs65.saf.txt>
Naturally occurring toxicants in foods (1998).
63. URL 6. <http://allserv.rug.ac.be/~hbrackma/labo/publications/MAN1294.HTML>
Dejonckheere W., Steurbaut W., Drieghe S., Verstraeten R. and Braeckman H. **Nitrate in food commodities of vegetable origin and the total diet in Belgium, 1992-1993** (1998).
64. URL 7 <http://www.ansci.cornell.edu/toxicagents/tannin/tannin.htm>
Cannas A. **Tannins: fascinating but sometimes dangerous molecules** (1998)