



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Ciencias Químico-Biológicas
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Bioprocesamiento de Moringa
(*Moringa oleífera*) para Obtener Alimento
Funcional con Potencial Antioxidante
y Nutracéutico Altos**

Tesis

que presenta

IBQ. Ana María Bañuelos Piña

para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIA

Y

TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Directores de Tesis

DRA. EDITH OLIVA CUEVAS RODRÍGUEZ

DR. CUAUHTÉMOC REYES MORENO

Culiacán, Sinaloa, México,

Febrero de 2016.

El presente trabajo de investigación titulado “**Bioprocesamiento de Moringa (*Moringa oleífera*) para Obtener Alimento Funcional con Potencial Antioxidante y Nutracéutico Altos**”, se realizó en el laboratorio de Nutracéuticos y Bioprocesos de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, bajo la dirección del Dr. Cuauhtémoc Reyes Moreno y Dra. Edith Oliva Cuevas Rodríguez, así como también se contó con la asesoría del Dr. Jorge Milán Carrillo y la Dra. Liliana León López. El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), proporciono beca para estudios de Maestría.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, el día 04 del mes febrero del año 2016, el (la) que suscribe ANA MARIA BAÑUELOS PIÑA alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias con Orientación en Biotecnología con número de cuenta 0361188-4, de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de

Dra. Edith Oliva Cuevas Rodríguez y Dr. Cuauhtémoc Reyes Moreno y cede los derechos del trabajo titulado “Bioprocesamiento de moringa (*Moringa oleífera*) para obtener alimento funcional con potencial antioxidante y nutracéuticos altos”, a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Ana María Bañuelos Piña

Nombre completo y firma

AGRADECIMIENTOS

Gracias a **Dios** por un logro más en mi vida, por darme la familia que tengo y por rodearme de gente muy linda que he tenido a mi lado.

A la **Facultad de Ciencias Químico Biológicas y la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, de la Universidad Autónoma de Sinaloa**, por abrirme sus puertas y permitir formarme como un profesionalista en sus instalaciones, a sus maestros siempre expresando cariño y por transmitirme sus conocimientos.

A mis directores de tesis, **Dra. Edith Oliva Cuevas Rodríguez y Dr. Cuauhtémoc Reyes Moreno**, por dirigir el desarrollo de este trabajo de tesis, por la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, por sus valiosas aportaciones y acertadas sugerencias, asesoría y comprensión para el desarrollo de este proyecto, por la confianza mostrada en mi persona, así como su amistad sincera dentro y fuera del laboratorio, muchas gracias.

A la **Dra. Liliana León López**, quien me ha brindado su amistad y su apoyo en todo momento, de quien he aprendido y con quien he reído también, muchas gracias Lili.

Al **Dr. Jorge Milán Carrillo**, gracias por el apoyo brindado, comentarios y colaboración en la realización de este proyecto así como brindarme la oportunidad de estar en su grupo de trabajo y su amistad.

A la **Dra. Sarahid Mora Rochín**, por su apoyo y amistad brindada dentro y fuera del laboratorio.

Al **Dr. Roberto Gutierrez Dorado**, por apoyarme con sus comentarios y mis dudas cuando lo requería, muchas gracias.

Al **Dr. Ignacio Contreras**, muchas gracias por su apoyo y amistad brindada.

Al **Dr. Luis Martin Sánchez Magaña**, por apoyarme con mis dudas y a encontrar reactivos en el lab., por brindarme su amistad, muchas gracias.

A mis amigos de generación con quienes compartí experiencias y viajes juntos, por su amistad brindada siempre **Brenda, Anayanci, Lourdes, María Fernanda, Karen y Rodolfo**, muchas gracias por todo.

A mi compañera de escritorio **Mariela**, por brindarme su amistad y sus consejos, por los gratos momentos en el lab; y mis compañeras de generación **Jenifer, Ana Luisa y Karla**.

A mis compañeros de laboratorio **Yudith, Dulce, Oscar, Diana, Mariela, Los chicos del maíz: Carlos y Radamés, Fabiola, Daniel, Evelyn, Yuriana, Ernesto González y al lab 18.5 (Alfredo)**, por ser parte de esta etapa tan importante de mi vida, por haber compartido conmigo sus conocimientos, por ayudarme en todo lo que necesité, por las comidas y las pláticas compartidas dentro y fuera del laboratorio. Espero seguir compartiendo con ustedes más buenos momentos.

A **Yudith Escobar**, por ser mi amiga y mi compañera, no pudo haberme tocado otra mejor persona como tú, para estar a mi lado y brindarme tu apoyo, tus consejos y por compartir todas las experiencias de vida dentro y fuera del área de trabajo, por ser mi mano derecha cuando lo requerí (literal). Muchas gracias por todo y espero seguir compartiendo más momentos.

A **Dulce Medina**, por su amistad brindada durante mi estancia en su lab.

Y por último pero no menos importante a mi madre **Nidia Piña Flores**, a mi papá **Raúl Bañuelos**, a mis hermanos **Glenda y Emanuel**, mi sobrino **Samuel**, a mi tía **Mayu**, a mi prima **Yunni**, muchas gracias por todo su amor y por todo su apoyo.

DEDICATORIA

A MI HIJA,

Por ser lo más hermoso que tengo, mi impulso para seguir adelante todos los días y superarme, por todo el cariño que me das, aunque a veces no estemos juntas eres lo más importante para mí, Te amo.

A MI FAMILIA,

Por siempre apoyarme y estar conmigo de manera incondicional para poder realizar y llevar a cabo este proyecto, por todo su amor, muchas gracias.

A MI ESPOSO,

Por ser la persona que ha estado a mi lado y me ha apoyado a seguir preparándome, con quien he compartido mis buenos y malos momentos, aguantando mis días de mal humor y de estrés, Te amo.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE CUADROS	vi
I RESUMEN	1
ABSTRACT	2
II INTRODUCCIÓN	3
III REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
A ESTRÉS OXIDATIVO	5
1 Estrés oxidativo	5
2 Radicales libres	5
3 Especies reactivas de oxígeno (ROS)	6
4 Daños por ROS a biomoléculas	7
a Lípidos	7
b Proteínas	8
c Ácido desoxiribonucleico (ADN)	8
B RELACIÓN ENTRE DIETA Y ENFERMEDADES CRÓNICO DEGENERATIVAS	9
C ALIMENTOS FUNCIONALES	10
1 Definición	10
2 Nutraceuticos en los alimentos	11
a Definición	11
3 Antioxidantes	12
a Evaluación de la actividad antioxidante	12
D BIOPROCESOS PARA EL DESARROLLO DE ALIMENTOS FUNCIONALES	14
1 Fermentación en estado sólido	14
2 Germinación	14
1 Factores que afectan la germinación	16
a Temperatura	16
b Tiempo	16
c Iluminación	16
d Hormonas	16
e Metales	17
2 Etapas de la germinación	18

a	Imbibición	18
b	Reanudación del metabolismo energético y reparación celular	19
c	Síntesis de proteínas	20
d	Metabolismo de hormonas	20
e	Cambios en el embrión	21
f	Relación entre el embrión y la estructura circundante	21
3	Efecto de la germinación sobre composición química y valor nutricional	22
4	Efecto de la germinación sobre fitoquímicos y propiedades nutraceuticas	22
F	MORINGA (Moringa oleifera)	23
1	Origen de moringa	23
2	Taxonomía	25
3	Distribución	25
4	Composición química de la semilla de moringa	27
a	Proteínas	27
b	Lípidos	27
c	Fibra dietaria	30
5	Valor nutricional de la semilla de moringa	31
a	Digestibilidad proteínica	31
b	Perfil de aminoácidos esenciales	32
6	Fitoquímicos en semilla de moringa	33
7	Propiedades nutraceuticas de la semilla de moringa	36
8	Utilización y consumo de moringa	36
IV	JUSTIFICACIÓN	39
V	OBJETIVOS	40
A	OBJETIVO GENERAL	40
B	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
VI	MATERIALES Y MÉTODOS	41
A	MATERIALES	41
B	MÉTODOS	41
1	Características físicas de la semilla de moringa	41
a	Dimensiones físicas	41
b	Peso de 1,000 semillas	41
c	Peso hectolítrico	41
2	Composición química	41
a	Proteína cruda	42
b	Grasa cruda	42

c	Minerales	42
d	Carbohidratos	43
3	Obtención de harinas de moringa cruda y bioprocesada	43
4	Evaluación del contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) y actividad antioxidante (AAox) en harinas de moringa bioprocesada (HMB)	45
a	Extracción de fitoquímicos libres	45
b	Extracción de fitoquímicos ligados	45
c	Compuestos fenólicos totales (CFT)	47
d	Actividad antioxidante (Aaox) hidrofílica total	48
5	Optimización del proceso de germinación de la semilla de Moringa	50
a	Diseño experimental	50
b	Optimización del proceso de geminación	52
6	Propiedades fisicoquímicas de harina de moringa germinada optimizada (HMGO)	52
a	Diferencia total de color (ΔE)	52
b	Actividad acuosa (aw)	53
c	Densidad aparente	53
d	Índice de absorción de agua (IAA)	53
e	Índice de solubilidad en agua (ISA)	54
7	Composición química y valor nutricional de harina de moringa cruda (HMC) y germinada optimizada (HMGO)	54
a	Composición química	54
b	Digestibilidad proteínica in vitro (DPIV)	54
c	Perfil de ácidos grasos	55
1)	Obtención de extractos	55
2)	Transesterificación	55
d	Fitoquímicos	56
1)	Taninos condensados	56
2)	Saponinas	56
3)	Inhibidores de tripsina	58
4)	Ácido Fítico	59
5)	Compuestos fenólicos totales (CFT)	60
1)	Análisis cualitativo por HPLC	61
8	Actividad antioxidante en HMC y HMGO	61
1)	ORAC	61
9	Análisis estadístico	61
VII	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
A	CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LAS SEMILLAS DE MORINGA	62

B OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE GERMINACION PARA LA OBTENCIÓN DE HMGO	64
1 Modelos de predicción	64
a Contenido de proteína (CP)	64
b Contenido de Fenólicos Totales (CFT)	68
c Capacidad antioxidante (AAox)	71
2 Optimización del proceso de germinación	74
C PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS, FUNCIONALES Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE HMC y HMGO	74
1 Propiedades fisicoquímicas	74
2 Propiedades funcionales	77
3 Composición química	78
a Perfil de ácidos grasos en HMC Y HMGO	81
b Fitoquímicos	83
1) Taninos condensados	83
2) Saponinas	83
3) Inhibidores de tripsina	85
4) Ácido fitico	85
5) Compuestos fenólicos totales	86
1) Método colorimétrico	86
2) Análisis de ácidos fenólicos por HPLC de la harina de moringa cruda y germinada optimizada	88
D ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN HMC Y HMGO	91
1 ORAC	91
XIII CONCLUSIONES	93
IX BIBLIOGRAFÍA	95
Abreviaturas	115

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig	Descripción	Pág
1	Esquema de las partes anatómicas de moringa.	24
2	Diagrama de flujo del proceso de germinación de semillas de moringa (<i>Moringa oleifera</i>).	44
3	Diagrama de flujo para la obtención de fitoquímicos libres y ligados para la determinación de compuestos fenolicos totales y capacidad antioxidante.	46
4	Mecanismo de acción propuesto para el método de capacidad antioxidante ORAC hidrofílico.	49
5	Superficie de respuesta del efecto de TG y tG para el contenido de proteína de las HMG.	66
6	Gráfica de contorno del efecto de la TG y tG sobre el contenido de proteína de las HMG.	67
7	Superficie de respuesta del efecto de la TG y tG sobre el contenido de Fenólicos Totales (CFT) de las HMG.	69
8	Gráfica de contorno del efecto de la TG y tG sobre el contenido de Fenólicos Totales (CFT) de las HMG.	70
9	Superficie de respuesta del efecto de TG y tG sobre la actividad antioxidante (ORAC) de las HMG.	72
10	Gráfica de contorno del efecto de TG y tG sobre la actividad antioxidante (ORAC) de las HMG.	73
11	Región de la mejor combinación de TG y tG para la producción de HMGO.	75
12	Cromatograma de HPLC de extractos libres de HMC y HMGO.	89
13	Cromatograma de HPLC de extractos ligados de HMC y HMGO.	90

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág
1	Especies de moringa.	26
2	Contenido de ácidos grasos en semilla de moringa (<i>Moringa oleifera</i>).	28
3	Composición proximal de semilla de moringa (<i>Moringa oleifera</i>).	29
4	Contenido de vitaminas A y C en hojas de Moringa.	34
5	Fitoquímicos presentes en aislados de semilla de moringa.	35
6	Usos medicinales reportados en la literatura de las diferentes partes de <i>Moringa oleifera</i> .	37
7	Propiedades físicas de semillas de moringa.	63
8	Diseño experimental propuesto en la presente investigación para la obtención de una harina de moringa germinada optimizada (HMGO) con capacidad antioxidante y compuestos fenólicos altos.	65
9	Composición química, propiedades fisicoquímicas y funcionales de HMC y HMGO.	76
10	Contenido de lípidos en HMC y HMGO.	82
11	Compuestos fitoquímicos de harina de moringa cruda y germinada.	84
12	Contenido de fenólicos totales y actividad antioxidante en HMC y HMGO.	87

I RESUMEN

El árbol de *M. oleifera* es un cultivo originario del norte de Afganistán, es un árbol que ofrece una amplia variedad de productos alimenticios, ya que todas las partes de la planta son comestibles (vainas verdes, hojas, flores, semillas y raíces) ya que se consideran nutritivas y que pueden utilizarse para consumo humano por su alto contenido de proteína, vitaminas y minerales. A las semillas, se les considera que podrían tener un alto potencial biotecnológico y que pueden ofrecer efectos positivos en la salud humana; sin embargo la mayoría de los estudios se han realizado en hojas y tallos. El proceso de germinación es una alternativa tecnológica para mejorar la calidad nutracéutica y el valor nutricional en algunas semillas. Por ello, el objetivo de la presente investigación fue determinar las mejores condiciones de temperatura (TG) y tiempo (tG) de germinación para obtener una harina de moringa germinada optimizada (HMGO) con valor nutricional y nutracéutico alto. Se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR) como técnica de optimización, como variables de proceso se utilizaron la temperatura (25-40°C) y tiempo (24-360 h) de germinación y como variables de respuesta contenido de proteína (CP), fenólicos totales (FT) y actividad antioxidante(Aaox). Los niveles máximos y mínimos para las variables de respuesta fueron CP= 21.5-25.6%, FT=197.3-297.6 mg EAG/100g bs y Aaox de 6280.5-11592.8 $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$. La mejor condición para obtener una HMGO fue de TG= 30°C y tG=336h, además se encontró que el proceso de germinación de moringa disminuye algunos factores antinutricionales, por lo que, la germinación de semillas de moringa podría ser utilizado para la elaboración de alimentos funcionales con potencial nutracéutico.

ABSTRACT

M. oleifera tree is a native crop in northern Afghanistan, is a tree that offers a wide variety of food products, since all parts of the plant are edible (green pods, leaves, flowers, seeds and roots) and they deemed nutritionally usable for human consumption due to its high protein content, vitamins and minerals. In the seeds, they are considered that could have a high biotechnological potential and can have positive effects on human health; however, most studies have been done on leaves and stems. Germination process is a technological alternative to improve nutritional value and nutraceutical quality of some seeds. The objective of this work was to determine the best germination conditions of temperature and time to obtain a flour from Moringa (*Moringa oleifera*) with high nutritional and nutraceutical value. Response surface methodology (RSM) with a central composite rotatable design was performed to optimize germination temperature (25-40°C) and time (24-360 h) using three response variables (protein content, total phenolics and antioxidant activity). According to regression models, minimum and maximum levels of the response variables were 21.5-25.6 % protein content of sample DM, 197.3-297.6 mg GAE/100g DM of total phenolics and 6280.5-11592.8 µmol TE/100g DM of antioxidant activity. The superposition of contour plots of each one of the responses variables allowed to find, graphically, the best conditions for *Moringa oleifera* seeds germination. The higher values of protein content, total phenolics and antioxidant activity were observed at 30°C and 336h of germination.

II INTRODUCCIÓN

En la actualidad, existe la tendencia a mejorar los hábitos alimenticios consumiendo alimentos funcionales que además de cubrir las necesidades alimentarias o nutritivas también aporten un beneficio extra a la salud. Las plantas son el principal reservorio de compuestos bioactivos: aproximadamente el 40% de los fármacos comerciales se obtienen de una fuente vegetal (Simmonds 2003). El árbol de *Moringa oleifera* ha recibido atención en los últimos años ya que se cree que posee un gran potencial para su cultivo en México así como en muchas partes de América tropical por su combinación singular de propiedades. Este árbol, que además es de ser de rápido crecimiento, tolera el calor y es resistente a las sequías (Martínez 1959; Reyes y col 2006).

Las hojas son comestibles y ricas en proteínas, con un perfil de aminoácidos esenciales balanceado. Además, proporciona vitaminas (principalmente A y C) en altas cantidades, así como antioxidantes potentes (Fuglie 2001; Fahey 2005; Ferreira y col 2008).

Los frutos jóvenes del árbol de moringa son comestibles y las semillas producen un aceite comestible y lubricante de altísima calidad ($\approx 70\%$ ac. oleico) (Abdulkarim y col 2007). Los desechos del prensado de las semillas para obtener el aceite contienen uno de los floculantes o aglutinantes vegetales más potentes que se conocen y pueden eliminar la turbidez del agua. Las hojas del árbol también ofrecen un forraje nutritivo para animales. En las últimas décadas el consumo de la semilla de *M. oleifera* se ha incrementado en la población. En el mercado se puede encontrar a la venta una extensa variedad de productos “medicinales” elaborados a base de las diferentes partes del árbol de moringa (hoja, tallo, vaina, semilla, flor y

raíz) resaltando los elaborados a base de semillas, que prometen numerosos beneficios como: incrementar las defensas naturales del cuerpo, promover la estructura celular, controlar de forma natural los niveles de colesterol sérico, reducir la aparición de arrugas y líneas finas, promover el funcionamiento normal del hígado y riñón, entre otras. Todo esto basado en suposiciones empíricas, sin datos científicos que puedan permitir conocer el beneficio real que puedan proporcionar estos productos a los humanos (Padrón 2014). En este sentido, poca literatura científica indexada muestra el tipo de compuestos químicos, propiedades fisiológicas que el consumo de semilla de moringa podría ejercer; algunos muestran el alto contenido nutrimental (proteína y lípidos), además la presencia de compuestos antinutrimientales como inhibidores de proteasas, saponinas, taninos, ácido fítico (fitatos) y lectinas, compuestos que se caracterizan por formar complejos con minerales, proteínas, carbohidratos o interaccionar con enzimas digestivas (tripsina, quimotripsina y pepsina), lo que ocasiona que no se lleve a cabo una correcta absorción de los nutrimentos en el intestino delgado (Cheryan 1980; Liener 1989; Gee y col 1993; Cameán y Repetto 2006). Así mismo, se ha reportado la presencia de fenólicos (Melo y col 2013; Oluwole y col 2013). La utilización de procesos biotecnológicos como la germinación, son alternativas propuestas en la última década para el desarrollo de alimentos y/o ingredientes funcionales, las cuales permiten potenciar el uso de algunas plantas, mejorando las propiedades nutricionales y nutraceuticas, lo que permite obtener productos con mejores efectos fisiológicos en los seres humanos. Es por ello que el objetivo de la presente investigación fue encontrar las mejores condiciones de germinación para la obtención de harina de moringa bioprocesada con valor nutricional y nutracéutico alto.

III REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

A **ESTRÉS OXIDATIVO**

1 **Estrés oxidativo**

El daño o estrés oxidativo se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno. Todo esto tiene como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado (Ames y col 1993). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) inducen peroxidación lipídica, alteración de las proteínas y el ADN (Pietta 2000). Cuando se presenta el estrés oxidativo, este a su vez está muy relacionado con carcinogénesis, lesiones inflamatorias, diabetes, arteriosclerosis, artritis reumatoide, envejecimiento y neoplasias (Mercuri y col 2000). Durante la vida se produce un equilibrio y, a medida que el individuo envejece, dicho balance está a favor de los oxidantes; se recomienda de vital importancia un consumo de alimentos ricos en antioxidantes naturales para contrarrestarlos (Ray y col 2012).

2 **Radicales libres**

Los radicales libres se definen como especies que contienen uno o más electrones no apareados, y es esta capa de electrones incompleta que confiere su alta reactividad, dándole una configuración que genera una alta inestabilidad (Burton y Jauniaux 2011). En la molécula de oxígeno se conocen las siguientes especies reactivas:

1. O_2 Anión súper óxido.
2. H_2O_2 Peróxido de Hidrógeno.
3. HO radical hidróxido.
4. O_2 Oxígeno singulete.

El oxígeno es un elemento imprescindible para la vida, pero es fuente de radicales libres, que si no se neutralizan de forma adecuada pueden tener efectos deletéreos sobre la función celular. Se dice que existe "estrés oxidativo" cuando existe una excesiva exposición a oxidantes y/o una capacidad antioxidante disminuida (González y Morera 2001).

3 Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Aproximadamente el 90 % del oxígeno que consumimos se destina a la fosforilación oxidativa. Las enzimas que requieren oxígeno para las reacciones de hidroxilación y oxigenación utilizan otra fracción de aproximadamente el 10 %. Una fracción residual, en torno al 1 % se convierte en especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) tales como el superóxido y el peróxido de hidrógeno, que son formas reactivas de oxígeno intrínsecamente tóxicas. Las ROS son importantes en el metabolismo, algunas enzimas utilizan H_2O_2 como sustrato y desempeñan un papel en la regulación del metabolismo y en las defensas inmunológicas contra la infección. Sin embargo, las ROS son también una fuente de daño crónico para las moléculas biológicas tisulares (Baynes 2005). Estas actúan como oxidantes y se cree que son las principales causantes del envejecimiento y de muchas enfermedades asociadas a éste, entre ellas la enfermedad cardiovascular, el cáncer, las cataratas, el declive del sistema inmunitario relacionado con la edad, y las

enfermedades degenerativas del sistema nervioso, tales como las enfermedades de Parkinson y de Alzheimer (Ashwell 2002).

4 Daños por ROS a biomoléculas

a Lípidos

Los radicales hidroxilo son capaces de causar la peroxidación lipídica en la membrana plasmática o de cualquier orgánulo que contiene grandes cantidades de cadenas laterales de ácidos grasos poliinsaturados. Por la abstracción de hidrógeno de la cadena lateral de hidrocarburo de un ácido graso, que crean un radical. Si el oxígeno está presente, este puede reaccionar para formar un radical peroxilo ($-C-O-O\cdot$), Que a su vez es capaz de abstraer hidrógeno a partir de un ácido graso adyacente, por lo que se da la propagación de la reacción (Burton y Jauniaux 2011).

Dado que la vitamina E es soluble en lípidos y posee una cola hidrófoba, que tiende a acumularse en el interior de las membranas lipídicas. En este caso, actúa como la cadena automática más importante, ya que reacciona con los radicales peroxilo lipídicos alrededor de cuatro veces más rápido de lo que pueden reaccionar con cadenas laterales de ácidos grasos adyacentes (Halliwell B. y Gutteridge 1999).

Evidencia de la peroxidación de lípidos puede ser detectada usando anticuerpos dirigidos contra uno de los productos principales, 4-hidroxinonenal. Puede ser desintoxicado de manera eficiente en las células por la glutación de S-transferasa grupo de enzimas, pero niveles elevados se asocian con la pérdida de la fluidez y la función de la membrana, y la activación de la cascada apoptótica (Burton y Jauniaux 2011).

b Proteínas

Los aminoácidos, tanto libres como en las proteínas, son un objetivo para el daño oxidativo. La oxidación directa de las cadenas laterales conduce a la formación de grupos carbonilo (aldehídos y cetonas), y prolina, arginina, lisina y treonina son particularmente vulnerables a los ataques (Donne y col 2003).

Los productos carbonílicos son estables, y su detección mediante ensayo inmuno enzimático o Western Blot es el método más utilizado para el ensayo de oxidación de proteínas (Burton y Jauniaux 2011).

La abstracción de iones de hidrógeno del grupo tiol de la cisteína puede conducir a la formación de enlaces disulfuro y el plegamiento de proteínas anormales, de una manera análoga a la activación de ASK1. Un plegamiento anormal no solo puede conducir a la pérdida de la función, sino también la agregación de proteínas y la muerte celular. El peróxido de nitrito reacciona con residuos de tirosina para formar 3-nitrotirosina, que de nuevo puede ser detectado inmuno histoquímicamente. En los niveles fisiológicos, se cree que la nitración de proteínas puede ser un proceso selectivo y reversible que conduce a la activación de una manera análoga a la fosforilación, pero a niveles más altos puede ser perjudicial (Burton y Jauniaux 2011).

c Ácido desoxiribonucleico (ADN)

El ADN es atacado principalmente por radicales $-OH$, y una variedad de productos se pueden generar a través de reacciones con cualquiera de las bases de ADN o la desoxirribosa (Halliwell y Gutteridge 1999). Los ataques contra los restos de azúcar pueden causar rupturas de cadena, mientras que los de las proteínas histonas puede conducir a enlaces cruzados que interfieren con el plegamiento de la cromatina, la reparación del ADN y la transcripción. Por lo tanto, pueden dar lugar a

la mutación o la expresión génica aberrante. El ADN mitocondrial es particularmente vulnerable a los ataques ROS debido a su proximidad al lugar de generación de O₂ de la cadena de transporte de electrones, la falta de protección de las histonas y los mecanismos mínimos de reparación que existen. En consecuencia, los daños en el ADN mitocondrial es extenso incluso en condiciones normales, y las mutaciones se producen en cinco a 10 veces la tasa observada en el ADN nuclear (Myatt 2010).

Como el ADN mitocondrial codifica varias proteínas, incluyendo enzimas de la cadena de transporte de electrones, la mutación puede conducir a la producción del deterioro de energía y el riesgo de nuevos escapes de electrones, lo que agrava la tensión inicial (Burton y Jauniaux 2011).

B RELACIÓN ENTRE DIETA Y ENFERMEDADES CRÓNICO DEGENERATIVAS

La dieta humana posee tanto sustancias que participan en la inhibición del desarrollo y/o prevención de algunas enfermedades crónico degenerativas entre las que se pueden citar al cáncer, cardiovasculares y diabetes. Referente al cáncer, a las sustancias que participan en la prevención, se les atribuyen propiedades como antimutágenos y/o anticarcinógenos, entre los más estudiados están los polifenoles (Cardador y col 2002).

Estudios epidemiológicos muestran cierta quimioprotección a ciertos tipos de cáncer en comunidades donde se consume frecuentemente frutas y vegetales frescos, debido al aporte de flavonoides. Esto ha llevado a que los polifenoles de la dieta, reciban especial atención como agentes quimioprotectores potenciales, debido a su acción protectora para suprimir la formación de radicales libres o bien por su capacidad para atraparlos (Tamimi y col 2002).

El mecanismo molecular por el cual los antioxidantes inhiben la proliferación de células de cáncer está bajo investigación. Diversas evidencias sugieren que los fitoquímicos con actividad antioxidante son específicos para un tipo de célula y dependientes de la concentración. Ellos pueden eliminar los radicales libres o bien generar más estrés oxidativo que inhiba la proliferación de las células cancerígenas (Loo 2003).

C ALIMENTOS FUNCIONALES

1 Definición

De acuerdo con el Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (ILSI por sus siglas en inglés, en 1999) un alimento puede considerarse funcional si se demuestra satisfactoriamente que afecta a una o más funciones corporales específicas, más allá de sus efectos nutricionales intrínsecos, de tal modo que resulte apropiado para mejorar el estado de salud y el bienestar, así mismo reducir el riesgo de enfermedad, o ambas cosas. De manera práctica, un alimento funcional puede ser: (1) Un alimento natural en el que uno de sus componentes ha sido mejorado mediante condiciones especiales de cultivo, (2) Un alimento al que se ha añadido un componente para que produzca beneficios (por ejemplo, la adición de bacterias probióticas seleccionadas, con efectos benéficos sobre la salud intestinal), (3) Un alimento del cual se ha eliminado un componente para que produzca menos efectos adversos sobre la salud (por ejemplo, la disminución de ácidos grasos saturados), (4) Un alimento en el que la naturaleza de uno o más de sus componentes ha sido modificada químicamente para mejorar la salud (por ejemplo, los hidrolizados proteicos adicionados en los preparados para lactantes para reducir el riesgo de alergenocidad), (5) Un alimento en el que la biodisponibilidad de uno o más de sus

componentes ha sido aumentada para mejorar la asimilación de un componente beneficioso, (6) Cualquier combinación de las posibilidades anteriores (ILSI 1999).

Los alimentos contienen también sustancias fisiológicamente activas que cumplen, al igual que los nutrimentos esenciales, una función de beneficio y contribuyen a reducir la incidencia de ciertas enfermedades crónicas y, por tanto, son necesarias para una vida saludable (Caragay 1992).

2 Nutracéuticos en los alimentos

a Definición

Se define a un nutracéutico como cualquier sustancia que puede ser considerada un alimento o parte de un alimento y proporciona beneficios médicos o de salud, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades (Andlauer y Frust 2002). A los componentes o ingredientes fisiológicos activos presentes en los alimentos nutracéuticos se les denomina con el término de fitoquímicos (Dillard y Bruce 2000). El número de fitoquímicos y de evidencias científicas a cerca de ellos ha ido en aumento. Cada vez se reconoce más el efecto benéfico de algunos de ellos, como los presentes en cereales y leguminosas. Son muchos y diferentes los compuestos que se investigan por su capacidad nutracéutica, específicamente por su actividad como antimutágenos y/o anticarcinógenos, así como antioxidante. Entre los fitoquímicos más estudiados se encuentran: fibra, compuestos fenólicos (proantocianidinas, flavonoides, ácidos fenólicos), terpenos (carotenoides), tocoferoles, calcio, clorofilina, tiocianatos e inhibidores de proteasas, entre otros (Liu 2004).

3 Antioxidantes

a Evaluación de la actividad antioxidante

Los compuestos antioxidantes naturales, como los flavonoides, coumarinas, quinonas y carotenoides, inhiben mecanismos de iniciación y propagación de las reacciones oxidativas (Velioglu y col 1998). Estos compuestos antioxidantes naturales son muy efectivos en la protección del organismo contra mutagénesis, carcinogénesis y envejecimiento celular (Cook y Samman 1996). Estudios in vitro sugieren que alimentos con fitoquímicos con potencial antioxidante tienen un efecto protector contra la mayoría de las enfermedades incluyendo cáncer y enfermedades cardiovasculares (Steinberg 1991; Block y col 1992; Ames y col 1993; Byers y Guerrero 1995; Knekt y col 1997; Elliot 1999; Kaur y Kapoor 2001; Dolly y col 2013).

En la revisión literaria se describen numerosos métodos para predecir la protección frente a la oxidación que se puede atribuir a los antioxidantes de un alimento. La información suministrada por estos métodos es a veces muy cuestionada. Los modelos in vitro químicos hay que interpretarlos teniendo en cuenta todas sus limitaciones: medio de reacción, sustrato oxidable, radical, concentración de iniciador de la oxidación, etc. los resultados son indicadores pero no está completamente demostrado que se pueden extrapolar a las condiciones fisiológicas. Sin embargo, son considerados buenas herramientas para seleccionar extractos fenólicos o sus fracciones con alta capacidad antioxidante principalmente por la rapidez, reproducibilidad y bajo costo de este tipo de métodos, además que algunos estudios han mostrado buenas correlaciones entre los resultados obtenidos en modelos animales con resultados de la actividad antioxidante in vitro. A continuación se resumen algunas de las metodologías más utilizadas en el estudio

in vitro de la actividad antioxidante de compuestos fenólicos. Una de las estrategias más aplicadas en las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración (Arena y col 2001). Con base en las reacciones químicas involucradas, la mayoría de los métodos de capacidad antioxidante se pueden dividir en dos categorías: (1) ensayo basado en reacción de transferencia de átomo de hidrógeno (e.g. método de decoloración del β -caroteno) y (2) ensayo basado en reacción de transferencia de un electrón (e.g. TEAC). La elección del método de actividad antioxidante depende del tipo de compuestos que se quieran evaluar ya sea de naturaleza hidrofílica ó hidrofóbica (Pérez y col 2003). Los ensayos basados en transferencia de un electrón involucran reacciones de óxido-reducción (redox) con el oxidante, en cual es usado también como sonda para monitorear la reacción y como un indicador del punto final de la misma (Huang y col 2005). Este método detecta la habilidad de un antioxidante para transferir un electrón y reducir así cualquier compuesto. Por otro lado, los métodos basados en transferencia de átomo de hidrógeno generalmente requieren de un generador de radicales libres, una sonda molecular oxidable y un antioxidante (Huang y col 2005). En estos métodos, se mide la habilidad de un antioxidante para suprimir radicales libres por la donación de átomos de hidrógeno. Estas reacciones son independientes del pH y solventes empleados, la presencia de agentes reductores, incluyendo metales, presenta una complicación en estos ensayos ya que pueden conducir a reactividades falsas y aparentemente altas (Prior y col 2005).

D BIOPROCESOS PARA EL DESARROLLO DE ALIMENTOS FUNCIONALES

Existen diversas tecnologías de procesamiento de alimentos las cuales presentan un alto potencial y pueden ayudar a incrementar la calidad nutritiva, biodisponibilidad de nutrientes, seguridad alimentaria, estabilidad y palatabilidad. Entre las tecnologías se encuentran las conocidas como tradicionales las cuales son: tostado, molienda, horneado, cocción, secado y germinación (Bressani y col 1984). En la industria alimentaria también podemos encontrar las siguientes tecnologías: calentamiento por radio frecuencias, microondas, infrarrojos, perfusión instantánea y de alto calor, calentamiento óhmico, extrusión y fermentación en estado sólido (Fellows 2000; Richardson 2001).

1 Fermentación en estado sólido

La fermentación en estado sólido se define como el bioprocesamiento que utiliza microorganismos, tales como bacterias, levaduras y hongos filamentados (mohos) (Nout y col 2005; Bourdichon y col 2012). Dicho procesamiento ayuda a enriquecer la dieta, puede enriquecer los sustratos alimenticios biológicamente con vitaminas, proteínas, aminoácidos esenciales y ácidos grasos esenciales, puede mejorar la seguridad alimentaria a través de la inhibición de patógenos y remueve compuestos tóxicos (Steinkraus 2002; Bourdichon y col 2012).

2 Germinación

La germinación consiste en la reanudación de la actividad metabólica y el crecimiento activo de los tejidos del embrión, lo que resulta en la ruptura de la cubierta de la semilla y la emergencia de una plántula. En orden secuencial, la germinación involucra la rehidratación, la utilización de las reservas y la formación de las estructuras de síntesis que permitirán a la plántula asumir un modo autótrofo de

existencia (Kermode 1990; King 1991). En términos bioquímicos la germinación es el resultado de procesos catabólicos y anabólicos contrastantes. Los primeros ocurren en los órganos de almacenamiento (endospermo en plantas monocotiledóneas y cotiledones en dicotiledóneas) y consisten en la degradación y movilización de las macromoléculas de reserva. Los segundos se efectúan en los ejes embrionarios e incluyen la síntesis de macromoléculas, componentes estructurales como membranas y paredes celulares, para generar nuevas células y tejidos durante el crecimiento (Kermode 1990).

La formación de una semilla y su germinación constituyen fenómenos adaptativos únicos en el ciclo de vida de las plantas superiores. Involucran el desarrollo del embrión y median varios procesos fisiológicos para asegurar la supervivencia de la planta en la próxima generación. Durante la formación de la semilla se acumulan las sustancias de reserva (proteínas, carbohidratos y lípidos), aunado a un incremento en los niveles de ácido abscísico (ABA) durante la embriogénesis intermedia y la pérdida del contenido de agua durante la embriogénesis tardía. Una vez formada, en la gran mayoría de las especies, la semilla pasa a un estado de desecación y posteriormente de latencia hasta el momento de la germinación (Legaria y col 2000).

Las semillas son el resultado de la reproducción sexual de las especies vegetales, contienen un embrión capaz de desarrollarse en una planta semejante a la que les dio origen, por lo que poseen toda la infraestructura que permite este desarrollo, así como sustancias de reserva que garanticen el aporte inicial de los nutrimentos requeridos por dicho embrión en el inicio del crecimiento (Duffus y Slaughter 1980).

1 Factores que afectan la germinación

a Temperatura

La temperatura a la cual se germina es otro parámetro importante, se considera una temperatura adecuada aquella que da mejores rendimientos en corto tiempo, siendo ésta dependiente del tipo de semilla. Se reportan temperaturas que van desde 21°C hasta 33°C (Elmalik y col 1986; Paredes-López y Mora-Escobedo 1989; Mora y col 1991).

b Tiempo

El tiempo al cual se cosechen las semillas de moringa, dependerá de su capacidad germinativa. González y col (2005) reportaron que el porcentaje de germinación mostraba una tendencia a disminuir conforme aumentaba el tiempo de cosecha, siendo significativamente diferentes los porcentajes de germinación, 71.20%, 65.45% y 60.06% para 30, 60 y 90 días, respectivamente.

c Iluminación

Seo y col (2009), concluyeron que la iluminación regula las concentraciones de dos hormonas antagónicas, Giberelinas (GA) y Ácido abscísico (ABA), y también la capacidad de respuesta GA. Las señales luminosas se transmiten a GA y genes relacionados con ABA a través de una proteína que interacciona con el fitocromo, PIL5, que funciona como un factor de transcripción que regula directa o indirectamente los genes relacionados con las hormonas.

d Hormonas

Las hormonas tienen una profunda influencia sobre la regulación de la germinación y la latencia. A su vez, los genes que codifican proteínas que modulan el metabolismo de estas moléculas de señalización (especial las que participan en la

biosíntesis y la desactivación de GA y ABA) son importantes reguladores genéticos de estos eventos (Seo y col 2009).

e Metales

Li y col (2005) investigaron los efectos de los metales sobre la germinación de semillas y crecimiento de las plántulas en *Arabidopsis* esencial (Cu y Zn) y no esenciales (Cd Hg, Pb y). El tratamiento de semillas con metales en el rango milimolar reducía la germinación total (GT, es decir, el porcentaje de semillas que germinan en una prueba de germinación) con una correlación negativa entre la concentración y GT, y el crecimiento de las plántulas fue en general más sensible a la toxicidad de metales en la germinación de las semillas, excepto para Cd, que inhibe tanto a la misma concentración. Embriones aislados eran mucho más sensibles a los metales que las semillas intactas, lo que refuerza que la cubierta de la semilla actúa como una barrera para la absorción de metales. Además, Pb inhibe la germinación en la mayor medida en las especies con cubiertas de las semillas de Pb-permeables, y las cubiertas de las semillas se convirtieron en más permeable al Pb durante las etapas posteriores de la imbibición, retrasar la germinación (Wierzbicka y Obidzinska 1998). Cadmio, plomo y cromo también redujeron considerablemente GT de una manera dependiente de la concentración en *Parkinsonia aculeata* y *Pennisetum americanum*, el último de los cuales fue más severamente afectado (Shaukat y col. 1999). En tres especies medicinales en la familia *Hyacinthaceae*, *volubilis* *Bowiea*, *Eucomis autumnalis* y *Merwillia natalensis*, la germinación de semillas y crecimiento de plántulas fueron negativamente afectados en diversos grados, en respuesta a Cu, Cd, Hg, Zn y Pb (Street y col 2007).

Estos estudios resaltan las variaciones inter e intra específicas en la germinación de semillas y plántulas de respuesta al estrés metal. Sin embargo, los datos limitados disponibles sugieren que existe una tendencia a que las semillas de plantas tolerantes a metales en general, pueden germinar en concentraciones de los metales, y que los micronutrientes esenciales pueden causar daño sólo a concentraciones relativamente altas, como para Zn y Ni (Maheshwari y Dubey 2008), aunque puede haber excepciones a esta regla.

2 Etapas de la germinación

a Imbibición

La rehidratación de la semilla es una de las fases bioquímicamente cruciales durante el proceso de germinación. La captación de agua generalmente es un proceso trifásico que se caracteriza por un periodo inicial de ganancia en peso, seguido de una fase estacionaria con un subsecuente incremento que coincide con el crecimiento de la radícula. Este proceso se puede llevar a cabo en algunas horas hasta varios días (Meredith y Pomeranz 1985; Fincher 1989).

La cantidad de agua absorbida por la semilla está en función directa de su tamaño, de la permeabilidad de la cubierta, cantidad y disponibilidad de agua y composición química. El agua se absorbe a través de los orificios naturales en la cubierta, difundiéndose a lo largo de los tejidos; esto ocasiona un incremento en el volumen de las células y de la semilla. Los cuerpos proteínicos del endospermo sufren alargamiento e hinchamiento. De los componentes del endospermo las proteínas son las que absorben agua en mayor proporción (Chavan y Kadam 1989).

Es notable que una máxima absorción de agua es deseable, sin embargo; una absorción excesiva puede romper la cubierta de la semilla y afectar la germinación

puesto que las sustancias celulares van hacia el exterior ocasionando: 1) pérdidas de reservas, 2) pérdida de la compartimentalización con mezclas indeseables de sustancias (por ejemplo, energía celular en forma de ATP que puede ser degradado por ATPasa) y 3) estímulo a la actividad de patógenos del ambiente (Chavan y Kadam 1989).

b Reanudación del metabolismo energético y reparación celular

Un evento temprano en la Fase I de imbibición es la reanudación del metabolismo energético. Las semillas secas maduras contienen mitocondrias con membranas internas pobremente diferenciados. Enzimas funcionales necesarias para la respiración, tales como las del ciclo de Krebs, y oxidasas terminales, están presentes lo que probablemente proporciona suficiente ATP a partir de la fosforilación oxidativa durante varias horas después del inicio de la imbibición (Hourmant y Pradet 1981). Las reacciones de oxidación mitocondrial aumentan tras la finalización de la imbibición, durante la Fase II, ya que las mitocondrias se someten a la reparación y la replicación. Hay dos distintos patrones de desarrollo mitocondrial. En el almacenamiento de almidón de semillas tales como guisantes, frijol mungo y caupí, hay reparación y reactivación de las mitocondrias pre-existentes; Sin embargo, la biogénesis de nuevas mitocondrias es típico de semillas oleaginosas que almacenan tales como maní, semillas de ricino y calabaza (Morohashi y Bewley 1980, 1981,1986).

Otras dos vías respiratorias, la glucólisis y la vía pentosa fosfato (PPP), también son activos en semillas embebidas. Muchas semillas experimentan condiciones anaeróbicas temporales durante o después de la imbibición que conduce a la producción de etanol (Kennedy y col 1992).

La vía glucolítica predomina cuando la producción de ATP mitocondrial está restringido por baja disponibilidad de oxígeno, con frecuencia debido a la permeabilidad limitada de las estructuras que rodean al embrión.

c Síntesis de proteínas

Muchos de los genes que codifican los ARNm residuales contienen elementos sensibles a ácido abscísico (ABA) y se activan típicamente durante la maduración de las semillas (Nakabayashi y col 2005). Es posible que los ARNm almacenados apoyen la síntesis de nuevas proteínas antes de que se reanude la actividad transcripcional y nuevos mensajes estén disponibles durante las primeras etapas de la imbibición. En las semillas secas (por ejemplo, embriones de trigo), todos los componentes necesarios para la reanudación de la síntesis de proteínas están presentes (Marcus y col 1966; Bewley y Black 1994). Pocos minutos después de la rehidratación, los ribosomas se convierten reclutados en los complejos de proteínas que sintetizan polysomal, utilizando ARNm existentes (Bewley y Black 1994). La participación de los ARNm almacenados durante la germinación es apoyada por experimentos en Arabidopsis utilizando inhibidores de transcripción y traducción.

d Metabolismo de hormonas

El óxido nítrico (NO) es reconocido como un importante componente de transducción de la señal, y podrían acelerar el flujo metabólico a través de la ruta de las pentosas fosfato (PPP), al aumentar indirectamente la oxidación de NADPH (Bethke y col 2007a), aunque podría estimular la germinación a través de otras vías, tales como los implicados en el metabolismo de la hormona, por ejemplo, NO promueve la giberelina (GA) biosíntesis en Arabidopsis. (Bethke y col 2007b). El nitrato (por lo tanto NO) podría actuar mediante la desactivación de ácido abscísico

(ABA) (Matakiadis y col 2009). Una característica importante del metabolismo de GA y ABA es su interacción. Por ejemplo, el ABA regula a la baja la biosíntesis de GA y hasta regula la desactivación de GA (Seo y col 2006), modulando así el contenido ABA en la semilla (Seo y col 2009).

e Cambios en el embrión

Después de que la semilla ha captado el agua suficiente, el embrión se transforma y la plúmula y radícula empiezan a emerger; en esta etapa probablemente hay síntesis y activación enzimática, degradación de inhibidores y cambios profundos en la estructura de la semilla, así como su composición. Existe un incremento en los niveles de metabolitos intermediarios y enzimas, asociados con la producción de energía, particularmente el ciclo de los ácidos tricarbónicos. Esto se ve reflejado por el aumento en la velocidad de intercambio gaseoso (Duffus y Slaughter 1980; Chavan y Kadam 1989).

f Relación entre el embrión y la estructura circundante

Al final de la Fase II del embrión, por lo general la radícula, emerge de la semilla, que marca la finalización de la germinación. Para ello, tiene que romper los tejidos circundantes, tales como el endospermo y la testa (cubierta de la semilla). En algunas especies estas estructuras son barreras para la emergencia, la imposición de latencia física. Las células adyacentes a la radícula tienen paredes finas (o en el caso de la fecha, un anillo de células de paredes delgadas) que le permite penetrar a completar la germinación (Williams y col 2001; Gong y col 2005). En todas las semillas que deben penetrar en las estructuras circundantes, el potencial de crecimiento del embrión debe ser superior a la resistencia mecánica de estos tejidos (Nonogaki y col 2007).

3 Efecto de la germinación sobre composición química y valor nutricional

Las semillas germinadas han tenido un crecimiento en cuanto a su uso alimenticio en los últimos años, esto debido al valor nutritivo y nutracéutico que éstas presentan los cuales aumentan en comparación de los presentes en las semillas crudas. Aphalo y col (2009) estudiaron la modificación estructural de las proteínas de amaranto durante la germinación y reportan que las albuminas y globulinas fueron modificadas primeramente y más tarde las glutelinas; sugiriendo que el orden de movilización de las proteínas de reserva dependen de la combinación de dos características estructurales, el estado de agregación y la presencia en la superficie de polipéptidos susceptibles a divisiones.

Donkor y col (2012) reportan que el proceso de germinación disminuyó el contenido de lípidos en diversos tipos de cereales. Ellos suponen que la grasa pudo haber sido utilizada como fuente de energía durante el proceso para el desarrollo del embrión. Se observó una tendencia similar para el efecto de la germinación sobre el contenido de lípidos de las semillas de soya, el cual disminuyó gradualmente por la progresión de la germinación (Bau y col 1997).

4 Efecto de la germinación sobre fitoquímicos y propiedades nutracéuticas

Los granos como cereales y leguminosas, deben ser procesados para su consumo con el fin de obtener alguna funcionalidad atractiva como sabor y textura o eliminar la acción antifisiológica de inhibidores enzimáticos en las leguminosas. Pasko y col (2008) reportaron que el principal ácido fenólico, en semillas crudas y germinadas, fue el ácido gálico. Además, encontraron que los ácidos p-

hidroxibenzoico, vainillico, p-cumárico, caféico y cinámico se encuentran principalmente en la semilla cruda mientras que en los germinados están presentes los ácidos p-cumárico, siríngico y ferúlico. En cuanto a la presencia de flavonoides en semillas y germinados estos mismos investigadores reportaron que los encontrados en germinados son vitexina, isovitexina y morina y que la rutina fue el flavonoide detectado en mayor cantidad.

F MORINGA (*MORINGA OLEIFERA*)

1 Origen de moringa

Moringa oleifera Lam. Es originaria del sur del Himalaya noreste de la india, Pakistán, BanglaDesh, Arabia Saudita y Afganistán se ha naturalizado en la mayoría de los países tropicales.

Moringaceae se distingue de las otras familias por una combinación única de rasgos (Olson 2010). Sus especies se caracterizan por tener hojas pinnadas grandes, en donde cada hoja está dividida en muchos folíolos dispuestos sobre un armazón llamado raquis (Fig. 1A). Los frutos forman una cápsula larga y leñosa que cuando alcanza la madurez se abre lentamente en 3 valvas que se separan la una de la otra por su longitud, quedando pegadas sólo en la base del fruto (Fig. 1B, C). En la mayoría de las especies, las semillas presentan 3 alas longitudinales. La combinación de hojas pinnadas, frutos trivalvados y semillas con 3 alas hace que sea muy fácil reconocer una Moringa. Para asegurar la identificación, se pueden buscar las glándulas foliares características de esta familia, las cuales se encuentran en ambos lados flanqueando la base o en el ápice del pecíolo y en la mayoría de las articulaciones del raquis (Fig. 1). Otras características únicas de la familia, incluyen

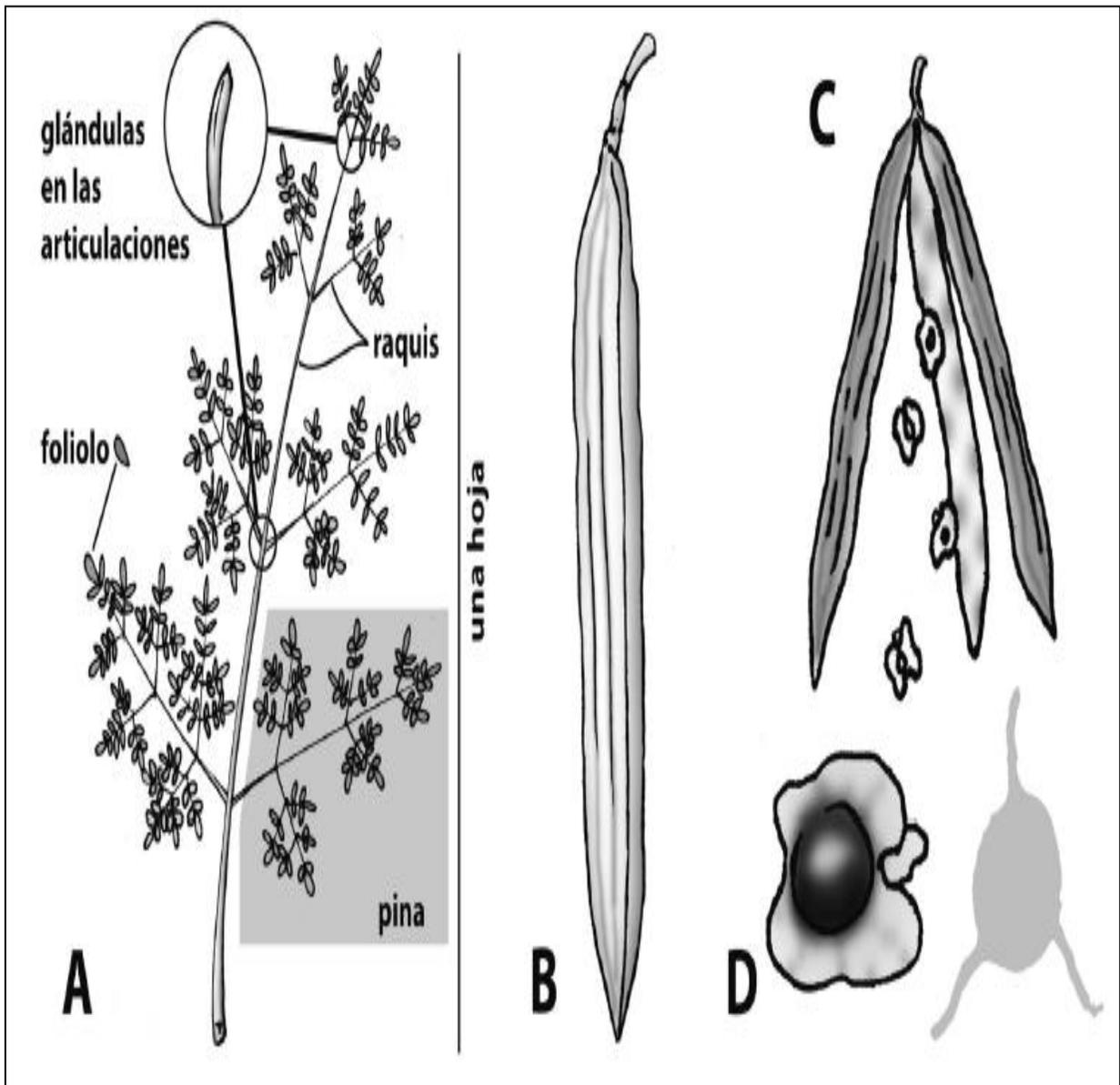


Figura 1. Esquema de las partes anatómicas de moringa. (A) Hojas; (B) Fruto(vaina); (C) Fruto abierto (trivalvado); (D) Semilla.

el estilo hueco y las anteras con 2 esporangios o cámaras para el polen en vez de los 4 que suelen presentar las plantas con flor (Olson 2003). Características aún menos aparentes incluyen los productos de goma en la médula de los tallos y elementos de vaso con placas de perforación sin bordes (Olson y Carlquist 2001; Olson 2002b).

2 Taxonomía

A la planta que conocemos como *Moringa oleifera* se le han aplicado nombres como *Guilandina moringa*, que se remonta a Linneo en el año 1753, y también *Hyperanthera moringa* (L.) Vahl, también se le conoce como “el árbol de la vida”. Todavía es común que algunos autores empleen el nombre *Moringa pterygosperma* Gaertn, que es un nombre ilegítimo de acuerdo con las reglas de nomenclatura botánica. Indican que *G. moringa* y *H. moringa* carecen de validez, mientras *M. oleifera* tiene prioridad y constituye el nombre válido. Es miembro de la familia moringácea teniendo de esta familia una amplia variedad de especies de las cuales encontramos las siguientes según su origen (Cuadro 1).

Moringaceae comprende únicamente un género, *Moringa*. Dentro de *moringa* hay 13 especies (Verdcourt 1985; Olson 2002), las cuales abarcan una gama muy diversa de hábitos o formas de crecimiento, desde hierbitas y arbustos hasta árboles grandes (Olson 2000, 2001, 2002). Si bien varían mucho en su forma, es muy fácil distinguir un miembro de *Moringa* de cualquier otra planta.

3 Distribución

En Centroamérica se introdujo y naturalizó en 1920 como un árbol ornamental y se usó como cercas vivas, para cortinas rompe vientos. El rango natural de este árbol se extiende de Arabia a la India, hoy en día el árbol de *moringa* es común en paisajes de todos los trópicos del viejo mundo del sur de Asia y África occidental. Es

Cuadro 1. Especies de moringa.

Especie	Lugar de origen
<i>Moringa drouhardii</i>	Madagascar
<i>Moringa concanensis</i>	Asia, principalmente la India
<i>Moringa arbórea</i>	Noroeste de Kenia
<i>Moringa hildebrandtii</i>	Madagascar
<i>Moringa borziana</i>	Kenia y Somalia
<i>Moringa ovalifolia</i>	Nambia el estrecho sur occidental de Angola
<i>Moringa peregrina</i>	Mar rojo, Arabia y cuerno de África
<i>Moringa longituba</i>	Kenia, Etiopia y Somalia
<i>Moringa stenopelala</i>	Kenia y Etiopia
<i>Moringa oleífera</i>	India
<i>Moringa pygmaea</i>	Norte de Somalia
<i>Moringa ribae</i>	Kenia y Etiopia
<i>Moringa ruspoliana</i>	Kenia, Etiopia y Somalia

Fuente: Agrodesierto, 1998

más visible en partes del este y sur de África. También se le puede encontrar en huertos caseros de muchas islas del pacífico, desde Kiribati hasta las Marianas del Norte (Fuglie 2000).

4 Composición química de la semilla de moringa

a Proteínas

En la literatura se ha reportado un contenido de proteína en semillas de moringa cultivadas en diversas regiones como Malasia, Alemania, con valores de 36.7–38.4%, Cuadro 2, (Duke y Atchley 1984; Makkar y Becker 1997; Abdulkarim y col 2005).

La composición química varía en correspondencia con la fracción de la planta (Garavito 2008); este autor encontró los mayores valores de proteína y energía metabolizable en las hojas y el más bajo valor de fibra cruda.

b Lípidos

El contenido de lípidos en semillas es alrededor de 41.2 % reportado por Oliveira y col (1999) (Cuadro 2), siendo un valor mayor al de algunas variedades de soja (14.9 a 22.0 %) (Vasconcelos y col 2001). Los principales ácidos grasos saturados presentes en las semillas son palmítico (6.1 – 7.8%), esteárico (5.1 – 6.8%), araquídónico y ácido behénico (5.4 %). El ácido oleico es el principal ácido graso insaturado (67.9 - 71.9%) (Abdulkarim y col 2005; Sánchez y col 2015), cuya concentración alta es deseable en términos de nutrición.

En el Cuadro 3 se muestran los ácidos grasos en semilla de moringa. La composición de los esteroides de aceite de semilla de Moringa se compone principalmente de campesterol, estigmasterol, β - sitosterol, Δ^5 -avenasterol y clerosterol (Tsaknis y col 1999; Anwar y col 2005; Anwar y col 2006). La composición

Cuadro 2. Composición proximal de semilla de moringa (*Moringa oleifera*).

Características	Valores obtenidos (%)
Humedad	4.1- 7.9
Proteína cruda ^a	36.7- 38.4
Lípidos	30.8 - 41.7
Fibra cruda	3.5 - 4.8
Contenido de cenizas	3.2 - 6.5
Carbohidratos total ^b	16.5 – 17.8

^aProteína cruda=N x 6.25

^bCarbohidratos obtenidos por diferencia.

Adulkarim y col 2005 ; Makkar y Becker 1997; Duke y Atchley 1984.

Cuadro 3. Contenido de ácidos grasos en semilla de moringa (*Moringa oleifera*).

Ac. Graso	No.C	%
Ac. Mirístico	(C14:0)	0.1 – 0.1
Ac. Palmítico	(C16:0)	6.1 – 7.8
Ac. Palmítoleico	(C16:1)	1.8 – 2.0
Ac. Estearico	(C18:0)	5.1 – 6.8
Ac. Oleico	(C18:1)	67.9 – 71.9
Ac. Linoléico	(C18:2)	0.7 – 0.9
Ac. Araquidónico	(C20:0)	3.0 – 4.6
Ac. Eicosanoico	(C20:1)	1.6 – 1.8
Ac. Behénico	(C22:0)	5.4 – 5.4
Ac. Lignocérico	(C24:0)	1.5

Abdulkarim y col 2007; Sánchez y col 2015.

de esteroides de las principales fracciones de aceite de semilla de *Moringa* difiere en gran medida de los de la mayoría de los aceites comestibles convencionales (Rossell 1991). La composición de ácidos grasos del aceite de semilla de *M. oleifera* revela que cae en la categoría de aceites de alto oleico (C18:1, 67.90 % -76.00). *Moringa oleifera* es también una buena fuente de diferentes tocoferoles (α - , γ - y δ -) ; la concentración de los reportes, es de 98.82 - 134.42, 27.90-93.70 y 48.0-71.16 mg/kg, respectivamente (Anwar 2005; Tsaknis y col 1999).

c Fibra dietaria

Se le conoce como fibra dietaria a una mezcla heterogénea de componentes de origen vegetal resistentes a las enzimas digestivas del hombre. Existen diferentes definiciones de fibra dietaria, pero todas ellas coinciden en que consisten principalmente de polímeros de carbohidratos (polisacáridos no amiláceos) que son componentes de las paredes de las células vegetales, incluidas celulosa, hemicelulosa y pectinas, así como otros polisacáridos de origen vegetal o algas, como gomas, mucílagos y oligosacáridos como la inulina. Los carbohidratos no digeribles análogos que pasan a través del intestino delgado sin cambios, pero se fermentan en el intestino grueso también deberían incluirse; por ejemplo, el almidón resistente, los fructooligosacáridos, las celulosas modificadas y los polímeros de carbohidratos sintéticos, como la povidexrosa (Gray, 2006).

Existen fibras que afectan principalmente la absorción de la glucosa y la grasa. Históricamente, a éstas se las llamó solubles debido a que muchas de ellas eran viscosas y formaban geles en el intestino delgado (por ejemplo, pectinas y β -glucanos). Por el contrario, los tipos de fibra dietética con una mayor influencia en la

función del intestino grueso se denominaron insolubles (incluidas la celulosa y la lignina) (Gray 2006).

No se encontraron reportes sobre el contenido de fibra dietaria en semillas de *M. oleifera*. Montañó (2014) reporta que la cáscara, la capa más externa de la semilla de *M. oleifera*, se caracteriza por el alto contenido de fibra, la cual puede estar compuesta por celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina entre otros.

Se han reportado valores de fibra dietaria en hojas de *Moringa oleifera* entre 19.2% y 25.8% (Dhakar y col 2011; Moyo y col 2011). Mallillin y col (2014) reporta el contenido de fibra dietaria total en hojas de *M. oleifera* de 24.3 ± 0.2 g/100g, de los cuales, el 4.7 ± 0.0 y 19.6 ± 0.2 g/100g de fibra soluble e insoluble respectivamente. En el mismo estudio se reportó el contenido de fibra de las vainas de Moringa, encontrando un contenido de fibra dietaria total de 34 ± 0.2 g/100g, de los cuales, 11.3 ± 0.2 y 22.7 ± 0.2 g/100g son de fibra soluble e insoluble respectivamente.

5 Valor nutricional de la semilla de moringa

a Digestibilidad proteínica

Borges y col 2014 encontraron que en las hojas de moringa tienen bajo valor nutritivo, lo que puede estar relacionado con su propia resistencia intrínseca frente a la hidrólisis enzimática y / o la presencia de compuestos termoresistentes, como los taninos (Correa y col 2004). Cuando aplicaron tratamiento térmico se incrementó la digestibilidad de la harina cruda de 69.2 % y un 57.5 % con respecto a la proteína estándar. Este aumento en la susceptibilidad a la proteólisis, después del tratamiento térmico, se ha atribuido a los cambios estructurales que conducen a la interrupción de las estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas, favoreciendo la acción enzimática. Estos resultados están en desacuerdo con los de Makkar y Becker

(1995), quienes evaluaron el forraje de hojas frescas de *M. oleifera* y observaron un 79% en la digestibilidad proteica *in vitro*. Tales diferencias pueden estar relacionadas con la metodología utilizada para la determinación de proteínas, ya que desde que se determinó la fracción insoluble como nitrógeno, esto no se corresponde con el contenido de proteína verdadera en el medio.

Un proyecto sobre el cultivo intensivo de *M. oleifera*, Pérez (2010) planteó que es una alternativa para la producción de forraje de alto contenido proteico para la alimentación de ovinos en la zona centro de Sinaloa, debido a su adaptabilidad y bajo costo de producción. Además presenta un 70,5% de digestibilidad aparente de materia seca y 65,5% de digestibilidad aparente de proteína.

b Perfil de aminoácidos esenciales

La harina de semilla de moringa cruda tiene un alto contenido de aminoácidos esenciales, excepto lisina (proteína 15.3g/kg), treonina (30.8 g/kg) y valina (43.5g/kg) (Oliveira y col 1999), que están presentes en niveles inferiores a las recomendadas para 2 a 5 niños años de edad. Los altos contenidos de metionina y cisteína (43.6g/kg proteína), son cercanos a los valores de la leche humana y de vaca y los huevos de gallina, los cuales varían de 33-57 g/Kg proteína (FAO/WHO/UNU1985). Las semillas de moringa pueden ser un buen complemento de leguminosas las cuales de manera usual son deficientes en aminoácidos azufrados.

Sánchez y col 2010 reportaron una concentración total de aminoácidos en partes comestibles de moringa en un rango de 74.5 – 172.7 mg/g (bs) para flores y hojas respectivamente. El contenido de aminoácidos esenciales en hojas fue de 44%, 31% en flores y 30% en vainas inmaduras. En dicha investigación encontraron que los aminoácidos que están en mayor proporción en las diferentes muestras fueron:

Ac. glutámico, Arginina, Ac. Aspartico. Mientras que Metionina y Tirosina se encontraron en menor proporción.

Oluwole y col 2013 reportaron un contenido de aminoácidos esenciales en harina de moringa germinada de 17.65 g/100g proteína cruda encontrando los valores más altos en Isoleucina y Leucina, 4.69 y 4.08 g/100g proteína cruda respectivamente.

Garavito y col 2008 compararon el contenido de nutrientes en hojas de la especie con otros alimentos (por cada 100 gramos de parte comestible) Cuadro 4. En todos los casos la moringa presentó un mayor contenido de vitamina A, vitamina C, calcio y potasio, con relación a la zanahoria, la naranja, la leche de vaca y el plátano, respectivamente.

6 Fitoquímicos en semilla de moringa

Los fitoquímicos son los productos químicos producidos por las plantas. Sin embargo, la palabra se refiere únicamente a los productos químicos que pueden tener un impacto en la salud o en el sabor, textura, olor o color de las plantas, pero no son requeridos por los seres humanos como nutrientes esenciales. Un examen de los fitoquímicos de las especies moringa brinda la oportunidad de examinar una gama de compuestos bastante únicas. En particular, esta familia de plantas es rica en compuestos que contienen el azúcar simple, ramnosa, y es rico en un grupo bastante único de compuestos llamados glucosinolatos e isotiocianatos (Fahey y col 2001; Bennett y col 2003). En el Cuadro 5 se muestran compuestos fitoquímicos encontrados en aislados de semilla de moringa.

Cuadro 4. Contenido de vitaminas A y C en hojas de Moringa.

Nutriente	Moringa	Otros alimentos
Vitamina A (mg/100g)	1,130	Zanahoria: – 315
Vitamina C (mg/100g)	220	Naranja: – 30
Calcio (mg/100g)	440	Leche de vaca: -120
Potasio (mg/100g)	259	Plátano: – 88
Proteína (mg /100g)	6,700	Leche de vaca: 3,200

Fuente: Garavito (2008)

Cuadro 5. Fitoquímicos presentes en aislados de semilla de moringa.

Aislados de	Fitoquímicos
Semilla	O- etil -4- (α -L-ramnosiloxi) bencil carbamato, 4(α -L-ramnosiloxi)bencil isotiocianato, 4(α -L-ramnosiloxi) bencilglucosinolato, niacimicina, 3-O-(6'-O-oleoil-beta-D-glucopiranosil)- β -sitosterol, β -sitosterol-3-O- β -D-glucopiranoside, niacirin, β -citoesterol, glicerol-1-(9-octadecanoato), isothiocianatos, thiocarbamatos y flavonoides. Presencia de hemaglutinina también ha sido reportada.

Guevara y col 1999; Lalas y Tsaknis 2002; Bennett y col 2003; Katre y col 2008

7 Propiedades nutracéuticas de la semilla de moringa

Las semillas de Moringa también poseen propiedades antimicrobianas (Olsen 1987; Madsen y col 1987). Broin y col (2002) informaron de que una proteína recombinante en la semilla es capaz de flocular las células bacterianas Gram -positivas y Gram -negativas. En este caso, los microorganismos pueden ser eliminados por decantación de la misma manera como la eliminación de coloides en agua adecuadamente coagulada y floculada (Casey 1997). Por otro lado, las semillas también pueden actuar directamente sobre los microorganismos y dar como resultado una inhibición en el crecimiento. Péptidos antimicrobianos se cree que actúan mediante la interrupción de la membrana celular o mediante la inhibición de enzimas esenciales (Silvestro y col 2000; Suárez y col 2003).

Sutherland y col (1990) mostraron que las semillas de moringa podrían inhibir la replicación de los bacteriófagos. Los efectos antimicrobianos de las semillas se atribuyen al compuesto 4 (α -L-ramnosiloxy) isotiocianato de bencilo (Eilert y col 1981). En el Cuadro 6 se muestran algunos usos medicinales en las diferentes partes de moringa.

8 Utilización y consumo de moringa

Las hojas son comestibles y ricas en proteínas, con un perfil de aminoácidos esenciales muy balanceado. Al mismo tiempo, contiene vitaminas, principalmente A y C, en altas cantidades, así como antioxidantes potentes. Los frutos jóvenes son comestibles y las semillas producen un aceite comestible y lubricante de altísima calidad. Los desechos del prensado de las semillas para obtener el aceite contienen uno de los floculantes o aglutinantes vegetales más potentes que se conocen y

Cuadro 6. Usos medicinales reportados en la literatura de las diferentes partes de *Moringa oleífera*.

Parte de la planta	Compuestos	Bioactividad	Referencias
Semilla	Fenólicos	Antitumoral	1
	Isotiocianatos		
Hoja	Niacimicina	Antiinflamatorio	2
	Niacirina		
	Sitosterol	Antimicrobiano	
	Polifenoles	Hipolipidémico	3
	Quercetina	Anticoagulante	4
	Vit C y E	Antioxidante Antidiabético	5
Flavonoides	6		
Corteza	Fitoesteroles, terpenoides, ácidos grasos	Antiinflamatorio	7
		(THP-1)	
		Antiproliferativo y Antioxidante(Hep- G2, Caco-2, MCF- 7)	
Corteza	Eugenol, Isotiacinatos, D-allosa, Ac. Ester etil Hexadecanoico	Anticarcinogénico (mama y colon)	8
			9

¹Guevara y col 1999; ³Santos y col 2012; ⁴Rajanandh y col 2012; ⁵Coppin y col 2013; ²Govardhan y col 2013; ⁶Yassa y Tohamy 2014; ⁷Charoensin y col 2014; ⁸Al-Asmari y col 2015; ⁹Vasantha y col 2015.

pueden eliminar la turbidez del agua. Sus hojas ofrecen un forraje nutritivo para los animales, así como también los residuos de las semillas después de la extracción de aceite y aun las ramas molidas (Martínez 1959; Reyes y col 2005). Foidl y col (2001) informaron que moringa contiene un 10% de azúcares y la energía metabolizable en las hojas es de 9,5 MJ/kg MS. Son sólo algunos de los usos de este árbol, que además crece con suma rapidez, tolera el calor y es resistente a las sequías.

IV JUSTIFICACIÓN

Se ha reportado que el árbol de moringa contiene diversos compuestos bioactivos, sin embargo la mayoría de los estudios se han realizado en hojas de esta planta. Se han llevado a cabo diversas investigaciones en *Moringa oleifera* para evaluar sus propiedades nutraceuticas, esta merece y es objeto de investigación científica a fin de establecer el mecanismo de funcionamiento biológico de los fitonutrientes y de su valor en la lucha por una mejor salud y calidad de vida.

En diversas investigaciones se ha reportado que el bioproceso de germinación incrementa las propiedades nutricionales y nutraceuticas en diversos tipos de semillas. Con lo cual se pretende estudiar el efecto de las variables del proceso de germinación de la semilla de moringa para establecer las mejores condiciones de proceso, lograr con ello obtener un producto bioprocesado de moringa con los valores más altos en capacidad antioxidante y propiedades nutraceuticas.

V OBJETIVOS

A OBJETIVO GENERAL

Encontrar las mejores condiciones de germinación para la obtención de harina de moringa bioprocesada con valor nutricional y nutracéutico alto.

B OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Evaluar características físicas de la semilla de moringa.
- 2 Determinar la mejor combinación de las variables del proceso de germinación (temperatura de germinación, tiempo de germinación) para la obtención de harina de moringa germinada con capacidad antioxidante y nutracéuticos altos.
- 3 Evaluar composición química, propiedades fisicoquímicas y funcionales de la harina de moringa cruda y germinada optimizada.
- 4 Evaluar capacidad antioxidante y fitoquímicos (fenólicos totales, taninos condensados, fitatos y saponinas) de la harina de moringa cruda y germinada optimizada.
- 5 Evaluar el perfil de ácidos grasos en harina de moringa cruda y germinada optimizada.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

A MATERIALES

Como materiales se utilizaron semillas de *Moringa oleífera* procedentes de la ciudad de Obregón, Sonora, Proporcionadas por el Dr. Jaime López Cervantes.

B MÉTODOS

1 Características físicas de la semilla de moringa

a Dimensiones físicas

Se midió la longitud y grosor, utilizando un vernier (calibrador) Scala modelo UNOX (Metro Méx, S.A. México, DF). Las mediciones se realizaron en 25 semillas de moringa seleccionadas al azar. La determinación se realizó por triplicado (Milán y col 2000).

b Peso de 1,000 semillas

Este parámetro se determinó pesando 1,000 semillas, tomados al azar de un lote de semillas limpias, en una balanza OHAUS (Mod TP2KS, Seedburo Equipment, Co., EUA). La prueba se realizó por triplicado.

c Peso hectolítrico

Para la determinación del peso hectolítrico se usó el procedimiento 55-10 de la AACC (1995) utilizando una microescala. Un recipiente de volumen conocido (1 L) se llenó de granos y se pesó en una balanza analítica. El peso hectolítrico se obtuvo al dividir el peso de los granos entre el volumen del recipiente y relacionándolo a un volumen de 100 L (kg/hL). Esta característica física se determinó de 10 repeticiones.

2 Composición química

La composición química se determinó, de acuerdo a métodos oficiales de AOAC (1999), proteína cruda, grasa cruda y cenizas, realizada a la harina de granos crudos

de *Moringa oleífera*, harinas derivadas de los 13 tratamientos (combinaciones temperatura/tiempo germinación) generadas por el diseño experimental y a la harina de moringa germinada optimizada.

a Proteína cruda

Se utilizó el método 46.12, microKjeldahl, de la AOAC (1999) para la determinación de nitrógeno en un sistema Kjeltex (Mod 1009 y 1002, Tecator, Suecia). Se digirán 0.2 g de muestra, con 5 mL de ácido sulfúrico y mezcla reactiva de selenio (Merck Co., Alemania) a una temperatura de 200°C. En la destilación de la muestra, previamente diluida con 25 mL de agua, se emplearan disoluciones de NaOH al 40% y ácido bórico al 4% como indicador para recibir el destilado. La titulación se llevara a cabo con una disolución valorada de HCl 0.1 N. Posteriormente, la proteína cruda se calculara por multiplicación del contenido de nitrógeno total por el factor 6.25.

b Grasa cruda

Se determinó el contenido de grasa cruda de acuerdo al método 920.39 de la AOAC (1999). Las extracciones se realizaron en muestras de 3-4 g de harina, que pasaran a través de malla 80 (0.180 mm). Posteriormente se utilizo el equipo Saxtec System HT 1043 Extraction Unit (Tecator, Suecia); se usara como disolvente éter de petróleo. La prueba se realizo por triplicado.

c Minerales

El contenido de cenizas se determino de acuerdo con el método 923.03 de la AOAC (1999). Se peso 1gr de muestra, la cual se coloco en un crisol de porcelana para llevarlo a incinerar en una mufla aproximadamente a 550° C hasta obtener una

ceniza gris luminosa; se enfrió en un desecador y se pesa al alcanzar la temperatura ambiente.

d Carbohidratos

El porcentaje de carbohidratos se calculo por diferencia de 100, tomando en consideración los porcentajes de proteína cruda, grasa cruda y cenizas.

3 Obtención de harinas de moringa cruda y bioprocada

La harina de moringa cruda (HMC), se obtuvo de la molienda directa de las semillas de moringa en un molino de café marca Krups modelo GX410011 y fue almacenada a 4°C para su posterior utilización y análisis.

Para la obtención de harinas de moringa germinada se aplico la metodología reportada por Mora-Escobedo (1994), Cáceres y col (2013), con algunas modificaciones (Fig 2). Se pesaron lotes de 50g de semillas de moringa, limpias y sin defecto, fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio al 0.1% por 10 min, esto para desinfectar y eliminar cualquier contaminante que pudiera traer en la superficie de la semilla. Luego, se retiraron y se lavaron para eliminar el exceso de cloro y se dejaron en remojo durante 24h en agua destilada. Pasado el tiempo de remojo, se decanto el agua, las semillas fueron colocadas homogéneamente sobre papel filtro en charolas de plástico y cubiertas con papel para retener humedad. Las charolas se colocaron en una estufa con puerta de vidrio para llevar a cabo la germinación de las semillas. Los 13 tratamientos se realizaron en oscuridad sin fotoperiodos. Una vez cumplidos los tratamientos, los germinados de moringa fueron llevados a congelación a -80°C, para posteriormente ser secados por medio de liofilización en un equipo Freezone 6®.

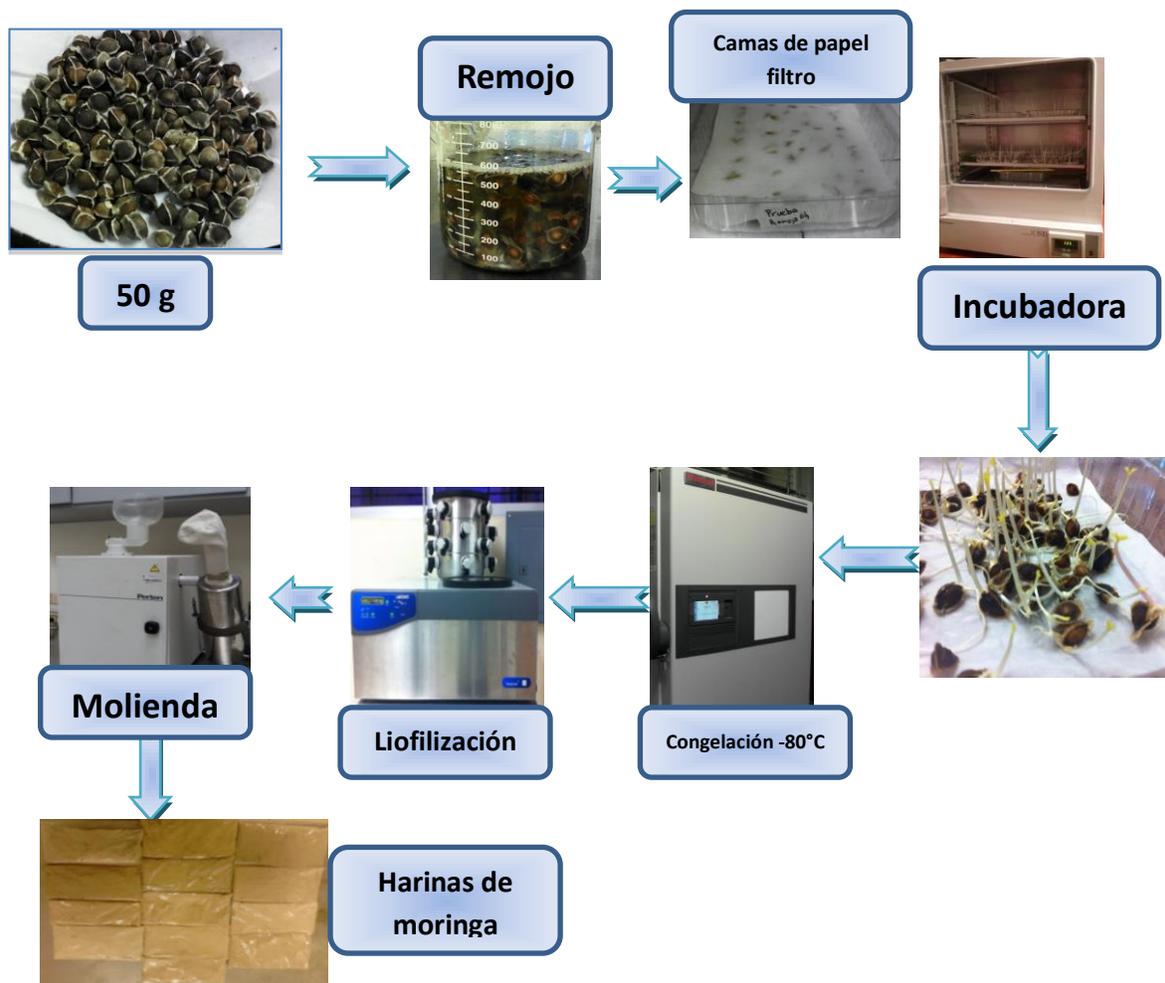


Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de germinación de semillas de moringa (*Moringa Oleifera*).

Una vez secos los tratamientos se procedieron con la etapa de molienda en molino de café marca Krups modelo GX410011 con malla de 1mm de diámetro y se almacenaron a 4°C para su posterior utilización y análisis.

4 Evaluación del contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) y actividad antioxidante (AAox) en harinas de moringa bioprocesada (HMB)

a Extracción de fitoquímicos libres

La extracción de fitoquímicos libres se realizó según el procedimiento de Adom y Liu (2002) y Mora-Rochín (2010) con modificaciones (Fig. 3). Los fitoquímicos libres de cada una de las harinas de los 13 tratamientos derivados del diseño experimental, se pesaron 0.5g de muestra con 10 ml de metanol al 80% (v/v); se agitaron en un rotator (OVAN noria R, EUA, 2010) a una velocidad de 25 por 10 min. Después fueron centrifugadas las muestras a 3,000xg/10°C durante 10 min. El sobrenadante se colocó en un tubo cónico y se llevaron a concentración a 45°C con presión baja (Apud Vac Concentrator, Thermo Elector Corporation) hasta alcanzar un volumen final de 2 ml. El concentrado se almacena a 4°C hasta su posterior utilización, las determinaciones se realizaron por cuadruplicado. A partir del precipitado se realiza la obtención de los extractos fitoquímicos ligados.

b Extracción de fitoquímicos ligados

La extracción de fitoquímicos ligados se realizó según el procedimiento de Adom y Liu (2002) y Mora-Rochín (2010) con modificaciones (Fig. 3). El precipitado se digirió con 10 ml de NaOH 2M, se eliminó el oxígeno en presencia de N₂ gas y la muestra fue sometida a tratamiento térmico, en baño maría a 95°C/30 min, posteriormente se agitaron durante 1 h a temperatura ambiente (25°C). La mezcla

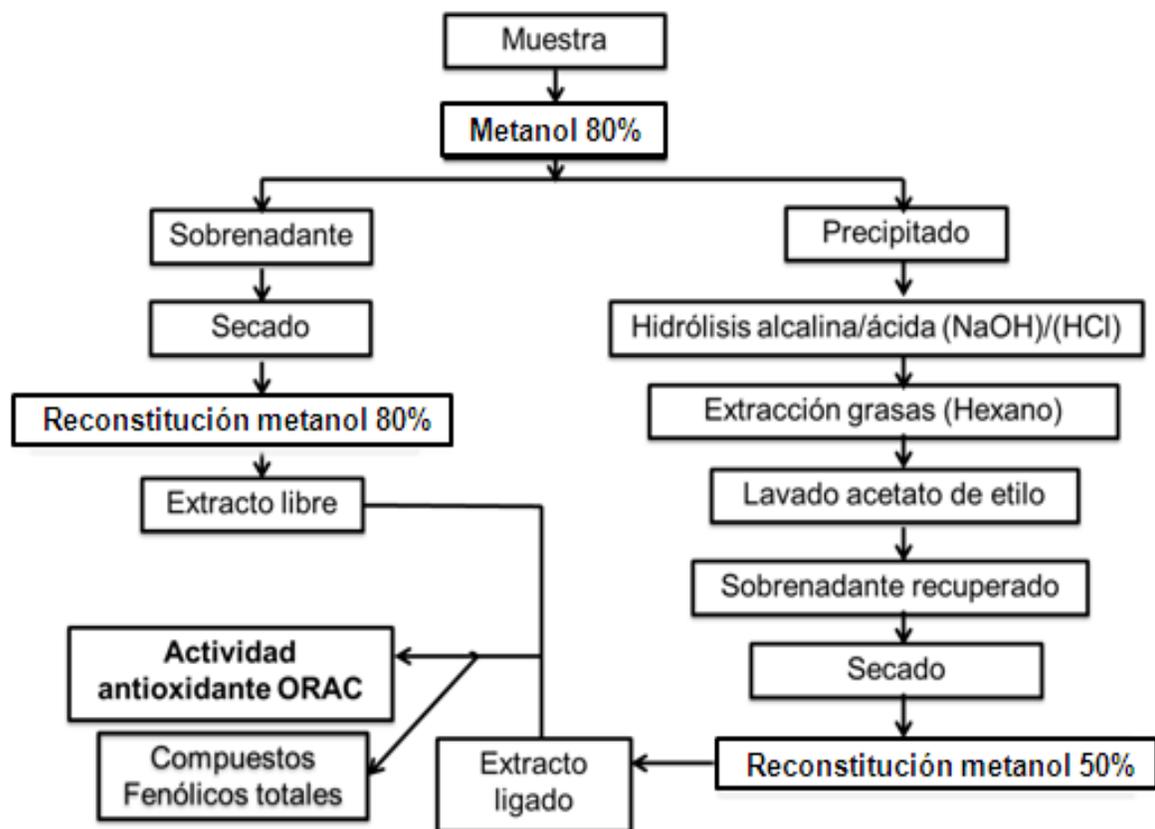


Figura 3. Diagrama de flujo para la obtención de fitoquímicos libres y ligados para la determinación de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante.

fue neutralizada con 2 ml de HCl concentrado, se agitó por 2 min en un vortex y posteriormente en un rotator (OVAN noria R, EUA, 2010) con velocidad de 25 por 10 min e inmediatamente después se le agregaron 10 ml de hexano; se realizó la misma operación de agitación mediante el vortex y rotator, se centrifugó a 3,000xg/10°C por 10 min, y se extrajo el hexano.

La mezcla resultante se le agregaron 10ml de acetato de etilo, se agitó por dos min (vortex) y se pasó a una agitación en rotador (OVAN noria R, EUA, 2010) con velocidad de 25 por 10 min y se centrifugó a 3,000xg/10°C por 10 min, se extrajo el acetato de etilo y se almacenó en un tubo cónico; esta extracción se llevó a cabo 5 veces. La fracción de acetato de etilo se evapora hasta sequedad (Apud Vac Concentrator, Thermo Elector Corporation). Los compuestos extraídos se reconstituyeron con metanol al 50% y se almacenaron a -20°C hasta su posterior utilización. Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado.

c Compuestos fenólicos totales (CFT)

El contenido de compuestos fenólicos totales (suma de compuestos fenólicos libres y ligados), en los extractos de fitoquímicos libres y ligados se determinó mediante el método colorimétrico descrito por Singleton y col (1999). Primero se tomaron 20 µL del extracto los cuales se oxidaron con 180 µL del reactivo Folin-Ciocalteu. Luego de 3 min de reposo, se les adicionaron 50 µL de carbonato de sodio al 7% y se incubaron en oscuridad. Después de 90 min de incubación, se realizó la medición de la absorbancia a 750 nm utilizando un lector de microplacas (Synergy™ HT Multidetector, Biotek, Inc., Winooski, VT). Se preparó una curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar y el contenido de fenólicos totales se expresó

como mg equivalentes de ácido gálico (mg EAG) por 100 g de muestra, en base seca.

d Actividad antioxidante (Aaox) hidrofílica total

La determinación de la capacidad antioxidante se llevo a cabo por el método de capacidad de absorbanca de radicales oxígeno (oxygen radical absorbance capacity, ORAC), desarrollado para compuestos hidrofílicos (Cao y col 1995, 1998; Ou y col 2001; Wu y col 2004). La degradación térmica del compuesto 2-2'-Azobis amidinopropano (AAPH) produce radicales peroxilo (ROO'), los cuales oxidan al compuesto fluorescente, diclorofluoresceína (DCFH) al compuesto no fluorescente, diclorofluorescina (DCF). El grado de inhibición de los antioxidantes (fitoquímicos) de atrapar o secuestrar a los radicales libres es usado como base para calcular la actividad antioxidante (Fig 4). Para preparar la solución de AAPH, se pesaron 0.207 g del reactivo y se aforaron en un matraz volumétrico de 5 ml con fosfato (pH 7.4). La fluoresceína se preparo hasta el final (ya que puede ser oxidada muy lentamente en condiciones ambientales) a una concentración de $0.1\mu\text{M}$ con fosfato (pH 7.4). Se realizaron diluciones correspondientes para los extractos de las muestras (fitoquímicos libres y ligados) usando solución reguladora de fosfato (pH 7.4) y posteriormente serán transferidos 25 μl de cada extracto a una placa de 96 celdas. La placa con las muestras se colocaron en el lector de microplatos (Synergy HT, Biotek Instrument) del espectrofotómetro fluorescente, por medio de un autodispensador del equipo se agregan 150 μl de fluoresceína a cada celda del microplato, la solución fue mezclada agitando a 1200 rpm por 20 s. La reacción se inició agregando 25 μl de AAPH por medio del autodispensador del equipo previamente programado. Las muestras y el control se analizaron por cuadruplicado.

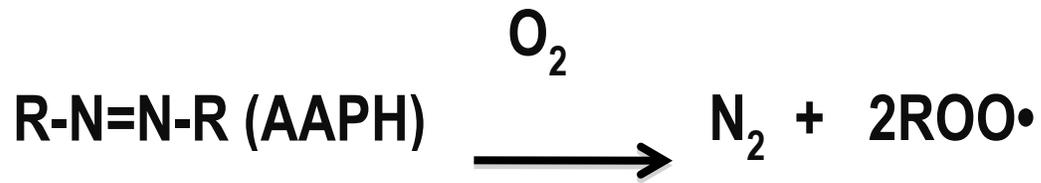


Figura 4. Mecanismo de acción propuesto para el método de capacidad antioxidante ORAC hidrofílico.

La reacción se llevó a cabo a 37°C y la fluorescencia fue medida a 485 nm de excitación y 538 nm de emisión. Las condiciones de la reacción se optimizaron de estudios preliminares para que la reacción control sea completada en un lapso de 40 min. Los datos se recolectaron por el software del equipo. La reacción con los radicales peroxilo genera la pérdida de la fluorescencia con el tiempo.

El efecto de un antioxidante es integrado por el área neta bajo la curva sobre la pérdida de fluorescencia (AUC) ($AUC_{AOX} - AUC_{no\ AOX}$). Los valores ORAC se reportaron como μmol equivalentes de Trolox. Se generó una curva estándar de cinco puntos (concentración de 25 a 100 μM), y los μmoles equivalentes de Trolox de la muestra se calcularon usando la siguiente ecuación lineal o cuadrática ($Y = a + bX$, lineal; ó $Y = a + bX + cX^2$, cuadrática) entre la concentración de Trolox (Y) (μM) y el área neta bajo la curva de la disminución de la fluoresceína (X) ($ABC_{muestra} - ABC_{blanco}$). La regresión lineal se utilizara en un rango de 100-25 μM de Trolox. Los datos se expresaran como micromoles equivalentes de Trolox (ET) por 100 g muestra (bs) ($\mu\text{mol ET}/100\text{ g, bs}$) (Ou y col 2001; Prior y col 2005).

5 Optimización del proceso de germinación de la semilla de Moringa

a Diseño experimental

Se utilizó, como técnica de optimización, la metodología de superficie de respuesta para determinar las condiciones óptimas para la producción de harina de moringa germinada (HMGO), mediante el proceso de germinación. Para seleccionar el número y niveles de variación de las variables de proceso en el diseño experimental se tomaran en consideración ensayos preliminares. Se selecciono un diseño experimental central rotatable de dos factores (Temperatura y tiempo de germinación) y cinco niveles (dos factoriales, dos axiales, un central) (Khuri y Cornell

b Optimización del proceso de germinación

Se aplicó el método convencional grafico como técnica de optimización, para obtener los valores máximos de contenido de proteína, fenólicos totales y capacidad antioxidante (ORAC), fueron utilizados los modelos de predicción para representar gráficamente dichas respuestas. Las gráficas de contorno de las variables de proceso fueron usadas para la aplicación de la metodología de superposición de superficies, para obtener una gráfica de contorno; para la observación y selección de la mejor combinación (región óptima) de las variables de proceso Temperatura de Germinación (TG) y Tiempo de Germinación (tG). Se utilizó el software Desing Expert ver 7.0 (Desing Expert 2005).

6 Propiedades fisicoquímicas de harina de moringa germinada optimizada (HMGO)

a Diferencia total de color (ΔE)

Se utilizó la metodología reportada por Reyes y col (2002). El color de las muestras se determinó en un colorímetro Minolta Chroma-meter mod CR-210 (Minolta LTD, Japón). La determinación de color se basa en el efecto triestímulo, donde **L** mide la brillantez y varia de 100 para un blanco perfecto a cero para negro. Las dimension de cromaticidad son dadas por los parámetros **a** y **b**. El valor positivo de **a** está asociado al color rojo y el negativo con el verde. El valor positivo de **b** está asociado al color amarillo y el negativo con el azul. Para la evaluación del color se utilizará aproximadamente 100 g de muestra, la cual se colocará en una tapa de caja petri de vidrio Kimax de 15 cm de diámetro y se midió los parámetros correspondientes **L**, **a** y **b**. Se usó un mosaico blanco como referencia (estándar) de

valores **L**, **a** y **b** conocidos (**L**=97.63, **a**=-0.78 y **b**=2.85). La diferencia total de color (**ΔE**) de la muestra se calculó con la ecuación:

$$\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$$

Donde: **ΔE** = Diferencia total de color entre el estándar y la muestra; **ΔL**, **Δa** y **Δb**= Diferencias absolutas de los valores de **L**, **a** y **b** del estándar utilizado y los valores correspondientes observados en la muestra.

b Actividad acuosa (aw)

Para su determinación se utilizó un equipo marca Aqualab mod CX2 (Decagon Devices Inc, Pullman, WA, EUA). Se pesó una muestra de aproximadamente 2 g y se colocaron en la celda porta muestras del equipo hasta que alcance el equilibrio (40-60 min). El instrumento se calibró con una disolución saturada de cloruro de potasio (**aw**= 0.876). Las mediciones se realizaron por triplicado a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (Milán-Carrillo y col, 2002).

c Densidad aparente

Se determinó de acuerdo a la norma oficial mexicana NMX-FF-034/1-SCFI-2002 (NOM 2007). En una probeta graduada se miden 100 mL de harina, vaciada con ayuda de un embudo, y golpeada suavemente 5 veces para acomodo de las partículas; se medirá el volumen de la harina y su peso correspondiente.

d Índice de absorción de agua (IAA)

Para esta determinación se utilizó el método descrito por Anderson y col (1969). Una muestra de harina de 2.5 g se suspendió en 30 ml de agua a 30°C en un tubo para centrifuga de 50 ml previamente tarado, se agitó intermitentemente a una velocidad moderada por 30 min. La suspensión se centrifugó a $3000 \times g$, 30°C durante 10 min. El líquido sobrenadante fue decantado cuidadosamente en un

recipiente previamente tarado para la determinación de sólidos. Se pesó el gel y el índice de absorción de agua se calculó con este peso como gramos de gel por gramo de muestra seca. Esta prueba se realizó por triplicado.

e Índice de solubilidad en agua (ISA)

El índice de solubilidad en agua (ISA) expresado como gramos de sólidos por gramo de sólidos originales, se calculó a partir de peso de sólidos secos recuperados mediante evaporación del sobrenadante líquido que se guardó durante la determinación de IAA durante la noche a 110°C.

7 Composición química y valor nutricional de harina de moringa cruda (HMC) y germinada optimizada (HMGO)

a Composición química

La composición química será determinada acorde a las metodologías descritas en la sección VI.B.2.

b Digestibilidad proteínica *in vitro* (DPIV)

Se aplicó la metodología de Hsu y col (1977). Se seleccionó un sistema multienzimático (Sigma hematical, St. Luis, MO, EEUU) constituido por 8mg de tripsina pancreatica porcina tipo IX (Sigma T-0303) con 5600U/mg; 15.5mg de quimotripsina pancreática bovina tipo II (Sigma C-4129) con 83.9U/mg; y 6.5 mg peptidasa intestinal porcina grado III (Sigma P-7500) con 102 U/g; todo en 5 ml de agua destilada. Mientras se agita en un baño María a 37°C, una cantidad específica de cada muestra se utilizó para preparar 50ml de una suspensión acuosa de proteína (6.25mg/ml) y se ajusto el pH de la suspensión a 8.0. A cada suspensión proteínica, mantenida a 37°C y en agitación constante, se le añadieron 5ml de solución multienzimática y se registró el pH a los 10min. La digestibilidad proteínica se calculó

como $DP=210.46 - 18.10X$, donde X es el pH registrado a los 10 min después de añadir el sistema multienzimático a la solución proteínica (Hsu y col 1977).

c Perfil de ácidos grasos

1) Obtención de extractos

Se realizó de acuerdo con la metodología de Soto y col (2014) con modificaciones, se pesaron 2g de muestra y se mezclaron con 15 ml de una solución de hexano:isopropanol (3:2), se colocaron en tubos de 50ml los cuales fueron agitados durante una hora en un rotator, posteriormente fueron centrifugados a 4,000 rpm x 10min y se recoló el sobrenadante en tubos de 15ml, el precipitado se volvió a resuspender en 15ml de hexano:isopropanol(3:2) se volvió a agitar y centrifugar, se juntaron los 2 sobrenadantes obtenidos y se agregaron 2.5ml de KCl 0.75%, se centrifugo la mezcla a 3,000 rpm x min para clarificar el extracto y observar las dos fases, se recuperó la fase superior, para ser llevada a sequedad en un rotaevaporador a una temperatura de 50°C (proteger la muestra de la luz)

2) Transesterificación

Una vez obtenidos las muestras de grasa, se tomaron 0.1g (100µl) del extracto etéreo fueron mezcladas con 80µl de KaOH (0.14mg/ml de MeOH), posteriormente aforar a un volumen de 1.5ml en un tubo de 2ml con MeOH, someter la muestra a ultrasonicación a una frecuencia de 60mHz por 20s (dependiendo del contenido de grasa), una vez sonicada se llevó a sequedad, resuspender la muestra en 2 ml de hexano grado HPLC, centrifugar a 5,000rpm x min durante 5min, filtrar la muestra (filtros de nylon 0.22mm), se pasó el sobrenadante a un vial ámbar o inserto para su análisis cualitativo, el cual se llevó a cabo en un equipo de cromatografía de gases Agilent 6890N con espectrómetro de masas Agilent 5973, columna Omega Wax 250,

Helio como gas acarreador e inyector automático serie 7683. Las condiciones de operación fueron: volumen de inyección, 1 μL ; flujo, 1 mL min^{-1} ; temperatura de columna, 50°C a 270°C (10 min) con una tasa de calentamiento de 5°C min^{-1} .inyectar la muestra en el cromatografía de gases acoplado a masas (GC-MC) para su análisis.

d Fitoquímicos

1) Taninos condensados

El contenido de taninos condensados de los extractos de muestras se determinó acorde al método de Xu y Chang (2007). Se empleó una alícuota de 20 μL de extractos metanólicos al 80% de la muestra y una de la solución estándar de catequina-(+); y se mezclaron con 1200 μL de vainillina al 4% en metanol y 600 μL de HCl concentrado y se dejaron en reposo durante 15 min. Se midió la absorbancia a 500 nm contra un blanco usando un espectrofotómetro visible UV (Synergy HT, Biotek Instrument). Los resultados se calcularon y expresaron como mg equivalentes de catequina/ 100g de muestra. El rango de linealidad de la curva de calibración fue de 25 a 500 ppm ($r=0.99$). La determinación se realizó por triplicado.

2) Saponinas

Para la cuantificación de saponinas, se utilizo la metodología propuesta por (Hiai, 1976), quien propone el uso de vainillina y H_2SO_4 para la generación de grupos cromóforos en saponinas, los cuales son visibles en longitudes de onda alrededor de 455 - 460 nm.

Se pesaron aproximadamente 0.5 g de harina de semillas de moringa cruda y optimizada y se colocaron en tubos de centrifuga de 50 mL, posteriormente se añadieron 10 mL de metanol acuoso al 80% a cada uno de los tubos y se agitaron

inmediatamente para que la mezcla quedara lo más homogénea posible. Los tubos se mantuvieron en agitación mecánica en un agitador orbital durante 16 h.

Pasado dicho tiempo los tubos se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos y se recolecto los sobrenadantes en tubos de vidrio. A los tubos que contenían el remanente de muestra, se les adicionó 5 mL de metanol al 80%, y se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos, y se recolecto nuevamente el sobrenadante (este procedimiento se realizó 2 veces).

Para la valoración de saponinas, primero se añadió la muestra (200 μ L de extracto), y se agregaron 50 μ L de metanol al 80% a temperatura ambiente. Los tubos se transfirieron a un baño de hielo, ahí se les adicionó 0.25 mL del reactivo de vainillina (1.6 g de vainillina en 20 mL de metanol absoluto, el reactivo debe ser preparado al momento de hacer la determinación) y 2.5 mL de ácido sulfúrico al 72% v/v (agregarlo lentamente, resbalando la solución por la pared del tubo), y agitando inmediatamente en el vortex. La mezcla obtenida se calentó en un baño a 60°C por 10 min. Terminado este periodo de tiempo se enfriaron los tubos en un baño de hielo. Finalmente se midió la absorbancia a 520 nm contra un blanco de reactivos.

Los valores de la absorbancias obtenidas para cada muestra se interpolaron en la curva tipo de diosgenina, para obtener μ g de diosgenina por cada mL y finalmente los resultados se expresaron en mg equivalentes de diosgenina por cada 100 g de muestra. Para el estándar de diosgenina se pesaron 10 mg de diosgenina y se disolvieron en 4 mL de agua destilada. Se añadieron 16 mL de metanol, para obtener una concentración final de 0.5 mg/mL.

Los cálculos se realizaron de la siguiente manera:

$$\frac{\text{mg equivalentes de diosgenina}}{100\text{g de muestra}} = \frac{\mu\text{g de diosgenina}}{\text{mL}} \times \frac{1}{\text{peso de la muestra (g)}} \times 20 \text{ mL} \times \frac{1 \text{ mg}}{1000 \mu\text{g}} \times 100$$

3) Inhibidores de tripsina

Para la evaluación de los inhibidores de tripsina se utilizó el método reportado por Welham y Domoney (2000), basado a su vez en el de Kakadey col. (1974), con ligeras modificaciones. Estos métodos permiten determinar la capacidad de la muestra para inhibir la actividad que la tripsina control ejerce sobre el sustrato sintético α -N-benzoil-DL- arginina-p-nitroanilida (BAPNA). Para llevar a cabo la extracción de los inhibidores de tripsina, se pesaron 0.025g de muestra, se colocaron en tubos eppendorf de 2 mL y posteriormente se les añadió 1 mL de HCl 0.05M. Se mantuvieron en agitación durante 1h a 4°C. Pasado dicho tiempo los tubos se centrifugarán a 10000 rpm durante 10 min. a 4°C en centrifuga marca eppendorf modelo 5427R, enseguida se recolectó el sobrenadante y se mantuvieron en un baño de hielo hasta el momento de su valoración. Al mismo tiempo en tubos eppendorf mantenidos en baño maría a 37°C se preparó el control, el blanco de control y la muestra; para el control se agregó 200 μ l de Tris al 7.5 (3.025g de tris aforado a 500mL y ajustado el pH a 7.5) y se añadieron 200 μ l de solución de tripsina (10mg de tripsina de 16700 unidades/mg de proteína disuelta en 500mL de HCl 1mM). Pasado el tiempo de inhibición enzimático (2 min), se adicionó 500 μ l de solución BTC (BAPNA en dimetilsulfoxido + Tris – HCl 0.05 M a pH 8.2 y cloruro de calcio 1M). Al cabo de 10 min. de incubación, la reacción enzimática se detuvo con 100 μ l de ácido acético al 30%. Para el blanco de control se agregó 200 μ l de tris 7.5 y se añadieron 200 μ l de solución de tripsina. Pasado el tiempo de inhibición enzimático (1 min.), se

agregó 100 µl de ácido acético al 30%. Al cabo de 1 min. se adicionó 500 µl de solución BTC. Para preparar la muestra se agregaron 200 µl de extracto y se añadieron 200 µl de solución de tripsina. Pasado el tiempo de inhibición enzimático (2 min.), se adicionarán 500 µl de solución BTC. Al cabo de 10 min. de incubación, la reacción enzimática se detuvo con 100 µl de ácido acético al 30%. La muestra se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min. a 4 °C y se midió su absorbancia a una longitud de onda de 410 nm en un espectrofotómetro marca Thermo Scientific, modelo GENESYS 10UV-Visible, absorbancia a la cual el sustrato cromogénico BAPNA (amida), al ser hidrolizado por la tripsina, libera un compuesto colorido de p-nitroanilina (amina). La actividad de los inhibidores de tripsina se expresará en términos de unidades de tripsina inhibidas, de manera que una unidad de inhibidores de tripsina (UIT) es la cantidad de inhibidores que reduce 0.01 unidades de absorbancia, en relación con la reacción control de tripsina y en las condiciones anteriormente definidas. El cálculo para obtener el número de unidades de inhibidor de tripsina se realiza de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades inhibidoras de tripsina (UIT)} = \frac{\text{Abs. control de tripsina} - \text{Abs. muestra}}{0.01}$$

4) **Ácido Fítico**

La determinación de fitatos se llevó a cabo por espectrofotometría, siguiendo el método de Vaintraub y Latpeva (1988). La técnica se fundamenta en la destrucción de un complejo de ($\text{Fe}^{3\pm}$ ácido sulfosalicílico) conocido como reactivo de Wade y como señal analítica se utiliza la disminución de la absorción de dicho complejo colorido. En presencia del fitato, el ion hierro se une al éster de fosfato y provoca su

indisponibilidad para reaccionar con el ácido sulfosalicílico, resultando un decremento en la intensidad del color morado.

Se pesaron aproximadamente 0.5 g de harina de moringa cruda y optimizada, se colocaron en tubos de centrifuga de 50 mL, posteriormente se añadieron 10 mL de HCl al 3.5% en cada tubo y se agitaron inmediatamente para que la mezcla quedara lo más homogénea posible. Los tubos se mantuvieron en agitación mecánica en un agitador orbital durante 1 h. Pasado dicho tiempo los tubos se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos y se recolecto los sobrenadantes.

Para la valoración de fitatos primero se añadió la muestra (200 µL de extracto), posteriormente se agregaron 2800 µL de agua destilada y 1 mL de Reactivo de Wade. Los tubos se agitaron en el vortex y finalmente se midió la absorbancia a 500 nm contra un blanco de agua destilada.

Los valores de la absorbancias obtenidas para cada muestra se interpolaron en la curva tipo de fitato de sodio (el estándar de fitato de sodio se preparó una con 160 µg de fitato de sodio/mL de agua destilada), para obtener µg de fitato de sodio y finalmente los resultados se expresaron en mg equivalentes de fitato de sodio por cada 100 gramos de muestra en base seca. Los cálculos de los resultados se realizaron con la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{mg equivalentes de fitato de sodio}}{100\text{g de muestra}} = \mu\text{g de fitato de sodio} \times \frac{1}{\text{peso de la muestra (g)}} \times 10 \text{ mL} \times \frac{1 \text{ mg}}{1000 \mu\text{g}} \times 100$$

5) Compuestos fenólicos totales (CFT)

Se determinó acorde a la metodología descrita en la sección VI.B.4.c.

1) Análisis cualitativo por HPLC

Se realizó un análisis cualitativo de ácidos fenólicos por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) de acuerdo al protocolo descrito por Adom y Liu (2002). Los extractos libres y ligados se utilizaron para el estudio de ácidos fenólicos usando un HPLC (Perkin Elmer, Alemania), equipado con una columna de 250 mm x 4.6 mm, C-18 YMC y un detector UV-visible. La elución isocrática se condujo con 20% de acetonitrilo en agua ajustado a un pH 2 con ácido trifluoroacético, con una velocidad de flujo de 0.5 mL/min y con una temperatura de columna de 25°C. La detección de los compuestos se llevó a cabo a 320 nm para los ácidos *p*-cumárico, sinápico y ferúlico, 275 nm para la identificación de catequina y ácido siríngico y 260 nm para los ácidos *p*-hidroxibenzóico y vanílico. El pico de identificación de cada ácido en los extractos de las muestras se basó en el tiempo de retención de cada estándar así como sus correspondientes espectros UV.

8 Actividad antioxidante en HMC y HMGO

1) ORAC

Se determinó acorde a la metodología descrita en la sección VI.B.4.d.

9 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente con un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) y las medias de los resultados se compararon con la prueba de Duncan, con un nivel de significancia $p \leq 0.05$.

VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LAS SEMILLAS DE MORINGA

Las dimensiones físicas son indicadores de la calidad comercial, manejo y almacenamiento de granos y semillas. Los valores obtenidos para dimensiones físicas, peso de 1000 semillas y peso hectolítrico de las semillas de moringa, se muestran en el Cuadro 7.

El tamaño que presentaron las semillas de moringa fueron 1.14 ± 0.06 cm de largo y 0.88 ± 0.10 cm de grosor. El peso de 1000 semillas indica el tamaño de la semilla de dicha variedad y el peso hectolítrico es una medida indirecta de la densidad de la semilla. La semilla de moringa utilizada en la presente investigación presentó un valor promedio de peso de 1000 semillas de 218.50 ± 6.04 g y un peso hectolítrico de 22.45 ± 0.54 K/hL. Aviara y col. (2013) reportaron valores de 1000 semillas de 24.23 K, los cuales, se podrían considerar similares a los obtenidos en nuestras semillas. Para ancho y largo de las semillas se encontraron valores de 1.19 y 1.00 cm, respectivamente, Aviara y col. (2013) realizaron las mismas mediciones sin embargo, utilizaron diferentes condiciones de humedad lo cual no nos permite comparar con las utilizadas en el presente estudio; Sin embargo, Olson y Fahey (2011) reportaron un rango de longitud de semilla entre 1.05–3.00 cm, encontrando que los valores obtenidos de longitud de nuestras semillas de moringa se encuentran dentro de este rango.

El peso promedio de una semilla fue de 0.22 ± 0.07 g lo que equivale a tener en promedio, 4570 semillas en un kilogramo. García y col (2003) reportaron un número de semillas por kilogramo de 4,000 a 4,800. Estas características describen a una semilla poco densa y debido a que esta semilla cuenta con 3 alas, se facilita su

Cuadro 7. Propiedades físicas de semillas de moringa.

Características	HMC^a
Dimensiones físicas (cm)	
Largo	1.14 ± 0.06
Grosor	0.88 ± 0.10
Peso de 1000 semillas (g)	218.50 ± 6.04
Peso hectolitrico (Kg/hL)	22. 45 ± 0.54

^aHMC: Harina de moringa cruda

propagación por el viento en condiciones naturales, ya que esta es la forma de reproducción de la planta.

B OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE GERMINACION PARA LA OBTENCIÓN DE HMGO

En el Cuadro 8 se muestra el diseño experimental utilizado en la presente investigación, para la obtención de las diferentes combinaciones de las variables del proceso de germinación [Temperatura de germinación (TG) y tiempo de germinación (tG)] para la producción de las 13 harinas de moringa germinada y los valores experimentales de las variables de respuesta [Contenido de proteína (CP), Fenólicos Totales (CFT) y Capacidad antioxidante (AAox)], obtenidas para cada combinación.

1 Modelos de predicción

a Contenido de proteína (CP)

Los valores experimentales para el contenido de proteína variaron de 21.5 a 25.6% (Cuadro 8). El análisis de regresión indicó que tanto los términos lineales, de interacción y cuadráticos, de temperatura y tiempo de germinación fueron significativos ($p < 0.05$) dentro del modelo.

El modelo de regresión explicó el 90.13% de la variación total en los valores de %Proteína ($p < 0.05$). Las Figuras 5 y 6 muestran el efecto de la TG y el tG sobre el %Proteína de las harinas de moringa germinada. En las dos figuras se puede observar que el % del contenido de proteína presenta tres regiones donde se observaron incrementos en el contenido de proteína al aumentar la TG y disminuir el tG, cuando se disminuye el tiempo y se incrementa la temperatura, así como también a temperatura y tiempos altos de germinación. Los modelos de regresión para el contenido de proteína de harinas de moringa germinada fueron:

Cuadro 8. Diseño experimental utilizado para la obtención de diferentes combinaciones de temperatura de germinación / tiempo de germinación para la producción de harinas de moringa germinada y resultados experimentales para las variables de respuesta.

Orden estándar	#corrida ^a	Variables de proceso ^b			Variables de respuesta ^c	
		TG	tG	CP(%)	CFT	Aaox
1	5	27.0	73	23.5	197.3	8126.4
2	7	37.8	73	25.6	284.4	6280.6
3	4	27.0	310	24.1	274.0	8961.0
4	6	37.8	310	23.7	256.0	8591.7
5	8	25.0	192	23.0	227.7	7921.6
6	3	40.0	192	24.9	269.9	6576.1
7	13	32.5	24	25.3	249.4	9056.2
8	12	32.5	360	25.5	256.1	11592.8
9	2	32.5	192	21.9	276.1	9392.9
10	10	32.5	192	22.4	284.3	9052.6
11	1	32.5	192	23.0	272.3	9445.8
12	9	32.5	192	21.5	297.7	9817.2
13	11	32.5	192	22.8	295.3	10280.2

^aOrdenamiento al azar

^bTG = Temperatura de germinación (°C); tG = Tiempo de germinación (h)

^cCP= Porcentaje de proteína cruda (%; bs); CFT = Contenido de fenólicos totales (mg EAG/ 100 g muestra base seca); Aaox = Capacidad antioxidante (μmol ET/ 100 g muestra base seca).

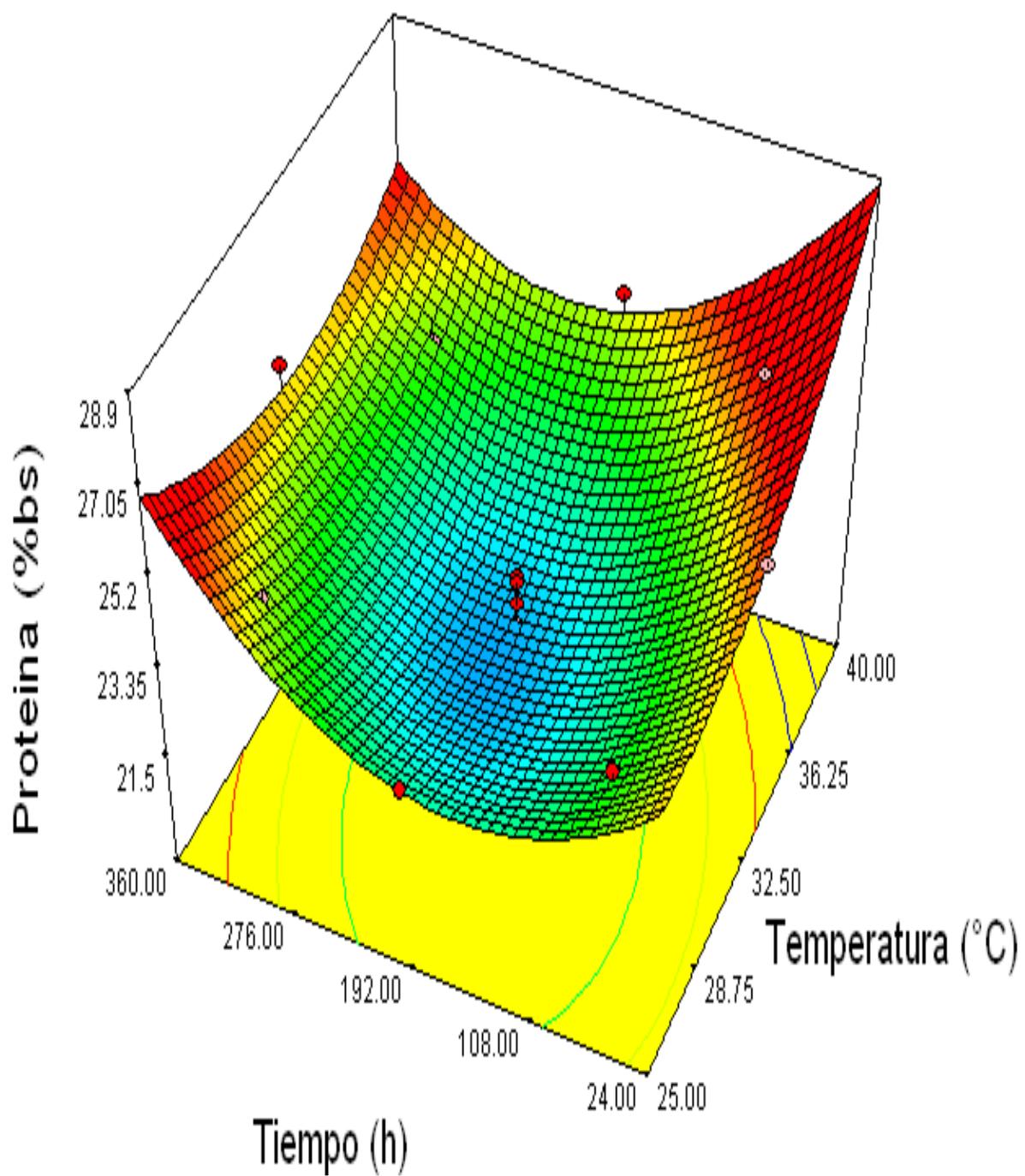


Figura 5. Superficie de respuesta del efecto de TG y tG para el contenido de proteína de las HMG.

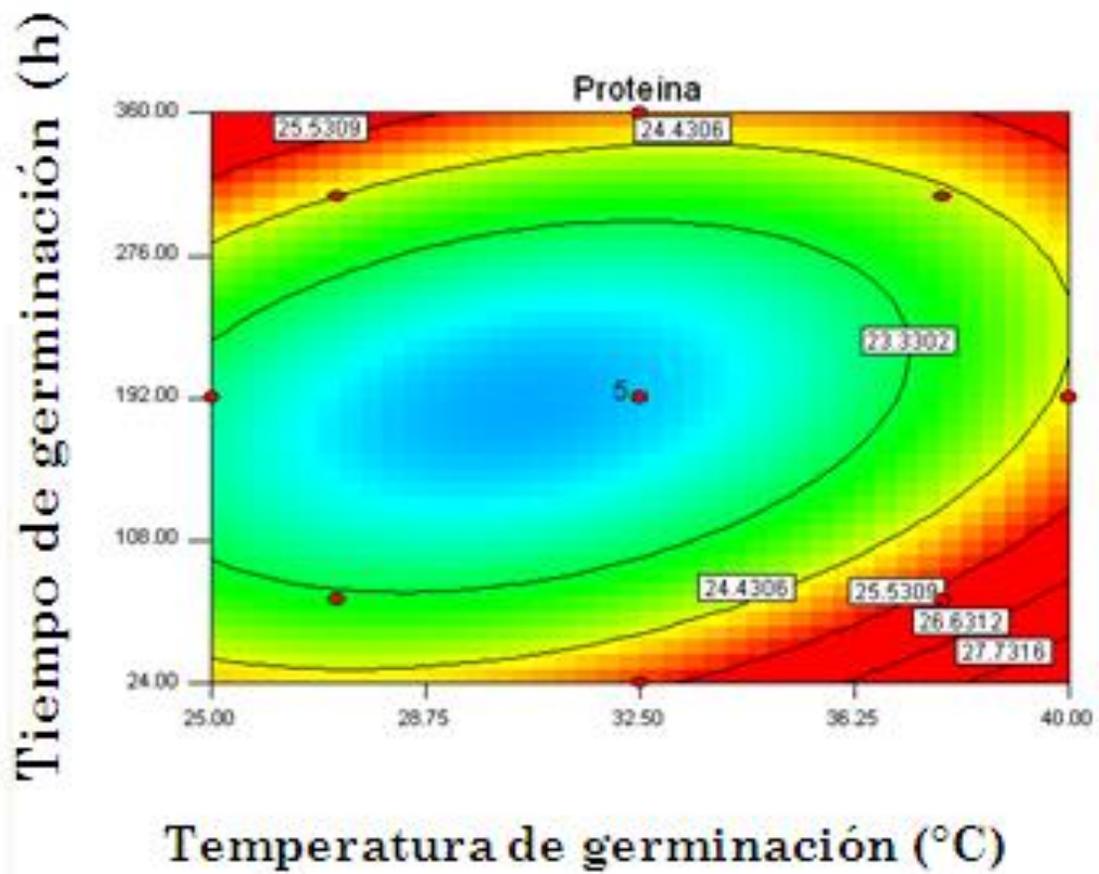


Figura 6. Gráfica de contorno del efecto de la TG y tG sobre el contenido de proteína de las HMG.

Usando valores codificados:

$$Y\% \text{ Proteína} = 22.34 + 0.56 X_1 - 0.13 X_2 - 0.61X_1X_2 + 0.72X_1^2 + 1.43X_2^2$$

Usando valores originales:

$$Y\% \text{ Proteína} = 44.00945 - 1.38334 \text{ TG} - 8.29673\text{E-}003\text{tG} - 9.72222\text{E-}003\text{TG}*\text{tG} + 0.025769 \text{ TG}^2 + 1.01137\text{E-}004\text{tG}^2$$

$$R^2 = 0.9013$$

b Contenido de Fenólicos Totales (CFT)

El modelo de regresión para el contenido de fenólicos totales de las harinas de moringa germinada como función de las variables independientes, explicó el 92.37% de la variación total ($p < 0.0001$). Los efectos lineales, de interacción y cuadráticos de las variables independientes (Temperatura de germinación y tiempo de germinación) fueron significativos ($p < 0.05$), dentro del área experimental evaluada. Las Figuras 7 y 8 muestran la relación entre la temperatura de germinación (TG) y el tiempo de germinación (tG) sobre la el contenido de fenólicos de las harinas de moringa germinada. En ambas imágenes se observa que al incrementar la TG y a tiempos intermedios de germinación incremento el contenido de fenólicos totales. Los valores de contenido de fenólicos totales variaron desde 197.3 hasta 297.6 mg EAG/100g muestra (bs). El modelo de regresión para el contenido de fenólicos totales de las harinas de moringa germinada fue del orden cuadrático y presentó las siguientes expresiones:

Usando valores codificados:

$$Y\text{CFT} = 285.12 + 16.1X_1 + 7.27X_2 - 26.26X_1X_2 - 17.61X_1^2 - 15.64X_2^2$$

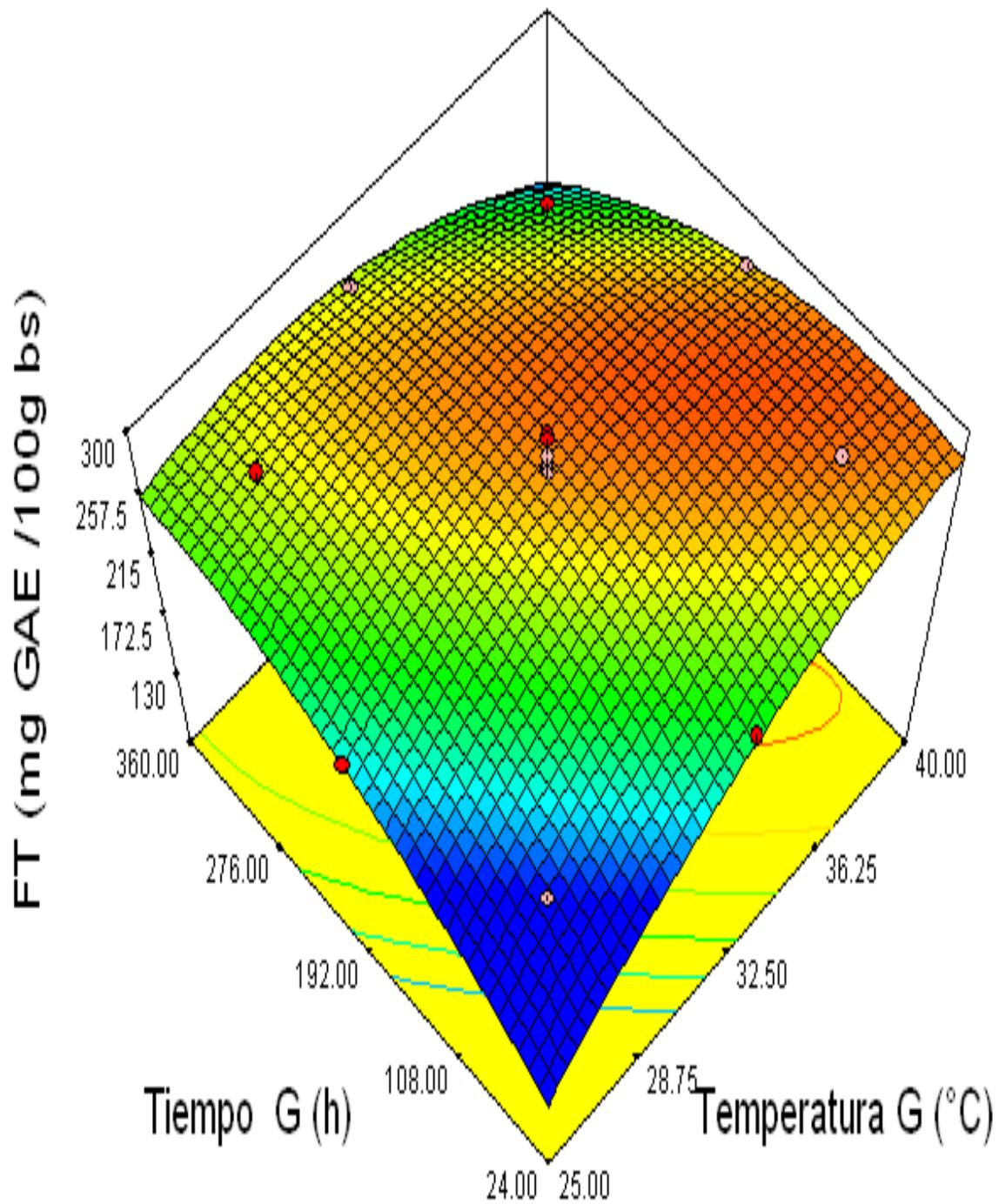


Figura 7. Superficie de respuesta del efecto de la TG y tG sobre el contenido de Fenólicos Totales (CFT) de las HMG.

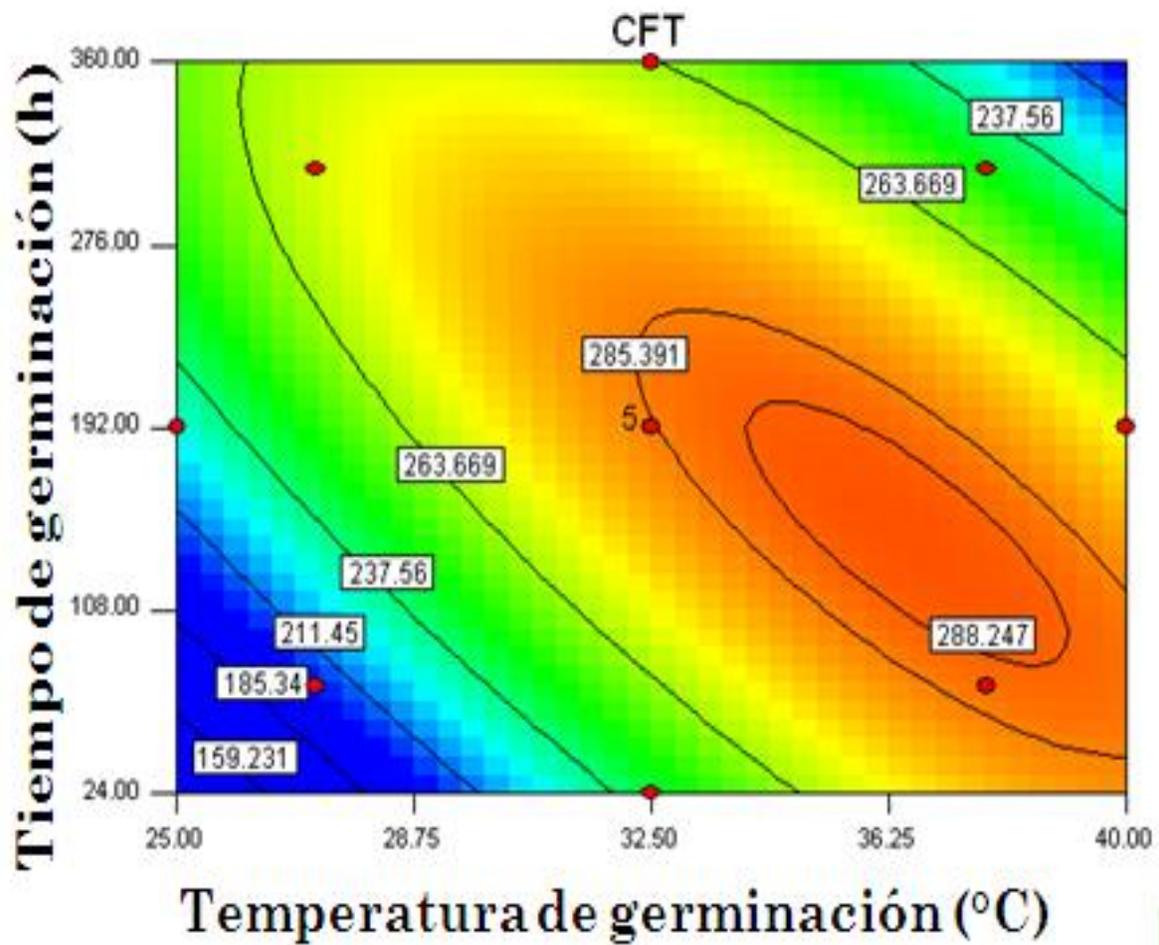


Figura 8. Gráfica de contorno del efecto de la TG y tG sobre el contenido de Fenólicos Totales (CFT) de las HMG.

Usando valores originales:

$$YCFT = -787.53694 + 51.73853TG + 1.84094tG - 0.041679TG*tG - 0.62615 TG^2 - 1.10848E-003tG^2$$

$$R^2 = 0.9237$$

c Capacidad antioxidante (AAox)

El modelo de regresión para la AAox de las harinas de moringa germinada como función de las variables independientes, explicó el 88.09% de la variación total ($p < 0.0001$) en los valores de capacidad antioxidante. Los efectos lineales de las variables independientes (Temperatura de germinación y tiempo de germinación) y el término cuadrático de temperatura fueron significativos ($p < 0.05$), dentro del área experimental evaluada. El efecto de la interacción de las variables independientes dentro del modelo, no fue significativa ($p > 0.1$). Asimismo, el efecto cuadrático del tiempo de germinación no fue significativo ($p > 0.01$) dentro del modelo. Las Figuras 9 y 10 muestran la relación entre la temperatura de germinación (TG) y el tiempo de germinación (tG) sobre la capacidad antioxidante (AAox) de las harinas de moringa germinada. En ambas figuras se observa que al incrementar el tG y a TG intermedias la AAox incrementa. Los valores de AAox variaron desde 6,280.5 hasta 11,592.8 $\mu\text{mol ET/ 100 g muestra (bs)}$. El modelo de regresión para la AAox de las harinas de moringa germinada fue del orden cuadrático y presentó las siguientes expresiones:

Usando valores codificados:

$$YAAox = 9711.94 - 514.75X_1 + 841.63X_2 - 1395.04X_1^2$$

Usando valores originales:

$$YAAox = -40885.29424 + 3127.02841TG + 7.08476tG - 49.60139TG^2$$

$$R^2 = 0.8809$$

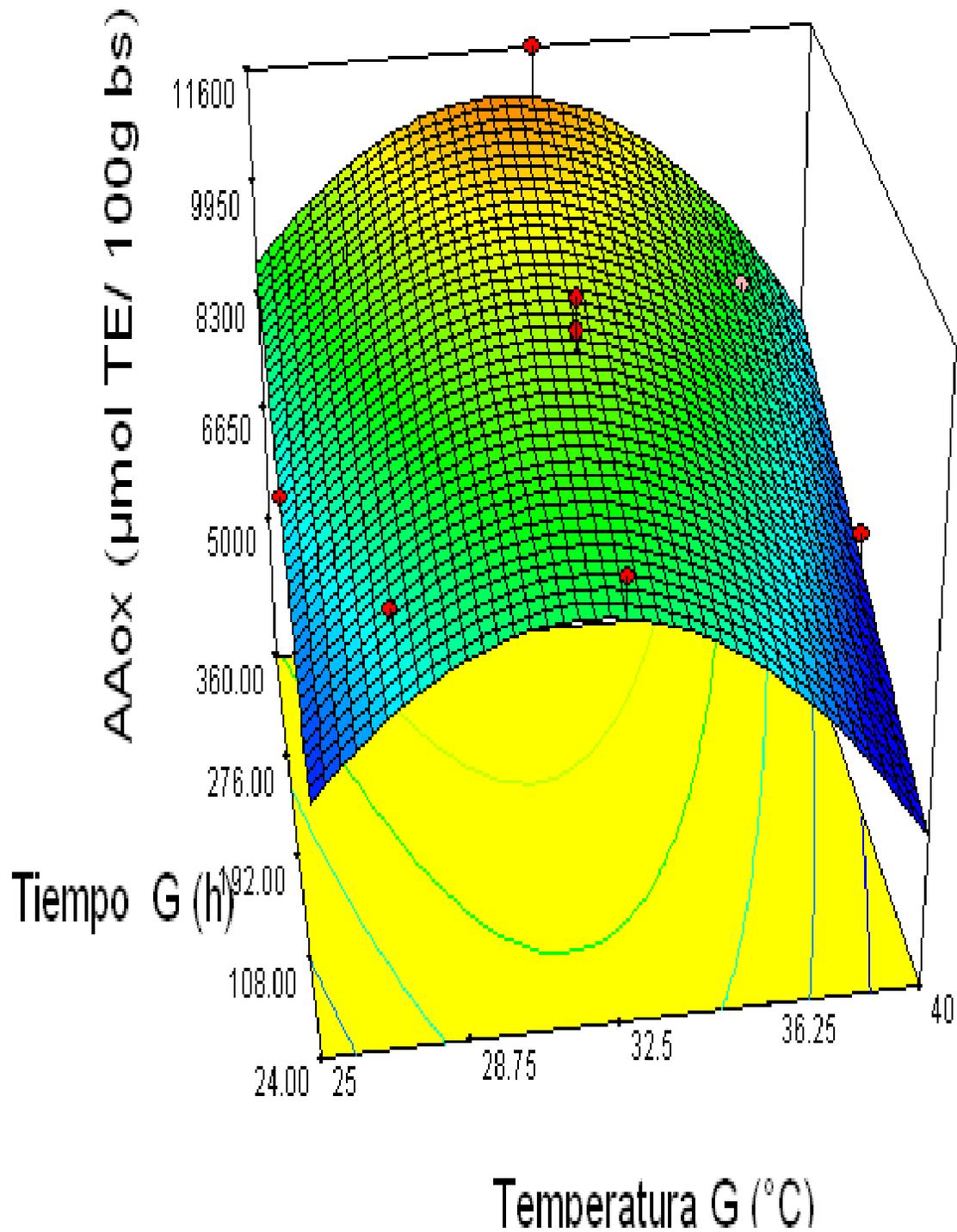


Figura 9. Superficie de respuesta del efecto de TG y tG sobre la actividad antioxidante (ORAC) de las HMG.

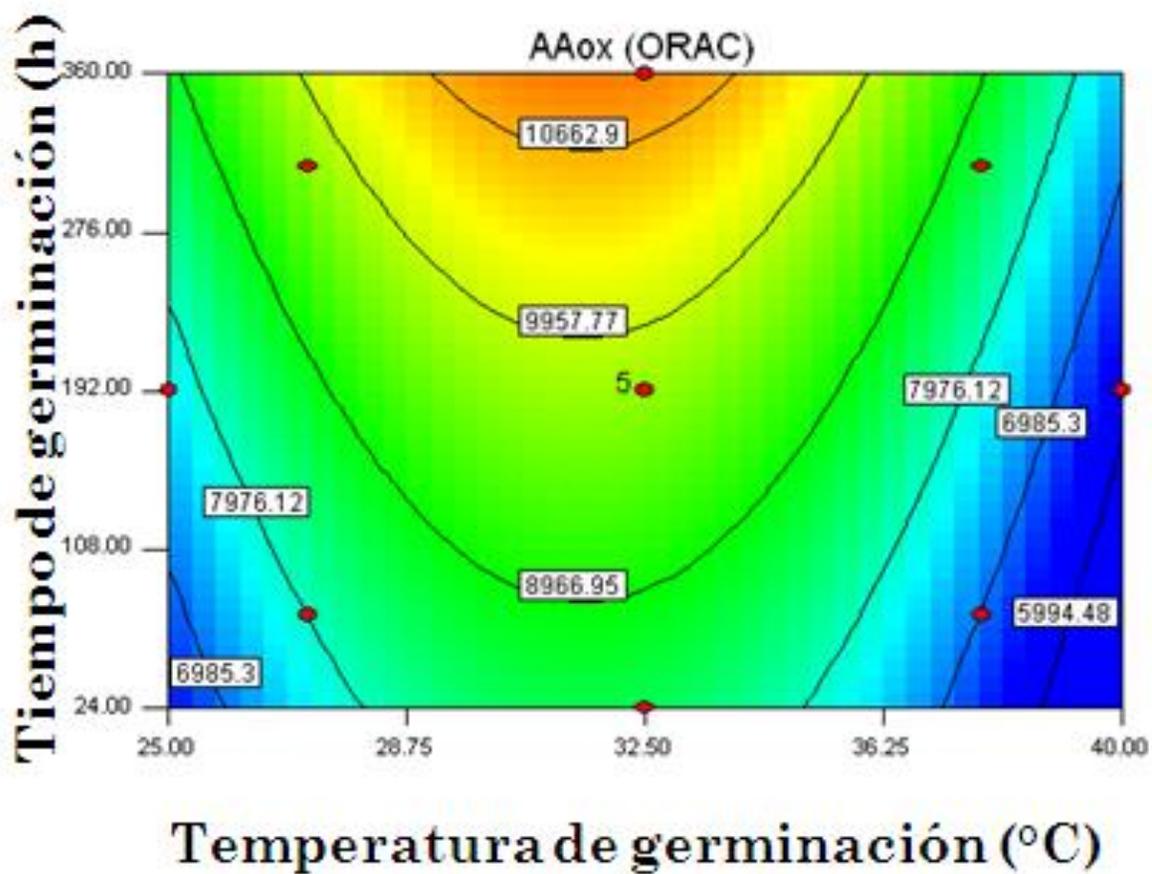


Figura 10. Gráfica de contorno del efecto de TG y tG sobre la actividad antioxidante (ORAC) de las HMG.

2 Optimización del proceso de germinación

La Figura 11 muestra el efecto de las variables del proceso temperatura de germinación (TG) y el tiempo de germinación (tG), sobre el contenido de proteínas, contenido de fenólicos totales y la actividad antioxidante de las harinas moringa germinada. La sobreposición de esas gráficas de contornos permitió la construcción de la Fig. 11 la cual se utilizó para observación y selección de la mejor combinación de las variables del proceso de germinación para la producción de harina de moringa bioprocesada optimizada. Los puntos centrales de la región de optimización en la Fig.11 para el contenido de proteína= 24.4%, contenido de fenólicos totales= 274.6mg EAG/10 b.s. y para actividad antioxidante= 10673.5 μ mol ET/100 b.s. La combinación óptima de las variables de proceso temperatura y tiempo de germinación, fueron: TG=30°C, tG=336h.

C PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS, FUNCIONALES Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE HMC Y HMGO

1 Propiedades fisicoquímicas

El valor Hunter "L" de la harina de moringa cruda fue de 55.65 ± 0.25 y se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a la harina de moringa germinada optimizada con un valor de 68.52 ± 0.30 (Cuadro 9), lo que indica un incremento en la luminosidad.

La diferencia total de color (ΔE) de la harina cruda fue de 42.74 ± 0.24 y presentó una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a la harina germinada optimizada (30.20 ± 0.29) (Cuadro 9), presentado una disminución. El ΔE nos representa la diferencia total de color con respecto a un estándar de color, valores mayores de ΔE

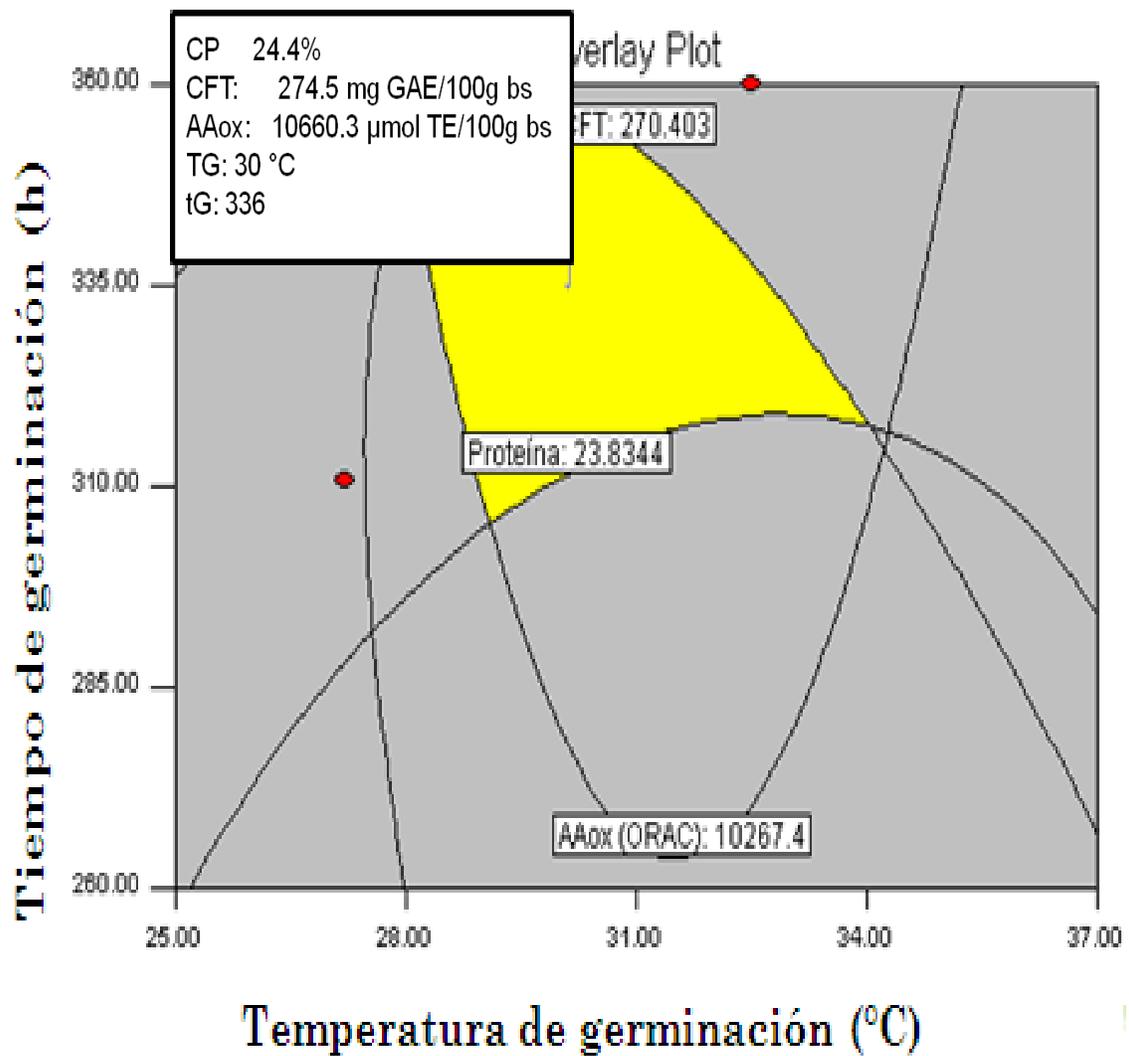


Figura 11. Región de la mejor combinación de TG y tG para la producción de HMGO.

Cuadro 9. Composición química, propiedades fisicoquímicas y funcionales de harinas de moringa cruda y germinada optimizada.

	HMC ^{1,5}	HMGO ^{2,5}
Composición química (%bs)		
Proteína	25.05 ± 0.50 ^a	24.32 ± 0.87 ^a
Lípidos	32.06 ± 0.04 ^a	17.38 ± 0.39 ^b
Minerales	3.15 ± 0.04 ^a	3.09 ± 0.05 ^a
Carbohidratos	39.74 ± 0.01 ^b	55.21 ± 0.01 ^a
Digestibilidad Proteínica in vitro (%DPIV)	72.46 ± 0.01 ^a	69.48 ± 0.12 ^b
Propiedades Fisicoquímicas³		
Color		
Hunter "L"	55.65 ± 0.25 ^b	68.52 ± 0.30 ^a
ΔE	42.74 ± 0.24 ^a	30.20 ± 0.29 ^b
a _w	0.64 ± 0.03 ^a	0.43 ± 0.02 ^b
DA(g/cm ³)	0.23 ± 0.01 ^b	0.31 ± 0.01 ^a
Propiedades Funcionales⁴		
IAA	2.61 ± 0.10 ^a	3.21 ± 0.01 ^b
ISA	15.08 ± 0.11 ^b	19.74 ± 0.04 ^a

¹HMC=Harina de Moringa Cruda

²HMGO= Harina de Moringa Germinada Optimizada

³ΔE= Diferencia total de color, a_w= Actividad acuosa,

⁴IAA= Índice de Absorción de Agua (g gel/g muestra seca), ISA=Índice de Solubilidad en Agua (g sólidos/100g de muestra seca)

⁵Las medias se separaron por filas, aplicando la prueba de rango múltiple de Duncan. Medias con la misma letra no son diferentes significativamente (p≤0.05).

significan harinas más oscuras, lo que nos indica que la harina cruda presentó una coloración más oscura que la harina germinada optimizada.

La actividad acuosa para la harina de moringa cruda y bioprocesada fue 0.64 ± 0.03 y 0.43 ± 0.02 , respectivamente (Cuadro 9), presentando un menor valor de a_w ($p < 0.05$) la harina de moringa germinada optimizada, encontrando diferencias significativas, en ambos casos podemos observar que los valores de a_w encontrados en las harinas corresponden a valores donde la actividad enzimática, el crecimiento de microorganismos y reacciones químicas se llevan a cabo muy lentamente, lo cual significa una larga vida de anaquel (Fennema 2011) y permite mantener las características deseadas de las harinas para los análisis posteriores.

La harina de moringa cruda y germinada optimizada, tuvieron valores de densidades aparentes de $0.23 \pm 0.01 \text{g/cm}^3$ y $0.31 \pm 0.01 \text{g/cm}^3$, respectivamente (Cuadro 9). Presentando una mayor densidad aparente la HMGO encontrando diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$). La densidad aparente depende del tipo de harina, del tamaño de las partículas, de la porosidad de las partículas, el volumen libre en las partículas y la humedad de las harinas (Barbosa y Yan, 2003; Subramanian y Viswanathan 2007).

2 Propiedades funcionales

En el índice de absorción en agua se observaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) teniendo valores para la harina de moringa cruda y germinada de 2.61 ± 0.10 y 3.21 ± 0.01 g de gel/g de muestra seca, respectivamente (Cuadro 9), Chinma y col (2015) encontraron un incremento en índice de absorción en agua en diversas variedades de arroz germinado con valores de 1.28 - 2.28g de gel/g de muestra seca para harina cruda y germinada respectivamente, dicho aumento en la

absorción de agua de la harina de arroz germinado lo atribuyeron a un aumento en el contenido de proteína y el cambio en la calidad de la proteína después del proceso de germinación y la descomposición de moléculas de polisacáridos; por lo tanto los sitios de interacción resultante dan una mayor capacidad de absorción de agua (Elkhalifa y col 2010).

La harina de moringa cruda y germinada optimizada, presentaron valores de índice de solubilidad en agua (ISA) de 15.08 ± 0.11 y 19.74 ± 0.04 g de sólidos /100g de muestra seca, respectivamente (Cuadro 9), encontrando diferencias estadísticas ($p < 0.05$) significativas, donde la HMGO presentó un incremento.

3 Composición química

En el Cuadro 9 se muestra la composición química y propiedades fisicoquímicas, funcionales y nutricionales de la harina de moringa cruda (HMC) y de la harina de moringa bioprocesada optimizada (HMGO). El contenido de proteína de la HMC fue de $25.05 \pm 0.50\%$ (Cuadro 9), el cual es un valor menor a lo reportado por diversos investigadores, quienes han reportado rangos de contenido de proteína de 32.2 a 38.4% (bs) (Oliveira y col 1999; Abdulkarim y col 2005; Ferreira 2008; Melo y col 2013), para semilla de moringa sin procesar y pudiera atribuirse a la zona de cultivo ya que las diversas condiciones de suelo y clima pueden tener cambios sobre su composición química.

El contenido de proteína cruda de la harina de HMGO fue de $24.32 \pm 0.87\%$ (bs) presentando un ligero decremento ($p < 0.05$) con respecto a la harina cruda ($25.05 \pm 0.50\%$), sin embargo, no se encontró diferencia estadística significativa, y de acuerdo con el diseño experimental se encuentra dentro del valor predicho a obtener.

Oluwole y col (2013) reportó valores cercanos al contenido de proteína en harina de moringa germinada (23.69 ± 0.11 %).

El contenido de lípidos en la HMC fue de 32.06 ± 0.04 % bs (Cuadro 9), Oliveira y col (1999) reportaron un contenido más alto de lípidos (41.2% bs) en harina de moringa cruda. Mientras que Abdulkarim y col (2005) reportaron un valor menor de 30.1% (bs). Oluwole y col (2013) reportó valores menores de lípidos (13.35 ± 0.03 %) en semilla cruda, este comportamiento se podría explicar debido al tipo de procesamiento que se le dio a la semilla ya que durante el proceso de extracción de la grasa de la semilla, previamente fue descascarillada y secada.

El bioproceso de germinación disminuyó el contenidos de lípidos ($p < 0.05$) aproximadamente en un 50%, encontrando un valor de 17.3 ± 0.39 % (bs) (Cuadro 9). Oluwole y col (2013) reportó valores menores de lípidos (14.62 ± 0.09 %) en harina de moringa germinada, en dicha investigación germinaron durante 96 h y posteriormente se realizó un descascarillado, así mismo, se utilizó semilla cultivada en Nigeria. Estas diferencias, podrían explicar la activación de rutas metabólicas en la semilla como fuentes de energía para iniciar el proceso de germinación (Canella y Castriotta 1982).

El contenido de cenizas de la harina de moringa cruda fue de 3.15 ± 0.04 % (bs) (Cuadro 9), Oliveira y col (1999) reportaron un contenido de cenizas de 4.43% (bs) en harina de moringa cruda mientras que, Abdulkarim y col (2005) obtuvieron un valor de 4.5% (bs), valores mayores a los encontrados en nuestras semillas crudas. Dichas diferencias podrían explicarse por el tipo de suelo donde fueron sembradas las semillas.

La harina de moringa germinada optimizada presentó un ligero decremento ($p < 0.05$) en el contenido de cenizas con un valor de $3.09 \pm 0.05\%$ (bs) (Cuadro 9) con respecto a la harina sin procesar, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas significativas con respecto a la harina sin procesar. Oluwole y col (2013) reportó valores mayores en cenizas ($4.50 \pm 0.04\%$) en harina de moringa germinada. Donkor y col (2012) concluyeron que el contenido de cenizas en diversos tipos de granos germinados no cambia con respecto a los granos sin germinar.

El contenido de carbohidratos en la harina cruda de moringa fue de $39.74 \pm 0.01\%$ bs (Cuadro 9). Oliveira y col (1999) reportaron un contenido de carbohidratos de 21.12% (bs), y Abdulkarim y col (2005) un valor de 16.5% , dichas diferencias pudieran deberse a la región donde fueron cultivadas.

La harina de moringa germinada optimizada presentó un incremento ($p < 0.05$) significativo, con un valor de $55.21 \pm 0.01\%$ (bs) (Cuadro 9), mayor que el valor encontrado en harina cruda, tal incremento se puede deber a las reacciones de biosíntesis llevadas a cabo durante el proceso de germinación. Oluwole y col (2013) reportó valores similares en el contenido de carbohidratos ($53.00 \pm 0.16\%$) en harina de moringa germinada.

En harina de moringa cruda se encontró un valor de digestibilidad proteínica *in vitro* de $72.46 \pm 0.01\%$ bs, encontrando diferencias significativas con respecto a la harina de moringa germinada optimizada la cual presentó una disminución ($p < 0.05$) con un valor de $69.48 \pm 0.12\%$ (Cuadro 9). Rojas y col (2010) encontraron un comportamiento similar en la digestibilidad de proteína en semillas de amaranto de un 79.22% en semillas sin germinar y un 72.60% en semillas con 3 días de germinación.

a Perfil de ácidos grasos en HMC Y HMGO

En el Cuadro 10 se muestra el perfil de ácidos grasos realizado por GC-MS mostro diferencias significativas entre los compuestos en harina de moringa cruda y harina de moringa germinada optimizada, encontrando el Ác. Oleico en mayor proporción en HMC con un 78.29%, mientras que en HMGO hubo una reducción de este ácido con un valor de 5.23%; se encontró en mayor proporción el ácido oleico anhídrido en HMGO con un valor de 83.43%, lo cual indica la transformación de compuestos lipídicos durante el proceso de germinación.

Sánchez y col (2015), reportaron un estudio del perfil de ácidos grasos de aceite de semillas de moringa cruda, teniendo en mayor concentración el ác. Oleico con un valor de 71.09 %.

En un estudio en cambios sobre la composición de lípidos durante la germinación de diferentes variedades de canola realizado por Dawood y col (2013), encontraron que el metabolismo de ácidos grasos durante la germinación varía entre las diferentes especies de plantas e incluso los cambios de la misma especie, en la variedad Sero 113, que presenta un mayor contenido de ácido erúcico, mostraron un decremento de ácidos grasos insaturados, mientras que se incrementaron los ácidos saturados.

Dichos cambios concuerdan con lo reportado en la literatura ya que la descomposición de lípidos desempeña un papel importante en el ciclo de vida de muchas plantas, proporcionando el esqueleto de carbono que soporta el crecimiento para la germinación. Este proceso metabólico es iniciado por lipasas que catalizan la hidrólisis de triacilglicéridos para liberar gliceroles y ácidos grasos libres (Quettier y Eastmond 2009).

Cuadro10. Contenido de lípidos en harina de moringa cruda.

Ác. Grasos	HMC^a	HMGO^b
	%	%
Ác. Palmitico	6.50	ND
Ác. Metilpalmitato	1.20	3.50
Ác. Estearico	6.13	ND
Ác. Oleico	78.29	5.23
Ác. Oleico Anhidrido	ND	83.43
Ác. Linoleico	1.23	ND
Ác. Eicosanoico	2.51	ND
Ác. Palmitoleico	ND	2.54
Ác. Behenico	2.14	ND

^aHMC: Harina de moringa cruda

^bHMGO: Harina de moringa germinada optimizada

b Fitoquímicos

1) Taninos condensados

En cuanto al contenido de taninos condensados (Cuadro 11), se encontraron valores de 494.69 ± 23.10 y 114.92 ± 7.07 mg de catequina/100g b.s. para harina de moringa cruda y harina de moringa germinada optimizada, respectivamente, teniendo diferencias estadísticas ($p < 0.05$) significativas con una disminución en la harina de moringa germinada optimizada. Oluwole y col (2013), reportaron valores de 241.67 ± 1.67 mg/100g para harina cruda y 181.67 ± 1.67 mg/100g para harina de moringa germinada, encontrando también una disminución en el contenido de taninos.

2) Saponinas

En el Cuadro 11 se muestran los resultados obtenidos para el contenido de saponinas en harina cruda se obtuvo un valor de 374.98 ± 28.38 mg equivalentes de diosgenina/100g b.s., en harina de moringa germinada optimizada se encontraron diferencias significativas presentando un incremento con respecto a la harina cruda ($p < 0.05$), teniendo un valor de 681.49 ± 10.88 mg equivalentes de diosgenina/100g b.s. En el estudio comparativo realizado por Oluwole y col (2013), reportaron una ligera disminución en el contenido de saponinas con valores de 9.83 ± 0.17 y 8.00 ± 0.29 mg/100g para harina cruda y germinada de moringa respectivamente, teniendo valores mucho menores a los reportados en el presente estudio, dichas diferencias se pueden deber principalmente al método utilizado en la cuantificación de saponinas, y el proceso de germinación ya que utilizaron 4 días a 30°C .

Cuadro 11. Compuestos fitoquímicos de harina de moringa cruda y germinada

Compuestos fitoquímicos	HMC^{1,7}	HMGO^{2,7}
<i>Taninos condensados</i>³	494.69 ± 23.10 ^a	114.92 ± 7.07 ^b
<i>Saponinas</i>⁴	374.98 ± 28.38 ^b	681.49 ± 10.88 ^a
<i>Ac. Fitico</i>⁵	1062.06 ± 5.81 ^a	841.69 ± 2.62 ^b
<i>Inhibidores de tripsina</i>⁶	18.23 ± 0.05 ^a	4.80 ± 0.01 ^b

¹HMC=Harina de Moringa Cruda

²HMGO= Harina de Moringa Germinada Optimizada

³ mg equivalentes de catequina/100g b.s.

⁴ mg equivalentes de diosgenina/100g b.s.

⁵ mg equivalentes de ac. fitico/100g b.s.

⁶ Unidades inhibidoras de tripsina (UIT)/mg de muestra

⁷Las medias se separaron por filas, aplicando la prueba de rango múltiple de Duncan.

Medias con la misma letra no son diferentes ($p \leq 0.05$).

3) Inhibidores de tripsina

En el presente estudio se encontraron diferencias significativas en cuanto al contenido de inhibidores de tripsina en la harina de moringa germinada optimizada ($p < 0.05$) Cuadro 11, con un valor de 18.23 ± 0.05 y 4.80 ± 0.01 unidades inhibidoras de tripsina (UIT), para harina cruda y germinada optimizada respectivamente. Sweta y col (2014), reportaron una disminución en inhibidores de tripsina en la germinación de soja, con valores de 53.73 UIT/mg b.s. para harina cruda y 28.35 UIT/mg b.s. para harina germinada, ellos coincidieron con lo reportado por Mubarak (2005) quien reportó que dichas disminuciones se podrían atribuir a los procesos de descascarillado y remojo durante el proceso de germinación.

4) Ácido fitico

La harina cruda de moringa germinada presentó una disminución en el contenido de ácido fitico con respecto a la harina de moringa bioprocesada optimizada encontrando diferencias significativas ($p < 0.05$) (Cuadro 11), con valores de 1062.06 ± 5.81 y 841.69 ± 2.62 mg equivalentes de ac. fítico respectivamente, Oluwole y col (2013) también encontraron disminución en el contenido de fitatos en la harina de moringa germinada con respecto a la harina cruda con valores de 78.33 y 40.00 mg/100, respectivamente, sus resultados los basaron tomando en cuenta una relación molecular 4:6 de hierro/fósforo. Albarracín y col (2013) reportaron disminución en el contenido de ácido fítico en germinados de arroz, y deducen que dichos cambios podrían deberse a la lixiviación de estos compuestos durante el proceso de remojo y a la actividad endógena de fitasa durante la germinación causada por el miositol y ac. fosfórico producida para el crecimiento de la plántula.

5) Compuestos fenólicos totales

1) Método colorimétrico

En el Cuadro 12 se muestra el contenido de fenólicos totales de la harina de moringa cruda y de la harina de moringa germinada optimizada. El contenido de fenólicos totales de la harina de moringa cruda fue de 209.64 mg EAG/100g muestra (bs) y para harina de moringa germinada optimizada se encontró un valor de 271.67mg EAG/100g muestra (bs).

En harina cruda se encontró que el mayor contenido de fenólicos totales fué de la fracción ligada con un valor de 170.90 ± 2.96 mg EAG/100g muestra (bs) mientras que en la fracción libre presentó un valor de 38.74 ± 2.78 mg EAG/100g muestra (bs). Govardhan y col (2013), también encontraron el mismo comportamiento donde, el mayor contenido de fenólicos totales se encontró en la fracción ligada, reportando valores para extractos libres y ligados en harina cruda de moringa desgrasada de 780 y 4173 mg EAG/100g muestra (bs) respectivamente.

El proceso de germinación presentó un incremento con diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en el contenido de fenólicos totales, teniendo una mayor contribución los compuestos fenólicos libres con 158.22 ± 10.98 mg EAG/100g muestra (bs), mientras que en la fracción ligada se encontró un contenido de fenólicos totales de 113.35 ± 10.90 mg EAG/100g muestra (bs). Chinma y col (2015), reportaron incrementos en el contenido de fenólicos totales en diferentes variedades de arroz germinado con respecto al crudo; dichos cambios podrían explicarse por la biosíntesis de compuestos fenólicos que se llevan a cabo durante el proceso de germinación (He y col 2011).

Cuadro 12. Contenido de fenólicos totales y actividad antioxidante en harina de moringa cruda y germinada.

Contenido de Fenólicos totales y Actividad Antioxidante (ORAC)		
Contenido de Fenólicos (CFT)³	HMC^{1,5}	HMGO^{2,5}
Extractos libres	38.74 ± 2.78 ^b	158.22 ± 10.98 ^a
Extractos ligados	170.90 ± 2.96 ^a	113.45 ± 10.90 ^b
Fenólicos Totales	209.64 ^b	271.67 ^a
AAox (ORAC)⁴		
Extractos libres	2695.88 ± 53.16 ^b	5397.81 ± 149.22 ^a
Extractos ligados	6063.76 ± 309.86 ^a	5574.38 ± 514.27 ^a
Total	8759.64 ^b	10972.19 ^a

¹HMC=Harina de Moringa Cruda

²HMGO= Harina de Moringa Germinada Optimizada

³CFT (mg EAG/100g muestra base seca)

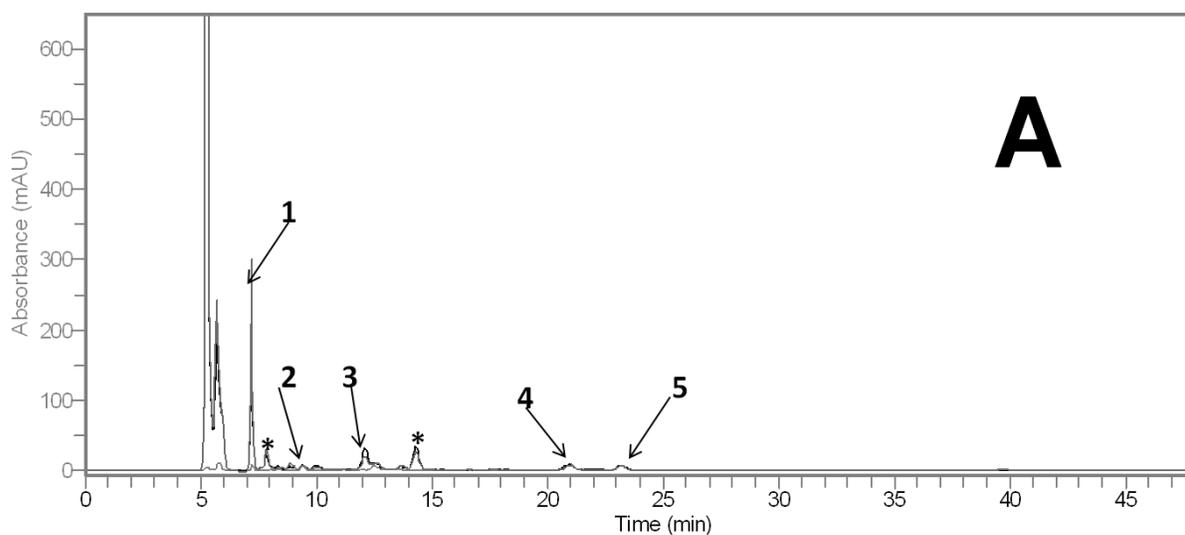
⁴AAox= Actividad antioxidante (µmol ET/100g muestra base seca)

⁵Las medias se separaron por filas, aplicando la prueba de rango múltiple de Duncan.

Medias con la misma letra no son diferentes (p≤0.05)

2) Análisis de ácidos fenólicos por HPLC de la harina de moringa cruda y germinada optimizada

En el presente estudio se pudo observar que la harina de moringa cruda en el perfil de compuestos fenólicos por HPLC (Figura 12 y 13), se pudieron identificar los siguientes compuestos para fitoquímicos libres (Figura 12,A): Ac. Gálico, Catequina, Ac. Parahidroxibenzoico, Ac. Cúmarico y Ac. Sinápico; mientras que en la harina de moringa germinada optimizada en los extractos libres se encontraron los siguientes (Fig 12,B): Ac. Gálico, Ac. Parahidroxibenzoico y Ac. Sinápico; mientras que en la HMGO pudiendo observar incrementos en las señales de los cromatogramas de éstos compuestos fenólicos. Ghovardhan y col 2013, identificaron diversos compuestos fenólicos en harina de moringa cruda desgrasada por la metodología de HPLC, en extractos libres se encontraron en mayor proporción Ac. Gálico, Epicatequina y Ac. Cafeico, y en los fitoquímicos ligados Catequina y Epicatequina. En los extractos ligados se pudieron identificar los siguientes para HMC (Figura 13, A): Ac. Gálico, Ac. Parahidroxibenzoico, Ac. Cúmarico y Ac. Ferúlico; y en HMGO se identificaron (Figura 13, B) los mismos compuestos pudiendo observar señales menores con respecto a la harina de moringa cruda. También se observó la presencia de dos señales no identificadas tanto en HMC como en HMGO, pero en HMGO estas señales fueron menos intensas que las de HMC. Esto nos sugiere realizar análisis posteriores para la cuantificación de los compuestos fenólicos presentes, así como análisis de masas y/o resonancia magnética nuclear para la identificación de los fitoquímicos presentes en las muestras.



Moringa Libre Optimo Replica : 320:10:400:10 : 1

Moringa Libre Optimo Replica : 320:10:400:10 : 1

Moringa Libre Optimo Replica : 320:10:400:10 : 1

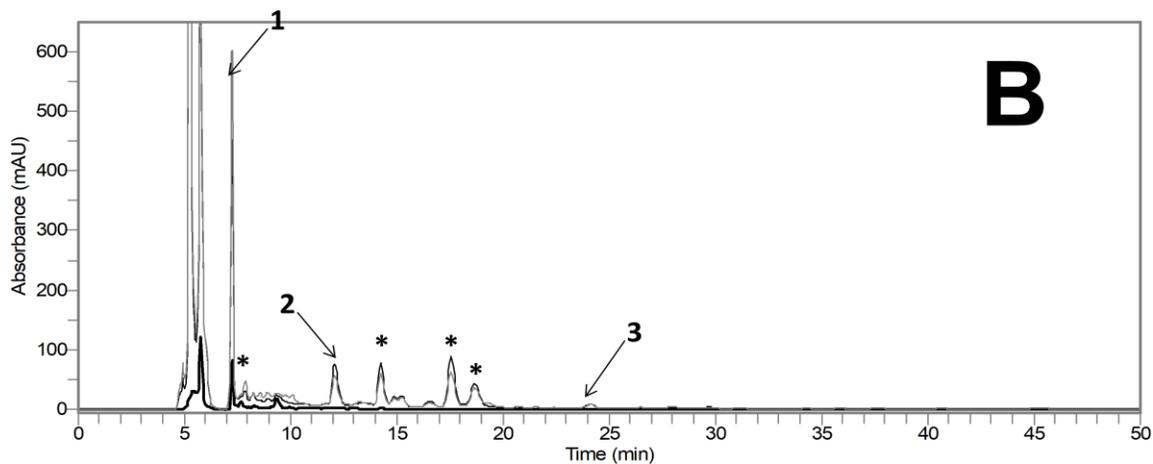
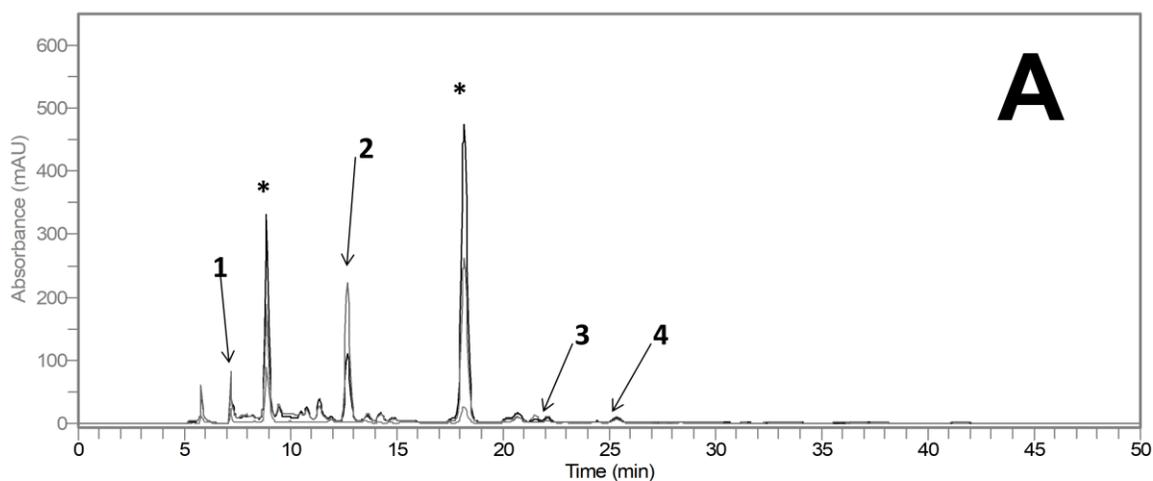


Figura 12. Cromatograma de HPLC de extractos libres de HMC y HMGO. **(A)** Fitoquímicos libres en HMC: 1, Ac. gálico; 2, Catequina; 3, Ac. p-hidroxibenzoico; 4, Ac. cumárico; 5, Ac. sinápico. **(B)** Fitoquímicos libres en HMGO: 1, Ac. gálico; 2, Ac. p-hidroxibenzoico; 3, Ac. sinápico. *No identificado.

Crudo Ligado Replica : 320:10:400:10 : 1

Crudo Ligado Replica : 320:10:400:10 : 1

Crudo Ligado Replica : 320:10:400:10 : 1



Moringa Ligado Optimo Replica : 320:10:400:10 : 1

Moringa Ligado Optimo Replica : 320:10:400:10 : 1

Moringa Ligado Optimo Replica : 320:10:400:10 : 1

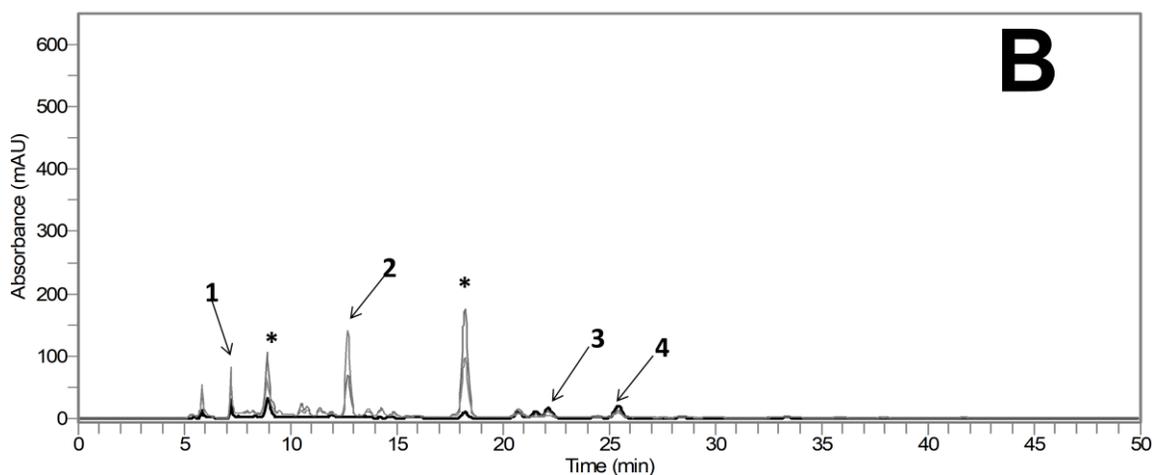


Figura 13. Cromatograma de HPLC de extractos ligados de HMC y HMGO. **(A)** Fitoquímicos ligados en HMC: 1, Ac. gálico; 2, Ac. p-hidroxibenzoico; 3, Ac. cumárico; 4, Ac. ferúlico. **(B)** Fitoquímicos ligados en HMGO: 1, Ac. gálico; 2, Ac. p-hidroxibenzoico; 3, Ac. cúmarico; 4, Ac. ferúlico. *No identificado.

D ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN HMC Y HMGO

1 ORAC

La actividad antioxidante hidrofílica total (AAox) por la metodología de ORAC (suma de actividades antioxidantes hidrofílicas de fitoquímicos libres y ligados) de harina de moringa cruda y germinada optimizada fue de 8 759.64 y 10 972.19 $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$ muestra (bs) respectivamente (Cuadro 12).

El proceso de germinación mostró un incremento ($p < 0.05$) en la actividad antioxidante con diferencias estadísticas significativas.

En los fitoquímicos libres y ligados de la harina de moringa cruda, se encontraron valores de 2695.88 ± 53.16 y 6063.76 ± 309.86 $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$ muestra (bs), respectivamente, presentando un mayor contenido la fracción ligada.

En la harina de moringa germinada optimizada se encontró que el contenido de fitoquímicos libres incrementó con respecto al que se observó en harina cruda con un valor de 5397.81 ± 149.22 $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$ muestra (bs), y el contenido de fitoquímicos ligados fue de 5574.38 ± 514.27 $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$ muestra (bs), encontrando una mayor actividad antioxidante en los extractos ligados.

El incremento de la actividad antioxidante durante la germinación podría deberse principalmente a un aumento en la actividad hidrolítica endógena de la enzimas (Chavan y Kadam 1989). Tal como una mayor acumulación de compuestos fenólicos con actividad de eliminación de radicales peroxilo (Andriantsitohaina y col 2012). Sin embargo, en esta investigación la actividad antioxidante evaluada por el ensayo ORAC no mostró una correlación lineal significativa con el contenido de fenólicos totales en el bioproceso de germinación de las harinas de moringa ($p \leq 0,05$), lo que puede sugerir la presencia de otros compuestos con actividad antioxidante como

pequeños péptidos de peso molecular generados durante la germinación mediante la proteólisis de las proteínas de almacenamiento.

XIII CONCLUSIONES

- 1 Las características físicas de la semilla de Moringa (*M. oleifera*) presentan densidad baja, teniendo esta semilla una ocupación de gran volumen durante su almacenamiento y transporte.
- 2 La mejor combinación de temperatura (TG) y tiempo de germinación (tG) para obtener una harina de moringa germinada optimizada, con valor nutricional y nutracéutico alto fueron TG=30°C y tG=336 h.
- 3 El proceso de germinación no mostró diferencias estadísticas significativas en el contenido de proteína (25.05 y 24.32 %) mientras que el contenido de lípidos disminuyó cuando fueron comparados con la HMC.
- 4 La HMGO disminuyó la DPIV e incrementó la densidad aparente, IAA e ISA cuando se compararon con la HMC.
- 5 La HMGO presentó disminución en contenido de taninos condensados, ácido fítico e inhibidores de tripsina, y se observó incremento en contenido de saponinas con respecto a la harina de moringa sin procesar. Asimismo, el contenido de compuestos fenólicos totales incrementó de 209.64 a 271.67 mg EAG/100g bs en HMGO.
- 6 EL proceso de germinación incrementa la actividad antioxidante. LA HMGO incrementó de 8 759.64 a 10 972.19 $\mu\text{mol ET/ 100g bs}$. Sin embargo, no se observó correlación lineal entre el contenido de fenólicos totales y actividad antioxidante.
- 7 El proceso de germinación modificó el perfil de ácidos grasos. En HMGO presentó disminución de ácido oleico (5%), pero ácido oleico anhídrido tuvo

proporción mayor (83.43%). Además no se detectó la presencia de ácidos béhenico, esteárico y linoleico

IX BIBLIOGRAFÍA

- AACC. 1995.** Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. St. 9°ed. St. Paul, MN, EUA.
- Abdulkarim SM, Long K, Lai OM, Muhammad SK, Ghazali HM. 2005.** Some physico-chemical properties of *Moringa oleifera* seed oil extracted using solvent and aqueous enzymatic methods. Food Chemistry 93(2):253–263.
- Adom KK, Sorrells ME, Liu RH. 2002.** Phytochemical profiles and antioxidant activity of wheat varieties. Journal of Agriculture and Food Chemistry 51:7825-7834.
- Andriantsitohaina R, Auger C, Chataigneau T, Étienne-Selloum N, Li H, Martínez M, Schini-Kerth V, Laher I. 2012.** Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. Journal Nutrition 108(9):1532-1549.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. 1993.** Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of aging. Proceedings of National Academy of Sciences USA 90:7915-7922.
- Anderson RA, Conway HF, Pfeifer VF, Griffin EL. 1969.** Gelatinization of corn grits by rool and extrusion cooking. Cereal Sciece Today 14:4-12.
- Andlauer W, Furst P. 2002.** Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. Food Research International 35:171-176.
- Anwar F, Ashraf M, Bhangar M. 2005.** Interprovenance variation in the composition of *Moringa oleifera* oil seeds from Pakistan. Journal of the American Oil Chemists Society 82:45–51.

- Anwar F, Nahid S, Rashid U. 2006.** Characterization of moringa oleifera seed oil from drought and irrigated regions of Punjab, Pakistan. *Grasas y Aceites* 57(2):160–168.
- AOAC. 1999.** Official Methods of Analysis. 16th ed. Association of Analyst Chemists. Gaithersburg, MD, USA. Cap. 4, 25; cap. 12, 7; cap. 32, 1-2; cap. 45, 59-60.
- Aphalo P, Martínez E, Añon M. 2009.** Structural Modifications of Amaranth Proteins During Germination. *The Protein Journal* 28:131-138.
- Arena E, Fallico B, Maccarone E. 2001.** Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. *Food Chemistry* 74: 423-427.
- Ashwell M. 2002.** Conceptos sobre los alimentos funcionales. ILSI - Internacional Life Science Institute, Brussels.
- Aviara NA, Power PP, Abbas T. 2013.** Moisture-dependent physical properties of *Moringa oleifera* seed relevant in bulk handling and mechanical processing. *Industrial Crops and Products* 42: 96– 104.
- Barbosa C, Yan H. 2003.** Poder characteristics of preprocessed cereal flours; “Characterization of Cereals and Flours: Properties, Analysis and Applications”. Kaletunc G y Breslauer KJ. (Eds). Marcel Dekker, Inc. New York, NY, EUA 173-186.
- Bau H, Villaume C, Nicolas J, Mejean L. 1997.** Effect of germination on the chemical composition, biochemical constituents and antinutritional factors of soya bean (*Glycine max*) seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 73:1-9.

- Becker K. 1995.** Studies on utilization of *Moringa oleifera* leaves as animal feed. Stuttgart, Germany: University of Hohenheim 15.
- Bennett RN, Mellon FA, Foidl N, Pratt JH, DuPont MS, Perkins L, Kroon PA. 2003.** Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose trees *Moringa oleifera* L. (Horseradish tree) and *Moringa stenopetala* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 3546-3553.
- Bethke PC, Libourel IG, Jones RL. 2007a.** Nitric oxide in seed dormancy and germination, in: K.J. Bradford, H. Nonogaki (Eds.), Seed Development, Dormancy and Germination, Blackwell Publishing, Oxford 153–175.
- Bethke PC, Libourel IG, Aoyama N, Chung YY, Still DW, Jones RL. 2007b.** The Arabidopsis aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. Plant Physiology 143:1173–1188.
- Bewley JD, Black M. 1994.** Seeds: Physiology of Development and Germination, 2nd edition, Plenum Press, New York 445.
- Block G, Patterson B, Subar A. 1992.** Fruits, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. Nutrition and Cancer 18:1-29.
- Borges TE, Barbieri CM, Neves VA, Apareci SM, Arantes PL, 2014.** Review Chemical characteristics and fractionation of proteins from *Moringa oleifera* Lam. Leaves. Food Chemistry 147: 51–54.
- Bourdinchon F, Casaregola S, Farrokh C, Frisvad J, Gerds M, Laulunds, Ouwehand A, Powell I, Prajapati J, Seto Y, Schure E, Bove A, Vankerckhoven V, Zgoda A, Tuijtelaars S, Hansen E. 2012.** A review: Food

- fermentation: Microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology* 154: 87-97.
- Bressani R, Harper J, Whickstrom B. 1984.** Processed and Packaged weaning foods: Development, manufacture and marketing. Improving the nutritional status Cambridge, MA, EUA 51-64.
- Broin M, Santaella C, Cuine S, Kokou K, Peltier G, Joet T. 2002.** Flocculent activity of a recombinant protein from *Moringa oleifera Lam.* seeds. *Appl Microbiology Biotechnology* 60: 114–119.
- Burton G, Jauniaux M. 2011.** Oxidative stress. *Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 25:287–299.
- Byers T, Guerrero N. 1995.** Epidemiological evidence of vitamin C and vitamin E in cancer prevention. *American Journal of Clinical Nutrition* 62:1385-1392.
- Caceres P, Martinez V, Amigo L, Frias J. 2014.** Maximizing the phytochemical content and antioxidant activity of Ecuadorian brown rice sprouts through optimal germination conditions. *Food Chemistry* 152: 407–414.
- Cameán A., Repetto. 2006.** *Toxicología Alimentaria.* Universidad de Sevilla. 245-247.
- Canella M, Castriotta G. 1982.** Protein and oil composition of germinated sunflower seeds. *Lebensm Wiss. University Technological* 15 (1): 15-18.
- Cao G, Verdon C, Wu A, Wang H, Prior R. 1995.** Automated oxygen radical absorbance capacity assay using the COBAS FARA II. *Clinical Chemistry* 41:1738-1744.

- Cao G, Booth S, Sadowski J, Prior R. 1998.** Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *American Journal Clinical Nutrition* 68:1081.
- Caragay AB. 1992.** Cancer-Preventive foods and ingredients. *Food Technology* 46 (4): 65-68.
- Cardador M., CastañoT, Loarca P. 2002.** Antimutagenic activity of natural phenolic compounds present in common bean (*Phaseolus vulgaris*) against aflatoxin B1. *Food Additives Contaminants*. 19:62-69.
- Casey TJ. 1997.** *Unit Treatment Processes in Water and Wastewater Engineering*. John Wiley & Sons: London.
- Charoensin S. 2014.** Antioxidant and anticancer activities of *Moringa oleifera* leaves. *Journal of Medicinal Plant Research* 8(7): 318-325.
- Chavan JK, Kadam SS, Salunkhe DK. 1989.** Chickpea. *CRC Handbook of World Food Legumes. Nutritional Chemistry, Processing Technology and Utilization I*: 247-288.
- Cheryan M, Rackis J. 1980.** Phytic acid interactions in Food systems. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 13 (4): 297-335.
- Chinma CE, Anuonye JC, Simon OC, Ohiare RO, Danbaba N. 2015.** Effect of germination on the physicochemical and antioxidant characteristics of rice flour from three rice varieties from Nigeria. *Food Chemistry* 185: 454–458
- Cook N, Samman S. 1996.** Flavonoids chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry* 7: 66-76.

- Corrêa AD, Santos SR, Abreu CM, Jokl L, Santos CD. 2004.** Remoção de polifenóis da farinha de folhas de mandioca. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 24(2): 159–164.
- Dawood MG, Sadak MS, Reyad BY, El-Sayed AS, El-Gayar SH. 2013.** Changes in Chemical Composition during Germination of Some Canola Varieties Changes in oil content and fatty acid Composition. *Scientia Agriculturae* 2(3):77-82.
- Dhakar RC, Maurya SD, Pooniya BK, Bairwa N, and Sanwormal MG. 2011.** Moringa: the herbal gold to combat malnutrition. *Chronicles of Young Scientists* 2(3):119-125.
- Dillard CJ, Bruce G. 2000.** Phytochemicals: nutraceuticals and human Health. A review *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:1744-1756.
- Dolly J, Prashant K, Shikha M, Sanjukta C, Surekha S, Devendra K, Gaurav S, Bechan S, Shahidul K, Geeta W. 2013.** Role of *Moringa oleifera* in regulation of diabetes-induced oxidative stress. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 6(6):426–432.
- Donkor O, Stojanovska L, Ginn P, Ashton J, Vasiljevic T. 2012.** Germinated grains – Sources of bioactive compounds. *Food Chemistry* 135: 950–959.
- Donne D, Rossi R, Giustarini D. 2003.** Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 329: 23–38.
- Duffus CM, Slaughter JC. 1980.** Seeds and their uses. John Wiley and Sons. New York, NY. 1-154.
- Duke JA, Atchley AA. 1984.** Proximate analysis. In B. R. Christie (Ed.), *The Handbook of plant science in agriculture*. Boca Raton, FL: CRC Press.

- Eilert U, Wolters B, Narsdtedt A. 1981.** The antibiotic principle of seeds of *Moringa oleifera* and *Moringa stenopetala*. *Planta Medica Journal* 42(1):55-61.
- Elkhalifa E, Abd O, Bernhardt R. 2010.** Influence of grain germination on functional properties of sorghum flour. *Food Chemistry* 12(1): 387–392.
- Elliott, JG. 1999.** Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Technology* 53: 46-48.
- Elmalik M, Klopfenstein C, Hoseney R, Bates L. 1986.** Effects of germination on the nutritional quality of sorghum grain with contrasting kernel characteristics. *Nutrition Reports International* 34:941.
- Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P. 2001.** The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56(1): 5-51.
- Fahey JW. 2005.** *Moringa oleifera*: A Review of the Medical Evidence for Its Nutritional, Therapeutic, and Prophylactic Properties. Part 1. *Trees for Life Journal a forum on beneficial trees and plants*.
- FAO/WHO/UNU. 1985.** World Health Organization. Energy and protein requirements. Report of a Joint Expert Consultation Meeting Series, n.724, Geneva, Switzerland.
- Fellows PJ. 2000.** *Food processing technology: Principles and practice*. 2a ed. Woodhead, Cambridge, RU.
- Ferreira PM, Farias DF, Oliveira JT, Carvalho AF. 2008.** *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritional potential. *Revista de Nutrição Campinas* 21:431-437.

- Fincher GB. 1989.** Molecular and celular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: 305-346.
- Foidl N, Makkar H, Becker K. 2001.** The Potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses. In *Proceedings of the 1th Workshop what development potential for moringa products*. Dar es Salaam, Tanzania.
- Fuglie LJ. 2000.** New Uses of *Moringa* Studied in Nicaragua. *ECHO Development Notes* No.68.
- Fuglie LJ. 2001.** The miracle tree: The multiple attributes of moringa. Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation, Wageningen/ Church World Service, New York. 172.
- García RM. 2003.** Producción de semillas forestales de especies forrajeras enfatizados en sistemas silvopastoriles. INAFOR. 37 p. [En línea]. <http://biblioteca.catie.ac.cr:5050/repositorioforestal/bitstream/123456789/6628/1/produccion%20de%20semillas%20inafor.pdf>. [Consultado en Agosto de 2015].
- Gee JM, Price KR, Ridout CL, Wortley GM, Hurrell RF. 1993.** Saponins of quinoa (*Chenopodium quinoa*): Effects of processing on their abundance in quinoa products and their biological effects on intestinal mucosal tissue. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 63: 201-209.
- Govardhan SR, Negi PS, Radha C. 2013.** Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of free and bound phenolic extracts of *Moringa oleifera* seed flour. *Journal of functional foods* 5:1883 –1891.

- Gong X, Bassel GW, Wang A, Greenwood JS, Bewley JD. 2005.** The emergence of embryos from hard seeds is related to the structure of the cell walls of the micropylar endosperm, and not to endo-mannanase activity, *Annals of Botany* 96:1165–1173.
- González CJ, Arroyo TI, Borondanenko A, Carballo MC. 2005.** Efecto de la Época de Cosecha en las Características Físicas, Químicas y Funcionales del Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Guanajuato.Gto. 95-102.
- González MN, Morera PJ. 2001.** Oxidación celular y fármacos mucoactivos antioxidantes. *Arch Bronconeumol* 37: 407 –410.
- Gray J. 2006.** Fibra dietética. Definición, análisis, fisiología y salud. *International Life Science Institute Europe* 5-24.
- Guevara AP, Vargas C, Sakurai H, Fujiwara Y, Hashimoto K. 1999.** An antitumor promoter from *Moringa oleifera Lam.* *Mutation Research* 440: 181–188.
- Halliwell B, Gutteridge J. 1999.** Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford: Oxford Science Publications.
- He D, Han C, Yao J, Shen S, Yang P. 2011.** Constructing the metabolic and regulatory pathways in germinating rice seeds through proteomic approach. *Proteomics* 11: 2693.
- Hourmant A, Pradet A. 1981.** Oxidative phosphorylation in germinating lettuce seeds (*Lactuca sativa*) during the first hours of imbibition, *Plant Physiology* 68:631–635.

- Huang D, Ou B, Prior R. 2005.** Reviews: The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(6):1841-1856.
- Hsu HW, Vavak DL, Satterlee LD, Miller GA. 1977.** A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *Journal of Food Science* 42(5): 1269–1273.
- ILSI.1999.**http://www.ilsis.org.ar/biblioteca/ILSI_Europa_Monografias/ILSICMFuncFoods
- Katre UV, Suresh CG, Khan MI, Gaikwad SM. 2008.** Structure–activity relationship of a hemagglutinin from *Moringa oleifera* seeds. *International Journal of Biological Macromolecules* 42: 203-207.
- Kaur C, Kappor H. 2001.** Antioxidants in fruits and vegetables, the millenniums health. *International Journal of Food Science and Technology* 36:703-725.
- Kennedy RA, Rumpho ME, Fox TC, 1992.** Anaerobic metabolism in plants, *Plant Physiology* 100:1–6.
- Kermode AR. 1990.** Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Critical Reviews in Plant Science* 9: 155-195.
- Khuri AA, Cornel JA. 1987.** *Response Surfaces: Design and Analyses*. New York, NY, USA: Marcel Dekker Inc. 1-17, 254.
- King J. 1991.** *The Genetic Basis of the Plant Physiological Processes*. Oxford University Press. USA 347-393.
- Knekt P, Jarvien R, Seppanen R, Heliovara M, Teppo, Aroma A. 1997.** Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *American Journal of Epidemiology* 146: 223-230.
- Lalas S, Tsaknis J. 2002.** Characterization of *Moringa oleifera* Seed Oil Variety “Periyakulum 1”. *Journal of Food Compost Analysis* 15: 65-77.

- Legaria SJ, Ponce RG, Muñoz OA. 2000.** Efecto del estrés osmótico sobre la germinación de las semillas y el crecimiento de plántulas de trigo (*Triticum aestivum L.*) y amaranto (*Amaranthus hypochondriacus L.*). Revista Fitotecnia Mexicana 23: 153- 166.
- Li WQ, Khan MA, Yamaguchi S, Kamiya Y. 2005.** Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. Plant Growth Regulation 46: 45–50.
- Liener IE. 1989.** Antinutritional factors. En: Legumes: Chemistry, Technology, and Human Nutrition. Matthews R.H. (Ed.), Marcel Dekker, N Y, EEUU 339-370.
- Liu RH. 2004.** Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. Journal of Nutrition 134:3479-348.
- Loo G, 2003.** Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation (review). Journal of Nutritional Biochemistry 14:64–73.
- Madsen M, Schlundt J, Omer E. 1987.** Effect of water coagulation by seeds of *Moringa oleifera* on bacterial concentrations. Journal of Tropical Medicine and Hygiene 90: 101-109.
- Maheshwari R, Dubey R. 2008.** Inhibition of ribonuclease and protease activities in germinating rice seeds exposed to nickel. Acta Physiologiae Plantarum 30: 863–872.
- Makkar HP, Becker K. 1997.** Nutrients and anti-quality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. Journal of Agricultural Science Cambridge 128:311–322.

- Mallillin CA, Trinidad PT, Sagum SR, de Leon PM, Borlagdan PM, Baquiran FP, Alcantara SJ, Aviles FT. 2014.** Mineral Availability and Dietary Fiber Characteristics of *Moringa oleifera*. Food and Public Health 4(5): 242-246.
- Marcus A, Feeley J, Volcani T. 1966.** Protein synthesis in imbibed seeds. III. Kinetics of amino acid incorporation ribosome activation, and polysome formation. Plant Physiologic. 41:1167–1172.
- Martínez M. 1959.** Plantas útiles de la flora mexicana. Botas, México, D. F. 621 p.
- Matakiadis T, Alboresi A, Jikumaru Y, Tatematsu K, Pichon O, Renou J, Kamiya Y, Nambara E, Truong H. 2009.** The Arabidopsis abscisic acid catabolic gene CYP707A2 plays a key role in nitrate control of seed dormancy, Plant Physiology 149: 949–960.
- Melo V, Vargas N, Quirino T, Calvo C. 2013.** *Moringa oleifera* L. – An underutilized tree with macronutrients for human health. Emirates Journal of Food and Agriculture 25 (10): 785-789.
- Mercuri F, Quagliari L, Ceriello A. 2000.** Oxidative stress evaluation in diabetes. Diabetes Technology Therapeutics 2: 589-600.
- Meredith P, Pomeranz Y. 1985.** Sprouted grain. Cap. 5. En: Advances in Cereal Science and Technology. Vol. 6. (Ed.). Y. Pomeranz. American Association of Cereal Chemists. St. Paul MN 239-320.
- Milán CJ, Reyes MC, Camacho HI, Rouzud SO. 2002.** Optimization of extrusión process to transform hardened chickpeas (*Cicer arietinum* L) into a useful product. Journal of the Science of Food and Agriculture 82: 1718-1728

- Milán CJ, Reyes MC, Armienta RE, Cárabez TA, Mora ER. 2000.** Physicochemical and nutritional characteristics of extruded flours from fresh and hardened chickpea (*Cicer arietinum* L). *Lebensm Wiss und Technology* 33(3): 117-223.
- Montaño MH. 2014.** Producción de Bioetanol a Partir de Material Lignocelulósico de *Moringa Oleifera*. Universidad Nacional de Colombia 14-17.
- Mora ER. 1994.** Germinación de amaranto: Características físicoquímicas, funcionales y nutricionales. *Tesis de Doctorado*. ENCB-IPN. Mexico, D.F.
- Mora ER, Paredes LO, Dominguez J. 1991a.** Optimization of germination procedure by response surface methodology. *Lebensm.-Wiss. u.-Technology*. 24:51.
- Mora RS, Gutiérrez UJ, Serna SS, Sánchez PP, Reyes MC, Milán CJ. 2010.** Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusión cooking. *Journal of Cereal Science* 52: 502-508.
- Morohashi Y, Bewley J. 1980.** Development of mitochondrial activities in pea cotyledons: influence of desiccation during and following germination of the axis, *Plant Physiology* 66: 637–640.
- Morohashi Y, Bewley J, Yeung E. 1981.** Biogenesis of mitochondria in imbibed peanut cotyledons. II. Development of light and heavy mitochondria, *Plant Physiology* 68: 318–323.
- Morohashi Y. 1986.** Patterns of mitochondrial development in reserve tissues of germinated seeds: a survey, *Plant Physiology* 66: 653–658.
- Moyo B, Masika P, Hugo A, Muchenje V. 2011.** Nutritional characterization of *Moringa (Moringa oleifera* Lam.) leaves. *African Journal of Biotechnology* 10(60):12925-12933.

- Mubarak AE. (2005).** Nutritional composition and antinutritional factors ofmung bean seeds (*Phaseolus aureus*) as affected by some hometraditional processes. Food Chemistry 89:489–495.
- Myatt L. 21010.** Review: reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. Placenta 31(suppl): 66–69.
- Nakabayashi K, Okamoto M, Koshiba T, Kamiya Y. 2005.** E. Nambara, Genome-wide profiling of stored mRNA in Arabidopsis thaliana seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. Plant Journal 41:697–709.
- Nonogaki H, Chen F, Bradford K. 2007.** Mechanisms and genes involved in germination sensu stricto, in: K.J. Bradford, H. Nonogaki (Eds.), Seed Development, Dormancy and Germination, Blackwell Publishing, Oxford 264–304.
- Nour MJ, Krers JL. 2005.** Tempe fermentation innovation and functionality: up- date into the 3 er millennium. Journal of Applied Microbiology 98: 789-805.
- Oliveira JT, Silveira SB, Vasconcelos KM, Cavada BS, Moreira RA. 1999.** Compositional and nutritional attributes of seeds from the multiple purpose tree Moringa oleifera Lamarck. Journal of the Science of Food and Agriculture 79(6):815-20.
- Olsen A. 1987.** Low technology water purification by bentonite clay and *Moringa oleifera* seed flocculation as performed in Sudanese villages. Effects on *Schistosoma mansoni* cercariae. Water Research 21(5): 517-522.

- Olson ME, Carlquist S. 2001.** Stem and root anatomical correlations with life form diversity, ecology, and systematic in *Moringa* (*Moringaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society* 135:315-348.
- Olson ME. 2002.** Intergeneric relationships within the Caricaceae-Moringaceae clade (Brassicales), and potential morphological synapomorphies of the clade and its families.
- Olson ME. 2003.** Ontogenetic origins of floral bilateral symmetry in Moringaceae. *American Journal of Botany* 90:49-71.
- Olson ME. 2010.** *Moringaceae*. In *Flora of North America North of Mexico*, vol. 7, *Flora of North America Editorial Committee* (eds.). *Flora of North America Association*, New York y Oxford 167-169.
- Olson EM, Fahey WJ. 2011.** *Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82: 1071-1082.
- Oluwole SI, Oluwole AA, Oluwaseun A. 2013.** Comparative study on nutrient composition, phytochemical, and functional characteristics of raw, germinated, and fermented *Moringa oleifera* seed flour. *Food Science & Nutrition* 1(6): 452–463.
- Ou B, Pior L. 2001.** Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 9 (10): 4619–4626.
- Padrón MC. 2014.** *Moringa pura*. Beneficios de la moringa en la salud humana. Consultado el 17 de abril del 2015 en: <http://www.moringapura.com/moringa-organica/beneficios-de-la-moringa-en-la-salud-humana/>.

- Paredes LO, Mora ER. 1989.** Germination of amaranth seeds: Effects on nutrient composition and color. *Journal of Food Science* 54(3):761-762.
- Paško P, Sajewicz M, Goristein S, Zachwieja Z. 2008.** Analysis of selected phenolic acids and flavonoids in *Amaranthus cruentus* and *Chenopodium quinoa* seeds and sprouts by HPLC. *Acta chromatographica* 20: 661-672.
- Pedroche J, Yust M, Giron C, Alaiz M, Millan F, Vioque J. 2002.** Utilization of chickpea protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82:960-965.
- Pérez RM, Vargas R, Martínez FJ, García EV, Hernández B. 2003.** Antioxidant activity of alkaloids from *Boconia arborea*. A study on six testing methods. *Ars Pharmaceutica* 44(1):5-21.
- Pietta PG. 2000.** Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products* 63 (7): 1035-1042.
- Premier R. 2002.** Phytochemical Composition: a Paradigm Shift for Food- Health Considerations. *Journal of Clinical Nutrition* 11:19-25.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. 2005.** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 53(10):4290-4302.
- Prior RL, Cao G. 2000.** Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables. Diet and health implications. *Horticulture Science* 35: 588-592.
- Puupponen R, Nohynek L, Meier L, KačekoÈnen M, Heinonen M, Hopia A, Oksman C. 2001.** Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology* 90: 494-507.

- Quettier AL, Eastmond PJ. 2009.** Storage Oil Hydrolysis During Early Seedling Growth. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 485.
- Ray PD, Huang B, Tsuji Y. 2012.** Review: Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling* 24: 981–990.
- Reyes N. 2005.** Marango: cultivo y utilización en la alimentación animal. Guía técnica No. 5. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima. 24 .
- Richardson P. 2001.** Thermal technologies in food processing. Woodhead. Cambridge, RU. 3a ed. 425.
- Rossell JB. 1991.** Vegetable oil and fats. In *Analysis of Oilseeds, Fats and Fatty Foods*, Rossell JB, Pritchard JLR (eds). Elsevier Applied Science: New York 261–319.
- Sánchez MD, Núñez GJ, Reyes MC, Ramírez WB, López CJ. 2010.** Nutritional Quality of Edible Parts of *Moringa oleífera*, *Food Analysis Methods* 3:175–180.
- Sánchez MD, López CJ, Núñez GJ, de la Mora LG, López HJ, Paseiro LP. 2015.** Effect of the refining process on *Moringa oleífera* seed oil quality. *Food Chemistry* 187: 53–57.
- Seo M, Hanada A, Kuwahara A, Endo A, Okamoto M, Yamauchi Y, North H, Marion P, Sun T, Koshiha T, Kamiya Y, Yamaguchi S, Nambara E. 2006.** Regulation of hormone metabolism in *Arabidopsis* seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellins metabolism. *Plant Journal* 48: 354–366.
- Seo M, Nambara E, Choi G, Yamaguchi S. 2009.** Interaction of light and hormone signals in germinating seeds, *Plant Molecular Biology* 69: 463– 472.

- Shaukat S, Mushtaq M, Siddiqui S. 1999.** Effect of cadmium, chromium and lead on seed germination, early seedling growth and phenoloc contents of *Parkinsonia aculeata* L. and *Pennisetum americanum* L. Schumann. Pak. International Journal Biological Sciences 2: 1307–1313.
- Silvestro L, Weiser J, Axelsen P. 2000.** Antibacterial and antimembrane activities of cecropin A in Escherichia coli. Antimicrobial Agents Chemotherapy 44: 602–607.
- Simmonds M. 2003.** Novel grugs from botaniucals sources. Drug Discovery Today.8(16):721-722.
- Soto LS, Zazueta PI, Piña VP, Nieves SM, Reyes MC, Contreras I. 2014.** Extracción de lípidos de *Tetraselmis* suecica: Proceso asistido por ultrasonido y solventes. Revista Mexicana de Ingeniería Química 13: 723-737.
- Steinberg D. 1991.** Antioxidants and atherosclerosis: a current assessment. Circulation 84: 1420-1425.
- Steinkraus KH. 2002.** Fermentations in World Food Processing. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 1: 23–32.
- Street RA, Kulkarni MG, Stirk WA, Southway C, Van SJ. 2007.** Toxicity of metal elements on germination and seedling growth of widely used medicinal plants belonging to *hyacinthaceae*. Bulletin of Environmental Contamination Toxicology 79: 371–376.
- Suarez M, Entenza JM, Doerries C. 2003.** Expression of a plant-derived peptide harbouring water-cleaning and antimicrobial activities. Biotechnology and Bioengineering 81: 13–20.

- Subramanian S, Viswanathan R. 2007.** Bulk density and friction coefficients of selected minor millet grains and flours. *Journal of Food Engineering* 81: 118-126.
- Sutherland JP, Folkard G, Grant WD. 1990.** Natural coagulants for appropriate water treatment: a novel approach. *Waterlines* 8: 30–32.
- Sweta K, Veda K, Archana S. 2014.** Impact of soaking and germination durations on antioxidants and anti-nutrients of black and yellow soybean (*Glycine max. L*) varieties. *Journal Plant Biochemistry Biotechnology*. DOI 10.1007/s13562-014-0282-6.
- Tamimi RM, Lagiou P, Adami HO, Trichopoulos D. 2002.** Prospects for chemoprevention. *Annals of Internal Medicine* 251 (4): 286-300.
- Tsaknis J, Lalas S, Gergis V, Dourtoglou V, Spiliotis V. 1999.** Characterization of moringa oleifera variety Mbololo seed oil of Kenya. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47: 4494–4499.
- Vasconcelos IM, Maia AA, Siebra EA, Oliveira JT, Carvalho AF, Melo VM. 2001.** Nutritional study of two Brazilian soybean (*Glycine max*) cultivars differing in the contents of antinutritional and toxic proteins. *Journal of Nutritional Biochemistry* 12(1):55-62.
- Velioglu YS, Mazza G, Gao YL, Oomah BD. 1998.** Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and gran products. *Journal Agricultural and Foods Chemistry* 46: 4113-4117.
- Verdcourt B. 1985.** A synopsis of Moringaceae. *Kew Bulletin* 40:1-23.
- Wierzbicka M, Obidzinska J. 1998.** The effect of lead on seed imbibition and germination in different plant species. *Plant Science* 137:155–171.

- Williams HA, Bewley JD, Greenwood JS, Bourgault R, Mo B. 2001.** The storage cell walls in the endosperm of *Asparagus officinalis* L. seeds during development and following germination, *Seed Science Research* 11: 305–315.
- Wu X, Gu L, Pior L, McKay S. 2004.** Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Some Cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and Their Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (26): 7846–7856.
- Xu BJ, Chang SK. 2007.** A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal Food Science* 72(2):S159-66.
- Young JF, Nielsen SE, Haraldsdottier J, Danesfvar B, Lauridsen ST, Knuthsen P, Crozier A, Sandstrom B, Dragsted L. 1991.** Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *American Journal of Clinical Nutrition* 69: 87-94.

ABREVIATURAS

AAox	Actividad antioxidante
AACC	American Association for Clinical Chemistry
ABA	Ácido abscísico
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
AlCl ₃	Cloruro de Aluminio
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
ATP	Adenosin Trifosfato
ATPasa	Adenosin Trifosfatasa
AUC	Área neta bajo la curva
a _w	Actividad acuosa
Bs	Base seca
°C	Grados Celsius
Ca	Calcio
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
CAE	Catequina equivalente
CFT	Compuestos fenólicos totales
CQ	Calificación química
col.	Colaboradores
C-PER	Relación de eficiencia proteínica calculada
Cu	Cobre
DA	Densidad Aparente
DCF	Diclorofluoresceina
DCFH	Diclorofluoeosceina
DPIV	Digestibilidad proteínica <i>in vitro</i>
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
FAO	Food and Agriculture Organization
FAO/WHO/ONU	Food and Agriculture Organization /Organización Mundial de la Salud/Organización de las Naciones

Unidas

Fe	Hierro
Fig	Figura
FT	Flavonoides totales
g	Gramo
GA	Giberelinas
GAE	Equivalentes de Ácido Gálico
H	Horas
HCl	Ácido Clorhídrico
HMB	Harina de moringa Bioprocesada
HMBO	Harina de moringa bioprocesada optimizada
hL	Hectolitro
IAA	Índice de Absorción de Agua
IAAc	Índice de Absorción de Aceite
ISA	Índice de Solubilidad en Agua
Kg	Kilogramo
L	Litro
M	Metros
M	Molaridad
mg	Miligramo
Mg	Magnesio
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MSR	Metodología de Superficie de Respuesta
N ₂	Nitrógeno
N	Normalidad
Na	Sodio
NaCl	Cloruro de Sodio
NaClO	Hipoclorito de Sodio
NaNO ₂	Nitrato de Sodio

NaOH	Hidróxido de Sodio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de Sodio
NO	Oxido de nitrógeno
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
ORAC	Capacidad de Absorbancia de Radicales Oxígeno
pH	Potencial de Hidrógeno
ppm	Partes por millón
p/v	Relación peso/volumen
ROO'	Radicales peroxilo
rpm	Revoluciones por minuto
S	Segundo
TC	Taninos condensados
TCA	Ácido Tricloroacético
TE	Equivalentes de Trolox
TG	Temperatura de germinación
tG	Tiempo de germinación
Ton	Toneladas
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
μmol	Micromol
μM	Micromolar
v/v	Relación volumen/volumen
Zn	Zinc