



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

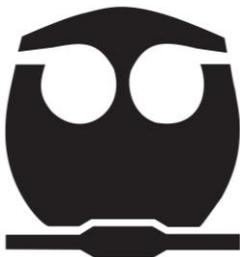
*“Composición bromatológica, potencial nutritivo y contenido de factores tóxicos, entre las hojas de diferentes cepas de moringa (*Moringa oleífera*) que se cultivan en el país”*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

RAMÓN RODRIGO HERRERA ZAMBRANO



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: DR. PEDRO VALLE VEGA**

**VOCAL: M. EN C. BERNARDO LUCAS FLORENTINO**

**SECRETARIO: M. EN C. LUCIA CORNEJO BARRERA**

**1er. SUPLENTE: Q.F.B. JUAN DIEGO ORTIZ PALMA PÉREZ**

**2° SUPLENTE: M. EN C. ARGELIA SÁNCHEZ CHINCHILLAS**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Está tesis se desarrollo en el Anexo del Laboratorio 4B, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Edificio A, Facultad de Química, UNAM.

**ASESOR DEL TEMA:**

\_\_\_\_\_  
**M. EN C. BERNARDO LUCAS FLORENTINO**

**SUSTENTANTE:**

\_\_\_\_\_  
**HERRERA ZAMBRANO RAMÓN RODRIGO**

## Agradecimientos

De todo corazón a Dios por este logro tan importante, por darme salud, por cuidarme y por darme las fuerzas para seguir adelante.

A mis queridos padres por su incondicional amor y apoyo, que me han brindado durante estos años, no sería lo que soy hoy sin ustedes, mi logro es su logro.

A mis hermanos por consentirme y apoyarme tanto. Sin duda, son mi ejemplo a seguir.

A mí querida Alianny por ser mi inspiración, mi motivación, por brindarme su apoyo, por llenarme de ilusiones y emociones pero sobre todo por quererme tanto y hacerme feliz. Gracias amor, eres parte de mi vida y de mi corazón, te adoro. Creo en ti y en este amor ¡¡¡

Al M. en C. Bernardo Lucas, por toda la confianza y todo su apoyo. Es una persona que admiro por su gran dedicación, por su fortaleza y tener muchos conocimientos, es un ejemplo a seguir sin duda alguna.

Anita, muchas gracias por tu apoyo y por escucharme, sin duda extrañare las pláticas que solíamos tener sobre libros, películas y muchos otros temas.

A la M. en C. Lucia Cornejo, por brindarme su amistad y por apoyarme. Admiro sus ganas de seguir adelante pero sobre todo el carácter tan especial que la caracteriza, también es un ejemplo a seguir.

A los chicos del laboratorio, en el 111 y el edificio A conocí a personas muy especiales como: Miguel Rangel, Angélica, Olga, Argelia, Toñito, Ricardo, Paola, Adriana, Mónica, Antonio, Valeria, Mayra, Diana, Roxana, Sandra y todos los demás compañeros de laboratorio. Gracias por todo muchachos, sin duda pasamos momentos muy padres, ojala nunca perdamos el contacto.

A mis familiares y amigos por estar ahí, en los momentos importantes y por su apoyo.

Mis mejores deseos a todos y que siempre tengan éxito en lo que hagan pero sobre todo sean felices y disfruten de la vida, porque todo pasa como un suspiro.

Sé que aun falta un largo camino por recorrer y que en esta vida nunca dejamos de aprender, sin embargo, he comprendido en este tiempo que el caerse es importante; los triunfos son maravillosos sin duda pero a veces nos confiamos y dejamos de hacer las cosas con pasión, en cambio, los fracasos y las caídas hacen que nos levantemos con más fuerza para luchar por nuestros sueños.

Nunca dejes de luchar y no te desespere, todo llega a su momento solo mantente alerta y disfruta de cada instante como si fuera el último.

## ÍNDICE

	Página
Resumen	1
1. Introducción	2
2. Objetivos	4
2.1 Objetivo general	4
2.2 Objetivos particulares	4
3. Generalidades	5
3.1 <b>Moringa oleífera</b>	5
3.2 Composición química de los alimentos	8
3.2.1 Análisis proximal	8
3.2.2 Agua	8
3.2.3 Hidratos de carbono	9
3.2.4 Grasas	9
3.2.5 Proteínas	10
3.2.6 Fibra cruda	11
3.2.7 Cenizas	11
3.3 Proteína verdadera	11
3.4 Digestibilidad <i>in vitro</i>	12
3.5 Complementación bromatológica	12
3.5.1 Calcio	12
3.5.2 Hierro	13
3.5.3 Vitamina C	14
3.5.4 Densidad calórica	15
3.6 Agentes tóxicos y factores antinutricionales	15
3.6.1 Inhibidores de tripsina	16
3.6.2 Taninos	17
3.6.3 Nitratos	18
3.6.4 Oxalatos	20
3.6.5 Saponinas	21

4. Materiales y métodos	23
4.1 Obtención del material biológico	23
4.2 Análisis químico bromatológico	24
4.3 Proteína verdadera	25
4.4 Digestibilidad <i>in vitro</i>	27
4.5 Complementación bromatológica	29
4.5.1 Calcio	29
4.5.2 Hierro	30
4.5.3 Vitamina C	32
4.5.4 Densidad calórica	34
4.6 Agentes tóxicos y factores antinutricionales	37
4.6.1 Inhibidores de tripsina	37
4.6.2 Taninos	39
4.6.3 Nitratos	42
4.6.4 Oxalatos	44
4.6.5 Saponinas	47
5. Resultados y discusión	51
5.1 Análisis químico bromatológico, proteína verdadera, digestibilidad <i>in vitro</i> , calcio, hierro, vitamina C y densidad calórica	51
5.2 Agentes tóxicos y factores antinutricionales: inhibidores de tripsina, taninos, nitratos, oxalatos y saponinas	63
6. Conclusiones	69
7. Bibliografía	70

## RESUMEN

La presente investigación evaluó la composición bromatológica, algunos factores tóxicos y antinutricionales, así como el potencial nutritivo de hojas del árbol de moringa (*Moringa oleífera*) que se cultivan en diferentes regiones del territorio nacional. Con un sin fin de beneficios reportados por varios investigadores, las hojas y otras partes del árbol, son de suma importancia en muchos países de Asia y África para combatir el problema de malnutrición en niños, mujeres embarazadas y lactantes. Actualmente, el árbol se produce a gran escala en muchas regiones del país y existen en el mercado nacional, productos a base de las hojas, que se expenden con atribuciones excepcionales, en la mayoría de los casos sin el sustento científico que lo avale, por lo cual fue necesario caracterizar este recurso vegetal, desde el punto de vista nutritivo y toxicológico. Con el apoyo del Doctor Mark Olson, investigador del Instituto de Biología de la UNAM, que además de ser experto en la planta, es también coordinador de muchos productores de moringa en el país, gracias a eso, se pudo contar con varias muestras de hojas de moringa provenientes de diferentes estados de la Republica. Dentro de la composición bromatológica se obtuvo un contenido de proteína cruda de hasta 25.31%; un contenido de grasa cruda de hasta 8.93%; y un contenido de fibra cruda de hasta 16.81%, lo cual habla de un buen perfil nutrimental al compararlo con otras hojas de consumo humano. El contenido de proteína verdadera fue de hasta 18.45%. El porcentaje de digestibilidad *in vitro* se obtuvo hasta de un 78.05%, la cual se puede considerar como buena por tratarse de un vegetal. El contenido de calcio se obtuvo hasta de 2635.74 mg del mineral por cada 100 g de hojas de moringa. Como resultado de la toxicología analítica no se presentaron niveles significativos de los tóxicos estudiados. Finalmente, al realizar el estudio estadístico se encontró que hay diferencia significativa entre las diferentes muestras de hojas de moringa tanto nutrimental como toxicológicamente, estas diferencias en el contenido de nutrientes y tóxicos pueden ser explicadas por las distintas condiciones climáticas, época del año y los diferentes tipos de suelo donde se colectaron las hojas.

## 1. INTRODUCCIÓN

En nuestro país, la presencia de hambre y desnutrición es un problema ancestral, presentándose un alto porcentaje de desnutrición proteínico-energética, particularmente en el sector infantil de zonas rurales y urbanas marginadas. Una solución a corto plazo es aumentar la producción de alimentos de origen vegetal y la búsqueda de nuevas alternativas de recursos naturales, que tengan una buena calidad nutritiva; así como la difusión de las ventajas en el consumo de las mismas.

Los alimentos de origen animal poseen un elevado valor nutritivo; sin embargo, son prácticamente inaccesibles para una gran parte de la población, en cambio los alimentos de origen vegetal tienen gran importancia por su disponibilidad y su menor precio, además de su adecuado valor nutritivo; por estas características son ampliamente usados en alimentación humana y animal. Sin embargo, las plantas producen y acumulan un amplio conjunto de metabolitos indispensables para su desarrollo así como metabolitos secundarios que juegan un papel importante en el mecanismo de defensa contra sus depredadores naturales; estos metabolitos son conocidos como factores tóxicos y antinutricionales, y son capaces de impedir el máximo aprovechamiento del material biológico o de alterar el metabolismo de quien los ingiere dependiendo de la dosis absorbida.

Un árbol que ha recibido mucha atención en los últimos años para la obtención de recursos alimenticios, es el árbol comúnmente conocido como moringa (*Moringa oleífera*). Este árbol tiene gran potencial en México así como en muchas regiones de América tropical por su combinación singular de propiedades. En algunos países de África y Asia que se encuentran en extrema pobreza, la planta es utilizada como alimento y suplemento para combatir el problema de malnutrición.

Actualmente existen en el mercado nacional, productos a base de las hojas de moringa, que se expenden aduciendo atribuciones excepcionales, en la mayoría de los casos sin el sustento científico que lo avale, por lo cual es

necesario poder caracterizar lo mejor posible este recurso vegetal, desde el punto de vista nutritivo y toxicológico.

En el presente trabajo se evalúan algunas cepas de hojas de moringa que se cultivan en el territorio nacional, las cepas provienen de los siguientes regiones: Escárcega, Campeche; Amuco de la Reforma, Guerrero; Zitácuaro, Michoacán; Cortijo, Oaxaca; Juchitán, Oaxaca; Chilac, Puebla; Sinaloa; Torreón, Coahuila. Se realizó la determinación del análisis proximal, proteína verdadera, digestibilidad *in vitro*, calcio, hierro, vitamina C, densidad calórica, y algunos factores tóxicos y antinutricionales como inhibidores de tripsina, nitratos, oxalatos, taninos y saponinas. Finalmente con los resultados obtenidos se realizó el análisis estadístico que consistió en un análisis de varianza acoplado a la prueba de rango múltiple (Duncan) para discriminar si hay diferencia significativa estadísticamente en la variable por analizar, de acuerdo a la procedencia de las hojas de moringa.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Determinar la composición bromatológica, algunos factores tóxicos y antinutricionales; así como el potencial nutritivo de las hojas del árbol de moringa (*Moringa oleífera*), de acuerdo a su procedencia de cultivo en el territorio nacional.

### 2.2 Objetivos particulares

- Realizar la determinación del análisis proximal a las hojas de moringa de acuerdo a su procedencia.
- Determinar el contenido de proteína verdadera y la digestibilidad proteínica *in vitro* en todas las hojas de moringa a las que se les haya realizado el análisis proximal.
- Cuantificar el contenido de calcio, hierro, vitamina C, así como el valor calórico en todas las muestras de hojas de moringa.
- Determinar el contenido de los siguientes agentes tóxicos y factores antinutricionales: inhibidores de tripsina, nitratos, ácido oxálico, taninos y saponinas, a las diferentes hojas de moringa.
- Realizar el análisis estadístico de los diferentes parámetros químicos y la prueba *in vitro*, para observar si hay diferencia significativa estadísticamente entre las diferentes hojas de acuerdo a su procedencia.

### 3. GENERALIDADES

#### 3.1 *Moringa oleífera*

El árbol de *Moringa oleífera* es una de las 14 especies del género *Moringa*, que pertenece a la familia *Moringaceae*. Este árbol es nativo de Asia y el norte de África, ha sido introducido y naturalizado en algunas partes de la India, Pakistán, Afganistán, Bangladesh, Sri Lanka, este y occidente de África, Cambodia, Filipinas, Islas del Caribe, México, Perú, Paraguay y Brasil. En algunas regiones del mundo la planta es conocida como: “árbol del rábano picante”, “palillo de tambor”, “el mejor amigo de mamá”, árbol del Ben”, “marango”, “árbol milagroso”, “árbol maravilloso”, “árbol de reseda”, “ángela”, “árbol de los espárragos”, “árbol de purificación”, entre otros. [2, 26, 62]

El árbol crece rápidamente, incluso en suelos pobres, alcanza alturas desde los 5 hasta los 15 m, es resistente a la sequía y tolera un amplio rango de condiciones de lluvia. El tronco alcanza diámetros desde los 25 hasta los 30 cm, su corteza es blanquizca y sus raíces ligeras y gruesas; hojas alternas, pequeñas, doble y triple pinnadas. Las flores se producen en panículos y son aromáticas. El fruto es alargado y triangular, contiene de 13 a 18 semillas. Las flores y los frutos aparecen dos veces al año. [2, 26, 62]

*Moringa oleífera* proporciona una rica y rara combinación de nutrientes, casi todas las partes del árbol: raíces, tronco, hojas, frutos, flores, vainas y semillas, son buena fuente de proteína, vitaminas (A, B, C, D, E y K), minerales (calcio, cobre, hierro, potasio, magnesio, manganeso y zinc),  $\beta$ -caroteno, aminoácidos, varios grupos fenólicos, tocoferoles ( $\alpha$  y  $\gamma$ ) y en compuestos llamados glucosinolatos e isotocianatos. Otras sustancias fitoquímicas como taninos, esteroides y triptenoides, flavonoides, saponinas, antraquinonas, alcaloides y azúcares reductores, también se encuentran presentes en la planta. [2, 26, 42, 52]

Las hojas de moringa son una buena fuente natural de antioxidantes como flavonoides, carotenoides y grupos fenólicos, además contiene el azúcar simple ramnosa. La alta concentración de sustancias estrogénicas,  $\beta$ -sitoesterol, hierro, calcio, fosforo, cobre, potasio, vitaminas A, B y C,  $\alpha$ -tocoferol, riboflavinas, ácido

nicotínico, ácido fólico, piridoxina,  $\beta$ -caroteno, proteínas y particularmente aminoácidos indispensables como metionina, triptófano y lisina, la hacen un ideal suplemento alimenticio. Además las hojas contienen hormonas promotoras del crecimiento. Extractos de las hojas de moringa han resultado contener una potente actividad antioxidante contra radicales libres, ofreciendo una protección significativa contra el estrés oxidativo. **[2, 52]**

En general, la planta presenta bajas concentraciones de factores antinutricionales, sin embargo, esta reportado que las hojas contienen cantidades apreciables de saponinas (80 g/kg en base seca), además de una baja cantidad de fitatos (21 g/kg en base seca), taninos (12 g/kg en base seca) pero ausencia de inhibidores de tripsina y amilasa, lectinas, glucosidos cianogénicos y glucosinolatos. **[26]**

Las hojas, frutos, flores y vainas inmaduras son una importante alternativa como suplemento alimenticio para combatir el problema de la malnutrición, son utilizadas en regiones como la India, Pakistán, Filipinas, Hawái y muchas partes de África, especialmente en niños y madres lactantes. **[2, 52]**

Las hojas de moringa pueden ser un alimento disponible todo el año y de alta calidad, son comúnmente consumidas como verduras, en ensaladas, en sopas, en salsas de verduras y como encurtidos; pueden comerse frescas, cocidas o almacenadas en forma de polvo seco, durante muchos meses, sin refrigeración y al parecer sin pérdida de valor nutritivo. En la India y Filipinas las hojas frescas son usadas para preparar alimentos ricos en grasa, ya que al ser una buena fuente natural de antioxidantes, es posible aumentar la vida útil de los alimentos. **[6, 62, 67]**

Las semillas pueden ser consumidas frescas, machacadas y asadas, tienen un sabor dulce ligeramente amargo, pueden secarse y molerse hasta obtener un polvo que se utiliza como condimento. Las vainas tiernas son comestibles y se usan en sopa o se preparan a manera de espárragos. Las raíces se pueden secar y moler para su uso como condimento, tienen un sabor picante como el rábano rústico. **[27]**

Las semillas contienen polipéptidos, conformados de proteínas catiónicas activadas con un peso molecular de entre 6 y 16 KDa y altamente alcalinas, que sirven como aglomerantes naturales para el tratamiento de agua, además, poseen poder antimicrobiano, fungicida y antioxidante, por lo tanto pueden ser utilizadas como un método rápido y simple para limpiar agua sucia, así, reducir costos y ampliar el suministro de agua en países en vías de desarrollo. [2, 26, 52]

El aceite proveniente de las semillas de moringa es muy estable a la oxidación por la presencia de antioxidantes naturales, esto explica que la industria lo use en la producción de cosméticos, lubricante para maquinaria, aceite de cocina y combustible para lámparas, además, es muy apreciado en la industria del perfume, debido a su alta capacidad para retener sustancias volátiles responsables del aroma. También se ha utilizado como agente solidificante en margarinas y otros alimentos que contiene grasa sólida y semisólida, eliminando la etapa de hidrogenación del proceso de elaboración. [26, 52, 62]

Varias partes de la planta como las hojas, raíces, semillas, frutos, flores y vainas inmaduras actúan como estimulante cardiaco y circulatorio, antitumoral, antipirético, antiepiléptico, antiinflamatorio, antiúlceras, antiespasmódico, antihipertensivo; para el tratamiento de diarrea, hipertensión, infecciones de la piel, anemia, asma, bronquitis, catarro, cólera, conjuntivitis, tos, dolor de cabeza, dolor de garganta, esguinces, tuberculosis, diabetes, osteoporosis; promueve los niveles normales de glucosa en sangre, apoya el sistema inmune y aumenta la producción de leche materna en madres lactantes. [2, 67]

La planta de moringa también es utilizada como forraje, para la producción de biogás, en productos de limpieza doméstica, fertilizante y como planta ornamental. [21]

***Moringa oleífera*** fue introducida en América Central en los años 1920 como planta ornamental y para cercas vivas. Es probable que la planta haya llegado a nuestro país por medio de los naos de China, que cubrían la ruta de Filipinas a México; por lo cual, si llegó de esta forma, los tripulantes de las naves la utilizaban como alimento y se estableció la costumbre de comer la planta en el país; este hábito quedó perdido a lo largo de los siglos; sin embargo, en nuestro

territorio la moringa es parte de la horticultura tradicional y desde mucho tiempo, se cultiva de manera informal con fines exclusivamente ornamentales. El árbol es conocido en algunas regiones del país como “perla”, “árbol de las perlas”, “árbol de los espárragos” y “chinto borrego”. [21, 59]

Con el auge reciente del cultivo de moringa a nivel mundial por sus atributos agroforestales, nutritivos y medicinales, este árbol ha llegado actualmente a México en forma de semilla desde África y Asia, generalmente para su cultivo intensivo en campos expresamente dedicados a la moringa, con la finalidad de cosechar las hojas; sin embargo, la mayoría de las personas que cultiva este árbol a escala intensiva, ignoran la presencia de la moringa en la horticultura mexicana, ya que se encuentra cultivada con fines ornamentales en toda la costa pacífica del país. [2, 48, 53, 54, 58]

Teniendo en cuenta las excelentes propiedades nutricionales, la baja toxicidad y la excelente capacidad de la planta para adaptarse a suelos pobres y climas secos, la planta de moringa es una alternativa barata y confiable no sólo para proporcionar una buena nutrición, también para la cura y prevención de muchas enfermedades. [26, 52]

## **3.2 Composición química de los alimentos**

### **3.2.1 Análisis proximal**

Las determinaciones que se realizan más frecuentemente para conocer la composición de los alimentos incluyen la determinación de humedad, cenizas, extracto etéreo (grasa cruda), proteína total, fibra y carbohidratos asimilables. Este tipo de análisis se emplea en todo el mundo para hacer descripciones de los alimentos; y la mayoría de los requisitos legales para productos alimenticios se basan en el sistema de Weende. [36]

### **3.2.2 Agua**

El contenido de agua en la mayoría de alimentos frescos se encuentra entre 60-70%. Tanto en tejidos vegetales como animales se distinguen dos formas generales, el *agua libre*, que es la forma más predominante y se pierde con gran facilidad, misma que se estima en la mayoría de los métodos para determinación

de humedad; y el *agua ligada*, que se encuentra como agua de cristalización o ligada a las proteínas y a las moléculas de disacáridos.

La mayoría de las funciones biológicas del agua están relacionadas con su propiedad de actuar como disolvente de numerosos compuestos. Participa en la digestión (hidrólisis de proteínas, grasa e hidratos de carbono), la absorción de nutrimentos digeridos, el transporte de metabolitos en el organismo, regula la temperatura corporal, la excreción de los productos de desecho así como medio donde se llevan a cabo las reacciones metabólicas de un organismo.

En un alimento es importante determinar la cantidad de agua (*humedad*), para darle un valor real a la cantidad de otros componentes; por otro lado, el dato de la humedad está relacionado con la edad y el estado de conservación del mismo. Un contenido de humedad mayor al 15% en los alimentos secos no es admisible, ya que se supone una disminución del valor nutritivo y la predisposición de los mismos para el desarrollo de microorganismos. [3, 4]

### **3.2.3 Hidratos de carbono**

Los hidratos de carbono (*CHOS*), son los nutrimentos más abundantes y baratos que se encuentran en la naturaleza y por lo tanto los más consumidos. Son compuestos de carbono, hidrógeno y oxígeno, con una fórmula general de  $C_n(H_2O)_n$ , químicamente son polihidroxicetonas o polihidroxialdehídos y sus derivados, comúnmente son de origen vegetal como: glucosa, sacarosa, al igual que los polisacáridos almidón y celulosa. La lactosa y glucógeno son de origen animal. [13]

Los hidratos de carbono son la principal fuente de energía en el organismo, además de ser necesarios para llevar a cabo funciones biológicas, como la mejor utilización de proteínas y grasa. Son comúnmente encontrados en frutas y vegetales en forma de azúcares y almidones, mismos que representan la principal fuente de energía en la dieta, como la celulosa, que representa una de los componentes más importantes de la fibra dietética. [12]

### **3.2.4 Grasas**

Las grasas son un importante combustible contenido en los alimentos debido al alto aporte calórico que suministran y representan una reserva

importante de energía. Son considerados químicamente como ésteres de ácidos grasos y glicerol. Entre las funciones más importantes de las grasas son el mantenimiento de la temperatura corporal, reserva energética y vehículo de vitaminas liposolubles.

Los ácidos grasos pueden ser sintetizados en el organismo mediante vías metabólicas específicas, sin embargo existen ácidos grasos de importancia nutricional, ya que son indispensables, es decir necesaria su ingesta, debido a que el organismo no los produce; tal es el caso del ácido linoleico, linolénico y araquidónico, los cuales son necesarios para realizar funciones específicas. [50]

### **3.2.5 Proteínas**

Las proteínas, desempeñan un papel importante en las funciones biológicas del organismo humano, entre las que destacan la regeneración y formación de tejidos, síntesis de enzimas, anticuerpos, hormonas y constituyentes de la sangre. Los órganos se componen básicamente de proteínas, forman parte del tejido conectivo, piel, cabello y de otros tejidos rígidos estructurales. Los alimentos más ricos en proteína son la carne, huevo, leche, pescado, leguminosas, nueces y almendras. [61]

Todas las proteínas contienen nitrógeno, carbono, hidrógeno y oxígeno, algunas contienen azufre, fósforo y otros elementos como hierro, cobre o zinc. La molécula de proteína se compone de unidades llamadas aminoácidos, unidos por enlaces peptídicos, que contienen un grupo carboxílico y un grupo amino en posición  $\alpha$  y un grupo R que varía en los distintos aminoácidos, a excepción de la glicina que dos de sus sustituyentes son hidrógeno. Dentro de los veinte aminoácidos conocidos, algunos son indispensables, debido a que el organismo no los sintetiza y son arginina, lisina, treonina, triptófano, fenilalanina, metionina, histidina, leucina, isoleucina y valina.

Al hablar del aprovechamiento nutritivo de las proteínas, se deben distinguir tres aspectos: cantidad, calidad y digestibilidad, debido a que consumir grandes cantidades de proteína no implica que satisfagan las necesidades de aminoácidos del individuo. La calidad de éstas, se define de acuerdo al contenido de aminoácidos indispensables, que son utilizados para el crecimiento y

mantenimiento del organismo; la digestibilidad, se considera como una medida de la capacidad con la que el organismo metaboliza y aprovecha los nutrientes. [5, 22]

### **3.2.6 Fibra cruda**

Con el nombre de fibra cruda se agrupa a una mezcla heterogénea de componentes de origen vegetal resistentes a las enzimas del tracto gastrointestinal del hombre, es un residuo orgánico insoluble constituido principalmente por celulosa, pectina, lignina, hemicelulosa, gomas y mucilagos.

La celulosa es el hidrato de carbono más abundante en la naturaleza y es uno de los componentes estructurales de las células vegetales, representando un 20-40% de la materia seca de las plantas verdes. La unión de las moléculas de glucosa, mediante un enlace  $\beta$ -glucósido hace a la celulosa especialmente insoluble y resistente a la degradación por enzimas digestivas. [49]

La fibra cruda se encuentra en verduras, cereales, leguminosas y en frutas, es responsable de la regulación gastrointestinal con la reducción del tiempo de tránsito de los alimentos y el aumento de la masa fecal. [56]

### **3.2.7 Cenizas**

Las cenizas, proporcionan un porcentaje aproximado de la cantidad de minerales presente en la muestra, provienen de las sales minerales que incluyen todos los compuestos inorgánicos fijos de la muestra, son el residuo que queda al incinerarlas. La incineración de la muestra destruye la materia orgánica cambiando su naturaleza, las sales metálicas se convierten en óxidos o carbonatos y reaccionan durante la incineración para formar fosfatos, sulfatos o haluros. Entre los minerales presentes se encuentran el hierro, cobre, magnesio, sodio, calcio, fósforo, azufre y zinc. [3, 36]

### **3.3 Proteína verdadera**

Los tejidos vegetales contienen cantidades apreciables de nitrógeno no proteínico, por lo tanto debe procederse con cautela, ya que no todo el nitrógeno proviene exclusivamente de proteínas. Las plantas, además de aminoácidos libres pueden contener cantidades apreciables de nitrógeno no proteínico en forma de

aminas, purinas, pirimidinas, nucleósidos, betaínas, alcaloides, porfirinas y aminoácidos no proteínicos. [24]

### **3.4 Digestibilidad *in vitro***

Los aminoácidos presentes en las proteínas no están siempre disponibles en su totalidad, debido a que la digestión y/o absorción de los aminoácidos puede ser incompleta.

Las proteínas de origen animal son generalmente asimilables ya que no hay factores que condicionen su adecuada absorción, mientras, que las de origen vegetal lo son en menor proporción, debido a la presencia de algunos factores antinutricionales, además de que la digestibilidad de las proteínas de los alimentos está asociada con su contenido de fibra, lo que aumenta la excreción de nitrógeno en el excremento y reduce por consiguiente su digestibilidad.

Los procedimientos *in vitro* se han desarrollado para remplazar a los procedimientos *in vivo*, tratando de simular en lo más posible la digestión natural para determinar la biodisponibilidad de las proteínas sin recurrir a ensayos biológicos donde se manejan animales integros. [28]

## **3.5 Complementación bromatológica**

### **3.5.1 Calcio**

El calcio es el mineral más abundante en el organismo, se encuentra en mayor proporción en los huesos en forma de fosfato de calcio y básicamente desempeña un papel esencial en numerosos procesos bioquímicos y fisiológicos.

El calcio, lleva a cabo una gran variedad de funciones en el organismo como son:

- ✓ Mecanismo de coagulación de la sangre.
- ✓ En la función cardíaca, actúa manteniendo la integridad de las membranas (ritmo cardíaco).
- ✓ Transmisión de impulsos nerviosos.
- ✓ Mecanismo de secreción de algunas hormonas.

- ✓ Interviene en la integración funcional del nervio y del músculo (contracción y relajación muscular).
- ✓ Interviene en el funcionamiento de membranas celulares.
- ✓ Permeabilidad y estabilidad de membranas celulares.
- ✓ Formación de dientes y sistema óseo.

Los alimentos que aportan niveles elevados de calcio a la dieta (200-400 mg/100g) son: mariscos, pescado, yema de huevo, tortilla y productos lácteos; los alimentos que aportan niveles medios (100-200 mg/100g) son: cereales en general, frutos, carnes y la mayoría de los vegetales.

La deficiencia de este mineral, debido al exceso de fósforo o a la falta de vitamina D, se manifiesta con síntomas como calambres, convulsiones, desmineralización ósea (osteoporosis), detención del crecimiento y raquitismo.

**[10, 25, 30]**

### **3.5.2 Hierro**

Su presencia en el organismo es de suma importancia, en principio por estar presente en la hemoglobina, donde toma un papel activo en la transferencia de oxígeno de la sangre a los tejidos. También se encuentra en la mioglobina y la médula ósea. Participa en el proceso de respiración celular en su última fase de la cadena de transporte electrónico transfiriendo electrones en los citocromos, participa en reacciones como la oxidación del ácido ascórbico y lípidos insaturados.

La absorción de hierro en el organismo se da en la forma ferrosa (hemo)  $Fe^{2+}$ . El hierro no hemo ( $Fe^{3+}$ ), consiste principalmente en sales de hierro; se encuentra comúnmente en los vegetales, los productos lácteos y los alimentos fortificados con hierro. En general, la absorción del hierro no hemo depende de sustancias contenidas en el mismo alimento o comida que favorecen o inhiben la solubilidad. El estimulante más conocido para la absorción del hierro no hemo es el ácido ascórbico (vitamina C), mientras que los inhibidores más conocidos son los fosfatos, el ácido fítico, el calcio y los polifenoles. 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 a tres veces mejor.

El contenido de hierro es variable, los alimentos que presentan una cantidad mayor de este micronutriente son: mariscos, productos cárnicos, leguminosas y huevo, contienen entre 5-18 mg/100g; las frutas, vegetales y productos lácteos contienen una cantidad moderada entre 0.1-1.10 mg/100g.

Cuando hay deficiencia en el consumo de hierro se pueden presentar problemas como anemia ferropénica, sangrado, poca resistencia a infecciones, debilidad, fatiga, poca resistencia al frío y falta de atención. [9, 23]

### 3.5.3 Vitamina C

El ácido ascórbico pertenece al grupo de vitaminas hidrosolubles, es un derivado de azúcar de seis carbonos que participa en reacciones de hidroxilación. Químicamente es la ***L-treo-2,3,4,5,6-pentahidroxi-2-hexeno-g-lactona*** o la ***lactona del ácido L-3-ceto-treo-hexurónico***. El elemento funcional de la vitamina es la agrupación ***diol*** en los carbonos 2 y 3 que hace que esta sustancia sea un agente reductor, y se oxida fácilmente a ***ácido deshidroascórbico***, que por sí mismo puede actuar como fuente de la vitamina, y da origen a la formación de una ***dicetona***.

El mecanismo de acción de muchas actividades del ácido ascórbico es difícil de conocer sin embargo se sabe que interviene en la biosíntesis de colágeno, en la degradación de la tirosina, en la síntesis de adrenalina y ácido biliar, estimula la absorción de hierro, puede actuar como antioxidante hidrosoluble general y puede inhibir la formación de nitrosaminas durante la digestión.

Las plantas y muchos animales pueden sintetizar este compuesto a partir del ***ácido glucurónico***, pero los seres humanos, simios y los conejillos de Indias carecen de la enzima ***L-gulonolactona oxidasa***, por lo que la vitamina C es esencial para estas especies. Las fuentes del ácido ascórbico, son básicamente: los cítricos, los vegetales y los tomates. La oxidación durante el almacenamiento inactiva a la vitamina y este proceso se acelera cuando la temperatura es elevada, la cocción es prolongada, la exposición al aire es prolongada y en presencia de catalizadores como el hierro.

La deficiencia del ácido ascórbico ocasiona escorbuto, que en los niños se asocia a esqueleto anormal, debido a anomalías del colágeno. En adultos se desarrollan hemorragias llamadas equimosis y petequias, debilidad, inflamación de las encías y aflojamiento de los dientes. **[8, 64]**

#### **3.5.4 Densidad calórica**

La energía necesaria para el funcionamiento y crecimiento del organismo humano se obtiene de la degradación enzimática de los alimentos que se ingieren, la serie de reacciones involucradas en esta tarea constituyen el dominado metabolismo. La energía total intercambiada en éste proceso es posible asociarla a la de un proceso de combustión, sin embargo, éste último ocurre en un solo paso (reacción), y a altas temperaturas. La densidad calórica es la cantidad de calor liberado cuando se quema en forma completa la masa de una sustancia a presión y temperatura constantes, ésta proporciona una medida de la energía química contenida en el alimento y puede ser determinado a través de un calorímetro adiabático. Este dispositivo mide el calor producido al quemar completamente una muestra en atmósfera con exceso de oxígeno. **[45]**

#### **3.6 Agentes tóxicos y factores antinutricionales**

Algunos alimentos de la dieta humana, además de nutrimentos, contienen sustancias sin valor nutritivo y que causan daños al organismo, en el caso de las plantas estas sustancias juegan un papel importante en el mecanismo de defensa contra sus depredadores naturales. Estas sustancias se pueden clasificar como: **[50]**

Sustancias antinutricionales: Su efecto se basa en disminuir la disponibilidad o provocar una pérdida suplementaria de los nutrientes esenciales. Estas sustancias provocan un desequilibrio, que se compensa con un aporte suplementario de los nutrientes implicados, a la larga, determinan la aparición de una patología particular. A este grupo pertenecen los inhibidores de tripsina y amilasa, los taninos, los fitatos, anti vitaminas, anti enzimas, secuestrantes de minerales, entre otros. **[20]**

Sustancias tóxicas: Son sustancias presentes en los alimentos capaces de producir a corto plazo, efectos dañinos, una anomalía fisiológica, que no puede ser atenuada por una suplementación de nutrientes, generalmente son xenobióticos de alto grado de toxicidad y afectan un órgano blanco. Dentro de este grupo se encuentran los nitratos, algunas lectinas, los glucósidos cianogénicos, entre otros. **[20]**

### **3.6.1 Inhibidores de tripsina**

Los inhibidores de tripsina son sustancias antinutricionales que tienen la capacidad de inhibir la actividad proteolítica de ciertas enzimas, en este caso, específicamente de la tripsina, la cual es una enzima de suma importancia en la digestión de los humanos y animales monogástricos. Se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, sobre todo, localizados en los órganos reproductores de los vegetales y particularmente en las leguminosas.

Debido a la formación de un complejo enzima-inhibidor, el páncreas se ve estimulado a secretar un exceso de enzimas proteolíticas debido a la falta de estas enzimas libres, lo que agranda e incrementa la demanda de la enzima por el órgano. Nutricionalmente estas sustancias causan un retraso en el crecimiento o un índice bajo de la eficiencia proteínica (PER), debido a que los nutrientes de los alimentos no pueden ser bien aprovechados por el organismo. **[20, 66]**

Los inhibidores de tripsina son resistentes a la proteólisis, pero al ser sustancias de naturaleza proteínica, un tratamiento térmico adecuado, puede por lo menos, disminuir en gran medida la actividad de estos inhibidores. Sin embargo, si se tratara de destruir por completo estas sustancias, las condiciones serían bastante drásticas, ocasionando la degradación de nutrientes.

Kakade et al, ha propuesto un método en el cual ha fijado un límite máximo permisible, de acuerdo a la actividad que presentan los inhibidores; cuando la concentración de los inhibidores de tripsina sobrepasa las 10 U.T.I / mg (unidades de tripsina inhibida), se considera al alimento como no apto para alimentación humana, ya que no permiten la adecuada biodisponibilidad de ciertos nutrientes. **[54]**

### 3.6.2 Taninos

El término tanino se ha aplicado a cualquier compuesto con la capacidad de convertir a las fibras de colágeno, presentes en la piel de los animales, en estructuras impermeables a ataques microbianos y resistentes a la degradación en condiciones extremas de humedad y temperatura; éste proceso comúnmente es conocido como curtido de la piel. **[33]**

Químicamente, estas sustancias antinutricionales, son compuestos oligoméricos con múltiples unidades estructurales con grupos fenólicos libres, con un peso molecular mayor a 500 Daltons, son solubles en agua, con excepción de algunas estructuras con peso molecular muy alto, tienen la propiedad de precipitar alcaloides y otras proteínas; se clasifican como hidrolizables y condensados con base en su tipo estructural y su reactividad contra agentes hidrolíticos, particularmente ácidos; entre los primeros se encuentran, los ésteres de glucosa como ácido gálico, digitalico y elágico, como por ejemplo el ácido tánico o simplemente tanino, que provoca lesión hepática aguda (hígado graso y necrosis hepática), son rápidamente hidrolizados por ácidos, bases o ciertas enzimas; mientras que los taninos condensados son flavonoides: polímeros de antocianidinas, y no se degradan por tratamiento ácido sino que tienden a polimerizarse. **[57, 63]**

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 o trivalentes como el hierro, dando como resultado un decremento en la biodisponibilidad de estos. Los taninos también se consideran potentes inhibidores enzimáticos debido a su complejación con enzimas digestivas como amilasas, proteasas y lipasas retardando así el proceso de digestión. Los taninos se complejan con proteínas de la mucosa intestinal, lo cual dificulta la absorción de nutrientes. **[11, 15]**

Los taninos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal casi ubicuamente. Se encuentran principalmente en las habas, los chícharos, los frijoles y el sorgo; pero también en frutas, te y chocolate. Generalmente provocan una respuesta negativa cuando se consumen, ya que son responsables de

producir una sensación desagradable de astringencia debido a la unión con las proteínas de la saliva y de la mucosa bucal. El contenido de taninos está relacionado directamente con el color de las semillas o las flores; es decir que en aquellas que tienen poco color o bien son pálidas, se encuentran éstos en bajas concentraciones, mientras que las que poseen colores intensos contiene niveles significativamente mayores. [47, 57]

Los taninos sin embargo también producen efectos positivos debido a sus múltiples grupos hidroxilo, pues son considerados antioxidantes naturales, ya que protegen contra las patologías mediadas por radicales libres en el hombre, como el cáncer y la arteriosclerosis.

Según estudios, en cuanto a la remoción de taninos, se ha encontrado que el remojo, lavado y cocción, remueve alrededor del 80% de taninos en semillas, pero la materia seca pierde un 18-23%, el cual puede acarrear nutrientes solubles en el agua. [44]

La dosis diaria admisible (DDA) de ácido tánico es de 500 mg/Kg. de peso corporal/día. Lo cual corresponde a 30, 000 mg de ácido tánico por día para una persona adulta de 60 kg. [20]

### **3.6.3 Nitratos**

Los nitratos se encuentran presentes en los alimentos de origen vegetal como componentes inherentes de las plantas, en el aire que respiramos y como contaminante en el agua potable debido al uso de fertilizantes nitrogenados. La acumulación de nitratos a partir del suelo es una característica de gran importancia para las plantas, ya que es en esa forma cómo la raíz toma el nitrógeno del suelo, lo transforma a amoníaco y lo transporta a las hojas para intervenir en la síntesis de proteínas. El proceso de acumulación es muy complejo y puede estar influido por diversos factores como la variedad y especie de la planta, el grado de maduración, su estado de salud, el contenido de humedad, el tipo de suelo, la cantidad de luz recibida y la época de cosecha. El contenido de nitratos varía en diferentes partes de la planta, los niveles mayores se encuentran en los tallos y en las hojas; en cambio en las flores son menores y las semillas usualmente se encuentran libres de éstos. [1, 18, 32]

Químicamente el ion nitrato es una molécula plana y simétrica formada por un átomo de nitrógeno y tres de oxígeno, con una carga negativa, cuya fórmula es  $\text{NO}_3^-$ , es pequeño con peso molecular de 62 g/mol, es estable y altamente soluble.

Solo 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 a nitritos por la microflora digestiva. El ion nitrito en contraste con el ion nitrato, es inestable, por lo tanto es muy reactivo y está dotado de números efectos tóxicos. El paso del ion  $\text{NO}_3^-$  al ion  $\text{NO}_2^-$  no es posible de forma espontánea ya que se trata de una reducción que necesita energía; en los medios biológicos esta reducción sólo puede efectuarse bajo la acción de una enzima, la nitrato reductasa, presente en las plantas y en las bacterias, pero esta enzima está totalmente ausente en los tejidos animales. **[20, 60]**

Existen dos categorías de organismos capaces de efectuar rápidamente esta transformación de nitratos a nitritos: bebés de hasta de 6 meses de edad y animales principalmente poligástricos como los rumiantes, en donde se da lugar a elevados niveles de nitritos en la sangre, ocasionando metahemoglobinemia o “síndrome del bebe azul”. **[20, 47]**

Además los nitratos tienen efectos cancerígenos, por sí solos no lo son, 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 digestión. En segundo lugar el nitrito reacciona con compuestos orgánicos conocidos como aminas secundarias o amidas, presentes en los alimentos para formar nuevas entidades químicas conocidas como N-nitroso compuestos ya sean nitrosaminas o bien nitrosamidas, muchas de las cuales son cancerígenas; dentro del organismo esta síntesis se lleva a cabo en el estómago ya que se reúnen las condiciones necesarias como pH ácido, nitrito libre, aminas secundarias básicas provenientes de los alimentos o medicamentos. **[65]**

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 desarrolla un color rosado característico de dichos productos cuando forman la nitromioglobina, y porque actúan como inhibidores del crecimiento de *Clostridium botulinum*, microorganismo anaerobio altamente peligroso por las toxinas que sintetiza.

En 1974 la OMS (Organización Mundial de la Salud) en cooperación con la FAO, establecieron la Dosis Diaria Admisible (DDA) de nitrato de 3.65 mg/kg de peso corporal/día. Lo cual corresponde a 219 mg de nitrato por día para una persona adulta de 60 kg. [20]

#### **3.6.4 Oxalatos**

Los oxalatos, son sales o ésteres formados a partir del ácido oxálico (HOOC-COOH), éste ácido se encuentra presente en numerosas plantas en forma libre o en forma de sales de sodio, potasio y calcio; las sales de Na y K son solubles en agua, mientras que las sales de Ca son insolubles a pH neutro o alcalino pero solubles en pH ácido. [20]

Los oxalatos están distribuidos en muchos vegetales como el betabel, el perejil, el apio, la espinaca, en la acelga, entre otros vegetales; se originan a partir del metabolismo de los hidratos de carbono por la vía glucolítica de la formación del ácido glicólico y su subsecuente oxidación a ácido glioxílico. Este proceso se lleva a cabo por la acción del oxígeno molecular y de una enzima muy activa, la glicolato oxidasa, localizada en los microcuerpos o peroxisomas de las plantas. [46]

El ácido oxálico no es tóxico por su acidez sino por las reacciones del ion oxalato; es un ácido débil y sólo en forma muy concentrada provoca la destrucción del tejido vivo. Los oxalatos actúan como agentes quelantes y reductores directamente en el metabolismo de los iones calcio disminuyendo su concentración plasmática e interviniendo en la formación de cristales de calcio. [29, 32]

Desde el punto de vista antinutricional, el problema principal de los oxalatos es el de interferir en la disponibilidad de calcio en la ración alimentaria. Se considera que 2.5 g de ácido oxálico precipitan 1 g de calcio, por lo tanto, la disponibilidad de calcio de un alimento está determinada por la relación ácido oxálico-calcio. Todos los alimentos que tengan una relación superior a 2.25 constituyen una mala fuente de calcio y generalmente se consideran descalcificantes. **[20]**

La ingestión de oxalatos a través de la dieta rica en vegetales, produce síntomas de envenenamiento, efectos dañinos en el tracto intestinal e hipocalcemia. Se ha establecido que en general las plantas que contengan más del 10% de oxalatos en base seca pueden ocasionar efectos tóxicos. El precipitado insoluble bloquea los túbulos renales causando uremia, nefritis y cálculos renales; alrededor del 50% de los cálculos renales son producidos por el oxalato de calcio. Los cristales de oxalato de calcio son también responsables de la oxaluria, una alteración hereditaria correspondiente al metabolismo de la glicina, en la cual prácticamente toda la glicina sintetizada es metabolizada a ácido oxálico, vía glioxílico. **[16, 43]**

El umbral de toxicidad del ácido oxálico es bastante bajo; la dosis letal mínima en el hombre se valora en 5 g aproximadamente para un adulto de 68 kg de peso **[20]**

### **3.6.5 Saponinas**

Las saponinas son glucósidos anfifílicos, en los cuales la parte polar la constituyen los azúcares (pentosas, hexosas o ácidos urónicos), que se encuentran enlazados a un grupo no polar llamado aglicona o sapogenina, el cual puede ser un esteroide o un triterpeno, siendo triterpenoides la mayoría de saponinas que han sido identificadas. Estas se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal, principalmente en hojas, raíces, tallos y flores. **[50]**

Las saponinas son sustancias en su mayor parte amorfas, de sabor amargo, por lo general inodoras; sus soluciones coloidales al producir espuma reducen fuertemente la tensión superficial por lo que pueden estabilizar emulsiones de grasas y aceites, irritan ojos y piel cuando se tiene contacto, son

termorresistentes, forman complejos con el colesterol y otros hidroxiesteroles. Son medianamente solubles en agua y muy solubles en alcohol. **[50]**

Algunas saponinas inhiben el crecimiento de ciertos microorganismos y hongos, ya que actúan precipitando esteroides de la pared celular.

Las saponinas crean lesiones gastrointestinales y si pasan a la corriente sanguínea pueden hemolizar las células de los glóbulos rojos, es decir, destruyen los glóbulos rojos produciendo liberación de hemoglobina; el punto de ataque en la hemólisis, es el colesterol de la membrana de los eritrocitos, al unirse la saponina al colesterol se da lugar a la formación de canales en la membrana y/o una posible desnaturalización. Se ha observado que se necesita una mínima cantidad de saponinas que rodeen a la membrana para producir hemólisis. Además las saponinas pueden producir fallas en la respiración, convulsiones y coma. **[17, 31]**

La toxicidad de las saponinas está en discusión ya que en algunos países se tienen límites permitidos mientras que en otros se utilizan como aditivos para alimentos. En la actualidad se ha realizado un incremento en el conocimiento de estas sustancias, ya que aparte de manifestar efectos tóxicos, también se les ha asignado cualidades tecnológicas y medicinales

Las saponinas se utilizan como sustancias que disminuyen la tensión superficial, como espumantes y emulsificantes en productos como: detergentes, helados, bebidas carbonatadas, shampoos, jabones y extinguidores de fuego. **[31]**

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

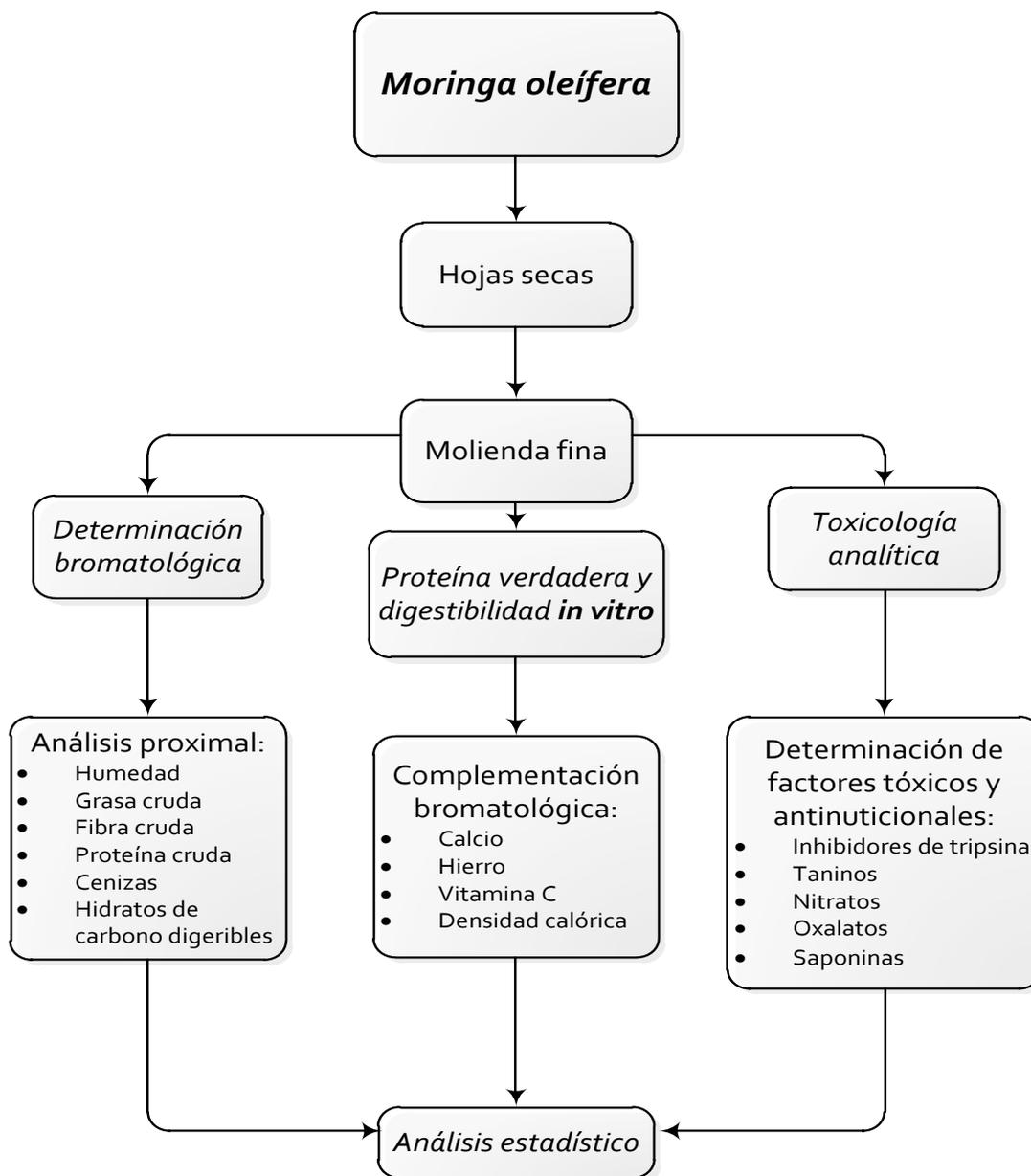
### 4.1 Obtención del material biológico

Gracias a la colaboración del Dr. Mark Olson del Instituto de Biología de la UNAM, quien es experto en la planta en cuestión, y quien tomó la iniciativa de congrega y organizar a la mayoría de los productores y comercializadores de moringa en nuestro país; este académico, pudo proporcionar varias cepas de hojas de moringa secas que se producen en el territorio nacional. Se procedió a fraccionar las hojas en un molino de laboratorio (Tomas Wiley Laboratory Hill Mod. 4), pasadas a través de una malla de 1 mm de diámetro, y así obtener las harinas respectivas del material biológico.

Se contó con cepas de hojas de moringa secas de ocho regiones del país:

- |                        |                                 |
|------------------------|---------------------------------|
| ✓ Sinaloa              | ✓ Juchitán, Oaxaca              |
| ✓ Zitácuaro, Michoacán | ✓ Chilac, Puebla                |
| ✓ Escárcega, Campeche  | ✓ Amuco de la Reforma, Guerrero |
| ✓ Cortijo, Oaxaca      | ✓ Torreón, Coahuila             |

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



**Figura 1.** Diagrama general de la investigación.

#### **4.2 Análisis químico bromatológico [7, 39]**

Con la harina de las hojas de moringa, se realizó el análisis proximal de acuerdo al esquema Weende, que consta de las siguientes determinaciones: humedad, proteína cruda ( $N \times 6.25$ ), extracto etéreo, fibra cruda, cenizas e hidratos de carbono digeribles por diferencia, las cuales se realizaron por triplicado y de acuerdo a los métodos establecidos por la AOAC.

### 4.3 Determinación de proteína verdadera [39, 51]

La técnica se basa en la solubilización del nitrógeno no proteínico así como de la proteína soluble y la posterior precipitación de dicha proteína con tungstato de sodio, con el fin de eliminar el nitrógeno no proteínico que puede interferir en la determinación del nitrógeno por medio de un micro-Kjeldahl.

Con este método la proteína insoluble también es tomada en cuenta, ya que en la etapa de filtración esta queda incluida junto con la proteína soluble precipitada.

#### **Material y reactivos**

- Balanza analítica Sartorius Analytic 022605
- Digestor Tecator modelo ab-20/40
- Dispositivo de microdestilación Tecator
- Agitador magnético Corning
- Barras magnéticas de 12x5 mm
- Papel Whatman # 50 de 5 cm de diámetro
- Tubos de digestión especiales Tecator
- Mezcla digestiva **(1)**
- Solución de ácido bórico con indicadores **(2)**
- Solución de HCl 0.01N (valorada)
- Solución de NaOH 60%
- Solución precipitante **(3)**
- Sulfato de potasio (R.A.)
- H<sub>2</sub>O<sub>4</sub> al 30%

- 1) Mezcla digestiva: se mezclan durante aproximadamente 30 minutos los siguientes reactivos y en la siguiente proporción: 3g de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 300 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y 100 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.
- 2) Solución de ácido bórico con indicadores: pesar 10 g de ácido bórico y colocarlos en un matraz de 2 L; se adiciona agua hasta disolverlo, a continuación se agregan 70 mL de indicador A (100 mg de fenolftaleína aforados a 100 mL con alcohol etílico) y 20 mL de indicador B (33 mg de verde de bromocresol y 66 mg de rojo de metilo aforados a 100 mL con alcohol etílico). Se ajusta el color a un tono café rojizo con ácido o base según se requiera, se afora a 2 L.
- 3) Solución precipitante: disolver 5g de tungstato de sodio y 1.51 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O en 20 mL de agua, añadir 22 mL de HCl 2N y mezclar; aforar a 50 mL con agua destilada.

### **Procedimiento**

#### a) *Proceso de precipitación:*

Pesar de 50-100 mg de muestra finamente molida y colocarla en un vaso de precipitado de 50 mL. Agregar 5 mL de agua caliente y agitar mecánicamente por 15 minutos, se agregan 2 mL de solución precipitante y se deja reposar 10 minutos; transferir cuantitativamente para su filtración en papel Whatman #50, utilizando 25 mL de agua destilada caliente y ligera succión.

#### b) *Proceso de digestión:*

Colocar el papel filtro con el precipitado en un tubo de digestión, al cual se le agregan 0.5 g de  $K_2SO_4$ , y 5 mL de mezcla digestiva; se coloca en el digestor y se calienta aproximadamente 15 minutos, se retira del digestor y se espera a que se enfríe para añadirle 3 mL de  $H_2O_2$  al 30%, se introduce nuevamente al digestor y se calienta hasta que la digestión sea completa (temperatura de digestión de  $370^\circ C$ ).

#### c) *Destilación y titulación:*

Una vez efectuada la digestión se deja enfriar el tubo digestor y se procede a la destilación en el microdestilador, el cual debe estar previamente en proceso de generación de vapor (caliente). El equipo se enjuaga con un tubo blanco lleno con agua y se calibra con dos tubos de dextrosa, una vez listo, se le adiciona a cada tubo 10 mL de agua destilada, se coloca el tubo, se cierra la puerta de seguridad y se da inicio a la destilación y a la titulación; la destilación se lleva a cabo en el equipo con NaOH al 60% y la titulación con HCl 0.01N. Finalmente el amoníaco atrapado en el ácido bórico se titula con HCl 0.01N, hasta un vire de color verde esmeralda a un rosa claro.

### **Cálculos**

Para realizar los cálculos es conveniente correr un blanco, en donde se sustituye la muestra por el equivalente en peso de glucosa o sacarosa; trabajándose de la misma forma.

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

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

Dónde:

P: mL de la titulación de la muestra  
B: mL de la titulación del blanco  
N: normalidad de la solución de HCl

meq: mili equivalentes de nitrógeno (0.014)  
m: peso de la muestra en g  
F: factor de conversión general (6.25)

#### 4.4 Digestibilidad *in vitro* [36]

Se fundamenta en que, al llevarse a cabo la digestión de las proteínas por proteólisis, se libera al medio  $H^+$  (por la ruptura del enlace peptídico), disminuyendo así el pH. Asumiendo una correlación entre la liberación de  $H^+$  y la digestibilidad de la proteína, ésta última puede evaluarse por el registro de la disminución del pH, mientras más bajo sea el pH más digerible será la proteína. La AOAC describe un método que utiliza un sistema multienzimático de las siguientes enzimas proteolíticas: tripsina, quimotripsina, peptidasa y proteasa bacteriana, sin embargo, la peptidasa (SIGMA-7500) se ha descontinuado del mercado por lo que se ha sustituido por pepsina gástrica de porcino (SIGMA P-7000). Se mide el pH al final del experimento y se determina el % de digestibilidad con el dato proporcionado por el potenciómetro.

##### **Material y reactivos**

- Baños de recirculación a 37°C y 55°C de agua con agitación LAB-LINE INSTRUMENT conectados por mangueras.
- Potenciómetro.
- Tripsina pancreática de porcino (SIGMA T-0134)
- $\alpha$ -Quimotripsina bovina (SIGMA C-4129)
- Pepsina gástrica de porcino (SIGMA P-7000)
- Proteasa bacteriana (SIGMA-P5147)

Solución A: disolver 227040 BAEE unidades de Tripsina (SIGMA T-0134) **(1)**, 1860 BAEE unidades de  $\alpha$ -quimotripsina (SIGMA C-4129) **(2)**, 2321 unidades de pepsina gástrica de porcino (SIGMA P-7000) **(3)**, en 10 mL de agua.

Solución B: disolver 65 unidades de caseína de proteasa bacteriana (SIGMA-P5147) **(4)** en 10 mL de agua.

Donde BAEE es el sustrato N- $\alpha$ -benzoil-L-arginina etil éster.

- 1) Una unidad de tripsina produce un  $\Delta A_{253}$  de 0.001 por minuto a pH 7.6 a 25°C, usando BAEE como sustrato. Contiene 16700 BAEE unidades por mg de proteína. Por lo tanto para disolver 227040 BAEE unidades de tripsina, se requiere:

$$\frac{(1 \text{ mg de tripsina} \times 227040 \text{ unidades BAEE})}{16700 \text{ unidades BAEE}} = 13.59 \text{ mg de tripsina}$$

- 2) Una unidad de  $\alpha$ -quimotripsina hidroliza 1  $\mu\text{mol}$  de BTEE (N-benzoil-L-Tirosina etil éster) por minuto a pH 7.8 a 25°C. Contiene 54 BAEE unidades por mg de  $\alpha$ -quimotripsina. Por lo tanto, para disolver 1860 BAEE unidades de  $\alpha$ -quimotripsina, se requiere:

$$\frac{(1 \text{ mg } \alpha\text{-quimotripsina} \times 1860 \text{ unidades BAEE})}{54 \text{ unidades BAEE}} = 34.44 \text{ mg quimotripsina}$$

- 3) Una unidad de pepsina libera 1.0  $\mu\text{mol}$  de  $\beta$ -naftilamina de L-Leucina- $\beta$ -naftilamina por minuto a pH 7.1 a 37°C. Contiene 456 unidades por mg de pepsina. Por lo tanto para disolver 2.32 unidades de pepsina L-Leucina- $\beta$ -naftilamina, se requiere:

$$\frac{(1 \text{ mg pepsina} \times 2321 \text{ unidades})}{456 \text{ unidades}} = 5.09 \text{ mg pepsina}$$

- 4) Una unidad de proteasa hidroliza para producir color equivalente a 1.0  $\mu\text{mol}$  de tirosina por minuto a pH 7.5 a 37°C. Por lo tanto para disolver 65 unidades de proteasa bacteriana, se requiere:

$$\frac{(1 \text{ mg proteasa} \times 65 \text{ unidades})}{5.5 \text{ unidades}} = 11.81 \text{ mg proteasa}$$

### **Procedimiento**

Se parte de 10 mg de nitrógeno de la proteína (caseína) o muestra según sea el caso, a la cual se le añaden 10 mL de agua destilada en agitación a una temperatura de 37°C durante 1h, a continuación se mide el pH el cual se ajusta a  $8.0 \pm 0.03$  con HCl o NaOH 0.1N según sea el caso. Inmediatamente se le adiciona 1.0 mL de solución A, la cual debe permanecer 10 minutos exactamente en agitación a una temperatura de 37°C, transcurrido el tiempo, se añade 1.0 mL de solución B, permaneciendo en agitación 9 minutos a una temperatura de 55°C. Al

término, se coloca la muestra a 37°C durante 1 minuto y a los 20 minutos exactos de haber adicionado la solución A, se mide el pH.

El pH para la caseína control o referencia deberá ser de 6.42±0.05 y sólo hasta que se obtiene este pH en la serie de referencia, se podrá realizar la determinación de las muestras a ensayar.

### **Cálculos**

El % de digestibilidad se obtiene al sustituir el pH en la siguiente formula:

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

## **4.5 Complementación bromatológica**

### **4.5.1 Determinación de calcio [39]**

Se fundamenta en la precipitación de este mineral como oxalato de calcio, su posterior disolución en ácido sulfúrico y su cuantificación indirecta como ácido oxálico.

#### **Material y reactivos**

- Balanza analítica Sartorius Analytic 022605
- Mufla Thermolyne
- Crisoles de porcelana
- Desecador
- Parrilla de agitación y calentamiento
- Papel filtro
- Filtros de vidrio
- HCl concentrado
- Sol. saturada de oxalato de amonio
- Indicador rojo de metilo
- Solución de hidróxido de amonio
- HCl 0.01N
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N
- KMnO<sub>4</sub> 0.1N

#### **Procedimiento**

Se calcinan 3 g de muestra a 550° C hasta obtener cenizas blancas. Se humedecen con 5 ml de HCl concentrado, evaporando hasta sequedad en parrilla eléctrica. Posteriormente, se humedece el residuo con 5 ml de HCl concentrado, adicionándose 25 mL de agua destilada, se calienta la mezcla hasta el inicio de ebullición y deja enfriar. En seguida, se procede a filtrar recibiendo la solución en un matraz aforado de 50 mL, se lava el vaso de precipitados para obtener los residuos y finalmente se afora el matraz (sol. "A").

Se transfirieren 25 mL de la solución "A" a un vaso de precipitados de 100

mL y se calienta hasta llegar a ebullición. A continuación, se adicionan 10 mL de solución saturada de oxalato de amonio y unas gotas de indicador rojo de metilo, para posteriormente añadir gota a gota una solución de hidróxido de amonio, hasta llegar al punto de neutralización (vire color amarillo). Inmediatamente, se coloca la solución a ebullición para precipitar el oxalato de calcio. Una vez fría la solución, se adiciona HCl 0.01 N hasta obtener una coloración rosa (pH 5), y se deja reposar durante toda la noche.

Al día siguiente, usando un filtro de vidrio poroso se procede a lavar la solución con 50 mL de agua destilada caliente, desechándose las aguas del filtrado. Después de lavar perfectamente el matraz Kitasato, se procede a realizar la filtración mediante lavados con 50 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> caliente (1 N) hasta llevar a un volumen de 100 mL, para inmediatamente realizar la titulación a una temperatura de 80° C, utilizando una solución de KMnO<sub>4</sub> 0.1 N hasta obtener una coloración rosa permanente.

### **Cálculos**

Para determinar el contenido de calcio presente en las muestras, se utiliza la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Ca} = \frac{(\text{mL KMnO}_4)(2 \text{ mg Ca})(A)}{(1\text{mLKMnO}_4)(B)(1000)(w)} \times 100$$

Dónde:

mL KMnO<sub>4</sub> 0.1 N= mililitros de permanganato de potasio gastados en la titulación

(1 mL de KMnO<sub>4</sub> 0.1 N equivale a 2 mg de Ca)

A = aforo correspondiente a 50 mL

B = alícuota de 25 mL

w = peso de la muestra en gramos

### **4.5.2 Determinación de hierro [36]**

Se fundamenta en la formación de un complejo de color rojo entre la ortofenantrolina y el Fe<sup>2+</sup>, que absorbe notablemente en las regiones del espectro visible a una longitud de onda de 530 nm.

#### **Material y reactivos**

- Crisoles de porcelana
- Desecador
- Solución de ortofenantrolina **(1)**
- Solución de clorhidrato de

- Parrilla de calentamiento
  - Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 mL
  - Matraz aforado de 50 mL
  - Embudo de tallo corto
  - Pinzas para crisol
  - Mufla Thermolyne
  - Espectrofotómetro Thermo Scientific
- hidroxilamina **(2)**
  - Buffer de acetatos **(3)**
  - Estándar de hierro **(4)**
  - HCl concentrado

- 1) Solución de ortofenantrolina: disolver 0.1 g de ortofenantrolina en 80 mL de agua destilada a 80°C, enfriar y aforar a 100 mL con agua.
- 2) Solución de clorohidrato de hidroxilamina: disolver 10 g de la sal en agua destilada y llevar a un volumen de 100 mL.
- 3) Buffer de acetatos: disolver 8.3 g de acetato de sodio anhidro, adicionar 12 mL de ácido acético y aforar a 100 mL con agua destilada.
- 4) Estándar de hierro (0.01 mg/ml): disolver 3.512 g de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (sulfato ferroso amoniacal, P.M. 392.14 g) en agua, adicionando previamente unas gotas de HCl y aforar a 500 mL. Se toman 10 mL de dicha solución y se aforan a 1000 mL con agua destilada.

### **Procedimiento**

#### a) *Preparación de la curva estándar:*

Tomar 0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 y 6.0 mL de la solución estándar de hierro, ajustar cada uno de los tubos a 10 mL con agua destilada y añadir en el siguiente orden: 1 mL de clorohidrato de hidroxilamina, agitar; 5 mL de buffer de acetatos, agitar y 1 mL de ortofenantrolina, agitar. Dejar en reposo entre 10 y 15 minutos. Leer a 530nm, usando el tubo cero como blanco.

#### b) *Preparación de la muestra:*

Se pesan por triplicado 3.5 g de muestra en un crisol y se obtienen las cenizas quemando primero con mechero y posteriormente calcinando en mufla a 550°C durante tres horas. Al crisol frío añadir con pipeta y en la campana 2 mL de HCl concentrado para disolver las cenizas. Evaporar en la campana, enfriar y añadir 1 mL de HCl concentrado y 3.5 mL de agua destilada, con un agitador de

vidrio tratar de disolver las cenizas en su totalidad. Pasar cuantitativamente el líquido a un matraz aforado de 50 mL, volver a lavar el crisol con agua dos o tres veces más, pasando los líquidos de lavado al matraz y después aforar. Filtrar y del filtrado tomar tres alícuotas de 10 mL. Desarrollar color de la misma forma que se hizo para la curva estándar. Si el color desarrollado es muy intenso, usar alícuotas de 5 mL de agua cuantas veces sea necesario y desarrollar color nuevamente.

### **Cálculos**

Se elabora la curva estándar de la solución de hierro graficando ABS (y) vs concentración de hierro en mg (x). A partir de la ecuación de la recta de la curva estándar y la lectura de absorbancia de la muestra problema es posible conocer la concentración de hierro (en mg) de la muestra problema con la siguiente ecuación:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

Dónde:

x: concentración de hierro en mg

y: ABS de la muestra problema

m: pendiente de la ecuación de la curva estándar

b: ordenada al origen de la ecuación de la curva estándar

Con la concentración de hierro expresada en mg de la muestra problema, se puede conocer el % de hierro con la siguiente formula:

$$C = \frac{(x)(A)(100)}{(a)(p)}$$

Dónde:

x: concentración de hierro en mg

C: mg de hierro / 100 g muestra

A: aforo del matraz (50 mL)

a: alícuota tomada del matraz (10 mL)

p: peso de la muestra en g

### **4.5.3 Determinación de vitamina C [36]**

Se fundamenta en la reducción del 2,6-diclorofenol-indofenol (compuesto pigmentado) a una forma incolora por la presencia de vitamina C. El ácido ascórbico se transforma en ácido deshidroascórbico; por lo cual la determinación de este reactivo es una valoración volumétrica de óxido-reducción.

### **Material y reactivos**

- Balanza analítica Sartorius Analytic 022605
- Papel filtro de poro grueso
- Pipetas volumétricas
- Bureta
- Matraz Erlenmeyer
- Solución de ácido acético al 5%
- Solución estándar de vitamina C **(1)**
- Solución de diclorofenol-indofenol **(2)**
- Bicarbonato de sodio

- 1) Solución estándar de vitamina C: pesar con exactitud 100 mg de ácido ascórbico anhidro y colocarlo en un matraz volumétrico de 100 ml y llevar al volumen con ácido acético al 5%. La concentración de la vitamina C es de 1 mg/ml.
- 2) Solución de diclorofenol-indofenol: pesar 100 mg de 2,6-diclorofenol-indofenol y 50 mg de bicarbonato de sodio, disolverlos y llevar con agua destilada a 1000 mL, valorar esta solución, colocando 1 mL de solución estándar de vitamina C con 9 mL de ácido acético al 5 % en un matraz Erlenmeyer y titular con la solución colorante hasta que persista el color rosado por lo menos durante 10 segundos. La cantidad consumida en mililitros se considera como el título que equivale a 1 mg de vitamina C.

### **Procedimiento**

Pesar de 5 a 10 gramos de la muestra problema, inmediatamente homogenizar con 50 mL de ácido acético al 5% con el fin de inactivar a la ascorbato oxidasa endógena. Llevar a 100 mL con agua destilada, dejar que sedimente el material insoluble. Para eliminar la mayor cantidad de material insoluble del sobrenadante, filtrar a través de papel filtro de poro grueso y obtener alícuotas de 10 mL para la valoración de vitamina C.

Colocar cada alícuota en un matraz Erlenmeyer, titular con la solución valorada de diclorofenol-indofenol, hasta que persista el color rosado por lo menos 10 segundos.

### **Cálculos**

1 mL de la solución estándar de vitamina C llevado a 10 mL con ácido acético al 5%, se valora con la solución de diclorofenol-indofenol. La cantidad

consumida en mililitros se considera como el título que equivale a 1 mg de vitamina C; es decir, si se gastan 20 mL de la solución de diclorofenol-indofenol, entonces 20 mL = 1 mg de vitamina C.

De acuerdo al volumen gastado de la solución de diclorofenol-indofenol en la titulación de la muestra problema y tomando en cuenta la alícuota, el aforo y el peso de la muestra, su puede calcular el % de vitamina C de acuerdo a la siguiente formula:

$$\% \text{ vitamina C} = \frac{T \times 1 \text{mg de vitamina C} \times A \times 100}{V \times Y \times W}$$

Dónde:

T = Volumen de titulación de la muestra problema

A = Aforo del extracto de la muestra problema (100 mL)

V = Volumen gastado de la solución de diclorofenol-indofenol en la valoración de la solución estándar de vitamina C (20 mL)

Y = Alícuota tomada del extracto de la muestra problema (10 mL)

W = Peso de la muestra problema en g

#### 4.5.4 Densidad calórica [34]

La densidad calórica, también denominada densidad energética de un alimento o dieta, es la cantidad de energía en términos de kilocalorías que proporciona un gramo de alimento o dieta. Para obtener el contenido calórico, se somete una fracción de la muestra a combustión total, dentro de un recipiente cerrado y en presencia de un exceso de oxígeno que asegure una completa combustión. En el caso específico de la bomba calorimétrica, la elevación de la temperatura por efecto de la combustión, es detectado por un termopar, el cual a su vez está acoplado a un galvanómetro de alta sensibilidad, produciéndose una diflexión que se traduce en una lectura, la cual al interpolar en una curva de calibración previamente establecida de un material de densidad energética conocida, proporcionara su valor calórico. El anterior dispositivo pertenece al grupo de calorímetros, denominado calorímetro de medición de un incremento de temperatura temporal.

##### **Material y reactivos**

- Acido benzoico (Patrón de referencia cuyo valor calórico está certificado)
- Desecador de vidrio

- Balanza analítica (SARTORIOS ANALITYC)
- Estufa de secado a presión reducida (BLUE M)
- Mecha de algodón de 75 mm de largo
- Crisol de acero inoxidable de 25.4 mm de diámetro
- Mango metálico compactador
- Bomba calorimétrica balística GALLENKAMP

### ***Procedimiento***

#### *a) Tratamiento de la muestra:*

Las muestras deben ser homogéneas, por lo que antes de realizar el pesado se colocó una pequeña cantidad en un mortero y se homogeneizó. El peso de las muestras para cada dieta fue de 500 mg, se colocaron en un crisol metálico a peso constante junto con la mecha de algodón quedando una parte de esta fuera, para después realizar la ignición de las mismas, el peso registrado correspondería a un peso preliminar. La compactación de las muestras se realizó con el mango para que las muestras quedaran uniformes, con un extremo de mecha dentro de éstas, por lo cual se realizó un segundo pesado para así obtener el peso final.

#### *b) Ignición de muestras:*

Después de esto se efectuó la ignición de cada muestra esto con ayuda de la bomba calorimétrica, colocando cada crisol de uno en uno en la base superior del pilar central de la bomba, se introdujo la punta libre de la mecha en el alambre de ignición, se cerró el cartucho con el capuchón de tal forma que el cierre fuese hermético, colocando el sensor del termopar en el orificio del capuchón. La presión en la bomba debe ser de 25 bars de 20 a 30 segundos, por lo cual se utilizó un cilindro de oxígeno; alcanzada esta presión se cerró la válvula de paso y se ajustó el indicador del galvanómetro a cero, se deben de mantener las condiciones por 10 segundos para poder oprimir el botón de ignición y comenzar la combustión que da la lectura máxima alrededor de 3 minutos, registrada en el galvanómetro. Se desconectó el sensor, se liberaron los gases y se quitó el capuchón para atemperar con hielo para seguir con la determinación. Esto se realizó para cada muestra y por triplicado.

## **Cálculos**

Se utilizó una curva de calibración de ácido benzoico experimental, a partir de las lecturas obtenidas para la combustión del ácido benzoico, en donde se convirtieron los gramos de ácido a kJ y kcal, con los datos se traza la curva de calibración del contenido calórico en kJ (x) vs lectura (y), se interpola la densidad calórica de cada muestra.

En donde:

$$1 \text{ g de ácido benzoico} = 26454.3 \text{ J} = 26.45 \text{ kJ}$$

$$4.1868 \text{ kJ} = 1 \text{ kcal}$$

A partir de la ecuación de la recta de la curva de calibración y de las lecturas obtenidas en la combustión de la muestra la muestra problema, es posible conocer el contenido calórico (kJ) de la muestra problema con la siguiente ecuación:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

Dónde:

x: contenido calórico de la muestra problema en kJ

y: lectura de la combustión de la muestra problema

m: pendiente de la ecuación de la curva de calibración

b: ordenada al origen de la ecuación de la curva de calibración

Con el contenido calórico de la muestra problema expresado en kJ, se puede conocer el contenido calórico (kJ) en 100 g de muestra con la siguiente formula:

$$C = \frac{x (100)}{W}$$

Dónde:

C = contenido calórico en 100 g de muestra problema

x = contenido calórico de la muestra problema en kJ

W = peso de la muestra en g

## 4.6 Agentes tóxicos y factores antinutricionales

### 4.6.1 Determinación de inhibidores de tripsina [41]

La técnica de Kakade se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso de la muestra sobre una solución estándar de tripsina. El extracto directo o diluido se pone en contacto con una solución estandarizada de tripsina, y después de cierto tiempo se determina la actividad proteolítica remanente, por medio de un sustrato sintético (BAPNA), el cual produce una coloración que se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm. Dicha coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores en la muestra.

#### **Material y reactivos**

- Potenciómetro
- Parrilla de agitación magnética Corning Sttrrer Multiple position
- Baño de agua a 37°C Grant Mod. 67530
- Espectrofotómetro Thermo Scientific
- Mezclador de tubos Lab-Line
- NaOH 0.01N
- HCl 0.001N
- Ácido acético al 30%
- Solución amortiguadora Tris (hidroximetil-amino-metano) pH 8.2, 0.05M **(1)**
- Solución estándar de tripsina bovina (Sigma T-8253) **(2)**
- Solución de BAPNA (benzoi-DL-arginina-p-nitroanilida-HCl)(Sigma B-4875) **(3)**
- Dimetilsulfóxido

- 1) Solución amortiguadora Tris: se pesan 1.51g de Tris y 0.73g de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), se disuelven en 200 mL de agua destilada, se ajusta el pH a 8.2 y se afora a un volumen de 250 mL.
- 2) Solución estándar de tripsina bovina: se pesan 4 mg de tripsina bovina y se disuelven en 200 mL de HCl 0.001N.
- 3) Solución de BAPNA: 100g de BAPNA se disuelven en 2.5 mL de dimetilsulfóxido y se diluye en 250 mL de amortiguador Tris previamente calentado a 37°C.

## ***Procedimiento***

### *a) Preparación del extracto:*

Se pesa aproximadamente 1 g de la muestra molida y desengrasada (<5% grasa) en un vaso de precipitado y se adicionan 45 mL de NaOH 0.01N, posteriormente se ajusta el pH a  $9.6 \pm 0.2$  y se afora con NaOH 0.01N a 50 mL. Se trasvasa a un vaso que contenga un magneto para agitar la suspensión por espacio de 2:30 hrs. a 300 r.p.m. Después de dicho tiempo se detiene la agitación, se deja reposar por 30 minutos. Por decantación se obtiene el sobrenadante desechando el residuo insoluble. El sobrenadante debe ser diluido hasta el punto que 1.0 mL de extracto produzca una inhibición de 40-60%; este requisito es indispensable para reducir la desviación estándar relativa.

### *b) Determinación de la actividad:*

Porciones de 0.0, 0.6, 1.0, 1.4 y 1.8 mL de extracto directo o diluido son pipeteados a tubos de ensayo por duplicado (2 series de 5 tubos) ajustando el volumen a 2.0 mL con agua destilada. Se introducen a un baño de agua a 37°C. A una serie de 5 tubos se les adiciona 2.0 mL de solución estándar de tripsina (previamente atemperada a 37°C) a cada tubo, se agita y se introduce al baño por espacio de 10 minutos. A continuación se adicionan 5.0 mL de solución BAPNA (previamente atemperada a 37°C), a cada tubo de la misma serie, se agita y se mantiene dicha mezcla de reacción por 10 minutos exactos (con cronómetro) en el baño de 37°C. La reacción enzimática se detiene por la adición de 1.0 mL de ácido acético al 30% agitándose inmediatamente.

La segunda serie de tubos llevan el mismo tratamiento, sólo que, en este caso los reactivos (estándar de tripsina, BAPNA y ácido acético al 30%) se adicionan sucesivamente, sin espacio de tiempo entre las adiciones y agitando inmediatamente terminada la adición del BAPNA; cada tubo de esta serie es el banco respectivo de la primera serie.

En caso de que se observe precipitación en los tubos de ambas series, es necesario filtrar en papel Whatman #1.

La lectura en el espectrofotómetro se realiza a 410 nm y cada tubo de la serie 2 es el blanco de la serie 1 en el orden respectivo.

### **Cálculos**

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

Debido a que se tiene una serie de alícuotas del extracto, se tendrían entonces una serie de valores de U.T., estos valores deben ser restados al valor de referencia (0.0 mL de extracto, 40 µg tripsina/100 mL) para así obtener el valor de unidades de tripsina inhibida (U.T.I.). Después calcular el valor de U.T.I./mL a partir del volumen de extracto utilizado para la serie (0.6, 1.0, 1.4 y 1.8 mL), calcular el promedio de U.T.I./mL. Finalmente la actividad de inhibidores de tripsina se expresa en términos de U.T.I./g de muestra, tomando en cuenta el volumen inicial de extracto, las diluciones realizadas y el peso de la muestra.

$$B \times F \times \left( \frac{50ml}{1000mg} \right) = U.T.I./mg \text{ de muestra}$$

Dónde:

B: valor promedio en U.T.I./ml

F: factor de dilución, cuando se trabaja con el extracto directo F=1

50 mL: del primer aforo realizado con NaOH 0.01N

1000mg: 1 g de muestra que se pesó para preparar el extracto.

#### **4.6.2 Determinación de taninos [40]**

Se basa en la extracción de taninos con dimetilformamida, seguida de una centrifugación y adición de citrato férrico amoniacal a una alícuota obtenida a partir del sobrenadante obtenido de la centrifugación, de éste modo se da lugar a la formación de un complejo colorido el cual puede leerse en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 525 nm. A su vez se emplea una curva de calibración utilizando un estándar de ácido tánico y de éste modo conocer el contenido de equivalentes de ácido tánico en la muestra.

#### **Material y reactivos**

- Parrilla de agitación magnética de 4 platos Thermolyne Mod. SP-13025
- Centrifuga Eppendorf 5702
- Solución patrón de ácido tánico 2g/L (Merck 773) **(1)**
- Solución de amoniaco 8g/L, como NH<sub>3</sub> **(2)**

- Tubos Falcon de 50 mL
- Magnetos
- Vortex Lab-Line Mod. 1290 super mixer
- Espectrofotómetro Sequioa-Turner Mod. 340
- Pipetas graduadas de 5 y 10 mL
- Tubos de ensayo de 140 x 14 mm
- Matraces aforados de 25 mL
- Baño de agua a 30°C
- Solución de dimetilformamida 75% v/v
- Solución de citrato férrico de amonio 3.5g/L **(3)**

- 1) Solución patrón de ácido tánico: se pesan 0.05g de ácido tánico y se llevan a un volumen final de 25 mL.
- 2) Solución de amoniaco: 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 50 mL.
- 3) Solución de citrato férrico amoniacal ( $C_6H_8O_7 \cdot xFe \cdot xNH_3$ ): se pesan 0.35 g de citrato férrico amoniacal y se disuelven en agua destilada llevándose a un volumen final de 100 mL. Ésta solución se prepara 24 horas antes de la determinación.

### ***Procedimiento***

#### *a) Preparación de la curva patrón de ácido tánico*

En 6 matraces aforados de 25 mL se colocan respectivamente: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 mL de la solución estándar de ácido tánico (2g/L) y se afora cada uno de los matraces con solución de dimetilformamida al 75%. De cada matraz aforado se toma 1 mL de la solución, se deposita en tubos de ensaye y se adicionan 5 mL de agua destilada, 1 mL de citrato férrico amoniacal, se agita durante unos segundos, después de agrega 1 mL de la solución de amoniaco, se agita y se deja reposar en un baño de agua a 30°C durante 15 minutos. Finalmente se mide la absorbancia a 525 en el espectrofotómetro, siendo el tubo con 0 mL de solución estándar de ácido tánico el blanco. Con los resultados obtenidos se construye una cuerva patrón de la absorbancia en función de la concentración (mg ácido tánico/ml).

b) *Extracción de la muestra:*

Se coloca aproximadamente 1 g de la muestra en un vaso de precipitado y se añaden 25 mL de dimetilformadida al 75%, se somete a agitación durante 1 hora, transcurrido el tiempo se traspasa el contenido a un tubo Falcon y se centrifuga por 10 minutos a 3000 r.p.m.

c) *Preparación del blanco:*

Se toma una alícuota de 1 mL del sobrenadante obtenido después de la centrifugación, se deposita en un tubo de ensaye, se agregan 6 mL de agua destilada y 1 mL de solución de amonio (8 g/L), se agita y se introduce a un baño de agua a 30°C durante 15 minutos.

d) *Preparación de la muestra para el desarrollo de color:*

Se toma una alícuota de 1 mL del sobrenadante obtenido después de la centrifugación, se deposita en un tubo de ensaye, se agregan 5 mL de agua destilada, 1 mL de la solución de citrato férrico amoniacal y 1 mL de la solución de amonio, se agita y se introduce a un baño de agua a 30°C durante 15 minutos. Finalmente se lee en el espectrofotómetro siendo el inciso anterior el blanco de la muestra.

**Cálculos**

Se elabora la curva patrón de ácido tánico, graficando la absorbancia ABS (y) vs concentración de ácido tánico (mg de ácido tánico / mL) (x). A partir de la ecuación de la recta de la curva patrón y la lectura de absorbancia de la muestra problema, es posible conocer la concentración de ácido tánico (en mg / mL) de la muestra problema con la siguiente ecuación:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

Dónde:

x: concentración de ácido tánico en mg / mL

y: ABS de la muestra problema

m: pendiente de la ecuación de la curva patrón

b: ordenada al origen de la ecuación de la curva patrón

Con la concentración de ácido tánico expresada en mg/mL de la muestra problema, se puede conocer el % de taninos con la siguiente formula:

$$C = \frac{(x)(A)(1g)(100)}{(a)(p)(1000mg)}$$

Dónde:

x: concentración de ácido tánico en mg/mL

C: g de taninos / 100 g muestra

A: volumen inicial del extracto (25 mL)

a: alícuota tomada del extracto (1 mL)

p: peso de la muestra en g

#### 4.6.3 Determinación de nitratos [14]

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 extremas, éste 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 una sal de nitrato químicamente pura (sodio, potasio).

##### *Material y reactivos*

- Embudos Buchner
- Matraces Kitasato
- Micropipetas de 50, 200 y 1000  $\mu$ L
- Bureta de 50 mL
- Tubos de centrifuga
- Parrilla de agitación magnética de 5 platos Thermolyne Mod. SP-13025
- Centrifuga Eppendorf 5702
- Baño de agua a 30°C
- Espectrofotómetro Sequioa-Turner Mod. 340
- Solución estándar de nitrato 10 mg/mL
- Solución de ácido salicílico al 5% (m/v) en ácido sulfúrico concentrado
- NaOH 2M
- Carbón activado

##### **Procedimiento**

###### a) *Preparación de la curva estándar:*

En un vaso de precipitados de 50 mL se adicionan 3 mL de la solución estándar de nitratos, 550 mg de carbón activado y 30 mL de agua; se mezclan hasta homogeneizar. Se filtra con ayuda de vacío sobre papel Whatman #41. El

filtrado de transfiere cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 mL, se afora con agua y posteriormente se traspasa a un tubo de centrifuga. Se centrifuga a 3000 r.p.m. por 1 hora. Se filtra el sobrenadante con ayuda de vacío sobre papel Whatman #542 y se homogeneiza; la concentración del sobrenadante es de 0.6 mg de  $\text{NO}_3^-/\text{mL}$ .

En 6 tubos de ensaye, correspondiente el número 1 al blanco de la curva, se adicionan 0, 10, 20, 50, 70 y 100  $\mu\text{g}$  de nitratos a partir de la solución patrón 0.6 mg de  $\text{NO}_3^- / \text{mL}$  (se hacen los cálculos correspondientes para obtener el volumen que contenga los  $\mu\text{g}$  de nitratos correspondientes). Se añade agua a cada tubo a fin de llevar a un volumen 0.1 mL y se agita. Posteriormente se adicionan 0.4 mL de la solución de ácido salicílico a cada tubo, se agita y se introduce en un baño de agua a 30°C durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo se adicionan lentamente con bureta 9.5 mL de solución de NaOH 2M, se agita y se introduce al baño nuevamente durante 15 minutos. Finalmente se transfiere a celdas de medición y se lee en el espectrofotómetro a 410 nm. Con lo resultados obtenidos se construye una gráfica de absorbancia vs concentración de nitrato, expresada en  $\mu\text{g}$  de nitrato.

b) *Preparación del extracto:*

En un vaso de precipitados de 50 mL se añaden de 0.25 a 0.9 g de muestra, 550 g de carbón activado y 30 mL de agua. Se agita moderadamente a 70 r.p.m. durante 15 minutos. Se filtra con ayuda de vacío sobre papel Whatman # 41, el filtrado se transfiere a un matraz volumétrico de 50 mL, se afora con agua y posteriormente se transfiere a un tubo de centrifuga de 50 mL. Se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 1 hora. Se filtra el sobrenadante con ayuda de vacío sobre papel Whatman #542 y se homogeneiza para proceder a la determinación.

c) *Desarrollo de color:*

Se rotulan 4 tubos de ensayo, correspondiente el número 1 al blanco de la muestra. Se adiciona una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de extracto a cada tubo. Se añaden 0.4 mL de solución de ácido salicílico, excepto al blanco, al cual se le adiciona 0.4 mL de ácido sulfúrico concentrado; se agitan los tubos y se introducen a un baño de agua a 30°C durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo, se adiciona con bureta

9.5 mL de NaOH 2M, se agita y se introduce nuevamente al baño durante 15 minutos. Se transfiere a celdas de medición y se lee en el espectrofotómetro a 410 nm.

### **Cálculos**

Se elabora la curva patrón de nitratos, graficando la absorbancia ABS (y) vs concentración de nitratos (en  $\mu\text{g}$ ) (x). A partir de la ecuación de la recta de la curva patrón y la lectura de absorbancia de la muestra problema, es posible conocer la concentración de nitratos (en  $\mu\text{g}$ ) de la muestra problema con la siguiente ecuación:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

Dónde:

x: concentración de nitratos en  $\mu\text{g}$

y: ABS de la muestra problema

m: pendiente de la ecuación de la curva patrón

b: ordenada al origen de la ecuación de la curva patrón

Con la concentración de nitratos expresada en  $\mu\text{g}$  de la muestra problema, se puede conocer el % de nitratos con la siguiente formula:

$$C = \frac{(x)(A)(1g)(100)}{(a)(p)(1000\mu g)}$$

Dónde:

x: concentración de nitratos en  $\mu\text{g}$

C: g de nitratos / 100 g muestra

A: volumen inicial del extracto (50 mL)

a: alícuota tomada del extracto (0.1 mL)

p: peso de la muestra en g

#### **4.6.4 Determinación de oxalatos [38]**

La determinación de oxalatos se basa en la extracción del ácido oxálico del material biológico en medio ácido por medio de calentamiento y agitación mecánica, posteriormente se precipita el oxalato como oxalato de calcio y se cuantifica por medio de una determinación permanganométrica en donde se realiza una titulación del ácido oxálico con una solución valorada de  $\text{KMnO}_4$  0.01N; donde el ácido oxálico se oxida hasta  $\text{CO}_2$ .

### **Material y reactivos**

- Matraz digestor de 600 ml Bercellius
- Digestor Labconco N0. 30001
- Tubos cónicos para centrifuga de 50 mL
- Centrifuga Eppendorf 5702
- Papel Whatman #30
- HCl 6N
- Reactivo de ácido tungstofosfórico **(1)**
- Buffer de acetatos **(2)**
- Líquido de lavado **(3)**
- $\text{KMnO}_4$  0.01N
- $\text{NH}_4\text{OH}$
- $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1 mL + 9 mL de agua)
- Antiespumante

- 1) Reactivo de ácido tungstofosfórico: disolver 2.5 g de  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en la mezcla de 4 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  y 50 mL de agua, aforar a 100 mL con agua destilada.
- 2) Buffer de acetatos pH=4.5: a) Disolver 2.5 g de  $\text{CaCl}_2$  (anhidro) en 50 mL de  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . b) Disolver 33 g de  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , diluir y aforar a 50 mL con agua destilada. El buffer de acetato se prepara mezclando ambas soluciones a y b. Se ajusta el pH.
- 3) Líquido de lavado: diluir 12.5 mL de ácido acético concentrado en 250 mL de agua destilada, añadir polvo de oxalato de calcio (se satura con una pequeña cantidad), mezclar y dejar reposar; repetir adición y mezclar hasta saturación. Conservar el líquido de lavado frío (refrigeración) y filtrar la cantidad necesaria antes de su uso.

### **Procedimiento**

Se pesan de 5 a 10 g de harina de la muestra, se coloca dentro de un vaso Bercellius graduado de 600 mL, se agregan 200 mL (en marca del vaso o con probeta) de agua destilada y se agita mecánicamente durante 15-20 minutos. Se lleva a 300 mL con agua destilada (en la marca de graduación del vaso) enjuagando las paredes, añadir 55 mL de HCl 6N, 2 gotas de antiespumante y se lleva a ebullición durante 15 minutos en el digestor para fibra cruda y transcurrido el tiempo se dejar enfriar. Se lleva a un aforo de 500 mL con agua destilada enjuagando las paredes del vaso, agitar y dejar reposar toda la noche. Se filtra a

través de papel Whatman #4 y se desechan los primero 100 mL (con la finalidad de acondicionar el sistema).

Se toma una alícuota de 25 mL del filtrado en un matraz Erlenmeyer de 50 mL, y se añaden 5 mL del reactivo del ácido tungstofosfórico, dejando reposar por un tiempo mínimo de 5 horas. Se filtra a través de papel Whatman # 40. Se toma una alícuota de 20 mL del filtrado y se depositan en un tubo cónico para centrifuga de 50 mL. Se añade hidróxido de amonio gota a gota con cuidado hasta alcanzar un pH de 4-4.5 utilizando un potenciómetro. Una vez logrado el pH, añadir 5 mL de la solución precipitante y amortiguadora de acetatos (buffer) y mezclar con una varilla de vidrio, enjuagarla con un pequeño chorro de agua destilada y dejar reposar toda la noche (dentro del tubo de centrifuga). Se centrifuga a 1700 r.p.m por 15 minutos para compactar el precipitado. Se decanta el sobrenadante con una inversión suave del tubo de centrifuga. Una vez obtenido el precipitado de oxalato de calcio sin sobrenadante, se lava con 20 mL del líquido de lavado frío, aplicándose en forma de un chorro fino rompiendo completamente todo el precipitado. Se repite la centrifugación y el drenado del líquido de lavado por completo. Se añaden 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 mL de ácido sulfúrico concentrado + 9 mL de agua) al precipitado y se disuelve. Homogeneizar en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, enjuagar el tubo con 20 mL de agua destilada y dos veces más con 5 mL de agua destilada a la vez.

Se calienta la muestra y el blanco (5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 mL + 9 mL de agua)) en una parrilla de calentamiento, con temperatura baja y agitación magnética. Se titulan las soluciones calientes (por lo menos 60°C) con KMnO<sub>4</sub> 0.01N hasta que persista una coloración rosa por 30 segundos.

### **Cálculos**

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

$$C = (V - mL\ blanco) \times N \times meq \times 30 \times 100$$

Donde:

C = mg de ácido oxálico

V = volumen de KMnO<sub>4</sub> de titulación

N = normalidad del KMnO<sub>4</sub>

meq: = 0.45 para ácido oxálico

Con el contenido de ácido oxálico expresado en mg de la muestra problema, el peso de la muestra y su contenido de humedad, se puede conocer el % de oxalatos con la siguiente fórmula:

$$P = \frac{C(100 - H)1g}{1000mg \times W}$$

Donde:

P = g de oxalatos / 100 g de muestra problema (%)

C = mg de ácido oxálico

H = % de humedad de la muestra problema

W = peso de la muestra problema en g

#### **4.6.5 Determinación de saponinas [31]**

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 la sangre de conejo.

El método de microtitulación es rápido y requiere de una mínima cantidad de muestra. Se necesita sensibilizar los glóbulos rojos lavados con una solución de tripsina, ya que la sensibilidad de los eritrocitos se mejora considerablemente con este tratamiento.

##### ***Material y métodos***

- Extractor de grasa Goldfish, Labconoco
- Cartuchos de celulosa Whatman 22x88 mm
- Rotavapor büchi, 461, modelo RE-111
- Centrifuga Eppendorf 5702
- Incubadora bacteriológica, Blue M.
- Espectrofotómetro
- Tubos de centrifuga de 15 mL con graduación
- Jeringa de 5 ó 10 mL #22
- Microtiter kit (Cook Eng-Alexander Virginia USA)
- Solución de metanol (RA) al 85% en agua.
- Sangre de conejo desfibrinada y lavada
- Solución anticoagulante **(1)**
- Solución salina al 0.9%
- Tripsina de páncreas de porcino al 0.1% (Sigma T-8128) **(2)**
- Solución estándar de saponinas al 0.5% en solución salina **(3)**
- Solución Alsever **(4)**

- 1) Solución anticoagulante: Cuando la sangre se va a trabajar inmediatamente se puede utilizar ya sea solución de heparina o citrato, las cuales se usan en la siguiente relación:

Solución heparina: 15-20 UI: 1 mL de sangre

Solución de citrato: 0.1 mL: 1 mL de sangre

Sin embargo cuando la sangre no se va a utilizar de inmediato, se puede guardar en refrigeración por unos días en la solución Alsever, en la siguiente proporción; 1:1.

- 2) Se usa tripsina de páncreas de porcino (Sigma T-8128) al 0.1% en solución salina al 0.9%, para el proceso de sensibilización.
- 3) El estándar de saponinas es una mezcla de digitonina (saponina tipo esteroidal) y un extracto de quillaza (saponina tipo triterpenoide), en la relación 1:1, es decir, 0.25 g de digitonina y 0.25 g de quillaza se disuelven en solución salina al 0.9% y se afora a 100 mL.
- 4) Solución Alsever: Consiste en glucosa 2.05 %, cloruro de sodio 0.42 %, citrato sódico 0.8 % y ácido cítrico 0.055 %, en agua destilada.

### ***Procedimiento***

- a) *Preparación del extracto:*

Una vez que se tiene la muestra molida y desengrasada (% de grasa < 5%), se pesan 7.5 g en un cartucho de celulosa, se coloca en el extractor Goldfish, la extracción se realiza a la máxima temperatura del aparato por 2 horas, con metanol al 85%. Una vez transcurrido el tiempo de extracción, el extracto se concentra a sequedad en un rotavapor a una temperatura aproximadamente de 65°C, la muestra seca se disuelve con solución salina al 0.9% y se filtra con ayuda de vacío para aforar a 100 mL con la misma solución. Si no se realiza la determinación de inmediato, el extracto se debe refrigerar o congelar para evitar contaminación.

- b) *Lavado de eritrocitos:*

Una vez que se sangró al animal se coloca la sangre en un matraz pequeño que contenga anticoagulante y se agita suavemente para la completa homogeneización (no interrumpir hasta el momento de diluirla). La sangre con

anticoagulante se trasvasa a tubos de centrifuga para lavarla 3 veces con solución salina al 0.9%. La relación sangre-solución es de aproximadamente 1:5. Se centrifuga a 1500 r.p.m. durante 10 minutos, entre cada lavado. Después del último lavado se mide en el tubo de centrifuga, la cantidad del paquete de eritrocitos y se diluyen al 4%, para lo cual se agregan por cada 1 mL de glóbulos rojos 24 mL de solución salina al 0.9%.

c) *Sensibilización de eritrocitos:*

A la suspensión al 4% de eritrocitos, se agregan por cada 10 mL de suspensión, 1 mL de la solución de tripsina al 0.1% en solución salina, se agita suavemente y se coloca el recipiente en una incubadora durante 1 hora a 37°C. Al término de éste tiempo, la suspensión de eritrocitos se distribuyó nuevamente en tubos graduados para centrifuga y se centrifuga a 1500 r.p.m. durante 10 minutos con el fin de eliminar la tripsina. Finalmente se someten los eritrocitos a 3 lavados con solución salina, de la misma manera mencionada en el lavado de la sangre. Después del último lavado, el paquete de eritrocitos fue llevado a una suspensión al 4 % con solución salina al 0.9%, para lo cual se considera que por cada 1 mL de eritrocitos se agregan 24 mL de solución salina.

d) *Ajuste de la suspensión de eritrocitos:*

Se toma 1 mL de la suspensión de eritrocitos y se agregan 4 mL de solución salina al 0.9 % en una celda de vidrio, se mide de inmediatamente el valor de la transmitancia en el espectrofotómetro a 620 nm utilizando un adaptador de celdas que permita el paso de 1 cm<sup>2</sup> de luz (se ajusta a 100% de transmitancia con la solución salina al 0.9%). El valor de % de transmitancia debe de estar en el rango de 24-29% para poder realizar la determinación.

e) *Microtitulación:*

En las placas tipo "U" se colocan, en cada pozo de cada hilera 50 µL de solución salina al 0.9% con una micropipeta multicanales (12 canales) (es necesario evitar tocar las paredes de los pozos). Posteriormente se llena el microdilutor con 50 µL del extracto y se procede a realizar 24 diluciones sucesivas en forma de culebra (ocupando 2 hileras), después se llena el microdilutor con 50 µL del extracto de referencia (estándar de saponinas) y se realizan 12 diluciones

sucesivas (ocupando 1 hilera), se maneja una hilera como control negativo, donde se colocan 50 µL de solución salina al 0.9%. Finalmente en cada pozo se colocan 50 µL de la suspensión de eritrocitos sensibilizada y ajustada, las placas se agitan de forma circular suavemente y se introducen a la incubadora a 37°C por 1 hora.

f) *Lectura de placas:*

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se coloca la placa en el dispositivo de lectura o a la luz, y se reporta la máxima dilución que presenta hemólisis, tomando como referencia a la hilera del control negativo y positivo.

**Cálculos**

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

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

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

Dónde:

t: título de la hemólisis

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

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

Por definición 1 µg del estándar de saponinas es equivalente a 10 unidades hemolíticas (U.H.).

El cálculo para la muestra es:

La concentración del extracto de la muestra para todos los casos es de 75 mg/mL, entonces, en 0.05 mL tenemos 3.7 mg; para cada título de hemólisis con valor de 1 se tiene la siguiente concentración:

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

Por definición se obtiene las unidades hemolíticas por mg de muestra:

$$10 \text{ U.H.} / 1.87 \text{ mg de muestra} = 5.3 \text{ U.H./mg de muestra}$$

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Análisis químico bromatológico, proteína verdadera, digestibilidad *in vitro*, calcio, hierro, vitamina C y densidad calórica

A continuación se presentan los resultados del análisis químico proximal, proteína verdadera, digestibilidad *in vitro*, calcio, hierro, vitamina C y densidad calórica de las diferentes cepas de hojas de moringa de cada región.

**Tabla 1.** Análisis proximal de las hojas de moringa provenientes de todas las regiones<sup>a</sup>

Localidad	Humedad (%)	Grasa cruda (%)	Fibra cruda (%)	Proteína cruda (%) <sup>b</sup>	Cenizas (%)	HC (%) <sup>c</sup>
Sinaloa	6.13 ± 0.12	5.34 ± 0.18	13.62 ± 0.64	20.08 ± 0.34	9.76 ± 0.06	45.07
Michoacán	6.16 ± 0.27	8.93 ± 0.14	12.85 ± 0.04	23.08 ± 0.14	10.92 ± 0.26	38.06
Campeche	8.01 ± 0.03	5.18 ± 0.04	8.74 ± 0.86	25.31 ± 0.21	9.32 ± 0.34	43.44
Cortijo, Oaxaca	4.85 ± 0.03	3.47 ± 0.05	9.70 ± 0.62	24.35 ± 0.69	9.22 ± 0.35	48.41
Puebla	6.84 ± 0.09	6.09 ± 0.07	5.91 ± 0.47	22.56 ± 0.25	8.68 ± 0.04	49.92
Guerrero	6.21 ± 0.03	5.50 ± 0.08	9.74 ± 0.74	24.29 ± 0.28	11.88 ± 0.51	42.38
Torreón	5.12 ± 0.01	5.52 ± 0.14	6.49 ± 0.57	24.84 ± 0.11	10.13 ± 0.39	47.9
Juchitán, Oaxaca	6.37 ± 0.02	4.12 ± 0.06	16.81 ± 0.57	19.69 ± 0.06	10.12 ± 0.32	40.89

a: Se presenta el valor promedio ± desviación estándar (n=3), CV < 5%

b: Determinado %N × 6.25

c: Hidratos de carbono, determinados por diferencia de acuerdo al esquema Weende

**Tabla 2.** Proteína verdadera, digestibilidad *in vitro*, calcio, hierro, vitamina C y densidad calórica de las hojas de moringa provenientes de todas las regiones<sup>a</sup>

Localidad	Proteína verdadera (%) <sup>b</sup>	Digestibilidad <i>in vitro</i> (%)	Calcio <sup>c</sup>	Hierro <sup>c</sup>	Vitamina C <sup>c</sup>	Densidad calórica <sup>d</sup>
Sinaloa	14.72 ± 0.41	70.38 ± 1.93	1791.85 ± 33.19	7.51 ± 0.04	34.86 ± 0.79	1732.86 ± 42.47
Michoacán	17.81 ± 0.34	78.05 ± 2.54	1655.52 ± 17.92	11.35 ± 0.14	86.78 ± 0.67	1775.11 ± 81.82
Campeche	15.96 ± 0.42	73.09 ± 1.58	1635.41 ± 18.64	12.82 ± 0.06	17.79 ± 0.70	1878.87 ± 57.27
Cortijo, Oaxaca	18.45 ± 0.14	76.15 ± 1.19	2174.07 ± 23.11	20.22 ± 0.08	109.62 ± 0.70	1862.78 ± 61.44
Puebla	17.38 ± 0.40	76.41 ± 1.42	2158.14 ± 33.20	9.87 ± 0.24	57.89 ± 0.56	2243.60 ± 16.46
Guerrero	15.91 ± 0.02	74.29 ± 0.57	2423.04 ± 33.20	4.33 ± 0.06	14.24 ± 0.56	1264.68 ± 51.49
Torreón	17.53 ± 0.28	76.92 ± 1.19	2635.74 ± 19.18	28.64 ± 0.04	49.17 ± 1.12	1652.38 ± 38.55
Juchitán, Oaxaca	15.91 ± 0.11	74.36 ± 0.57	2516.81 ± 38.41	9.91 ± 0.09	51.10 ± 0.56	1701.32 ± 79.40

a: Se presenta el valor promedio ± desviación estándar (n=3), CV < 5%

b: Determinado %N × 6.25

c: mg/100g muestra

d: KJ/100g muestra

En la siguiente tabla se presenta la composición química de algunas hojas de otros alimentos como son el Garbanzo, Soya, Trigo y Avena, con el fin de compararlas en cuanto a la composición de las hojas de moringa.

**Tabla 3. Composición bromatológica de hojas de algunos alimentos (55)**

Forraje	Garbanzo	Soya	Trigo	Avena
<b>Grasas (%)</b>	2.4	2.8	1.3	2.3
<b>Fibra (%)</b>	40.0	34.6	38.1	37.0
<b>Proteína total (%)</b>	22.05	8.5	3.8	5.2
<b>Cenizas (%)</b>	6.5	7.5	4.2	5.1
<b>Hidratos de carbono (%)</b>	25.0	41.1	43.4	42.4

A partir de las tablas 1-3, puede observarse que todas las muestras de moringa son superiores en el contenido de grasa cruda, cenizas e hidratos de carbono asimilables con respecto a otros forrajes. En el caso de la proteína cruda solo la moringa de Juchitán, Oaxaca y Sinaloa se encuentran por debajo del valor reportado para el forraje de garbanzo, sin embargo, esos valores son superiores al contenido de proteína de las pajas de trigo, soya y avena. En cuanto al contenido de fibra todas las muestras de moringa están por debajo de los valores reportados para los otros forrajes. Con respecto al contenido de grasa las hojas de moringa son superiores a la paja de avena, soya, garbanzo y trigo. Además, la moringa tiene más grasa que el forraje de alfalfa, chícharo de vaca y chícharo de árbol. [55]

El componente mayoritario determinado por diferencia en el análisis proximal fueron los hidratos de carbono seguido de la proteína cruda, posteriormente la fibra y las cenizas se encuentran en cantidades similares, finalmente la grasa cruda es el componente minoritario. Cabe señalar que sería recomendable emplear otras técnicas para cuantificar fibra dietética e hidratos de carbono asimilables, ya que para este último componente puede haber error al hacerlo por diferencia.

Con los resultados obtenidos de la prueba de digestibilidad *in vitro* y los parámetros químicos del material biológico evaluado, se realizó el análisis estadístico con el apoyo del paquete de computación en estadística STATGRAPHICS versión 5.0. y consistió en el análisis de varianza acoplado a la prueba de Duncan, para discriminar si hay diferencia significativa estadísticamente

en cada variable por analizar, de acuerdo a la procedencia de las hojas de moringa. [19]

A continuación se muestran los resultados del análisis estadístico para cada parámetro (humedad, grasa, fibra, proteína, cenizas, proteína verdadera, digestibilidad *in vitro*, vitamina C, hierro y calcio), de acuerdo a la procedencia de las hojas de moringa.

**Tabla 4.** Resultados del Análisis de varianza y prueba de Duncan para el contenido de humedad <sup>a</sup>

Localidad	% Humedad
Cortijo, Oaxaca	4.85 <sup>a</sup>
Torreón	5.12 <sup>b</sup>
Sinaloa	6.13 <sup>c</sup>
Zitácuaro, Michoacán	6.16 <sup>c</sup>
Amuco de la R., Guerrero	6.21 <sup>c d</sup>
Juchitán, Oaxaca	6.37 <sup>d</sup>
Chilac, Puebla	6.84 <sup>e</sup>
Escárcega, Campeche	8.01 <sup>f</sup>

a: Se presenta el valor promedio (n=3), CV < 5%  
Diferentes letras dentro de la columna indican diferencia estadísticamente significativa.

Un contenido de agua por arriba del 15% no es recomendable, ya que se favorece el desarrollo de microorganismos, razón por la que es importante que el porcentaje de humedad en las hojas de moringa sea bajo para que en condiciones de almacenamiento o transporte no se favorezca el crecimiento de microorganismos. Todas las muestras de hojas con que se trabajó ya habían recibido un tratamiento térmico por parte de los productores, pero se desconoce en qué condiciones fueron secadas; sin embargo, ninguna de ellas con base en su contenido de agua tendría problemas de almacenamiento.

Con la información de la tabla 4, se puede apreciar que en general la humedad de las hojas es baja, la moringa de Campeche tiene el mayor contenido de humedad, mientras que la moringa de Cortijo Oaxaca presentó el menor contenido de humedad. Estadísticamente no hay diferencia significativa en el contenido de humedad de las hojas de moringa de Sinaloa, Michoacán y Guerrero; tampoco hay diferencia significativa entre esta última y la moringa Juchitán, Oaxaca.

No se puede analizar con más detalle este parámetro ya que se desconoce que tipo de tratamiento térmico y a que condiciones fueron secadas las hojas de moringa.

**Tabla 5.** Resultados del Análisis de varianza y prueba de Duncan para el contenido de grasa<sup>a</sup>

Localidad	% Grasa cruda
Cortijo, Oaxaca	3.47 <sup>a</sup>
Juchitán, Oaxaca	4.12 <sup>b</sup>
Escárcega, Campeche	5.18 <sup>c</sup>
Sinaloa	5.34 <sup>c-d</sup>
Amuco de la R., Guerrero	5.50 <sup>d</sup>
Torreón	5.52 <sup>d</sup>
Chilac, Puebla	6.09 <sup>e</sup>
Zitácuaro, Michoacán	8.93 <sup>f</sup>

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

Diferentes letras dentro de la columna indican diferencia estadísticamente significativa

Con la información de la tabla 5, se puede apreciar que hay una mayor variación en el contenido de grasa cruda, pues se tienen valores desde 3.47% para la moringa de Cortijo Oaxaca hasta 8.93% para la moringa de Zitácuaro, Michoacán; esto puede ser una consecuencia del estado fisiológico de la planta, es decir, su estado de maduración, que también es desconocido.

Entre la moringa de Escárcega, Campeche y Sinaloa no se encontró diferencia estadísticamente significativa; tampoco hay diferencia significativa de esta última con la moringa de Guerrero y Torreón.

Para conocer más sobre la composición de la grasa de la moringa es necesario seguir caracterizándola, principalmente conocer qué tipo de ácidos grasos están presentes desde el punto de vista nutricional; sin embargo, es interesante el contenido de este componente en la muestra proveniente de Michoacán (>8%), ya que de entrada aportaría un apreciable contenido energético.

**Tabla 6.** Resultados del Análisis de varianza y prueba de Duncan para el contenido de fibra cruda <sup>a</sup>

Localidad	% Fibra cruda
Chilac, Puebla	5.91 <sup>a</sup>
Torreón	6.49 <sup>a</sup>
Escárcega, Campeche	8.74 <sup>b</sup>
Cortijo, Oaxaca	9.70 <sup>b</sup>
Amuco de la R., Guerrero	9.74 <sup>b</sup>
Zitácuaro, Michoacán	12.85 <sup>c</sup>
Sinaloa	13.62 <sup>c</sup>
Juchitán, Oaxaca	16.81 <sup>d</sup>

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

Diferentes letras dentro de la columna indican diferencia estadísticamente significativa

En cuanto al contenido de fibra cruda puede apreciarse en la tabla 6, que también hay una variación entre las hojas de moringa, esto se debe en parte a la fisiología de planta y además que entre algunas muestras proporcionadas había partes fibrosas como ramas.

Nutritionalmente se sabe que la fibra debe ser parte de la dieta en cantidades moderadas debido a ciertos beneficios que ocasiona su consumo, sin embargo, se sabe que en exceso puede interferir en la digestión de las proteínas y algunos nutrientes inorgánicos, siendo alterado su aprovechamiento. Así que para poder apreciar la planta de moringa desde el punto de vista nutricional es necesario conocer su cantidad de proteína y su cantidad de fibra. En el caso de la moringa con alto contenido de fibra sería necesario seguir caracterizándola para poder destinarle un uso en específico. Además hay que recordar que la técnica para cuantificar fibra cruda generalmente subestima el contenido real, por lo que es importante conocer el contenido de fibra dietética.

Con respecto al contenido de fibra no hay diferencia estadísticamente significativa entre la moringa de Puebla y Torreón; no hay diferencia estadísticamente significativa entre la moringa de Campeche, Cortijo Oaxaca y Guerrero; así como tampoco hay diferencia significativa entre la moringa de Sinaloa y Michoacán. Esta variación puede ser una consecuencia del estado de maduración de la planta y las condiciones del suelo donde fue plantada.

No obstante, se puede observar un amplio rango de este componente en las diferentes hojas de moringa (de 5.91 a 16.81%), lo que podría ser destinado para una cierta funcionalidad, de acuerdo al contenido de fibra.

**Tabla 7.** Resultados del Análisis de varianza y prueba de Duncan para el contenido de proteína cruda <sup>a</sup>

Localidad	% Proteína cruda
Juchitán, Oaxaca	19.69 <sup>a</sup>
Sinaloa	20.08 <sup>a</sup>
Chilac, Puebla	22.56 <sup>b</sup>
Zitácuaro, Michoacán	23.08 <sup>b</sup>
Amuco de la R., Guerrero	24.29 <sup>c</sup>
Cortijo, Oaxaca	24.35 <sup>c d</sup>
Torreón	24.84 <sup>d e</sup>
Escárcega, Campeche	25.31 <sup>e</sup>

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

Diferentes letras dentro de la columna indican diferencia estadísticamente significativa

Después de los hidratos de carbono, la proteína cruda, es el componente de mayor contenido en las hojas de moringa. Desde el punto de vista nutricional el contenido de proteína es muy importante ya que la desnutrición en un sector importante de nuestra población se asocia con una deficiencia energético-proteínica principalmente en niños de zonas marginadas, por lo que no basta saber la cantidad de proteína que contiene la moringa, sino también conocer la calidad de esta, es decir, qué aminoácidos indispensables están presentes dentro de esta proteína y en qué cantidad. En resultados posteriores, se analizará el contenido de proteína verdadera y digestibilidad *in vitro*.

Comparando el contenido de proteína de otros forrajes que se representan en la tabla 9 se puede observar que la moringa es superior en cantidad con respecto al forraje de soya, trigo y avena, en el caso del forraje del garbanzo la moringa de Michoacán, Guerrero, Cortija Oaxaca, Torreón y Campeche son superiores en contenido de proteína.

En general el contenido de proteína cruda no es muy variable entre las diferentes hojas, así pues, se ve que entre la moringa de Juchitán Oaxaca y Sinaloa no hay diferencia estadísticamente significativa; tampoco entre la moringa de Puebla y Michoacán, Guerrero y Cortijo Oaxaca y Torreón, y finalmente tampoco hay diferencia entre la moringa de Torreón y Campeche.

**Tabla 8. Resultados del Análisis de varianza y prueba de Duncan para el contenido de cenizas <sup>a</sup>**

Localidad	% Cenizas
Chilac, Puebla	8.68 <sup>a</sup>
Cortijo, Oaxaca	9.22 <sup>a b</sup>
Escárcega, Campeche	9.32 <sup>b</sup>
Sinaloa	9.76 <sup>b c</sup>
Juchitán, Oaxaca	10.12 <sup>c</sup>
Torreón	10.13 <sup>c</sup>
Zitácuaro, Michoacán	10.92 <sup>d</sup>
Amuco de la R., Guerrero	11.88 <sup>e</sup>

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

Diferentes letras dentro de la columna indican diferencia estadísticamente significativa

La cantidad de cenizas es mayor en las hojas de moringa en comparación con otros forrajes presentados en la tabla 3. Se encontró en la bibliografía que las hojas de moringa contienen cantidades importantes de potasio, calcio, magnesio, sodio, azufre, fósforo y hierro. Por lo tanto se esperaba que el valor de las cenizas fuera alto.

Se puede observar que entre el contenido de cenizas de la moringa de Puebla y Cortijo Oaxaca no hay diferencia estadísticamente significativa; tampoco hay diferencia significativa entre la moringa de Cortijo Oaxaca, Campeche y Sinaloa; así como entre la moringa de Sinaloa, Juchitán Oaxaca y Torreón, tampoco existe diferencia significativa.

**Tabla 9. Resultados del Análisis de varianza y prueba de Duncan para el contenido de proteína verdadera <sup>a</sup>**

Localidad	% Proteína verdadera
Sinaloa	14.72 <sup>a</sup>
Juchitán, Oaxaca	15.91 <sup>b</sup>
Amuco de la R., Guerrero	15.91 <sup>b</sup>
Escárcega, Campeche	15.96 <sup>b</sup>
Chilac, Puebla	17.38 <sup>c</sup>
Torreón	17.53 <sup>c</sup>
Zitácuaro, Michoacán	17.81 <sup>c</sup>
Cortijo, Oaxaca	18.45 <sup>c</sup>

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

Diferentes letras dentro de la columna indican diferencia estadísticamente significativa

Algo interesante es que el contenido de proteína cruda ya no coincide con el de proteína verdadera, ya que puede observarse que hay una reducción significativa en el contenido de proteína; sin embargo, sigue siendo uno de los componentes mayoritarios, después de los hidratos de carbono. Posiblemente los

compuestos con nitrógeno no proteínico que se eliminaron en la determinación fueron aminas, purinas, pirimidinas, betaínas, alcaloides, porfirinas y aminoácidos no proteínicos

Se puede decir que para fines nutricionales, la moringa de Cortijo Oaxaca puede ser una opción por su mayor contenido de proteína, sin embargo, es la muestra que presenta un mayor contenido de fibra cruda (tabla 6) y por lo tanto se puede ver alterada su digestión. La moringa de Torreón, en cambio, tiene una cantidad apreciable de proteína y una baja cantidad de fibra (tabla 6). Es conveniente realizar las evaluaciones necesarias para conocer la calidad de la proteína, siendo una de ellas la que a continuación se discute.

En general el contenido de proteína verdadera varía muy poco entre las muestras ya que pueden observarse tres grupos: la moringa de Sinaloa es quien tiene el menor contenido de proteína y es la única muestra que presenta diferencia significativa al compararla con las demás. Entre la moringa de Juchitán Oaxaca, Guerrero y Campeche no hay diferencia estadísticamente significativa; así mismo entre la moringa de Puebla, Torreón, Michoacán y Cortijo Oaxaca no hay diferencia significativa.

**Tabla 10.** Resultados del Análisis de varianza y prueba de Duncan para la digestibilidad *in vitro*<sup>a</sup>

Localidad	% Digestibilidad
Sinaloa	70.38 <sup>a</sup>
Escárcega, Campeche	73.09 <sup>b</sup>
Amuco de la R., Guerrero	74.29 <sup>b c</sup>
Juchitán, Oaxaca	74.36 <sup>b c</sup>
Cortijo, Oaxaca	76.15 <sup>c d</sup>
Chilac, Puebla	76.41 <sup>c d</sup>
Torreón	76.92 <sup>c d</sup>
Zitácuaro, Michoacán	78.05 <sup>d</sup>

a: Se presenta el valor promedio (n=3), CV < 5%  
Diferentes letras dentro de la columna indican diferencia estadísticamente significativa

Los alimentos proteínicos de origen animal son más digeribles que los de origen vegetal lo cual se debe a que los alimentos de origen vegetal contienen fibra que provoca que haya una menor absorción de los nutrimentos. Además hay factores antinutricionales que pueden alterar la digestión de la proteína y en general de todos los nutrimentos.

A partir de un 80% se puede considerar que un alimento tiene buena digestibilidad proteínica; las hojas de moringa presentaron una digestibilidad entre 70 y 80% que se puede considerar normal para este tipo de material biológico, esto debido al contenido de fibra y posiblemente a otros factores antinutricionales, sin embargo, se puede considerar como adecuada la digestibilidad proteínica de las hojas de Cortijo, Oaxaca; Chilac, Puebla; Torreón y Zitácuaro, Michoacán; ya que su digestibilidad *in vitro* fue superior al 75%.

Además, haciendo análisis de correlación entre los parámetros estudiados, sólo en la proteína verdadera y digestibilidad *in vitro* se pudo encontrar que existe una relación entre ambos parámetros, ya que se obtuvo un coeficiente de correlación (r) de 0.902; por lo tanto entre mayor sea el contenido de proteína verdadera mayor es la digestibilidad.

La digestibilidad varía muy poco entre las hojas de moringa ya que se puede observar un grupo muy amplio que no presenta diferencia estadísticamente significativa entre la moringa de Guerrero, Cortijo Oaxaca, Puebla y Torreón; así mismo Campeche, Guerrero y Juchitán Oaxaca no presentan diferencia significativa; finalmente entre las moringas de Cortijo Oaxaca, Puebla, Torreón y Michoacán tampoco existe tal diferencia; no obstante, se puede establecer que las hojas de Sinaloa tienen la menor digestibilidad proteínica, en tanto las hojas de Michoacán, presentan la mejor digestibilidad de este componente.

**Tabla 11.** Resultados del Análisis de varianza y prueba de Duncan para el contenido de calcio <sup>a</sup>

Localidad	mg Ca / 100 g moringa
Escárcega, Campeche	1635.41 <sup>a</sup>
Zitácuaro, Michoacán	1655.52 <sup>a</sup>
Sinaloa	1791.85 <sup>b</sup>
Chilac, Puebla	2158.14 <sup>c</sup>
Cortijo, Oaxaca	2174.07 <sup>c</sup>
Amuco de la R., Guerrero	2423.04 <sup>d</sup>
Juchitán, Oaxaca	2516.81 <sup>e</sup>
Torreón	2635.74 <sup>f</sup>

a: Se presenta el valor promedio (n=3), CV < 5%  
Diferentes letras dentro de la columna indican diferencia estadísticamente significativa

De acuerdo al contenido de calcio obtenido, se puede decir que la moringa es una buena fuente de calcio; sin embargo, sería necesario estudiar si no se encuentra en forma de oxalatos, lo cual reduciría su aprovechamiento.

No hubo diferencia significativa en el contenido de calcio de la moringa de Campeche y Michoacán; así como en la moringa de Puebla y Cortijo Oaxaca tampoco se encontró diferencia significativa; sin embargo, se puede notar que hay cepas de moringa que se pueden considerar como excelentes fuentes de este elemento indispensable (>2%) y vital para el desarrollo humano.

**Tabla 12.** Resultados del Análisis de varianza y prueba de Duncan para el contenido de hierro <sup>a</sup>

Localidad	mg Fe / 100 g moringa
Amuco de la R., Guerrero	4.33 <sup>a</sup>
Sinaloa	7.51 <sup>b</sup>
Chilac, Puebla	9.87 <sup>c</sup>
Juchitán, Oaxaca	9.91 <sup>c</sup>
Zitácuaro, Michoacán	11.35 <sup>d</sup>
Escárcega, Campeche	12.82 <sup>e</sup>
Cortijo, Oaxaca	20.22 <sup>f</sup>
Torreón	28.64 <sup>g</sup>

a: Se presenta el valor promedio (n=3), CV < 5%  
Diferentes letras dentro de la columna indican diferencia estadísticamente significativa

El contenido de hierro es muy variable entre las hojas de moringa y solo en las muestras de Puebla y Juchitán Oaxaca no hay una diferencia estadísticamente significativa.

La principal razón de esta variación está directamente relacionada con la composición del suelo de donde provienen las muestras, ya que las plantas aprovechan los minerales del suelo donde crecen.

No hubo correlación entre el contenido de hierro y vitamina C, partiendo desde el punto de vista que esta vitamina puede incrementar la biodisponibilidad de este mineral, cuando son ingeridos por el organismo humano.

Sobre este micronutriente, cuatro cepas de moringa, presentaron un contenido alto de hierro (> 11 mg / 100 g de hojas de moringa), en particular la cepa de Torreón presentó una concentración mayor a 25 mg / 100 g de hojas; no obstante, hay que mencionar que este micronutriente en los recursos vegetales

tiene baja biodisponibilidad; sin embargo, entre mayor sea la cantidad de hierro mayor será el posible aprovechamiento en el organismo.

**Tabla 13.** Resultados del Análisis de varianza y prueba de Duncan para el contenido de vitamina C <sup>a</sup>

Localidad	mg vit. C / 100 g moringa
Amuco de la R., Guerrero	14.24 <sup>a</sup>
Escárcega, Campeche	17.79 <sup>b</sup>
Sinaloa	34.86 <sup>c</sup>
Torreón	49.17 <sup>d</sup>
Juchitán, Oaxaca	51.10 <sup>e</sup>
Chilac, Puebla	57.89 <sup>f</sup>
Zitácuaro, Michoacán	86.78 <sup>g</sup>
Cortijo, Oaxaca	109.62 <sup>h</sup>

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

Diferentes letras dentro de la columna indican diferencia estadísticamente significativa

En esta tabla puede apreciarse que la vitamina C es el componente más variable en las hojas de moringa, ya que todas las muestras presentan diferencia estadísticamente significativa entre si.

La causa de esta variación es que esta vitamina es muy inestable ya que se oxida con relativa facilidad y mayor rapidez si la temperatura se incrementa. Las hojas con las que se trabajó recibieron un tratamiento térmico desconocido, por lo tanto es probable que la vitamina se haya visto afectada. En todo caso el tratamiento térmico que se aplicó a la moringa de Cortijo Oaxaca fue el ideal ya que es la muestra con un mayor contenido de vitamina C, que incluso se puede considerar como una fuente adecuada de este micronutriente.

Otra razón por la que pudo variar el contenido de vitamina C es por las condiciones de almacenamiento, ya que las muestras contenidas en frascos presentan un mayor contenido de vitamina, mientras que las muestras contenidas en bolsas de plástico presentan menor cantidad neta de vitamina.

**Tabla 14.** Resultados del Análisis de varianza y prueba de Duncan para la densidad calórica de las diferentes hojas de moringa <sup>a</sup>

Localidad	KJ/100g moringa
Amuco de la Reforma Guerrero	1264.68 <sup>a</sup>
Torreón	1652.38 <sup>b</sup>
Juchitán, Oaxaca	1701.32 <sup>bc</sup>
Sinaloa	1732.86 <sup>bc</sup>
Zitácuaro, Michoacán	1775.11 <sup>cd</sup>
Cortijo, Oaxaca	1862.78 <sup>d</sup>
Escárcega, Campeche	1878.87 <sup>d</sup>
Chilac, Puebla	2243.60 <sup>e</sup>

a: Se presenta el valor promedio (n=3), CV < 5%  
Diferentes letras dentro de la columna indican diferencia estadísticamente significativa

Los alimentos que menor densidad calórica aporten, serán más apropiados para adelgazar, sin embargo, al hablar del problema de desnutrición energética-proteínica, se buscan alimentos que aporten un alto contenido energético para mantener el funcionamiento y crecimiento del organismo humano.

Algo muy interesante sobre el contenido energético, es que se esperaba que las hojas de moringa de Zitácuaro, Michoacán tuvieran el mayor contenido energético sobre las otras hojas de las respectivas localidades; debido a que presentaron el mayor contenido de grasa cruda (8.93%, Tabla 1), y se sabe que las grasas aportan 9 kcal/g, sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos sobre la densidad energética, puede apreciarse que las hojas de moringa de Chilac, Puebla presentan el mayor contenido energético, con un valor de 2243.60 kJ/100g de moringa, por lo tanto estas hojas son la mejor fuente energética; no obstante, hay que aclarar que esta determinación no discrimina el aporte energético que aporta la fibra cruda.

Estadísticamente, se puede apreciar de forma general que las hojas de moringa de Guerrero y Puebla, muestran diferencia significativa con respecto a la densidad calórica de las demás hojas, las hojas de Guerrero presentan el menor contenido energético y las hojas de Puebla presentan el mayor contenido energético.

## 5.2 Agentes tóxicos y factores antinutricionales: inhibidores de tripsina, taninos, nitratos, oxalatos y saponinas

A continuación se presentan los resultados de los siguientes factores tóxicos: inhibidores de tripsina, taninos, nitratos, oxalatos y saponinas; de las diferentes hojas de moringa de cada región. Cabe señalar que para esta etapa experimental se agotaron las hojas de Cotija, Oaxaca y no pudo ser posible adquirir más, por lo tanto para esta etapa experimental sólo se trabajó con 7 muestras.

**Tabla 15.** Factores tóxicos y antinutricionales presentes en las hojas de moringa provenientes de algunas regiones del país <sup>a</sup>

Localidad	Inhibidores de tripsina (U.T.I./mg) <sup>b</sup>	Taninos (%)	Nitratos (%)	Ácido oxálico (%)	Saponinas (U.H./mg) <sup>c</sup>
Sinaloa	0.84 ± 0.001	1.60 ± 0.006	0.05 ± 0.004	1.09 ± 0.052	NEGATIVO
Michoacán	1.04 ± 0.065	1.82 ± 0.010	0.06 ± 0.005	1.20 ± 0.052	NEGATIVO
Campeche	0.70 ± 0.025	1.52 ± 0.006	0.01 ± 0.000	1.06 ± 0.060	10.65
Puebla	0.74 ± 0.030	1.62 ± 0.015	0.08 ± 0.003	0.37 ± 0.029	NEGATIVO
Guerrero	0.41 ± 0.006	1.36 ± 0.020	0.02 ± 0.003	2.27 ± 0.081	NEGATIVO
Torreón	1.34 ± 0.032	1.45 ± 0.015	0.04 ± 0.000	1.61 ± 0.070	10.52
Juchitán, Oaxaca	0.55 ± 0.015	1.28 ± 0.010	0.14 ± 0.002	1.60 ± 0.040	NEGATIVO

a: Se presenta el valor promedio ± desviación estándar (n=3), CV < 5%

b: U.T.I./mg (unidades de tripsina inhibida/mg de muestra)

c: U.H./mg (unidades hemolíticas/mg de muestra)

Algunos factores tóxicos y antinutricionales que se encuentran frecuentemente en los materiales vegetales, se analizaron para las diferentes hojas de moringa. En general se puede observar que la mayoría de ellos se encuentran en muy bajas concentraciones o incluso por debajo del límite de detección del método como es el caso de las saponinas.

Ahora se muestran los resultados del análisis estadístico para cada factor (inhibidores de tripsina, taninos, nitratos, oxalatos), de acuerdo a la procedencia de las hojas de moringa.

**Tabla 16.** Resultados del Análisis de varianza y prueba de Duncan para el contenido de inhibidores de tripsina de las hojas de moringa <sup>a</sup>

Localidad	UTI
Amuco de la Reforma Guerrero	0.41 <sup>a</sup>
Juchitán, Oaxaca	0.55 <sup>b</sup>
Escárcega, Campeche	0.70 <sup>c</sup>
Chilac, Puebla	0.74 <sup>c</sup>
Sinaloa	0.84 <sup>d</sup>
Zitácuaro, Michoacán	1.04 <sup>e</sup>
Torreón	1.34 <sup>f</sup>

a: Se presenta el valor promedio (n=3), CV < 10%  
Diferentes letras dentro de la columna indican diferencia estadísticamente significativa  
U.T.I. (unidades de tripsina inhibida)

Los inhibidores de tripsina son sustancias con la capacidad de inhibir la actividad proteolítica de la tripsina, de acuerdo a la técnica de Kakade, se considera que el valor admisible con respecto a los inhibidores de tripsina es de 10 UTI/mg, así pues, puede observarse que las diferentes muestras de moringa se encuentran muy por debajo de este valor, por lo que se puede concluir que dado el contenido de inhibidores de tripsina, el consumo de moringa no representa en un riesgo desde el punto de vista antinutricional al organismo.

La comparación estadística entre las diferentes muestras es irrelevante pues todas se encuentran por debajo del nivel en que se puede presentar un efecto antinutricional. Este resultado es muy interesante si consideramos a las hojas de moringa como una fuente importante de proteína dietética y en cierta forma justificar el relativamente adecuado valor de digestibilidad proteínica *in vitro*.

**Tabla 17.** Resultados del Análisis de varianza y prueba de Duncan para el contenido de taninos de las hojas de moringa <sup>a</sup>

Localidad	% Taninos
Juchitán, Oaxaca	1.28 <sup>a</sup>
Amuco de la Reforma, Guerrero	1.36 <sup>b</sup>
Torreón	1.45 <sup>c</sup>
Escárcega, Campeche	1.52 <sup>d</sup>
Sinaloa	1.60 <sup>e</sup>
Chilac, Puebla	1.62 <sup>e</sup>
Zitácuaro, Michoacán	1.82 <sup>f</sup>

a: Se presenta el valor promedio (n=3), CV < 10%  
Diferentes letras dentro de la columna indican diferencia estadísticamente significativa

Los taninos han demostrado tener cierta toxicidad en dosis muy elevadas, se requiere de grandes concentraciones para causar algún efecto como formar

complejos con proteínas o hidratos de carbono, y disminuir la biodisponibilidad de estos; también tienen la particularidad de ser sustancias astringentes por lo que pueden generar sensaciones indeseables al ingerirlos.

La ingesta diaria admisible (IDA) para los taninos es de 500 mg / kg de peso corporal / día, es decir, una persona de 60 kg de peso puede consumir hasta 30 g de taninos al día.

De acuerdo a los resultados puede observarse que el contenido de taninos en las diferentes hojas de moringa se encuentra por arriba del 1 %. Las hojas de Michoacán presentan el mayor contenido de taninos 1.82 %; de acuerdo a la IDA se puede decir que una persona de 60 kg de peso tendría que consumir más de 1.5 kg de hojas de moringa de Michoacán al día para presentarse algún efecto antinutricional.

Estadísticamente entre hojas de Sinaloa y Puebla no existe diferencia significativa en el contenido de taninos, en las otras muestras si hay diferencia significativa.

Cabe señalar que en la actualidad a los taninos por considerarse compuestos fenólicos, se les relaciona a comportarse como sustancias antioxidantes, por lo tanto desde este enfoque podría considerarse importante el contenido de estas sustancias en las hojas de moringa.

**Tabla 18.** Resultados del Análisis de varianza y prueba de Duncan para el contenido de nitratos de las hojas de moringa <sup>a</sup>

Localidad	% Nitratos
Escárcega, Campeche	0.01 <sup>a</sup>
Amuco de la Reforma Guerrero	0.02 <sup>b</sup>
Torreón	0.04 <sup>c</sup>
Sinaloa	0.05 <sup>d</sup>
Zitácuaro, Michoacán	0.06 <sup>e</sup>
Chilac, Puebla	0.08
Juchitán, Oaxaca	0.14 <sup>g</sup>

a: Se presenta el valor promedio (n=3), CV < 10%  
Diferentes letras dentro de la columna indican diferencia estadísticamente significativa

Los nitratos son considerados como precursores de formar compuestos cancerígenos, no por sí mismos, pero sí en presencia de otras sustancias. Según la OMS la ingesta diaria admisible (IDA) para el ion nitrato es de 3.65 mg/kg de peso corporal/día, es decir una persona de 60 kg puede consumir máximo 219 mg

de nitratos al día; la IDA del ion nitrito es de 0.13 mg/Kg/día, es decir una persona de 60 kg puede consumir 7.8 mg de nitritos al día.

En esta etapa experimental se determinó el contenido de nitratos, la hojas de moringa con mayor contenido de nitratos es la correspondiente a la localidad de Juchitán, Oaxaca con 0.14%, haciendo la relación con la IDA reportada por la OMS se puede establecer que una persona de 60 kg puede consumir hasta 156 g de hojas de moringa de Juchitán, Oaxaca al día sin que rebase la IDA para este xenobiótico, en la cepa que presento la mayor concentración de nitratos.

Estadísticamente hay diferencia significativa entre todas las muestras de moringa por lo tanto se puede decir que es muy variable el contenido de nitratos en las hojas de moringa.

**Tabla 19.** Resultados del Análisis de varianza y prueba de Duncan para el contenido de oxalatos de las hojas de moringa <sup>a</sup>

Localidad	% Ácido Oxálico
Chilac, Puebla	0.37 <sup>a</sup>
Escárcega, Campeche	1.06 <sup>b</sup>
Sinaloa	1.09 <sup>b</sup>
Zitácuaro, Michoacán	1.20 <sup>c</sup>
Juchitán, Oaxaca	1.60 <sup>d</sup>
Torreón	1.61 <sup>d</sup>
Amuco de la Reforma, Guerrero	2.27 <sup>e</sup>

a: Se presenta el valor promedio (n=3), CV < 10%  
Diferentes letras dentro de la columna indican diferencia estadísticamente significativa

El ácido oxálico puede considerarse como factor antinutricional debido a que interfiere en la asimilación del calcio de los alimentos, sin embargo también puede actuar como factor tóxico cuando los alimentos tienen un contenido mayor al 10% y cuando la dieta es rica en vegetales; lo cual produce cálculos renales e hipocalcemia. [20]

La dosis letal media (DL<sub>50</sub>) para humanos por vía oral es de 5 g, para una persona de 68 kg de peso. Las hojas de moringa de Amuco de la Reforma, Guerrero presentan el mayor contenido de ácido oxálico de 2.27% por lo tanto para que se presente un efecto tóxico en una persona de 68 kg se necesitarían consumir 220 g de hojas de moringa de esta región. [20]

El contenido de ácido oxálico en las hojas de moringa es muy variable, ya que se presentan valores desde 0.37 hasta 2.27% por lo que es muy importante

considerar el contenido de calcio de las hojas de cada región ya que se puede ver afectada su asimilación, por lo tanto se busca una cepa de moringa con bajo contenido de ácido oxálico para que no interfiera en la asimilación del calcio ni produzca algún efecto antinutricional.

Retomando que 2.5 g de ácido oxálico precipitan 1 g de calcio, la disponibilidad de calcio de un alimento está determinada por la relación ácido oxálico-calcio. De acuerdo al contenido de calcio y ácido oxálico en las diferentes hojas de moringa, la siguiente tabla muestra la relación de estos dos componentes con respecto a que 2.5 g de ácido oxálico precipitan 1 g de calcio. [20]

**Tabla 20.** Relación del contenido de calcio con respecto al contenido de ácido oxálico en las diferentes hojas de moringa<sup>a</sup>

Localidad	% Calcio	% Ácido oxálico	% Ca precipitado <sup>b</sup>	% Ca disponible <sup>c</sup>
Sinaloa	1.79	1.09	0.44	1.35
Zitácuaro, Michoacán	1.66	1.20	0.48	1.18
Escárcega, Campeche	1.64	1.06	0.42	1.22
Chilac, Puebla	2.16	0.37	0.15	2.01
Amuco, Guerrero	2.42	2.27	0.91	1.51
Torreón	2.63	1.61	0.64	1.99
Juchitán, Oaxaca	2.52	1.60	0.64	1.88

- a: Se muestran el contenido en % de calcio y ácido oxálico determinados anteriormente.  
b: Si 2.5 g de ácido oxálico precipitan 1 g de calcio, por regla de tres se llega a estos valores.  
c: Diferencia del % de calcio original y el % de calcio precipitado.

De acuerdo a la relación de ácido oxálico-calcio, puede observarse que el contenido de calcio es mayor que el contenido de ácido oxálico en las hojas de moringa y aunque 2.5 g de ácido oxálico precipiten 1 g de calcio, el contenido de éste mineral es mayor al 1 % por lo cual se puede considerar que las hojas de moringa son una buena fuente de calcio. En el caso de las hojas de Puebla se puede notar que relativamente tiene un alto contenido de calcio y un bajo contenido de ácido oxálico lo que hace a estas hojas una buena fuente de calcio y se necesitaría consumir una gran cantidad de este material para presentar algún efecto antinutricional.

**Tabla 21.** Resultados de la determinación de saponinas de las hojas de moringa <sup>a</sup>

<b>Localidad</b>	<b>U.H./mg muestra</b>
Sinaloa	NEGATIVO
Zitácuaro, Michoacán	NEGATIVO
Chilac, Puebla	NEGATIVO
Amuco, Guerrero	NEGATIVO
Juchitán, Oaxaca	NEGATIVO
Torreón	10.52
Escárcega, Campeche	10.65

a: La determinación se realizó por triplicado  
U.H. (unidades hemolíticas)

De acuerdo a los resultados obtenidos sobre las saponinas puede concluirse que no representan un riesgo para la salud pues los niveles son muy bajos o incluso no son detectables por el método, además, la toxicidad de estas sustancias aún sigue en discusión ya que en algunos países se utilizan como aditivos alimentarios donde tienen establecido su límite de uso permisible.

## 6. CONCLUSIONES

- ❖ Se aportó información de la composición química de las hojas de ***Moringa oleífera***, ya que hasta el momento no existe información al respecto, de las cepas que se cultivan en el país.
- ❖ El componente mayoritario de las hojas de moringa determinado en el análisis proximal fueron los hidratos de carbono, seguido por la proteína cruda, las cenizas y la fibra están en cantidades similares y finalmente la grasa cruda es el componente minoritario.
- ❖ Respecto al contenido de proteína pudo observarse que no todo el nitrógeno corresponde a este nutriente ya que hay una disminución significativa entre el contenido de proteína cruda y el de proteína verdadera. Las hojas que presentaron el mayor contenido de proteína verdadera son las correspondientes a Cortijo, Oaxaca; Zitácuaro, Michoacán; Torreón y Chilac, Puebla.
- ❖ Con respecto a los micronutrientes, pudo observarse que la vitamina C es el micronutriente que presenta mayor variabilidad, sin embargo, la cepa de Cortijo, Oaxaca se puede considerar una buena fuente de esta vitamina.
- ❖ En general el contenido de factores tóxicos y antinutricionales fue bajo o incluso por debajo del límite de detección del método como es el caso de las saponinas; por lo que la ingesta de ***Moringa oleífera*** no representa un riesgo a la salud, ya que la concentración de estos factores no rebasa la dosis diaria admisible.
- ❖ De acuerdo al estudio se puede considerar a las hojas de moringa una adecuada alternativa alimenticia en la complementación de la dieta. De acuerdo al contenido proteínico-energético, las cepas más importantes son las provenientes de Cortijo, Oaxaca; Torreón y Chilac, Puebla; sin embargo, se demostró que definitivamente hay una variación en la composición química de este recurso natural, de acuerdo a su procedencia, ya que hay factores intrínsecos y externos que afectan su composición.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Alfonso, A., 1988. Algunas consideraciones sobre las plantas tóxicas para los animales domésticos. Censa, La Habana, pp. 84-92.
2. Anwar, F., Ltif, S., Ashraf, M. and Gilani, A., 2007. *Moringa oleifera*: A Food Plant with Multiple Medicinal Uses. Phytotherapy Research. 21, 17-25.
3. Aragón, M. y Villa, N., 1994. "Prácticas de laboratorio de análisis de alimentos", Departamento de Alimentos y Biotecnología, División de Ingeniería, Facultad de Química UNAM, México D.F., pp. 2-19.
4. Aron, A., 1988. Nutrición animal, 1era edición, Acirbia, Zaragoza, España, pp. 43-59, 79-106.
5. Ayres, G., 1970. Análisis químico cuantitativo. Editorial Harla, México, D.F., pp. 246-251, 253-257.
6. Bamishaiye, E., Olayemi, F., Awagu, E. and Bamshaiye, O. 2011. Proximate and Phytochemical Composition of *Moringa oleifera* Leaves at Three Stages of Maturation. Advance Journal of Food Science and Technology, 3(4), 233-237.
7. Bateman, J., 1970. Nutrición animal (manual de métodos analíticos). Herrero Hnos., S.A. México, D.F., pp. 110-112, 123-131, 146-231, 269-282.
8. Biesalski, H., Grimm, P. and Nowitzki, S., 2007. Nutrición: texto y atlas. Ed. Médica Panamericana, Madrid, pp. 164-167.
9. Bourges, H., 1983. El calcio y fósforo, Cuadernos de Nutrición, 6(9), 3-10.
10. Bowman, R., 1989. Farmacología. Editorial Interamericana, 2ª ed. México, D.F. pp. 43, 17-31.
11. Bressani, R., Elias, L., Wolzak, A., Hagerman A. and Butler, L., 1983. Tannins in common beans: methods of analysis and effects on protein quality. Journal Food Science. 48, 1000-1003.
12. Brian, A., Allan, G., 1997. Ciencia de los alimentos, nutrición y salud. Limusa Noriega Editores, 5º edición, México, D.F., pp. 113-129.
13. Brownsell, V., Griffith, C. y Eleri, J., 1993. La ciencia aplicada al estudio de los alimentos. Editorial Diana, México, D.F., pp. 13.

14. Catoldo, D., Haroon, M., Schrader, L. and Youngs, V., 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Science Plant Anal.* 6, 71-80.
15. Chang, M., Collins, J., Bailey, J. and Coffey, D., 1994. Cowpeas tannins related to cultivar, maturity, dehulling and heating. *Journal of Food Science*, 59, 1034-1036.
16. Cheeke, P. and Shull, L., 1985. *Natural Toxicants of Feeds and Poisonous Plants*. Avi Publishing Company, 250 Post Road Entertainment, Post Office Box 831, Westport, pp. 492.
17. Clavert, M., Dinole, J. and Lucy, J., 1967. Action of saponins on biological cell membranes. *Nature*. 196, 952-955.
18. Committee on Food Protection., 1973. *Toxicants occurring naturally in food*. National Academy of Sciences, 2<sup>nd</sup> edition, Washington DC., pp. 7-25.
19. Coronado, J., Corral, A., López, P., Miñano, R., Ruíz, B. y Villén, J., 1998. *Estadística Aplicada con statgraphics*. Addison-Wesley Iberoamericana, Delaware, pp. 145-159, 259-276.
20. Derache, R., 1990. *Toxicología y seguridad de los alimentos*. Ediciones Omega, Zaragoza, España, pp. 24, 109-132, 234-247, 255-258.
21. Fahey, J., 2005. ***Moringa oleifera***: A Review of the Medical Evidence for Its Nutritional, Therapeutic, and Prophylactic Properties. Part 1. *Tress for Life Journal*, 1(5), 5-10.
22. Feldman, E., 1988. *Principios de nutrición clínica. El manual moderno*, México, D.F., pp. 46-48.
23. Fennema, O., 1988. *Food Chemistry*. Marcel Dekker. S.A., pp. 513-516.
24. Fennema, O., 1993. *Química de los alimentos*. 2da edición, Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, pág. 968.
25. Fennema, O., 2000. *Química de los alimentos*. 2da edición, Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, pág. 761-763.
26. Ferreira, P., Farias, D., Oliveira, J. and Carvalho, A., 2008. ***Moringa oleifera***: bioactive compounds and nutritional potential. *Review Nutrition*, Campinas, 21(4), 431-437.

27. Foidl, N., Makkar, H. and Becker, K., 2001. The Potential of *Moringa oleifera* for Agricultural and Industrial Uses. pp. 45-76, In: The Miracle Tree: The Multiple Uses of Moringa. Ed. Lowell J. Fuglie, CTA, Wageningen, The Netherlands.
28. Fox, B. and Cameron, A., 1997. Ciencia de los alimentos, Nutrición y Salud. Limusa Noriega Editores, 5ª Edición. México, D.F., pág. 198.
29. Ganong, F., 1978. Manual de fisiología médica. Editorial Manual Moderno, México D.F., pp. 112-117.
30. Garcia, R., 1990. Alimentación humana, errores y consecuencias. Editorial Mundi-Prensa, Zaragoza, España, pp. 167-199.
31. Giron, M., 1992. Determinación semicuantitativa de saponinas en muestras vegetales aprovechando su capacidad hemolítica. Tesis de la Facultad de Química, UNAM, México D.F. pp. 35-40.
32. González, A., 1989. Plantas tóxicas para el ganado. Limusa, México D.F., pp. 27-28.
33. Griffiths, D., 1986. The inhibition of digestive enzymes by polyphenolic compounds. In Nutritional and toxicological significance of enzyme inhibitors in food. Friedman M.(Ed). Plenum Press. New York, pp. 509-516.
34. Hajiev, K., Kerimov, K., Hajieva, F. and Ignat'yev, V., 1980. Advances in experimental thermochemistry. A modern bomb calorimeter. J. Chemistry Thermodynamikcs. 12, 509-519.
35. Hart, L., 1984. Análisis moderno de alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza. pp. 1-13.
36. Helrich, K., 1990. Official methods of analysis of the Association Official Analytical Chemists. Published of AOAC, 15<sup>th</sup> edition, Vol. II, Arlington, pp. 778-779, 1058-1059.
37. Helrich, K., 1995. Official methods of analysis of the Association Official Analytical Chemists. Published of AOAC, 16<sup>th</sup> edition, Vol. II, Arlington, pp. 12.

38. Herrera, B., 1998. Desarrollo de métodos para determinar fitatos y oxalatos y su aplicación en semillas silvestres de interés. Tesis de la Facultad de Química, UNAM, México, D.F., pp. 33-41.
39. Horwitz, W. and Latimer, G. (Jr.), 2005. Official methods of analysis of the Association Official Analytical Chemists. Published of AOAC International, 17th edition, Chapter 4, Gaithersburg, pp. 1-8, 33-36, 42-47.
40. ISO 9648-1998, 1998. Determinación of tannin content in sorghum. 1th edition.
41. Kakade, M., Rackis, J., Maghee, J. and Puski, G., 1974. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. Cereal Chemistry, 51, 376-382.
42. Kasolo, J., Bimenya, G., Ojok, L., Ochieng, J. and Ogwal-Okeng, J., 2010. Phytochemicals and uses of *Moringa oleifera* leaves in Ugandan rural communities. Journal of Medicinal Plants Research. 4(9), 753–757.
43. Klingman, G., 1980. Estudio de las plantas nocivas: principios y prácticas. Limusa, México, D.F., pp. 311-318.
44. Kumar, R. and Singh, M., 1984. Tannins: Their Adverse Role in Ruminant Nutrition. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 32(3), 447-453.
45. Laider, K. and Meiser, J., 1997. Físicoquímica. Ed. Acribia, S.A. 2a edición, Zaragoza, España pp. 45-87.
46. Lehninger, L., 1980. Bioquímica. Omega, 2a ed, Barcelona. España, pp. 325, 450-455.
47. Lindner, E., 1995. Toxicología de los alimentos. Acribia, 2ª edición, Zaragoza, España, pp. 82-84, 176-184.
48. Lomelí, L., 2009. Evaluación nutritiva y toxicológica de la flor de moringa (*Moringa oleifera*) consumida en el municipio de Santa María Colotepec, Oaxaca. Tesis de la Facultad de Química, UNAM, México, D.F., pág. 6-19, 76-82.
49. López, G., 2003. Estudio de la Composición y Valor Nutricio de los Residuos de Uva (*Vitis vinífera*) y su Posible Uso en la Alimentación Animal. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México D.F., pp. 43, 45-47, 53, 55-56.

50. Lopez, M., 2000. Determinación de factores tóxicos en varias almendras no tradicionales con potencial aporte de proteína y grasa dietética. Tesis de la Facultad de Química, UNAM, México, D.F., pág. 28-33.
51. Lucas, B., Guerrero, A., Sigales, L. and Sotelo, A., 1988. True protein content and nonprotein amino acids present in legume seeds. *Nutrition Reports International*. 37, 545-553.
52. Mahmood, K., Mugal, T. and Haq, I., 2010. ***Moringa oleifera***: a natural gift-A review. *Science & Research*. 2(11), 775-781.
53. Makkar, H. and Becker, K., 1996. Nutritional value and antinutritional components of whole and ethanol extracted ***Moringa oleifera*** Leaves. *Animal Feed Science Technology*. 63, 211-228.
54. Martinez, B. and Rincon, F., 1997. Trypsin inhibitors, 2: Effects of processing and determination methods. *Alimentaria*. 279, 33-38.
55. Martínez, M., 1957. Plantas útiles de la flora Mexicana. Ediciones botas, México, D.F., pág. 415-416.
56. Miranda, R. La fibra dietaria en la alimentación. Determinación del contenido de fibra soluble e insoluble en 60 alimentos. Proyecto de investigación 235/88. U. A. E. M. Toluca, pp. 60-68.
57. Naczki, M., Sánchez, L., John, C. and Sosulski, F., 1994. Condensed tannins in canola hulls. *Journal of Agriculture Food and Chemistry*. 42, 2196-2200.
58. Reyes-Sánchez, N., Spörndly, E. and Ledin I., 2006. Effect of feeding different levels of foliage of ***Moringa oleifera*** to creole dairy cows on intake, digestibility, milk production and composition. *Livestock Science*. 101, 21-31.
59. Richter, N. and Becker, K., 2003. Evaluation nutritional quality of moringa (***Moringa oleifera*** Lam.) leaves as an alternative protein source for Nile tilapia (***Oreochromis niloticus*** L.). *Aquaculture*. 217, 599-611.
60. Roberts, H., 1981. Food safety. Wiley Interscience Publication. Wiley and sons. Westport. pp. 195-196, 245-246.

61. Sánchez, M., 1989. Vida y nutrición. Siglo XXI Editores, México, D.F., pp. 46-50
62. Shih, M., Chang, C., Kang, S. and Tsai, M., 2011. Effect of Different Parts (Summer and Winter) on the Chemical Compositions and Antioxidant Activity of *Moringa oleifera*. International Journal Molecular Science. 12, 6077-6088.
63. Braun, A., 2003. Comparación bromatológica y de factores tóxicos entre el frijol comba (*P. Lunatus*) y frijol peruano (*P. vulgaris*) consumidos en San Miguel Totolapan, Gro. Tesis de la Facultad de Química, UNAM, México D.F., pp. 30-35.
64. Melo, V., 2004. Bioquímica de los procesos metabólicos. Ed. Reverte, Barcelona. pp. 335-336.
65. Taylor, S. and Scanlan, R., 1989. Food toxicology: a perspective on the relative risks. Ed. Dekker. Wisconsin, pp. 57-100.
66. Valle, P. y Lucas, B., 2000. Toxicología de alimentos. México D.F., I.S.B.N. 92-75-37004-4.
67. Yaméogo, C., Bengaly, M., Savadogo, A., Nikiema, P. and Traore, S., 2011. Determination of Chemical Composition and Nutritional Values of *Moringa oleifera* Leaves., Pakistan Journal of Nutrition, 10(3), 264-268.