



**Centro de Investigación en Alimentación  
y Desarrollo, A.C.**

**EFICIENCIA DE BIOCONVERSIÓN DEL  $\beta$ -CAROTENO  
DE HOJAS DE *Moringa oleifera* MARCADA CON  
DEUTERIO, COMO FUENTE DE VITAMINA A EN NIÑOS  
DE UNO A DOS AÑOS.**

---

Por:

**MARIELA PAZ CASSINI**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

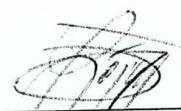
## APROBACIÓN

Los miembros de comité designado para la revisión de la tesis de Mariela Paz Cassini, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



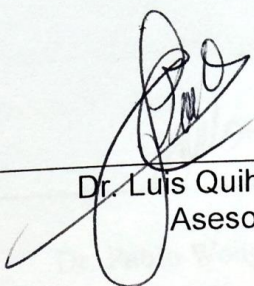
---

Dr. Humberto Astiazarán García  
Director de Tesis



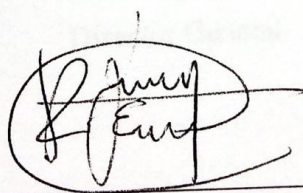
---

Dra. Verónica López Teros  
Co-Directora de Tesis



---

Dr. Luis Quihui Cota  
Asesor



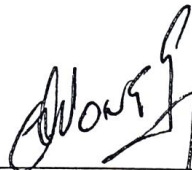
---

Dr. Julián Esparza Romero  
Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



---

Dr. Pablo Wong González

Director General

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico (beca) que se me proporcionó con el fin de financiar mis estudios para obtener mi título de posgrado y continuar mi formación profesional.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) por haberme abierto las puertas y hacer este logro posible.

Al Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) por el financiamiento y apoyo en este proyecto (Contrato No. 16880).

A la Coordinación de Salud y Seguridad Escolar de la Secretaría de Educación y Cultura, por concedernos el permiso para la realización de estudio.

A los Centros de Desarrollo Infantil 1 y 2 (CENDI) por abrirnos sus puertas, y brindarnos su apoyo y ayuda durante el desarrollo del proyecto, así mismo por facilitar la comunicación con los padres de los niños participantes.

A la Universidad de Sonora (UNISON) por concedernos trabajar en el Laboratorio de Nutrición del Departamento de Ciencias Químico- Biológicas.

A los padres de los niños participantes en este proyecto que nos abrieron las puertas de sus casas en múltiples ocasiones mostrando siempre buena disposición, e interés por la salud de sus hijos.

Al Dr. Humberto Astiazarán García por abrirme las puertas de su laboratorio y guiarme durante el desarrollo de este proyecto, resolviendo mis dudas y apoyarme en cada paso.

A la Dra. Verónica López Teros, por haber estado presente en cada paso del proyecto, por su asesoría y ayuda durante todo el proceso, al igual que sus enseñanzas.

Al Dr. Luis Quihui Cota por su ayuda en la realización de análisis al igual que asesoría en momentos de dudas sobre la realización de estos mismos.

Al Dr. Julián Esparza Romero por su ayuda en el diseño de experimento que se llevó a cabo.

Al Dr. Iván Anduro Corona por sus consejos dentro del laboratorio, y su apoyo en algunas partes del proyecto.

Al M. en C. Orlando Tortoledo por la orientación en la realización de los análisis en HPLC, al igual que su ayuda para la toma de muestras sanguíneas, las cuales son clave para el presente proyecto.

A la QB. Bertha Isabel Pacheco Moreno por su apoyo en el laboratorio y fuera de él para la toma de muestras sanguíneas, y por estar siempre dispuesta a ayudarnos.

A la M. en C. Bianca Vargas Tequida, por su gran ayuda en la toma de muestras sanguíneas y su gran habilidad para el trato con los niños participantes en este proyecto.

M.C.S Alma Delia Contreras por su ayuda y capacitación para la realización de los análisis dietarios de los niños.

A la p.L.C.N. Karla María Olivas Matas, por su ayuda en la interpretación de datos dietarios de los niños, al igual que su recolección.

A la L.N.H. Mónica Guadalupe Soto Bernal por su ayuda durante este proyecto y por las madrugadas para ir a campo.

A la L.C.N. Lucía Guadalupe Duarte Ramírez por su ayuda en campo para la recolección de datos y la administración del puré adicionado a los niños.

A la L.C.N. Brianda Isamar Monreal Barraza por su ayuda en recolección de datos dietarios.

Y al igual agradezco a mis compañeros dentro de Laboratorio de Patología Experimental, que con el paso de este breve tiempo se convirtieron más que en compañeros, y hemos llegado a ser hermanos, así como dice el Doc. Humberto

somos como sus hijos, después de tantas horas de convivencia dentro y fuera del Lab. Gracias a: M. en C. Gema Iñigo, M. en C. Roció León, M. en C. Hiram Bracamonte, Q. B. C. Esmeralda Urías, L.C.N. Alejandro Rendón, L.N.H. Julio Rivas.

También un agradecimiento a mis compañeros de generación Glenda Alcantar, Lucinda Clark, Alejandra Arana, Arturo Coronado y Maria Jose Navarro, que estuvieron presentes en todos los desvelos de estudio y las horas de trabajo, al igual que el apoyo durante el trabajo para la realización de este proyecto. A Gustavo Velderrain por su ayuda y apoyo durante el periodo de intervención.

Y sin olvidar un agradecimiento especial a Annie como la llaman cariñosamente sus padres la Dra. Verónica y M. en C. Orlando, por su ayuda en la degustación del puré y darnos ideas de como acercarnos a los niños pequeños, en ocasiones las grandes ideas pueden venir de los más pequeños.

## **DEDICATORIA**

Una especial dedicatoria a mis padres Alvaro Paz y Mónica Cassini por apoyarme y estar presentes en cada etapa durante el desarrollo de mi proyecto y estar siempre dispuestos con algún consejo. Al igual a mis hermanos Alvaro y Mónica.

Y por supuesto a Dios pues siempre una oración en algún momento difícil puede ayudar a aclarar los problemas y encontrar las soluciones.

## CONTENIDO

<b>LISTADO DE FIGURAS</b> .....	<b>IV</b>
<b>LISTADO DE TABLAS</b> .....	<b>V</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>INTRODUCCION</b> .....	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>2</b>
VITAMINA A .....	2
FUNCIÓN Y EFECTOS ASOCIADOS A LA DEFICIENCIA DE VITAMINA A .....	3
SIGNOS DE DEFICIENCIA DE VITAMINA A .....	3
<i>MORINGA OLEIFERA</i> .....	5
<i>Moringa oleifera en México</i> .....	5
BIOCONVERSIÓN.....	6
FIGURA 1.- POSIBLES TRANSFORMACIONES DEL B-CAROTENO EN MAMÍFEROS BASADAS EN EL DIAGRAMA DE ALLEN, 1988.....	7
ISÓTOPOS ESTABLES.....	8
TÉCNICAS DE DILUCIÓN ISOTÓPICA: VITAMINA A .....	10
IMPORTANCIA DE MEDIR EL FACTOR DE BIOCONVERSIÓN .....	11
<b>OBJETIVO</b> .....	<b>13</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>13</b>
<b>SUJETOS Y MÉTODOS</b> .....	<b>14</b>
DESARROLLO DE LAS PLANTAS DE <i>MORINGA OLEIFERA</i> EN AMBIENTE HIDROPÓNICO RICO EN DEUTERIO .....	14
DETERMINACIÓN DE B-CAROTENO EN LAS HOJAS DE <i>MORINGA OLEIFERA</i> .....	15
INTERVENCIÓN.....	16
<i>Convocatoria</i> .....	16
<i>Análisis coproparasitológico</i> .....	17
<i>Evaluación antropométrica</i> .....	17
<i>Detección de anemia</i> .....	19
<i>Proteína C reactiva</i> .....	19
ANÁLISIS DIETARIO.....	20
PAPILLA ADICIONADA CON <i>MORINGA OLEIFERA</i> INTRÍNSECAMENTE MARCADA CON DEUTERIO .....	21
PUNTOS DE MUESTREO PARA LA CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA CINÉTICA .....	22
CÁLCULOS DE EQUIVALENCIA DE RETINOL.....	25
CALCULO DEL FACTOR DE BIOCONVERSIÓN.....	26
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>27</b>
CARACTERIZACIÓN DE LAS HOJAS DE <i>MORINGA OLEIFERA</i> MARCAS CON DEUTERIO .....	27
<i>Contenido de carotenoides</i> .....	27
<i>Enriquecimiento isotópico</i> .....	28



## CONTENIDO (CONTINUACIÓN)

<i>Análisis nutrimental</i> .....	29
CARACTERÍSTICAS DE LOS PARTICIPANTES.....	30
EVALUACIÓN DIETARIA.....	31
RETINOL SÉRICO TOTAL Y CÁLCULO DEL FACTOR DE BIOCONVERSIÓN .....	32
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>36</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>37</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>43</b>

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1	Posibles transformaciones del $\beta$ -caroteno en mamíferos basadas en el diagrama de Allen, 1988.....	8
Figura 2	Diferencias de isotopos estables y radiactivos.....	10
Figura 3	Plantas de Moringa oleifera en ambiente rico en deuterio (Baylor College of Medicine Texas, USA).....	15
Figura 4	Medición de la longitud con el uso de infantometro.....	19
Figura 5	Registro pesado de alimentos el en CENDI.....	21
Figura 6	Modelo del Súper Niño, Haskell et al, 2003.....	25
Figura 7	Perfil de carotenos presente en las hojas de Moringa oleifera marcada con deuterio.....	28
Figura 8	Perfil de enriquecimiento isotópico del $\beta$ -caroteno de Moringa oleifera, determinado usando cromatografía líquida – ionización química por presión atmosférica – espectrometría de masas.....	30
Figura 9	Curvas de respuesta del suero a la dosis de [ $^2\text{H}$ ] retinol proveniente de las hojas de Moringa oleifera (ng $^2\text{H}$ ) y [ $^{13}\text{C}_{10}$ ] de acetato de retinilo (ng $^{13}\text{C}$ ), calculada en base a la cinética de asimilación de vitamina A.....	35

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 1	Factor de bioconversión de alimentos calculado a partir de las técnicas con isótopos estables.....	12
Tabla 2	Recomendaciones de consumo de nutrimentos tomado de Burges et al., 2005; Food and Nutrition Board, National Research Council, NAS: Recommended Dietary Allowances 10th ed. National Academy Press, 1989.....	22
Tabla 3	Contenido de carotenoides pro-vitamina A en hojas frescas de Moringa oleifera marcada con deuterio.....	29
Tabla 4	Caracterización proximal de hojas frescas de Moringa oleifera.....	31
Tabla 5	Promedio de las concentraciones de retinol y carotenoides en suero de los participantes.....	32
Tabla 6	Ingesta de energía y nutrientes dentro de CENDI 1 y 2.....	32
Tabla 7	Respuesta de los participantes a la dosis de referencia de [ <sup>13</sup> C <sub>10</sub> ] acetato de retinilo y del [ <sup>2</sup> H] retinol formado a partir del β-caroteno en las hojas de Moringa oleifera.....	34

## RESUMEN

La deficiencia de vitamina A (DVA) es un problema que se presenta principalmente en países en desarrollo, la cual afecta principalmente al crecimiento y salud de los niños que la padecen, llegando incluso a causarles la muerte. Ante estos problemas se han buscado métodos para combatir la DVA como por ejemplo el promover el consumo de alimentos ricos en VA. En este caso al estudiar las propiedades de la planta *Moringa oleifera* (MO), se observó que las hojas tanto frescas como secas, tienen un alto contenido de  $\beta$ -caroteno (pro-vitamina A) sin embargo, se desconoce cuánto se transforma a retinol. El objetivo de este estudio fue determinar el factor de bioconversión del  $\beta$ -caroteno a retinol en hojas frescas de MO intrínsecamente marcadas con deuterio, mediante un estudio cinético. Participaron 15 niños entre 1 y 2 años, previo consentimiento informado de sus padres, sin infecciones, parásitos intestinales, anemia ( $< 110$  g/l) o desnutrición (score  $z < -2$ ). La dosificación de los niños se realizó empleando como vehículo una preparación de puré de manzana adicionada con 7g de hojas de MO intrínsecamente marcadas (1mg de  $\beta$ -caroteno), al finalizar se administró oralmente 1mg de  $^{13}\text{C}_2$  -acetato de retinilo como dosis de referencia. Cada participante se le tomó dos muestras de sangre venosa en distintos tiempos de muestreo, de forma que por cada punto de la curva se contó con 2-3 niños. Las muestras de suero fueron analizadas por LC-APCI-MS, y distribuidas según el modelo del súper niño para crear una sola curva cinética. Los datos fueron introducidos en el software KaleidaGraph®, donde se obtuvo el área bajo la curva (AUC), del total de retinol formado a partir del  $\beta$ -caroteno marcado, y el AUC de la dosis de referencia de acetato de retinilo, las cuales se usaron para calcular el total de retinol formado por la dosis de  $\beta$ -caroteno, y se calculó el factor de bioconversión el cual fue de 1.4689 factor de  $\beta$ -caroteno por peso. A su vez demostrando que el modelo del súper niño nos brindó una curva cinética acertada con respecto a la asimilación de la VA.

**Palabras clave:** Súper niño,  $\beta$ -caroteno, bioconversión, vitamina A, *Moringa oleifera*.

## ABSTRACT

Vitamin A deficiency (VAD) is a problem that occurs primarily in developing countries, which mainly affects the growth and health of children, often leading to death. Given these problems have sought methods to combat VAD such as promoting the consumption of foods rich in VA. In this case when studying the properties of *Moringa oleifera* (MO) plant, it was found that both fresh and dried, leaves have a high content of  $\beta$ -carotene (pro-vitamin A), however, is unknown how much is converted to retinol. The objective of this study was to determine the bioconversion factor  $\beta$ -carotene to retinol MO in fresh leaves of intrinsically labeled with deuterium, with a kinetic study. Involved 15 children between 1 and 2 years, prior informed consent of their parents, no infections, intestinal parasites, anemia ( $<110$  g / l) or malnutrition (z score  $<-2$ ). The dosage for children was performed using it as a vehicle preparation of applesauce added with 7g leaves MO intrinsically labeled (1 mg of  $\beta$ -carotene), at the end of orally administered 1mg of  $^{13}C_2$ -acetate, retinyl as reference dose. Each participant took two venous blood samples at different sampling times, so that for each point of the curve is told with 2-3 children. Serum samples were analyzed by LC-APCI-MS, and distributed according to the model of super kid to create a single kinetic curve. Data were entered into the KaleidaGraph<sup>®</sup> software, where the area was obtained under the curve (AUC) of total retinol formed from  $\beta$ -carotene marked, and AUC of the reference dose of retinyl acetate, which were used to calculate the total dose retinol consisting of  $\beta$ -carotene, and the bioconversion factor which factor was 1.4689  $\beta$ -carotene by weight was calculated. At the same time demonstrating that the model of super kid gave us a kinetic curve regarding the successful assimilation of the VA.

**Keywords:** Super child,  $\beta$ -carotene, bioconversion, vitamin A, *Moringa oleifera*.

## INTRODUCCION

La vitamina A cumple diferentes funciones en el desarrollo de las personas, es por esto que ha ido tomando importancia con el paso de los años. Para el año del 2009 según las encuestas realizadas por la Organización Mundial de la Salud, 5.2 millones preescolares sufrían de DVA clínica. Dentro de este mismo estudio, se observó que de 1995 a 2005, se presentaba un aumento en la DVA, que va de 45 a 122 países afectados, dicho estudio se basó en la prevalencia de ceguera nocturna y de DVA subclínica (concentraciones de retinol sérico  $<0.7 \mu\text{mol/L}$ ).

Al observar el aumento en los casos de DVA, se han buscado diferentes métodos para combatirla, como son intervenciones dietarias, suplementación con megadosis de vitamina A y en algunos países en desarrollo, se utiliza la promoción del consumo de alimentos locales o de fácil obtención, ricos en vitamina A, ya que es una forma más económica y accesible para la población.

El presente estudio centra su atención en la planta *Moringa oleifera*, pues se ha utilizado para tratar problemas de desnutrición especialmente en niños y mujeres en países como África (Jed W., 2005). La *Moringa oleifera* es una planta de fácil crecimiento en climas secos, no necesita mucha agua o cuidados, lo cual la convierte en una planta muy accesible (Khawaja, 2010). Además se han realizado análisis a las hojas tanto secas como frescas de la *Moringa oleifera*, que han mostrado un alto contenido de  $\beta$ -caroteno (Garavito, 2008), molécula precursora de la vitamina A.

Con base en lo anterior y aunado a las evaluaciones realizadas por nuestro grupo de trabajo en los laboratorios de CIAD, donde se observó un contenido de  $\beta$ -caroteno en las hojas frescas de *Moringa oleifera*, se buscó como objetivo principal Identificar el factor de bioconversión del  $\beta$ -caroteno, contenido en las hojas de *Moringa oleifera* intrínsecamente marcada, a retinol en niños de uno a dos años.

## ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

### Vitamina A

La vitamina A también conocida como retinol se encarga de realizar diferentes funciones en el desarrollo de las personas, como por ejemplo ayudar a mantener una visión saludable, la regeneración de células y tejidos, y además cumple con la función de antioxidante. La vitamina A de fuentes vegetales, se forma a partir de la separación de las moléculas llamadas carotenoides provitamina A, siendo el  $\beta$ -caroteno el más conocido, ya al ser absorbido por el organismo la mayor parte de tiempo se divide formando dos moléculas de vitamina A. La provitamina A se encuentra en vegetales de pigmentación verde oscuro o naranja (Mataix y Carazo, 2005)

Para que la molécula de  $\beta$ -caroteno forme 2 moléculas de vitamina A el individuo debe consumirla para después ser absorbida en el intestino delgado. Una vez asimilado el  *$\beta$ -caroteno*, se une a la enzima beta-caroteno-15.15-dioxigenasa, se lleva a cabo un proceso de oxidación, y se forman 2 moléculas de retinal que posteriormente se reducen a retinol a través de la enzima retinol-deshidrogenasa (Urtúbia, 1999).

Las moléculas de vitamina A formadas mediante este proceso, se metabolizan para cubrir el requerimiento básico del organismo. Cuando no se presenta DVA y se han cubierto todas las funciones básicas de nutrición, la vitamina A se almacena en el hígado en forma de ésteres de retinilo, el cual constituye más del 90% de la vitamina A en el organismo (FAO/OMS, 1991).

## Función y Efectos Asociados a la Deficiencia de Vitamina A

Dado que el retinol participa en el desarrollo de los pigmentos de las células oculares, afectando a las células encargadas de captar la luz tenue, un signo clínico característico de la DVA es la pérdida de la visión nocturna, y se puede presentar cuando la deficiencia aún no es muy severa (Roberts, et al., 2003).

La vitamina A participa en la regulación del crecimiento, la regeneración de la mucosa intestinal y del tracto respiratorio y la diferenciación de tejidos, Se recomienda que las mujeres embarazadas tengan un consumo moderado de vitamina A sin sobrepasar las recomendaciones, ya que al ser precursor de la diferenciación de tejidos, un alto consumo de vitamina A durante los primeros meses del embarazo podrían provocar alguna malformación embrionaria (Biesalski y Grimm, 2009). Así juega un papel importante en el sistema inmune ya que participa en el mantenimiento de los tejidos epiteliales y de la mucosa, lo cual previene la generación de daños en los tejidos, evitando así las infecciones (Sanchez, 2001).

### Signos de Deficiencia de Vitamina A

El incremento de la DVA en los recientes años ha creado una preocupación creciente en las personas. Como se mencionó antes, en el año 2005 se calculó que 5.2 millones de niños en edad preescolar presentaron DVA clínica, cifra que continua aumentando con el paso del tiempo (WHO, 2009).

Cuando la DVA está presente, puede tener manifestaciones clínicas, sin embargo sólo se manifiestan cuando la deficiencia es severa. Algunos ejemplos de signos clínicos incluyen la queratinización del tejido epitelial en ojos, pulmones, vías gastrointestinales y genitourinarias, acoplada con la reducción de la secreción de mucosa (Melo y Cuamatzi, 2006). Otros signos que se presentan cuando la deficiencia es menor, es una mayor predisposición infecciones y lesiones cutáneas a causa de la resequedad en la piel (Melvin, 2002).



La hiperqueratosis de la piel aparece 4 a 6 semanas después de que la reserva de retinol disminuye. Este signo es seguido por la xeroftalmia, en la cual se puede observar una opacidad en el ojo formando una mancha de Bitot. Cuando la DVA es severa se presenta la queratomalacia, la cual consiste de un reblandecimiento y deformación de la córnea acompañada con úlceras, en casos graves se presenta la ceguera total del paciente (Prodhom, 2002).

Otra forma de detectar los problemas de DVA es empleando los métodos bioquímicos, en los cuales se toma y analiza una muestra de sangre, para clasificar el estado de vitamina A. Se presenta deficiencia leve cuando la concentración séricas de vitamina A van de 0.7 – 1.05  $\mu\text{mol/L}$ , deficiencia moderada cuando se sitúan entre 0.35 y 0.7  $\mu\text{mol/L}$  y deficiencia severa cuando  $<0.35 \mu\text{mol/L}$  (West, 2002).

Con el fin de prevenir que se presente la DVA, se han establecido dosis diarias recomendadas dependiendo de la etapa de desarrollo de la persona. El presente proyecto contempla el trabajo con niños entre uno y dos años de edad, en quienes la ingesta diaria recomendada es de 300  $\mu\text{g/día}$ , (Instituto Nacional de Salud, 2013).

El abordaje de la DVA debe considerar los diversos factores que pueden afectar su asimilación. La absorción de la vitamina A disminuye en el caso de síndromes de malabsorción de lípidos (por ser una vitamina liposoluble), infección de parásitos intestinales, diarrea y colestasis. Al igual que en las infecciones, particularmente las que se acompañan de fiebre, aumentan el catabolismo de la vitamina A y reducen la concentración plasmática de retinol (FAO/OMS, 1991).

La deficiencia de hierro va acompañada de una disminución de todos los pigmentos como lo es el  $\beta$ -caroteno (precursor de la vitamina A), (Lopez Gorge, 1991). Estudios más recientes han demostrado que en niños deficientes de vitamina A y en hierro la suplementación de vitamina A moviliza el hierro existente en reserva, ayudando a incrementar la eritropoyesis (Zimmermann et al., 2006).

## *Moringa oleifera*

La *Moringa oleifera* es la más conocida de la especie moringaceae, es nativa de la India, Pakistán, Bangladesh y Afganistán. El cultivo de la *Moringa oleifera* data de la época de los antiguos romanos, griegos y egipcios, los cuales le daban usos medicinales. Recientemente, se le ha utilizado como biocombustibles, forraje y en algunos casos como agente de limpieza doméstico (Jed, 2005).

Las hojas de *Moringa oleifera* son ricas en diversos nutrientes: vitamina A (1,130mg), vitamina C (220 mg), calcio (440 mg), potasio (259 mg) y proteína (6.7 g), (Gravito, 2008). Dichas cualidades se aprovechan para ayudar a combatir la desnutrición y las estrategias se enfocan principalmente en infantes y en mujeres en periodo de lactancia (Jed, 2005).

Así mismo se han identificado 24 ácidos grasos en la planta de la *Moringa oleifera*, entre los cuales se encuentran el palmítico y oleico, además de, 13 minerales como el selenio, el zinc y el calcio (Busani et al., 2011)

*Moringa oleifera*, es una planta de fácil cultivo ya que no requiere de muchos cuidados y se desarrolla principalmente en zonas desérticas (Khawaja et al., 2010).

### ***Moringa oleifera* en México**

Con el fin de combatir problemas de desnutrición en algunas regiones como Sonora, Michoacán y Oaxaca, algunas organizaciones civiles, indígenas y ONG's han promovido el cultivo de traspatio de árboles de *Moringa oleifera*, pero al carecer de apoyo gubernamental se ha dificultado la ejecución de estos programas (Gonzales, 2006; Montoya, 2006; León, 2007).

En Sonora fue requerida la investigación sobre la composición fisicoquímica y de impacto de los niveles de VA en las personas que la consumen (FAI, 2006). En base a esta petición se derivó un estudio sobre el impacto en el estado nutricional de vitamina A,

hierro y zinc en preescolares, el cual se llevó a cabo dentro de esta misma institución CIAD (Fernández, 2010). Además de un estudio sobre el efecto del consumo de las hojas deshidratadas de *Moringa oleifera* sobre los niveles de retinol y carotenoides provitamina A séricos en escolares (Bracamonte, 2014).

## Bioconversión

Al hablar de vitamina A en las plantas es importante resaltar que ésta no se encuentra de forma libre, sino que está como carotenoides pro-vitamina A ( $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina). El proceso por el cual los carotenoides pro-vitamina A se transforman en retinol se denomina bioconversión.

El proceso de bioconversión comienza cuando el  $\beta$ -caroteno entra al organismo y es absorbido a través de la pared intestinal, una vez que esto ocurre la molécula de  $\beta$ -caroteno puede pasar por 2 posibles rutas de bioconversión. Una de ellas es la ruptura central, en la cual la molécula se corta justo por la mitad formando dos moléculas de retinol. La otra ruta de bioconversión es la excéntrica, en donde la molécula de  $\beta$ -caroteno se corta en un doble enlace lateral lo cual produce otros derivados del  $\beta$ -caroteno dando como resultado diferentes compuestos, que a su vez al unirse entre ellos pueden llegar a formar una molécula de retinol (Figura 1) (Allen, 1988). Con el avance tecnológico se han desarrollado nuevas técnicas que se emplean isótopos estables como marcadores biológicos. Para la cuantificación del factor de bioconversión del  $\beta$ -caroteno a retinol, se cuenta con información para algunos alimentos como por ejemplo el maíz dorado, la espinaca de india, zanahoria, camote, y alga espirulina. Se ha determinado un factor de bioconversión del  $\beta$ -caroteno dietario con un rango de eficiencia de 10 a 28.1  $\mu\text{g}$   $\beta$ -caroteno: 1  $\mu\text{g}$  retinol (Van Poppel, 1995).

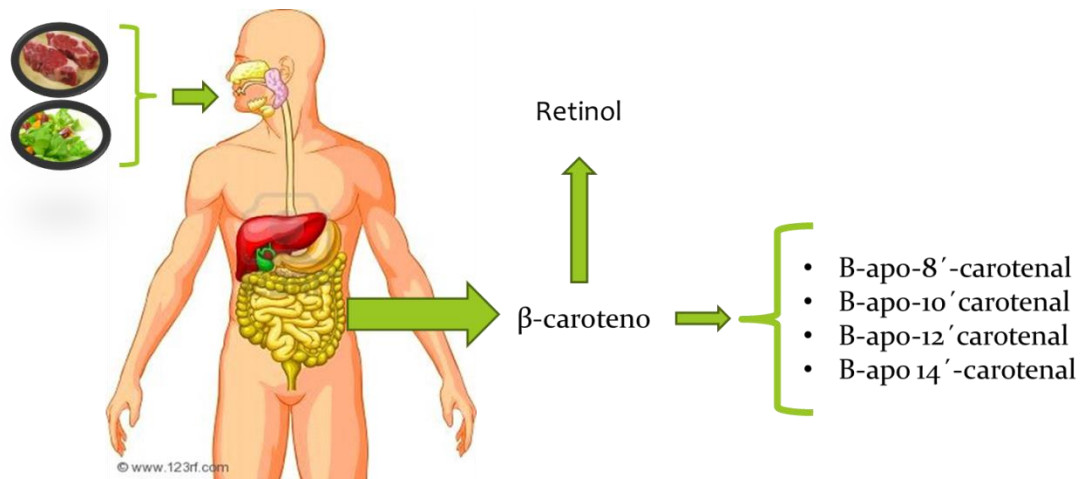


Figura 1.- Posibles transformaciones del  $\beta$ -caroteno en mamíferos basadas en el diagrama de Allen, 1988.

## Isótopos Estables

Las técnicas de dilución isotópica para la determinación de vitamina A se han ido perfeccionando y diversificando. Es una técnica aplicable en seres humanos ya que no representa un riesgo para la salud de los individuos. Los isótopos estables se presentan de forma natural en los alimentos de origen vegetal y son químicamente idénticos a los elementos naturales (Miján, 2002). Un isótopo estable son elementos que existen en la naturaleza en dos o más formas estables y solo difieren en su número de protones, esto aumenta el radio de la molécula lo cual facilita su detección y cuantificación (Peter D. Klein y E. Roseland Klein, 1987). En la Figura 2 podemos observar un ejemplo en el que se compara una molécula normal, un isótopo estable y un isótopo radiactivo de Hidrogeno.

Diversas técnicas se han desarrollado para el cálculo del factor de bioconversión del  $\beta$ -caroteno a retinol como son la detección por absorción de IR (radio del isótopo) y las técnicas de espectrometría de masas, en la cual la cuantificación se lleva a cabo al separar los núcleos atómicos en función a la masa y la carga del elemento. Al hacer uso de estos métodos analíticos, se puede tener un análisis del deuterio en líquidos biológicos, como sangre, orina, saliva y agua procedente del tracto respiratorio (Lura E, y Mechele M., 2004).

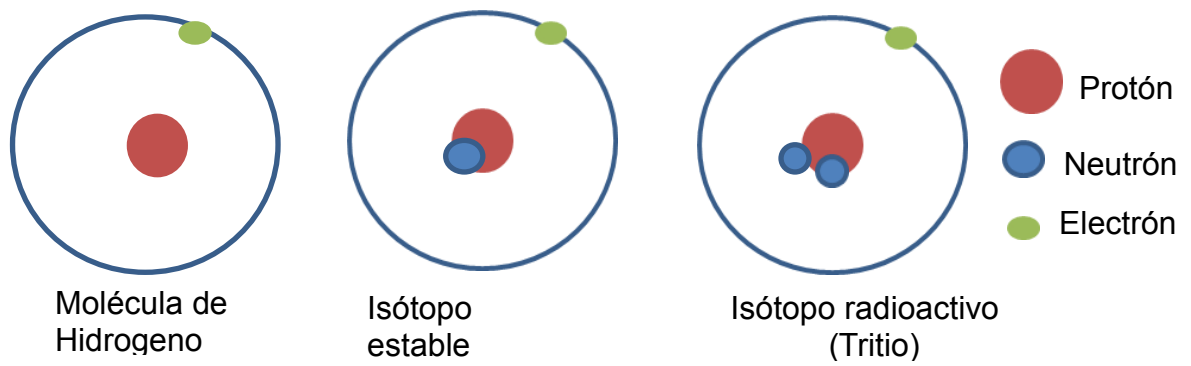


Figura 2.-Diferencias de isotopos estables y radiactivos

## Técnicas de Dilución Isotópica: Vitamina A

El uso de las diversas técnicas de dilución isotópica como retinol marcado, comenzó a implementarse al buscar una forma menos invasiva para la cuantificación de las reservas corporales, ya que el “estándar de oro” para evaluar la reserva de retinol era a partir de una biopsia de hígado, la cual difícilmente consigue y sólo en casos extremos de deficiencia. Así el uso de las técnicas de dilución isotópica con retinol marcado, permite cuantificar la reserva intercambiable de vitamina A en el organismo de la persona (Haskell, et al., 2005). Asimismo, el uso de los isótopos estables y nuevas metodologías permiten cuantificar el factor de bioconversión del  $\beta$ -caroteno en algunos alimentos a retinol, además de emplearse para verificar la eficacia de algunas intervenciones dietarias.

Otros factores a considerar para el uso apropiado de las técnicas de dilución isotópica con vitamina A marcada, es que se debe comprender el funcionamiento y asimilación de la vitamina A y a su vez el funcionamiento del equipo a utilizar para el análisis de las muestras (Vitamin A Tracer Task Force, 2004).

Al conocer algunas de las técnicas que emplean isótopos estables para la evaluación del estado de vitamina A, podemos hablar de usos adicionales para la técnica de dilución isotópica como vitamina A marcada, por ejemplo para medir los cambios de retinol sérico en almacén después de una intervención dietaria en personas con un estado de vitamina A de marginal-normal (Tang, 2010). Ribaya-Mercado et al. en el 2000 realizaron una intervención dietaria a un grupo de escolares filipinos, a los cuales se les dió una dosis de vitamina A marcada al inicio del estudio para poder cuantificar su reserva de retinol antes de la intervención y ésta se comparó con la evaluación final, encontrando que la reserva de vitamina A en los niños, aumentó después de la intervención.

Como ya se había mencionado antes los isótopos estables se han usado para calcular el factor de bioconversión del  $\beta$ -caroteno contenido en algunos vegetales a retinol. De forma general tenemos que se ha estimado el factor de bioconversión del  $\beta$ -caroteno como 2:1, es decir por cada dos moléculas de  $\beta$ -caroteno obtenemos 2 de retinol. Sin embargo dicho factor de bioconversión también depende de otros factores como es la

bioaccesibilidad y grado de absorción, lo cual provoca que por lo general el factor de bioconversión de algunos alimentos sea menor al estimado, (Russell et al, 2003 y West et al., 2003).

Con base en lo anterior se ha calculado del factor de bioconversión del  $\beta$ -caroteno al retinol en diferentes alimentos. En la Tabla 1 se muestra en resumen el factor de bioconversión, el estudio y el vegetal en que se realizó. En base a todo lo anterior, podemos confirmar que el uso de isótopos estables es totalmente seguro para las personas, siendo de gran ayuda para calcular el factor de bioconversión del  $\beta$ -caroteno al retinol en los alimentos, ya que en ninguno de los estudios anteriores se presentó algún problema de salud o efectos secundarios en los sujetos que participaron en los estudios.

Tabla 1.-Publicaciones de factores de bioconversión de alimentos calculado a partir de las técnicas con isótopos estables en diferentes años.

Fuente	Vegetal	Factor de bioconversión del $\beta$ -caroteno a retinol ( $\mu\text{g } \beta$ -caroteno: $\mu\text{g retinol}$ )
Haskell MJ et al., 2004	Camote	13.4:1
	Espinaca	5.5:1
Parker RS. et al., 1999	Zanahoria (cruda)	13:1
Tawanda Muzhingi et al., 2011	Maíz amarillo	1.5-5.3:1

#### Importancia de Medir el Factor de Bioconversión en Alimentos

Como ya se ha mencionado la pro-vitamina A no se encuentra libre en la naturaleza sino que es necesario que se dé una ruptura del  $\beta$ -caroteno para que éste se divida en una o dos moléculas de retinol (Allen, 1988). Es por esto que se realizan experimentos para conocer el factor de bioconversión del  $\beta$ -caroteno en algunos alimentos y así



poder conocer su aporte de vitamina A en el humano. Esta información será de gran ayuda para la organización de futuras intervenciones dietarias, así como promover el consumo de algún alimento en poblaciones DVA.

En el presente estudio se busca evaluar el factor de bioconversión de  $\beta$ -caroteno contenido en las hojas de *Moringa oleifera* para conocer la cantidad apropiada que se debe añadir a un suplemento alimenticio que será usado para combatir la DVA como problema de salud pública mundial.

## OBJETIVO

Determinar el factor de bioconversión del  $\beta$ -caroteno a retinol, contenido en las hojas de *Moringa oleifera* intrínsecamente marcada con deuterio, en niños entre 1 y 2 años de edad.

### Objetivos Específicos

Desarrollar plantas de *Moringa oleifera* intrínsecamente marcadas con deuterio.

Cuantificar el nivel de marcaje en el  $\beta$ -caroteno contenido en las hojas de las plantas marcadas.

Evaluar el estado de vitamina A (retinol sérico) en un grupo de niños de 1 a 2 años.

Realizar el cálculo del factor de bioconversión usando el modelo del Súper niño.

## SUJETOS Y MÉTODOS

### Desarrollo de las Plantas de *Moringa oleifera* en Ambiente Hidropónico rico en Deuterio.

Las plantas de *Moringa oleifera* se desarrollaron en un medio de hidroponía como se muestra en la figura 3. Las semillas fueron germinadas en papel filtro. Hasta desarrollar sus primeras raíces, para después ser trasferidas a contenedores plásticos con una solución nutritiva, y con aireación continua de micronutrientes y una vez comenzada la floración fueron trasplantadas en una nueva solución nutritiva en la que se encontraba el agua marcada ( $^2\text{H}_2\text{O}$ ), con aireación constante para purgar el vapor de agua producido en el ambiente.



Figura 3.- Plantas de *Moringa oleifera* en ambiente rico en deuterio (Baylor College of Medicine Texas, USA).

## Determinación de $\beta$ -caroteno en las Hojas de *Moringa oleifera*

Para determinar el porcentaje de enriquecimiento del  $\beta$ -caroteno marcado, la fracción de  $\beta$ -caroteno fue extraída y recolectada HPLC (usando el mismo procedimiento de recolección de retinol descrito anteriormente), el residuo de los carotenoides fue resuspendido en 200  $\mu$ L de cloroformo y colocados una columna abierta  $\text{NH}_2$  – propyl Strata (500mg/3ml; Phenomex, Torrance, CA) acondicionado con 4mL de hexano el cual fue usado como eluyente. El  $\beta$ -caroteno en hexano fue evaporado bajo  $\text{N}_2$ . Y el residuo resuspendido en 75  $\mu$ L E:T (1:2 por volumen), y en 60  $\mu$ L fueron inyectados en el HPLC en una columna  $\text{C}_{18}$ . El gradiente lineal del solvente comenzó en 60% solvente A y 40% solvente B, cambiando a los 4 minutos y manteniéndose de esta forma por 4 minutos en un 17% solvente A y 83% solvente B, y en los 5 minutos a los 25 min se mantuvo en 10% solvente B y cambiando de nuevo de los 2 a 8 minutos se estabilizó para la siguiente inyección. El  $\beta$ -caroteno se lavó por 17 min, y la elución de 16 – 18 minutos fue recolectada en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).

La LC- ionización química por presión atmosférica –MS (LC-APCI-MS) incluye un sistema Agilent 1100LC (Agilent Technologies) equipada con una columna  $\text{C}_{18}$  Prizm (Keystone Scientific, Bellefonte, PA) y un espectrómetro de masas Esquiere (Bruker Daltonic Inc, Billerica, MA). La fase móvil contenía 75% metanol y 25% E:M:T (75:20:5 por volumen). El espectrómetro de masas cuenta con un scanner a  $m/z$  530 – 560 en 0.1 – Da con un scanner de velocidad de 5.25 scans/s.

## Intervención

### Convocatoria

Previo a la selección de sujetos se obtuvo la aprobación de protocolo de investigación por parte de comité de ética del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), la Coordinación Estatal de Salud y Seguridad Escolar de la Secretaría de Educación y Cultura, y posterior a los permisos y autorizaciones necesarios se efectuaron 2 reuniones en los Centros de Desarrollo Infantil (CENDI) con los padres de niños entre las edades de 1 y 2 años donde se les habló de la importancia de la vitamina A en el desarrollo de los niños.

A los padres interesados que firmaron la carta de consentimiento informado (Anexo 1) se explicó el protocolo del estudio que consistió en la toma de 2 muestras de sangre (5 mL), posterior a la administración de las hojas de *Moringa oleifera*. A los menores se les proporcionara una sola dosis de puré adicionado con 7gr de hojas de *Moringa oleifera* marcada con deuterio. Esto con el fin de realizar un estudio sobre el valor nutricional y clínico que tendrá el consumo de *Moringa oleifera* sobre los niveles de vitamina A en niños pre-escolares de 1 a 2 años.

Los criterios de inclusión y exclusión a tomar en cuenta para poder participar en el proyecto fueron que no presentaran anemia (11mg/dL), no padecer de paracitos intestinales patógenos (*Guardia lamblia*, *Ascaris lumbricoides*) y no presentar desnutrición (puntaje de  $z < -2$ ).

## **Análisis coproparasitológico**

Para descartar la presencia de parásitos intestinales patógenos en los niños que participaron en el estudio se utilizó la técnica de Faust, al cual consiste en que la materia fecal se diluye en un líquido de alta densidad y los parásitos que proporcionalmente son más livianos tenderán a flotar en la superficie. Para esta técnica se utilizó sulfato de zinc al 33% con una densidad de 1.180, (Faust et al., 1939).

## **Evaluación antropométrica**

Para conocer el estado nutricional de los niños con respecto a su crecimiento, se tomó peso y longitud según el protocolo de Lohman recomendado por la OMS (Suverza y Haua, 2010) y se registró su edad de acuerdo a la fecha de nacimiento de los niños proporcionada por sus padres.

A los menores de 2 años se midió su longitud empleando un infantómetro (Figura 4). En los niños mayores de dos años se empleó un estadiómetro (SECA, modelo: 2171721009). Para el registro del peso los niños que podían sostenerse de pie por sí mismos y podían permanecer en la posición adecuada se pesaron de forma normal con una balanza (SECA modelo:8721321959), en cuanto a los niños que no se sostenían solos, se pesaron en los brazos de una instructora de CENDI, quien anteriormente se pesó sola; el peso del niño se registró como la diferencia eliminando el peso de la instructora.



Figura 4.- Medición de la longitud con el uso de un infantómetro

El cálculo de los indicadores antropométricos para los índices de peso para la edad, talla para la edad y peso para la talla se realizó empleando el programa Anthro desarrollado por la OMS, el cual presenta descripciones a fondo con respecto a los patrones de crecimiento de acuerdo al sexo y la edad. Como punto de corte de desnutrición se tomó el score  $z < -2$  DE (WHO, 2006).

### **Detección de Anemia**

Se determinó la concentración de hemoglobina en una muestra de sangre venosa empleando el espectrofotómetro portátil HemoCue® validado contra el método de referencia (Neufeld et al., 2002).

Se consideró como punto de corte para anemia valores menores a 110 g/l de hemoglobina (WHO, 2008).

### **Proteína C Reactiva**

Para la detección de la PCR se usó el kit comercial de RADOX (REF CP2714). El reactivo de PCR contiene un partícula de látex cubiertas con anticuerpos anti – PCR humano. Cuando el reactivo se mezcla con una muestra de suero que contiene niveles de PCR mayor a 6 mg/l las partículas aglutinarán. Esto se interpreta como una muestra positiva. Una muestra positiva indicaría la presencia de infecciones o inflamación en los niños.



## Análisis Dietario

La dieta fue evaluada con el fin de tener un control poblacional con respecto a la alimentación de los niños y su consumo de nutrientes. Esto debido a que la biodisponibilidad del  $\beta$ -caroteno puede verse afectado por diversos componentes de la dieta como la cantidad de grasas absorbidas, la cantidad y calidad de la proteína, ya que suficiente cantidad de proteína de alta calidad favorece a la conversión de los carotenoides a retinol (Gil Hernandez et al., 2005 y Tang et al., 2003).

También se tomó en cuenta el consumo de zinc ya que según Rahman et al., 2002 el consumo de zinc facilita la bioavilidad de la vitamina A, además de que existen pruebas de una relación entre la deficiencia de zinc y de vitamina A.

Con el fin de conocer si el consumo de alimentos en los niños es adecuado para este estudio se llevó acabo un registro de pesado de alimentos en los Centros de Desarrollo Infantil uno y dos, en base al menú de una semana (Figura 5). Con el fin de cubrir la alimentación de los niños en las horas que pasan en casa, se aplicó un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos a los padres de los niños en base a su consumo.



Figura 5.- Registro pesado de alimentos el en CENDI

Los datos obtenidos se analizaron con el uso del diario de alimentos aprobado por la USDA, y comparados con las tablas de recomendaciones de consumo para niños entre uno y dos años que se muestran en el tabla 2 (Bourges et al., 2005)

Tabla 2. Recomendaciones de consumo de nutrimentos tomado de Bourges et al., 2005; Food and Nutrition Board, National Research Council, NAS: Recommended Dietary Allowances 10th ed. National Academy Press, 1989.

	<b>Recomendación</b>
<b>Energía</b>	740 Kcal/día
<b>Proteína</b>	1.00 g/kg/día
<b>Lípidos</b>	25-35 %
<b>Carbohidratos</b>	130 g/día
<b>Hierro</b>	13 mg
<b>Zinc</b>	4.0 mg
<b>Vitamina A</b>	300 µg ER

Papilla Adicionada con Moringa Oleifera Intrínsecamente Marcada con Deuterio.

Cada niño recibió una dosis de 1mg de  $\beta$ -caroteno marcado con deuterio a partir de 7g de *Moringa oleifera* ya que 2g de hojas frescas contenía 0.2 mg de  $\beta$ -caroteno, de acuerdo al análisis por HPLC. Considerando pérdidas de preparación del pure fue que se tomaron 7 gr de hojas de *Moringa oleifera*, las cuales pasaron por un proceso de escaldado (2.5min en agua hirviendo y 2 min en agua fría). Posteriormente, se homogenizaron en un puré de manzana de marca comercial Gerber®, elegido por no

contener vitamina A, y ser el de mayor aceptación entre los niños de 1 a 2 años, de acuerdo a una evaluación sensorial previa.

El puré se preparó una hora antes de ser administrado, para evitar la oxidación de las hojas de *Moringa oleifera* marcadas con deuterio, y que esto no afectara al sabor o la imagen del puré para los niños.

Al finalizar, se administró una cápsula con 1 mg de  $^{13}\text{C}_{10}$  – acetato de retinilo, como dosis de referencia. Asimismo, a fin de construir la curva cinética se resgistró la fecha y hora exacta de la dosificación.

#### Puntos de Muestreo Para la Construcción de la Curva Cinética

A partir de la ingestión de las dosis de vitamina A marcada se organizaron los puntos de muestreo, a partir de las 7.5 hrs post-dosis hasta el día 35.

La construcción de las curvas se realizó siguiendo la cinética de absorción de vitamina A, lo cual permitió se cuantificar el retinol marcado tanto por la dosis de referencia como el retinol formado a partir de la dosis de  $\beta$ -caroteno marcado ( $^{13}\text{C}$  y deuterio, respectivamente), construyendo una gráfica en la que es posible observar el punto máximo de asimilación de la vitamina A, el tiempo que pasa en reserva hasta el momento de su decaimiento al día 35.

Por cuestiones éticas no es posible recolectar 10 muestras de sangre de cada pre-escolar, por lo que se decidió emplear el modelo del “súper niño” (Figura 6) como estrategia para evaluar el factor de bioconversión del  $\beta$ -caroteno a retinol, en una población infantil. Así, cada niño proporcionó dos muestras de sangre en diferentes tiempos de muestreo, de forma que por cada punto en la curva se encontraban 2 -3 niños. Una vez cubiertos los 10 puntos de muestreo, se calcularon los promedios por punto y se analizaron para obtener una sola curva cinética. Con base en el área bajo la curva (AUC), tanto de la dosis de referencia ( $^{13}\text{C}$ ) y el retinol formado con la dosis de

$\beta$ -caroteno, se calculó el factor de bioconversión a partir del  $\beta$ -caroteno en hojas de *Moringa oleifera*.

Dado que la toma de muestra de sangre se realizó en los hogares de los niños participantes, la ubicación de los mismos en los tiempos de muestreo se realizó por conveniencia, de acuerdo a la cercanía entre viviendas de cada niño, para poder cubrir los muestreos en el tiempo adecuado.

Las muestras de sangre tomadas por cada punto se procesaron para determinar la concentración de retinol y carotenos por HPLC (Wang et al 2008). La relación isotópica se midió por el método electron capture negative chemical ionization desrito pro Tang et al., 2009

Los datos obtenidos por HPLC y GS – MS fueron analizados por el programa KaleidaGraph®, buscado obtener la curva de retinol marcado para estimar el factor de bioconversión.

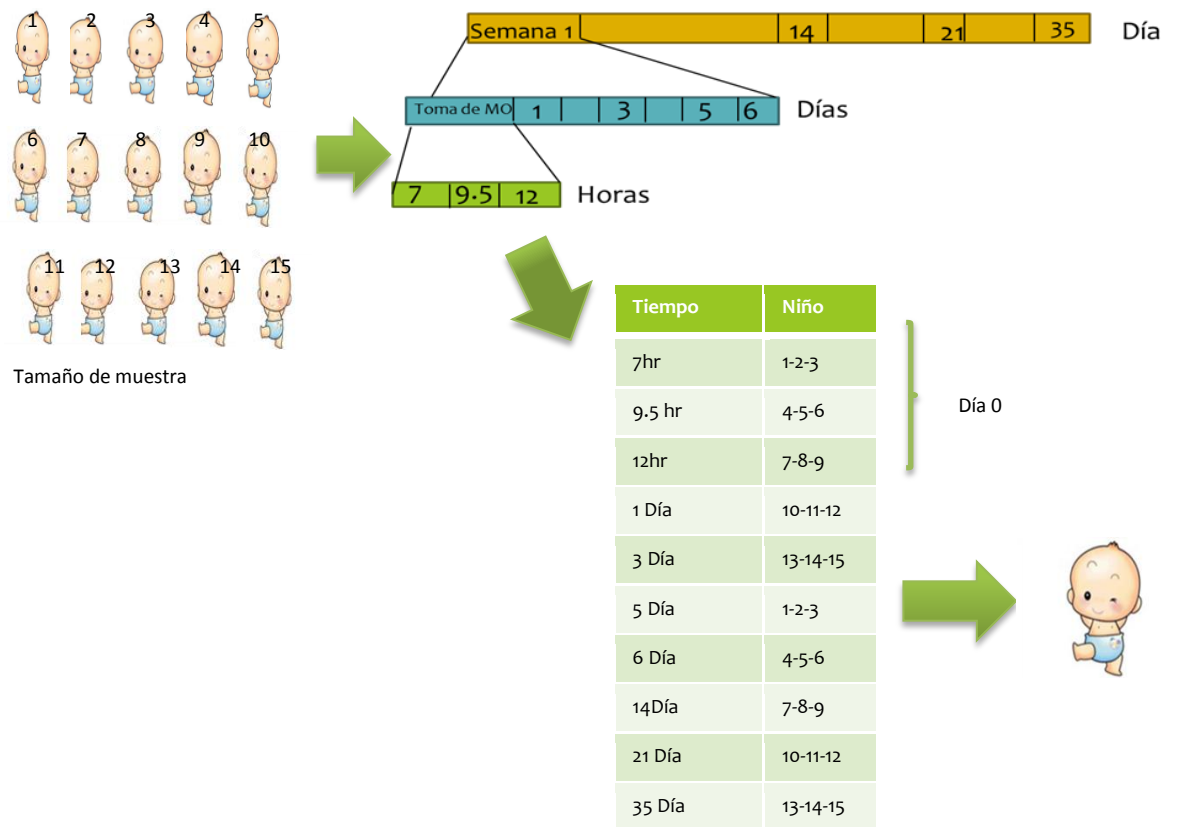


Figura 6.-Modelo del Súper Niño, Haskell et al, 2003.

## Cálculos de Equivalencia de Retinol

El área bajo la curva (AUC sus siglas en inglés) fue calculada con el uso del programa KaleidaGraph de Synergy Software, (<http://www.synergy.com>), para el total de [<sup>2</sup>H] retinol en suero en respuesta de cada dosis de retinol marcado con deuterio (μmol / tiempo), y se comparó con la AUC de la dosis de referencia de vitamina A (1 mg de acetato de retinilo [<sup>13</sup>C<sub>10</sub>]; masa molecular = 338). Los cálculos realizados se muestran en la siguiente fórmula (Tang et al., 2012).

Retinol plasmático total marcado del β-caroteno o del [<sup>13</sup>C<sub>10</sub>] retinyl acetato=  
enriquecimiento isotópico x concentración de retinol x peso corporal x 0.0497

Donde el peso corporal x 0.0497 = volumen total del suero en el cuerpo.

El total de [<sup>2</sup>H] retinol formado de la dosis de β-caroteno se calculó con la siguiente formula.

[<sup>2</sup>H] retinol formado de la dosis de β-caroteno (μmol)= (AUC de [<sup>2</sup>H] retinol / AUC de [<sup>13</sup>C<sub>10</sub>] retinol) x ([<sup>13</sup>C<sub>10</sub>] acetato de retinyl (mg) / 338) x 1000

Donde 338 es el peso molecular del retinol.

## Cálculo del Factor de Bioconversión

La cantidad de  $\beta$ -caroteno marcado contenido en las hojas de *Moringa oleifera* comparado con la cantidad de vitamina A generado a partir de la dosis de  $\beta$ -caroteno es definido como factor de bioconversión, y fue calculado con el uso de la siguiente fórmula (Tang et al., 2012)

Factor de bioconversión del  $\beta$ -caroteno por peso = ( $\beta$ -caroteno en las hojas de *Moringa oleifera* ( $\mu\text{mol}$ ) x 536) / ( $[^2\text{H}]$  retinol formado de la dosis de  $\beta$ -caroteno ( $\mu\text{mol}$ ) x 286)

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización de las Hojas de *Moringa oleifera* Marcadas con Deuterio

#### Contenido de Carotenoides

Al caracterizar las hojas de *Moringa oleifera* se encontró, Luteína, Trans  $\beta$ - caroteno, 9 cis $\beta$ - Caroteno (Figura 7). Para obtener la  $\beta$ -Equivalencia ( $158.65 \pm 9.50 \mu\text{g/g}$ ) se tomó la suma de la concentración de cada uno de estos carotenoides (tabla 3).

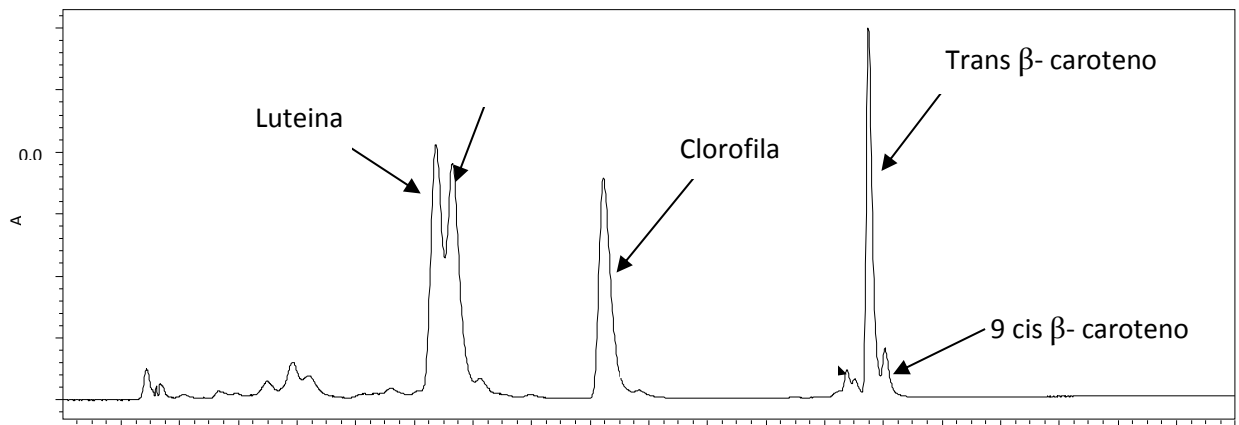


Figura 7.-Perfil de carotenos presente en las hojas de *Moringa oleifera* marcada con deuterio.



**Tabla 3.-** Contenido de carotenoides pro-vitamina A en hojas frescas de *Moringa oleifera* marcada con deuterio.

<b>Carotenoides</b>	<b>Promedio del total de carotenoides(<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>
Luteína	186.58 $\pm$ 22.37
Trans $\beta$ -caroteno	147.41 $\pm$ 8.76
9cis- $\beta$ -caroteno	22.49 $\pm$ 1.49
B-caroteno	158.65 $\pm$ 9.50

### Enriquecimiento Isotópico

El perfil de iones en moléculas de  $\beta$ -caroteno marcado con deuterio en las hojas de *Moringa oleifera* fueron evaluados por LC-APCI-MS, se muestran en la Figura 8, y se observa que la molécula contiene 10 átomos de deuterio, representado por relación masa carga de 547.5 de mbc + 10. Observando el perfil de 537.4 de la masa molecular del  $\beta$ -caroteno sin marcar y una masa molecular del  $\beta$ -caroteno marcado con 547.5 esto mostró la abundancia más alta de enriquecimiento, indicó un marcaje efectivo con deuterio sobre el  $\beta$ -caroteno en las hojas de *Moringa oleifera*.

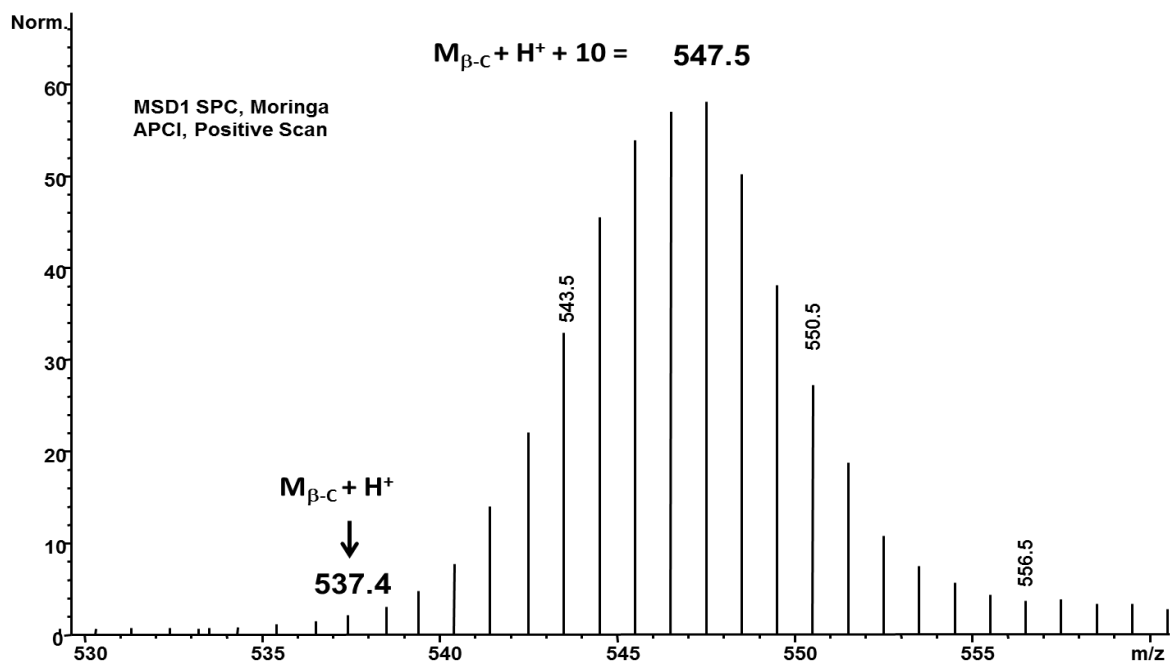


Figura 8.- Perfil de enriquecimiento isotópico del  $\beta$ -caroteno de *Moringa oleifera*, determinado usando cromatografía líquida – ionización química por presión atmosférica – espectrometría de masas.

## Análisis Nutricional

Adicionalmente, se realizó un análisis proximal de las hojas de *Moringa oleifera* el cual se muestra en el Tabla 4. Los porcentajes de proteína, grasa, humedad, cenizas, fibra cruda, extracto libre de nitrógeno y sodio fueron determinados. Estos resultados al ser comparados con trabajos previos (Pérez et al., 2010 y Garavito 2008) se pudieron observar resultados similares indicándonos que la composición de las hojas de MO se mantienen dentro de los mismos rangos de composición.

Tabla 4.- Caracterización proximal de hojas frescas de *Moringa oleifera*

	Resultados
Proteína	26.20%
Grasa	5.16%
Humedad	9.94%
Ceniza	11.7%
Fibra cruda	5.73%
Extracto libre de nitrógeno	41.27%
Sodio	295.57 mg/100 gr

#### Características de los Participantes

Este estudio como se mencionó con anterioridad fue llevado a cabo en los CENDI, en Hermosillo Sonora, los niños participantes estuvieron dentro de un rango de edad de 1 a 2 años, libres de paracitos intestinales patógenos (*Giardia lamblia*, *Ascaris lumbricoides*), no presentaron infecciones respiratorias graves como influenza, y nos aseguramos de que los niños participantes no estuvieran recibiendo antibióticos o consumiendo algún tipo de suplemento vitamínico. También se les llevó acabo un conteo de glóbulos blancos, con el uso de HemoCue®, para verificó que no se presentaran casos de anemia (11mg/dL) dentro del grupo de los participantes. Otro factor que se tomó en cuenta fue que los participantes no padecieran de desnutrición, esto basado en los parámetros establecidos por la OMS (score  $z < -2$ ).

Las muestras de sangre se separó el suero y se analizó con el uso de HPLC con el fin de conocer las concentraciones de retinol y carotenoides presentados en la Tabla 5. Donde se observa una concentración de retinol y carotenoides entre normal y con deficiencia moderada.

Tabla 5. Promedio de las concentraciones de retinol y carotenoides en suero de los participantes.

	Promedio ( $\mu\text{g/dL}$ )
Luteína	11.15 $\pm$ 3.68
Zeaxantina	2.44 $\pm$ 1.05
Criptoxantina	13.69 $\pm$ 8.99
$\alpha$ -Caroteno	3.56 $\pm$ 1.95
$\beta$ -Caroteno	14.22 $\pm$ 6.50
Retinol	1.34 $\pm$ 0.36 *
$\alpha$ -Tocoferol	298.71 $\pm$ 118.93
Licopeno	0.96 $\pm$ 0.44

\*Retinol  $\mu\text{mol/L}$

#### Evaluación Dietaria

La dieta de los participantes fue evaluada de acuerdo a su consumo de vitamina A, energía, proteína, lípidos, carbohidratos, hierro y zinc. En la Tabla 6 podemos observar que en la mayoría no se cumple con el requerimiento de consumo para los niños de entre 1 y 2 años, siendo importante mencionar que solo se tomó en cuenta la cantidad de una porción de la comida y la cena, y que en la mayoría de los casos los niños repetían un segundo plato. Además se realizó un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos con el fin de cubrir la alimentación de los niños fuera de los Centros de Desarrollo Infantil en los que pudimos ver un alto consumo de energía y proteína, considerando las limitaciones de este cuestionario que tiende a sobre estimar algunos nutrientes.

Tabla 6. Ingesta de energía y nutrientes dentro de CENDI 1 y 2.

	CENDI 1	CENDI 2
Energía (kcal)	331.54 ± 117.50	260 ± 133.90
Proteína (g)	15.41 ± 6.23	12.63 ± 7.91
Lípidos (g)	11.15 ± 3.47	9.92 ± 5.83
Carbohidratos (g)	43.82 ± 21.67	31.61 ± 19
Hierro (mg)	4.09 ± 3.63	2.24 ± 1.44
Zinc (mg)	2.42 ± 1.98	2.18 ± 1.58
Vitamina A (RAE)	124.97 ± 116.11	159.07 ± 135.85

#### Retinol Sérico Total y Cálculo del Factor de Bioconversión

Se colectaron un total de 29 muestras de sangre (2 por niño a excepción del sujeto número 15 de que no fue posible obtener la segunda muestra de sangre), de las cuales se cuantificó el nivel de retinol de dosis de referencia de [<sup>13</sup>C<sub>10</sub>] retinol, y del retinol formado a partir de las hojas de *Moringa oleifera*. Se realizó un promedio de las muestras de sangre por cada punto de muestreo la cual se puede observar en el tabla 7.

Tabla 7. Respuesta de los participantes a la dosis de referencia de [ $^{13}\text{C}_{10}$ ] acetato de retinilo y del [ $^2\text{H}$ ] retinol formado a partir del  $\beta$ -caroteno en las hojas de *Moringa oleifera*.

Tiempo de muestreo (Días)	[ $^2\text{H}$ ] retinol (nmol)	[ $^{13}\text{C}_{10}$ ] retinol (nmol)
0.31*	7.24	88.32
0.375*	52.06	179.67
0.5*	5.79	84.94
1	0.00	28.74
3	3.49	11.38
5	12.68	14.23
6	4.27	2.53
14	4.70	2.80
21	2.24	2.00
35	6.52	2.91
Media $\pm$ DS	9.90 $\pm$ 15.19	41.75 $\pm$ 58.74

\*Fracción de día

Los datos obtenidos de retinol de la dosis de referencia y el generado a partir del  $\beta$ -caroteno marcado en las hojas de *Moringa oleifera*, fueron introducidos en el programa KaleidaGraph (Synergy Software, Reading, PA), para ser comparados y obtener el área bajo la curva (AUC) de retinol de la dosis de referencia, con el retinol formado a partir de [ $^2\text{H}$ ]  $\beta$ -caroteno (eje de las y), contra el tiempo en que se tomó la muestra de sangre (eje de las x) (Figura 9), obteniendo que el AUC de la dosis de referencia fue de 59293.78 ng y el AUC del [ $^2\text{H}$ ] retinol fue de 45412.6 ng.

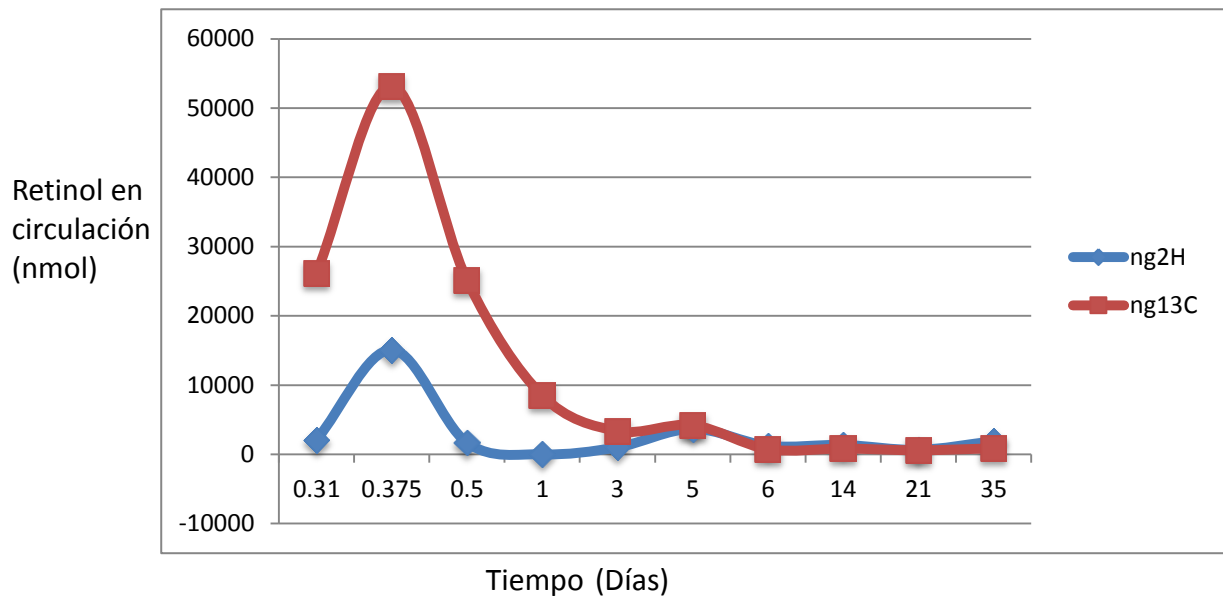


Figura 9. Curvas respuesta del suero a la dosis de  $[^2\text{H}]$  retinol proveniente de las hojas de *Moringa oleifera* (ng2H) y  $[^{13}\text{C}_{10}]$  de acetato de retinilo (ng13C), calculada en base a la cinética de asimilación de vitamina A

El AUC de dosis de referencia y del retinol formado a partir de  $[^2\text{H}]$   $\beta$ -caroteno, estos fueron comparados para obtener el total de  $[^2\text{H}]$  de retinol formado a partir de la dosis de  $\beta$ -caroteno obteniendo un total de 2.3129  $\mu\text{mol}$ .

Al comparar la cantidad de  $[^2\text{H}]$   $\beta$ -caroteno que se les dio a comer a los niños participantes, con la cantidad formada de  $[^2\text{H}]$  de retinol, fue posible calcular el factor de bioconversión por peso del  $\beta$ -caroteno el cual fue de 1.4689, que al redondearlo nos dice que por cada 1.5 moléculas de  $\beta$ -caroteno contenido en las hojas de *Moringa oleifera* se forma una molécula de retinol.

En este estudio fue posible observar que el factor de bioconversión del  $\beta$ -caroteno contenido en las hojas frescas de *Moringa oleifera* muestran una bioconversión eficiente en niños de 1 a 2 años de edad con niveles de retinol sérico normales y con deficiencia moderada, para el caso. Para poder tener

datos más acertados sobre grupos con niveles marginales de vitamina A sería necesario un estudio de mayor duración y número de muestra, para de esta forma poder comprobar la existencia de cambios séricos de concentración de vitamina A.

Además un factor importante a considerar con respecto a la eficiencia de conversión del  $\beta$ -caroteno de las hojas de *Moringa oleifera*, en su composición nutricional, ya que el ser rica en proteína como se muestra en los resultados referentes a la caracterización de las hojas, y que además se ha demostrado que es proteína de buena calidad (Makkar y Becker 1997), ayudando a una mejor biodisponibilidad del  $\beta$ -caroteno. Además, estudios *in-vitro* realizados por Pullakhandam y Falla (2007) mostraron que el contenido de  $\beta$ -caroteno en las hojas de MO presentaron una buena biodisponibilidad y estabilidad durante la simulación gástrica y la digestión en el intestino.

Otro factor que se consideró fue la ingesta de grasa y otros nutrientes antes mencionado, para asegurarnos que estos no interfirieran en la biodisponibilidad de la dosis administrada a los niños participantes (Gil et al., 2005), cuidando que no tuvieran un consumo alto de vitamina A.



## CONCLUSIONES

El modelo del “súper niño” nos brindó una curva cinética acertada con respecto a la asimilación de la vitamina A de manera menos invasiva en niños sanos.

Se obtuvo un factor de bioconversión de 1.5:1 es decir que por cada 1.5 moléculas de  $\beta$ -caroteno en las hojas de *Moringa oleifera* obtenemos una molécula de retinol. Lo cual nos dice que el  $\beta$ -caroteno en las hojas de *Moringa oleifera* está obteniendo una conversión efectiva y casi completa.

## REFERENCIAS

Gil Hernandez, Fermin Sanchez de Medina; Tratado de nutrición: bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición Tomo 1; Editorial: Acción Medica; pag 773; 2005

Miján de la Torre. Técnicas y métodos de la investigación humana. Editorial GLOSA 2002; pag 168.

Roberts. Dra Marg E. O'Brien, Genell Subak-Sharpe. Enciclopedia de la medicina ortomolecular: Nutricéuticos. Ediciones Robinbook 2003.

Biesalki, Grimm. Nutrición: texto y atlas. Editorial medica panamericana 2009

Busani Moyo, Patrick J. Masika, Arnold Hugo y Voster Muchenje. Nutritional characterization of *Morienga (Moringa oleifera Lam)* leaves. African Journal of Biotechnology 2011; 12925:12933 – 60.

Bracamonte. Efecto del consumo de hojas deshidratadas de *Moringa oleifera* sobre los niveles de retinol y carotenoides provitamina A séricos en escolares. Tesis de maestría del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., 2014.

Bourges R., Esther Casanueva, Jorge L. Rosado, Instituto Danone de México. Recomendaciones de ingestión de nutrimentos para la población mexicana. Editorial Medica Panamericana, 2005.

Faust EC, Sawitz W, Tobie J, Odom V, Peres C, Lincicome DR. Comparative efficiency of various techniques for the diagnosis of protozoa and helminth in feces. J Parasitol 1939;25:241-6

Francisco Ruza; Cuidados intensivos pediátricos; Capitel Editores, 2003; pag 1581.

Urtúbia Vacario. Neurobiología de la visión. Universidad Politécnica de Cataluña, EDICIONS UPC 1999. Prodhom. Evaluación y tratamiento de la desnutrición en situaciones de emergencia: Manual del tratamiento de la desnutrición y planificación de un programa nacional. Acción contra el hambre, Caracas 2002.

Peter D. Klein y E. Roseland Klein. Stable isotope usage in developing countries: Safe tracer tool to measure human nutritional status. IAEA BULLETIN, 4/1987

Boteros. Parasitos humanos cuarta edición. Corporación para investigaciones biológicas 2003; pag 464

FAI, Fundación de apoyo infantil Sonora, I.A.P. FAI – Sonora, 2006. Internet: [http://fai-son.org/quienes\\_somos/historia.php](http://fai-son.org/quienes_somos/historia.php)

FAO/OMS informe de consulta mixta de expertos. Necesidades de vitamina A, folatos y vitamina B12. Roma 1991

Fernandez. Moringa oleifera y su impacto en el estado nutricional de vitamina A, hierro y zinc en preescolares: Estudio piloto, Tesis de maestría del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. 2010.

Food and Nutrition Board, National Research Council, NAS: Recommended Dietary Allowances 10th ed. National Academy Press, 1989.

Furr, Michael H. Green, Marjorie Hakell, Najat Mkhtar, Penelope Nestel, Sam Newton, Judy Ribaya-Mercado, Guangwen Tang, Shery Tonumihuatdjo, Emron Wasantsit. Stable isotope dilution techniques for assessing vitamin A status and bioefficacy of provitamin A carotenoids in humans. Public Health Nutrition 2004; 8(6) 596-607

Garavito, U. 2008. Moringa oleifera, alimento ecológico para ganado vacuno, porcino, equino, aves y peces, para alimentación humana, también para producción de etanol y biodiesel. [En línea]. <http://www.engormix.com/MA-avicultura/nutricion/articulos/moringa-oleifera-t1891/141-p0.htm>

Guangweng Tang, Jian Qin, Gregorg G Dolnikowsky, Robert M. Rusell; Short – term (intestinal) and long term (pos intestinal) conversión of  $\beta$ -carotene to retinol in adults as assessed by stable isotope reference method; AmJClinNutr, 2003;78:259-66

Gonzalez B. La increíble Moringa Internet: [https://www.expreso.com.mx/PortalNovo/sitio/interiores.php?s=vernota&id=53078&cod\\_canal=acceso\(05/mayo/2008\).Expreso.com.mx](https://www.expreso.com.mx/PortalNovo/sitio/interiores.php?s=vernota&id=53078&cod_canal=acceso(05/mayo/2008).Expreso.com.mx) 2006.

Haskell MJ, Jamil KM, Hassan F, Peerson JM, Hossaie ML, Fechs GJ et al. Daily consumption of indian spinach (*Basella alba*) or sweet potatoe has a positive impact on total body vitamin A stores of Bagladeshi mean. American Journal Of Clinical Nutrition 2004; 80:705-14.

Haskell, Lembcke JL, Salazar M., Green MH, Peerson JM, Brown KH. Population baser plasma kinetics of an oral dose of [ $^2\text{H}_4$ ] retinyl acetate among preschool – aged, peruan children. Am J Clin Nutr 2003; 77:681 – 6.

Olson. Provitamin A functions of carotenoids: The conversión of B-carotene in to vitamin A. The Journal Of Nutrition 1988; 0022-3266 189.

Jed W. Fahey, ScD. *Morienga oleifera*: A review of the medicinal evidence for its nutritional, therapeutic and prophylactk properties pert 1. Trees For Life Journal 2005.

Mataix Verdú, Emilia Carazo Martín. Nutrición para educadores. Ediciones Díaz de Santos 2005.

Ribaya-Mercado, Florentinos, Solon, Mercedes S. Solon, Marilyn A Cabal-Barza, Christine S. Perfecto, Guangwen Tang, Juun Antonio A Solon, Carla F.

Fjeld y Robert M Rusell. Biconversion of plant carotenoids to vitamin A in filipino school-age children varies inversely whit vitamin A status. The American Journal of Clinical Nutrition 2000; 25:29-6

Khawaja Tahir Mahmood, Thahira Mugal y Ikram UI Haq. *Moringa oleifera*: a natural gift – A review. Khawada Tahir Mahmood et al J Pharm. Sci and Res Vol 2(11), 2010, 775-781.

Lopez Gorge. Fijacion y movilización biológica de nutrietes, Vol 1. Consejo superior de investigaciones científicas (CSIC), 1991.

Matares, Mechele M. Gottschlich. Nutrición clínica practica segunda edición. ELSELVIER science 2004.

Neufeld, Armando García-Guerra, Domingo Sanchez-Francia, Oscar Nerwton-Sánchez, María Dolores Ramiresz-Villalobos, Juan Rivera-Dommarco. Hemoglobin measured by HemoCue and reference method in venons and capillary blood: A validation study. Salud Pública de México /vol 44, no 3 mayo-junio de 2002.

MacCrehan, W.A.; Schönberger, E.; Determination of trans-Retinol,  $\alpha$ -Tocopherol, and  $\beta$ -Carotene in Serumbly Liquid Chromatography with Absorbance and Electrochemical Detection; Clin. Chem., Vol. 33, pp. 1585–1592 (1987).

Makkar, H; Becker, K. Nutrents and antiquality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. JAgrSci Cambridge 1997, 128.311-322

Montoya, P. Impulsando uso de árbol para combater hambruna Internet: [http://www.eluniversal.com.mx/estados/vi\\_60146.html](http://www.eluniversal.com.mx/estados/vi_60146.html) El Univerasal 14 Febrero 2006.

Haskell, Judy D Ribaya-Mercado y The vitamina A tracer task forcé. Handboock on vitamin A tracer dilution methods to asses status and evaluate intervention programs. Breeding Crops For Better Nutrition 2005.

Institutos Nacionales de Salud, Medline Plus. Vitamina A. [En línea] <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/002400.htm> Página actualizada el 2/18/2013

Melvin H. Williams. Nutrición para la salud y condición física y el deporte (bicolor). Editorial Paidotribo España 2002.

Moussan Ndong, Mariko Uehara, Shinichi Katsumata, Shigueru Sato y Kazuharu Suzuki. Preventive effects of M

Parker RS, Swanson JE, Bou CS, Edwards AJ, Huangt T. Bioability of carotenoids in human subjects. *Preceding Of Nutrition Society* 1999; 58:155-62.

Pullakhandam R, Falla M. Micellarization and intestinal cell uptake of beta-carotene and lutein from drumstick (*Moringa oleifera*) leaves. *JMedFood* 2007,10 (2), 252-7.

Rusell RM, Ross AC, Trumb PR, West KP. Retinal equivalency. *International Journal Of Nutrition* 2003; 133:2915-6.

Rohman, Mohammad A Wahed, Gueorge J Fuchs, Abdullah H Baqui y Jose O Alvarez; Synergistic effect of zinc and vitamin A on the biochemical indexes of vitamin A nutrition in children. *AmJ Clin Nutr* 2002;75:92-8

Tawanda Muzhingi, Tendekayi H, Gadoga, Adrew H Siwela, Michael A Grusak, Robert M Rusell y Guangwen Tang. Yellow maize with B-carotene is an efective source of vitamina A in healty zimbabwenn mean. *The American Journal Of Clinical Nutrition* 2011; 510-519:94(2).

Tang, Jian Quin, Gregory G Dolnikowski, Robert M. Rusell y Michael A Grusak. Golden Rice is an efective surce of vitamin A. *AmJClinNutr* 2009;89:1776-83.

Tang, Yumming Hu, Shi-an Yin, Yin Wang, Gerard E Dallal, Michael A Grusak and Robert M Rusell.  $\beta$ -Carotene in golden rice is a good as  $\beta$ -carotene in oil at providing vitamin A to children. *Am J Clin Nutr* 2012;96:658-64.

Van Poppel G, Goldbohn G. Epidemiologic evidence for beta-carotene and cancer prevention. Am J Clin Nutr 1995; 13935-4025:62.

Melo, Oscar Cuamatzi Tapia. Bioquímica de los procesos metabólicos. Editorial Reverte UNAM Xochimilco 2006.

Vitamin A Tracer Task Force. Appropriate use of vitamin A Tracer (stable isotope) methodology. Human Nutrition Institute (ILSI) 2004.

Sanchez Alvarez. Vitamina A inmunocompetencia e infección. Rev Cubana de Alimentacion Nutr 2001; 121-9: 15(2).

Suverza y Haua. El ABC de la evaluación del estado de nutrición. Editorial Mc Graw Hill pag 36, 2010.

Wang, Yin Wang, Zhixu Wang, Lei Li, Jian Qin, Weiqi Lai, Ying Fu, Paolo M Suter, Robert M Russell, Michael A Grusak, Guangwen Tang y Shian Yin. Vitamin A equivalence of spirulina  $\beta$ -carotene in Chinese adults as assessed by using a stable-isotope reference method. Am J Clin Nutr 2008; 87:1730-7

West CE, Eilanden A, Van Lieshout M. Reply to Russell et al. Journal Of Nutrition 2003; 133:2915-6.

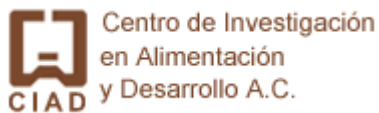
WHO. WHO child growth standards. WHO library cataloguins – in – publication data, 2006. <http://www.who.int/childgrowth/standards/en/>

WHO. Worldwide prevalence of anemia 1993-2005. Global data base on anaemia 2008.

WHO. Global prevalence of vitamin A deficiency in population in risk 1995-2005. Global data base of vitamin A WHO 2009.

## ANEXOS

### Anexo 1. Carta de consentimiento informado



#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, \_\_\_\_\_ he sido informado(a) del proyecto “Eficiencia de bioconversión del  $\beta$ -caroteno de hojas de *Moringa oleifera* marcadas con deuterio como fuente de vitamina A en niños en edades de 1 a 2 años”. Este estudio tiene como objetivo conocer que beneficios tendrá el consumo de la planta *Moringa oleifera* sobre los niveles de vitamina A en preescolares. También se me ha solicitado la participación de mi hijo(a) en dicho estudio.

Se me ha informado que la participación de mi hijo(a) consistirá en lo siguiente:

1. Una preselección inicial que se basará en:
  - a) La medición de su peso, estatura y edad,
  - b) La toma de 3 muestras de sangre (5 mL) de las cuales serán una para la preselección, y de ser seleccionado se tomarán 2 más durante el protocolo del estudio
  - c) La entrega de 3 muestras de heces fecales.

De ser mi hijo(a) seleccionado(a) se realizará un registro en donde se pesarán los alimentos que consuma o no durante el día. Posteriormente y de manera aleatoria recibirá o no, una dosis que consistirá en 6 g de hojas cocidas de *Moringa oleifera*



marcada con deuterio en una porción de puré de papa. Esta dosis será administrada por única ocasión después de que mi hijo(a) sea seleccionado(a). Esto con el fin de realizar un estudio sobre el valor nutricional y clínico que tendrá el consumo de *Moringa oleifera* sobre los niveles y distribución de vitamina A en niños en edad escolar.

Con la firma de la presente carta autorizo la participación de mi hijo(a) \_\_\_\_\_ en dicho estudio en el entendido de que únicamente se realizarán las pruebas aquí descritas. También se me ha informado que los datos proporcionados por mi hijo(a), así como sus resultados serán guardados en la más **estricta y absoluta confidencialidad**, en ningún momento, se utilizarán ni serán proporcionados a terceras personas con fines diferentes a los especificados.

**Beneficios que obtendrá mi hijo(a) al participar en el estudio:**

Conocer su estado de nutrición, haciendo énfasis en sus niveles de vitamina A, de ser necesario recibir un tratamiento antiparasitario y si fuese el caso, ser canalizado a un centro de salud.

**Los estudios que se realizarán serán totalmente gratuitos.**

Por último, se me ha explicado que **la participación de mi hijo(a) en este estudio es totalmente voluntaria** pudiéndose retirar cuando desee. A su vez, tengo derecho a recibir todas las explicaciones necesarias para comprender los procedimientos a los que será sometido(a) por parte del investigador responsable.

\_\_\_\_\_  
**Firma del Padre o Tutor**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Testigo 1**

**Testigo 2**

**Domicilio** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**\_\_Teléfono** \_\_\_\_\_

## Anexo 2. Cuestionario de Frecuencia de consumo de alimentos.

### CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS

Nombre: \_\_\_\_\_  
 Escuela: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Alimentos	Porción Promedio	Tamaño			Frecuencia de consumo					g	Clave	
		CH	M	G	D	S	M	A	R			
<b>Frutas y Jugos</b>												
1- Mango fresco	1 mediano											
2- Néctar de Manzana	1 vaso chico/1 cajita											
3- Néctar de Durazno	1 vaso chico/1 cajita											
4- Néctar de Mango	1 vaso chico/1 cajita											
5- Sandía	1/2 rebanada (media luna)											
<b>Verduras</b>												
6- Aguacate	1/4 de uno mediano											
7- Chile colorado	1 cucharada sopera											
8- Lechuga	1 Hoja mediana											
9- Papas fritas	1 1/2 cucharadas de cocinar											
10- Tomate (crudo, cocido)	1/3 saladez, 1/2 chico											
11- Zanahoria cocida	1/4 de una chica											
12- Zanahoria cruda	1 chica											
<b>Productos Lácteos</b>												
13- Leche de Litro	1 vaso chico											
14- Leche Nutrileche	1 vaso chico											
15- Leche LICONSA (líquida)	1 vaso grande											
16- Leche de Vainilla (DE)	1 cajita											
17- Mantequilla	1 cucharadita											
18- Queso amarillo	1 rebanada, 3/4 cucharada de cocinar											
19- Queso cocido	1 rebanada mediana											
20- Queso fresco (regional)	2 cucharadas soperas											
21- Yopli (danonino yoplait)	1 pieza											
<b>Alimentos para desayuno</b>												
22- Crema de trigo preparada con leche	1/2 plato mediano											
23- Cereal Arroz inflado	1 plato mediano											
24- Cereal Corn Flakes	1 plato mediano											
25- Cereal Corn pops	1 plato mediano											
26- Cereal Especial K	1 plato mediano											
27- Cereal Froot Loops	1 plato mediano											
28- Cereal Trigo inflado	1 plato mediano											
29- Cereal Trix Nestlé	1/2 plato mediano											
30- Cereal Zucaritas	1 plato mediano											
31- Chorizo con Papas	1 1/2 cucharadas de cocinar											
32- Hot cakes	1 1/2 piezas											
33- Huevo crudo y/o cocido	1 pieza											
34- Huevos fritos	1 pieza											



