



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL
CENTRO DE LA REPÚBLICA (PROPAC)

**EFFECTO DE LOS MÉTODOS DE COCINADO EN LA CALIDAD
NUTRICIONAL, CONTENIDO DE METABOLITOS SECUNDARIOS Y
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS HOJAS DE *Amaranthus
hypochondriacus* L. VARIEDAD REVANCHA**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA

I.A. ALMA ROSA LAZCANO PERALTA

C.U. SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO. OCTUBRE DE 2009.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Programa de Posgrado del Centro de la República (PROPAC)
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Efecto de los métodos de cocinado en la calidad nutricional,
contenido de metabolitos secundarios y actividad antioxidante de
las hojas de *Amaranthus hypochondriacus* L. variedad Revanchá**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I.A. Alma Rosa Lazcano Peralta

Dirigido por:

Dra. Sandra O. Mendoza Díaz

SINODALES

Dra. Sandra O. Mendoza Díaz
Presidente

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Secretario

Dr. Gerardo Ortiz González
Vocal

Dr. Manuel Mora Gutiérrez
Suplente

Dra. Ma. Guadalupe. Flavia Loarca Piña
Suplente

Q.B. Magali E. Aguilar Ortiz
Director de la Facultad de Química

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Octubre, 2009.
México

RESUMEN

Las hojas de amaranto son una fuente importante de nutrientes. Usualmente todos los vegetales son cocinados antes de ser consumidos. La literatura ha mostrado que los métodos de cocción pueden provocar pérdidas en la composición y biodisponibilidad de compuestos antioxidantes. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de cinco métodos de cocción (blanqueado, escaldado al vapor, salteado, cocción al vapor y fritura profunda) en el contenido fitoquímico (ácidos fenólicos y flavonoides), parámetros de color, contenido nutricional y actividad antioxidante de las hojas de amaranto. Las hojas fueron recolectadas 57 días después de ser sembradas, fueron cocinadas y liofilizadas, se obtuvieron extractos con metanol al 70%. El contenido de fenoles y flavonoides se determinó con ensayos espectrofotométricos y por HPLC. La capacidad antioxidante fue evaluada por los ensayos de ABTS, FRAP y capacidad quelante. El contenido de minerales así como el estudio bromatológico se determinó mediante procedimientos estándar. El contenido de flavonoides se encontró en el intervalo de 1.32-2.94 mg. eq. de (+)-catequina/g Hoja Seca (HS), observándose el siguiente orden para las hojas salteadas < blanqueadas < escaldadas al vapor < cocidas al vapor < crudas < fritas. El intervalo del contenido de ácidos fenólicos fue de 3.5-6.6 mg. eq. de ácido gálico/g HS con un orden ascendente de hojas salteadas < cocidas al vapor < blanqueadas < fritas < crudas. Ácido protocatecuico, cafeico, p-cumárico, catequina, rutina, quercetina y apigenina fueron identificados para todas las muestras por HPLC. El contenido de humedad de las hojas fue de 1.7-7%, cenizas 10-19.2%, proteína cruda 14.7-24.9%, lípidos 4.9-44% y carbohidratos 23.1-46.9%. El contenido mineral expresado en mg/g HS fue para Ca 7-18, Fe 0.09-0.16, Mg 1-2, K 13.5-34.8, Na 3.8-16 y Zn 0.01-0.03. El método de blanqueado preservó el mayor contenido de humedad, proteína cruda y fibra y mantuvo la mayor concentración de Zn. Las hojas escaldadas al vapor mantuvieron el mayor contenido de cenizas, lípidos y carbohidratos y preservaron el mayor contenido de Fe, Mg y K. Las hojas cocidas mostraron la menor pérdida de Ca. Se observó una pérdida significativa de brillo en todas las hojas cocinadas en comparación con las hojas crudas. En la actividad antioxidante, el porcentaje de inhibición del catión radical ABTS fue en el intervalo de 44.5 a 76.5%, siendo las hojas escaldadas al vapor las que presentaron el mayor porcentaje. La capacidad reductora de los extractos expresada en $\mu\text{mol eq. FeSO}_4/\text{g HS}$ fue de 3.61- 6.47, en orden ascendente de la actividad de las hojas blanqueadas < salteadas < escaldadas al vapor < cocidas al vapor < crudas < fritas. El método de cocción que mejor preservó la calidad nutricional, contenido de metabolitos secundarios y capacidad antioxidante de las hojas fue el escaldado al vapor, seguido del blanqueado y cocción al vapor.

(Palabras clave: hojas amaranto, métodos de cocinado, actividad antioxidante.)

SUMMARY

Amaranth leaves are an important source of nutrients. Vegetables usually undergo some type of processing before being ingested. The literature has shown that domestic cooking can result in significant losses in the composition and bioavailability of antioxidant compounds. The objective of the present study was to evaluate the effect of five common cooking treatments (blanching, steam scalding, stir-frying, steam cooking and deep-frying) on phytochemical profiles (phenolic acids and flavonoids), color parameters, nutritional contents and antioxidant activity of amaranth leaves. The leaves were collected after 57 days of being sown, cooked and lyophilized. 70% Methanolic extracts were obtained to quantify total phenolic and flavonoid contents by spectrophotometric assays. HPLC was performed to identify and quantify flavonoids and phenolic acids from the extracts. The antioxidant capacity of the extracts was evaluated by the ABTS, FRAP and chelating capacity assays. The mineral content and the proximal analysis were determined by standard procedures. The total flavonoid content range around 1.32-2.94 mg (+)-catechin eq./g Dry Leave (DL), significantly ordered as stir-frying < blanching < steam scalding < steam cooking < raw < deep-frying. The total phenolic content range was around 3.5-6.6 mg gallic acid eq. /g DL, significantly ordered as stir-frying < steam cooking < blanching < deep-frying < raw. Protocatechuic, caffeic, p-cumaric acids; catechin, rutin, quercetin and apigenin were identified and quantified for all the samples by HPLC. The moisture content in leaves was of 1.7-7%, ash 10-19.2%, crude protein 14.7-24.9%, lipids 4.9-44% and carbohydrates 23.1-46.9%. The mineral content expressed in mg/g DL was for Ca 7-18, Fe 0.09-0.16, Mg 1-2, K 13.5-34.8, Na 3.8-16 and Zn 0.01-0.03. The blanching treatment preserved best the moisture, crude protein and crude fiber contents and maintained the highest Zn concentration. Steam scalded leaves maintained the highest content of ash, lipids and carbohydrates and preserved the highest Fe, Mg and K content. The steam cooked leaves showed the lowest decrease for Ca content. A significant loss of vivid color with respect to raw leaves was observed for all cooking treatments. In the antioxidant activity, the percentage of inhibition of ABTS radical was 44.5 - 76.5%, the steam scalded leaves showed the highest inhibition percentage. The reducing ability of extracts expressed as $\mu\text{mol eq. FeSO}_4/\text{g DL}$ was 3.61-6.47, in ascending order of the content of the leaves blanched < stir-frying < steam scalded < steam cooking < raw < deep-frying. The treatment that best preserved the nutritional quality, content of secondary metabolites and antioxidant capacity of leaves was the steam scalding, followed by blanching and steam cooking.

(Key words: amaranth leaves, cooking methods, antioxidant activity)

DEDICATORIA

Dios, estoy convencida de que esta etapa, ha sido parte del maravilloso plan que tienes preparado para mi vida.

Todo el trabajo, tiempo y esfuerzo invertidos en la realización de este proyecto, fueron posibles gracias al apoyo, amor y confianza encontrados en mis padres, quienes a través de su sacrificio, siempre me han alentado en mi desarrollo humano y profesional, en mis hermanas, quienes son mi más grande inspiración; en mis amigos de la Fortaleza, que me han motivado a ser mejor y que son parte de mi vida; en la persona que Dios puso en mi camino para complementar mi vida y quien amo profundamente: Toño, y en todos los chicos nutracéuticos que me acompañaron todo este tiempo y con los cuales aprendí y compartí muy buenos momentos en el laboratorio.

A todos ustedes dedico este proyecto con mucho cariño.

AGRADECIMIENTOS

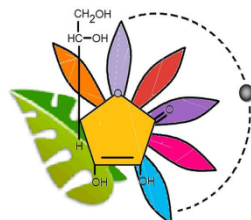
A Dios principalmente por esta oportunidad, por su guía y su amor.

Mi más sincero agradecimiento a la directora de este proyecto, Dra. Sandra Mendoza Díaz, quien a lo largo de este tiempo me brindo su apoyo, amistad y conocimiento y a cada uno de los doctores que fungieron como sinodales que sin su colaboración y aportaciones este proyecto no hubiese sido posible. Gracias por confiar en mí.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico otorgado a través de la beca.

A las instituciones que a través de sus servicios y colaboradores apoyaron y participaron en la realización de este proyecto:

- División de Posgrado de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.
- Unidad de Servicios Químicos de la UAQ
- Instituto Gastronómico de Estudios Superiores, IGES S.C.
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP
- México Tierra de Amaranto A.C
- Cinvestav, Unidad Querétaro.
- Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Querétaro, CONCYTEQ.



Laboratorio de Nutraceuticos



La Gastronomía Elevada al Arte®



INDICE

	Página
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
Índice de cuadros	vii
Índice de figuras	ix
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 El amaranto	3
2.2 Generalidades de algunos componentes de la hoja de amaranto.	9
A) Metabolitos secundarios	10
B) Minerales	10
2.3 Efecto de los métodos de cocción en los vegetales	14
III. JUSTIFICACIÓN	16
IV. OBJETIVOS	17
4.1 Objetivo general	17
4.2 Objetivos específicos	17
V. MATERIALES Y METODOS	18
5.1 Material biológico	18
5.2 Material químico	18
5.3 Métodos de cocción	20
A) Escaldado al vapor	20
B) Fritura profunda	20
C) Blanqueado	21
D) Blanqueado – Cocción al vapor	22
E) Blanqueado – Salteado	22
5.4 Medición de color	22
5.5 Liofilización de las muestras	23

5.6 Análisis bromatológico	23
A) Determinación de proteína	23
B) Determinación de cenizas	24
C) Determinación de fibra cruda	25
D) Determinación de extracto etéreo	26
E) Determinación de minerales	27
5.7 Obtención de extractos metanólicos	27
5.8 Determinación de metabolitos secundarios	27
A) Cuantificación de fenoles y flavonoides totales	28
B) Análisis HPLC de ácidos fenólicos y flavonoides	29
5.9 Determinación de la capacidad antioxidante.	30
A) Poder antioxidante de reducción férrica.	
<i>Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP).</i>	30
B) Método del ABTS	30
C) Capacidad quelante	31
5.10 Diseño y análisis estadístico	32
VI. RESULTADOS Y DISCUSION	33
6.1 Medición de color	33
6.2 Análisis bromatológico	37
6.3 Composición mineral	42
6.4 Metabolitos secundarios	48
6.5 Identificación de ácidos fenólicos y flavonoides por HPLC	52
6.6 Cuantificación de ácidos fenólicos y flavonoides por HPLC	64
6.7 Capacidad antioxidante	66
6.8 Capacidad quelante	71
VII. CONCLUSIONES	74
Anexo 1	75
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	76

Índice de cuadros

Cuadro		Página
1	Composición mineral de las hojas de <i>Amaranthus hybridus</i> L.	4
2	Composición de vitaminas de las hojas de <i>Amaranthus Hybridus</i> L.	4
3	Composición de fitoquímicos de las hojas de <i>Amaranthus Hybridus</i> L.	5
4.	Composición de aminoácidos de las hojas de <i>Amaranthus Hybridus</i> L.	5
5.	Composición de las hojas de amaranto comparado con la espinaca ^a	9
6	Valores para la determinación de color (L^* , a^* y b^*) de las hojas crudas y cocidas ^a	33
7	Valores de cromaticidad de las hojas crudas y cocidas	35
8	Valores de matiz de las hojas crudas y cocidas ^a	36
9	Contenido de humedad y cenizas de las hojas crudas y cocidas ^a	38
10	Análisis proximal de las hojas crudas y cocidas ^a	40
11	Contenido de Kcal/100g las hojas crudas y cocidas ^a	43
12	Contenido de Ca, Fe, Mg, K, P, Na y Zn de las hojas crudas y cocidas ^a	45
13	Contenido de fenoles totales de las hojas crudas y cocidas ^a	48
14	Contenido de flavonoides totales de las hojas crudas y cocidas ^a	51
15	Contenido de flavonoides totales en el aceite usado en los métodos de salteado, fritura profunda y sin cocer ^a	52

16	Contenido de ácidos fenólicos y flavonoides en los extractos metanólico e hidrolizado de las hojas crudas y cocidas de amaranto expresado en $\mu\text{g/g}$ de hoja ^a	65
17	Valores TEAC de las hojas crudas y cocidas	67
18	Actividad antioxidante de los extractos determinada a los 30 min ^a	70
19	Eq mM EDTA para las hojas crudas y cocidas de amaranto ^a	72

Índice de figuras

Figura		Página
1	Planta de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L. variedad Revancha, Parcela demostrativa INIFAP, Álvarez, Pedro Escobedo, Querétaro	7
2	Metodología experimental del proyecto	19
3	Diagrama de flujo de los métodos de cocción	21
4	Extractos metanólicos de hojas cocidas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L. variedad Revancha	28
5	Efecto de los métodos de cocción en la luminosidad (L^*) de las hojas	33
6	Efecto de los métodos de cocción en los valores para la determinación de color (a^* y b^*) de las hojas	34
7	Efecto de los métodos de cocción en los valores de cromaticidad de las hojas	36
8	Efecto de los métodos de cocción en el contenido de humedad y cenizas de las hojas	39
9	Efecto de los métodos de cocción en el contenido de proteínas, grasas, fibra y carbohidratos de las hojas	41
10	Relación entre los métodos de cocción y la composición proximal de las hojas	42
11	Efecto de los métodos de cocción en el contenido de Kcal/100g de las hojas	43
12	Efecto de los métodos de cocción en el contenido Ca, Fe, Mg, K, Na y Zn de las hojas	46
13	Relación entre los métodos de cocción y composición mineral de las hojas	47
14	Efecto de los métodos de cocción en el contenido fenoles totales de las hojas	50

15	Efecto de los métodos de cocción en el contenido de flavonoides totales de las hojas	53
16	Relación entre los métodos de cocción y el contenido de Metabolitos secundarios de las hojas	53
17	Cromatograma de estándares (flavonoides y ácidos fenólicos)	54
18	Cromatograma del extracto de la hoja cruda	55
19	Cromatograma comparando el extracto de la hoja cruda (en negro) con el cromatograma de estándares (en azul)	56
20	Cromatograma comparando el extracto de la hoja cruda (en negro) con el extracto de la hoja escaldada al vapor (en azul)	56
21	Cromatograma comparando el extracto de la hoja cruda (en negro) con el extracto de la hoja frita (en azul)	57
22	Cromatograma comparando el extracto de la hoja cruda (en negro) con el extracto de la hoja blanqueada (en azul)	57
23	Cromatograma comparando el extracto de la hoja cruda (en negro) con el extracto de la hoja cocida (en azul)	58
24	Cromatograma comparando el extracto de la hoja cruda (en negro) con el extracto de la hoja salteada (en azul)	58
25	Cromatograma comparando el extracto de la hoja cruda (en negro) con el extracto hidrolizado de la hoja cruda (en azul)	59
26	Cromatograma comparando el extracto hidrolizado de la hoja cruda (en negro) con el cromatograma de estándares (en azul), señalando los picos que coinciden con ác. Cafeico, ác. <i>p</i> -cumárico, quercetina y apigenina	60
27	Cromatograma comparando el extracto hidrolizado de la hoja cruda (en negro) con el extracto hidrolizado de la hoja escaldada al vapor (en azul)	61
28	Cromatograma comparando el extracto hidrolizado de la hoja cruda (en negro) con el extracto hidrolizado de la hoja frita (en azul)	61

29	Cromatograma comparando el extracto hidrolizado de la hoja cruda (en negro) con el extracto hidrolizado de la hoja blanqueada (en azul)	62
30	Cromatograma comparando el extracto hidrolizado de la hoja cruda (en negro) con el extracto hidrolizado de la hoja cocida al vapor (en azul)	62
31	Cromatograma comparando el extracto hidrolizado de la hoja cruda (en negro) con el extracto hidrolizado de la hoja salteada (en azul)	63
32	Efecto de los métodos de cocción en los equivalentes μmol de Trolox de las hojas	68
33	Cinética de reacción FRAP de los extractos metanólicos de las hojas cruda y cocidas, determinado a 595 nm	69
34	Relación entre los métodos de cocción y la capacidad antioxidante de las hojas	71

I. INTRODUCCION

El amaranto es una planta que ha sido cultivada y consumida en México desde tiempos prehispánicos, con el paso del tiempo el hombre ha creado con ella, una gran diversidad de platillos, actualmente, la forma más común de consumir el amaranto en México es en el popular dulce "alegría" también el grano es mezclado con maíz para la preparación de tamales, atoles y pinole.

Tradicionalmente el amaranto es cultivado para cosechar únicamente la panoja que contiene los granos, provocando que el resto de la planta sea desechada, en menor escala, la planta sin panoja es aprovechada con fines forrajeros para alimentar al ganado u otros animales, solo en algunas comunidades las hojas de la planta son consumidas como verdura.

La hoja de amaranto puede ser consumida en estado fresco, en una gran variedad de platillos como ensaladas, guisados o bien para elaborar aguas frescas y jugos, ya que su sabor no modifica el de otros alimentos ni su apariencia.

Al igual que otros vegetales, las hojas de amaranto se consumen tiernas y cocidas, ya sea al vapor, en sopas, guisos, tortillas o tamales. Los métodos de cocción varían de acuerdo a los hábitos y costumbres de cada región. En algunos estados de la República Mexicana, el consumo de las hojas de amaranto ha ido incrementando en los últimos años, de manera que se consumen en lugar de la acelga y espinaca. Existen alrededor de 50-60 especies de amaranto cuyas hojas son comestibles; su contenido nutrimental, textura y sabor ha sido comparado con estos vegetales de hoja verde, ricos en Hierro.

Por su elevado valor nutrimental, desde 1979 la Academia de Ciencias de los Estados Unidos de Norte América (NAS, por sus siglas en inglés) y la Organización para la Alimentación y Agricultura de las Naciones Unidas (FAO) determinaron al amaranto como uno de los cultivos en el mundo con un elevado

potencial para su explotación económica y nutricional a gran escala. Así mismo, lo calificaron como el mejor alimento de origen vegetal para consumo humano.

Es por esto importante determinar y documentar el contenido nutrimental y nutracéutico de alimentos que son reconocidos como fuentes importantes de nutrientes, como las hojas de amaranto, para establecer de manera integral el valor nutricional de la planta de amaranto.

Plantas como el amaranto pueden ser estudiadas ampliamente desde varias vertientes, como son las variedades comestibles del género, su estado fresco para conocer su composición nutricional o bien evaluando el efecto de métodos de cocción para establecer parámetros que permitan un mayor aprovechamiento de sus propiedades nutricionales y antioxidantes.

II. ANTECEDENTES

2.1 El amaranto

Junto con el maíz, el frijol y la chía, el amaranto fue uno de los principales productos para la alimentación de las culturas precolombinas de América. Para los mayas, aztecas e incas el amaranto fue la principal fuente de proteínas y se consumía como verdura y grano reventado. Además estuvo asociado a los ritos religiosos, a los dioses y a la visión cósmica de estas culturas. Con la llegada de los españoles a América y durante la Conquista, el amaranto fue eliminado de la dieta indígena por razones religiosas y políticas. La cultura del cultivo y consumo del amaranto casi desaparecieron; solamente en los lugares más apartados de la conquista española se mantuvo la producción de amaranto (Espitia, 1994).

El amaranto se puede aprovechar de varias formas, como grano, como verdura o recientemente, lo han empleado como forraje para cerdos, pollos, patos, conejos, caballos y peces con excelentes resultados (Cervantes, 2007).

Es un cultivo de múltiples usos, para la alimentación humana (granífero y hortícola), para alimentación animal (grano) y como forraje y ensilaje. Las hojas y tallo tienen altos contenidos de: proteína 26.7 %, lípidos 3.2 %, carbohidratos 39.7 %, fibra 9.9 % y cenizas 19.9 %. Se han reportado contenidos de calcio 2.034 mg / 100 g, hierro 30 mg / 100g y fósforo 311 mg / 100 g, todos en base seca. Los contenidos de nitratos comprende desde 0.4 % a 0.9 % y oxalatos desde 0.6 % a 9.1 % (Bertoni y Cattaneo, 1997). De acuerdo a las tablas de Ingesta Diaria Recomendada para la población mexicana (2001), las proporciones deseables de las fuentes de energía en el adulto son hidratos de carbono 60 a 63 %, lípidos 25 % y proteínas 12 a 15 %, por lo tanto, la planta de amaranto cubre satisfactoriamente las necesidades de proteína.

El valor nutritivo de las hojas de amaranto ha sido estudiado, Akubugwo *et al.*, (2007) publicaron que la hoja de *Amaranthus hybridus* L. contiene minerales importantes en altas concentraciones, tales como el Magnesio, Potasio y Calcio, como se muestra en el Cuadro 1; también para el ácido ascórbico (Vitamina C) reportaron el valor más alto en comparación con otras vitaminas (Cuadro 2).

Cuadro 1 Composición mineral de las hojas de *Amaranthus hybridus* L.

Mineral	Composición (mg/100 g)
Sodio (Na)	7.43
Potasio (K)	54.20
Calcio (Ca)	44.15
Magnesio (Mg)	231.22
Hierro (Fe)	13.58
Zinc (Zn)	3.80
Fosforo (P)	34.91

(Akubugwo *et al.*, 2007)

Cuadro 2. Composición de vitaminas de las hojas de *Amaranthus hybridus* L.

Vitamina	Composición (mg/100 g)
β -Caroteno (Vitamina A)	3.29
Tiamina (Vitamina B ₁)	2.75
Riboflavina (Vitamina B ₂)	4.24
Niacina (Vitamina B ₃)	1.54
Piridoxina (Vitamina B ₆)	2.33
Ácido ascórbico (Vitamina C)	25.40
α -Tocoferol (Vitamina E)	0.50

(Akubugwo *et al.*, 2007)

En cuanto a la composición fitoquímica de las hojas de *A. hybridus*, Akubugwo *et al.* (2007) reportaron valores altos de ácido hidrocianico y valores bajos de fenoles y flavonoides (Cuadro 3). También las hojas de *A. hybridus* son buena fuente de aminoácidos, tales como: Ácido aspártico, Ácido glutámico y Leucina, (Cuadro 4).

Cuadro 3. Composición fitoquímica de las hojas de *Amaranthus hybridus L.*

Fitoquímicos	Composición (mg/100 g)
Alcaloides	3.54
Flavonoides	0.83
Saponinas	1.68
Taninos	0.49
Fenoles	0.35
Ácido hidrocianico	16.99
Ácido fítico	1.32

(Akubugwo *et al.*, 2007)

Cuadro 4. Composición de aminoácidos de las hojas de *Amaranthus hybridus L.*

Aminoácido	Concentración (g/100g proteína)	Aminoácido	Concentración (g/100g proteína)
Isoleucina	3.39	Valina	3.50
Leucina	6.70	Histidina	2.15
Lisina	3.03	Alanina	3.35
Metionina	1.76	Arginina	3.94
Cisteína	0.46	Ácido aspártico	5.40
Aminoácidos sulfurosos		Ácido glutámico	15.79
totales (TSAA)	2.22		
Fenilalanina	4.00	Glicina	3.81
Tirosina	3.05	Prolina	3.43
Aminoácidos aromáticos		Serina	3.04
totales (TARAA)	7.05		
Treonina	2.62		

(Akubugwo *et al.*, 2007)

Las diversas formas en que se consumen las hojas de amaranto, como otras plantas, varía de acuerdo a la región o a la época del año, ya que en algunos lugares se consumen en tacos, quesadillas, cocinadas combinadas con otros alimentos, hervidas en agua como caldos, preparadas como infusión con fines medicinales, frescas como ensalada, e incluso hasta en platillos muy sofisticados (Sotelo *et al.*, 2007). Mucho se ha investigado sobre su composición, sin embargo

no hay información documentada sobre los cambios o pérdida de estos componentes a causa de la cocción, además, otro aspecto importante a considerar acerca de la composición química de las hojas de amaranto es la etapa de maduración en la que éstas son consumidas.

Una investigación realizada sobre la influencia de diferentes condiciones de temperatura, durante la maduración de varias especies de amaranto en su calidad nutricional, revela que los valores del contenido nutrimental de las hojas varían de acuerdo a la etapa de maduración y a las condiciones ambientales durante el crecimiento de la planta. Se recomienda que para obtener el mayor beneficio nutrimental es mejor que la planta de amaranto crezca bajo condiciones cálidas y es preferible el consumo de hojas tiernas, es decir en una etapa temprana de maduración (Modi, 2006).

En los últimos veinte años ha existido un aumento notorio en la investigación y producción de amaranto en América, Asia, África, y varios países del Este de Europa. El amaranto es sembrado y utilizado en los Estados Unidos, donde las semillas se combinan con granos de trigo y maíz, en productos para desayuno, panes, harina de panqueques y pasta. En África, el amaranto es consumido como verdura, mientras que en otros países, como en Rusia, el amaranto silvestre es usado como forraje. En China se usa el amaranto cultivado para grano y forraje (Jacobsen *et al.*, 2002).

El género *Amaranthus* comprende alrededor de 50 especies, la mayoría de ellas son de origen tropical y se han distribuido alrededor del mundo, aún en zonas templadas. Algunas de estas especies, reciben el nombre común de amaranto, y son cultivadas por su grano (*A. hypochondriacus* L., *A. cruentus* L., *A. caudatus* L. = *A. edulis* Speg.) o para consumir la hoja (*A. mantegazzianus* Pass. *A. tricolor* L. = *A. gangeticus* L., *A. viridis* L., *A. gracilis* Desf. *A. blitum* L. = *A. lividus* L.) y otras son malezas (*A. hybridus* L., *A. powelli* S.Watt., *A. retroflexus* L., *A. spinosus* L.). Las zonas de producción y cultivo de amaranto son las mismas de la época precolombina. Puebla es el mayor productor de amaranto en México con

el 51 % de la producción total nacional. Le sigue Morelos, 22 %; Tlaxcala, 18 %; el Distrito Federal, 9 %; Estado de México, 6 % y Guanajuato con el 2 % (Cervantes, 2007).

En su totalidad, las siembras comerciales en México, se realizan con variedades criollas, las cuales se han clasificado en tipos agronómicos dependiendo de los usos y las características morfológicas de la planta. La variedad Revancha (Figura 1) pertenece a la raza Mercado de la especie *Amaranthus hypochondriacus* L.



Figura 1. Planta de *Amaranthus hypochondriacus* L. variedad Revancha Parcela demostrativa INIFAP, Álvarez, Pedro Escobedo, Querétaro

Es una variedad de ciclo vegetativo intermedio, la madurez fisiológica ocurre en promedio en 130 días, esta variedad es de porte intermedio, su altura varía de 101 a 162 cm, según el manejo agronómico del cultivo, se cultiva actualmente en valles altos de los estados de Hidalgo, Estado de México, Puebla y Tlaxcala, comprendidos en la zona templada con altura mayor a los 2240 msnm,

aunque también tiene buen comportamiento en regiones semitropicales como Guanajuato, Morelos y Querétaro (Espitia, 1994).

Para elegir el lugar de la siembra hay que tomar en cuenta algunas consideraciones; el amaranto es muy sensible a los suelos pesados, ya que éstos afectan el desarrollo de las raíces y consecuentemente el crecimiento de la planta. Los suelos con buen drenaje son los más recomendables para este cultivo (Espitia, 1994).

Desde el punto de vista fotosintético, las plantas presentan altas eficiencias de uso de la radiación por pertenecer al grupo de plantas que fijan el anhídrido carbónico por la llamada *vía del C₄*, por consiguiente se desarrollan bien en condiciones adversas de temperaturas altas y suelos salinos (Lozoya, 1999).

2.2 Generalidades de algunos componentes de la hoja de amaranto

Las hojas de amaranto tienen un alto contenido de calcio y magnesio debido a la gran cantidad de ácido oxálico que poseen las plantas en crecimiento. Las hojas presentan mayores contenidos de nutrientes similares a muchas hortalizas de hoja tales como acelga, espinaca, verdolaga, etc., (Cuadro 5) mostrando alto contenido de proteínas, fósforo, hierro, calcio y vitaminas como vitamina C, retinol, y niacina (Saunders y Becker, 1994).

Cuadro 5. Composición de las hojas del amaranto comparado con la espinaca^a

Componente	Amaranto	Espinaca
Materia seca (g)	13,1	9,3
Energía (cal)	36	26
Proteína (g)	3,5	3,2
Grasa (g)	0,5	0,3
Carbohidratos	6,5	4,3
Total (g)	1,3	0,6
Fibra (g)		
Cenizas (g)	2,6	1,5
Calcio (mg)	267	93
Fósforo (mg)	67	51
Fierro (mg)	3,9	3,1
Sodio (mg)	---	71
Potasio (mg)	411	470
Vitamina A (IU)	6100	8100
Tiamina (mg)	0,08	0,10
Riboflavina (mg)	0,16	0,20
Niacina (mg)	1,4	0,6
Vitamina C (mg)	80	51

^a Componentes por 100 g de porción comestible
Saunders y Becker, 1994

A) Metabolitos secundarios

Polifenoles: Desde el punto de vista químico, los compuestos fenólicos se definen como sustancias que poseen un anillo aromático unido a uno o más sustituyentes hidroxilo, incluyendo sus derivados funcionales (ésteres, metil ésteres, glucósidos, etc.). Los compuestos fenólicos protegen a las plantas contra los daños oxidativos y llevan a cabo la misma función en el organismo humano. El efecto principal de los compuestos fenólicos es su habilidad para bloquear la acción de enzimas específicas que causan inflamación. Los fenoles comúnmente en los alimentos son cumarinas, taninos, antocianinas, isoflavonas, flavononas, flavonoles y sus glucósidos. Los compuestos fenólicos son esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas; algunos investigadores los han considerado como factores antinutricionales; sin embargo recientemente debido a sus propiedades benéficas (antioxidantes, antimutagénicas y/o anticarcinogénicas) se recomienda su consumo. Algunos de los factores antinutricionales es posible disminuirlos con procesos comunes como tratamiento térmico y remojo (Sotelo *et al.*, 2007).

Las isoflavonas como la glicosil isovitexina, aisladas de las hojas verdes de la cebada producen efecto inhibitorio de la peroxidación lipídica, junto con la luteolina, la orientina, la gardenina, la daticisteina y la quercetina. La cuprofilina (complejo de la clorofila) de las espinacas, el brócoli y las coles de Bruselas protege frente a la arterioesclerosis (Balasundram *et al.*, 2006).

B) Minerales

Los minerales son elementos químicos simples cuya presencia e intervención es imprescindible para la actividad de las células. Su contribución a la conservación de la salud es esencial. Se conocen más de veinte minerales necesarios para controlar el metabolismo o que conservan las funciones de los diversos tejidos. Se pueden dividir a los minerales en tres grupos (Badui, 2006):

- Los macroelementos que son los que el organismo necesita en mayor cantidad: calcio, fósforo, magnesio, potasio y sodio
- Los microelementos que se necesitan en menor cantidad: zinc, flúor, hierro, yodo.
- Los oligoelementos o elementos traza

En los últimos 50 años, elementos traza como el cromo, selenio o el zinc han surgido en una nueva categoría como elementos indispensables. En la actualidad son considerados 10 elementos (cobre, selenio, zinc, hierro, manganeso, molibdeno, cromo, flúor, yodo, cobalto) y 13 vitaminas (A, D, E, K, C, B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (niacina), B5 (ácido pantoténico), B6 (piridoxina), B8 (biotina), B9 (ácido fólico) y B12 (cobalamina) dentro de esta categoría (Hardy, 1999).

Al igual que en el caso de la vitaminas, ningún alimento posee todos los minerales en las cantidades suficientes para cubrir los requerimientos nutricionales del hombre y por ello la dieta ha de ser variada y equilibrada. También, como en el caso de las vitaminas, los excesos de algunos minerales producen alteraciones en el organismo (Olivares *et al.*, 2002).

En ningún caso los minerales pueden ser sintetizados por el organismo, es decir, son nutrientes esenciales. Aunque no se conoce con exactitud el papel de todos ellos en el organismo, de algunos se sabe que intervienen en las siguientes funciones (Zuliani *et al.*, 2005):

Función plástica: El calcio, fósforo, flúor y magnesio dan consistencia a la estructura ósea. El hierro es componente de la hemoglobina.

Función reguladora: El yodo forma parte de las hormonas tiroideas.

Transporte: El sodio y el potasio facilitan el transporte a través de la membrana celular.

Las hojas de amaranto poseen un alto contenido en calcio, hierro, magnesio, fósforo y vitamina A y C, lo que lo convierte en un buen complemento con los granos (Singh y Kumar, 2004).

Las hortalizas, como las espinacas son ricas en vitaminas A, B, C y E, potasio, calcio y fósforo. Por su alto contenido en zinc y ácido fólico, resultan muy adecuadas para ser consumidas durante el embarazo. El zinc, entre otras propiedades interviene en la formación de los huesos. Junto con las berenjenas, las espinacas son ricas en hierro, por lo que resultan muy adecuadas para combatir la anemia (Dogan y Tirasoglu, 2006).

La concentración de micronutrientes en los alimentos puede ser afectada por el tipo de suelo donde crecen, los fertilizantes, insecticidas y fungicidas usados, así como los contenedores donde son almacenados y procesados (Serralde *et al.*, 2005).

La disponibilidad de algunos elementos traza puede afectarse por las múltiples interacciones antagónicas sobre la absorción intestinal entre vitaminas y minerales: la vitamina C mejora la absorción del hierro, el zinc interactúa con la vitamina A y el hierro; mientras que el cobre, hierro y zinc compiten por el mismo transportador (metalotienina) y el hierro afecta la disponibilidad del cromo (Solomons, 1996).

La deficiencia de hierro resulta cuando su absorción es inadecuada para cubrir los requerimientos del cuerpo, lo cual ocurre cuando el aporte es pobre en la dieta, cuando existe crecimiento rápido o pérdidas sanguíneas; con importantes efectos deleterios a la salud del individuo (Craig, 1994).

La vitamina C es un potente promotor de la absorción del hierro (Cook, 1977). Algunos estudios han encontrado niveles de hierro adecuados en vegetarianos que podrían consumir vegetales ricos en hierro y bajos en sustancias que puedan inhibir su absorción, además de incluir alimentos con alto contenido

de ácido ascórbico y aminoácidos como la cisteína (leche y huevo) que se sabe mejoran la absorción del hierro (Dwyer, 1991).

Las fuentes más importantes de hierro son el trigo y cereales, leguminosas, vegetales de hoja verde, nueces, semillas y frutas secas.

El magnesio se relaciona con el funcionamiento de intestino, nervios y músculos. Además, forma parte de huesos y dientes, mejora la inmunidad y posee un suave efecto laxante (Serralde *et al.*, 2005).

El potasio, al igual que el sodio, es un mineral necesario para la transmisión y generación del impulso nervioso y para la actividad muscular normal. Regula también el equilibrio de agua dentro y fuera de la célula. El fósforo tiene una importante función estructural. Forma parte de huesos y dientes y colabora en los procesos de obtención de energía. El yodo es indispensable para el buen funcionamiento de la glándula tiroidea, que regula el metabolismo (Olivares *et al.*, 2002).

El calcio contenido en los vegetales tiene menor disponibilidad, se absorbe cinco veces menos que el calcio contenido en los lácteos por el alto consumo de fibra, ácido oxálico y ácido fítico (Weaver y Plaweczy, 1994).

Los cereales son la fuente primaria de zinc. Se ha reportado que más de 200 enzimas son dependientes de este mineral y participan en procesos como la regulación ácido-base, el metabolismo de los aminoácidos, síntesis de ácidos nucleídos y proteínas y disponibilidad de folatos. Es importante para el funcionamiento del sistema inmunológico y reproductivo y el desarrollo y función del sistema nervioso central.

La Organización Mundial de la Salud (WHO, 1996), clasificó las dietas de acuerdo a la disponibilidad del zinc según la proporción molar que guarda con el fitato (fitato/zinc): alta disponibilidad (absorción 50-55 %), descritas como dieta

refinada, baja en fibra con una proporción fitato/zinc < 5 ; disponibilidad moderada (absorción 30-35 %) con relación fitato/zinc 5-15 y disponibilidad baja (absorción 15 %) con relación fitato/zinc molar > 15 que son dietas ricas en cereales integrales; y que requiere más de 50 % de zinc que en los no vegetarianos (Hunt y Roughead, 1999).

La ingestión de cobre y manganeso son mayores en los vegetarianos porque consumen alimentos ricos en estos minerales como cereales enteros (los refinados los pierden durante la refinación), semillas, leguminosas, nueces y vegetales verdes (Gibson, 1994).

Los productos animales, sobre todo los que provienen del mar tienen mayor concentración de selenio que las plantas. El pescado, hígado, riñón y nueces de Brasil tienen alto contenido de selenio y es bajo en frutas y verduras (Serralde *et al.*, 2005).

2.3 Efecto de los métodos de cocción en los vegetales

La mayoría de los vegetales son comúnmente cocinados antes de ser consumidos, es conocido que los tratamientos de cocción inducen cambios significativos en la composición química, influyendo en la concentración y biodisponibilidad de compuestos bioactivos en los vegetales (Miglio *et al.*, 2008).

Métodos de cocinado, tales como la cocción, freído, cocción por microondas, pueden afectar profundamente la textura y el valor nutricional de los vegetales. Algunos estudios han demostrado que la pérdida de algunos nutrientes en los vegetales debido a la cocción varía de acuerdo al tratamiento de cocción que sea empleado. Los vegetales contienen compuestos antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos, que dependiendo del método de cocción al que sean sometidos, éstos compuestos se verán afectados o disminuidos (Jiménez *et al.*, 2009).

Es una creencia convencional de que los vegetales cocidos tienen un valor nutricional inferior que en estado fresco, principalmente debido a la pérdida del contenido de vitaminas y otros nutrientes durante en el tratamiento de cocción (Danesi y Bordoni, 2009).

La literatura ha mostrado que los métodos domésticos de cocción pueden resultar en pérdidas significativas en la composición y biodisponibilidad de compuestos antioxidantes; compuestos como el ácido ascórbico y los carotenoides son muy sensibles al calor y al almacenamiento. En contraste los flavonoides y polifenoles han mostrado cierta estabilidad cuando son expuestos a altas temperaturas, una cualidad que es reflejada en la preservación de su capacidad antioxidante (Faller y Fialho, 2008).

Es evidente que existe un cambio en la composición nutricional de los vegetales después de ser cocinados, debido a que algunos compuestos presentes en los vegetales son termolábiles.

Existe una amplia variedad de métodos de cocción para los vegetales, que los cuales varían de acuerdo a la región o costumbres de los comensales, algunos de ellos incluyen la adición de otros ingredientes para la elaboración de platillos, generalmente los medios de cocción más usados para cocer vegetales son el vapor de agua, agua caliente o incluso aceite vegetal, dependiendo del platillo.

III. JUSTIFICACION

Las hojas de amaranto son una fuente importante de nutrientes, sin embargo la inmensa diversidad de especies estudiadas no incluyen variedades mexicanas. Hasta ahora los estudios realizados con hojas de amaranto comprenden de manera aislada su composición nutricional en estado fresco, sin considerar que, al igual que el resto de los vegetales, se consumen cocidas.

Normalmente el amaranto no es cultivado en las zonas de valle del estado de Querétaro, debido a esto, las plantas de la variedad Revancha pudieron desarrollar una mayor concentración de metabolitos secundarios, durante su crecimiento, los cuales podrían contribuir a una alta capacidad antioxidante de las hojas.

Por lo tanto es importante realizar una investigación completa que abarque la determinación del contenido nutrimental, nutracéutico y la evaluación del efecto de los métodos de cocción más comúnmente usados para los vegetales, aplicados a la hoja de *Amaranthus hypochondriacus* L. variedad Revancha.

Los resultados del presente estudio ofrecen información valiosa, para los comensales, de un alimento que puede cubrir satisfactoriamente sus necesidades nutricionales, así como un panorama de cómo los diferentes parámetros fisicoquímicos de los métodos de cocción pueden afectar el valor nutricional y nutracéutico de las hojas de amaranto.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar el efecto de 5 métodos de cocción sobre el contenido de nutrientes, metabolitos secundarios y actividad antioxidante de las hojas de *Amaranthus hypochondriacus* L. variedad Revancha usando como control el contenido y actividad de la hoja cruda.

Objetivos específicos:

Para evaluar el efecto de los métodos de cocción se plantean los siguientes objetivos específicos para las hojas crudas, blanqueadas, cocidas al vapor al vapor, salteadas, fritas y escaldadas al vapor:

- Analizar los parámetros de color de las hojas crudas y cocidas para evaluar el efecto de los métodos de cocción sobre el color final de las hojas.
- Determinar el composición proximal y contenido de minerales de las hojas cocidas por los 5 métodos, comparar los datos que se obtengan para identificar el método que causa menor decremento de nutrientes y minerales respecto a valores de la hoja cruda.
- Cuantificar ácidos fenólicos y flavonoides por HPLC en las hojas crudas y cocidas por los 5 métodos de cocción.
- Determinar la capacidad antioxidante de las hojas cocidas y crudas por el ensayo de FRAP, ABTS y capacidad quelante para evaluar que método de cocción reduce mayormente dicha capacidad.

V. MATERIALES Y METODOS

5.1 Material Biológico

Las hojas de amaranto variedad Revancha se colectaron de una parcela demostrativa del INIFAP en la comunidad de Álvarez del municipio Pedro Escobedo del Estado de Querétaro. El sitio consistió de una superficie de 5,000 m² donde el suelo predominante en esta región es de tipo arcilloso. El día 18 de abril de 2008 se sembró *Amaranthus hypochondriacus L.* variedad Revancha. La siembra se realizó manualmente, la distancia de siembra entre surcos fue de 0.80 m. La fertilización consistió en aplicar 100 Kg de nitrógeno y 40 Kg de fósforo por hectárea.

El día 14 de junio de 2008, a los 57 días después de la siembra, cuando las plantas tuvieron un promedio de 0.80 m de altura, se cortaron, a igual altura, hojas de 80 plantas, seleccionadas al azar en todo el lote.

La hoja en etapa tierna, comprendida entre los 50 y 60 días después de la siembra, generalmente es apta para consumo humano y también es empleada como alimento para cerdos, pollos o chivos.

5.2 Material Químico

Para la determinación de la composición proximal y contenido de minerales los reactivos empleados de grado analítico fueron: sulfato de potasio, sulfato de cobre, ácido sulfúrico, ácido bórico, rojo de metilo, verde de bromocresol, caseína, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, éter, ácido nítrico, ácido perclórico, lantano, metanol y estándares certificados de los minerales: Sodio, Potasio, Magnesio, Calcio, Hierro, Zinc y Fósforo.

Para la determinación de la capacidad antioxidante y cuantificación de flavonoides y ácidos fenólicos los reactivos de grado analítico empleados fueron:

reactivo de Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio, nitrito de sodio, reactivo de FRAP, acetato de sodio, 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), cloruro férrico, ácido clorhídrico, metanol, sulfato de hierro, cloruro ferroso, ferrozina, ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzoazolina-6-sulfónico (ABTS), EDTA, acetonitrilo, ácido acético y estándares certificados grado HPLC de los ácidos gálico, p-cumárico, protocatecuico, cafeico, rosmarínico y de los flavonoides: rutina, quercetina, catequina, hesperidina, miricetina, luteolina, apigenina, naringenina, hesperetina y Kampferol.

La Figura 2 muestra la metodología que se siguió para la realización del proyecto.

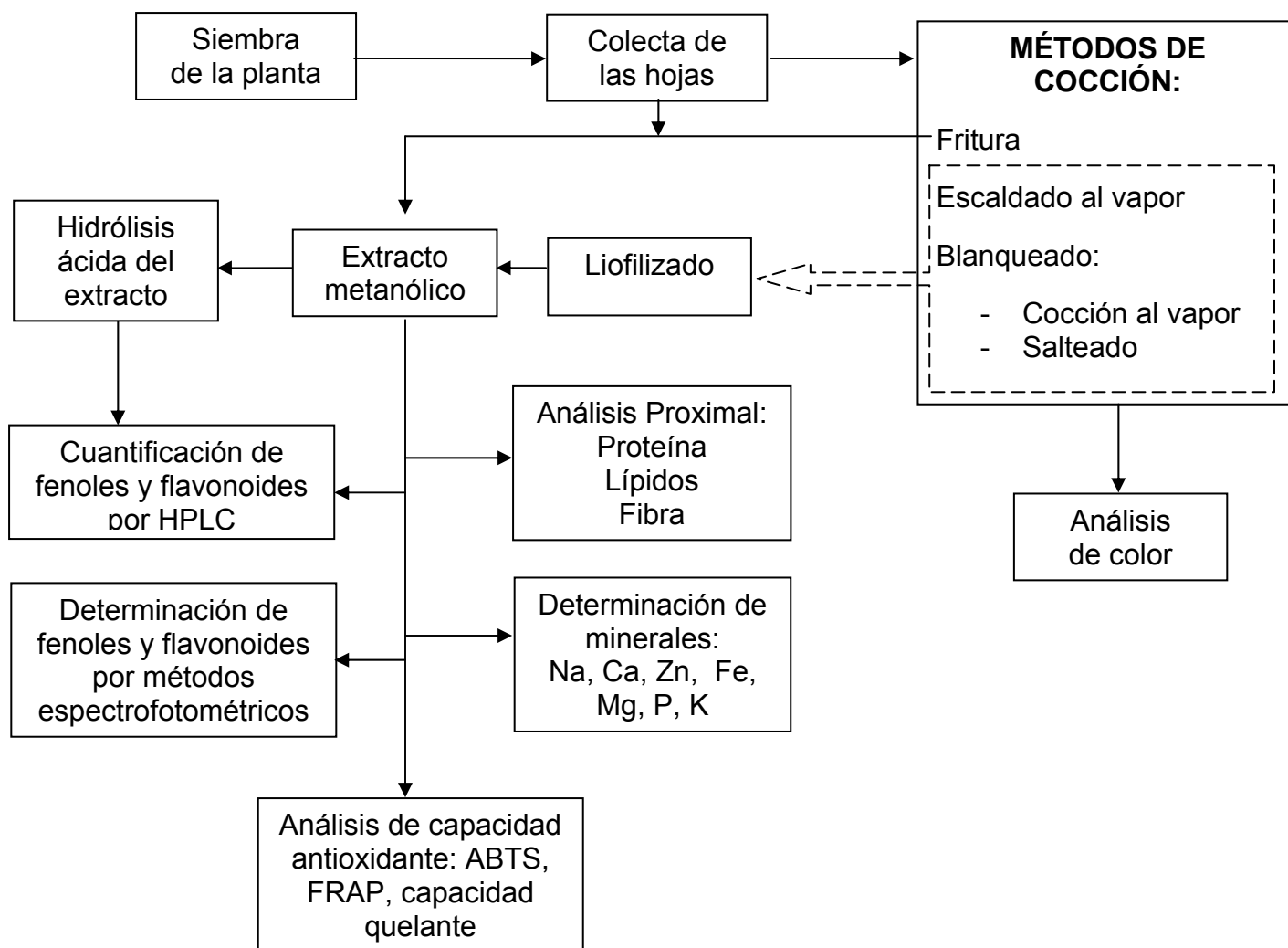


Figura 2 Metodología experimental del proyecto

5.3 Métodos de cocción

Una vez que se colectaron las hojas se eliminó toda la materia extraña, como basura o tierra, se seleccionaron las hojas menores a 12 cm de largo, ya que de este tamaño son las hojas que generalmente se destinan para consumo humano, y se les retiró el tallo. Una vez listas las hojas, se mezclaron homogéneamente y se dividieron en seis porciones iguales de 30 g. Cinco porciones se destinaron para ser cocinadas y una porción se conservó en crudo. La Figura muestra el proceso que se siguió para realizar los métodos de cocción.

Todos los métodos de cocción se realizaron en el Instituto Gastronómico de Estudios Superiores con la colaboración del Licenciado en Gastronomía Alfredo del Río Gallardo (IGES S.C.).

La preparación que todas las hojas recibieron antes de ser cocinadas fue un lavado con agua abundante y desinfección con una solución bactericida, cuyo ingrediente activo es plata coloidal, por inmersión durante 10 minutos.

A) Escaldado al vapor

El proceso de escaldado consistió en exponer las hojas, dentro de una coladera, al vapor emitido por agua hirviendo (97° C), en un recipiente de aluminio durante 2 minutos.

B) Fritura profunda

El exceso de agua en las hojas se eliminó usando papel absorbente, posteriormente se sumergieron en aceite vegetal comestible caliente (190° C) hasta que la hoja se volviera crujiente; el tiempo dependió del tamaño de la hoja y se realizó en una sartén de acero inoxidable.

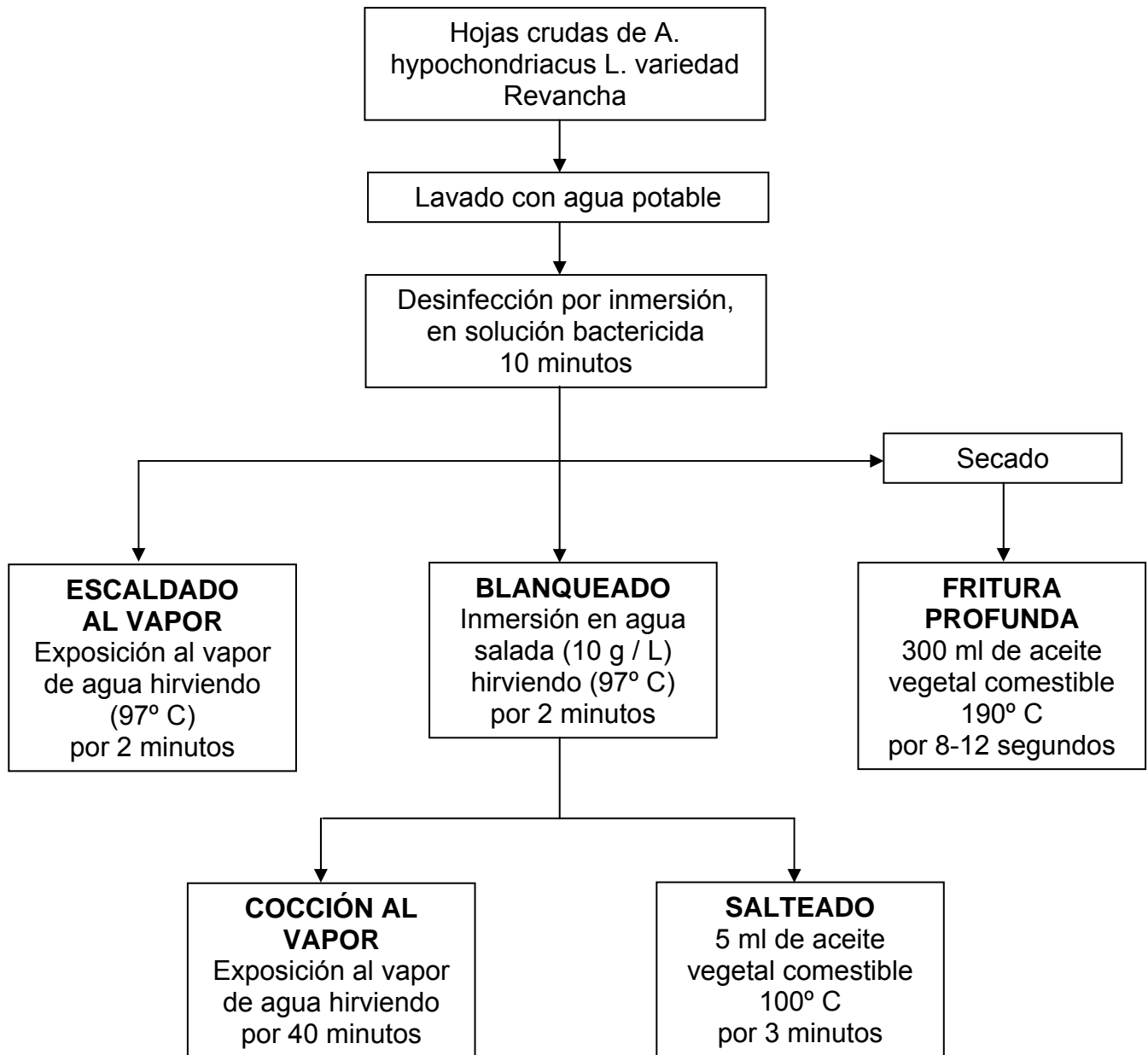


Figura 3 Diagrama de flujo de los métodos de cocción

C) Blanqueado

Para blanquear las hojas, se sumergieron 2 minutos en agua hirviendo (97° C), ligeramente salada, (10 g de sal común / litro de agua) en un recipiente de acero inoxidable. Después de este tiempo se pasaron por un baño de agua corriente fría (25° C / 15 segundos) para detener la cocción.

D) Blanqueado-Cocción al vapor

El proceso de cocción al vapor se realizó en una vaporera de aluminio cuya parrilla es perforada, y así las hojas se cocieron al vapor; las hojas fueron blanqueadas previamente a la cocción, se formaron rollos con la hoja extendida y se rellenaron también de hojas; la cocción al vapor fue durante 40 minutos a fuego medio.

E) Blanqueado-Salteado

Hojas previamente blanqueadas, se saltearon en una sartén de acero inoxidable con una cucharada (5 ml) de aceite vegetal comestible caliente (aproximadamente a 100° C) durante 3 minutos.

5.4 Medición de color

La determinación de los parámetros de color se efectuó en el laboratorio de Propiedades Fisicoquímicas del CINVESTAV Unidad Querétaro, empleando un colorímetro portátil MiniScan de Hunter Lab Reston Virginia EUA, que mide, entre otros, el color de las superficies, simulando la luz del día iluminado y cuyo principio se basa en registrar la intensidad de la luz absorbida por el color negro y la reflejada por el color blanco, así como la descomposición de la luz en los colores: rojo, azul, amarillo y verde.

El método se basa en la determinación por reflexión de la luz de tres parámetros; L^* , que mide el grado de la luminosidad y varía de 100 para el blanco perfecto a 0 para el negro; a^* y b^* , son indicativos de la cromaticidad, los valores positivos de a^* están relacionados con el color rojo y los negativos con el color verde; mientras que los valores positivos del parámetro b^* están asociados con el color amarillo y los negativos con el azul. Las mediciones de las hojas se

realizaron por duplicado y en diferentes puntos de la misma, se usó como referencia una teja blanca, para la calibración del equipo.

La fórmula empleada para calcular el valor del ángulo matiz fue:

$$\tan^{-1}(a^* / b^*) + 180^\circ$$

ya que los valores obtenidos para los parámetros de color a^* y b^* se encuentran en el segundo cuadrante del círculo cromático, el cual abarca los colores amarillo a verde. Posteriormente el valor de cromaticidad fue calculado con la fórmula:

$$\sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

5.5 Liofilización de las muestras.

Las hojas crudas y las que fueron sometidas a los tratamientos de cocción, excepto las de fritura profunda, fueron congeladas a -70°C por 24 horas, posteriormente se introdujeron en la liofilizadora durante 96 horas, ya liofilizadas las hojas cocidas se guardaron en recipientes herméticos y se conservaron en refrigeración hasta el momento de su análisis. Las hojas fritas se mantuvieron a -11°C para evitar su oxidación, hasta el momento en que fueron analizadas.

5.6 Análisis bromatológico

El análisis proximal de las hojas se realizó en la Unidad de Servicios Químicos de la Facultad de Química de la UAQ. Las muestras fueron analizadas por triplicado y en base a los métodos de la AOAC (1995), para determinar contenido de humedad, cenizas, proteína, fibra, grasas y minerales.

A) Determinación de Proteína (AOAC – 978.04)

El contenido proteico de los alimentos puede estimarse a partir del contenido de nitrógeno orgánico siguiendo el procedimiento de Kjeldahl. Este

consistió en pesar 0.2 g de la muestra, se colocó en los tubos de digestión y se le agregaron 10 g de sulfato de potasio, 60 mg de sulfato de cobre y 15 ml de ácido sulfúrico concentrado a cada tubo. Posteriormente los tubos se colocaron en el digestor, se calentaron desde 100° a 400° C y se taparon con el sistema de vacío funcionando por 2 horas. Después se dejaron atemperar y se introdujeron uno a uno en el destilador. El producto destilado se recibió en una solución indicadora con 25 ml de ácido bórico y como indicador rojo de metilo y verde de bromocresol. Posteriormente el volumen destilado se tituló con ácido clorhídrico 0.1 N. Se utilizó un control de caseína.

Cálculos: % de proteína = %N x F

Donde F = 6.25 (factor) y % N = 0.014 x A x B x (100 / g de muestra), A corresponden a los ml de ácido clorhídrico gastados en la titulación y B es la normalidad del ácido clorhídrico.

B) Determinación de cenizas (AOAC - 930.05)

El concepto de cenizas se refiere al residuo que queda después de la combustión (incineración) completa de los componentes orgánicos de un alimento en condiciones determinadas.

Se utilizó un crisol previamente secado y llevado a peso constante, se registró el peso del crisol vacío (A). Se pesaron 0.5 g de la muestra en el crisol y se registró el peso (B), después se colocó sobre la parrilla y se quemó la muestra lentamente (evitando la proyección) hasta su carbonización total. Posteriormente se colocó dentro de la mufla a 550° C y se efectuó la calcinación completa durante 6 horas, hasta que las cenizas fueron blancas o ligeramente grisáceas, después se sacó el crisol y se dejó enfriar dentro del desecador hasta temperatura ambiente. El peso del crisol con las cenizas también se registró (C).

Cálculos y expresión de resultados:

% cenizas totales = $(C - A) \times 100 / B$ ó

g cenizas / 100g muestra = $(C - A) \times 100 / B$

C = peso del crisol con cenizas en g

A = peso del crisol en g

B = peso de la muestra en g

C) Determinación de fibra cruda (AOAC – 930.10)

Este método se basa en la digestión ácida con ácido sulfúrico seguida por una digestión alcalina con hidróxido de sodio, después de haber desengrasado la muestra, lo que elimina las grasas y proteínas resultando un residuo comestible formado principalmente de celulosa y lignina (hidratos de carbono no digeribles) que en su conjunto se le denomina fibra cruda.

Se pesaron 0.5 g de la muestra libre de grasa en un vaso de precipitado y se agregaron 200 ml de ácido sulfúrico 0.255N caliente. Después se colocó el vaso sobre la parrilla eléctrica para que hirviera 30 minutos, el vaso se giró periódicamente para evitar que los sólidos se adhieran a las paredes. Se retiró el vaso y se filtró la solución caliente a través de papel filtro. El residuo vertido sobre el papel se transfirió al vaso inicial con ayuda de 200 ml de hidróxido de sodio 0.313 N caliente y se llevó a ebullición durante 30 minutos. El vaso se retiró del plato y se filtró inmediatamente sobre un Buchner con papel filtro previamente pesado y de cenizas conocidas. El residuo se lavó con agua caliente. El residuo retenido en el papel se transfirió a un crisol, previamente puesto a peso constante y se secó en la estufa a 100° C durante 2 horas. Posteriormente se dejó enfriar en el desecador y se determinó su peso. Se colocó en mechero hasta su total carbonización. Después se colocó en la mufla de a 600° C hasta que el contenido fue de color blanco (aproximadamente 1 hora), se retiró de la mufla, se pasó a la

estufa, se dejó enfriar en el desecador y se pesó. Se corrió un blanco de reactivos en forma alterna con la muestra.

Cálculos y expresión de resultados:

$$\% \text{ Fibra cruda} = \{ [(Ps - Pp) - (Pcp - Pc) - Pb] / M \} \times 100$$

Ps = masa en g del residuo seco a 100° C más la masa del papel

Pp = masa en g del papel filtro

Pcp = masa en g de las cenizas del residuo + masa en g del crisol

Pb = masa en g del residuo del blanco

M = masa de la muestra en g

D) Determinación de Extracto etéreo (método Soxhlet) (AOAC – 930.09)

El método Soxhlet utiliza un sistema de extracción cíclica de los componentes solubles en éter que se encuentran en los alimentos. Se pesaron 0.2 g de muestra finamente dividida en el cartucho y se cubrieron con una porción de algodón. El cartucho se colocó dentro del extractor Soxhlet. En la parte inferior se ajustó un matraz y en la parte posterior el refrigerante. Se añadió éter por el extremo superior del refrigerante en cantidad suficiente (aproximadamente 90 ml) para tener de 2 a 3 descargas del extractor. Se hizo circular agua fría por el refrigerante y se calentó el sistema hasta que se obtuvo una frecuencia de 2 gotas / segundo. La extracción se realizó durante 6 horas, después de este tiempo se suspendió el calentamiento. Se dejó evaporar el éter del matraz y se secó a 105° C hasta peso constante.

Cálculos y expresión de los datos:

$$\% \text{ de E.E.} = [(P - p) / M] \times 100$$

P = masa en g del matraz con grasa

p = masa en g del matraz sin grasa

M = masa en g de la muestra

E) Determinación de minerales: Calcio, Hierro, Zinc, Magnesio, Sodio, Potasio, Fósforo (AOAC – 975.03)

Para la determinación de minerales se utilizó una oxidación húmeda con dos ácidos, nítrico concentrado para hacer una predigestión eliminando los grupos OH de los carbohidratos de la materia orgánica y perclórico (70 %) para lograr una oxidación completa. Los minerales se cuantificaron en un analizador de espectroscopía atómica con emisión de plasma. En cada corrida se utilizaron estándares certificados de cada mineral.

Se llevó a cabo la predigestión de 0.5 mg de muestra con 4 ml de ácido nítrico y se dejó reposar toda la noche. Posteriormente, se digirió por una hora a 100° C en una placa digestora y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. A continuación se le añadió 2 ml de ácido perclórico y se continuó la digestión a 160° C hasta que la solución presentó un aspecto claro. Después de enfriar, se aforó a 50 ml con agua desionizada. Para determinar Hierro y Zinc se leyó la absorbancia de la solución a 248.3 y 213.9 nm, respectivamente. Para las determinaciones de calcio, la muestra se diluyó nuevamente tomando 0.5 ml y adicionando 2.5 ml de lantano al 5 % y 7 ml de agua desionizada y se leyó la absorbancia a 422.7 nm.

5.7 Obtención de extractos metanólicos

Se pesaron 500 mg de la hoja liofilizada, se agregaron 10 ml de metanol al 70 % y se agitó durante 12 horas, pasado este tiempo se decantó el solvente y se centrifugó a 9000 rpm durante 10 minutos, y el sobrenadante se aforó a 10 ml (Figura 2).



Figura 4. Extractos metanólicos de hojas cocidas de *Amaranthus hypochondriacus* L. variedad Revancha

5.8 Determinación de metabolitos secundarios

A) Cuantificación de fenoles y flavonoides totales

El contenido total de fenoles de los extractos se determinó de acuerdo al método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Dewanto *et al.*, 2002). Las diluciones apropiadas de los extractos metanólicos fueron oxidadas con 250 μ l del reactivo de Folin-Ciocalteu 1N. Después de 5 minutos, 625 μ l de una solución de carbonato de sodio al 20 % se agregó para neutralizar por 2 horas. La absorbancia se leyó contra un blanco preparado a 760 nm. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por cada g. de hoja seca.

El contenido de flavonoides se determinó por el método descrito por Liu *et al.* (2002). Los extractos metanólicos fueron mezcladas con 75 μ l de una solución al 5 % de nitrito de sodio. Después de 6 minutos, 150 μ l de una solución de cloruro de aluminio al 10 % se añadieron y la mezcla se dejó reposar por otros 5 minutos.

Después se agregaron 0.5 ml de hidróxido de sodio 1M y suficiente agua destilada para alcanzar un volumen total de 2.5 ml.

La solución se mezcló bien, y la absorbancia se leyó, contra un blanco preparado, a 510 nm. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de (+)-catequina por cada g. de hoja seca.

B) Análisis HPLC de ácidos fenólicos y flavonoides

Los extractos metanólicos de las hojas cocinadas se filtraron a través de una membrana de filtración de 0.2 mm y 20 µl se inyectaron por triplicado en una columna de fase reversa (C18 Prep-Nova Pack HR, 60 Å, 6 µm, 3.9-300 mm), usando un sistema HPLC Waters (Waters Corporation, Milford, MA, USA), el cual consiste en una bomba cuaternaria (modelo 600), un detector de arreglo de diodo (modelo 996), un desgasificador de vacío en línea (MetaChem Technologies Inc.), y un inyector Rheodyne (4793).

El control del equipo, los datos comerciales, el proceso y el manejo de la información cromatográfica se realizó por el programa Millennium (Waters). La cuantificación se llevó a cabo por estandarización externa y se obtuvieron las curvas estándar.

Las condiciones cromatográficas para cuantificar ácidos fenólicos y flavonoides fueron: λ_{max} 280 nm; el gradiente de la fase móvil consistió de (A) MeOH, (B) Ácido acético 0.0125 N y (D) acetonitrilo. Ácido acético 0.0125 N. 95 %(B) y 5 %(D) a un flujo de 1 ml / min. El gradiente se programó como sigue: 0-2 min, 95 %B, 5 % D; 2-5 min, 95-85 % B, 5-15 % D; 5-20 min, 85-50 % B, 15-50 % D; 20-25min, 50-95 % B, 50-5 % D; 25-35 min, 95 % B, 5 % D.

Para realizar la hidrólisis ácida de cada extracto, se tomaron 5 ml del extracto metanólico y se le añadieron 10 ml de ácido clorhídrico 6M, se puso a reflujo por 2 horas a 95° C. Pasado este tiempo la solución se filtró usando filtros

de celulosa regenerada para jeringa con un poro de 0.45 μm , de la marca Agilent Technologies, posteriormente se inyectaron 20 μl en el sistema.

5.9 Determinación de la capacidad antioxidante

A) Poder antioxidante de reducción férrica. *Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)*.

Los valores FRAP se obtuvieron de acuerdo al método reportado por Firuzi *et al.* (2000). Previamente se preparó el reactivo de FRAP, una mezcla de 10 ml de solución amortiguadora de acetato de sodio 300 mM (pH 3.6), 1 ml de cloruro férrico 20 mM, 1 ml de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mM disuelta en ácido clorhídrico (HCl) 40 mM. Posteriormente, 25 μl de cada extracto se colocaron por cuadruplicado en una microplaca de 96 pozos (Nalge Nunc International, N.Y., U.S.A.). Después 175 μl de la solución FRAP recién preparada y tibia (37° C) se agregaron a tres pozos y el mismo volumen de la solución amortiguadora de acetato se añadió al cuarto pozo. Se leyó la absorbancia a 595 nm en un lector de microplaca Spectra Max (Molecular Devices Co., Sunnyvale, U.S.A.) a 0, 4, 10, 30 y 60 min. Se preparó el blanco y se obtuvo la curva estándar de sulfato de hierro. Los resultados fueron reportados como mg equivalentes de FeSO_4 / g de hoja seca.

B) Método ABTS

La determinación de la capacidad antioxidante de un compuesto expresada como equivalentes de Trolox se basa en la habilidad de un antioxidante para atrapar radicales libres. El método descrito por Nenadis *et al.* (2004) fue adaptado para su uso en microplaca. La disminución en absorbancia leída a 734 nm, 6 minutos después de añadir los extractos de las hojas se empleó para calcular el porcentaje de inhibición. En una placa se añadieron 20 μl de muestra y 230 μl de una solución de ABTS. La capacidad antioxidante de los extractos se reportó

como μmol equivalentes de Trolox / g de hoja seca y como porcentaje de inhibición del radical.

C) Capacidad Quelante

La capacidad quelante de Fe^{2+} fue obtenida de acuerdo al método descrito por Hinneburg *et al.* (2006). Brevemente, 30 μl del extracto fueron añadidos a 150 μl de FeCl_2 acuoso 2 mM. Después de 5 minutos, 60 μl de ferrozina 5 mM fueron añadidos. La absorbancia a 562 nm fue medida después de 10 minutos. Se obtuvo una curva de calibración con EDTA. La capacidad quelante se expresó como mM equivalentes de EDTA / g hoja seca.

5.10 Diseño y Análisis Estadístico.

Se planteó un diseño unifactorial (factor: método de cocción) en cinco métodos (escladado al vapor, fritura profunda, blanqueado, blanqueado-cocción al vapor, blanqueado-salteado) con 3 réplicas para cada tratamiento.

Los resultados fueron se reportaron como la media \pm Error Estándar (EE) Se realizo un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, para la comparación de medias de cada método de cocción con la hoja cruda por la prueba de Tukey con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$. Todos los datos se analizaron con el paquete estadístico JMP 5.0.1.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Medición de color

Los valores de color que se muestran en el Cuadro 6 corresponden a las hojas cocidas y crudas. L^* mide el grado de luminosidad, desde cero para negro hasta 100 para blanco. Comparando el valor de L^* de la hoja cruda (29.77) todos los métodos de cocción redujeron la luminosidad de las hojas; sin embargo no hay diferencia estadística significativa entre los métodos de cocción, es decir que todas las hojas cocinadas fueron más opacas que las crudas (Figura 5).

Cuadro 6 Valores para la determinación de color (L^* , a^* y b^*) de las hojas crudas y cocidas.^a

Tratamiento	L^*	a^*	b^*
Cruda	29.77+ .23 a	-5.68+ 0.13 b	10.21+ 0.26 ac
Escaldada	23.57+ .78 b	-4.48+ 1.04 ab	7.17+ 0.78 b
Frita	22.40+ .51 b	-2.51+ 0.34 a	4.64+ 0.29 c
Blanqueada	22.29+ .91 b	-4.22+ 0.93 a	6.48+ 0.54 b
Cocida	21.33+ .77 b	-1.90+ 0.58 ab	5.25+ 0.59 bc
Salteada	22.13+ .14 b	-2.35+ 0.37 a	4.23+ 0.15 c

^a Los valores son expresados en unidades colorimétricas y presentados como la media \pm EE. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa, prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

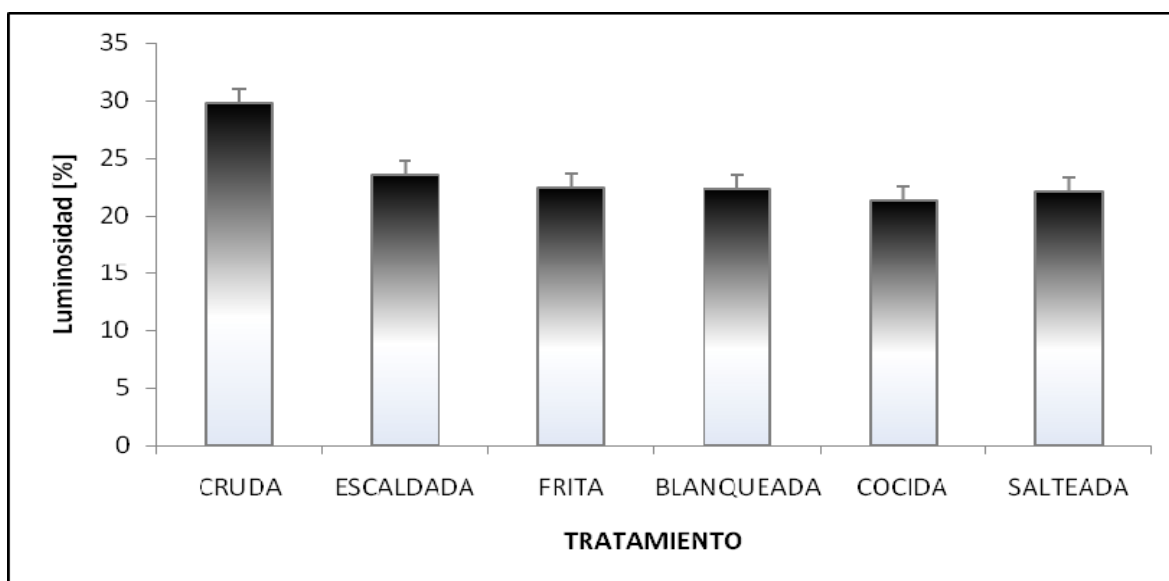


Figura 5. Efecto de los métodos de cocción en la luminosidad (L^*) de las hojas

Los valores de a^* y b^* son indicativos de la cromaticidad. Los valores negativos de a^* , están relacionados con el color verde, de acuerdo a los valores obtenidos con el colorímetro, se observa que las hojas fritas, cocidas al vapor y salteadas, cuyos valores de a^* son menos negativos que el valor de la hoja cruda, son menos verdes que las hojas crudas. Los valores positivos de b^* están relacionados con el color amarillo, los resultados nos muestran que las hojas fritas y salteadas resultaron ser menos amarillas que las hojas crudas. El color final de las hojas cocidas al vapor fue menos luminoso, verde más oscuro, y menos amarillo que las hojas crudas, debido a que el tiempo de cocción fue más prolongado que el de los otros tratamientos. (Figura 6).

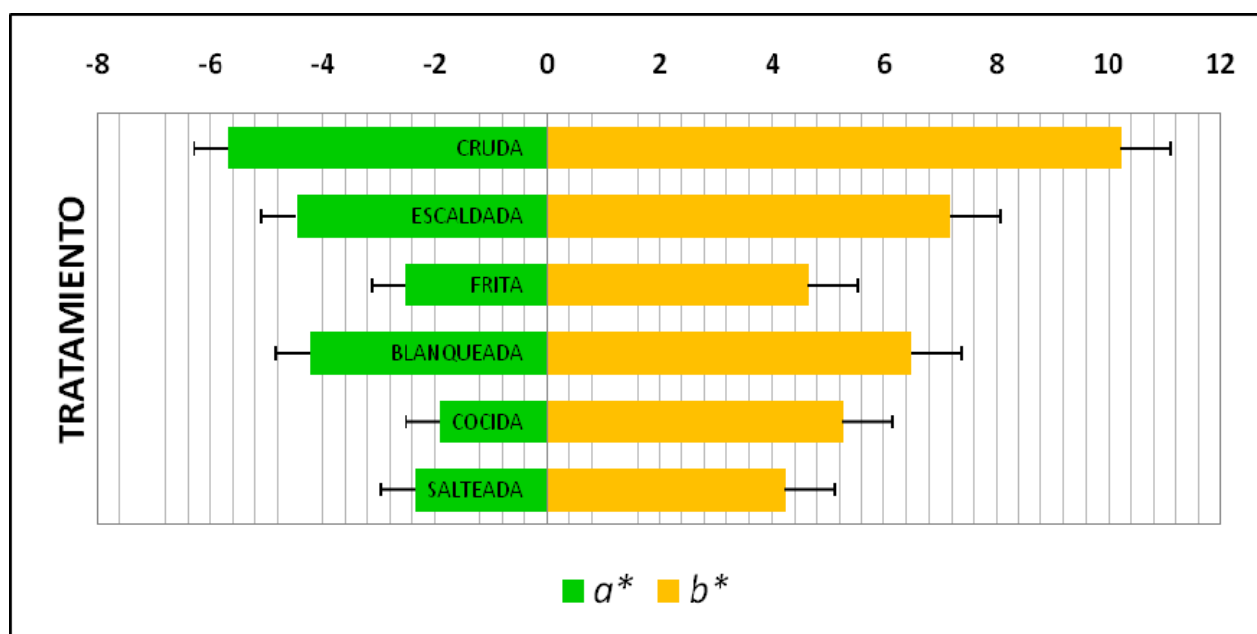


Figura 6. Efecto de los métodos de cocción en los valores para la determinación de color (a^* y b^*) de las hojas

Con los valores de a^* y b^* es posible calcular los valores de cromaticidad. El croma describe lo llamativo o lo apagado de un color, es decir, que tan cerca está el color ya sea al gris o al matiz puro. En el Cuadro 7 se muestran los valores de cromaticidad para cada uno de los tratamientos de hojas. El valor de cromaticidad de las hojas crudas disminuyó con todos los tratamientos de cocción,

principalmente para las hojas salteadas; es decir, el color final de estas fue más oscuro que el de las hojas crudas (Figura 7). Este cambio en el valor de cromaticidad se ha relacionado con cambios estructurales de la clorofila. La clorofila es el principal pigmento presente en las plantas verdes y puede sufrir distintos tipos de alteraciones, La más frecuente, y la más perjudicial para el color de los alimentos vegetales que la contienen, es la pérdida del átomo de magnesio, formando la llamada feofitina, de un color verde oliva con tonos marrones, en lugar del verde brillante de la clorofila. Esta pérdida del magnesio se produce por sustitución por dos iones H⁺, y consecuentemente se ve favorecida por el medio ácido. La pérdida es irreversible en medio acuoso, por lo que el cambio de color de los vegetales verdes es un fenómeno habitual en procesos de cocción. (Turkmen *et al.*, 2006)

Cuadro 7. Valores de cromaticidad de las hojas crudas y cocidas.^a

Tratamiento	Croma
Cruda	11.69± 0.16 ^a
Escaldada	8.48± 1.20 ^{ab}
Frita	5.29± 0.41 ^{bc}
Blanqueada	7.78± 0.89 ^{bc}
Cocida	5.61± 0.74 ^{bc}
Salteada	4.85± 0.31 ^c

^a Los valores son expresados en unidades colorimétricas y presentados como la media ± EE. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa, prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

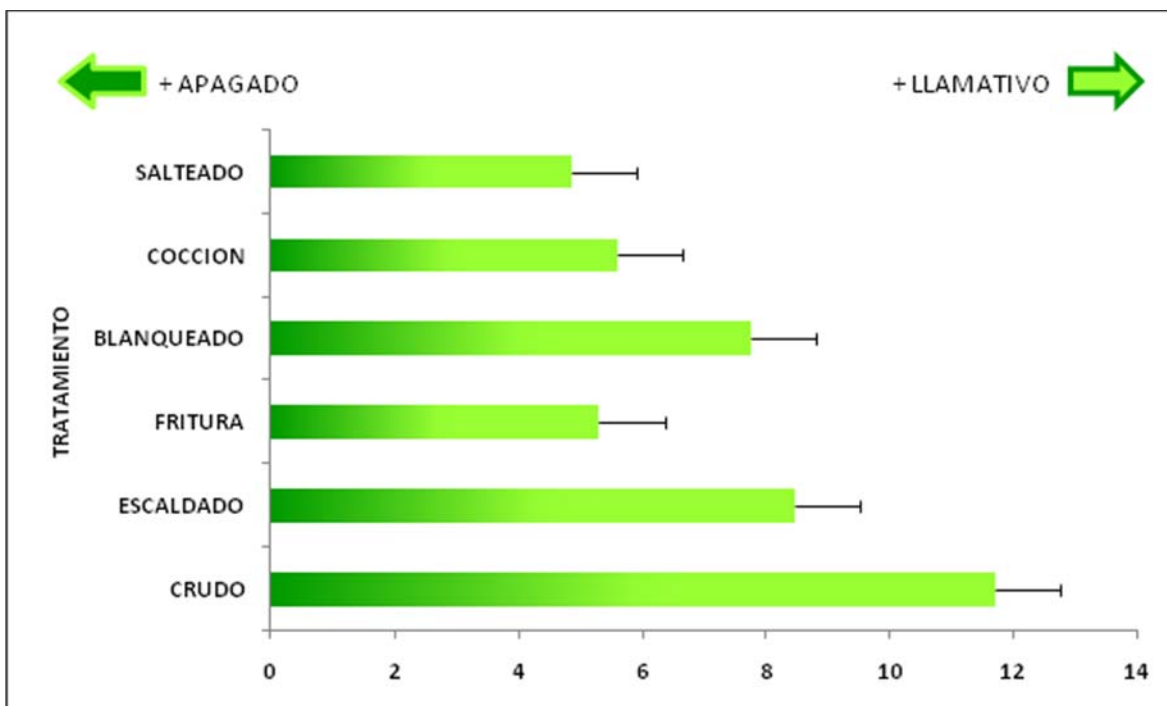


Figura 7. Efecto de los métodos de cocción en los valores de cromaticidad de las hojas

El matiz es como se percibe el color de un objeto: rojo, anaranjado, verde, azul, etc. Los valores del ángulo matiz para las hojas mostrados en el Cuadro 8, nos indican que se encuentran dentro del cuadrante que va del amarillo al verde (90° a 180°), de manera que el color final de las hojas escaldadas al vapor, blanqueadas y salteadas tuvo mayor tendencia al verde, mientras que el color final de las hojas fritas y cocidas al vapor tuvieron una mayor tendencia al amarillo en comparación al color de las hojas crudas.

Cuadro 8. Valores de matiz de las hojas crudas y cocidas.^a

Tratamiento	Angulo Matiz
Cruda	119.11± 1.20 ^a
Escaldada	121.07± 3.98 ^a
Frita	118.23± 2.06 ^a
Blanqueada	122.13± 4.83 ^a
Cocida	109.17± 3.66 ^a
Salteada	118.74± 3.11 ^a

^a Los valores son expresados en unidades colorimétricas y presentados como la media ± EE. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa, prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$).

El valor del ángulo matiz de las hojas blanqueadas incrementó ligeramente en comparación con el valor de las hojas crudas, en un estudio realizado para evaluar el efecto de métodos de cocción sobre el color de hojas de espinaca, estas fueron blanqueadas y se calculó el valor del ángulo matiz, donde se presenta la misma tendencia en el aumento de este valor a comparación del valor de las hojas crudas después del tratamiento (Turkmen *et al.*, 2006).

Otra razón para explicar la retención del color verde en los vegetales cocidos o hervidos también ha sido atribuida no sólo al patrón de conversión de la clorofila sino también a un cambio en la superficie de reflexión y profundidad de la penetración de la luz en los tejidos de los vegetales cocidos, causada por la pérdida de aire y otros gases disueltos en las células y su sustitución por agua de cocción (Tijskens *et al.*, 2001).

El color es un parámetro importante en la calidad de vegetales cocidos e influye fuertemente en la elección del comensal. Generalmente los vegetales cocidos exhiben una calidad pobre de color en comparación con su estado fresco.

6.2 Análisis bromatológico

Los resultados del contenido de humedad y cenizas de las hojas crudas y cocinadas se presentan en el Cuadro 9. El contenido de humedad de las hojas crudas fue de 7.05%; un valor bajo en comparación con el valor de 83.48 % reportado por Akubugwo *et al.* (2007), para *A. hybridus*, debido a que las hojas de nuestro estudio fueron previamente liofilizadas. En comparación con las hojas cocinadas, el contenido de humedad disminuyó significativamente con los tratamientos de escaldado, cocción al vapor, fritura, salteado ya que estos dos últimos tratamientos emplean aceite en lugar de agua. El tratamiento de blanqueado preservó mayormente el contenido de humedad de las hojas, siendo su contenido de 5.94 %, aunque esto podría deberse al empleo de agua propia del método de cocción.

El contenido de cenizas, el cual indica el contenido mineral en la biota, para las hojas crudas fue de 19.2 %, superior al reportado para *A. hybridus* (13.8 %) de manera que las hojas de Revancha son más ricas en minerales. Después de los métodos de cocción el contenido mineral disminuyó, principalmente con el método de fritura profunda (6.98 %) debido a las condiciones de alta temperatura que se manejaron para este método (180° C) y probablemente el contenido mineral sufrió daño térmico ocasionando pérdida. Las hojas escaldadas al vapor, blanqueadas y cocidas al vapor conservaron el mayor porcentaje de contenido de cenizas en comparación con las hojas crudas. En la Figura 8 podemos observar que las hojas blanqueadas preservaron el mayor contenido de cenizas, debido a la adición de sal en el tratamiento, la cual pudo ser cuantificada en la determinación. Estadísticamente el método de fritura profunda fue el que provocó una mayor pérdida tanto del contenido de humedad como del contenido de cenizas.

Cuadro 9. Contenido de humedad y cenizas de las hojas crudas y cocidas.^a

Tratamiento	% Humedad	% Cenizas
Cruda	7.05± 0.18 ^a	19.20± 0.47 ^a
Escaldada	1.74± 0.05 ^c	16.72± 0.20 ^b
Frita	2.62± 0.08 ^c	6.98± 0.34 ^c
Blanqueada	5.94± 0.06 ^a	16.11± 0.40 ^b
Cocida	2.43± 0.07 ^b	16.24± 0.45 ^b
Salteada	2.37± 0.47 ^c	10.07± 0.91 ^c

^a Media del triplicado de una muestra ± EE. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa, prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$).

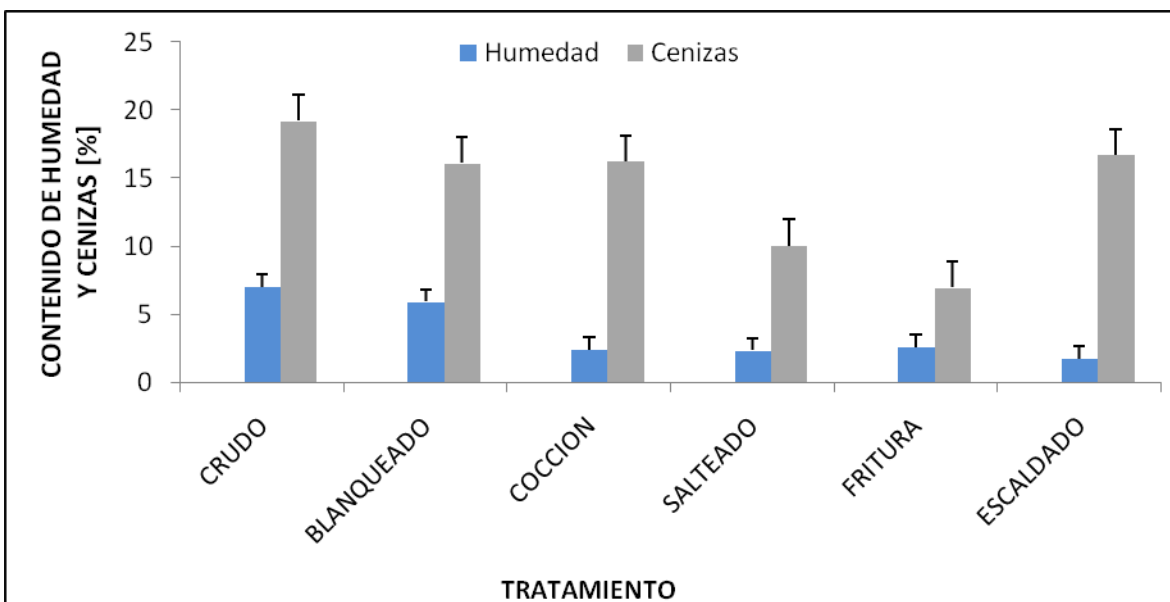


Figura 5. Efecto de los métodos de cocción en el contenido de humedad y cenizas de las hojas

La composición proximal de las hojas cocinadas y crudas se presenta en el Cuadro 10. En cuanto al contenido de proteína, el valor de la hoja cruda, 24.98 %, es más alto que el valor de otras especies de amaranto (*A. hybridus* L 17.92 %). De acuerdo a Pearson (1976) las plantas comestibles que proveen más del 12 % de su valor calórico, proveniente de las proteínas, son consideradas como una buena fuente de proteínas. Para el caso de las hojas objeto de estudio, el porcentaje de calorías correspondiente al valor de proteínas equivale a 24.54 %, de manera que las hojas crudas de amaranto variedad Revancha son una buena fuente proteica. Por otro lado, después de ser cocidas las hojas, su contenido de proteína cruda disminuyó hasta 11.65 % con el método de fritura profunda, esto se debió a la desnaturalización térmica de las proteínas. El orden decreciente en cuanto al contenido de proteína de las hojas cocinadas es: blanqueadas, escaldadas al vapor, cocidas al vapor, salteadas, y fritas, con 24.4 %, 23.6 %, 22.2 %, 14.7 %, 11.6 %, respectivamente, de manera que las hojas blanqueadas, escaldadas al vapor, y cocidas al vapor aun pueden considerarse una buena fuente proteica, no así las hojas salteadas y fritas, ya que el aporte calórico proveniente de su contenido proteico es menor del 7 %.

Cuadro 10. Análisis proximal de las hojas crudas y cocidas.^a

Tratamiento	% Proteína		% Lípidos		% Carbohidratos		% Fibra	
Cruda	24.98±	0.01 ^a	5.62±	0.22 ^c	39.31±	0.49 ^{ab}	3.80±	1.04 ^a
Escaldada	23.61±	0.36 ^{ab}	4.90±	0.27 ^c	46.98±	1.42 ^{ab}	6.03±	1.08 ^a
Frita	11.65±	0.40 ^d	58.08±	2.15 ^a	13.23±	2.52 ^d	7.42±	0.66 ^b
Blanqueada	24.40±	0.30 ^b	7.83±	0.38 ^c	32.31±	3.84 ^{bc}	13.38±	4.28 ^c
Cocida	22.22±	0.66 ^{ab}	7.77±	0.27 ^c	41.81±	3.64 ^{ab}	9.51±	3.01 ^b
Salteada	14.76±	1.00 ^c	44.07±	1.78 ^b	23.17±	1.22 ^{cd}	5.54±	1.67 ^a

^a Media del triplicado de una muestra ± EE. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa, prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

El contenido de lípidos de la hoja cruda (5.62 %) es similar al contenido de las hojas de *A. hybridus* L. (4.65 %), lo cual revela que las plantas comestibles son una fuente pobre lipídica. Después de ser escaldadas al vapor, blanqueadas y cocidas al vapor las hojas, el contenido bajo de lípidos se mantuvo sin cambios estadísticos significativos, sin embargo en los métodos de fritura y salteado, debido al uso de aceite comestible comercial, el contenido final de lípidos en las hojas aumenta considerablemente, 58.08 % y 44.07 %, respectivamente.

En cuanto al contenido de carbohidratos, el valor de las hojas crudas (39.31 %) es bajo en comparación con las hojas de *A. hybridus* L. (52.18 %). Los métodos de cocción y escaldado conservan el contenido de carbohidratos semejante al de las hojas crudas, sin embargo el método de fritura reduce significativamente el contenido de este nutriente hasta 13.23 %.

El contenido de fibra cruda de las hojas crudas (3.8 %) es bajo comparado con el contenido de las hojas de *A. hybridus* L. (8.61 %). De acuerdo a los valores reportados en el Cuadro 10, observamos que el contenido de fibra de las hojas fritas, blanqueadas y cocidas al vapor es superior al valor de las hojas crudas, sin embargo este aumento aparente, podría deberse a que los productos de la reacción de feofitina, que dan una coloración opaca a las hojas, pudieron haber sido analizados como lignina (Matarese, 2004).

En la Figura 9 podemos observar que las hojas escaldadas al vapor preservaron la mayor similitud en porcentaje de proteína, lípidos, carbohidratos y fibra en comparación con las hojas crudas.

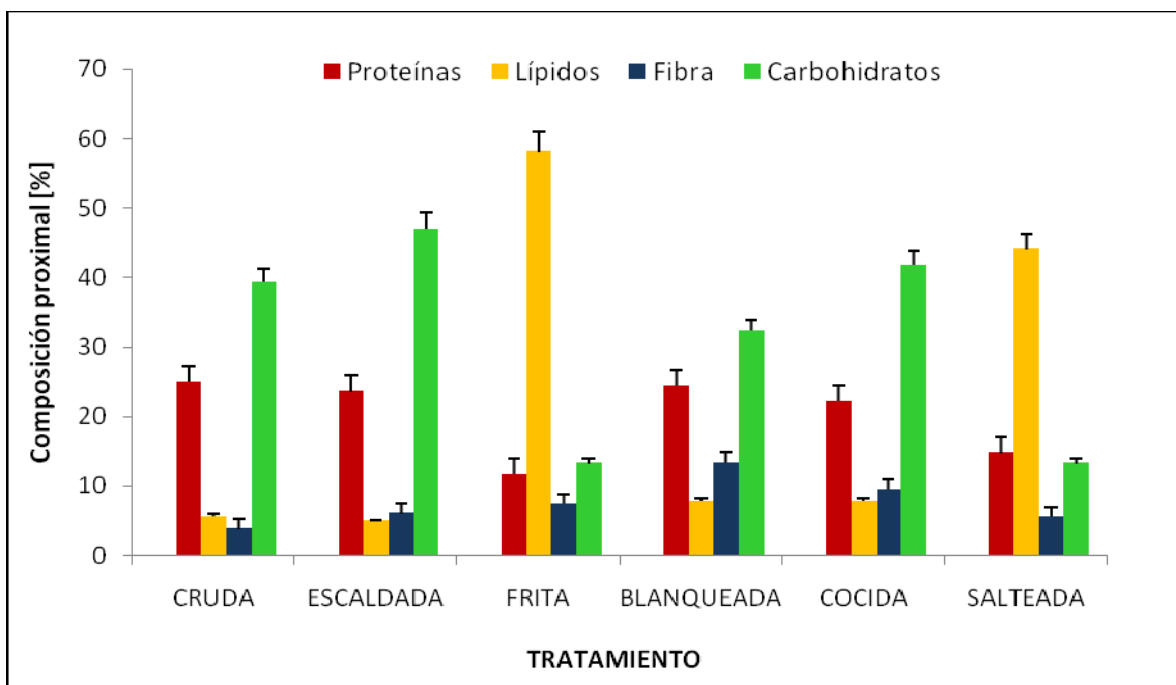


Figura 9. Efecto de los métodos de cocción en el contenido de proteínas, grasas, fibra y carbohidratos de las hojas.

De manera general, como se observa en la Figura 10, el tratamiento que afecta mayormente el contenido proximal de las hojas de amaranto fue el método de fritura profunda y salteado, debido a que la temperatura de éstos, es superior a la temperatura en la que se desarrollaron el resto de los tratamientos, lo cual nos indica que los componentes determinados en este análisis son sensibles al daño térmico, por otro lado, se observa también que los tratamientos en los que el medio de cocción es el vapor, los valores del contenido proximal se conservaron similares a los valores de la hoja cruda.

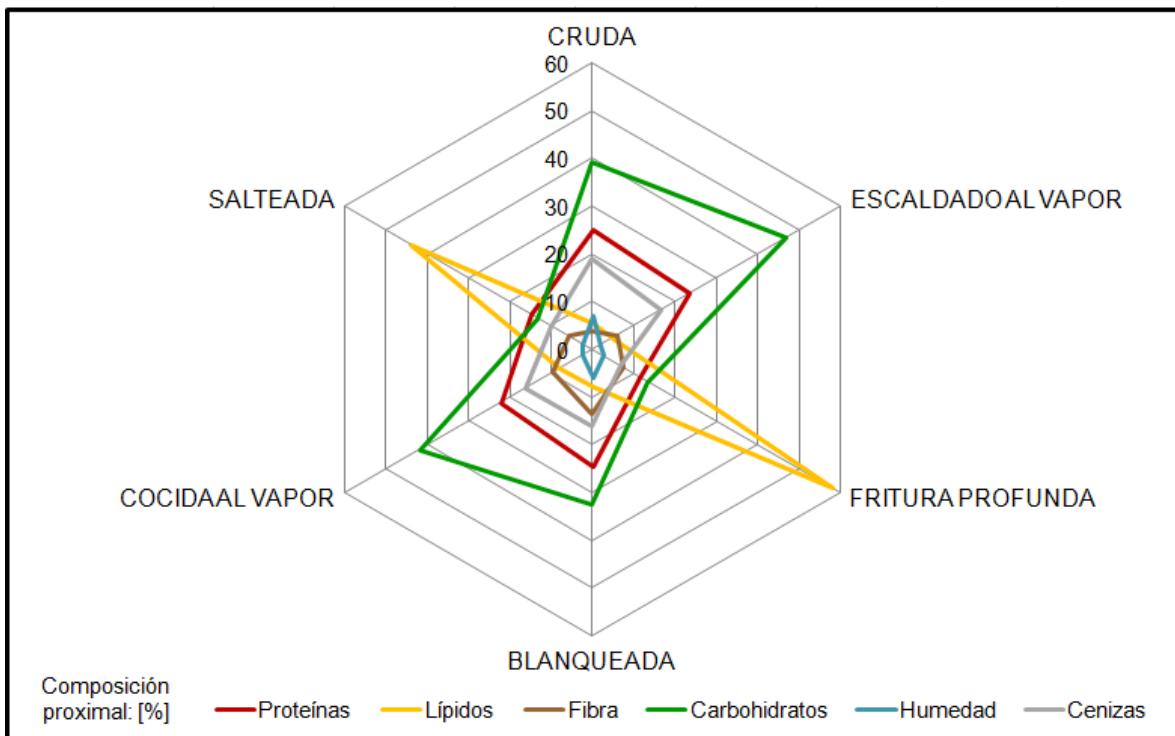


Figura 10. Relación entre los métodos de cocción y la composición proximal de las hojas

El contenido energético de las hojas crudas de *A. hypochondriacus L* (307.87 Kcal/100g) está dentro del rango del contenido energético de los vegetales, esto concuerda con la observación general que el contenido energético de los vegetales es bajo. Al igual que el contenido de lípidos, el contenido calórico aumenta en las hojas cocinadas en las que se usó aceite, es decir, en el salteado y fritura profunda, siendo estas las que presentan el mayor contenido calórico (622.36 Kcal/100g). No es posible considerar este valor calórico como bueno, ya que el mayor aporte proviene de los lípidos. Los otros métodos de cocción no afectan significativamente el contenido energético de las hojas cocinadas, aunque las hojas blanqueadas presentan el valor calórico más bajo 297.42 Kcal/100g (Cuadro 11 y Figura 11).

Cuadro 11. Contenido de Kcal/100g las hojas crudas y cocidas.^a

Tratamiento	Kcal/100 g	
Cruda	307.87±	3.91 ^c
Escaldada	326.54±	5.47 ^c
Frita	622.36±	8.78 ^a
Blanqueada	297.42±	18.82 ^c
Cocida	326.14±	12.81 ^c
Salteada	548.39±	16.54 ^b

^a Media del triplicado de una muestra ± EE. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa, prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

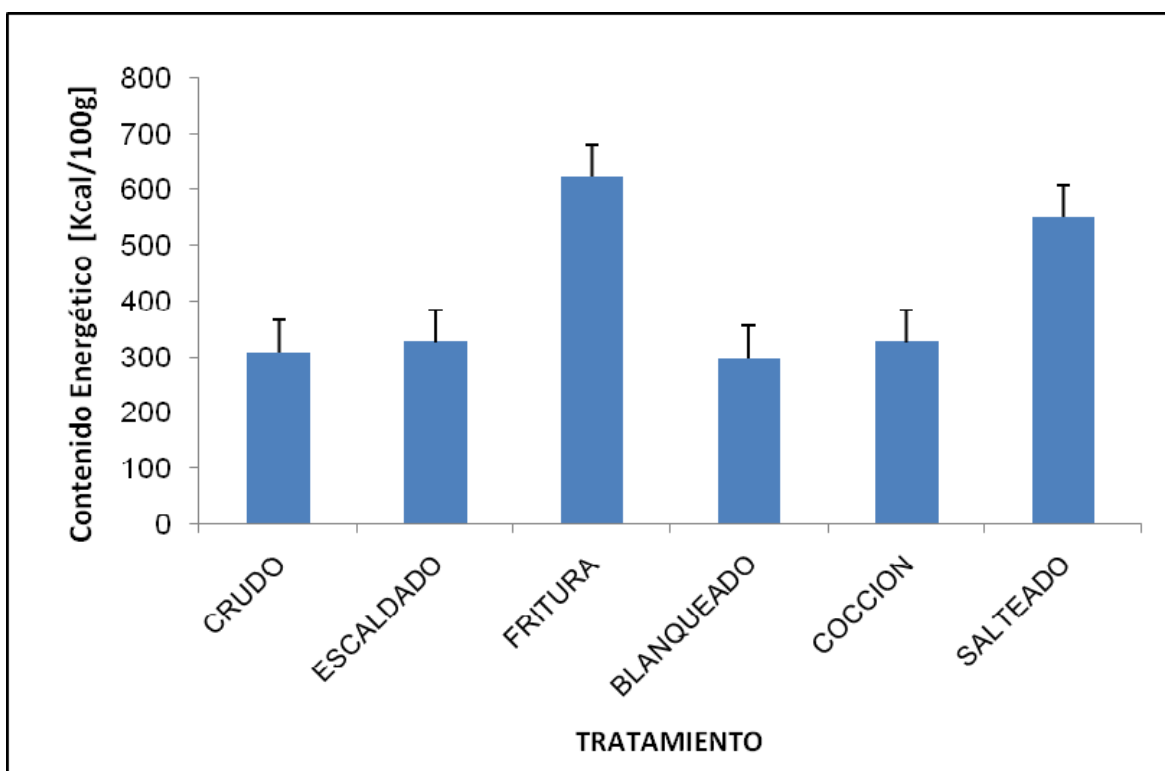


Figura 11. Efecto de los métodos de cocción en el contenido de Kcal/100g de las hojas

6.3 Composición mineral

El contenido mineral de las hojas crudas y cocinadas se presenta en el Cuadro 12, donde podemos observar que el potasio (K) es el mineral con mayor concentración en las hojas crudas con 34.88 mg/g; y el menos abundante es el zinc (Zn) con tan solo 0.02 mg/g.

La proporción de sodio a potasio (Na / K) en el cuerpo es de gran importancia para la prevención de la hipertensión; un valor de Na / K menor de uno es recomendado. El valor Na/K de las hojas crudas de *A. hypochondriacus* es de 0.10, sin embargo para las hojas cocidas al vapor es de 0.75, por lo que podríamos sugerir el consumo de hojas cocidas, principalmente al vapor, para reducir el riesgo de padecer hipertensión.

Para la buena absorción intestinal de fósforo (P) y calcio (Ca), la proporción Ca / P debe ser cercana a la unidad (Guil *et al.*, 1998). La proporción en la hoja cruda es de 3.4, sin embargo, para la hoja frita y escaldada al vapor es de 2.3 y 2.8 respectivamente, siendo estos los valores más bajos de todos los métodos de cocción, de tal forma que consumir la hoja frita o escaldada al vapor podría asegurar una mejor absorción de Ca y P que comerla cruda.

El contenido de calcio de las hojas crudas (15.72 mg/g) disminuyó significativamente con el tratamiento de fritura profunda. El contenido de fósforo en las hojas crudas fue de 4.7 mg/g, y después de ser salteadas las hojas su contenido disminuyó significativamente, sin embargo con el método de escaldado no hubo diferencia significativa en el contenido final de P. El contenido de hierro (Fe) de las hojas crudas (0.09 mg/g) es bajo al compararlo con el contenido de las hojas de *A. hybridus* L (0.13 mg/g), con los métodos de cocción este contenido no varía significativamente. El contenido de magnesio (Mg) es de 2.09 mg/g, este disminuye después de los tratamientos de cocción, principalmente con el método de fritura profunda.

Cuadro 12. Contenido de Ca, Fe, Mg, K, P, Na y Zn de las hojas crudas y cocinadas.^a

Tratamiento	Ca	Fe	Mg	K	P	Na	Zn
Cruda	15.72 _± 1.71 ^{ab}	0.10 _± 0.02 ^a	2.09 _± 0.13 ^a	34.88 _± 0.13 ^a	4.80 _± 0.568 ^a	3.82 _± 0.43 ^b	0.02 _± 0.004 ^a
Escaldada	12.30 _± 2.46 ^{abc}	0.16 _± 0.01 ^a	1.49 _± 0.18 ^b	32.16 _± 0.18 ^{ab}	4.22 _± 0.188 ^{ab}	4.27 _± 0.24 ^b	0.02 _± 0.001 ^a
Frita	5.08 _± 1.05 ^c	0.12 _± 0.03 ^a	0.78 _± 0.15 ^d	16.85 _± 0.15 ^b	2.18 _± 0.047 ^c	2.50 _± 0.08 ^b	0.02 _± 0.002 ^a
Blanqueada	14.07 _± 1.06 ^{abc}	0.16 _± 0.01 ^a	1.36 _± 0.09 ^b	26.21 _s 0.09 ^{ab}	4.14 _± 0.102 ^{ab}	16.05 _± 1.03 ^a	0.03 _± 0.001 ^a
Cocida	18.02 _± 0.77 ^a	0.16 _± 0.01 ^a	1.48 _± 0.23 ^b	21.10 _± 0.23 ^{ab}	3.16 _± 0.355 ^{bc}	16.01 _± 0.48 ^a	0.02 _± 0.000 ^a
Salteada	7.04 _± 3.15 ^{bc}	0.15 _± 0.04 ^a	1.09 _± 0.41 ^c	13.54 _± 0.40 ^{ab}	2.03 _± 0.276 ^c	7.27 _± 3.42 ^b	0.01 _± 0.010 ^a

^a Los valores son expresados en mg/g muestra y presentados como la media \pm EE. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa, prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

El tratamiento de salteado disminuyó significativamente el contenido de K de 34.88 a 13.54 mg/g, siendo el método de escaldado el que preservó mayormente el contenido de este mineral en 32.26 mg/g. El contenido de Na de las hojas crudas es bajo (3.82 mg/g), el contenido final de sodio en las hojas blanqueadas, así como salteadas y cocidas al vapor, se incrementó debido a la adición de sal en el tratamiento. El contenido de Zn tanto de las hojas crudas como cocinadas es muy bajo, muy poco perceptible, este contenido tampoco se ve afectado por algún método de cocción.

En la Figura 12 se observa que el mineral con mayor presencia en las hojas es el K, y que su contenido varía después de los métodos de cocción. Las hojas blanqueadas son las que mayormente preservan el contenido de los minerales, por otro lado el método de fritura profunda es el que mayormente afecta la composición mineral de las hojas.

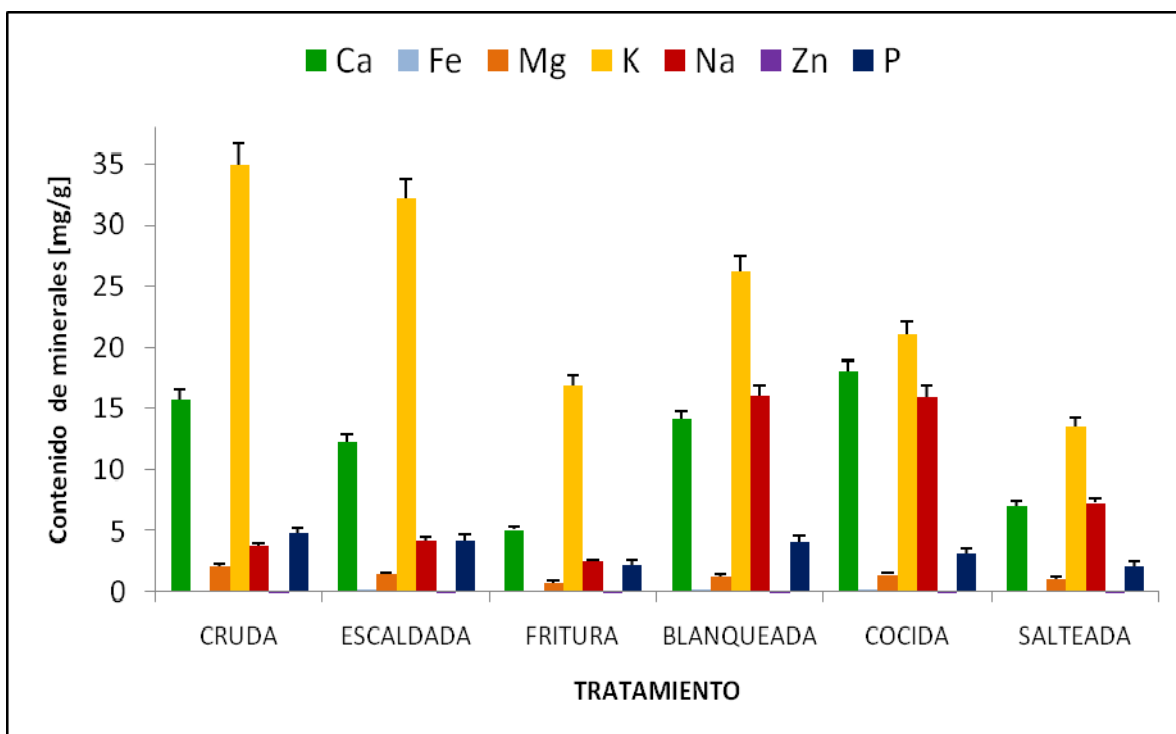


Figura 12. Efecto de los métodos de cocción en el contenido Ca, Fe, Mg, K, Na y Zn de las hojas

De igual forma, se observa en la Figura 13 que el K fue el mineral con mayor concentración presente en las hojas de *A. hypochondriacus* L, y que este contenido se conservó en las hojas escaldadas al vapor, al igual que el contenido de Ca, P y Mg. El incremento en el contenido de Na, es claro en las hojas que recibieron el tratamiento de blanqueado. La mayor disminución del contenido mineral se observa en los tratamientos de fritura profunda y salteado, cuyo medio de cocción es el aceite a diferencia de los otros medios de cocción de los tratamientos. En este diagrama se observa también que el tratamiento de escaldado al vapor fue el que mejor preservó el contenido mineral de las hojas de amaranto, debido a que este tratamiento se desarrolló a una temperatura más baja y por menos tiempo.

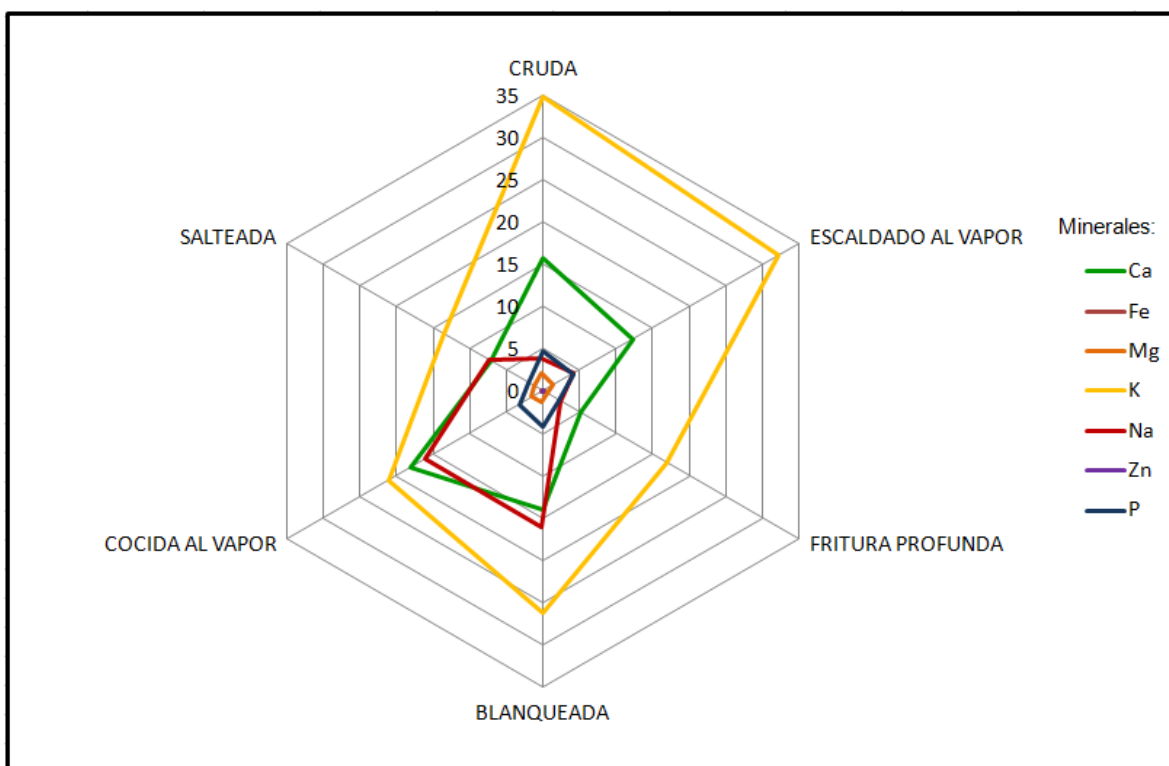


Figura 13. Relación entre los métodos de cocción y el contenido mineral de las hojas

6.4 Metabolitos secundarios

En el Cuadro 13 se muestran los contenidos de fenoles totales de las hojas crudas y cocinadas. Los valores se expresan en mg de eq. ác. Gálico/g de hoja seca, el valor de las hojas crudas (6.6 mg eq. ác. Gálico/g) es superior al valor reportado para otras especies de hojas de amaranto: *A. cruentus* con 0.618 mg eq. ác. Gálico/g (Adebooye *et al*, 2008); *A. gangeticus* con 0.849 mg eq. ác. Gálico/g, e incluso superior al valor reportado en este mismo trabajo para hojas de espinaca 0.338 mg eq. ác. Gálico/g (Saxena *et al.*, 2007). Esta diferencia puede deberse a que la planta de *A hypochondriacus* L, fue sembrada en un región diferente a la que habitualmente se siembra, de manera que durante el crecimiento y adaptación de la planta, esta pudo desarrollar una mayor cantidad de metabolitos secundarios.

Cuadro 13. Contenido de fenoles totales de las hojas crudas y cocidas.^a

Tratamiento	mg eq. ác. Gálico/g hoja seca
Cruda	6.607± 0.33 ^a
Escaldada	4.023± 0.19bc
Frita	6.314± 0.19 ^a
Blanqueada	5.352± 0.52ab
Cocida	4.604± 0.35bc
Salteada	3.491± 0.17c

^a Los valores son expresados en mg equivalentes de ác gálico/g muestra y presentados como la media ± EE. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa, prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$).

De acuerdo a los valores obtenidos para las hojas crudas y cocinadas podemos observar que el contenido total de fenoles disminuye con todos los métodos de cocción. Esta disminución se debe al tiempo y temperatura de los métodos empleados, es decir, que los compuestos fenólicos presentes en las hojas son termolábiles, además de la temperatura, el tiempo de cocción es un factor que afecta los compuestos fenólicos, por ejemplo, el método de cocción al vapor que se realiza por 40 minutos, las hojas sometidas a este método

presentaron uno de los valores más bajos, o bien el tratamiento térmico puede inducir el acomplejamiento de las moléculas fenólicas con otras macromoléculas como carbohidratos o proteínas, las cuales pueden ser solubles en otro solvente diferente al metanol empleado para la obtención del extracto analizado.

Es importante mencionar que las hojas blanqueadas, así como las hojas cocidas al vapor y salteadas, que también fueron blanqueadas previamente, presentan mayor pérdida de compuestos fenólicos. De acuerdo a otros investigadores, el método de blanqueado, por el uso de sal, podría tener ciertos efectos en la disminución del contenido final de compuestos antioxidantes como los fenoles, debido a dos factores importantes, en primer lugar: el efecto osmótico de la solución de sal en el líquido protoplásmico de la célula vegetal; es decir podría ser que el líquido protoplásmico (que contiene los ácidos fenólicos, flavonoides y taninos), de menor concentración fue liberado a la solución de sal de mayor concentración, dejando así el protoplasma vacío. En segundo lugar, la solución de sal podría haber sufrido algunas reacciones químicas con los ácidos fenólicos y flavonoides, convirtiéndolos a algunos otros productos tal y como se ha observado que sucede con la clorofila y sus derivados (Turkmen *et al.*, 2006).

En el trabajo realizado por Adebooye *et al.* (2007) evaluaron el efecto de seis pre-tratamientos de cocción en hojas de amaranto (*A. cruentus*), empleando un blanqueado por 15 minutos (20 g de NaCl/l de agua). Los resultados que obtuvieron muestran la misma tendencia en la disminución en el contenido de fenoles totales de las hojas crudas y las blanqueadas, 61.8 y 39.4 mg ácido gálico/100 g, respectivamente. Otros investigadores (Amin *et al.*, 2006) analizaron el efecto del blanqueado (10 y 15 minutos, sin el uso de sal en el agua) y observaron también una pérdida de compuestos fenólicos, principalmente después del tratamiento de 15 minutos, de hasta un 71 % del valor reportado para hojas crudas de *A. gangeticus*.

El valor obtenido para las hojas fritas es aparentemente el que presenta menor pérdida de los compuesto fenólicos, sin embargo no es posible asegurar

esto ya que debido a la temperatura empleada en este método (190° C) se esperaría que hubiera la mayor pérdida de fenoles para las hojas fritas, además para este método, se empleó un gran volumen de aceite comestible, el cual queda en las hojas, el aceite empleado tiene antioxidantes adicionados (vitamina E, omega 6), los cuales podrían estar contribuyendo al contenido final de fenoles en las hojas; se leyó la absorbancia del aceite sin cocinar a la misma longitud de onda que el ensayo para determinar el contenido total de fenoles y el valor obtenido fue de 0.067, lo cual equivale a 21.13 μg eq. ác. Gálico/ml de aceite, esto nos confirma que el aceite empleado interfiere con el valor real del contenido final de las hojas fritas y contribuye al aumento observado. La Figura 13 ilustra la tendencia de sensibilidad a los tratamientos térmicos de los fenoles totales presentes en las hojas principalmente con el tratamiento de salteado

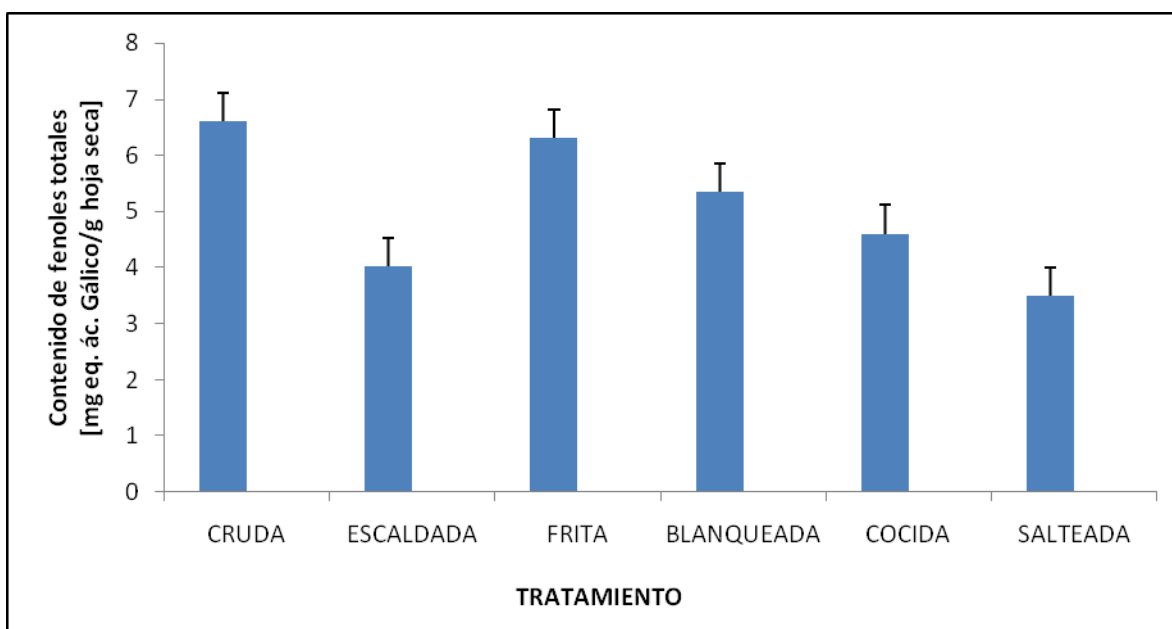


Figura 14. Efecto de los métodos de cocción en el contenido fenoles totales de las hojas

El Cuadro 14 presenta los valores del contenido de flavonoides totales para las hojas crudas y cocinadas expresados en mg eq. catequina/g de hoja seca. El resultado obtenido para las hojas crudas de Revancha (2.93 mg eq. catequina/g) es superior al compararlo con el valor reportado por Adebooye *et al.*, (2007) para *A. cruentus* (0.494 mg eq. catequina/g), esto podría deberse a condiciones

agronómicas, especie o madurez de la planta a la cual fueron realizados los análisis.

Cuadro 14. Contenido de flavonoides totales de las hojas crudas y cocidas.^a

Tratamiento	mg eq. catequina/g hoja seca
Cruda	2.95± 0.07 ^a
Escaldada	1.626± 0.07bc
Frita	2.942± 0.08 ^a
Blanqueada	1.496± 0.03c
Cocida	2.015± 0.19b
Salteada	1.319± 0.09c

^a Los valores son expresados en mg catequina/g muestra y presentados como la media ± EE. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa, prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

Los datos obtenidos para la hoja cruda, y para la hoja frita no son estadísticamente diferentes, lo que nos haría suponer que el método de fritura no produce pérdidas significativas, sin embargo ocurre el mismo comportamiento que para los compuestos fenólicos totales, los antioxidantes presentes en el aceite podrían estar causando un valor erróneo en el contenido total de flavonoides de las hojas. Para confirmar esto, se llevó a cabo la determinación de flavonoides totales en el aceite sin cocinar, aceite calentado a 40° C y a 180° C, de acuerdo a las condiciones de los métodos de salteado y fritura profunda respectivamente; los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 15, donde podemos observar que el aceite calentado a 190° C presentó el mayor contenido de μg equivalentes de catequina (183.39), lo cual nos revela que el alto contenido total de flavonoides de las hojas fritas se ve influenciado por los antioxidantes presentes en el aceite, y una vez que este es calentado su contenido aumenta considerablemente.

Cuadro 15. Contenido de flavonoides totales en el aceite usado en los métodos de salteado, fritura profunda y sin cocer.^a

Aceite	µg eq Catequina/ ml
Sin cocinar	94.30 ± 5.14
A 40° C	83.39 ± 12.66
A 180° C	183.39 ± 11.78

^a Los valores son expresados en µg catequina/g muestra y presentados como la media ± EE. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa, prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

Por otro lado las hojas con mayor pérdida en el contenido de flavonoides fueron las hojas blanqueadas, cocidas al vapor y salteadas confirma la contribución del efecto osmótico de la sal presente para los métodos, como factor en la disminución de estos compuestos, tal como se explicó en el contenido de fenoles totales. Se observa esta tendencia de disminución del contenido de flavonoides, independientemente de la especie, en el trabajo realizado por Adebooye *et al.* (2007), se reporta una disminución del valor de flavonoides de las hojas crudas de *A. cruentus* después del tratamiento de blanqueado (15 minutos; 20 g de NaCl / L de agua) de 49.4 a 30.2 mg eq. Catequina / 100 g respectivamente.

El contenido final de fenoles y flavonoides en las hojas crudas y cocidas muestra la misma tendencia, como se observa en la Figura 16, es decir, el contenido de metabolitos secundarios disminuyo principalmente con los métodos cuyo medio de cocción fue el vapor. Para el único tratamiento que no se observo esta tendencia fue para el blanqueado, ya que el contenido de fenoles en las hojas sometidas a este tratamiento no disminuyo significativamente, como para el contenido de flavonoides.

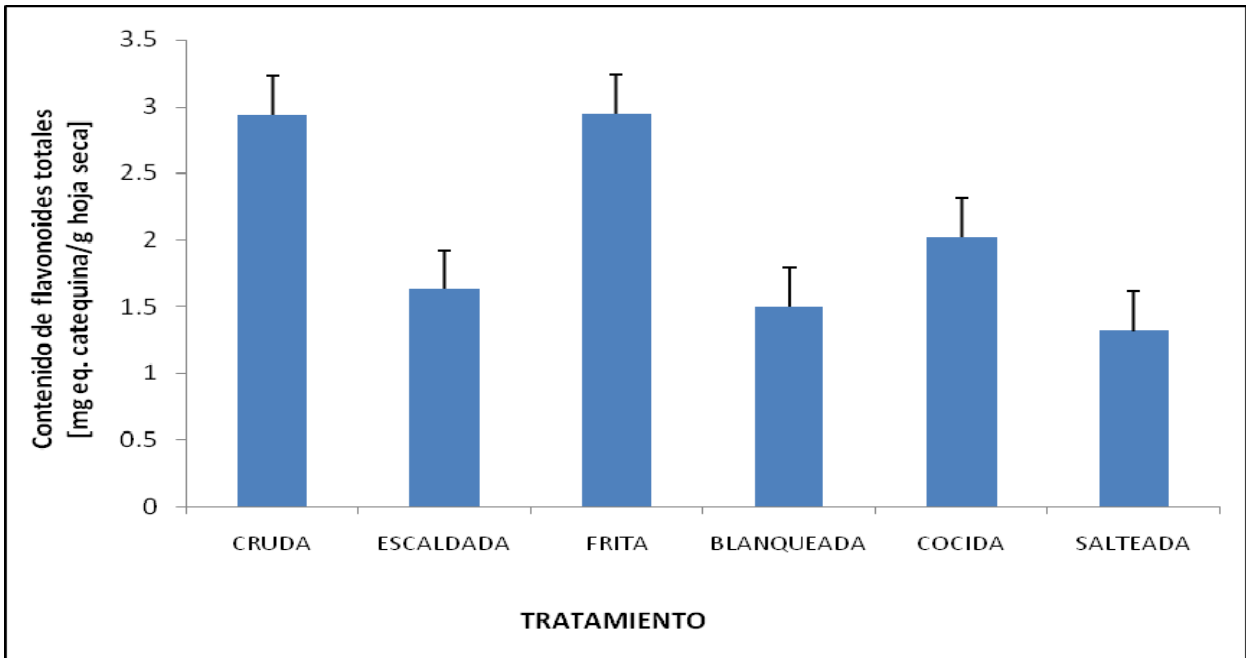


Figura 14. Efecto de los métodos de cocción en el contenido flavonoides totales de las hojas

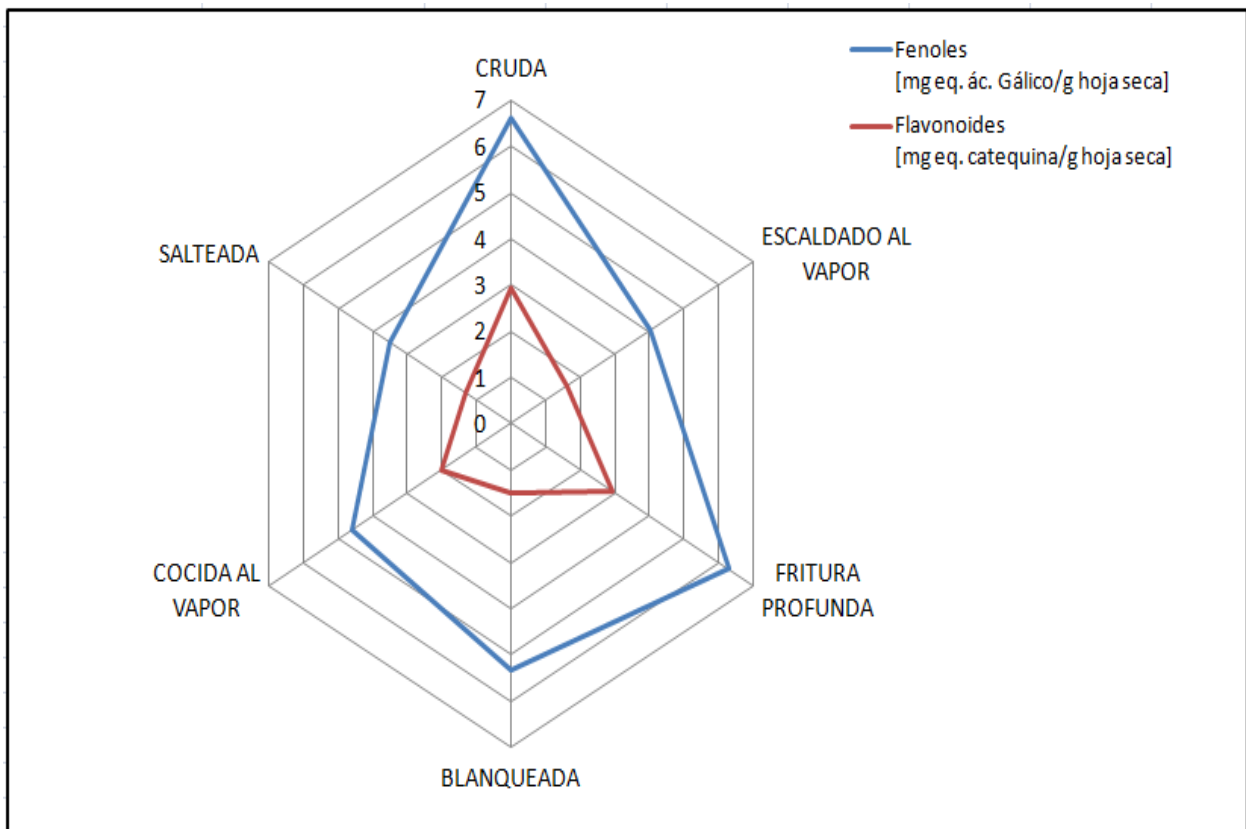


Figura 16. Relación entre los métodos de cocción y el contenido de metabolitos secundarios de las hojas

6.5 Identificación de ácidos fenólicos y flavonoides por HPLC

Se estandarizó una técnica en HPLC para identificar y cuantificar 5 ácidos fenólicos y 10 flavonoides:

- | | |
|------------------------|-----------------|
| 1. ácido gálico | 9. miricetina |
| 2. ácido protocatéuico | 10. luteolina |
| 3. catequina | 11. quercetina |
| 4. ácido cafeico | 12. apigenina |
| 5. rutina | 13. naringenina |
| 6. ácido p-cumárico | 14. kampferol |
| 7. hesperidina | 15. hesperetina |
| 8. ácido rosmarínico | |

Se preparó una solución con los 15 estándares (0.001 g / ml) en metanol y se obtuvo el perfil cromatográfico, para identificar los picos y tiempos de retención de cada estándar (Figura 17).

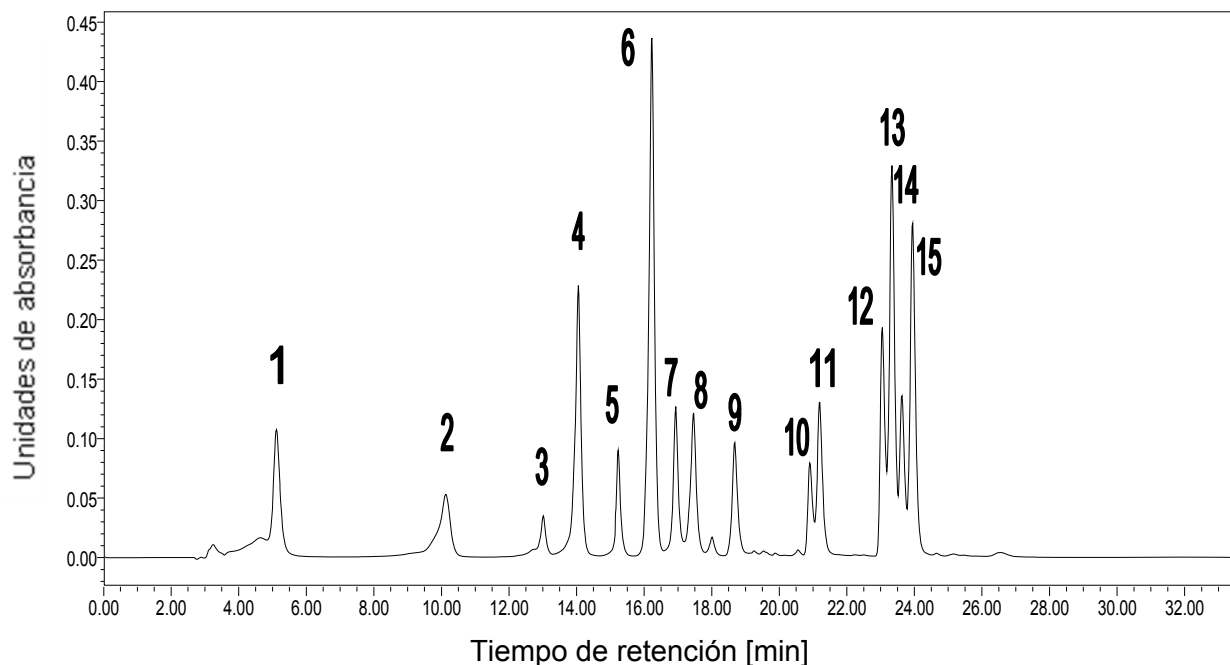


Figura 17. Cromatograma de estándares (flavonoides y ácidos fenólicos)

Una vez obtenido el extracto de la hoja cruda se filtraron y se inyectaron 20 μl en el sistema para obtener su perfil cromatográfico (Figura 18), después se comparó éste con el cromatograma de estándares, (Figura 19) donde se identificaron 3 picos en el mismo tiempo de retención que los estándares de catequina, rutina y ácido protocatéuico. Para confirmar la presencia de estos compuestos en el extracto se realizó una coelución con cada estándar identificado y la muestra, de manera que al inyectar la mezcla, si se observaba un aumento en la absorbancia del pico de interés significaba que el estándar estaba presente en el extracto. Así pues se confirmó la presencia de estos tres compuestos.

Del extracto metanólico de las hojas sometidas a los cinco métodos de cocción, se tomaron 20 μl , los cuales fueron filtrados e inyectados en el cromatógrafo para obtener su perfil y después poder compararlos con el cromatograma del extracto de la hoja cruda, para ver el efecto de los métodos de cocción (escaldado al vapor, fritura profunda, blanqueado, cocción al vapor y salteado) en la hoja y observar la pérdida de cada estándar (Figuras 20, 21, 22, 23 y 24).

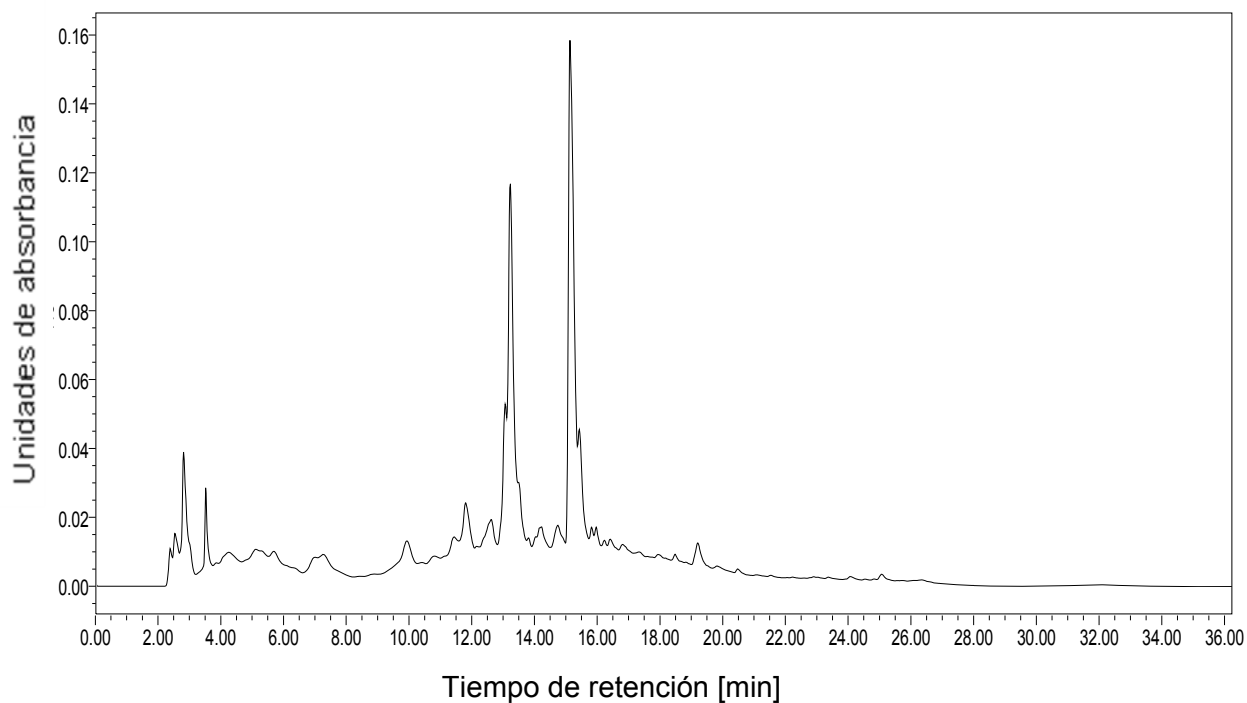


Figura 18. Cromatograma del extracto de la hoja cruda

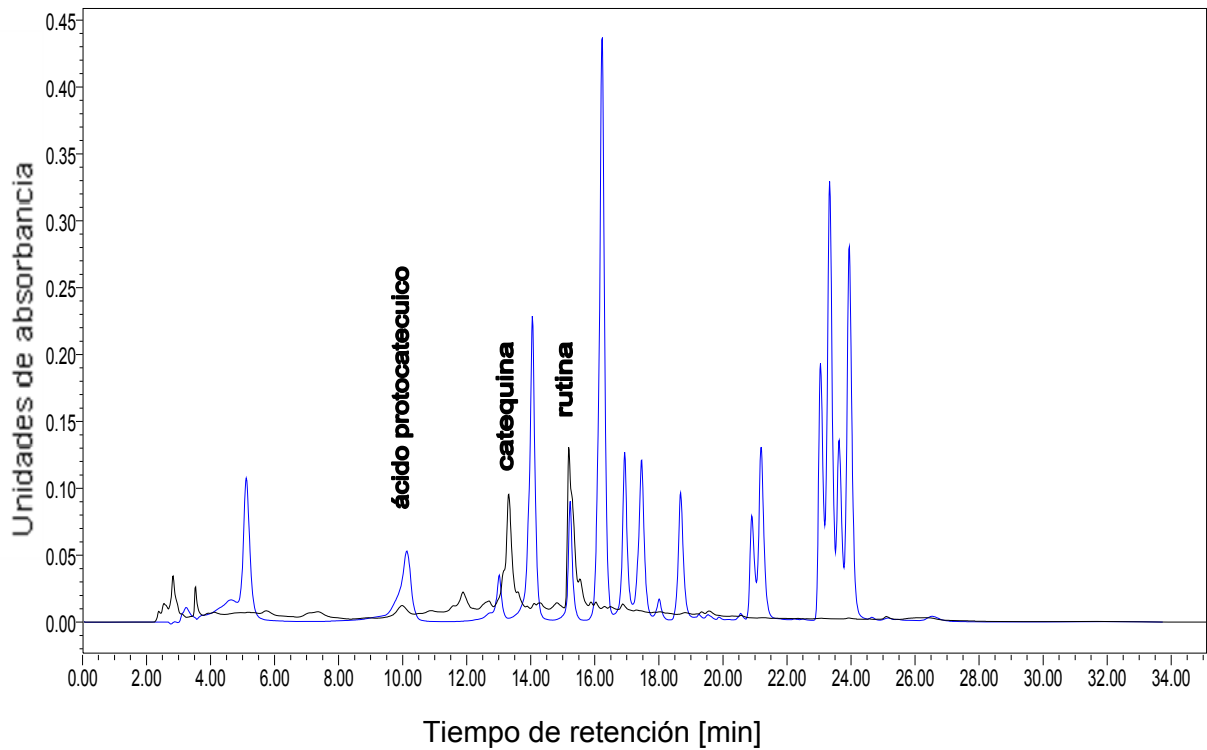


Figura 19. Cromatograma comparando el extracto de la hoja cruda (en negro) con el cromatograma de estándares (en azul)

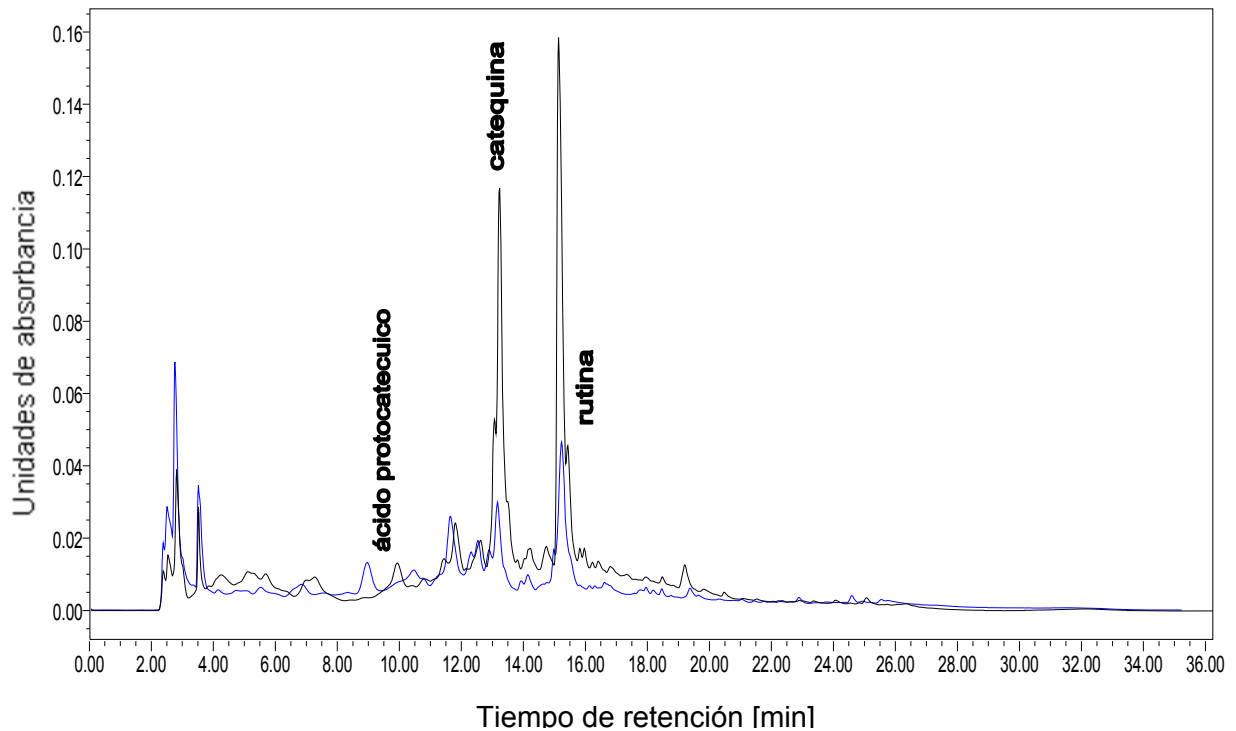


Figura 20. Cromatograma comparando el extracto de la hoja cruda (en negro) con el extracto de la hoja escaldada al vapor (en azul)

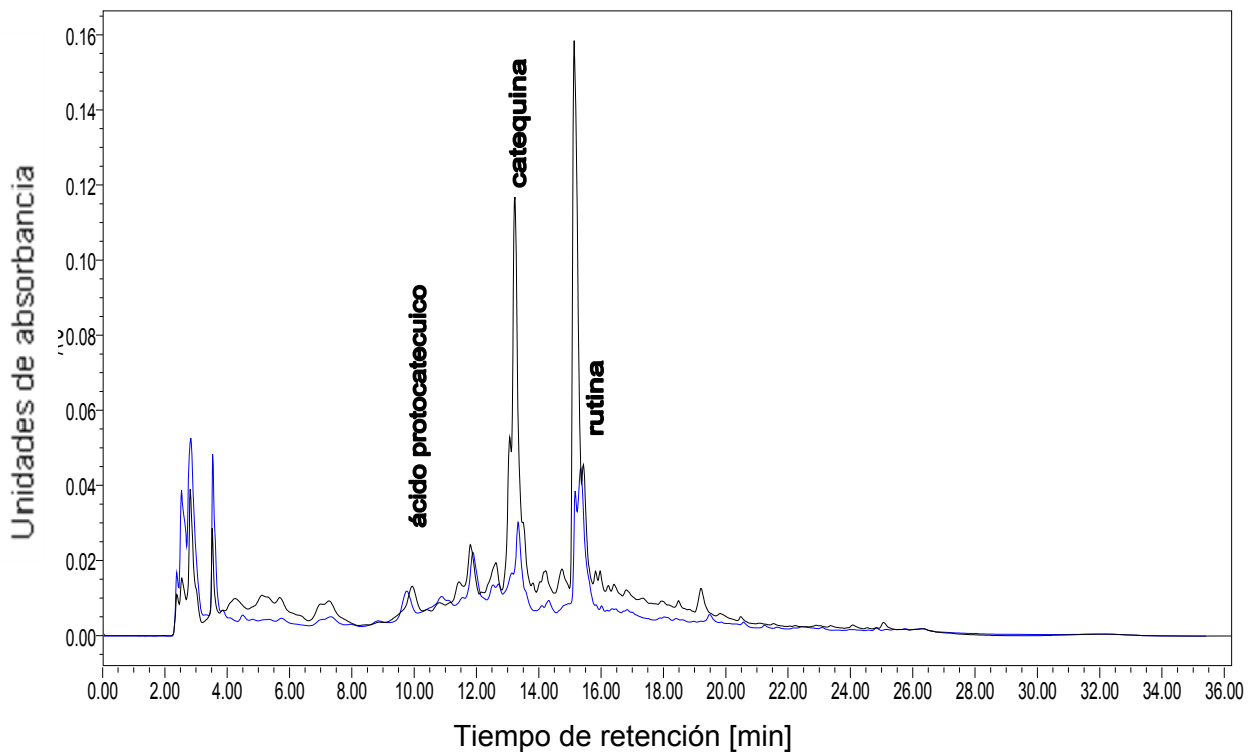


Figura 21. Cromatograma comparando el extracto de la hoja cruda (en negro) con el extracto de la hoja frita (en azul)

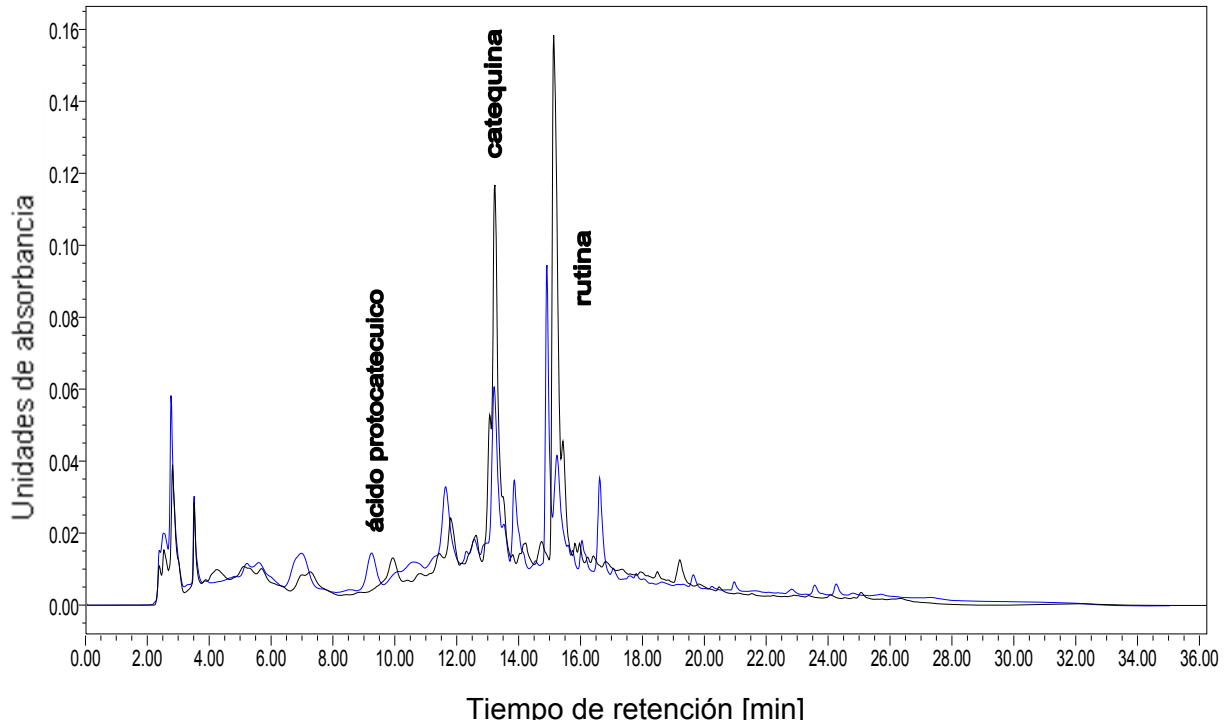


Figura 22. Cromatograma comparando el extracto de la hoja cruda (en negro) con el extracto de hoja blanqueada (en azul)

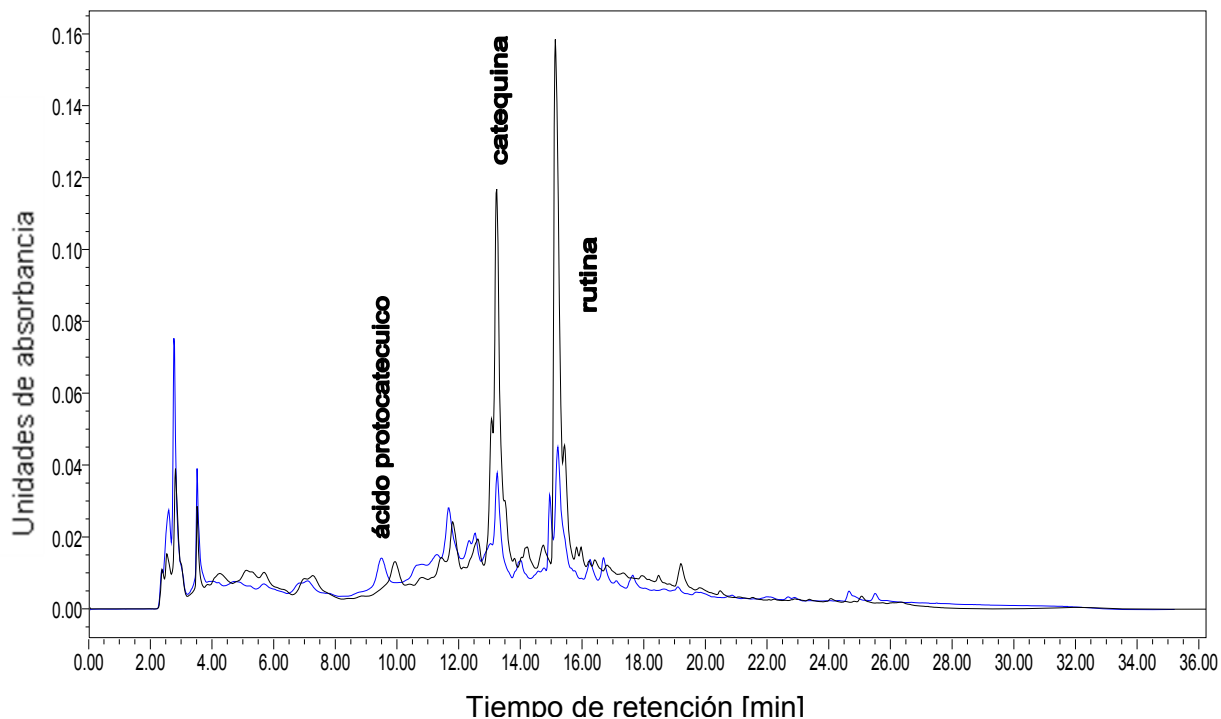


Figura 23. Cromatograma comparando el extracto de la hoja cruda (en negro) con el extracto de la hoja cocida al vapor (en azul)

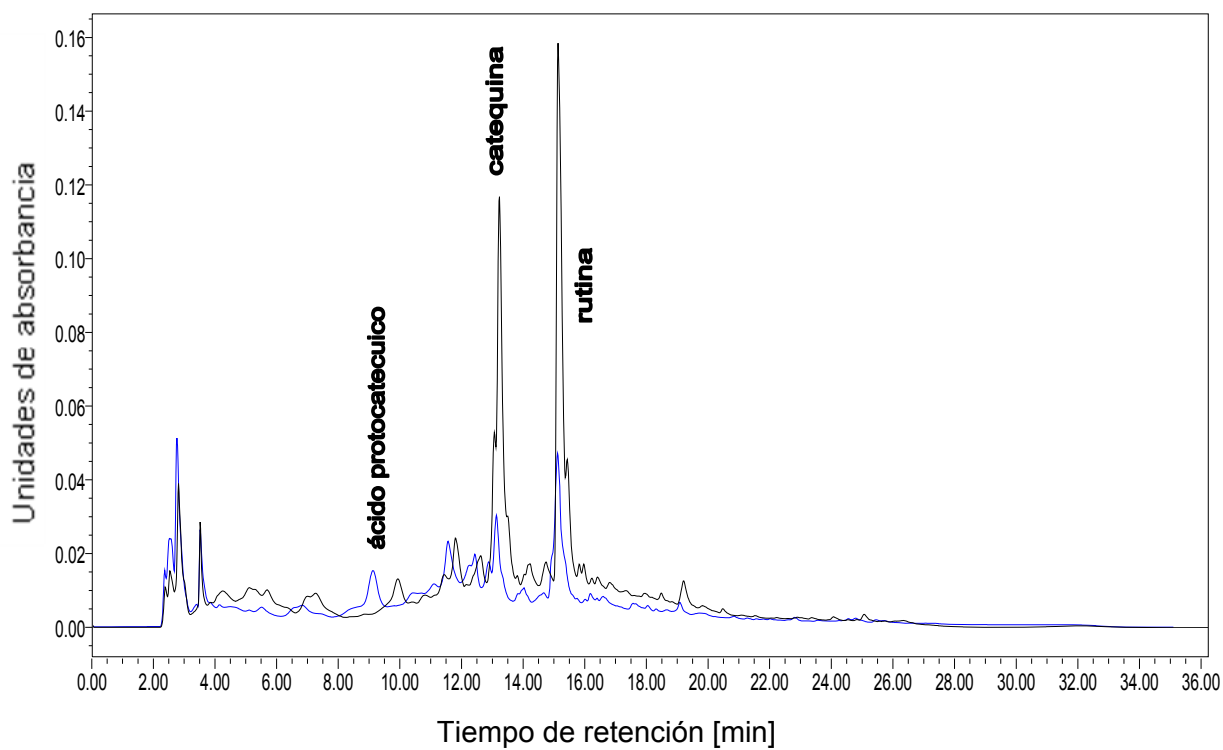


Figura 24. Cromatograma comparando el extracto de la hoja cruda (en negro) con el extracto de la hoja salteada (en azul)

El perfil cromatográfico del extracto hidrolizado de la hoja cruda se comparó con el cromatograma del extracto de la hoja cruda (Figura 25), en donde se observan otros picos que en el cromatograma de extracto sin hidrolizar no se identificaron, al compararlo con el cromatograma de estándares se observan cuatro picos en los mismos tiempos de retención de los estándares: apigenina, ácido caféico, quercetina y ácido *p*-cumárico (Figura 26).

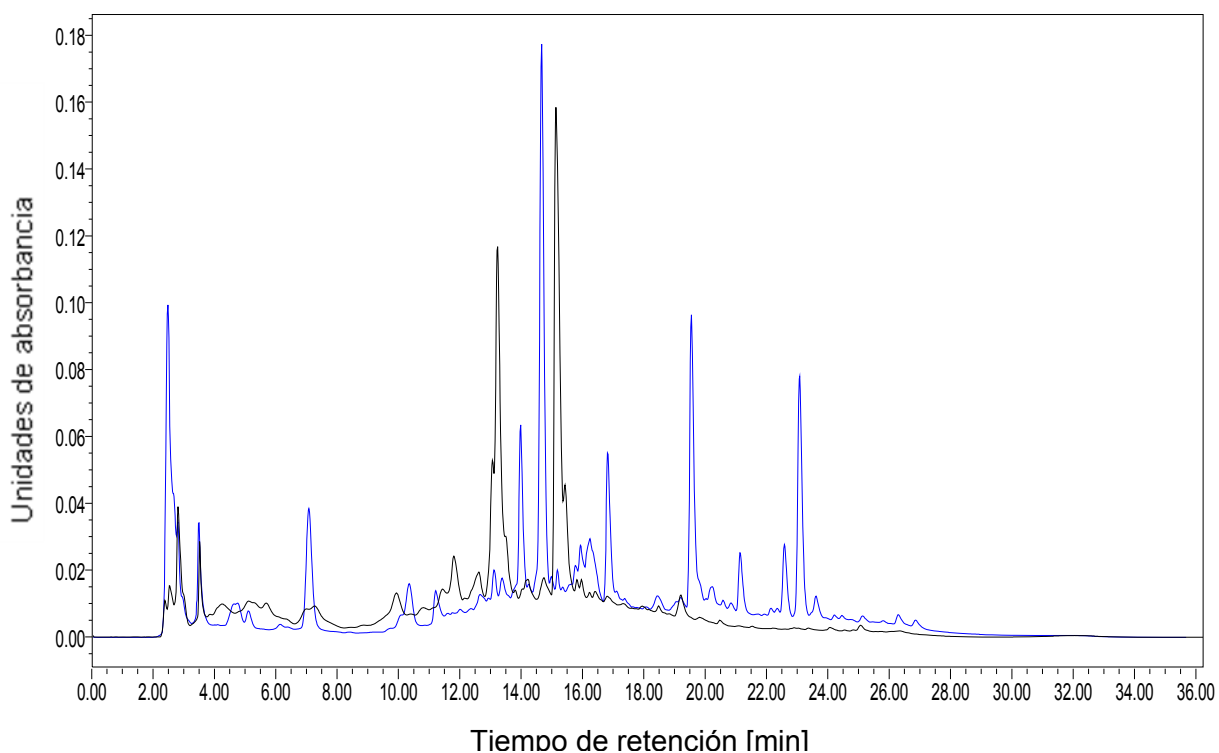


Figura 25. Cromatograma comparando el extracto de la hoja cruda (en negro) con el extracto hidrolizado de la hoja cruda (en azul)

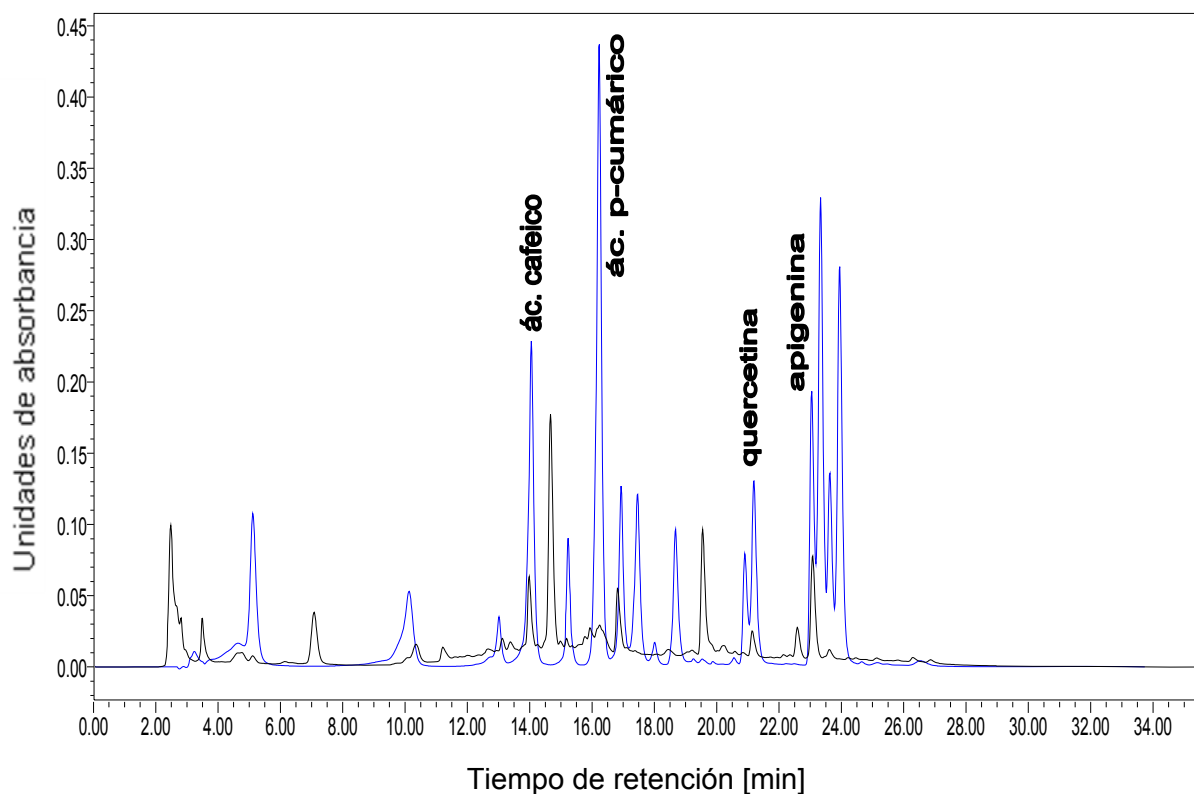


Figura 26. Cromatograma comparando el extracto hidrolizado hoja cruda (en negro) con el cromatograma de estándares (en azul), señalando los picos que coinciden con *ác. Cafeico*, *ác. p-cumarico*, *quercetina* y *apigenina*

Para confirmar la presencia de estos compuestos en el extracto hidrolizado se llevó a cabo una coelución con cada estándar identificado y el extracto hidrolizado, confirmando la presencia de estos compuestos en la muestra.

De igual forma, de cada extracto se llevo a cabo la hidrólisis, se filtraron e inyectaron 20 μl en el cromatógrafo para obtener su perfil y compararlo con el extracto hidrolizado de la hoja cruda para observar el efecto de los métodos de cocción (escaldado al vapor, fritura profunda, blanqueado, cocción al vapor y salteado) en las hojas (Figuras 27, 28, 29, 30 y 31).

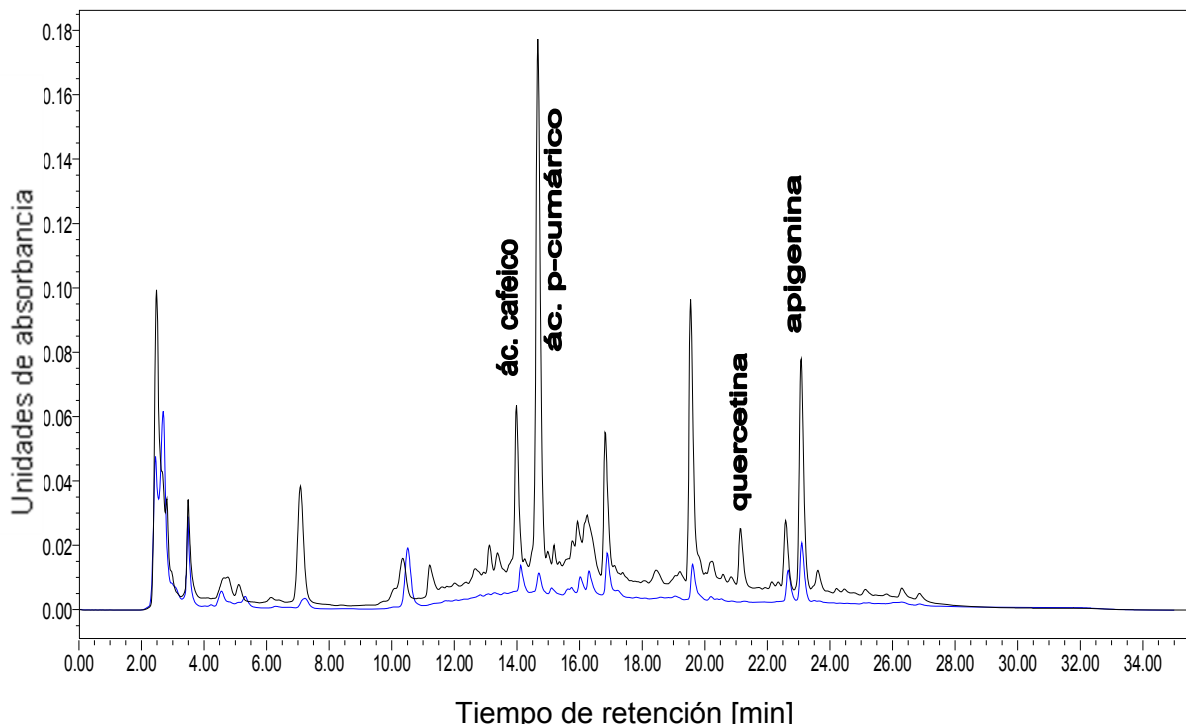


Figura 27. Cromatograma comparando el extracto hidrolizado de la hoja cruda (en negro) con el extracto hidrolizado de la hoja escaldada al vapor (en azul)

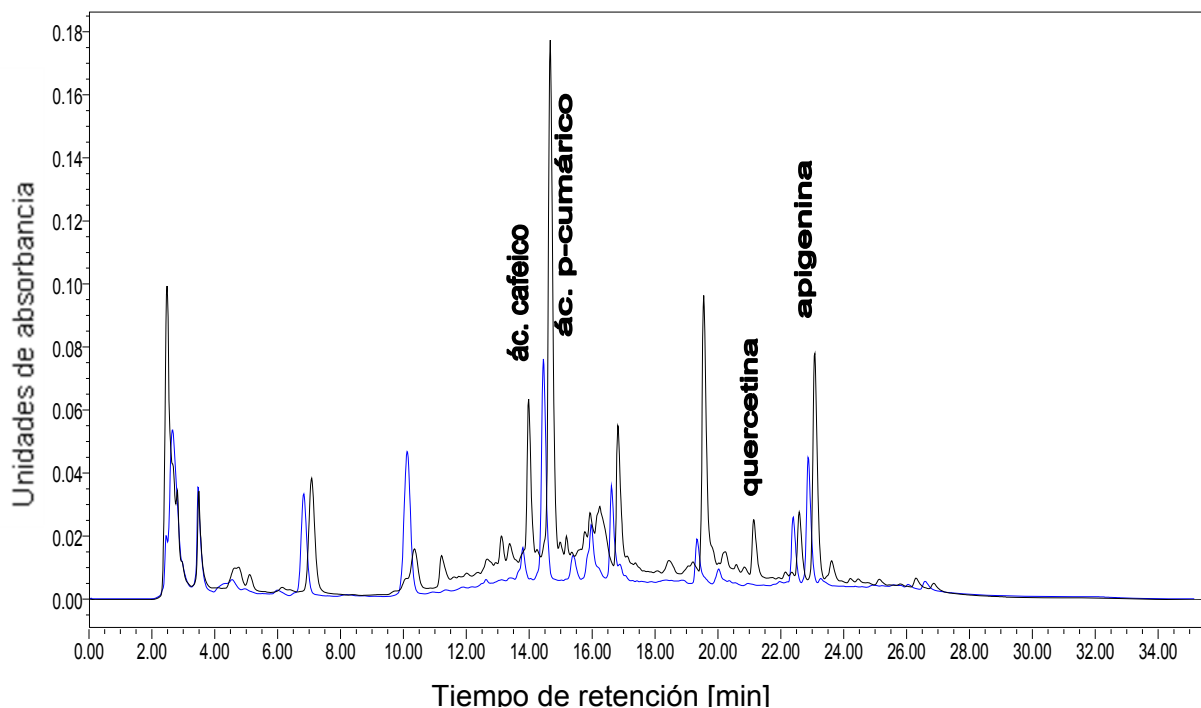


Figura 28. Cromatograma comparando el extracto hidrolizado de la hoja cruda (en negro) con el extracto hidrolizado de la hoja frita (en azul)

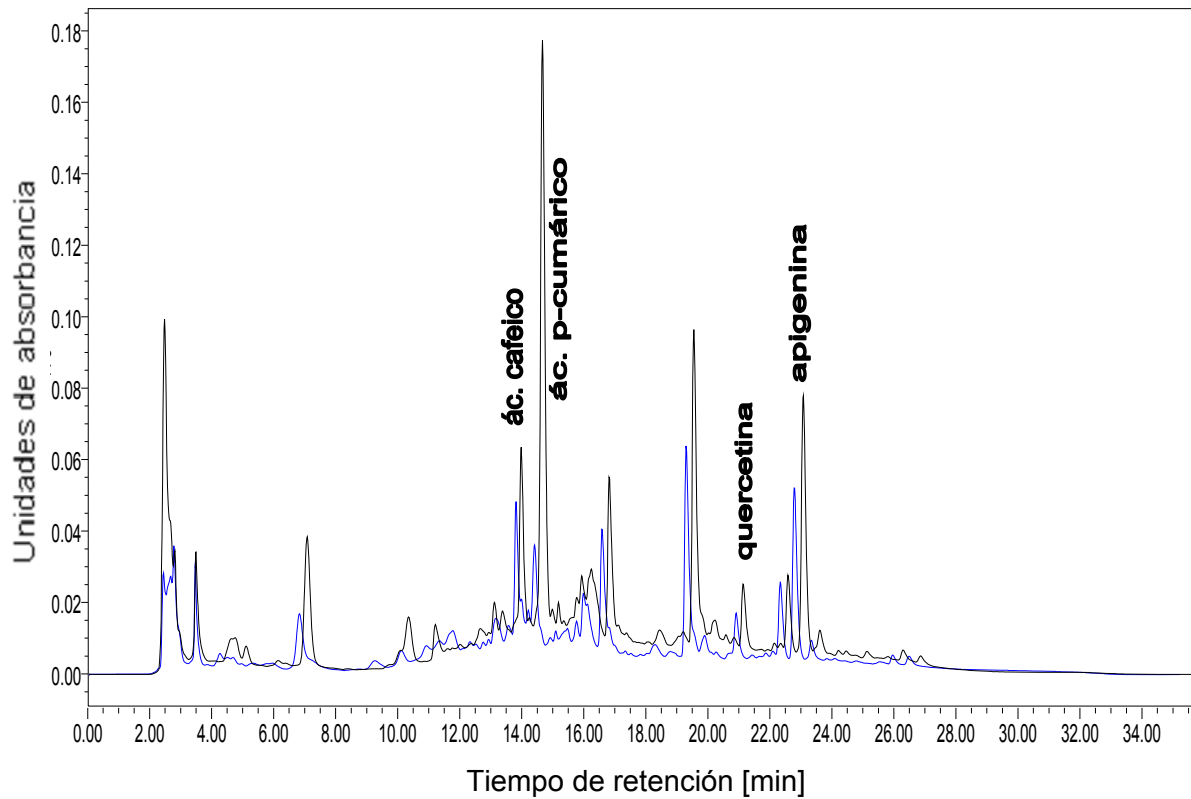


Figura 29. Cromatograma comparando el extracto hidrolizado de la hoja cruda (en negro) con el extracto hidrolizado de la hoja blanqueada (en azul)

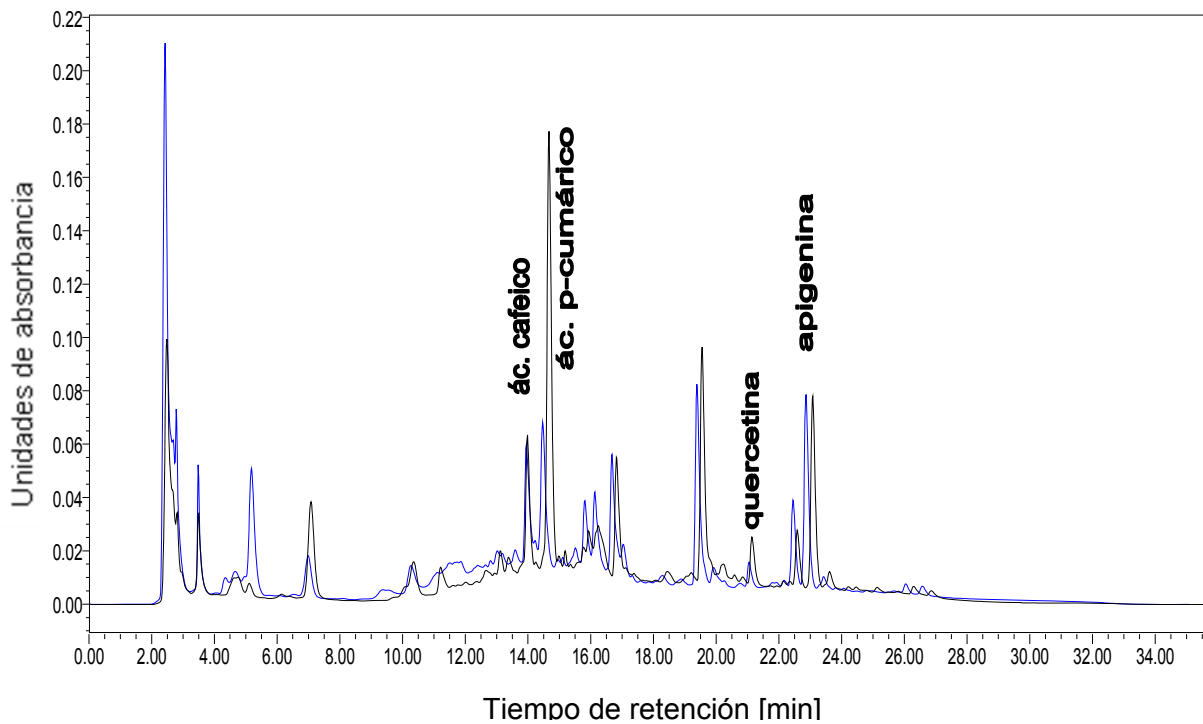


Figura 30. Cromatograma comparando el extracto hidrolizado de la hoja cruda (en negro) con el extracto hidrolizado de la hoja cocida al vapor (en azul)

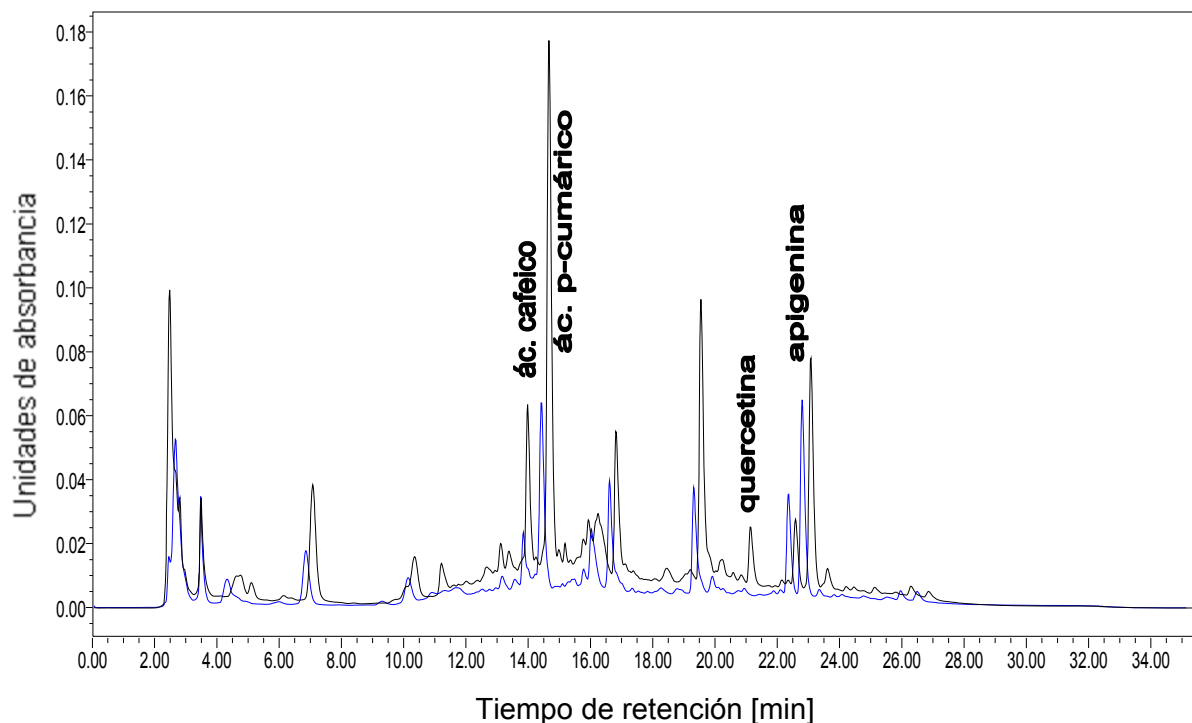


Figura 31. Cromatograma comparando el extracto hidrolizado de la hoja cruda (en negro) con el extracto hidrolizado de la hoja salteada (en azul)

Los procesos de blanqueado, escaldado al vapor, cocción al vapor y salteado redujeron el contenido de ácido protocatéuico, catequina y rutina en los extractos sin hidrolizar, sin embargo con el método de fritura profunda la concentración de estos compuestos no fue afectada.

Por otro lado en los extractos hidrolizados, la concentración del ácido caféico, p-cumárico y apigenina es disminuida con todos los proceso de cocción. El pico de quercetina identificado en el cromatograma de la hoja cruda no es apreciable en los cromatogramas de los métodos de blanqueado, escaldado al vapor, salteado, cocción al vapor y fritura; por lo que podemos proponer que este compuesto es sensible a temperaturas altas (100°-190°C).

6.6 Cuantificación de ácidos fenólicos y flavonoides por HPLC

Una vez que se determinó el perfil cromatográfico del extracto metanólico de las hojas de amaranto crudas y cocinadas, se identificó un ácido fenólico: ácido protocatéuico, y dos flavonoides: catequina y rutina, se realizaron curvas estándar de cada compuesto para poder cuantificar la concentración de cada uno en los extractos de las hojas cocinadas. Una vez que se realizó la hidrólisis del extracto y las agliconas fueron obtenidas, se identificaron adicionalmente dos ácidos fenólicos: ácido caféico y ácido *p*-cumárico; y dos flavonoides: apigenina y quercetina. El Cuadro 16 muestra el contenido de estos compuestos en cada extracto. El contenido de ácido protocatecuico en el extracto metanólico de la hoja cruda, fue de 1562.27 $\mu\text{g} / \text{g}$ hoja seca, después de los métodos de blanqueado, salteado y fritura no se detectó este compuesto, probablemente por efecto de la temperatura en cada proceso, se degradó. Mientras que el método de escaldado al vapor fue el que mayormente preservó este compuesto. Por el contrario, la catequina no se detectó después del método de escaldado, siendo las hojas blanqueadas y cocidas al vapor las que preservaron mayormente este flavonoide. Para las hojas fritas, el contenido final de catequina es incluso superior al de la hoja cruda, sin embargo, los compuestos fenólicos del aceite pueden ser causa del contenido tan alto. La rutina resultó ser más resistente a la temperatura, ya que se detectó en todos los extractos, siendo en el método de blanqueado en el que se cuantificó el mayor contenido de este compuesto.

Para el extracto hidrolizado, los ácidos fenólicos identificados resultaron ser también resistentes a la temperatura de los tratamientos de cocción, ya que se detectaron en todos los extractos. El ácido caféico, se encuentra en una concentración de 624.70 $\mu\text{g} / \text{g}$ en la hoja cruda y para las hojas cocidas al vapor y escaldadas al vapor los contenidos finales de ácido caféico fueron de 226.14 y 132.32 $\mu\text{g} / \text{g}$ respectivamente. El ácido *p*-cumárico fue el compuesto con menor concentración de todos los compuestos identificados, el contenido para la hoja cruda fue de 353.26 $\mu\text{g} / \text{g}$, después de todos los métodos de cocción el contenido

disminuyó considerablemente. Las hojas cocidas al vapor son las que preservaron el mayor contenido de este ácido fenólico con 09.59 $\mu\text{g/g}$.

Con respecto a los flavonoides detectados en el extracto hidrolizado, la apigenina resultó ser el compuesto con mayor contenido en la hoja cruda con 2326.60 $\mu\text{g/g}$, el contenido de este compuesto también disminuyó con todos los métodos de cocción, pero sin desaparecer; el método de blanqueado fue el que redujo mayormente este compuesto y el método de cocción fue el que mayormente preservó la apigenina. Para el caso de la quercetina, se detectó un bajo contenido de este compuesto, de apenas 280.80 $\mu\text{g/g}$, sin embargo a diferencia de los otros, la quercetina fue degradada en todos los métodos de cocción, excepto para la hoja cocida, probablemente por las condiciones de temperatura u otros factores de cada tratamiento. El contenido presente en la hoja cocida fue de 78.39 $\mu\text{g/g}$.

Cuadro 16. Contenido de ácidos fenólicos y flavonoides en los extractos metanólico e hidrolizado de las hojas crudas y cocidas de amaranto expresado en $\mu\text{g/g}$ de hoja.^a

Hoja	Extracto MeOH				Extrato hidrolizado		
	μg de ácido protocat / g de hoja	μg de rutina / g de hoja	μg de catequina / g de hoja	μg de ácido cafeico / g de hoja	μg de ácido p-cumar / g de hoja	μg de ácido quercetina / g de hoja	μg de ácido apigenina / g de hoja
Cruda	1562.272	639.419	1561.214	624.702	353.269	280.804	2316.601
Escaldada	503.523	567.381	ND	132.326	28.506	ND	697.514
Frita	ND	226.841	1979.217	129.831	12.741	ND	551.713
Blanqueada	ND	251.739	693.376	35.762	24.549	ND	498.359
Cocida	251.164	241.439	692.946	226.145	90.592	78.394	869.516
Salteada	ND	241.186	522.706	56.877	17.748	ND	726.147

ND = NO DETECTABLE

6.7 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante expresada como el porcentaje de inhibición del radical ABTS de las hojas crudas y cocinadas se muestra en el Cuadro 17. La capacidad de secuestrar el radical de las hojas disminuyó después de ser cocinadas. Se aprecian diferencias significativas entre las hojas blanqueadas y salteadas con respecto a las hojas crudas. Un bajo contenido del total de fenoles y flavonoides de las hojas salteadas puede explicar su baja capacidad antioxidante.

La capacidad antioxidante de las hojas cocinadas tiene correlación con el contenido de fenoles, probablemente porque estos compuestos se encuentran más disponibles para reacciones con radicales libres.

En el Cuadro 17 se muestran también los contenidos de equivalentes μmol de Trolox para las hojas cocinadas, otra forma de expresar su capacidad antioxidante comparada con un antioxidante comercial, de manera general, el valor de las hojas crudas, 6.47 equivalentes μmol de Trolox/ gramo de hoja seca, es superior al valor reportado por Nilsson *et al.* (2005) para el extracto de espinaca fresca con 2.0 μmol de Trolox/ gramo, confirmando que el valor nutracéutico de las hojas de amaranto es superior al de las espinacas; sin embargo al comparar con los valores de otros vegetales crudos como calabacita y brócoli, 8 y 11 μmol de Trolox / gramo respectivamente (Miglio *et al.*, 2008), el valor de las hojas de amaranto es cercano al de la calabacita.

El valor inicial de la hoja cruda disminuyó hasta 3.61 equivalentes μmol de Trolox con el tratamiento de blanqueado; por otro lado el tratamiento que mejor preservó este contenido, fue la cocción al vapor con valores de 5.26 equivalentes μmol de Trolox.

Cuadro 17. Valores TEAC de las hojas crudas y cocidas^a

Tratamiento	% inhibición de ABTS	Eq μmol trolox/g hoja seca
Cruda	76.53 \pm 6.54 ^a	6.47 \pm 0.58 ^a
Escaldada	64.43 \pm 0.96 ^{abc}	5.39 \pm 0.08 ^{abc}
Frita	69.67 \pm 2.72 ^{ab}	5.87 \pm 0.24 ^{ab}
Blanqueada	44.57 \pm 5.88 ^c	3.61 \pm 0.52 ^c
Cocida	63.01 \pm 4.18 ^{abc}	5.26 \pm 0.37 ^{abc}
Salteada	55.03 \pm 3.30 ^{bc}	4.25 \pm 0.29 ^{bc}

^a Los valores son presentados como la media \pm EE. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa, prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

Después del método de fritura los valores altos obtenidos de la capacidad antioxidante pueden deberse a la formación de productos de la reacción de Maillard, los cuales presentan actividad antioxidante; también se ha sugerido que los procesos de cocción pueden promover la oxidación de los polifenoles a un estado intermedio de oxidación, el cual puede exhibir una eficiencia más alta de secuestrar radicales que los que no están oxidados (Nicoli *et al.*, 1999).

La misma tendencia, en el aumento de la capacidad antioxidante, se observa para la calabacita y para el brócoli frito, ya que los valores finales fueron 16.4 y 28.8 μmol de Trolox/ gramo respectivamente (Miglio *et al.*, 2008).

La Figura 32 muestra la tendencia descendiente de los equivalentes μmol de Trolox de las hojas crudas y cocinadas y su sensibilidad a los tratamientos térmicos. Se puede apreciar que el método de blanqueado es el que reduce mayormente el contenido de equivalentes μmol de Trolox.

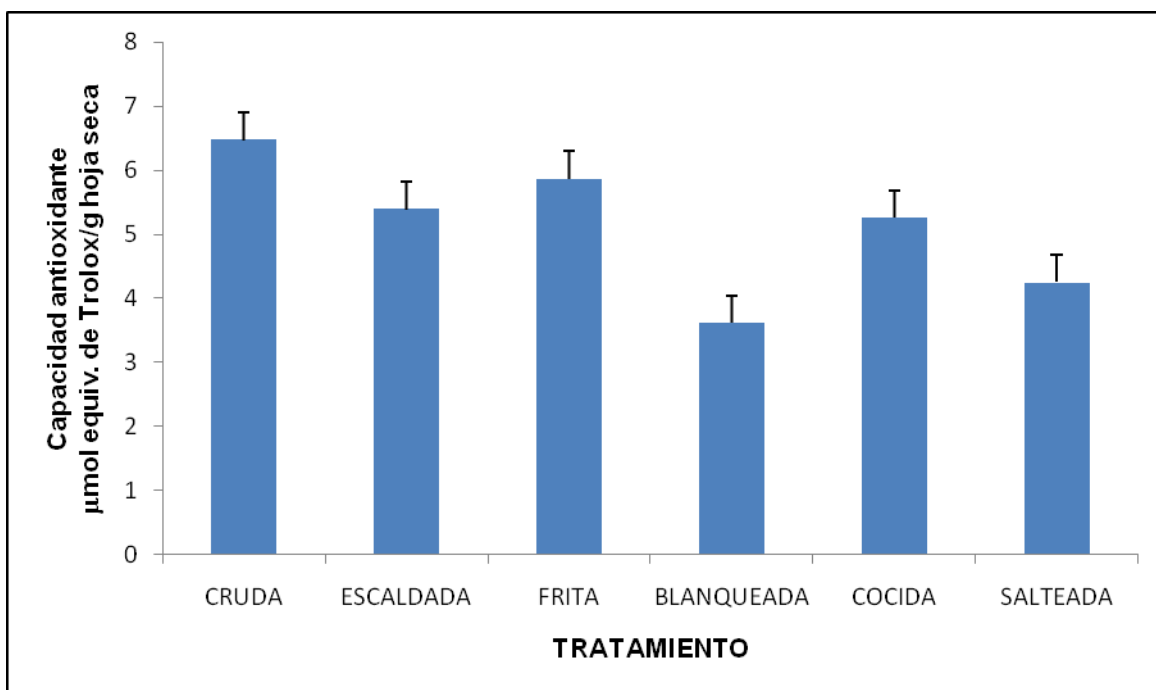


Figura 32. Efecto de los métodos de cocción en los equivalentes μmol de Trolox de las hojas

El método de inhibición de ABTS, se basa en la capacidad de los antioxidantes de reaccionar o neutralizar el radical libre generado con un sistema de ensayo, mientras que el método de FRAP mide la reducción de Fe^{3+} (hierro férrico) a Fe^{2+} (hierro ferroso) en presencia de antioxidantes. Los valores del método de FRAP expresan la concentración correspondiente de antioxidantes donadores de electrones.

Después de llevar a cabo el ensayo de FRAP con las hojas crudas y cocinadas, se evaluó la cinética reacción de las muestras y el reactivo de FRAP durante 90 minutos y se observó que después del minuto 30, la reacción se vuelve estable, es decir que pasado este tiempo se completó la reducción del complejo, según podemos observar en la Figura 27.

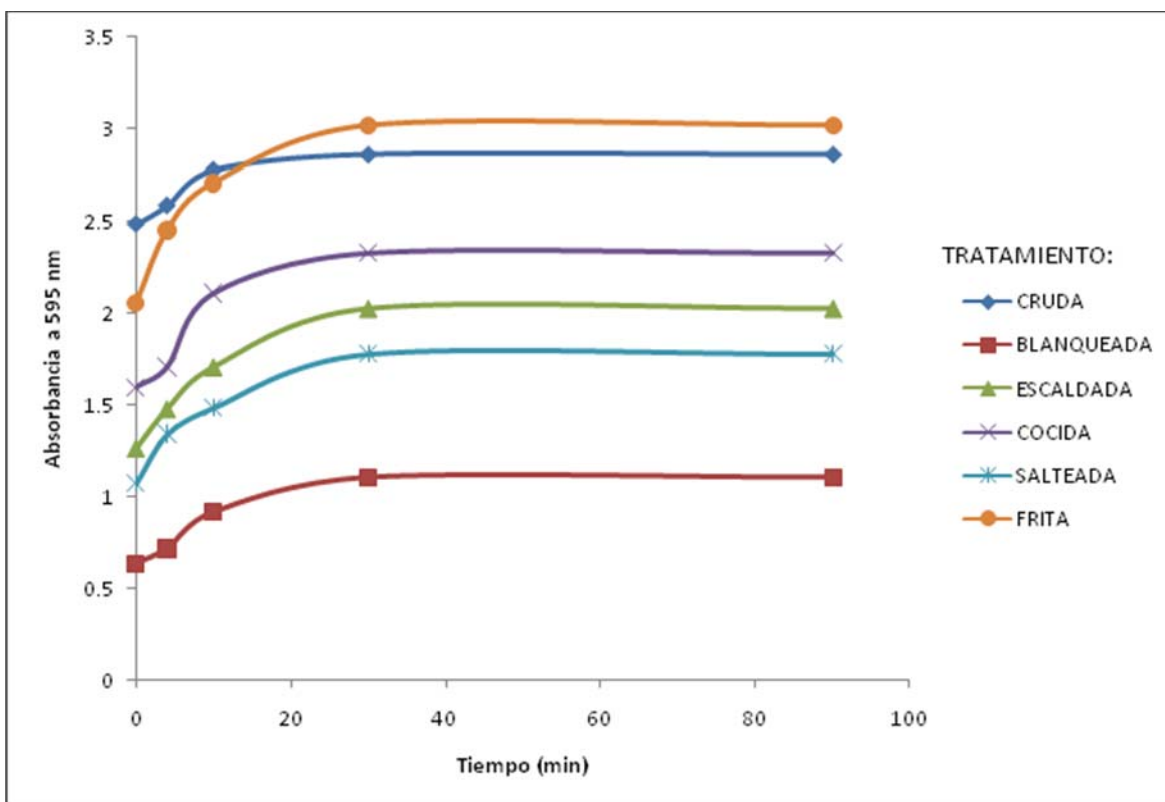


Figura 33. Cinética de reacción FRAP de los extractos metanólicos de las hojas crudas y cocidas, determinado a 595 nm

La capacidad de reducir el hierro se considera un índice del poder antioxidante de la muestra. El Cuadro 18 muestra los valores de FRAP, expresados como $\mu\text{mol Eq FeSO}_4 / \text{g hoja}$. El valor para la hoja cruda es de $40.43 \mu\text{mol Eq FeSO}_4$ el cual disminuye después de los métodos de cocción, excepto para el método de fritura profunda, siendo el valor final para este método mayor al de la hoja cruda, $42.6 \mu\text{mol Eq FeSO}_4$ aunque, sin diferencia estadística significativa. Esto se puede deber a que el aceite que se emplea en este método, por si solo tiene poder reductor alto, bajo las condiciones de temperatura de este método de cocción, 190°C .

Miglio *et al.* (2008) llevó a cabo el ensayo de FRAP para brócoli y calabacitas en estado fresco, obteniendo 52.3 y $27.9 \mu\text{mol Eq FeSO}_4$ respectivamente y después de haber sido fritos los valores fueron 90.2 y $79.7 \mu\text{mol eq FeSO}_4$ respectivamente, observando la misma tendencia de aumento en el

poder reductor después de que los vegetales fueron sometidos a este método de cocción.

El método que conservó mayormente el poder reductor de las hojas crudas fue el método de cocción al vapor, mientras que el método de blanqueado, disminuyó el poder reductor de las hojas considerablemente.

Cuadro 18. Actividad antioxidante de los extractos determinada a los 30 min.^a

Tratamiento	$\mu\text{mol eq feso}_4/\text{g hoja}$
Cruda	40.430 \pm 0.627 a
Escaldada	28.609 \pm 2.009 bc
Frita	42.600 \pm 0.767 a
Blanqueada	15.607 \pm 0.846 c
Cocida	32.860 \pm 7.333 ab
Salteada	25.088 \pm 0.782 bc

^a Los valores son presentados como la media \pm EE. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa, prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$).

En la Figura 34 se expresa la capacidad antioxidante evaluada por ambos ensayos (ABTS Y FRAP) de las hojas cocidas y crudas, donde podemos observar la misma tendencia en cuanto a dicha capacidad final, es decir, para los tratamientos cuyo medio de cocción es el vapor, la disminución de la capacidad antioxidante fue similar por ambos ensayos, mientras que para el tratamiento de fritura profunda el valor final de la capacidad antioxidante incrementó debido a los antioxidantes presentes en el aceite, sin embargo, al igual que en el contenido de metabolitos secundarios, el tratamiento de blanqueado, la capacidad antioxidante, por el ensayo de FRAP mostró valores más bajos que por el ensayo de ABTS.

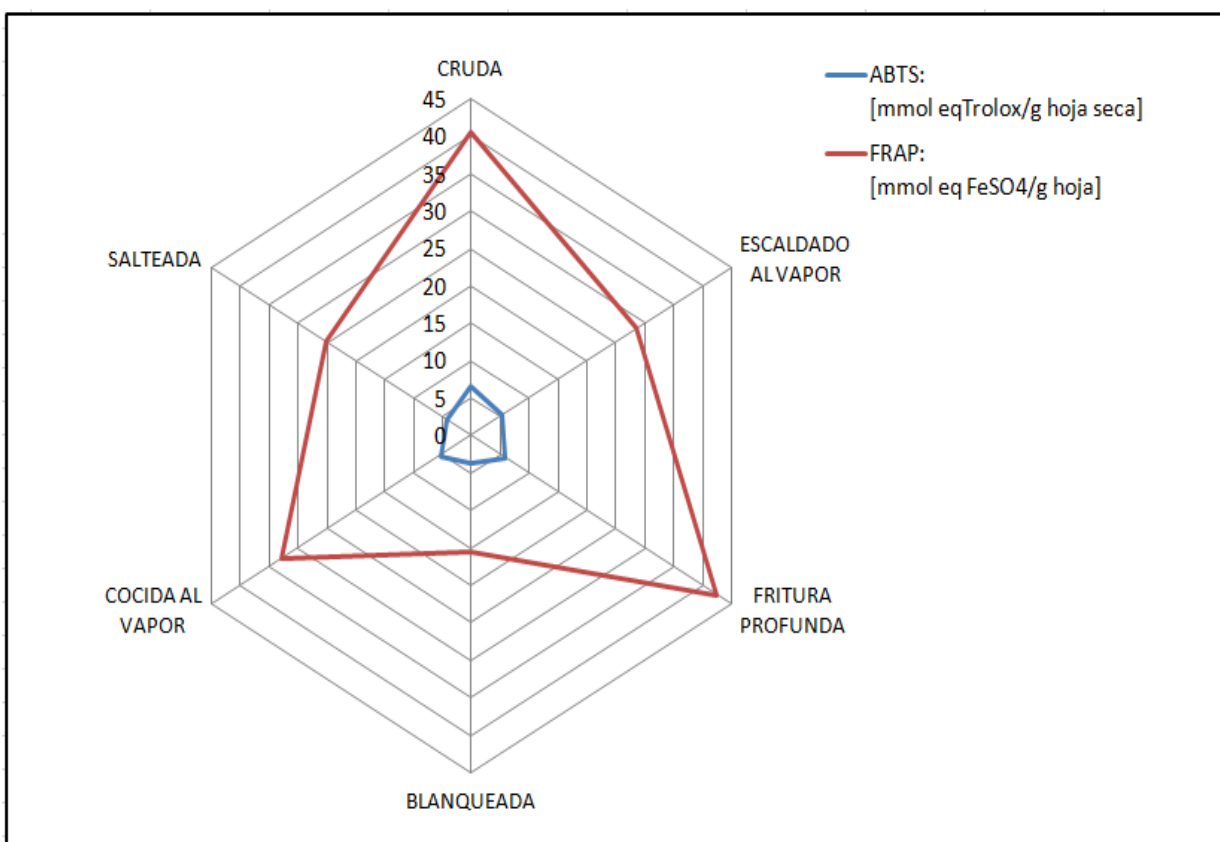


Figura 34. Relación entre los métodos de cocción y la capacidad antioxidante de las hojas

6.8 Capacidad quelante

Los agentes antioxidantes presentes en los vegetales pueden actuar como quelantes de metales e interferir con las rutas que regulan la división celular, proliferación y la desintoxicación.

El Cuadro 19 contiene los valores de la actividad quelante expresados en mM equivalentes de EDTA/ g de hoja. Para la hoja cruda se observó un valor de 448.66 mM/g hoja, al igual que para el poder reductor, los valores de las hojas fritas y salteadas fueron los más altos obtenidos, sin embargo, podría deberse al aceite absorbido por las hojas durante el tratamiento. Por otro lado, el valor de las hojas blanqueadas y escaldadas al vapor es también superior al de las hojas crudas, esto podría deberse a los diferentes tipos de compuestos fenólicos

presentes en las hojas, además de las interacciones entre estos y otros fitoquímicos en las estructuras celulares. Estas interacciones son modificadas por efecto de la temperatura y pueden resultar en una mejor disponibilidad de sitios que estructuralmente son necesarios para la asociación con el metal (Jeong *et al.*, 2004).

Cuadro 19. Eq mM EDTA para las hojas crudas y cocidas de amaranto.^a

Tratamiento	mM eq EDTA/g hoja
Cruda	448.66 ± 0.002 ab
Escaldada	616.66 ± 11.200 ab
Frita	846.44 ± 6.627 a
Blanqueada	683.55 ± 9.510 ab
Cocida	230.88 ± 32.755 bc
Salteada	915.53 ± 4.665 c

^a Los valores son presentados como la media ± EE. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa, prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$).

Se han propuesto dos mecanismos para explicar las interacciones que ocurren entre los polifenoles, responsables de la capacidad antioxidante, y los polisacáridos. La primera sugiere la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo en el fenol y los átomos de oxígeno del azúcar de la pared celular de polisacáridos. Esta interacción puede entonces formar geles de dextrano, que son capaces de encapsular a los polifenoles, provocando que no estén disponibles para poder secuestrar radicales libres y/o quelar metales. El segundo se basa en la capacidad de algunos polisacáridos para desarrollar estructuras secundarias, como nanotubos, que crean cavidades hidrofóbicas capaces de encapsular complejos polifenólicos (Pinelo *et al.*, 2006).

El valor más bajo para los mM equivalentes de EDTA/g hoja se encuentran para las hojas cocidas al vapor. Los antioxidantes presentes en las hojas de amaranto, son diversos, de manera que la capacidad antioxidante de las hojas podría resultar de la acción sinérgica e integrada de los compuestos en lugar de una suma de cada uno de los antioxidantes de manera individual.

Se han sugerido otras posibilidades para explicar el incremento en la capacidad antioxidante de algunos vegetales después de ser cocinados: (1) la liberación de grandes cantidades de componentes antioxidantes debido a la destrucción térmica de las paredes celulares y compartimentos subcelulares; (2) la producción de antioxidantes secuestradores de radicales más fuertes por la reacción química-térmica (Morales y Babel, 2002).

Es importante considerar que los compuestos antioxidantes determinados en este proyecto son hidrosolubles (ácidos fenólicos, flavonoides, etc.), por lo tanto pueden perderse por lixiviación.

VII. CONCLUSIONES

- ✓ Tiempos cortos de tratamiento y vapor de agua como medio de cocción permiten obtener valores más altos en la calidad nutricional, contenido mineral y capacidad antioxidante de las hojas.

- ✓ Agua potable como medio de cocción, provoca pérdida de nutrientes, minerales y metabolitos secundarios por lixiviación.

- ✓ Las condiciones fisicoquímicas de los tratamientos de cocción que mayormente afectaron la calidad nutricional, contenido de metabolitos secundarios y capacidad antioxidante de las hojas fueron temperaturas superiores a 100° C, y medios de cocción lipídica.

Anexo 1

Condiciones fisicoquímicos de los tratamientos empleados.

Método de cocción	Pre-tratamiento	Medio de cocción	Temperatura proceso [° C]	Tiempo proceso [min]	Sustancias agregadas al producto final
Escaldado al vapor		Vapor	97° C	2	
Blanqueado		Agua	97° C	2	Sal
Cocción al vapor	Blanqueado	Agua	97° C	2	Sal
		Vapor	97° C	40	
Salteado	Blanqueado	Agua	97° C	2	Sal
		Aceite vegetal	100° C	3	Aceite
Fritura Profunda		Aceite vegetal	190° C	0.2	Aceite

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adebooye O., Vijayalaskkshmi R., Singh V. 2008. Peroxidase activity, clorophylls and antioxidant profile of two leaf vegetables (*Solanum nigrum* L. and *Amaranthus cruentus* L.) under six pretreatment before cooking. International Journal of Food Science and technology, 43, 173-178
- Akubugwo I., Obasi, N., Chinyere G., Ugbogu A. 2007. Nutritional and chemical value of *Amaranthus hybridus* L. leaves from Afikpo, Nigeria. African Journal of Biotechnology, 6, 2833-2839.
- Amin I., Norazaidah K., Emmy H. 2006. Antioxidant activity and phenolic content of raw and blanched Amaranthus species. Journal of Food Chemistry 94, 47–52.
- AOAC. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, 17th ed., Helrich K., Editorial, AOAC: Arlington, VA, 1995; Volumen. I and II, (930.05, 930.09, 930.10, 975.03, 978.04).
- Badui D. 2006. Quimica de los alimentos. Capítulo VI vitaminas y minerales, Editorial Prentice Hall México.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by products: antioxidant activity occurrence and potential uses. Food Chemistry.
- Bertoni M., Cattaneo P. 1997. Aspectos nutricionales del follaje y de la semilla de amarantos americanos cultivados. Actas de las primeras jornadas nacionales sobre amarantos. Universidad Nacional de La Pampa. Facultad de Agricultura Santa Rosa.
- Cervantes R. 2007. Catálogo de Propiedades Nutrimentales, Nutracéuticas y Medicinales de Amaranto. Secretaría de Desarrollo Rural del Estado de Puebla, Coordinación general de cadenas productivas.
- Cook J. 1977. Vitamin C, the common cold and iron absorption in man. American Journal of Clinical Nutrition, 30, 235-241.
- Craig W. 1994. Iron status of vegetarians. American Journal of Clinical Nutrition, 59,1233S-1237S.
- Danesi F, Bordoni A. 2009. Effect of home freezing and Italian style of cooking on antioxidant activity of edible vegetables. Journal of Agricultural Food Chemistry, 74, H109-H112.
- Dewanto V., Wu X., Adom K., Lui R. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 50, 3010-3014.

- Dogan O., Tirasoglu E. 2006. Determination of potassium, calcium and chlorine in some vegetables by EDXRF. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transference*, 101.1, 141-145, 5.
- Dwyer J. 1991. Nutritional consequences of vegetarianism. *Annual Revision of Nutrition*, 11, 61-91.
- Espitia R. 1994. Guía para cultivar amaranto en los valles altos de la mesa central. Folleto para productores No. 18 INIFAP, SARH. Chapingo, México.
- Faller A., Fialho E. 2008. The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic cooking. *Food Research International*, 463-491.
- Firuzi O., Lacanna A., Petrucci R., Marrosu G., Saso L. 2000. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "feric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1721, 174-184.
- Gibson R. 1994. Content and bioavailability of trace elements in vegetarian diets. *American Journal Clinical Nutrition*, 59, 1223S-1232S.
- Guil G., Gimenez G., Rodriguez G., Torija I. 1998. Nutritional composition of *Sonchus* Species (*S. asper* L., *S. oleraceus* L., and *S. tenerrimus* L.). *Journal of Science and Food Agriculture*, 76,628-632.
- Hardy G. 1999. Technical aspects of trace element supplementation. *Curr Opinion Clinical Nutrition Metabolism Care*; 2: 277-285.
- Hinneburg I., Dorman H., Hiltunen R. 2006. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Journal of Food Chemistry* 97, 122-129.
- Hunt J., Roughead Z. 1999. Nonheme-iron absorption, fecal ferritin excretion, and blood indexes of iron status in women consuming controlled lactoovovegetarian diets for 8 weeks. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69, 944-952.
- Jacobsen S., Iteno K., Mujica Á. 2002. Amaranto Como Un Cultivo Nuevo En El Norte De Europa. *Agronomía Tropical Volumen* 52,101-119.
- Jeong S., Kim S., Kim D., Jo S., Nam K., Ahn D., Lee S. 2004. Effect of heat treatment on the antioxidant acitivity of extracts from citrus peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3389-3393.
- Jiménez M., García D., Martínez T., Mariscal M, Murcia M. 2009. Influence of cooking methods on antioxidant activity of vegetables. *Journal of Food Science*, H97-H103

- Liu M., Li X., Weber C., Lee C., Brown J., Liu R. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2926-2930.
- Lozoya E. 1999. Amaranthus betacyanin pigments applied in model food systems. *Journal of Food Science*, 64,5, 869-873.
- Matarese L., Gottschlich M. 2004. *Nutrición Clínica Práctica. Parte III Nutrientes para el soporte nutricional. 2ª. Edición. Elsevier.*
- Miglio C., Chiavaro. E., Visconti A., Fogliano V., Pellegrini N. 2008. Effects of different cooking methods on nutritional and physicochemical characteristics of selected vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 139-147.
- Modi T. 2006. Growth temperature and plant age influence on nutritional quality of Amaranthus leaves and seed germination capacity. *Water SA*.33, 3, Special Edition.
- Morales F., Babel M. 2002. Antiradical efficiency of Maillard reaction mixtures in a hydrophilic media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2788-92.
- Nicoli M., Anese M., Parpinel M. 1999. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends in Food Science Technology*, 10, 94–100.
- Nilsson J., Pillai D., Ónning G., Persson C., Nilsson Å, Akesson B. 2005. Comparison of the 2,2'-azinobis-3-ethylbenzoazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruits and vegetables. 2005. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49,239-246.
- Nenadis N., Wang L., Tsimidou M., Zhang H. 2004, Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS+ assay, *Journal of agricultural and food chemistry*, 52, 4669-4674.
- Olivares E., Peña E., Aguilar G. 2002. Nutrición mineral y estrés oxidativo por metales en espinaca y lechuga, en comparación con dos malezas asociadas, en cultivos semi-urbanos. *Interciencia, revista de ciencia y tecnología de América*, 27, 9
- Pearson D. 1976. *Chemical analysis of foods*. Churchill, Livingstone, London, 7th edition, 218-336.
- Pinelo M., Arnous A., Meyer A. 2006. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in food science and technology*, 17, 579-590.

- Saunders R., Becker. 1994. Amaranthus: A potential food and feed resource, Advanced Sciences and Technologies, Volumen VI, American Association for Clinical Chemistry, Editorial Pomeranz.
- Saxena R., Venkaiah P., Anitha L., Venu, Raghunath M. 2007. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 58,4, 250-260
- Serralde Z., Pasquetti C., Meléndez M. 2005. Micronutrientes en vegetarianos. Revista de Endocrinología y Nutrición Volumen 13, 1.
- Singh N., Kumar R. 2004. Changes in β -carotene and ascorbic acid content of fresh amaranth and fenugreek leaves during storage by low cost technique. Journal of Plant Foods for Human Nutrition, 58, 225-230.
- Solomons N. 1996. Competitive interaction of iron and zinc in the diet: consequences for human nutrition. Journal of Nutrition, 116, 927-935.
- Sotelo A., López G., Basurto P. 2007. Content of nutrient and antinutrient in edible flowers of wild plants in Mexico. Plants Foods for Human Nutrition, 62, 133-138.
- Tablas de Ingestión diaria recomendada (IDR) de energía para la población mexicana, 2001. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.
- Tijsskens L., Schijvens E. Biekman, E. 2001. Modelling the change in colour of broccoli and green beans during blanching. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2, 303-313.
- Turkmen N., Sari F. Velioglu Y. 2006. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. Food Chemistry, 93, 713-718.
- Weaver C., Plawecky K. 1994. Dietary calcium: adequacy of a vegetarian diet. American Journal of Clinical Nutrition, 59, 1238S-1241S.
- World Health Organization. 1996. Trace elements in human nutrition and health. Geneva: WHO.
- Zuliani T., Kralj Bl., Stibilj V., Milačič R. 2005. Minerals and trace elements in food commonly consumed in slovenia. Italian Journal of Food Science, 17.