



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN NUTRITIVA Y TOXICOLÓGICA DE  
LA INFLORESCENCIA DEL HUAUZONTLE  
(*Chenopodium nuttalliae*) CRUDA Y COCIDA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**Q U Í M I C O D E A L I M E N T O S**

**P R E S E N T A :**

**ENRIQUE MANUEL GUZMÁN MOSQUEDA**



MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

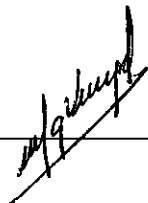
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Prof. BERNARDO LUCAS FLORENTINO
VOCAL	Prof. INOCENCIA MARÍA DE LOURDES FLORES TELLEZ
SECRETARIO	Prof. LETICIA GIL VIEYRA
1er SUPLENTE	Prof. INES MIRANDA MARTÍNEZ
2do SUPLENTE	Prof. ILIANA ELVIRA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

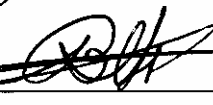
El tema se desarrolló en el Laboratorio 111 del Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química, Ciudad Universitaria

Asesor:  
QFB Leticia Gil Vieyra



---

Supervisor técnico:  
M. en C. Bernardo Lucas Florentino



---

Sustentante:  
Enrique Manuel Guzmán Mosqueda



---

## AGRADECIMIENTOS

*A M. en C. Bernardo Lucas Florentino y a QFB Leticia Gil Vieyra por el apoyo, colaboración y dedicación brindados durante la realización de los ensayos en el laboratorio y de este escrito*

*A M. en C. Imelda Velázquez por el amplio respaldo durante la investigación bibliográfica de esta tesis*

*Al Colegio de Profesores de la Facultad de Química, UNAM y a la sección 024 de las Asociaciones Autónomas del Personal Académico de la UNAM, por el apoyo proporcionado para la realización de este trabajo, a través de la Cátedra “Alberto Urbina del Raso”*

*Con especial agradecimiento y dedicatoria a mis padres Enrique Guzmán Cuevas y Martha Mosqueda Canchola, por todo el esfuerzo que han realizado por toda su familia, por el apoyo que me han brindado durante toda mi vida y por tantas enseñanzas que me han compartido*

*A mis hermanos Susana, José, Rodrigo, Carolina y Erick por su confianza y apoyo: a cada uno de ustedes los respeto y admiro mucho*

*A Magali por haber compartido conmigo tantas experiencias, por todas las cosas que he aprendido junto a ella, por estar siempre a mi lado, por su amor incondicional y por mostrarme un ejemplo de superación y trabajo constante*

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	7
OBJETIVOS	9
1. ANTECEDENTES	10
1.1. El género <i>Chenopodium</i>	10
1.2. La quinoa ( <i>Chenopodium quinoa</i> )	10
Usos de la quinoa	11
Composición química de la semilla de la quinoa	12
Factores tóxicos y antinutrimientales de la semilla de la quinoa	13
Contenido de minerales de la semilla de la quinoa	14
Calidad de la proteína de la semilla de la quinoa	15
1.3. El huauzontle ( <i>Chenopodium nuttalliae</i> )	18
1.4. Factores tóxicos y antinutrimientales	19
Taninos	19
Inhibidores de tripsina	20
Hemaglutininas (lectinas)	22
Saponinas	23
Nitratos	24
1.5. Minerales	25
Hierro	26
Fósforo	27
Calcio	29
1.6. Valor nutricional de las proteínas	30
Aminoácidos esenciales	30
Evaluación de la calidad de las proteínas por métodos biológicos	32
Relación de Eficiencia de la Proteína (REP)	32
Digestibilidad	33
2. METODOLOGÍA	35
2.1. Caracterización bromatológica y toxicológica de la inflorescencia del huauzontle	36
Obtención y tratamiento de la muestra	36
Análisis proximal	36

Determinación de factores tóxicos y antinutrimientales	39
Cuantificación de minerales	54
2.2. Evaluación nutritiva de la inflorescencia del huauzontle	55
Obtención y tratamiento de las fuentes de proteína	55
Análisis proximal	56
Preparación de las dietas	57
Prueba biológica. Relación de Eficiencia de la Proteína (REP)	58
Digestibilidad	60
2.3. Análisis de resultados	61
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
3.1. Caracterización bromatológica y toxicológica	67
Análisis proximal	67
Factores tóxicos y antinutrimientales	69
Minerales	70
3.2. Evaluación nutritiva	71
Análisis proximal de las fuentes de proteína	71
Contenido de proteína en las dietas	72
Relación de Eficiencia de la Proteína (REP)	72
Digestibilidad	74
4. CONCLUSIONES	76
5. BIBLIOGRAFÍA	77

## INTRODUCCIÓN

Las especies del género ***Chenopodium***, son plantas que se encuentran distribuidas en zonas áridas y semiáridas del planeta, siendo su característica principal la resistencia a condiciones adversas de clima y suelo; además, cumplen diversas funciones como la producción de alimentos para el hombre y producción de forraje para animales domésticos y silvestres. Entre estas especies, la quinoa (***Chenopodium quinoa***) ha sido catalogada como un pseudocereal, ya que además de tener usos múltiples (principalmente en Sudamérica) su valor nutricional ha llamado la atención en todo el mundo, por lo que se han realizado estudios enfocados a obtener sus propiedades bromatológicas con el fin de introducir el cultivo a otras regiones e incorporarlo a su alimentación.

En el valle de México se consume la inflorescencia del huauzontle (***Chenopodium nuttalliae***) como un platillo típico; no obstante, poco se sabe de su perfil nutrimental y toxicológico, a diferencia de la quinoa. Las investigaciones en torno al huauzontle se han limitado a comparaciones con otros vegetales, por lo que no se cuenta con un estudio detallado de esta planta. Al pertenecer a las Chenopodaceas, el huauzontle debería tener similitudes nutricionales y agronómicas con la quinoa, por lo que podría ser aprovechada no sólo la inflorescencia, sino también el tallo, las hojas y las semillas de la planta, para tener usos variados, principalmente en la industria alimentaria.

En este trabajo se realizó el análisis proximal, la cuantificación de algunos factores tóxicos y antinutrimientales y la determinación de algunos minerales de la inflorescencia del huauzontle cruda y cocida (como es consumida), se cuantificaron los factores tóxicos y antinutrimientales que presentan ambas formas, y se compararon las dos muestras para definir si había diferencia estadísticamente significativa entre las muestras.



Además se realizó un estudio biológico para evaluar la calidad de la proteína de la inflorescencia cocida del huauzontle, comparándola con la del queso, huevo y huauzontle preparado (combinación de las tres fuentes).

# OBJETIVOS

## Objetivo general

- ✓ Realizar la caracterización bromatológica, toxicológica y nutritiva de la inflorescencia del huauzontle (***Chenopodium nuttalliae***) cruda y cocida

## Objetivos particulares

- ✓ Realizar el análisis proximal de la inflorescencia del huauzontle cruda y cocida
- ✓ Determinar en la inflorescencia del huauzontle cruda y cocida los factores tóxicos y antinutrimientales que con mayor frecuencia se presentan en los vegetales
- ✓ Cuantificar algunos minerales en la inflorescencia del huauzontle cruda y cocida
- ✓ Evaluar la calidad nutritiva de la proteína de la inflorescencia del huauzontle cocida mediante un ensayo biológico

# 1. ANTECEDENTES

## 1.1. El género *Chenopodium*

El género ***Chenopodium*** es el principal dentro de la familia ***Chenopodiaceae*** y tiene amplia distribución mundial, con cerca de 250 especies. El uso de las especies de ***Chenopodium*** es como planta entera o parte de la misma. Se puede encontrar en diversidad de formas (ramificada o sencilla), tamaño (hasta 2 m), color de la hoja (blanca, amarilla, morena, negra), diversidad en precocidad (3-8 meses), tamaño de grano (hasta 3.5 mm), formas de inflorescencia, características agronómicas diferenciales como son estrías en el tallo, parámetros genéticos, componentes de rendimiento y otras, de la especie cultivada, así como la diversidad de los parientes (1).

Dentro del género ***Chenopodium*** existen cuatro especies cultivadas como plantas alimenticias: como productoras de grano, ***Ch. quinoa*** y ***Ch. pallidicaule***, en Sudamérica; como verdura ***Ch. nuttalliae*** y ***Ch. ambrosioides*** en México. Este género también incluye especies silvestres de amplia distribución mundial: ***Ch. album***, ***Ch. hircinum***, ***Ch. murale***, ***Ch. graveolens***, ***Ch. petiolare*** entre otros. En general, las especies cultivadas presentan gran diversidad genética y utilización variada, pero su importancia social y económica es más significativa en la zona de los Andes (2,3).

## 1.2. La quinoa (*Chenopodium quinoa*)

La quinoa ha sido un cultivo indígena de la región de los Andes en Sudamérica desde tiempos ancestrales. Es una planta que presenta características peculiares en su morfología, coloración y comportamiento en diferentes zonas agroecológicas donde se cultiva, así como una enorme variación y plasticidad para adaptarse a diferentes

condiciones ambientales; muy tolerante a los factores abióticos adversos como sequía, helada, salinidad de suelos y otros (3).

Actualmente varios centros de investigación alimentaria en el mundo se están esforzando por introducir el cultivo de la quinoa para incorporarlo en la dieta tradicional de los pueblos; por ello se han iniciado una serie de estudios que cubren desde el cultivo de dichas plantas en diferentes condiciones climatológicas, hasta investigaciones más específicas que incluyen las propiedades bromatológicas del tallo, hojas y semillas y su empleo en la dieta humana y animal. También se han realizado esfuerzos con miras a mejorar los métodos tradicionales del cultivo, particularmente con relación a la cosecha y separación de las semillas mediante la introducción del equipo más adecuado (4).

#### Usos de la quinoa

La importancia de la quinoa reside en la alta calidad como alimento, la utilización completa de la planta y su amplia adaptación a condiciones agroecológicas (1).

En la alimentación humana, las semillas (granos) se utilizan previa eliminación del contenido amargo (saponinas) en forma de ensaladas, entradas, guisos, sopas, postres, bebidas, pan, galletas, etc. Las semillas germinadas son también un alimento exquisito y muy nutritivo, sobre todo para aquellas personas vegetarianas. Las hojas y plántulas tiernas como reemplazo de las hortalizas de hoja (acelga, espinaca, col, etc.), Las inflorescencias tiernas completas, en reemplazo de hortalizas de inflorescencia como el brócoli y coliflor, etc.

La planta completa en estado fresco hasta el inicio de la floración se emplea como forraje verde para los animales; las partes de la planta que quedan después de la cosecha finamente picada o molida para elaborar concentrados y suplementos alimenticios. Los granos (semillas) hervidos para la crianza de pollos, patos, pavos y codornices; mientras

que los granos germinados en el ganado lechero aumentan considerablemente la producción láctea (2).

Las semillas, hojas, tallos y cenizas se utilizan desde el punto de vista medicinal; se le atribuyen propiedades cicatrizantes, desinflamantes, analgésicas y desinfectantes (1).

Los tallos secos se usan como combustible en zonas de escasa vegetación; así mismo como guía en siembras de frijol trepador (2).

### Composición química de la semilla de la quinoa

En el Cuadro 1 se muestra el análisis proximal de la semilla de quinoa.

Cuadro 1  
**Análisis proximal de la semilla de la quinoa en peso fresco (%)**

Humedad	11.7
Cenizas	3.4
Grasa	5.6
Proteína (Nx6.25)	14.6
Fibra	3.4
Hidratos de carbono	61

Fuente: Koziol, 1992 (5)

En base seca, la quinoa muestra un contenido de proteína mayor que los cereales pero mucho menor comparado con las leguminosas (Cuadro 2) (5).

Cuadro 2  
**Comparación de la composición de la quinoa con la de algunos cereales y leguminosas en base seca (g/100 g)**

	<i>Grasa</i>	<i>Proteína</i>	<i>Cenizas</i>	<i>Fibra</i>	<i>Hidratos de carbono</i>
Quinoa	6.3	16.5	3.8	3.8	69.0
Arroz	2.2	7.6	3.4	6.4	80.4
Cebada	1.9	10.8	2.2	4.4	80.7
Maíz	4.7	10.2	1.7	2.3	81.1
Trigo	2.3	14.3	2.2	2.8	78.4
Frijol	1.1	28.0	4.7	5.0	61.2
Soya	18.9	36.1	5.3	5.6	34.1

Fuente: Koziol, 1992 (5)

El análisis proximal presentado en el Cuadro 2 es similar a los resultados obtenidos por Chauhan et al. (1992), en un estudio que consistió en separar las semillas de quinoa en sus fracciones (salvado, cascara, germen), para determinar en cada harina su composición, así como el contenido de algunos minerales, factores tóxicos y aminoácidos (6).

La composición de nutrientes y antinutrientes en plantas comestibles, en este caso la quinoa, puede variar dependiendo de las condiciones climáticas, lugar de crecimiento, variedad del cultivo, etc.; esto podría explicar las diferencias entre los resultados obtenidos por los autores citados.

#### Factores tóxicos y antinutrimientales de la semilla de la quinoa

##### *Taninos*

Taninos medidos como flavonoides no fueron detectados en la semilla de quinoa cruda por Ruales y Baboo (1993). Chauhan et al. (1992) encontró 0.53% de taninos en la semilla entera de quinoa, 0.28% en una harina obtenida a partir de semillas descascaradas manualmente y 0.23% en semillas descascaradas después de un remojo y lavado con agua (6,7).

##### *Inhibidores de tripsina*

Ruales y Baboo (1993) no detectaron inhibidores de tripsina, por lo que sugieren que el contenido sea menor a 0.97 UTI/100 g (UTI = unidades de tripsina inhibidas), que es el límite de detección del método de Kakade et al. (1974) (7).

Romero (1981) cuantificó los inhibidores de tripsina en ocho variedades de quinoa y encontró valores entre 1.36 a 5.04 UTI/mg de muestra. Estos valores son mucho menores que los reportados para el frijol de soya (24.5-41.5 UTI/mg), lentejas (17.8 UTI/mg) y frijoles (12.9-14.8 UTI/mg). Incluso el valor obtenido por Chauhan et al. (1992)

de 10 UTI/mg para la semilla de quinoa entera es menor que el de cualquiera de las leguminosas citadas. Además, los inhibidores de tripsina que presenta la quinoa son termolábiles, por lo que la cocción de la semilla inactiva estos antinutrientes (8).

### *Lectinas*

Ninguna actividad hemaglutinante pudo ser encontrada en las variedades de quinoa usadas en el estudio de Romero (1981) (8).

### *Saponinas*

Las saponinas son quizá el mayor factor antinutricional que presenta la quinoa. Romero (1981) encontró que las concentraciones de saponinas medidas por afrosometría (habilidad para producir espuma en agua) variaban de 0.4 a 5.6% en base seca, con una media de 2.2%, entre las ocho variedades que estudió. Koziol (1990) analizó 69 variedades de quinoa, también por el método afrosimétrico, obteniendo valores entre 0.01 y 4.65% (base seca), con una media de 0.65% (5).

Chuahan et al. (1992) reporta 2.05% (base seca) de saponinas en la semilla entera. Ruales y Baboo (1993) identificaron dos saponinas que se encontraban mayoritariamente en la semilla de quinoa, mediante un estudio por HPLC. Entre ambas el contenido de saponinas fue 0.9% (base seca). Tanto Chuahan como Ruales y Baboo notaron que después de que la quinoa era lavada con agua, el total de saponinas se reducía, a 0.7% y 0.3% respectivamente (6,7).

### Contenido de minerales de la semilla de la quinoa

El Cuadro 3 compara la composición de minerales de la quinoa con algunos cereales.

Cuadro 3

**Composición mineral de la quinoa y algunos cereales en base seca (mg/ kg)**

	<i>Quinoa</i>	<i>Arroz</i>	<i>Cebada</i>	<i>Trigo</i>	<i>Maiz</i>
Ca	200-3 900	69	430	503	171
P	1 290-6 300	1 378	3 873	4 677	2 926
Fe	5-321	7	32	38	21
K	5 000-19 800	1 183	5 028	5 783	3 771
Mg	1 300-4 600	735	1 291	1 694	1 371
Na	12-425	69	203	89	69
Cl	1 100-2 300	-	260	633	137

Fuente: Koziol, 1992 (5)

La quinoa contiene más calcio, hierro, magnesio y cloro que los otros cereales; el potasio y el fósforo se encuentran también en elevadas concentraciones.

Los datos obtenidos por Chauhan et al. (1992) y Ruales y Baboo (1993) se encuentran dentro de los intervalos mostrados en el Cuadro 3. Además de cuantificar los minerales en la semilla cruda, Ruales y Baboo (1993) los midieron en una quinoa que fue lavada y pulida. Encontraron que el contenido de calcio, cobre y sodio en la quinoa procesada era mayor, explicando que podría deberse a una contaminación por el agua empleada para el lavado; el potasio disminuyó significativamente, así como el hierro y magnesio (9).

González et al. coinciden en que los niveles de hierro y calcio que muestra la quinoa son mayores que los reportados para el maíz y la cebada (10).

Calidad de la proteína de la semilla de quinoa

El Cuadro 4 incluye los valores de aminoácidos esenciales de la quinoa y algunos cereales.



Cuadro 4

<b>Aminoácidos esenciales en la quinoa y algunos cereales (g/100 g de proteína)</b>								
	<i>HIS</i>	<i>ILE</i>	<i>LEU</i>	<i>LYS</i>	<i>M+C</i>	<i>P+T</i>	<i>THR</i>	<i>TRY</i>
Quinoa	3.2	4.4	6.6	6.1	4.8	7.3	3.8	1.1
Arroz	2.1	4.1	8.2	3.8	3.6	10.5	3.8	1.1
Maíz	2.6	4.0	12.5	2.9	4.0	8.6	3.8	0.7
Trigo	2.0	4.2	6.8	2.6	3.7	8.2	2.8	1.2

Abreviaciones: HIS-histidina, ILE-isoleucina, LEU-leucina, LYS-lisina, M+C-metionina+cisteína, P+T-fenilalanina+tirosina, THR-treonina, TRY-triptofano.

Fuente: Koziol (1992)

La proteína de la quinoa, en comparación con la de los cereales, presenta un mayor contenido de histidina, metionina+cistina e isoleucina, y es particularmente más rica en lisina, aminoácido típico de las leguminosas (5).

Ruales y Baboo (1992) señalan que los aminoácidos limitantes de la semilla de quinoa son los aminoácidos aromáticos, tirosina+fenilalanina, seguidos por la treonina; concuerdan en que la cantidad de aminoácidos azufrados, metionina-cistina, y lisina es alta y en general el contenido de aminoácidos esenciales en la quinoa es más alta que en los cereales más comunes (11).

Según Mahoney et al. (1975) existe una considerable variación en el contenido de aminoácidos entre variedades de quinoa; por ejemplo, la variedad Sajama contiene menos metionina, mientras que la variedad Blanca muestra poca lisina; en su estudio, la metionina y el triptofano fueron los únicos aminoácidos esenciales limitantes en la variedad Sajama (12).

Alvistur et al. (1953) compararon la eficiencia de la proteína de la quinoa con la de la leche mediante el crecimiento de ratas y concluyó que la eficiencia de utilización de la proteína de quinoa fue superior que la de la leche. Los estudios de White et al. (1955) también señalan que la quinoa produce mayor crecimiento que la caseína y la leche entera en polvo.

El Cuadro 5 resume los resultados de cuatro estudios sobre la relación de eficiencia de la proteína (REP) de quinoa expresados como porcentajes de un control de

caseína. Las harinas de quinoa cruda presentan una REP más alta que aquellas de trigo, y particularmente la quinoa cocida muestra REP mayores que el del control de caseína (5).

Cuadro 5  
**Relacion de Eficiencia de la Proteína de diferentes variedades de quinoa**

<i>Estudio</i>	<i>Fuente de proteína</i>	<i>REP como % de caseína</i>
Mahoney et al. (1975) (10% de proteína en dietas)	Caseína	100
	Trigo	32
	Quinoa (Sajama)	18
	Quinoa cocida	102
Tellería Ríos et al. (1978) (10% de proteína en dietas)	Caseína	100
	Quinoa “blanca”	44
	Quinoa “blanca”, agua caliente (87°C) para extraer saponinas	93
	Quinoa “colorada”	47
	Quinoa “colorada”, agua caliente (87°C) para extraer saponinas	85
	Sajama, lavada con agua a 50°C	74
Sajama, lavada con agua a 87°C	85	
Hurrell (1988) (10% de proteína en dietas)	Caseína	100
	Quinoa (pulida)	89
	Quinoa cocida (pulida)	105
	Trigo	23
	Trigo cocido	31

Fuente: Koziol, 1992 (5)

El potencial que muestra la quinoa debe ser empleado para complementar la dieta, no para reemplazar ninguna materia prima que sea utilizada en la actualidad para elaborar alimentos. La quinoa podría ser empleada para mejorar la calidad nutricional de los bocadillos, panes, pastas, cereales para desayunar y otras comidas preparadas.

Hay que resaltar que la información anteriormente citada se refiere a la semilla de quinoa (*Chenopodium quinoa*), cultivo muy apreciado en Sudamérica, cuyo recurso vegetal es muy similar al del huauzontle (*Chenopodium nuttalliae*).

### 1.3. El huauzontle (*Chenopodium nuttalliae*)

En México, durante la época prehispánica, a los ciudadanos del Imperio Azteca se les demandaba pagar un tributo al gobierno central; dicho pago era efectuado con productos agrícolas, siendo el huauzontle uno de los cultivos de tributo más importantes. Sin embargo, el uso del huauzontle fue evidentemente suprimido con la llegada de los españoles, y fue reemplazado por plantas domesticadas por españoles durante la época colonial (13).

En la actualidad el huauzontle se encuentra ampliamente distribuido en el Valle de México. El huauzontle, a diferencia de la quinoa, se cultiva más como hortaliza que como productor de grano: la inflorescencia tierna se consume en reemplazo de hortalizas de inflorescencia, como el brócoli o la coliflor, ya sea cocida o frita (2,3).

Pocos estudios se han realizado sobre la planta del huauzontle. Sánchez-Castillo et al. (1998) reportan que el quelite de huauzontle cocido muestra mayor cantidad hierro y calcio respecto a otros vegetales importantes en la alimentación mexicana, como el elote, brócoli, chile y chícharo. Villadelmar et al. (1956) señalan que el huauzontle es una buena fuente de triptofano y que su contenido de metionina es bajo (14,15).

Tales resultados sugieren que el huauzontle, al pertenecer a la familia de las chenopodiaceas, podría tener similitudes con la quinoa y otras especies relacionadas, tanto en su perfil nutrimental como en el toxicológico. En tal caso, el huauzontle podría convertirse en un cultivo con una gran importancia económica en México (tal y como la quinoa actualmente lo es para Sudamérica), con múltiples aplicaciones, pudiéndose aprovechar principalmente en la industria alimentaria y para combatir el problema de desnutrición en nuestro país.

#### 1.4. Factores tóxicos y antinutrientales

Por su modo de acción, las sustancias nocivas de los alimentos pueden clasificarse en dos grandes grupos:

- ✓ Las sustancias antinutritivas, el efecto tóxico de las cuales se basa en disminuir la disponibilidad o provocar una pérdida suplementaria de los nutrientes esenciales. Estas sustancias provocan un desequilibrio, que no se compensa por un aporte suplementario de los nutrientes implicados, y a la larga determinan la aparición de una patología particular.

Desde el punto de vista nutricional, las sustancias antinutritivas de origen natural se clasifican en función del tipo de nutrientes con los que interfiere en:

- ✓ Las sustancias que afectan la utilización digestiva o metabólica de las proteínas.
- ✓ Las sustancias que interfieren en la asimilación de los minerales.
- ✓ Las sustancias que inactivan o aumentan el requerimiento de vitaminas.
- ✓ Los factores tóxicos de los alimentos, de efectos indeseables, que no pueden compensarse por aporte suplementario de nutrientes. Son compuestos que tienen un efecto tóxico sobre el organismo. Su modo de acción puede explicarse, sea por su particular reactividad, por un mimetismo molecular de las hormonas, aminoácidos, o en ciertos casos, por la existencia de una información genética que favorezca la aparición de una determinada patología (16).

#### Taninos

Químicamente son compuestos polifenólicos, solubles en agua (con excepción de algunas estructuras con peso molecular muy alto), con la propiedad de precipitar alcaloides y proteínas; se dividen en dos grupos: hidrolizables, estructuras que consisten en un centro de azúcar al cual se unen moléculas de ácido gálico, fácilmente hidrolizados

por ácido, álcali y enzimas; y condensados, polímeros de dos o más unidades flavonoides, cuya estabilidad es considerablemente mayor que al de los taninos hidrolizables, haciéndolos difíciles de degradar (17)

Se encuentran en vegetales como cacao, té, bananas, chícharos, habas y sorgo (16,18).

Los taninos tienen un gran impacto en la nutrición humana y animal debido a la habilidad que poseen de formar complejos con hidratos de carbono, proteínas y con iones metálicos di y trivalentes como el hierro, dando como resultado un decremento en la biodisponibilidad de estos nutrientes. También se consideran potentes inhibidores enzimáticos debido a que forman complejos con enzimas digestivas como amilasas, proteasas y lipasas, retardando así el proceso de digestión. Además, pueden enlazarse con proteínas de la mucosa intestinal, dificultando la absorción de nutrientes (19).

Los taninos en las plantas actúan como un mecanismo de defensa contra infecciones bacterianas o fúngicas, actuando probablemente como una barrera química a la penetración y colonización de patógenos; por otro lado se han asociado con el mantenimiento de la latencia, jugando un papel en la regulación del desarrollo y crecimiento de la planta.

Diferentes autores han reportado que tratamientos simples como el remojo y el cocimiento reducen la presencia de taninos en alimentos.

Los taninos se utilizan como aditivos en enología, cervecería (agente clarificante), en la industria de conservas y como saborizante o potenciador de sabor (16,18).

### Inhibidores de tripsina

Las proteasas, enzimas naturales que hidrolizan las proteínas, se clasifican en función de la naturaleza del aminoácido que controla el centro activo y/o mecanismo de

acción, existiendo las proteasas séricas (tripsina, quimotripsina), las sulfidrilproteasas, las metaloproteasas, animopeptidasas y las carboxilo acídicas proteasas (18).

Cuando una proteína entra en contacto con proteasas bajo condiciones fisiológicas, usualmente se forma un complejo enzima-sustrato (complejo descrito por Michaelis-Menten) y luego la proteína es fraccionada en péptidos. Si hay inhibidores presentes, éstos compiten con las proteínas por las enzimas. Generalmente los inhibidores ganan, formando complejos muy estables con las proteasas; los sitios activos de las enzimas son así bloqueados por los llamados sitios activos de los inhibidores (20):



Los inhibidores de tripsina (y quimotripsina) han sido estudiados en leguminosas (soya, frijol, chícharo) debido a su importancia como fuentes de proteína y por que tales sustancias han sido considerados como una característica particular de la familia. Los cereales (maíz, trigo, arroz, avena, centeno, etc.) también contienen inhibidores de tripsina y quimotripsina (18,20).

Los inhibidores consumidos oralmente inactivan la tripsina y quimotripsina en el intestino, bloqueando la digestión de las proteínas. En primera instancia esto lleva sólo a un problema digestivo. Sin embargo, si los inhibidores son tomados en repetidas ocasiones, esta pérdida (exógena) primaria de proteína provoca un retraso en el crecimiento. Como una reacción de defensa, el páncreas produce más enzima, lo cual lleva a una pérdida (endógena) secundaria de proteína.

Varios autores reportan la desaparición de inhibidores de proteasas durante la germinación, postulándose varios mecanismos de regulación de proteasas endógenas durante diferentes fases de la vida de la planta. Además, los inhibidores de proteasas inhiben a las enzimas exógenas de los microorganismos, por lo que podrían tener un papel de defensa, protegiendo a las semillas contra infecciones microbianas. Del mismo modo, también parece servir como protección contra algunos insectos (20).

Los inhibidores de proteasas son inactivados por adecuado y óptimo proceso de calentamiento (por ejemplo, los inhibidores de la papa son completamente inactivados a 100°C por 3 minutos). Algunos autores opinan que el escaldado al cual se someten algunos vegetales es suficiente para inactivar el mayor porcentaje del inhibidor, aunque otros plantean que éste es bastante estable (18).

### Hemaglutininas (lectinas)

Son sustancias peptídicas que se encuentran en leguminosas como frijoles negros, chícharos, lentejas, etc., así como en peces, moluscos, crustáceos y esponjas; también se les denomina como “lectinas” (que quiere decir “selección” en latín). Son aglutinantes de los eritrocitos de los humanos y de otras especies animales, debido a su especificidad por los restos de carbohidratos complejos que forman parte de la estructura de las membranas de ese tipo de células (16).

La aglutinación es la manifestación más fácilmente detectable de interacción entre lectinas y células, y debido a esto es que es usada para revelar la presencia de lectinas en una fuente biológica. La habilidad para aglutinar células distingue a las lectinas de otras macromoléculas que ligan azúcares, como glucosidasas y glucosiltransferasas (21).

El efecto tóxico de las lectinas se relaciona con su acción sobre la absorción intestinal. Pueden combinarse con las proteínas de las células epiteliales del intestino, de una manera semejante como se combinan con los glóbulos rojos, reduciendo la capacidad de absorción intestinal (probablemente modificando el funcionamiento de las vellosidades) e impidiendo que varios nutrientes sean absorbidos.

Las lectinas pueden producir retraso en el crecimiento, daño hepático, diarreas, pérdida de peso, lesiones en la microvellosidades e incluso la muerte de algunos animales de experimentación. La importancia de la afectación está relacionada con la concentración de las lectinas (18).

La presencia de las lectinas en varias plantas sugiere que estas sustancias pueden jugar papeles biológicos fundamentales en tales organismos. Las propiedades de ligar carbohidratos específicos hacen a las lectinas candidatas para una variedad de funciones relacionadas con eventos de reconocimiento, incluyendo mecanismos de defensa de la planta, reconocimiento celular, transporte, inmovilización y almacenamiento de carbohidratos; también han sido propuestas como reguladores de crecimiento, con funciones enzimáticas, entre otras (21).

Las lectinas como la mayoría de las proteínas, son termolábiles y generalmente su efecto tóxico se puede evitar o disminuir notablemente por medio de un tratamiento térmico adecuado (16,18).

### Saponinas

Las saponinas son compuestos anfifílicos en los cuales los azúcares (pentosas, hexosas o ácidos urónicos) son enlazados a un grupo no polar (sapogenina), el cual puede ser esteroide o triterpenoide. Las saponinas se presentan en una gran variedad de plantas (alfalfa, espinaca, remolacha, espárrago, soya, té) y en ciertas especies de peces (18,22).

Las saponinas son sustancias en su mayor parte de sabor amargo, inodoras, de difícil cristalización; irritan los ojos y la piel cuando se frota, son termorresistentes, forman complejos con el colesterol y otros hidroxiesteros; son medianamente solubles en agua y muy solubles en alcohol, mientras que en disolventes orgánicos son insolubles (18).

La naturaleza anfifílica de las saponinas determina sus propiedades físicas en solución. Forman espumas estables y actúan como agentes emulsificantes. Además parecen formar micelas como los detergentes. Estas propiedades físicas son explotadas en la mayoría de los usos tecnológicos de las saponinas, como aditivos alimentarios en



algunos países como Inglaterra y Estados Unidos, como correctores del sabor o por sus propiedades espumantes en bebidas carbonatadas, pero en otros como en Alemania está prohibida su utilización.

Las saponinas normalmente permanecen dentro del tracto digestivo, pero envenenamientos graves pueden provocar lesiones gastrointestinales, permitiendo a las saponinas entrar en el torrente sanguíneo, ocurriendo el verdadero daño (la dosis letal intravenosa puede ser cien veces menor que la oral). El resultado es daño al hígado, hemólisis de eritrocitos, paros respiratorios, convulsiones y coma. Irritación del tracto gastrointestinal (debido a otras causas) puede incrementar la susceptibilidad al envenenamiento por saponinas (la ingesta continua de dosis subletales puede guiar a una irritación severa del intestino, lo cual eventualmente permitirá el paso de las saponinas al torrente sanguíneo) (22).

### Nitratos

El ion nitrato es una molécula plana y simétrica formada por un átomo de nitrógeno y tres de oxígeno, con carga negativa y fórmula  $\text{NO}_3^-$ . Los nitratos se encuentran presentes en los alimentos de origen vegetal como componentes inherentes a las plantas, en el aire que respiramos y como contaminante de agua potable debido al uso de fertilizantes nitrogenados.

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.

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, muchos de los cuales son cancerígenos. Algunas verduras tienen simultáneamente cantidades elevadas de aminas secundarias y nitratos, como por ejemplo las espinacas, los rábanos y la lechuga, lo que favorece la aparición de nitrosaminas (23).

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

Las sales de nitrato y nitrito se emplean como aditivos en carnes y productos cárnicos, ya que desarrollan un color rosado característico de dichos productos cuando forman la nitrosomioglobina, y por que actúan como inhibidores del crecimiento de ***Clostridium botulinum***, microorganismo anaerobio altamente peligroso por las toxinas que sintetiza (produce botulismo, enfermedad que afecta el funcionamiento de los músculos respiratorios) (24).

### 1.5. Minerales

Los minerales son indispensables para el organismo, no sólo desde el punto de vista cuantitativo sino también cualitativo: intervienen en la constitución de los tejidos y en la regulación hídrica. Los oligoelementos son necesarios en cantidades muy pequeñas, inferiores al miligramo por día; sin embargo, algunos minerales tienen una importante función en los sistemas enzimáticos (16).

## Hierro

El hierro es el micronutriente más conocido. La investigación sobre el estado nutricional del hierro se ha hecho más simple gracias a la facilidad para obtener muestras de sangre (entre las estructuras corporales, los eritrocitos son los que contienen más hierro).

### *Principales compuestos que contienen hierro y su función*

Los principales compuestos que contienen hierro son las proteínas hemo, es decir, las que poseen un grupo ferroporfirínico.

*Hemoglobina.* Posee un peso molecular de 68 000 y está constituida por cuatro subunidades hemo, cada una con una cadena polipeptídica de globina. La hemoglobina desempeña un papel clave en la transferencia de oxígeno desde el pulmón hacia los tejidos.

*Mioglobina.* Esta proteína muscular consiste en un único hemo con una sola cadena de globina. La función primaria de esta proteína es transportar y almacenar el oxígeno en el músculo y liberarlo para cubrir el aumento de las necesidades metabólicas durante la contracción muscular.

*Citocromos.* Son compuestos que contienen hemo que desempeñan una función crucial en la respiración y el metabolismo energético en virtud de su papel en el transporte mitocondrial de electrones (25).

### *Almacenamiento de hierro*

El hierro se almacena principalmente en dos formas: ferritina y hemosiderina; estos compuestos de almacenamiento se hallan especialmente en el hígado, el bazo, las células reticuloendoteliales y la médula ósea (16,25).

### *Absorción*

El hierro no hemo y el hemo se absorben por mecanismos diferentes. El hierro no hemo consiste principalmente en sales de hierro; se encuentra en especial en los

vegetales, los productos lácteos y los alimentos fortificados con hierro. Representa la mayor parte del hierro alimentario, en general >85%. En general, la absorción del hierro no hemo depende de sustancias contenidas en la misma comida que favorecen o inhiben la solubilidad. El estimulante más conocido para la absorción del hierro no hemo es la vitamina C, mientras que los inhibidores más conocidos son el salvado y el ácido fítico (presentes en cereales integrales no procesados) y los polifenoles (contenidos en el té y algunos vegetales).

El hierro hemo proviene esencialmente de la hemoglobina y la mioglobina contenidas en las carnes rojas, las aves y el pescado. Aunque el hierro hemo representa una menor proporción del hierro alimentario que el no hemo, su absorción es dos o tres veces mejor (25).

## Fósforo

### *Almacenamiento y distribución de fósforo*

El fósforo existe en los alimentos vegetales y de origen animal y en los líquidos biológicos como los iones fosfato. Existe en el organismo humano adulto un máximo de 850 g de fósforo elemental, 85% en el esqueleto, 14% en los tejidos blandos y 1% en el líquido extracelular, las estructuras intracelulares y las membranas celulares.

*Células.* Las membranas que envuelven todas las células y que separan los organelos intracelulares del propio citoplasma constan, fundamentalmente, de una bicapa de fosfolípidos. El material genético de la célula, el ADN y el ARN, contienen grupos fosfato que unen los azúcares de desoxirribosa y ribosa a la columna de la molécula. Los fosfatos son componentes de la estructura intracelular y también actúan en las reacciones celulares que se producen dentro de las células.

*Hueso.* La fase mineral de los tejidos esqueléticos consta de cristales de hidroxapatita que poseen una proporción constante de calcio/fosfato de alrededor 2:1 y trazas de otros minerales.

*Sangre.* Existen dos fracciones de fosfato en la sangre humana: orgánico (70%) e inorgánico (30%). La mayoría del fósforo orgánico se halla en los componentes fosfolipídicos de la sangre, especialmente los de las lipoproteínas. Los fosfatos inorgánicos existen en tres formas distintas, pero la predominante es el  $\text{HPO}_4^{2-}$ , el cual es más soluble en la sangre que los otros y representa casi el 50% del fósforo inorgánico (Pi) libre. El 40% restante de los iones Pi forman complejos en la sangre con sales de sodio, calcio y magnesio. Los iones Pi son también reguladores del equilibrio ácido-básico corporal general, metabólico y respiratorio, pero que facilitan la excreción renal de hidrogeniones al aceptar un protón adicional, es decir, al cambiar de  $\text{HPO}_4^{2-}$  a  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (25).

#### *Fuentes alimentarias de fósforo*

*Alimentos naturales.* Los alimentos naturales con alto contenido proteínico son por lo general ricos en fósforo; por cada gramo de proteína se consumen alrededor de 15 mg de fósforo. Además de la leche y los productos lácteos existen otros grupos (carne vacuna, aves de corral, pescado, productos con cereales y huevo) que aportan de un 20 a 30% de la ingesta diaria de fósforo (16,18).

El fósforo se presenta como ácido fítico en la cobertura externa de los granos de los cereales. Cuando se les consume con otros minerales, como calcio, zinc y hierro, los fitatos forman complejos que pueden ligar cationes y hacer que los minerales no sean accesibles para la absorción, lo cual también hace menos biodisponible al fósforo.

*Aditivos alimentarios.* Entre los 45 o más aditivos alimentarios directos con fósforo en el Código de Reglamentaciones Federales, el ácido fosfórico y los compuestos de polifosfato son los más empleados y los que más contribuyen a la ingesta de fósforo (25).

## Calcio

El calcio es el mineral más abundante en el organismo y, básicamente, todos los procesos orgánicos requieren este metal.

### *Distribución y función en el organismo*

*Hueso.* Más del 99% del calcio del cuerpo humano se halla en el esqueleto, sobre todo en forma de hidroxiapatita. Como tal el hueso constituye un gran reservorio de calcio listo para ser extraído en épocas en que el aporte es inadecuado.

*Calcio del líquido extracelular.* Cerca de la mitad del calcio plasmático se halla en la forma libre ionizada y está disponible funcionalmente. La mayor parte del resto se haya unida a la albúmina, una fracción está ligada a la globulina y <10% forma complejos con fosfatos, citratos y otros aniones. El calcio extracelular actúa en especial como fuente de  $\text{Ca}^{2+}$  para el esqueleto y las células, pero también participa en la coagulación sanguínea y la adhesión intracelular.

*Calcio intracelular.* Las concentraciones de calcio intracelular son alrededor 10 000 veces más bajas que las del calcio extracelular. El calcio actúa como un segundo mensajero (en respuesta a un estímulo químico, eléctrico o físico) para activar una amplia gama de respuestas fisiológicas, como contracciones musculares, liberación hormonal y de neurotransmisores, metabolismo del glucógeno, etc.

Diferentes enzimas, entre ellas varias proteasas y deshidrogenasas, son activadas o reguladas por la concentración de calcio (25).

### *Fuentes de calcio*

El calcio es aportado esencialmente por la leche, tortillas y queso. Se encuentran también cantidades no despreciables en las verduras, por ejemplo en las espinacas, coles, zanahorias y brócoli. En cambio los frutos contienen muy poco calcio y la mantequilla cantidades mínimas (16).

## *Absorción*

Hasta no hace mucho se pensaba que la biodisponibilidad de calcio dependía de la capacidad del catión para liberarse de sus ligandos o de disociarse de la sal para permanecer soluble, lo que era una función del pH.

Recientemente se demostró que no es necesario que el calcio se disocie de las sales de bajo peso molecular para ser absorbido, presumiblemente a través de la ruta paracelular o por pinocitosis. A pesar de esto, algunos ligandos inhiben la absorción del metal, mientras que otros la aumentan. Entre los inhibidores se encuentran el oxalato y el ácido fítico. Algunos estimuladores son el citrato malato de calcio, fosfopéptidos de caseína, inulina y fructooligosacáridos (25).

### 1.6. Valor nutricional de las proteínas

Las proteínas son la unidad primaria de los organismos vivos y el constituyente más importante de los alimentos, el material con el cual se construye la mayor parte de la materia sólida de los tejidos del músculo y de varios órganos del cuerpo. La función principal de las proteínas de la dieta es suministrar aminoácidos para la formación de nuevos tejidos y para reemplazar los aminoácidos catabolizados durante la síntesis y degradación de las proteínas de los tejidos; además para la síntesis de muchas estructuras específicas, como hormonas y enzimas. Existe una cantidad ilimitada de proteínas, las cuales se ha intentado clasificarlas de acuerdo a su composición de aminoácidos y la cantidad que contienen de cada uno (26).

### Aminoácidos esenciales

En términos generales los dos grupos de aminoácidos esenciales y no esenciales pueden distinguirse por el hecho de que un grupo no es sintetizado por los animales mientras que el otro, los aminoácidos no esenciales, se sintetizan normalmente en

cantidades suficientes directamente a partir de metabolitos comunes. Las plantas y la mayoría de los microorganismos, a diferencia de los animales, sintetizan fácilmente los aminoácidos esenciales a través de patrones metabólicos más complicados.

Existen ocho aminoácidos estrictamente esenciales para la nutrición adecuada de los adultos (Cuadro 6). Aunque algunos de ellos, por ejemplo el triptofano, se necesitan directamente para la biosíntesis de hormonas y otros compuestos metabólicamente activos, la existencia de distintos tipos de aminoácidos con carga, polaridad y forma diferentes determina también la importancia de la estructura terciaria de las enzimas y de las proteínas estructurales. Sin embargo, de entre los ocho aminoácidos esenciales, sólo cinco limitan la calidad de las proteínas en la dieta del hombre: la lisina, los aminoácidos azufrados, la treonina y el triptofano.

La tirosina y la cisteína/cistina también se clasifican como aminoácidos esenciales, puesto que no pueden ser sintetizados en cantidades adecuadas cuando la dieta es deficiente en fenilalanina o metionina, respectivamente. Las necesidades de triptofano y fenilalanina, y en consecuencia de tirosina, se deben a la incapacidad de los animales para sintetizar anillos aromáticos. La arginina y la histidina no se incluyen en el Cuadro 6, aunque son esenciales para los niños.

Las necesidades proteínicas mínimas de las diferentes proteínas alimentarias son una cantidad variable, que viene determinada por la proporción relativa de aminoácidos esenciales presentes en diferentes proteínas. En consecuencia, la dependencia de una única fuente de proteína puede dar lugar a una ingesta proteínica insuficiente en algunos de los aminoácidos esenciales; por ejemplo, los cereales son deficientes en lisina, mientras que las leguminosas lo son en aminoácidos azufrados. En orden de cubrir las necesidades nutricionales, el hombre necesita una fuente proteínica variada y por tanto es mejor considerar la contribución nutricional de la dieta globalmente en vez de contribución por alimentos aislados (27).



Cuadro 6

**Aminoácidos esenciales para el hombre**

<i>Naturaleza química</i>	<i>Fuente alimentaria</i>
<u>Alifáticos</u> Isoleucina Leucina Valina	Leguminosas
<u>Aromáticos</u> Fenilalanina Tirosina Triptofano	Huevos, leche
<u>Básicos</u> Lisina	Carne, pescado, leguminosas
<u>Hidroxiaminoácidos</u> Treonina	Carne, pescado, leguminosas
<u>Azufrados</u> Cisteína Metionina	Huevos, cereales

Fuente: Robinson, 1991 (27)

Evaluación de la calidad de proteínas por métodos biológicos

Aunque se cuenta con métodos químicos para la evaluación de las proteínas, los estudios con animales de laboratorio tienen mayor relevancia al momento de evaluar los elementos nutritivos útiles para un organismo. Los resultados que se obtengan pueden ser extrapolados al ser humano.

Relación de eficiencia de la proteína (REP)

El nivel de crecimiento de un animal bajo condiciones bien definidas es un buen índice para evaluar la calidad nutritiva de un alimento. Si la proteína en estudio es insuficiente en uno o más aminoácidos indispensables se refleja en el crecimiento, ya que este puede ser reducido o no presentarse. La relación de eficiencia de la proteína (REP) es el procedimiento más ampliamente usado dentro de las pruebas biológicas en la

evaluación de una fuente de proteína. Generalmente se acepta que el incremento en peso de ratas destetadas alimentadas con una dieta, bajo condiciones estandarizadas, provee una medida confiable del valor nutritivo de una proteína. Factores como la edad y sexo de los animales, tiempo de experimentación, iluminación, nivel de proteína en la dieta, etc., pueden afectar la determinación de la REP.

La REP es el método biológico más simple para evaluar la calidad de la proteína y se define como la ganancia en peso por gramo de proteína ingerida. Esta técnica permite categorizar las proteínas por orden de calidad, sobre todo cuando son ensayadas simultáneamente. La crítica más fuerte hecha al REP es que considera que toda la proteína ingerida es utilizada para el crecimiento; de lo anterior se deriva la necesidad de contar con métodos de balance de nitrógeno (28).

### Digestibilidad

Durante la digestión de las proteínas por los animales, los enlaces peptídicos se deben hidrolizar en forma relativamente rápida en el estómago y parte del intestino delgado, mediante la acción de enzimas proteolíticas específicas, de tal forma que se liberan aminoácidos y péptidos pequeños, los cuales son absorbidos en el intestino delgado.

La digestibilidad es la disponibilidad de los aminoácidos constituyentes de la proteína para ser absorbidos por el organismo de prueba. Cualquier método para evaluar la calidad nutritiva de una proteína alimenticia debe estimar directa o indirectamente la biodisponibilidad de los aminoácidos para la síntesis de las proteínas de mantenimiento.

Algunos factores que pueden influir en la digestibilidad de la proteína son:

- ✓ La fracción proteínica puede estar protegida contra la acción enzimática por materiales celulares estructurales;

- ✓ El procesamiento térmico en ocasiones puede mejorar la digestibilidad, debido a la desnaturalización de las proteínas nativas y hacerlas más susceptibles a la acción de las enzimas digestivas; sin embargo, en el caso de un sobreprocesamiento, los aminoácidos pueden ser destruidos, disminuyendo el valor nutritivo de la proteína;
- ✓ Algunos alimentos naturales pueden contener factores tóxicos (como lectinas, saponinas, etc.) que disminuyen la función de absorción de la mucosa intestinal, o factores antinutricionales (inhibidores de tripsina, taninos, etc.) que no permiten la acción de las enzimas digestivas (26).

## 2. METODOLOGÍA

En la Figura 1 se presenta el diagrama general de trabajo y enseguida una descripción de cada parte.

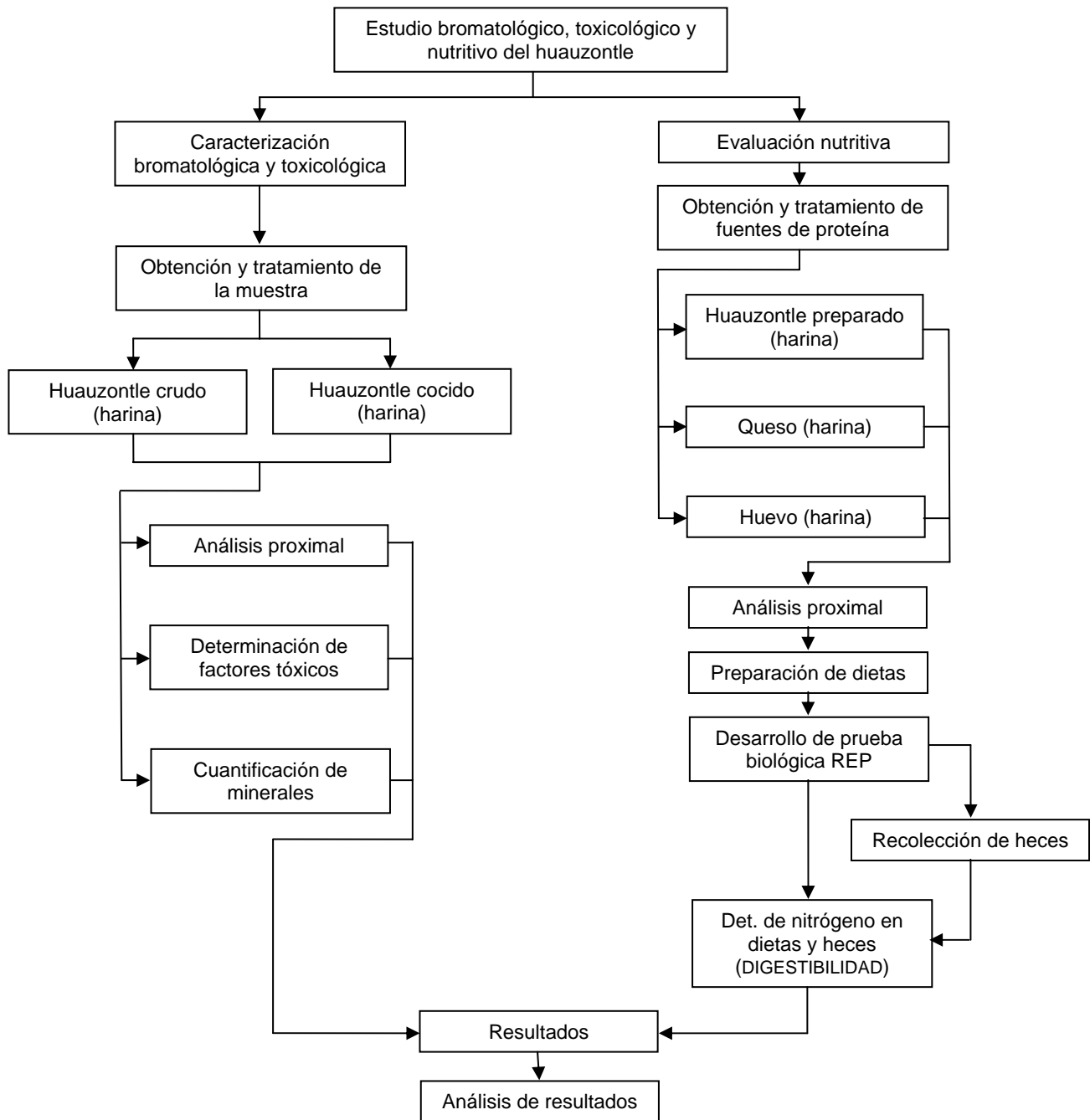


Figura 1

## 2.1. Caracterización bromatológica y toxicológica de la inflorescencia del huauzontle

### Obtención y tratamiento de la muestra

La muestra fue adquirida en mercados ubicados en diferentes zonas del Distrito Federal. Se limpió, retirando ramas, hojas y agentes extraños; posteriormente fue dividida en dos lotes. El primero, de aproximadamente el 80% del total, se coció durante una hora y media a ebullición (guardando la relación 1:10 entre muestra y agua). Tanto al lote cocido como al crudo (el resto de la muestra, que no se somete al tratamiento térmico) se le determinó el contenido de humedad gruesa, para referir posteriormente los resultados en la base original.

Las muestras cruda y cocida fueron secadas a  $57^{\circ}\text{C} \pm 1$  en una estufa de corriente de aire (Lab-Line Imperial III, Radiant Heat Oven Modelo 293 A); terminado el tiempo de secado, la muestra fue introducida en un bote de plástico, donde se almacenó. Las muestras secas fueron molidas (molino Tomas Wiley Laboratory Hill Mod. 4), pasadas a través de una malla de 1mm de diámetro, para obtener las harinas correspondientes.

### Análisis proximal

Las metodologías empleadas se realizaron de acuerdo con los procedimientos descritos por la **Association of Official Analytical Chemists** (AOAC); como dichos procedimientos son de amplio dominio en el área bromatológica, sólo se explica brevemente su fundamento, ya que los detalles se pueden encontrar en la bibliografía respectiva (29).

### Determinación de humedad analítica

#### *Fundamento*

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

### Determinación de cenizas

#### *Fundamento*

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

### Determinación de grasa

#### *Fundamento*

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

### Determinación de fibra cruda

#### *Fundamento*

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

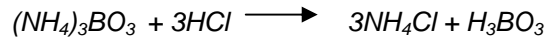
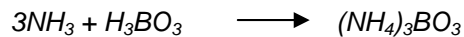
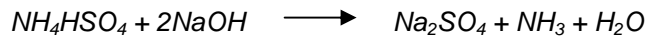
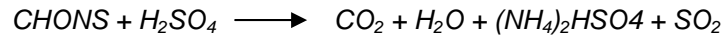
### Determinación de proteína cruda

#### *Fundamento*

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

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

Las reacciones antes descritas se muestran a continuación:



Referente a las determinaciones analíticas de los factores tóxicos, que corresponden a la Toxicología Analítica, a continuación se presenta una descripción más amplia.

### Determinación de factores tóxicos y antinutrimientales

#### Determinación de taninos (30)

##### *Fundamento*

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

##### *Material y reactivos:*

- ✓ Parrilla con agitación magnética de 5 platos (Thermolyne Mod. SP -13025)
- ✓ Centrifuga (DINAC)
- ✓ Tubos de centrifuga con capacidad de 50 mL
- ✓ Magnetos
- ✓ Vortex (Lab-Line mod. 1290 super mixer)



- ✓ Espectrofotómetro (Sequioa-Turner Mod. 340)
- ✓ Solución patrón de ácido tánico de 2 g/L (Merck 773) (se pesan 0.05 g de ácido tánico para ser llevados a un volumen final de 25 mL)
- ✓ Solución de amonio 8 g/L, como  $\text{NH}_3$  (se toman 1.54 mL de hidróxido de amonio con densidad de 0.896 a 20°C y 29 % de pureza llevándose a un volumen final de 50mL)
- ✓ Solución de dimetilformamida 75% (v/v) (se toman 375 mL de dimetilformamida y se llevan a un volumen final de 500 mL con agua)
- ✓ Solución de citrato férrico de amonio 3.5 g/L (se toman 0.35 g de citrato férrico amoniacal y se llevan a un volumen final de 100 mL con agua). Esta solución se prepara 24 horas antes de la determinación

#### *Procedimiento*

- ✓ *Preparación de la curva estándar*

Se rotularon 6 tubos de ensayo, correspondiendo el no. 1 al blanco de la curva. Se adicionaron 0, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 y 0.2 mL de la solución de ácido tánico. Se llevaron a un volumen de 1 mL con dimetilformamida. Se añadieron 5 mL de agua destilada a cada tubo luego 1 mL de la solución de citrato férrico amoniacal y posteriormente 1 mL de la solución de amonio y se mezcló. Se introdujeron en un baño de temperatura controlada y se mantuvieron 10 minutos a 30°C para permitir el desarrollo óptimo de color. Transcurrido este tiempo, inmediatamente se transfirieron a celdas de medición y se leyó en espectrofotómetro a 525 nm. Finalmente se trazó una gráfica de absorbancia vs concentración de ácido tánico expresada como  $\mu\text{g}$  de ácido tánico.

- ✓ *Obtención del extracto*

Se pesaron de 0.3 a 1 g de muestra en un vaso de precipitados de 50 mL, los cuales se disolvieron con 20 mL de dimetilformamida y se sometieron a agitación moderada a 700 rpm durante 60 minutos. Se transfirieron cuantitativamente a un matraz

volumétrico de 25 mL, aforando con dimetilformamida. Se homogeneizó y transfirió a un tubo de centrifuga; se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante en un recipiente de plástico, el cual se refrigeró hasta que se efectuó la determinación.

#### ✓ *Determinación*

Una vez obtenido el extracto se rotularon 2 tubos de ensayo (uno correspondiente al blanco y el otro al problema).

Se añadió al blanco 1 mL de muestra, 6 mL de agua y 1 mL de citrato férrico amoniacal, mientras que al problema se adicionó 1 mL de muestra, 5 mL de agua, 1 mL de citrato y 1 mL de la solución de amoniaco. Se agitó perfectamente con ayuda del vortex el contenido en cada tubo y después de la última adición se introdujeron en un baño a temperatura controlada de 30°C durante 10 minutos para permitir el desarrollo del color. Al término del tiempo se transfirió el contenido de cada tubo a celdas de medición y se leyó en el espectrofotómetro a 525 nm.

#### *Cálculos*

Mediante la ecuación de la línea recta obtenida con los datos de la curva patrón, se determinó el contenido de taninos y se reportó como % de ácido tánico.

La determinación se hizo por triplicado.

#### *Determinación de inhibidores de tripsina* (31)

##### *Fundamento*

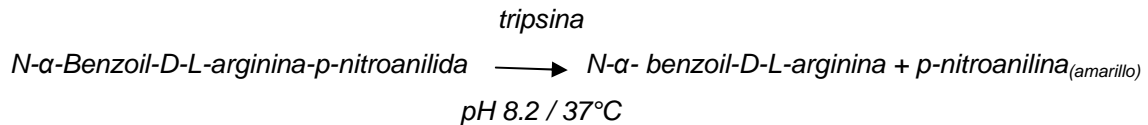
Se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso de la muestra sobre una solución estándar de tripsina.

El extracto se pone en contacto con una solución estandarizada de tripsina y después de cierto tiempo se determina la actividad proteolítica remanente, por medio de un sustrato sintético (BAPNA), el cual producirá coloración al ser hidrolizado por la

enzima, la cual se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm, donde la coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de la muestra.

La actividad de inhibidores de tripsina se expresa en términos de unidades de tripsina inhibida (UTI), donde una unidad de tripsina se define arbitrariamente como un incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm.

La reacción antes mencionada es la siguiente:



*Material y reactivos:*

- ✓ Potenciometro (Corning Mod. 10)
- ✓ Parrilla con agitación magnética (Thermoline Mod. SP-13025)
- ✓ Baño de agua a 37°C (Grant Mod. 67530)
- ✓ Espectrofotómetro (Sequoia-Turner Mod. 340)
- ✓ Vortex (Lab-Line mod. 1290 super mixer)
- ✓ Solución de NaOH 0.01 N
- ✓ Solución de ácido acético al 30 %
- ✓ Solución amortiguadora TRIS pH 8.2 y 0.05M (3.025 g de hidroximetil-amino-metano y 1.47 g de CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O se disuelven en 450 mL de agua destilada, se ajusta el pH a 8.2 y se afora a un volumen de 500mL)
- ✓ Solución BAPNA (100 mg de N-α-benzoil-D-L-arginina-p-nitroanilida-HCl se disuelven en 2.5 mL de dimetil-sulfóxido y se diluyen a 250 mL con amortiguador TRIS el cual se calienta previamente a 37°C) esta solución se prepara el mismo día de la determinación.
- ✓ Solución estándar de tripsina 20 µg/mL (se pesan 4 mg exactos de tripsina bovina –SIGMA T-8253 y se disuelven en 200 mL de HCl 0.001 N)

### *Procedimiento*

#### ✓ *Preparación del extracto*

Se pesaron aproximadamente 1 g de muestra en un vaso de precipitados y se adicionaron 45 mL de NaOH 0.01 N, posteriormente se ajustó el pH a  $9.6 \pm 0.2$  y se aforó con NaOH 0.01N a 50 mL; se introdujo un magneto en el vaso y se colocó en agitación por un periodo de 2 horas y media a 300 rpm.

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

#### ✓ *Determinación de la actividad del extracto*

Se adicionaron a un tubo de ensaye 0, 0.6, 1, 1.4 y 1.8 mL del extracto obtenido y se ajustó cada tubo a un volumen final de 2 mL con agua destilada. Los tubos se introdujeron en el baño de agua a 37°C y se adicionaron 2 mL de solución estándar de tripsina a 37°C, manteniéndose así por 10 minutos exactos. Después se adicionaron 5mL de BAPNA a 37°C a cada tubo, se mantuvieron por 10 minutos exactos a 37°C y finalmente se detuvo la reacción con adición de 1 mL de ácido acético al 30%.

En el caso del blanco después de agregar la solución estándar de tripsina, se adicionó inmediatamente 1 mL de ácido acético para detener la reacción. Los tubos de reacción después de un tiempo de reposo de 15 minutos se filtraron a través de papel filtro Whatman # 1. De cada tubo se determinó la lectura de transmitancia en el espectrofotómetro (ajustando a 100% de transmitancia con el tubo que contenía 0 mL del extracto) a una longitud de onda de 410 nm.

La determinación se hizo por triplicado

### *Cálculos*

El valor de transmitancia se convierte a un valor de absorbancia la cual se multiplica por 100, para convertir a unidades de tripsina inhibidas (UTI); se resta a cada

valor obtenido el valor de la referencia que es el tubo al cual no se le agrega extracto. Después se divide cada valor entre la cantidad de extracto empleada de tal modo que se tienen UTI/mL. A continuación se relaciona el volumen de extracto con UTI/mL con un modelo de regresión lineal.

$$\frac{UTI}{mg \text{ muestra}} = \text{ordenada al origen}_{reglin} \times \frac{Vol \text{ extracto}}{mg \text{ muestra}}$$

Nota: La ecuación anterior es utilizada siempre y cuando los inhibidores de tripsina determinados muestren una cinética de inhibidores tipo Kunitz; esto es cuando el coeficiente de correlación de la ecuación de la recta sea -0.9, de no de ser así se obtiene el promedio de un cuadruplicado y se reporta el valor.

### Determinación de hemaglutininas (prueba semicuantitativa) (32)

#### *Fundamento*

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

#### *Material y reactivos:*

- ✓ Parrilla con agitación magnética (Thermoline Mod. SP-13025)
- ✓ Espectrofotómetro (Sequoia-Turner Mod. 340)
- ✓ Centrífuga para tubos (DYNAC)
- ✓ Tubos graduados de 15 mL para centrífuga
- ✓ Incubadora a 37°C (Blue-M)
- ✓ Adaptador para celdas de 10 x 75 mm (acondicionado a una abertura de 1 cm<sup>2</sup>)

- ✓ Kit de microtitulación (Microtiter Kit cook Eng-Alexander Virginia USA)
- ✓ Placas tipo "V" para microtitulación
- ✓ Dispositivo con espejo para la lectura de las placas de microtitulación.
- ✓ Papel Whatman de filtración rápida
- ✓ Solución de pronasa 0.2% en solución salina
- ✓ Solución salina al 1% (m/v)
- ✓ Solución salina al 0.9% (m/v)
- ✓ Solución anticoagulante (heparina)
- ✓ Sangre de hámster

#### *Procedimiento*

- ✓ *Preparación del extracto*

Se pesó 1 g de muestra molida y se suspendió en 10 mL de solución salina al 1%. La suspensión se sometió a agitación mecánica durante 2 horas a 300 rpm a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de agitación, el extracto se centrifugó durante 15 minutos a 1400 rpm con el fin de eliminar el residuo insoluble. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de vidrio sobre un matraz aforado, llevando el extracto a un volumen final de 10 mL con solución salina al 1%.

Se obtuvieron 3 extractos de cada harina y 1 extracto de frijol negro jamapa que se utiliza como control positivo.

- ✓ *Lavado de eritrocitos*

Se obtuvieron aproximadamente 50 gotas de sangre de hámster, las cuales se colocaron en un matraz de 25 mL con heparina; posteriormente se diluyó la sangre con solución salina al 0.9% en una relación 1:5 v/v (sangre:solución salina). La sangre se distribuyó en 2 tubos graduados para centrífuga los cuales se sometieron a centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos. Al término de éste tiempo se separó el sobrenadante y

se volvieron a diluir los eritrocitos con la relación antes mencionada para volver a ser centrifugados bajo las mismas condiciones.

Esta operación se repitió 3 veces.

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

✓ *Sensibilización de eritrocitos*

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

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

✓ *Ajuste de la suspensión de eritrocitos*

Se tomaron 0.1 mL de la suspensión de eritrocitos y se agregaron 4.9 mL de solución salina en una celda de vidrio, midiéndose inmediatamente el valor de transmitancia en el espectrofotómetro a 620 nm utilizando un adaptador de celdas que permitiera el paso de 1cm<sup>2</sup> de luz (el espectrofotómetro fue ajustado a 100% de transmitancia utilizando como blanco solución salina al 0.9%). El valor de % de transmitancia se encontró dentro del intervalo de 24 – 29% T.

✓ *Microtitulación*

En las placas tipo "V" se colocaron, en cada pozo de cada hilera 50 µL de solución salina al 0.9% con un pipetero de gota. Posteriormente se empleó el microdilutor para agregar 50 µL del extracto y se procedió a realizar diluciones sucesivas. Después se llenó el microdilutor con 50 µL del extracto de referencia y se realizaron 12 diluciones sucesivas.

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

✓ *Lectura de las placas*

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se colocó la placa en el dispositivo de lectura y se reportó la máxima dilución que presenta aglutinación (título).

*Determinación de saponinas* (33)

*Fundamento*

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

El método de microtitulación es rápido y requiere una mínima cantidad de muestra. Se necesita trabajar con glóbulos rojos lavados y activados con una solución de proteasa (como pronasa, tripsina o papaína), ya que la sensibilidad de la aglutinación se mejora considerablemente con este tratamiento.

*Material y reactivos:*

- ✓ Extractor de grasa Goldfisch, LABCONCO.
- ✓ Cartuchos de celulosa Whatman 22x88 mm
- ✓ Rotavapor Büchi, 461, modelo RE-111



- ✓ Centrífuga Dynac
- ✓ Incubadora bacteriológica, BLUE M.
- ✓ Espectrofotómetro COLEMAN, Junior II-A
- ✓ Tubos de centrífuga de 15 mL con graduación
- ✓ Microtiter kit (Cook Eng-Alexander Virginia USA)
- ✓ Solución de metanol y agua destilada al 85% (v/v)
- ✓ Sangre de conejo desfibrinada y lavada
- ✓ Solución anticoagulante (a)
- ✓ Solución salina al 0.9 %
- ✓ Solución de tripsina al 0.1 % en solución salina (b)
- ✓ Tripsina de páncreas de porcino (Sigma t-8128)
- ✓ Solución estándar de saponinas al 0.5 % en solución salina (c)

(a) Cuando la sangre se va a trabajar inmediatamente se puede utilizar ya sea solución de heparina o citrato. Si por el contrario se requiere conservar en refrigeración por unos días, lo mejor es usar como anticoagulante la solución ELSEVER.

(b) La solución de tripsina de páncreas de porcino (Sigma t-8128) al 0.1 % en solución salina al 0.9 % se emplea durante el proceso de sensibilización.

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

#### *Procedimiento*

- ✓ *Preparación del extracto*

Se pesaron 7.5 g en cada cartucho de celulosa, los cuales se colocaron en los portadedales y en el extractor Goldfish. La extracción se realizó a la máxima temperatura del aparato durante 2 horas, con metanol:agua (85:15) como solución extractora de saponinas. Una vez transcurrido el tiempo de extracción, el extracto se concentró a sequedad en el rotovapor, aproximadamente a 65°C. La muestra se redisolvió con

solución salina al 0.9 % y se filtró con ayuda de vacío para aforar a 100 mL con la misma solución. El extracto fue refrigerado hasta que fue empleado, para evitar su contaminación.

✓ *Preparación de la sangre*

Una vez que se sangró al conejo, la sangre se colocó en un matraz pequeño que contenía solución anticoagulante y se agitó suavemente para la completa homogeneización de la mezcla sangre-anticoagulante.

La sangre con anticoagulante se trasvasó a tubos de centrifuga para lavarla (3 veces) con solución salina al 0.9 %. La relación sangre solución salina fue aproximadamente 1:5.

Se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min. Después del último lavado se midió en el tubo de centrifuga la cantidad de paquete de eritrocitos y se diluyeron al 4 % con solución salina (por cada mililitro de glóbulos agregar 24 mL de solución salina 0.9 %).

✓ *Sensibilización de los glóbulos rojos*

A cada 10 mL de suspensión de glóbulos rojos al 4 % se les agregó 1 mL de solución de tripsina al 0.1 % y se colocaron en incubadora por espacio de 1 hora a 37°C. Al término del tiempo estipulado se centrifugaron para eliminar la enzima sobrenadante, dando además 3 lavados con solución salina al 0.9 %. Después del último lavado se resuspendió el paquete de glóbulos rojos al 5 % con solución salina (por cada mililitro de paquete de glóbulos se agregaron 19 mL de solución salina 0.9 %).

✓ *Ajuste de la suspensión de glóbulos rojos*

Se tomó 1 mL de la suspensión de glóbulos rojos ya sensibilizados y se agregaron 4 mL de solución salina al 0.9 %. Se leyó en el espectrofotómetro a 620 nm, usando un adaptador de celdas que permitía el paso de sólo 1 cm<sup>2</sup> de luz y como blanco solución salina al 0.9 %.

La lectura que se obtuvo fue de 25 % ± 1 de transmitancia.

✓ *Microtitulación*

En las placas tipo "U" del microtiter se colocaron en cada pozo de una hilera 50 µL de solución salina al 0.9 % con el pipeteador de gota.

A continuación se llenó el microdilutor de 50 µL por contacto con la superficie del extracto problema o de estándar de saponinas para proceder a realizar las diluciones sucesivas en la hilera escogida, introduciendo el microdilutor en el pozo y rotándolo sin excesiva presión (se eliminó el residuo de la última dilución).

Por último con un pipetero de gota se colocó en cada pozo 50 µL de la suspensión ajustada de glóbulos rojos sensibilizados, teniendo también un control negativo con solución salina al 0.9 % sin extracto problema y otro positivo con solución salina y el estándar de saponinas al 0.5 %. Luego se rotó la placa en forma circular y se llevó a la incubadora a 37°C durante 1 hora.

✓ *Lectura*

Una vez transcurrido el tiempo, se colocó la placa sobre el dispositivo de lectura. Se localizó en la placa el número que corresponde al último pozo donde se apreció hemólisis y que resulte ser la mínima cantidad de muestra que produce prueba positiva de hemólisis.

*Cálculos*

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

En una dilución seriada se tiene la fórmula:

$$\text{mg muestra o estándar que producen hemólisis} = \frac{\text{Concentración del extracto}}{2^t}$$

donde

$t = \text{Título de hemólisis}$

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

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

El cálculo para las muestras es:

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

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

Lo cual sería equivalente a los mg de estándar de saponinas que produjeron hemólisis en el control positivo:

$$\begin{aligned} &1 \text{ } \mu\text{g} \text{ de estándar de saponina} / 1.875 \text{ mg muestra} \\ &= 0.53 \text{ } \mu\text{g} \text{ de estándar de saponina} / \text{mg muestra} \end{aligned}$$

### Determinación de nitratos (34)

#### *Fundamento*

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

#### *Material y reactivos:*

- ✓ Embudos Buchner
- ✓ Matraces Kitasato
- ✓ Micropipetas de 50, 200 y 100  $\mu\text{L}$

- ✓ Bureta de 50 mL
- ✓ Tubos de centrifuga
- ✓ Parrilla con agitación magnética de 5 platos (Thermolyne Mod. SP –13025)
- ✓ Centrifuga (DINAC)
- ✓ Adaptador para filtración de jeringa millipore
- ✓ Baño de agua (Grant Mod. 67530)
- ✓ Espectrofotómetro (Sequioa-Turner Mod. 340)
- ✓ Solución estándar de nitrato 10 mg/mL
- ✓ Solución de ácido salicílico al 5% (m/v) en ácido sulfúrico concentrado
- ✓ Hidróxido de sodio 2 M
- ✓ Carbón activado

#### *Procedimiento*

- ✓ *Obtención del extracto*

En un vaso de precipitados de 50 mL se añadieron de 0.25 a 0.9 g de muestra, 550 mg de carbón activado y 30 mL de agua. Se agitó moderadamente a 700 rpm, durante 15 min. Se filtró con ayuda de vacío sobre papel Whatman No. 41, enjuagando el vaso con porciones pequeñas de agua. El filtrado se transfirió cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 mL y se llevó a la marca de aforo con agua; se homogeneizó y transfirió a un tubo de centrifuga de 50 mL. Se centrifugó una hora a 3000 rpm. Se filtró el sobrenadante con ayuda de vacío sobre papel Whatman No. 542 y se homogeneizó para hacer la determinación.

- ✓ *Preparación de la curva estándar*

En un vaso de precipitados de 50 mL se adicionaron exactamente 3 mL de la solución estándar de nitrato, 550 mg de carbón activado y 30 mL de agua. Se mezclaron hasta homogeneizar. Se filtró con ayuda de vacío sobre papel Whatman No. 41, enjuagando el vaso con pequeñas porciones de agua. El filtrado se transfirió

cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 mL y se llevó a la marca de aforo con agua, se homogeneizó y transfirió a un tubo de centrifuga de 50 mL. Se centrifugó una hora a 3000 rpm. Se filtró el sobrenadante con ayuda de vacío sobre papel Whatman No. 542 y se homogeneizó. La solución así obtenida tuvo una concentración de nitrato 0.6 mg/mL.

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

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

#### ✓ *Determinación*

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

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

### *Cálculos*

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

La determinación se hizo por triplicado.

### Cuantificación de minerales

Las metodologías empleadas se realizaron de acuerdo con los procedimientos descritos por la **Association of Official Analytical Chemists** (AOAC) (29).

### Determinación de hierro

#### *Fundamento*

Se basa en la reducción del hierro presente en el alimento a su forma ferrosa con clorhidrato de hidroxilamina, seguida de la formación de un complejo colorido entre el ion ferroso y ortofenantrolina en condiciones ligeramente ácidas; la absorbancia de este compuesto (medida espectrofotométricamente a una longitud de onda de 530 nm) es proporcional a la cantidad de hierro. Se emplea una curva de calibración utilizando un estándar de hierro para conocer el contenido de hierro en la muestra.

### Determinación de fósforo

#### *Fundamento*

Se basa en la reacción del fósforo contenido en la muestra como ortofosfato con el ácido molíbdico para formar el ácido 12-molibdofosfórico, el cual es reducido a azul de molibdeno, compuesto de composición desconocida que contiene una mezcla de Mo (VI) y Mo (V), que absorbe a 650 nm. La intensidad del color azul formado depende de la concentración de fósforo.

## Determinación de calcio

### *Fundamento*

La muestra se calcina hasta obtener cenizas, las cuales se disuelven y se tratan con un exceso de oxalato de amonio para precipitar el calcio como oxalato de calcio. El precipitado se separa por filtración, se lava, se disuelve con ácido sulfúrico y se valora con una solución patrón de permanganato de potasio.

## 2.2. Evaluación nutritiva de la inflorescencia del huauzontle

### Obtención y tratamiento de las fuentes de proteína

#### *Huauzontle cocido*

Se empleó la misma muestra empleada durante la caracterización bromatológica y toxicológica.

#### *Huevo, queso y huauzontle preparado*

Se trabajó con huevo de gallina blanco, el cual fue sometido a cocción durante 20 minutos a ebullición (1 litro de agua por cada kg de huevo). La pieza de queso adquirida fue dividida en dos partes: la primera (que a su vez se fraccionó en 3 porciones) fue empleada como ingrediente durante la elaboración del huauzontle preparado y la otra para obtener la harina de queso. Para preparar el huauzontle, la materia prima recibió un tratamiento idéntico al descrito en el apartado *Caracterización bromatológica y toxicológica de la inflorescencia del huauzontle* (en cuanto a su limpieza y cocción); luego se dividió en 3 lotes, que fueron repartidos junto con el queso a tres diferentes personas que lo prepararon de la manera tradicional (huauzontle capeado, relleno de queso, en caldo de jitomate). Una vez recibido el platillo ya preparado, se separó el caldo (que fue liofilizado en un equipo Labconco Freeze Dryer Mod. 4.5) de los huauzontles, a los que se les retiraron las ramas.



El queso, el huevo cocido y el huauzontle preparado (sin caldo ni ramas) fueron secados a  $57^{\circ}\text{C} \pm 1$  en una estufa de corriente de aire. Las muestras secas fueron molidas para obtener las harinas correspondientes (tamaño de partícula: 2mm). En el caso del huauzontle preparado, la harina fue mezclada con el caldo liofilizado.

### Análisis proximal

Las metodologías fueron las mismas que se realizaron para la caracterización bromatológica del huauzontle crudo y cocido (procedimientos descritos por la AOAC), con excepción de la determinación de grasa en queso, que a continuación se describe.

### Determinación de grasa en queso. Método Gerber-Vangulik

#### *Fundamento*

El queso es tratado en un butirómetro con ácido sulfúrico y alcohol isoamílico: el ácido disuelve las proteínas, liberando la grasa del queso y el alcohol facilita su separación del resto de los componentes. Mediante centrifugación la grasa es separada en el vástago graduado del butirómetro, en donde es leído directamente el contenido de materia grasa.

#### *Material y reactivos:*

- ✓ Butirómetro para queso con copita y dos aberturas
- ✓ Centrifuga (Gerber)
- ✓ Ácido sulfúrico de densidad 1.530 a  $15^{\circ}\text{C}$  (se colocan 152.5 mL de agua destilada en un vaso de precipitados de 500 mL y verter resbalando por las paredes y con ayuda de un agitador 150 mL de ácido sulfúrico concentrado, en un baño de hielo)
- ✓ Alcohol isoamílico

### Procedimiento

Se pesaron directamente en el tubo fijado en el tapón del butirómetro 3 g de queso y se metió el tapón. Por la abertura superior se agregaron 15 mL de ácido sulfúrico, cubriendo todo el queso. Se tapó el butirómetro y se puso en baño maría a 65°C durante 30 min., agitándolo cuidadosamente para disolver las partículas de queso. Posteriormente se destapó, se agregó 1 mL de alcohol isoamílico y se agitó. El butirómetro se llenó con ácido sulfúrico hasta que el volumen cubrió  $\frac{3}{4}$  partes de la columna graduada. Se tapó la abertura superior y se metió en baño cinco minutos más. Finalmente se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min.

### Lectura

La lectura se hizo llevando la base de la columna de grasa exactamente a cero, por medio de la presión en el tapón del butirómetro.

### Preparación de las dietas

A partir del análisis proximal de cada una de las fuentes de proteína se ajustaron las dietas a un mismo nivel de proteína (9%) y contenido calórico (Cuadro 7).

Cuadro 7  
**Dieta de referencia de caseína**

<i>Ingrediente<sup>1</sup></i>	<i>g/100 g dieta</i>
Caseína (90% de proteína) <sup>a</sup>	10.00
Sacarosa <sup>b</sup>	18.61
Dextrosa <sup>c</sup>	16.07
Dextrina <sup>d</sup>	21.14
Aceite vegetal <sup>e</sup>	10.36
Manteca <sup>f</sup>	13.82
Mezcla de minerales <sup>g</sup>	4.00
Mezcla de vitaminas <sup>h</sup>	2.00
Celulosa <sup>i</sup>	4.00

<sup>1</sup> Marcas empleadas: <sup>a</sup> Sigma C-0376, <sup>b</sup> Comercial Cucurumbe, <sup>c</sup> Química Barsa, S. de R. L., <sup>d</sup> Comercial Maizena, <sup>e</sup> Comercial 1-2-3, <sup>f</sup> Comercial Cristal, <sup>g</sup> Rogers-Harper 70760, <sup>h</sup> MP Biomedicals, Inc., 904654, <sup>i</sup> Sigma N-C-8002

## Prueba biológica. Relación de eficiencia de la proteína (REP)

### *Fundamento*

Generalmente se acepta que el incremento en peso de ratas destetadas alimentadas con una dieta proteínica, bajo condiciones estandarizadas, provee una medida confiable del valor nutritivo. Factores como la edad, sexo, periodo de ensayo, nivel de proteína, entre otros, puede afectar la determinación de la REP; las condiciones de experimentación deben estar bien definidas así como el uso de un grupo control de caseína. Esta prueba relaciona la ganancia de peso del animal de prueba con la proteína consumida, asumiendo que el incremento en peso es exclusivo del nitrógeno ingerido (35,36).

### *Animales*

Se emplearon ratas macho recién destetadas de raza Wistar, de aproximadamente 21-23 días de edad con un peso inicial de 30-50 g; seis ratas para cada dieta.

### *Condiciones experimentales*

- ✓ Temperatura: 22-23°C
- ✓ Iluminación: 12 horas luz y 12 horas oscuridad
- ✓ Alimentación: dieta respectiva y agua
- ✓ Tiempo de experimentación: 28 días

### *Distribución de los animales*

Al inicio del experimento las ratas se pesaron individualmente (tal dato corresponde al peso inicial,  $P_i$ , del experimento). Posteriormente fueron repartidos de acuerdo a la distribución japonesa, ordenando los animales por peso en orden creciente para luego distribuirlos en una tabla (que contemplaba los cinco lotes utilizados) inicialmente de derecha a izquierda y al terminar el renglón de izquierda a derecha, y así sucesivamente hasta la última fila.

Se manejaron seis ratas por dieta, las cuales fueron colocadas en jaulas individuales. Debido a que estos animales al comer tienden a desperdiciar alimento, se colocó debajo de la jaula una charola de papel con el fin de recuperar ese material.

#### *Desarrollo de la prueba*

Una vez que los animales fueron enjaulados se le proporcionó a cada uno su respectivo alimento (pesado) y agua. Los animales y el alimento fueron pesados 3 veces por semana, recuperando el alimento desperdiciado. El bebedero fue llenado con agua cuando era requerido. Para llevar el control de todos los datos se empleó una hoja de anotación.

#### *Cálculos*

Se trazó la curva de crecimiento de cada dieta (gráfica de tiempo vs incremento en peso acumulativo) para poder visualizar la tendencia de la respuesta de los animales de estudio.

El valor de REP de cada rata fue obtenido a partir de la siguiente fórmula:

$$REP = \frac{\text{Incremento en peso}}{\text{Proteína ingerida}} = \frac{(P_f - P_i)}{(\sum AI \times F)}$$

donde

$P_f$  = Peso final del animal, en gramos

$P_i$  = Peso inicial del animal, en gramos

$\sum AI$  = Alimento ingerido acumulado total, en gramos

$F$  = Contenido de proteína de la dieta, expresado en fracción decimal (% P/100)

Para que los datos fueran comparativos fue necesario expresarlos en valores de *REP ajustado*, tomando como referencia el valor de 2.5 para la dieta de caseína, los cuales fueron calculados de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$REP_{Ajustado} = REP_{Prueba} \times \frac{REP_{CaseínaReferencia}}{REP_{CaseínaExperimental}}$$

A continuación fue obtenido la *REP ajustado promedio* de cada dieta, según la fórmula:

$$REP_{Promedio} = \frac{\sum_{i=1}^6 REP_i}{6}$$

## Digestibilidad

### *Fundamento*

La digestibilidad de una proteína es la fracción de nitrógeno ingerido que ha sido retenido en el cuerpo para el crecimiento y mantenimiento de la síntesis celular.

### *Procedimiento*

Durante los últimos cinco días de la prueba biológica (día 23 al 28) fueron colectadas las heces de las treinta ratas en frascos de plástico rotulados, fueron pesadas y secadas en una estufa de circulación de aire a 60°C durante 16 horas y se trituraron con mortero con el fin de disminuir el tamaño de partícula y poder homogeneizarlas de forma adecuada; finalmente a cada muestra se determinó nitrógeno (por duplicado).

### *Cálculos*

La digestibilidad de cada rata fue obtenida de la siguiente manera:

$$Digestibilidad = \frac{N_{Absorbido}}{N_{Ingerido}} \times 100 = \frac{N_{Ingerido} - N_{Fecal}}{N_{Ingerido}} \times 100$$

$$Digestibilidad = \frac{(AI_{23-28})(N_D) - (H)(N_H)}{(AI_{23-28})(N_D)} \times 100$$

donde:

$AI_{23-28}$  = Alimento ingerido durante los días 23 al 28, en gramos

$N_D$  = Contenido de nitrógeno de la dieta, expresado en fracción decimal (% N/100)

$H$  = Peso de las heces, en gramos

$N_H$  = Contenido de nitrógeno promedio de las heces (para cada rata), expresado en fracción decimal (% N/100)

La metodología empleada para cuantificar nitrógeno en las dietas y heces fue la descrita por la AOAC (29).

### 2.3. Análisis de resultados

Los datos obtenidos del análisis proximal, minerales, taninos, nitratos e inhibidores de tripsina fueron analizados con una *Prueba de t de Student* (prueba de hipótesis para la diferencia entre las medias de dos poblaciones) para saber si los componentes del huauzontle crudo disminuían (o aumentaban) significativamente con el proceso de cocción. Los resultados de lectinas y saponinas, al tratarse de datos no paramétricos, fueron tratados con una *Prueba de signo* en el caso de lectinas (prueba de hipótesis para la diferencia entre la mediana de una población y algún valor en particular), y una *Prueba de Mann-Whitney* en el caso de las saponinas (prueba de hipótesis para la diferencia entre las medianas de dos poblaciones). En todos los casos se empleó un nivel de significancia de 0.05 ( $\alpha=0.05$ ).

Con la REP y la digestibilidad de cada dieta se realizó un *Análisis de Varianza* y una *Prueba de rango múltiple* (Duncan), con ayuda del paquete estadístico SPSS v. 10.0, para determinar si había diferencia significativa entre las dietas trabajadas (en ambos casos  $\alpha=0.05$ ).

#### *Prueba del signo* (37)

Es una prueba no paramétrica que se centra en la mediana como una medida de tendencia central o de ubicación. Toma su nombre del hecho de que los signos más y menos, y no los valores numéricos, proporcionan los datos utilizados en los cálculos

### Supuestos

- ✓ La escala de medición es por lo menos ordinal
- ✓ La variable de interés es continua

### Ejemplo:

Se tienen las siguientes calificaciones obtenidas por diez niñas:

Niña	Calificación	Niña	Calificación
1	4	6	6
2	5	7	10
3	8	8	7
4	8	9	6
5	9	10	6

Se desea saber si es posible concluir que la calificación mediana de la población es diferente de 5.

### Hipótesis

$H_0$ : la mediana de la población es 5

$H_A$ : la mediana de la población es diferente de 5

### Estadístico de prueba

El estadístico de prueba es el número observado de signos más o de signos menos. La naturaleza de la hipótesis alterna determina cuál de estos estadísticos de prueba es conveniente. En una prueba dada, cualquiera de las siguientes hipótesis alternas puede ocurrir:

$H_A: P(+)>P(-)$  alterna unilateral

$H_A: P(+)<P(-)$  alterna unilateral

$H_A: P(+)\neq P(-)$  alterna bilateral

Si la hipótesis alterna es  $H_A: P(+)>P(-)$  un número suficientemente pequeño de signos menos causa el rechazo de  $H_0$ . El estadístico de prueba es el número de signos menos. En forma análoga, si la hipótesis alterna es  $H_A: P(+)<P(-)$  un número

suficientemente pequeño de signos más causa el rechazo de  $H_0$ . El estadístico de prueba es el número de signos más. Si la hipótesis alterna es  $H_A: P(+) \neq P(-)$  un número suficientemente pequeño de signos menos o signos más causa el rechazo de la hipótesis nula. Se puede tomar como estadístico de prueba al signo que ocurra con menos frecuencia.

#### *Distribución del estadístico de prueba*

El primer paso para determinar la naturaleza del estadístico de prueba es analizar la tabla de calificaciones para establecer cuales caen arriba y debajo de la mediana supuesta de 5:

Niña	Calificación relativa a la mediana hipotética	Niña	Calificación relativa a la mediana hipotética
1	-	6	+
2	0	7	+
3	+	8	+
4	+	9	+
5	+	10	+

#### *Regla de decisión*

La regla de decisión depende de la hipótesis alterna:

Para  $H_A: P(+) > P(-)$  se rechaza  $H_0$  si la probabilidad de observar  $k$  o menos signos menos es menor o igual a  $\alpha$

Para  $H_A: P(+) < P(-)$  se rechaza  $H_0$  si la probabilidad de observar  $k$  o menos signos más es menor o igual a  $\alpha$

Para  $H_A: P(+) \neq P(-)$  se rechaza  $H_0$  si la probabilidad de obtener un valor de  $k$  tan extremo o más que el valor calculado es igual o menos que  $\alpha/2$

Para este ejemplo, la regla de decisión es rechazar  $H_0$  si el valor  $p$  del estadístico de prueba es menor o igual que 0.05 ( $\alpha$ )



### *Cálculo del estadístico de prueba*

Es posible determinar la probabilidad de observar  $x$  o menos signos menos, cuando está dada una muestra de tamaño  $n$  y parámetro  $p$ . empleando una tabla de *Distribuciones acumuladas de la probabilidad binomial* se encuentra:

$$P(k \leq x \mid n, p) = P(k \leq 1 \mid 9, 0.5) = 0.0195$$

Como  $0.0195 < 0.05$  se rechaza  $H_0$

### *Prueba de Mann-Whitney (37)*

Es un procedimiento no paramétrico que puede emplearse para probar la hipótesis nula de que dos muestras independientes fueron extraídas de poblaciones con medianas iguales; esta prueba se basa en las jerarquías de las observaciones.

#### *Supuestos*

- ✓ Las dos muestras, de tamaños  $n$  y  $m$ , han sido extraídas de manera independiente y en forma aleatoria de sus poblaciones respectivas
- ✓ La escala de medición es por lo menos ordinal
- ✓ La variable de interés es continua

#### *Hipótesis*

- ✓ Las poblaciones no tienen medianas iguales (prueba bilateral)
- ✓ La mediana de la población 1 es mayor que la mediana de la población 2 (prueba unilateral)
- ✓ La mediana de la población 1 es menor que la mediana de la población 2 (prueba unilateral)

#### *Ejemplo:*

Se tienen los siguientes datos, tomados de las poblaciones  $X$  y  $Y$ :

X	Y
14.4, 14.2, 13.8, 16.5, 14.1, 16.6, 15.9, 15.6, 14.1, 15.3, 15.7, 16.7, 13.7, 15.3, 14.0	17.4, 16.2, 17.1, 17.5, 15.0, 16.0, 16.9, 15.0, 16.3, 16.8

Las hipótesis nula y alterna son las siguientes:

$$H_0: M_X \geq M_Y$$

$$H_A: M_X < M_Y$$

donde  $M_X$  es la mediana de la población X y  $M_Y$  es la de la población Y. Sea  $\alpha = 0.05$ .

Para calcular el estadístico de prueba se procede a combinar las dos muestras, y las observaciones se ordenan de menor a mayor teniendo presente a cuál muestra pertenece cada observación:

X	Jerarquía	Y	Jerarquía
13.7	1		
13.8	2		
14.0	3		
14.1	4.5		
14.1	4.5		
14.2	6		
14.4	7		
		15.0	8.5
		15.0	8.5
15.3	10.5		
15.3	10.5		
15.6	12		
15.7	13		
15.9	14		
		16.0	15
		16.2	16
		16.3	17
16.5	18		
16.6	19		
16.7	20		
		16.8	21
		16.9	22
		17.1	23
		17.4	24
		17.5	25
Total	145		

El estadístico de prueba es:

$$T = S - \frac{n(n+1)}{2}$$

donde  $n$  es el número de observaciones de la muestra  $X$  y  $S$  es la suma de las jerarquías asignadas a las observaciones de  $X$ .

La regla de decisión es:

Rechazar  $H_0: M_X \geq M_Y$  si el valor calculado de  $T$  es menor que  $\omega_\alpha$ , donde  $\omega_\alpha$  es el valor crítico de  $T$ , el cual se obtiene de la tabla de *Cuantiles de la estadística de prueba de Mann-Whitney*, con  $n$  el número de observaciones de  $X$ ,  $m$  el número de observaciones de  $Y$  y  $\alpha$  el nivel de significancia.

Para el ejemplo se tiene:

$$T = 145 - \frac{15(15+1)}{2} = 25$$

Al consultar una tabla de *Cuantiles del estadístico de prueba de Mann-Whitney* con  $n=15$ ,  $m=10$  y  $\alpha=0.05$  se encuentra que el valor crítico de  $\omega_\alpha$  es 45. Dado que  $25 < 45$  se rechaza  $H_0$ .

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados obtenidos del estudio bromatológico y toxicológico del huauzontle; posteriormente se muestran los correspondientes a la evaluación nutritiva de la proteína del huauzontle.

#### 3.1. Caracterización bromatológica y toxicológica de la inflorescencia del huauzontle

##### Análisis proximal

En la Tabla 1 se muestra el análisis proximal de las harinas de huauzontle crudo y cocido.

Tabla 1  
**Análisis proximal de huauzontle crudo y cocido en base húmeda (g/100 g)**

	<i>Crudo</i>	<i>Cocido</i>
Humedad	4.98 ± 0.13	3.46 ± 0.05
Cenizas	12.69 ± 0.18	6.88 ± 0.29
Extracto etéreo	1.99 ± 0.19	3.03 ± 0.04
Proteína (Nx6.25)	28.27 ± 0.29	25.07 ± 0.82
Fibra	10.62 ± 0.47	12.33 ± 0.35
Hidratos de carbono <sup>1</sup>	41.45	49.23

Se muestran los valores promedios ± desviación estándar (n=3); CV < 5%.

<sup>1</sup> Carbohidratos calculados por diferencia.

Para discutir los resultados del análisis proximal de manera adecuada y representarlos en una base uniforme, se presentan los valores en base seca. La Tabla 2 incluye el análisis de las muestras estudiadas en base seca.

Tabla 2  
**Análisis proximal de huauzontle crudo y cocido en base seca (g/100 g)**

	<i>Crudo</i>	<i>Cocido</i>
Cenizas	13.36 ± 0.19 <sup>a</sup>	7.13 ± 0.30 <sup>b</sup>
Extracto etéreo	2.09 ± 0.20 <sup>a</sup>	3.14 ± 0.03 <sup>b</sup>
Proteína (Nx6.25)	29.76 ± 0.31 <sup>a</sup>	25.97 ± 0.85 <sup>b</sup>
Fibra	11.18 ± 0.50 <sup>a</sup>	12.77 ± 0.36 <sup>b</sup>
Hidratos de carbono <sup>1</sup>	43.61	50.99

Se muestran los valores promedios ± desviación estándar (n=3); CV < 5%.

<sup>1</sup> Carbohidratos calculados por diferencia.

Diferentes letras dentro del mismo renglón indican diferencias estadísticamente significativas.

Como puede observarse, hay una disminución significativa de cenizas y de proteína en el huauzontle cocido, lo cual se debe a que ambos componentes se pierden en el agua de cocción; por el contrario, el extracto etéreo y la fibra se incrementan después del cocimiento, ya que al tratarse de materiales insolubles en agua no se pierden, y como consecuencia de la disminución de las cenizas y proteínas, se concentran en la harina cocida.

En cuanto a los hidratos de carbono, no se realizó la una prueba estadística respectiva ya que estos valores fueron obtenidos por diferencia. Sin embargo, quizá haya un aumento en el huauzontle cocido (Tabla 2) por las mismas razones que se incrementan el extracto etéreo y la fibra cruda.

En la Tabla 3 se comparan los valores de composición química del huauzontle estudiado en su forma original con dos referencias, provenientes de diferentes Estados de la República. Se observa que los resultados de la muestra con la que se trabajó son muy parecidos a la muestra del Edo. de Morelos y con respecto a la muestra del D.F. si hay discrepancia con respecto al contenido de cenizas y carbohidratos.

Tabla 3

**Análisis proximal de huauzontle en peso fresco en base seca (g/100 g)**

	Estudiado	Distrito Federal <sup>1</sup>	Morelos <sup>1</sup>
Cenizas	13.35	35.81	13.18
Extracto etéreo	2.07	2.70	2.21
Proteína (Nx6.25)	29.74	26.08	20.35
Fibra	11.18	11.28	12.09
Hidratos de carbono	43.65	24.12	52.17

<sup>1</sup> Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, 1996 (38).

**Factores tóxicos y antinutrimientales**

En la Tabla 4 se presentan los resultados de los factores tóxicos y antinutrimientales para ambas harinas en base húmeda.

Tabla 4

**Factores tóxicos y antinutrimientales de huauzontle crudo y cocido en base húmeda**

<i>Factor</i>	<i>Crudo</i>	<i>Cocido</i>
Taninos (g/100 g) <sup>1</sup>	0.73 ± 0.01	0.24 ± 0.00
Nitratos (g/100 g) <sup>1</sup>	1.19 ± 0.04	0.24 ± 0.02
Inhibidores de tripsina (UTI/mg) <sup>1</sup>	7.48 ± 0.87	1.42 ± 0.20
Lectinas (título) <sup>2</sup>	4	0
Saponinas (µg/mg) <sup>2</sup>	8.49	4.28

<sup>1</sup> Se muestran los valores promedios ± desviación estándar (n=3); CV < 5%.

<sup>2</sup> Se muestran los valores medianos (n=14).

Tal y como se realizó para el análisis proximal, la Tabla 5 incluye los valores de los factores tóxicos y antinutrimientales en base seca.

Tabla 5

**Factores tóxicos y antinutrimientales de huauzontle crudo y cocido en base seca**

<i>Factor</i>	<i>Crudo</i>	<i>Cocido</i>
Taninos (g/100 g) <sup>1</sup>	0.77 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.00 <sup>b</sup>
Nitratos (g/100 g) <sup>1</sup>	1.25 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.02 <sup>b</sup>
Inhibidores de tripsina (UTI/mg) <sup>1</sup>	7.87 ± 0.92 <sup>a</sup>	1.47 ± 0.21 <sup>b</sup>
Lectinas (título) <sup>2</sup>	4 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
Saponinas (µg/mg) <sup>2</sup>	8.94 <sup>a</sup>	4.43 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Se muestran los valores promedios ± desviación estándar (n=3); CV < 5%.

<sup>2</sup> Se muestran los valores medianos (n=14).

Diferentes letras dentro del mismo renglón indican diferencias estadísticamente significativas

Después del tratamiento térmico, los taninos disminuyen ya que se tratan de sustancias polifenólicas, solubles y en este caso quizá termolábiles. Los nitratos también decrecen debido a que poseen una alta solubilidad en agua por su naturaleza iónica. Los

inhibidores de tripsina y las lectinas se reducen ya que se tratan de sustancias o moléculas de naturaleza proteínica, muy sensibles al calor, destruyéndose la mayoría durante la cocción del huauzontle. Finalmente las saponinas también se pierden como consecuencia de que en su estructura el azúcar las hace altamente solubles en agua; por lo tanto, de acuerdo a los factores tóxicos analizados, el consumo de la inflorescencia del huauzontle no representa ningún riesgo.

### Minerales

Las Tablas 6 y 7 muestran el contenido de minerales en el huauzontle crudo y cocido, en base húmeda y base seca, respectivamente.

Tabla 6  
**Contenido de minerales en el huauzontle crudo y cocido en base húmeda (mg/100 g)**

<i>Mineral</i>	<i>Crudo</i>	<i>Cocido</i>
Calcio	496.7 ± 0.01	927.0 ± 0.03
Hierro	16.7 ± 0.00	18.7 ± 0.00
Fósforo	575.2 ± 0.01	404.5 ± 0.01

Se muestran los valores promedios ± desviación estándar (n=3); CV < 5%

Tabla 7  
**Contenido de minerales en el huauzontle crudo y cocido en base seca (mg/100 g)**

<i>Mineral</i>	<i>Crudo</i>	<i>Cocido</i>
Calcio	522.7 ± 0.01 <sup>a</sup>	960.2 ± 0.03 <sup>b</sup>
Hierro	17.6 ± 0.00 <sup>a</sup>	19.4 ± 0.00 <sup>b</sup>
Fósforo	605.3 ± 0.01 <sup>a</sup>	419.0 ± 0.06 <sup>b</sup>

Se muestran los valores promedios ± desviación estándar (n=3); CV < 5%  
Diferentes letras dentro del mismo renglón indican diferencias estadísticamente significativas.

Después de la cocción, el contenido de fósforo disminuye ya que se solubiliza en el agua residual. El uso de una olla de fierro para cocinar el huauzontle trajo como consecuencia el incremento del contenido de hierro en la harina así obtenida. Por último, los valores de calcio se incrementaron por que en el huauzontle este mineral quizá se encuentra en forma de una de sus sales insolubles (probablemente en forma de fitato de

calcio), y al haber pérdida de otros minerales y en general de las cenizas, hay un efecto de concentración en el huauzontle cocido.

### 3.2. Evaluación nutritiva de la inflorescencia del huauzontle

#### Análisis proximal de las fuentes de proteína

En la Tabla 8 se presentan los datos obtenidos del análisis proximal de cada una de las fuentes de proteína, en base húmeda y base seca, respectivamente. Los resultados del huevo y del queso son similares a los reportados en la literatura (Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, 1996).

Tabla 8  
**Análisis proximal de las fuentes de proteína (g/100 g)**

	<i>Huevo</i>	<i>Queso</i>	<i>Huauzontle cocido</i>	<i>Huauzontle preparado</i>
Humedad	1.33	3.33	3.46	3.72
Cenizas	3.58	7.76	6.88	5.76
Grasa	37.60	39.75	3.03	51.66
Proteína <sup>1</sup>	47.92	32.15	25.07	19.23
Fibra	-	-	12.33	2.04
Hidratos de carbono <sup>2</sup>	9.57	17.01	49.23	17.59

Se muestran los valores promedios (n=3); CV < 5%.

<sup>1</sup> Factores de conversión: huevo, huauzontle cocido y huauzontle preparado: 6.25; queso: 6.38.

<sup>2</sup> Carbohidratos calculados por diferencia.

Ninguna fuente de proteína presentó restricción para la preparación de una dieta al 10% de proteína. Sin embargo, el huauzontle preparado mostró un contenido de grasa muy elevado (51.66 % de huauzontle preparado, Tabla 8), razón por la cual fue necesario ajustar todas las dietas al 9% de proteína (tanto el control como las dietas de prueba) e incrementar su contenido calórico (para mantenerlas isocalóricas).



### Contenido de proteína en las dietas

Con la finalidad de obtener datos reproducibles y comparables, se cuantificó el contenido de proteína en las dietas elaboradas; estos resultados se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10

#### **Contenido de proteína en las dietas (%)**

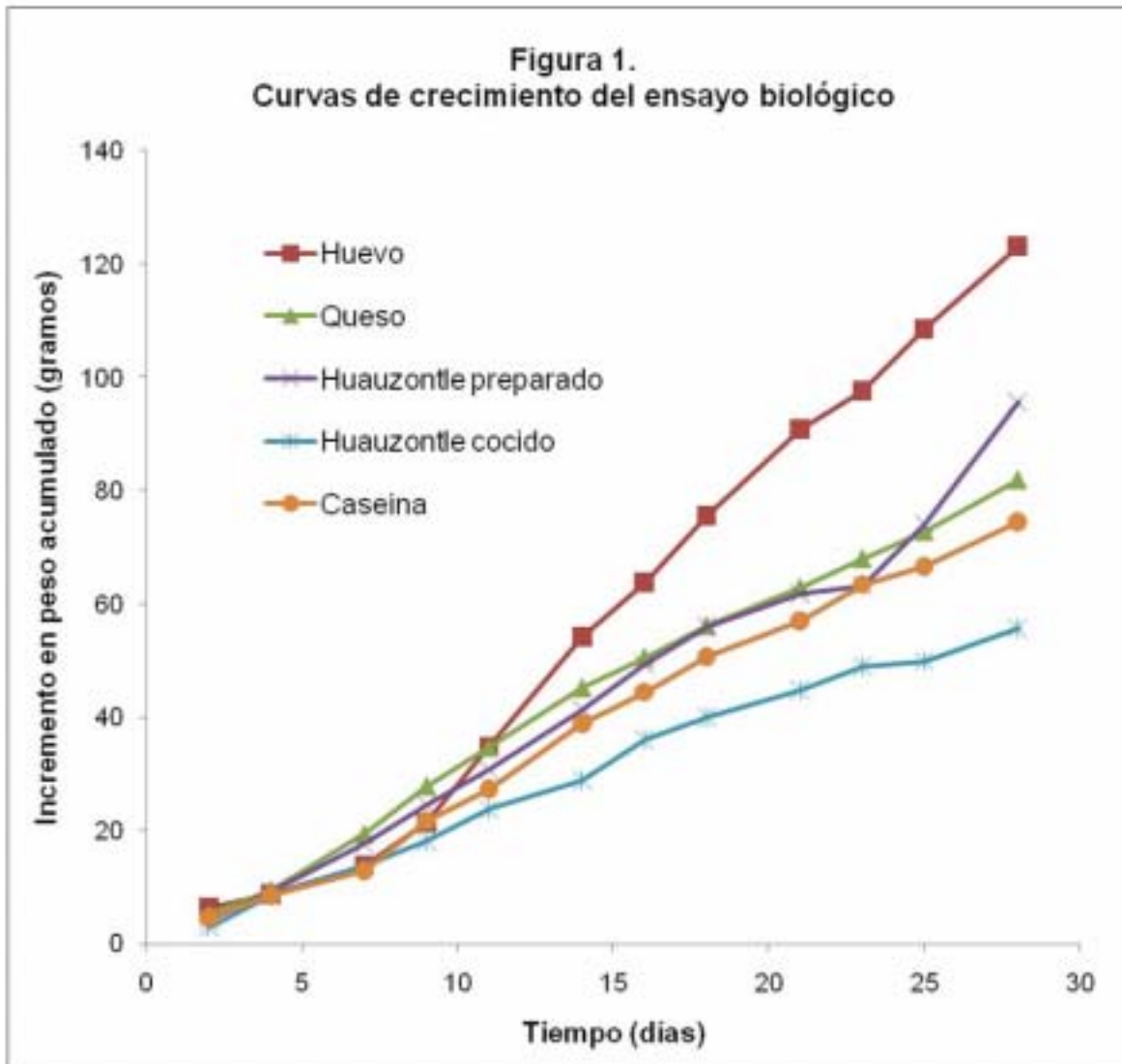
<i>Dieta evaluada</i>	<i>% Proteína</i>
Huevo (Nx6.25)	8.50 ± 0.09
Queso (Nx6.38)	8.29 ± 0.07
Caseína (Nx6.38)	9.38 ± 0.05
Huazontle cocido (Nx6.25)	9.23 ± 0.08
Huazontle preparado (Nx6.25)	9.31 ± 0.07

Se muestran los valores promedios ± desviación estándar (n=3); CV < 5%.

Todas las dietas presentaron una concentración de proteína alrededor del 9% (tal y como fueron diseñadas); las diferencias quizá se deban a que durante la preparación de las dietas no fue posible homogeneizar en su totalidad los componentes, ya que la proporción de grasa incorporada provocó que se apelmazara el alimento.

### Relación de eficiencia de la proteína

Las curvas de crecimiento de las cinco dietas evaluadas durante el ensayo biológico se presentan en la Figura 1.



Puede apreciarse claramente que:

- ✓ Los animales que presentaron el mayor incremento en peso fueron los alimentados con la dieta de huevo (como era de esperarse, ya que esta fuente de proteína es de excelente calidad)
- ✓ Los animales alimentados con huauzontle preparado y queso mostraron un crecimiento superior que el logrado por los animales alimentados con la dieta de referencia (caseína)

- ✓ El incremento en peso mostrado por las ratas alimentadas con huauzontle cocido fue el menor de todas las dietas ensayadas

En la Tabla 11 se muestran los valores de la REP obtenidos al término del ensayo biológico.

Tabla 11  
**Relación de eficiencia de la proteína (REP)**

<i>Dieta evaluada</i>	<i>REP</i>	<i>REP ajustada</i>
Huevo	4.47 ± 0.22	3.67 ± 0.18 <sup>a</sup>
Huauzontle preparado	3.62 ± 0.42	2.97 ± 0.34 <sup>b</sup>
Queso	3.57 ± 0.37	2.94 ± 0.30 <sup>b</sup>
Caseína	3.04 ± 0.27	2.50 ± 0.22 <sup>c</sup>
Huauzontle cocido	2.75 ± 0.11	2.26 ± 0.09 <sup>c</sup>

Se muestran los valores promedios ± desviación estándar (n=6); CV < 15%.  
Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas.

Como se esperaba, el huevo tuvo la REP más alta (es un alimento con uno de los mejores balances de aminoácidos, lo que hace que su proteína sea de excelente calidad), aunque está ligeramente abajo del valor reportado; no hubo diferencia significativa entre las REP del huauzontle cocido y de la caseína, por lo que puede decirse que la proteína de la inflorescencia del huauzontle tiene una calidad nutritiva buena (similar a la de la caseína); además, como sugieren los resultados del huauzontle preparado, la proteína del huauzontle se complementa bien con las del huevo y del queso, mostrando crecimientos muy similares a los de la dieta elaborada únicamente con queso, que es una proteína de muy buena calidad biológica.

### Digestibilidad

En la Tabla 12 se presentan las digestibilidades de cada fuente de proteína.

Tabla 12  
**Digestibilidades**

<i>Dieta evaluada</i>	<i>Digestibilidad aparente<sup>1</sup></i>
Caseína	93.18 ± 1.89 <sup>a</sup>
Queso	89.86 ± 1.94 <sup>b</sup>
Huazontle preparado	88.22 ± 1.16 <sup>b</sup>
Huevo	83.13 ± 1.46 <sup>c</sup>
Huazontle cocido	73.15 ± 1.69 <sup>d</sup>

Se muestran los valores promedios ± desviación estándar (n=6); CV < 5%.

Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas.

<sup>1</sup> Digestibilidad aparente =  $(N_2 \text{ absorbido} / N_2 \text{ retenido}) \times 100$

La digestibilidad del huevo fue baja, lo cual quizá se deba a la aparición de nitrógeno fecal proveniente de algunos aminoácidos que fueron destruidos durante el proceso de secado (el tiempo de calentamiento se prolongó para el primer lote, haciendo reaccionar a los aminoácidos con otras sustancias y disminuyendo el valor nutritivo del huevo), lo cual explicaría también el valor relativamente bajo de REP. Es interesante observar que el huazontle cocido, aunque tuvo la menor digestibilidad (quizá porque en particular esta dieta tuvo un mayor contenido de fibra, la cual incrementa los movimientos peristálticos y disminuye la absorción de las proteínas), produjo un incremento en peso y una REP similares a los de la caseína, cuya digestibilidad es cercana al 100%. Se puede decir que la digestibilidad del huazontle se mejora cuando se combina con el huevo y el queso, y por consiguiente se produce una mejor respuesta biológica, como se pudo observar.

## 4. CONCLUSIONES

- ✓ Se presentó diferencia significativa entre todos los valores del análisis proximal del huauzontle crudo y el cocido; no obstante que hay pérdida de proteína en el huauzontle cocido, su nivel sigue siendo relevante.
- ✓ Todos los factores tóxicos (lectinas, nitratos y saponinas) y antinutrimientales (inhibidores de tripsina y taninos) mostraron un decremento significativo en el huauzontle cocido.
- ✓ La presencia de los factores tóxicos determinados es baja y la ingesta de huauzontle cocido (e incluso crudo) no representa ningún riesgo a la salud, ya que no se rebasan las dosis diarias admisibles de tales sustancias.
- ✓ El hierro tuvo un valor más alto en la muestra cocida, aunque el huauzontle es una mala fuente de este mineral; el calcio presenta un contenido considerable en el huauzontle cocido, sin embargo no es posible saber si se encuentra en forma biodisponible; el fósforo disminuyó con la cocción.
- ✓ La proteína de la inflorescencia del huauzontle cocida mostró una calidad similar a la de la caseína, pese a su baja digestibilidad; a su vez, la proteína del huauzontle se complementó bien con las de queso y huevo, mostrando los animales alimentados con esta dieta, valor de REP similar a los alimentados con queso y superior al obtenido con la dieta de referencia (caseína).

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Mujica, A. and Jacobsen, S., La quinua (*Chenopodium quinoa*, Willd) y sus parientes silvestres, Botánica Económica de los Andes Centrales, Universidad Mayor de San Andrés, pp. 449-457, La Paz (2006)
- (2) Mujica, A., Izquierdo, J., y Marathee, J. Origen y Descripción de la quinua (en línea; disponible en: <http://www.rlc.fao.org/prior/segalim/prodalim/prodveg/cdrom/contenido/libro03/Cap1.htm>; Internet; accesado el 20 de agosto de 2006).
- (3) Bonifacio, A. *Chenopodium sp.*, Recursos genéticos, Etnobotánica y Distribución geográfica (en línea; disponible en: <http://www.rlc.fao.org/prior/segalim/prodalim/prodveg/cdrom/contenido/libro14/cap1.6.htm>; Internet; accesado el 21 de agosto de 2006).
- (4) Vega, S., Altagracia, M., Pérez, N. y Ríos, C. Agroindustrialización de la Quinua (*Chenopodium quinoa*), Departamento de Producción Agrícola y Animal, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, pp. 3, 6, Xochimilco (1991).
- (5) Koziol, M., Chemical Composition and Nutritional Evaluation of Quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd), Journal of Food Composition and Analysis 5, 35-68 (1992).
- (6) Chauhan, G., Eskin, N. and Tkachuk, R., Nutrients and Antinutrients in Quinoa Seed, Cereal Chemistry 69 (1), 85-88 (1992).
- (7) Ruales, J. and Baboo M., Saponins, phytic acid, tannins and protease inhibitors in quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd) seeds, Food Chemistry 48, 137-143 (1993).
- (8) Romero, J. A., Evaluación de las características físicas, químicas y biológicas de ocho variedades de quinua (*Chenopodium quinoa*, Willd), MS Tesis, Universidad de San Carlo de Guatemala (1981).
- (9) Ruales, J. and Baboo M., Content of fat, vitamins and minerals in quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd) seeds, Food Chemistry 48, 131-136 (1993).

- (10) González, J., Roldán, A., Gallardo, M., Escudero, T. and Prado, E., Quantitative determinations of chemical compounds with nutritional value from inca crops: *Chenopodium quinoa* (quinoa), Plant Foods for Human Nutrition, 39, 331-337 (1989).
- (11) Ruales, J. and Baboo M., Nutritional quality of the protein in quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd) seeds, Plant Foods for Human Nutrition, 42, 1-11 (1992).
- (12) Mahoney, A., López, J., and Hendricks, D. An Evaluation of the Protein Quality of Quinoa, Journal of Agriculture and Food Chemistry 23 (2), 190-193 (1975).
- (13) Wilson, H. and Heiser, Ch., The origin and evolutionary relationships of 'Huauzontle' (*Chenopodium nuttalliae* Safford), domesticated chenopod of Mexico, American Journal of Botany 66 (2), 198-206 (1979).
- (14) Sánchez-Castillo, C., Dewey, P., Aguirre, A. and Lara, J. The Mineral Content of Mexican Fruits and Vegetables, Journal of Food Composition and Analysis 11, 340-356, (1998).
- (15) Villadelmar, M., Soares, M., Massieu, H., Guzman, G. and Cravioto, R., Determination of essential amino acids in Mexican foods, Ciencia 16, 17-23, México, D.F. (1956).
- (16) Derache, R. Toxicología y Seguridad de los alimentos, Ed. Omega, pp. 18, 19, 111, 112, 120, 121, 130, Barcelona (1990).
- (17) Griffiths, D., The inhibition of digestive enzymes by polyphenilic compounds, In Nutritional and toxicological significance of enzyme inhibitors in foods, Friedman M. (ed.), Plenum Press., pp. 509-516, New York (1986).
- (18) Silvestre, A. Toxicología de los alimentos, Ed. Hemisferio Sur, S. A., pp. 75-85, Buenos Aires (1996).
- (19) Bressani, R., Elias, L., Wolzak, A., Hagerman, A. and Butler, L., Tannins in common beans: methods of analysis and effects on protein quality, Journal of Food Science 48, 1000-1003 (1983).

- (20) Polhill, R. and Raven, P., Advances in Legume Systematics, Royal Botanic Gardens, pp. 533-547, England (1981).
- (21) Liener, I., Sharon, N. and Goldstein, I., The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine, Academic Press, Inc., pp. 266, 372, 544, New York (1986).
- (22) Oakenfull, D., Saponins in food- a review, Food Chemistry 6, 19-40 (1981).
- (23) Lindner, E., Toxicología de los alimentos, Ed. Acribia, pp. 82-84, Zaragoza (1995).
- (24) Badui, S., Química de los alimentos, Ed. Alhambra, pp. 467-470, México, D.F. (1990).
- (25) Bowman, B. and Russell, R. Conocimientos actuales sobre Nutrición, Organización Panamericana de la Salud e Instituto Internacional de Ciencias de la Vida, Serie Publicación Científica y Técnica No. 592, pp. 297-311, 340-343, Washington, D.C. (2003)
- (26) Altschul, A., Processed plant protein foodstuffs, Academic Press, pp. 1-39, 83-122, New York (1958).
- (27) Robinson, D., Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos, Ed. Acribia, pp. 111-114, Zaragoza (1991).
- (28) Campbell, J., Methodology of protein evaluation. Acritical appraisal of methods for evaluation or protein foods originally issued as nutrition, In: The PAG Compendium, Vol. D6, 49-94, New York (1961).
- (29) Horwitz, William (ed.), Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International, 17<sup>th</sup> Edition, Published by AOAC, Inc., chap 3, pp. 1-6, 8, 9, 21, 25, Gaithersburg, Maryland (2000).
- (30) Sarghum. Determination of tannin content, International Standard, ISO 9848 (1988).
- (31) Kakade, M., Rackis, J., Mcghee, J. and Puski, J. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products, Cereal Chemistry 51, 376-382 (1974).
- (32) Jaffé, G. y Brucher, O. Toxicidad y especificidad de diferentes fitohemaglutininas de frijoles, Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 22, 267-281 (1972).



- (33) Girón, M. Determinación semicuantitativa de saponinas en muestras vegetales aprovechando su capacidad hemolítica, Tesis, Facultad de Química, México (1992).
- (34) Cataldo, D., Haroon, M., Schrader, L. and Youngs, V. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 6, 71-80 (1975).
- (35) De Maeyer, E. M., Collaborative study in protein evaluation, In: The PAG Compendium, Sach, M. Y. (ed.), John Wiley & Sons, Vol. D, pp. 729-732, New York (1975)
- (36) Hurt, H. D., Factors which influence the biological evaluation of protein quality by the protein efficiency ratio method, In: Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds, Friedman, M. (ed.), Vol. I, pp. 87-112, New York (1975)
- (37) Daniel, W., Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud, Ed. Limusa Wiley, pp. 228-236, 660-664, 678-683, México (2002).
- (38) Tablas de composición de alimentos, Subdirección de Nutrición experimental y Ciencia de los alimentos, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, México (1996).