

MONOGRAFÍA

Efecto de la concentración de triptófano en la solución de riego sobre la concentración de triptófano en las hojas de Spinaca oleracea.

Nombre del alumno: Paola Beato García de Sola

Nombre del supervisor: Mr. Mark Polko

Asignatura: Biología

Recuento de palabras: 3944

05/03/2015

Resumen

Varios son los estudios que han demostrado la relación entre los niveles de serotonina en el cerebro y el estado anímico de las personas. También se ha demostrado la relación entre los niveles del aminoácido triptófano en el individuo y los niveles de serotonina en el cerebro, al ser el triptófano un precursor de dicho neurotransmisor, que está implicado en la modulación de la actividad neuronal, la producción de hormonas y la regulación de la ansiedad (Salín Pascual, 2006). El triptófano es un aminoácido esencial y abundante en alimentos como las espinacas, pudiéndose utilizar como suplemento alimenticio para el tratamiento de los trastornos depresivos. El presente trabajo trata de responder a la pregunta de investigación: ¿Puede aumentarse la concentración del aminoácido triptófano en plantas de *Spinaca Oleracea* aumentando la concentración del mismo en la solución de riego de las plantas?

Se sembraron 25 plantas de *Spinaca Oleracea* que se dividieron en cinco grupos de cinco. Tres semanas después de la siembra, las plantas de *Spinaca Oleracea* se regaron cada dos días con soluciones de cacao y agua de 50 ml al 0%, 10%, 20%, 30% y 40%. Después de tres semanas de tratamiento, se determinó espectrofotométricamente la concentración de triptófano en moles·L⁻¹ de las soluciones de riego y de extractos de hojas de *Spinaca Oleracea*.

Los resultados obtenidos muestran una correlación positiva entre la concentración del aminoácido en la solución de riego y la concentración de triptófano en hojas de *Spinaca Oleracea*. Si bien las espinacas no alcanzan una concentración de triptófano suficiente para considerarlas suplemento alimenticio para la depresión, la concentración de triptófano aumenta en un 51,6%. Estos resultados sugieren que sería conveniente usar mayores concentraciones de triptófano, quizá trabajando con triptófano aislado, con objetivo de observar mayores concentraciones de triptófano en las hojas de espinaca.

Recuento de palabras: 297

Índice

Resumen	2
Introducción.....	4
Procedimiento.....	7
Resultados.....	9
Procedimiento para la recta de calibrado	9
Obtención del valor de la concentración de triptófano en solución de riego.....	11
Procedimiento para el análisis de los extractos de hoja de <i>Spinaca Oleracea</i>	13
Conclusión y evaluación.....	19
Apéndices	22
Apéndice 1: Materiales	22
Apéndice 2: Materiales para la recta de calibrado	22
Apéndice 3: Materiales para el análisis de las muestras de espinacas.....	22
Referencias	23

Introducción

La depresión es, según la OMS, “la principal causa de discapacidad mundial”, afectando a más de 350 millones de personas en el mundo (Llaquet, 2014). En España, el informe SESPAS (Sociedad Española de Salud Pública y Administración Sanitaria) asegura que los trastornos depresivos han aumentado un 19,4% entre 2006 y 2010 (Cortés-Franch & González López-Varcárcel, 2014). El vicepresidente de la Asociación Española de Psiquiatría Privada (ASEPP) afirma que la "*causa fundamental*" del gran incremento en su incidencia mundial "*ha sido el estilo de vida que llevamos: dormimos poco, comemos mal y hacemos poco ejercicio*" (Anónimo, 2014).

La depresión tiene un fundamento biológico, si bien es cierto que tiene una dimensión psicológica. Diferentes estudios sugieren que la depresión se debe a cambios en los niveles o en la actividad de ciertos neurotransmisores¹ en el cerebro- como la serotonina, noradrenalina y dopamina- relacionados con el humor y la motivación (Goldberg, 2014).

En cuanto al tratamiento, la presidenta de la Asociación Española de Neuropsiquiatría indica que, en ocasiones, los médicos prescriben antidepresivos para síntomas moderados, mientras que estos fármacos están indicados para el trastorno depresivo mayor. "*Para ello sí son útiles. Pero para paliar el sufrimiento cotidiano son más eficaces otras terapias que mejoran y no cronifican el sufrimiento humano al que se responde farmacologizando*". Además, una encuesta realizada por el Collaborative Psychiatric Epidemiology Surveys (CPES) mostró que el 89% de los adultos estadounidenses que consumieron antidepresivos entre 2001 y 2003 no habían sido diagnosticados por psiquiatras (Pagura & Katz LY, 2011).

La función de los antidepresivos consiste básicamente en alterar las funciones químicas del cerebro, afectando a las sinapsis cerebrales aumentando la cantidad de neurotransmisor disponible (Rigo, 2013). Pero lo cierto es que la efectividad de estos medicamentos para combatir las depresiones moderadas está en cuestión. Así, un estudio realizado en 2008 sobre la eficacia de tres de los principios activos de los antidepresivos (fluoxetina, venlafaxina y paroxetina), determinó que en pacientes que no tenían síntomas depresivos graves, los antidepresivos eran igual de útiles que un placebo (Kirsch, Deacon, & Huedo-Medina, 2008).

Hacer ejercicio físico- por la producción de endorfinas²- o llevar una dieta sana son buenas alternativas dado que la serotonina se sintetiza a partir del aminoácido triptófano (figura 1), que el cuerpo no produce. Consumir alimentos ricos en triptófano como la leche, el

¹ *Los neurotransmisores son biomoléculas generadas por las neuronas en la sinapsis neuronal que permiten el intercambio de información entre neuronas y, con ello, la transmisión del impulso nervioso* (Brown & Wallace, 1989).

² *Las endorfinas son biomoléculas que funcionan como neurotransmisores. Se producen durante la realización de ejercicio físico y tienen un efecto analgésico, de forma que altos niveles de endorfinas reducen la sensación de dolor y otras sensaciones negativas* (W. McGilvery, 1977)

chocolate o las espinacas incrementa la producción de serotonina y, así, nuestro bienestar (Bravo, 2011). Una vez incorporado el triptófano es hidroxilizado para producir el 5-hidroxitriptófano, que precede a la formación de serotonina (Leathwood, 1987).

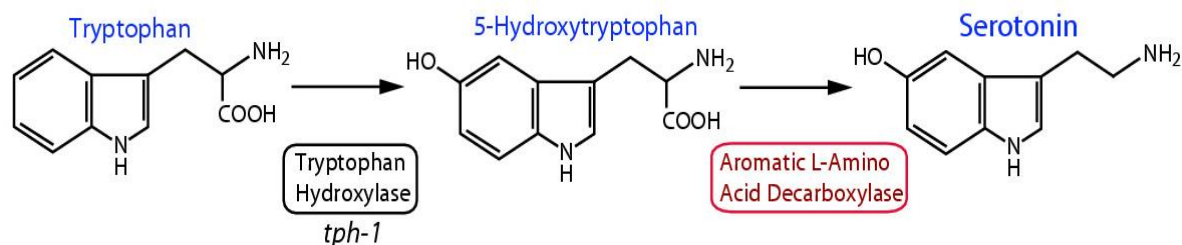


Figura 1. Biosíntesis de serotonina a partir del aminoácido L-triptófano (Hare & Loer, 2004)

En particular, las espinacas son verduras de fácil accesibilidad, bajo coste, facilidad de cultivo y rapidez de crecimiento. Además, se consumen con bastante frecuencia y según el Centro de Asuntos Agrícolas de la Universidad de California, su consumo per cápita ha aumentado considerablemente desde principios de siglo (Borris & Kreith, 2006).

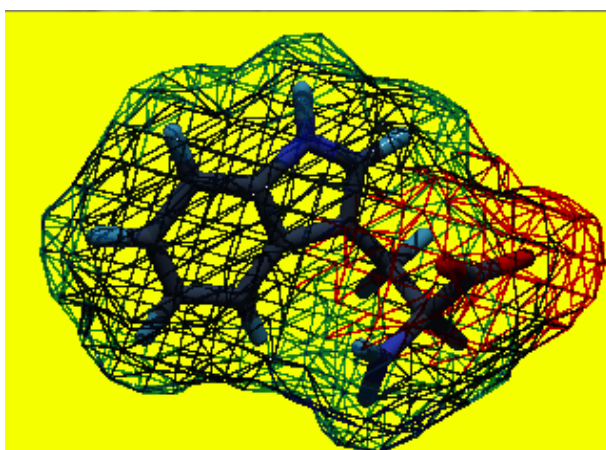


Figura 2. Diagrama molecular del aminoácido L-triptófano con mapa de potencial electrostático (Cash, n.d)

El presente trabajo tiene el objetivo de aumentar la concentración de triptófano (figura 2) de las espinacas para que sirvan de suplemento alimenticio en el tratamiento de la depresión. Para ello, se trata de responder a la pregunta de investigación: **¿Puede aumentarse la concentración del aminoácido triptófano en plantas de *Spinaca Oleracea* aumentando la concentración del mismo en la solución de riego de las plantas?**

Puesto que la composición química del agua de riego de las plantas tiene un efecto edáfico (J. González, 2012), es decir, en las propiedades del suelo y, por consiguiente, un efecto en la fisiología y producción de la planta (Committee, 1995), aumentando la concentración de triptófano en la solución de riego de *Spinaca Oleracea*, cuya concentración de triptófano en condiciones normales es de $0.39 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (USDA, 2011), podrá aumentarse la concentración de triptófano de la propia planta, que se medirá espectrofotométricamente a partir de extractos de hojas. Para preparar soluciones ricas en triptófano, se preparan soluciones de cacao y agua al 0%, 10%, 20%, 30% y 40%; pues el cacao tiene una alta concentración de triptófano ($2.93 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) (USDA, 2011).

Lejos de obtener una planta medicinal como el *ginkgo biloba*³, se busca un suplemento alimenticio para personas con tendencias depresivas o con depresiones leves. Como se ha comentado, estas personas en ocasiones consumen antidepresivos sin receta médica y estos, además de ser inútiles si la depresión es leve, tienen efectos secundarios (insomnio, fatiga, estreñimiento) (Timms, 2014). Estas espinacas podrían suponer un sustituto sano, seguro y barato que les permitiera evitar los efectos secundarios y no someter al organismo a químicos que no necesita. Por otro lado, para los casos de depresiones mayores donde los antidepresivos son necesarios, podría complementar la acción de los mismos.

³ *El ginkgo biloba es una planta medicinal de cuyas hojas se obtienen los extractos que se utilizan en terapias de diversas enfermedades tales como el Alzheimer o la depresión. La efectividad de esta planta medicinal es elevada, pero el hecho de que no haya muchos ejemplares unido a su reducida área de distribución geográfica dificulta su acceso (Sun, 1998).*

Procedimiento⁴



Figura 3. Veinte de las macetas de espinacas en condiciones controladas.

para controlar las condiciones de viento, humedad, temperatura y luz, de manera que el único factor que pueda causar alguna diferencia en la composición de las plantas sea la concentración de triptófano del agua de riego (que será la variable independiente). Durante las tres primeras semanas las macetas se riegan con 50 ml de agua en días alternos, es decir, se regaban un día y al día siguiente no, con objeto de que las semillas germinaran sin anomalías y las plantas dispusieran de hojas antes de comenzar con el tratamiento.

Una vez transcurridas estas tres semanas, las plantas comienzan a regarse con distintas soluciones (figura 2). Estas soluciones se prepararon a partir de una solución madre, de 40 gramos de cacao de uso culinario disueltos en un litro de agua. Dicha solución se diluye con objeto de obtener cinco concentraciones crecientes de triptófano. Se prepararon, por tanto, cinco soluciones de 250 ml: una al 0% (250 ml de agua y 0 ml de solución madre), otra al 10% (25 ml de solución madre en 225 ml de agua), al 20% (50 ml de solución madre en 200 ml de agua), al 30% (75 ml de solución madre en 175 ml de agua) y al 40% (100 ml de solución madre en 150 ml de agua). Las plantas fueron regadas con 50 ml de solución en días alternos de manera que había un grupo de cinco plantas que se regaba con las soluciones al 10%, otro que se regaba con las soluciones al 20%, etc. Este tratamiento se llevó a cabo durante tres semanas después de las cuales se llevó a cabo la obtención de datos en el laboratorio.

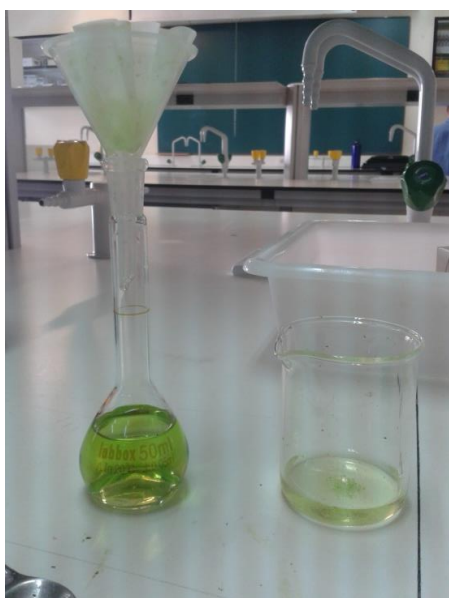


Figura 4. Preparación de solución de riego al 20% para plantas

⁴ Todo el material utilizado queda recogido en el Apéndice 1.

La variable dependiente, que es la concentración de triptófano de la hoja de *Spinaca Oleracea* se cuantificó mediante espectrofotometría. Sobre la base de la ley de Lambert-Beer, es posible determinar la concentración c , de una sustancia conociendo la absorbancia, Abs , el coeficiente de extinción molar, ϵ , y la longitud de la cubeta que se introduce en el espectrofotómetro, l . Esto es así porque la absorción de luz de una sustancia a una determinada longitud de onda está relacionada con la concentración de dicha sustancia en el compuesto que se está analizando, la longitud de trayectoria de la luz al atravesar la muestra y el coeficiente de extinción molar (Pedrajas Cabrera, n.d).

$$Abs = \epsilon \times c \times l$$



Para ello, se obtuvieron extractos de hojas de espinacas de cada grupo y, tras machacarlas con nitrógeno líquido en un mortero, se disolvieron en etanol filtrando la solución (figura 3). Estas muestras se sometieron a espectrofotometría para utilizar la Ley de Lambert-Beer y determinar la concentración de triptófano en las muestras de espinaca. De esta manera, puede establecerse una relación entre la concentración de triptófano en las soluciones de riego y la concentración de triptófano en las muestras de espinacas (Harris, 2007).

Figura 5. Muestra de solución de hojas de espinaca y etanol para el espectrofotómetro.

Resultados

En un primer análisis de la espectrofotometría de las soluciones de riego, se comprobó que eran demasiado opacas para que la luz pasara a través de la solución, por lo que fueron diluidas. Además, puesto que el triptófano es poco soluble en agua (Jean-Claude & Neylon, 2009) al tener cadenas laterales no polares (W. McGilvery, 1977), en las soluciones de riego podían observarse partículas en suspensión que alterarían los resultados de la espectrofotometría al dispersar la luz. Por ello, aunque el triptófano es solo moderadamente soluble en etanol (Belitz, Grosh, & Schieberle, 2009), se probó este solvente; puesto que era el que después se utilizaría para las espinacas. Se realizó una recta de calibrado para confirmar que se estaba midiendo la absorbancia del triptófano sin demasiada dispersión de luz.

Procedimiento para la recta de calibrado⁵

1. Añadir 0,5 ml de la solución madre al matraz de disolución y añadir etanol hasta alcanzar los 100 ml. Repetir el proceso para 1 ml, 2 ml, 3 ml y 4 ml de solución madre.
2. Someter las disoluciones a espectrofotometría con una longitud de onda de 280 nm (Arenas Sosa & López Sánchez, 2004).
3. Para un uso apropiado del espectrofotómetro es necesario hacer cero con una muestra de etanol antes de comenzar, pues es el solvente utilizado para las muestras. Seguidamente se introducen las muestras, registrando la absorbancia observada.

En la siguiente tabla se muestra la absorbancia del triptófano a 280 nm en función de la concentración de la solución madre en una disolución de etanol de 100 ml, así como las medias y las desviaciones estándar calculadas.

⁵ *Todo el material utilizado queda recogido en el Apéndice 2.*

Tabla 1: Absorbancia del triptófano a 280 nm en función del volumen de la solución madre en una disolución con etanol.

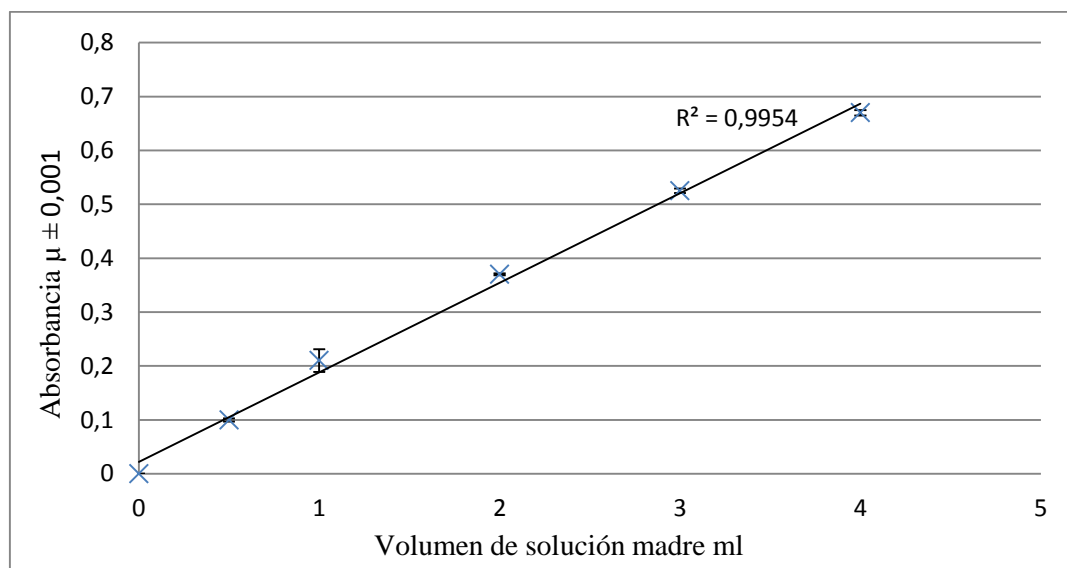
Volumen solución madre ml $\pm 0,0004$	Volumen etanol ml $\pm 0,05$	Muestras	Absorbancia U.A $\pm 0,001$
0,0000 ⁶	100,00	-	0,000
0,5000	99,50	1	0,100
		2	0,102
		3	0,101
		4	0,096
		5	0,103
		Media	0,100
		SD	0,003
1,0000	99,00	1	0,235
		2	0,190
		3	0,230
		4	0,195
		5	0,200
		Media	0,210
		SD	0,021
2,0000	98,00	1	0,370
		2	0,371
		3	0,368
		4	0,374
		5	0,369
		Media	0,370
		SD	0,002
3,0000	97,00	1	0,525
		2	0,519
		3	0,530
		4	0,527
		5	0,523
		Media	0,525
		SD	0,004
4,0000	96,00	1	0,673
		2	0,668
		3	0,670
		4	0,675
		5	0,663
		Media	0,670
		SD	0,005

⁶ Los datos de la absorbancia de aquellas soluciones que tenían 0 ml de la solución madre solo están recogidos una vez porque en todas las pruebas dieron 0, ya que la prueba era solo etanol y en las soluciones de riego solo agua y ninguno de los dos contiene triptófano en condiciones normales.

En el proceso se observó que unos diez minutos después del preparado de las soluciones, algo de cacao se depositaba en el fondo de los matraces y había que agitarlos.

A continuación se muestra un gráfico que muestra el contenido de la tabla.

Gráfico 1: Absorbancia del triptófano a 280 nm en función del volumen en ml de la solución madre en una disolución de 100 ml de etanol.



La absorbancia del triptófano aumenta conforme aumenta el volumen de la solución madre en la disolución. En el gráfico puede verse que la recta de calibrado es muy exacta ($R^2=0,9954$) ya que los datos se ajustan muy bien con la ecuación lineal, siendo el coeficiente de determinación prácticamente 1. Esto indica que los datos que obtengamos son fiables. Además, en el gráfico se han representado las barras de error, pero son tan pequeñas que apenas son visibles, lo que indica que la dispersión de los datos es muy pequeña y, por tanto, los resultados son muy precisos.

Obtención del valor de la concentración de triptófano en solución de riego

Con estos datos y la ley de Lambert-Beer, se calculó la concentración de triptófano de la solución madre a partir de la absorbancia del triptófano en la solución de 1/100 ml, la longitud de la cubeta de cuarzo utilizada (1 cm) y el coeficiente de extinción molar que es $5690 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ⁷ (Gill & von Hippel, 1989) para compararla con la concentración de triptófano de las hojas de *Spinaca Oleracea* que se obtendrá posteriormente. Así:

$$Abs = \varepsilon \times c \times l ; 0,210 = 5690 \times c \times 1 ; c = \frac{0,210}{5690} = 0,0000369 = 3,69 \times 10^{-4} M$$

⁷ Esto quiere decir que si se sometiera a espectrofotometría una solución 1 M de triptófano en una cubeta de 1 cm, la absorbancia sería 5690 y por tanto se dice que este es su coeficiente de extinción molar. Gráficamente, el coeficiente de extinción molar se relaciona con la pendiente de la recta de calibrado (Skoog, West, & Holler, 1996).

Una vez determinada la concentración de triptófano de la solución 1/100 ml es de $3,69 \times 10^{-4}$ M, para determinar la concentración de triptófano de la solución madre, basta con multiplicar este valor por 100, puesto se ha diluido cien veces para poder medir la absorbancia con el espectrofotómetro.

$$3,69 \times 10^{-4} \times 100 = 3,69 \times 10^{-2} M$$

Conocida la concentración de triptófano de la solución madre y el volumen de solución madre presente en la solución de riego, se puede obtener las concentraciones del aminoácido de cada solución.

$$\frac{3,69 \times 10^{-2} \times 5 \text{ ml}}{50 \text{ ml}} = 0,003690 M$$

$$\frac{3,69 \times 10^{-2} \times 10 \text{ ml}}{50 \text{ ml}} = 0,007380 M$$

$$\frac{3,69 \times 10^{-2} \times 15 \text{ ml}}{50 \text{ ml}} = 0,011107 M$$

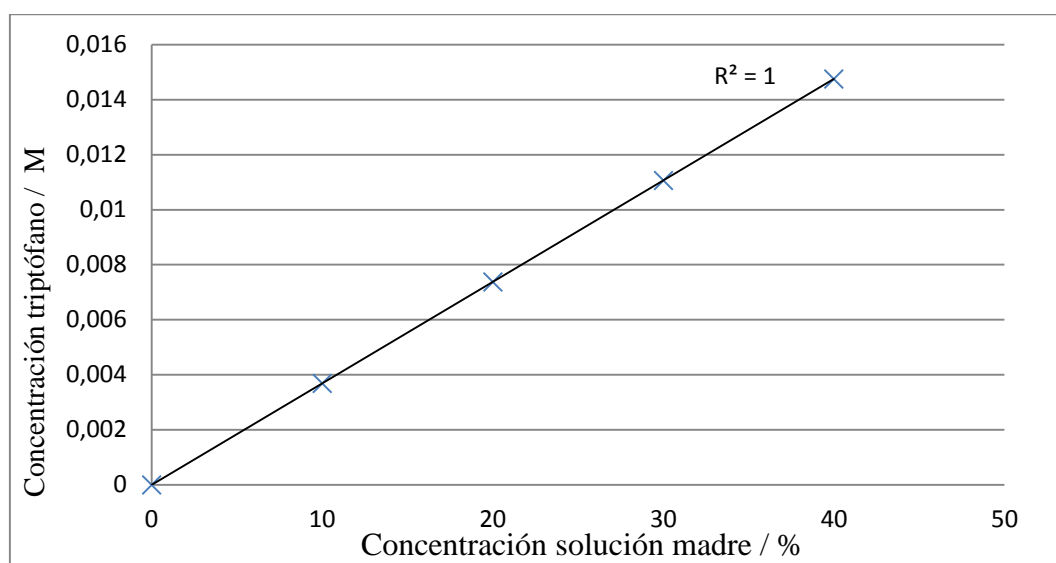
$$\frac{3,69 \times 10^{-2} \times 20 \text{ ml}}{50 \text{ ml}} = 0,01476 M$$

A continuación se presentan los datos de las concentraciones de triptófano en las diferentes soluciones de riego en una tabla y un gráfico.

Tabla 2: Concentración de triptófano en solución de riego en función de la concentración de solución madre.

Concentración solución madre %	Concentración triptófano M
0	0,000
10	0,003690
20	0,007380
30	0,011107
40	0,01476

Gráfico 2: Concentración de triptófano en solución de riego en función de la concentración de solución madre.



En este gráfico se aprecia cómo la concentración del triptófano va aumentando a medida que la concentración de la solución madre aumenta en la solución de riego, es decir, en este rango son directamente proporcionales.

A continuación, se muestra el procedimiento y la obtención de datos de las muestras de espinacas.

Procedimiento para el análisis de los extractos de hoja de *Spinaca Oleracea*⁸

1. Añadir nitrógeno líquido al mortero e introducir las muestras de hojas de espinacas (unos 3 gramos) de una maceta.
2. Machacar las hojas hasta obtener un polvo fino.
3. Pesar la muestra.
4. Verter 50 ml de etanol en un vaso de precipitado y añadir la muestra de espinacas. Mezclar con la cucharilla.
5. Preparar el matraz de disolución con el embudo y el papel de filtro y filtrar la solución (figura 3).
6. Someter la muestra a espectrofotometría. Repetir el proceso con las veinticinco muestras de espinacas.

La siguiente tabla recoge la masa de las muestras de espinacas, la concentración de las disoluciones y la absorbancia de triptófano a una longitud de onda de 280 nm, así como las medias y las desviaciones estándar.

⁸ Todo el material utilizado queda recogido en el Apéndice 3.

Tabla 3: Absorbancia de triptófano en muestras de hojas de espinacas en función de la concentración de triptófano en la solución de riego.

Concentración de triptófano en solución de riego	Muestra	Masa g ± 0,01	Concentración espinacas ⁹ g·ml ⁻¹	Absorbancia U.A ± 0,001
0,00000	1	0,25	0,0050	0,110
	2	0,23	0,0046	0,075
	3	0,21	0,0042	0,116
	4	0,24	0,0048	0,095
	5	0,23	0,0046	0,087
	Media	0,23	0,0046	0,097
	SD	0,01	0,0003	0,017
0,00369	1	0,20	0,0040	0,120
	2	0,18	0,0036	0,143
	3	0,20	0,0040	0,100
	4	0,19	0,0038	0,090
	5	0,16	0,0032	0,085
	Media	0,19	0,0037	0,108
	SD	0,02	0,0003	0,024
0,00738	1	0,26	0,0052	0,197
	2	0,25	0,0050	0,118
	3	0,24	0,0048	0,175
	4	0,24	0,0048	0,133
	5	0,20	0,0040	0,125
	Media	0,24	0,0048	0,150
	SD	0,02	0,0005	0,035
0,01107	1	0,40	0,0080	0,260
	2	0,37	0,0074	0,295
	3	0,40	0,0080	0,250
	4	0,32	0,0064	0,370
	5	0,37	0,0074	0,395
	Media	0,37	0,0074	0,314
	SD	0,03	0,0007	0,065
0,01476	1	0,20	0,0040	0,193
	2	0,21	0,0042	0,073
	3	0,23	0,0046	0,185
	4	0,23	0,0046	0,331
	5	0,29	0,0058	0,220
	Media	0,23	0,0046	0,200
	SD	0,03	0,0007	0,092

$$^9 \text{Concentración espinacas} = \frac{\text{gramos de extracto de hoja de espinaca}}{\text{mililitros de solución}}$$

Como se puede ver en la tabla, existen ligeras diferencias entre las concentraciones de espinacas en las disoluciones analizadas. Esto hace que la diferencia en las absorbancias no se deba solo a la concentración de triptófano en el extracto de hoja, sino a la cantidad de muestra en la solución. Para conseguir la misma concentración de hojas de espinaca en etanol, de manera que solo interfiera la concentración de triptófano de la solución de riego, se utilizará el siguiente modelo, donde la “concentración estándar”, será la menor concentración con la que se ha trabajado (0,0037 gml⁻¹) para lograr la “absorbancia esperada”:

$$\frac{\text{Concentración estándar} \times \text{Absorbancia real}}{\text{Concentración real}} = \text{Absorbancia esperada}$$

$$\frac{0,0037 \times 0,097}{0,0046} = 0,0780^{10}$$

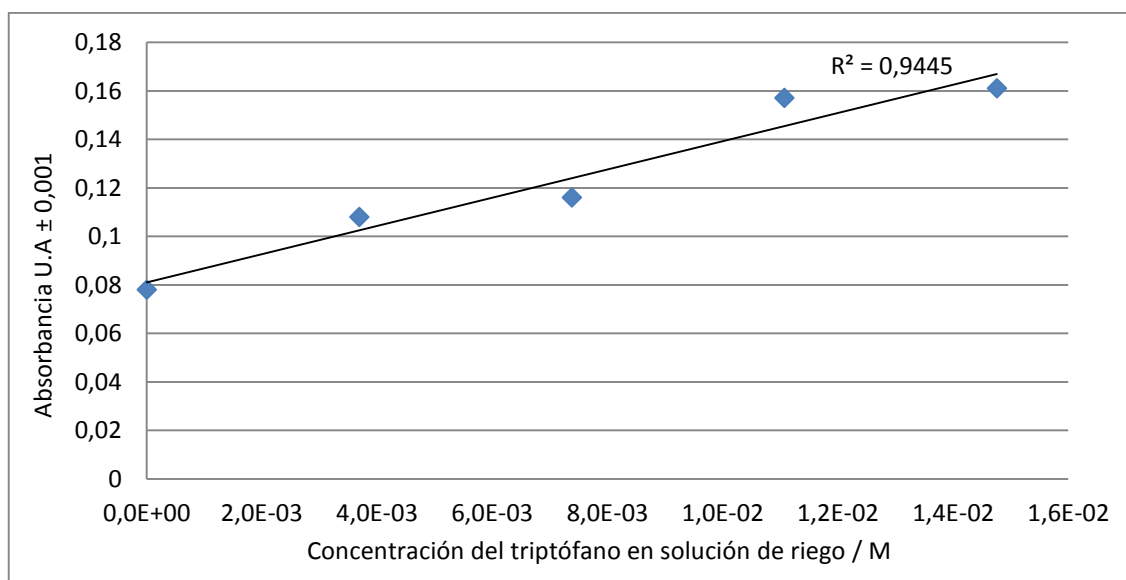
$$\frac{0,0037 \times 0,150}{0,0048} = 0,116$$

$$\frac{0,0037 \times 0,314}{0,0074} = 0,157$$

$$\frac{0,0037 \times 0,200}{0,0046} = 0,161$$

A partir de los datos calculados, se plantea un gráfico en el que se representa la absorbancia del triptófano esperada en las muestras de espinaca si estas tuvieran una “concentración estándar” de 0,0037 gml⁻¹.

Gráfico 3: Absorbancia del triptófano en muestras de espinacas en función de la concentración de triptófano de la solución de riego.



¹⁰ Nótese que el valor está redondeado a tres cifras significativas en lugar de a dos pues se corresponde con una absorbancia, que se han representado con tres cifras significativas en el presente trabajo.

En este gráfico se aprecia cómo conforme va aumentando la concentración de triptófano en la solución de riego, va aumentando la absorbancia del triptófano en las muestras de espinacas.

Se representa el aumento de la absorbancia de triptófano de los extractos de hojas de espinacas como porcentaje, siguiendo el siguiente modelo:

$$\text{porcentaje de aumento} = \frac{\text{Absorbancia mayor} - \text{Absorbancia menor}}{\text{Absorbancia mayor}} \times 100$$

Así, se puede observar cómo el aumento en el valor de la absorbancia es más notable entre la primera y la segunda concentración, aumentando en un 27,8%; y entre la tercera y la cuarta, aumentando en un 26,1%. Por otro lado, el aumento de la absorbancia de triptófano en los extractos de hoja de espinaca entre la cuarta y la quinta concentración es muy pequeño (2,48%). Además, se aprecia que la absorbancia de triptófano de los extractos de hojas de espinacas que fueron regados con la solución de riego de mayor concentración de triptófano ($1,476 \times 10^{-2} \text{ M}$) ha aumentado en un 51,6 % con respecto a la absorbancia de triptófano de los extractos de hoja del grupo Control (regados solo con agua).

Por otro lado, la línea de mejor ajuste, que en este caso es lineal ya que es una relación de proporcionalidad directa, tiene un coeficiente de determinación elevado de 0,9445, lo que indica un ajuste muy bueno con la relación de proporcionalidad directa.

A continuación se hará uso de la Ley de Lambert-Beer con objeto de conocer la concentración de triptófano en las muestras de espinacas.

$$Abs = \varepsilon \times c \times l$$

$$0,0780 = 5690 \times c \times 1; c = 1,37 \times 10^{-5} \text{ M}^{11}$$

$$0,108 = 5690 \times c \times 1; c = 1,89 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$0,116 = 5690 \times c \times 1; c = 2,04 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$0,157 = 5690 \times c \times 1; c = 2,76 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$0,161 = 5690 \times c \times 1; c = 2,83 \times 10^{-5} \text{ M}$$

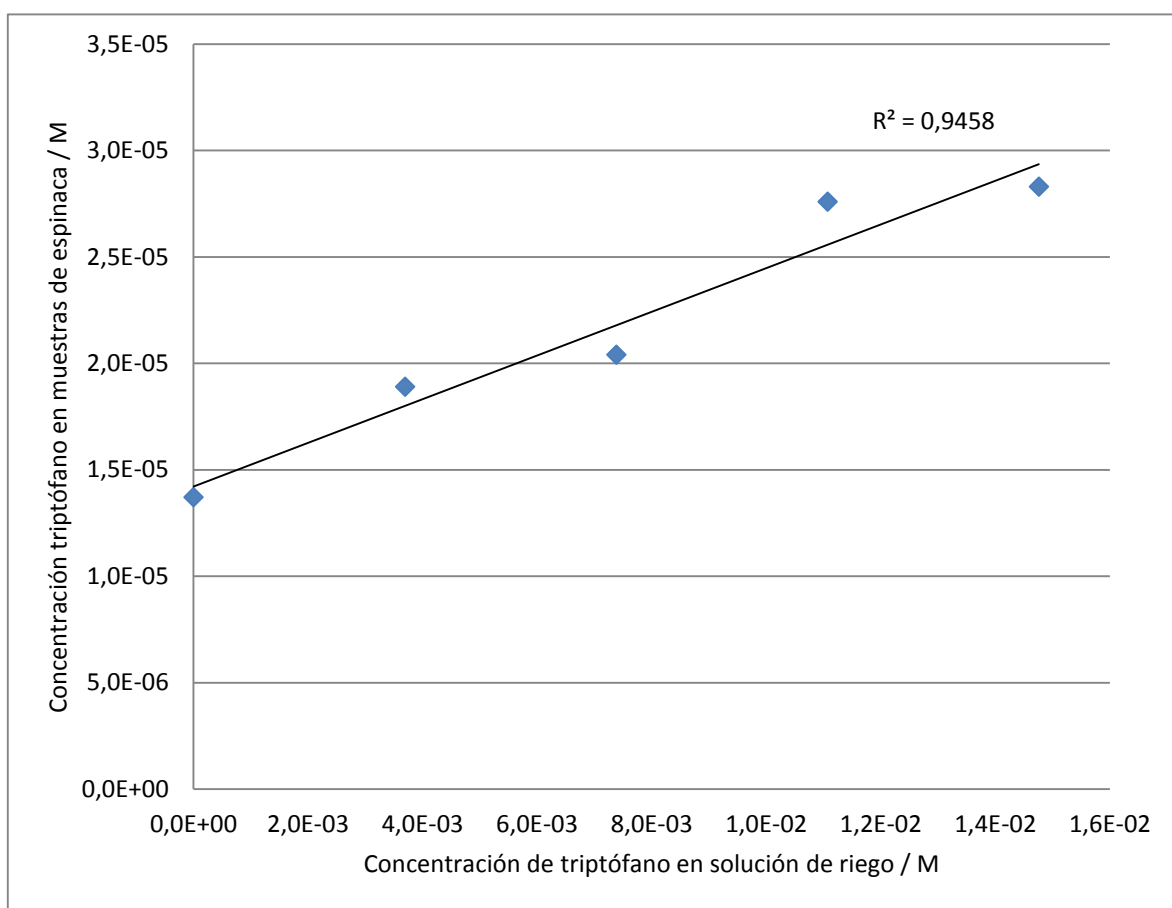
Se presenta una tabla que recoge los datos calculados y un gráfico que representa la concentración de triptófano en las muestras de espinacas en función de la concentración del mismo en las soluciones de riego.

¹¹ Nótese que los valores de concentración han sido redondeados a tres cifras significativas, pues eran necesarias para que existiera una diferencia significativa entre los valores.

Tabla 4: Concentración de triptófano en las muestras de espinaca en función de la concentración de triptófano en las soluciones de riego

Concentración de triptófano en solución de riego / M	Concentración de triptófano en muestra de espinaca / M
0,000	$1,37 \times 10^{-5}$
$3,690 \times 10^{-3}$	$1,89 \times 10^{-5}$
$7,380 \times 10^{-3}$	$2,04 \times 10^{-5}$
$1,107 \times 10^{-2}$	$2,76 \times 10^{-5}$
$1,476 \times 10^{-2}$	$2,83 \times 10^{-5}$

Gráfico 4: Concentración de triptófano en las muestras de espinaca en función de la concentración de triptófano en las soluciones de riego



En el gráfico puede apreciarse cómo la concentración de triptófano en las muestras de espinacas aumenta conforme aumenta la concentración del mismo en la solución de riego.

Se presenta el aumento de la concentración de triptófano en los extractos de hojas de *Spinaca Oleracea* como porcentaje siguiendo el siguiente modelo:

$$\text{porcentaje de aumento} = \frac{\text{Concentración mayor} - \text{Concentración menor}}{\text{Concentración mayor}} \times 100$$

De nuevo se observa lo comentado en el gráfico anterior acerca de las diferencias en el grado de aumento de la concentración de triptófano entre un punto y otro, encontrando la diferencia más pequeña entre las dos últimas concentraciones, con un aumento del 2,47 %. Mientras que los mayores porcentajes de aumento se encuentran entre la concentración de triptófano de los extractos de hoja que fueron regados con la concentración al 0% y los que fueron regados con la concentración al 10%, habiendo aumentando en un 27,5%; y entre la tercera y la cuarta concentración, habiendo aumentando en un 26,1%. Finalmente, se puede observar que ha habido un aumento del 51,6% en la concentración de triptófano en los extractos de hojas de *Spinaca Oleracea* que fueron regadas con la solución de riego al 40% con respecto a la concentración de triptófano en los extractos de hojas de espinacas del grupo Control (0% de solución madre).

La línea de mejor ajuste encaja muy bien con los datos, con un coeficiente de determinación de 0,9458, lo que indica un buen ajuste de los datos a la relación de proporcionalidad directa. Sin embargo, es cierto que la diferencia entre los valores es pequeña.

A continuación se realiza el test de Spearman para evaluar la intensidad de la correlación entre ambas variables.

Tabla 5: Test de correlación de Spearman

Concentración de triptófano en solución de riego	Rangos	Concentración de triptófano en muestras de espinaca	Rangos	Diferencia (d)	Diferencia ² (d ²)
0,000	1	$1,37 \times 10^{-5}$	1	0	0
$3,690 \times 10^{-3}$	2	$1,89 \times 10^{-5}$	2	0	0
$7,380 \times 10^{-3}$	3	$2,04 \times 10^{-5}$	3	0	0
$1,107 \times 10^{-2}$	4	$2,76 \times 10^{-5}$	4	0	0
$1,476 \times 10^{-2}$	5	$2,83 \times 10^{-5}$	5	0	0
				$\sum(d^2)$	0
				N	5
				R _s	1

El valor de R_s es 1, lo que quiere decir que existe una correlación positiva directa muy fuerte entre las variables (Gonzalez Losada, 2004). Por otro lado, todas las desviaciones estándar calculadas en el presente trabajo (de las masas de las muestras de espinaca, de las concentraciones y de las absorbancias) son muy pequeñas pues los valores son bastante más pequeños que el 33% de las correspondientes medias, lo que indicia que la dispersión en los datos es pequeña.

Conclusión y evaluación

Los resultados obtenidos muestran claramente que la concentración de triptófano en las espinacas aumenta a medida que aumenta la concentración de triptófano en la solución de riego. Estos datos sugieren, respondiendo a la pregunta de investigación planteada, que sí se puede aumentar la concentración de triptófano en las hojas de *Spinaca Oleracea* aumentando la concentración del mismo en la solución de riego. No obstante, los resultados solo muestran correlación entre las dos variables, pero esto no quiere decir necesariamente que haya una relación causal.

Puesto que tanto las incertidumbres de los instrumentos utilizados como las SD de los datos son pequeñas, se puede mantener que los resultados son muy precisos y, por tanto, fiables. No obstante, el hecho de que la mayoría de los datos hayan sido obtenidos a partir de cálculos puede provocar que sean muy teóricos, pues los datos no han podido observarse directamente en el laboratorio. Por otro lado, aunque la cantidad de triptófano en las espinacas ha aumentado en un 51,6%, el contenido de triptófano de la planta sigue siendo demasiado pequeño como para que pueda considerarse un suplemento alimenticio eficaz contra la depresión. Esto puede estar causado porque las concentraciones de triptófano en las soluciones de riego eran muy pequeñas. Por ello, probablemente no sería rentable económicamente regar las plantas con una solución de cacao, al menos no con tan baja concentración. Para futuras investigaciones, sería recomendable utilizar mayores concentraciones de cacao en la solución de riego, tal vez se podría establecer el tratamiento de manera intermitente, de forma que se regaran las plantas con soluciones de cacao en días alternos y el resto de los días con agua, para asegurar que no se estropeen los cultivos y reducir costes. También podrían regarse las plantas con mezclas de agua y triptófano aislado, pues si bien el triptófano no es lo suficiente soluble en agua como para someter la disolución a espectrofotometría, para regar una planta la mezcla es suficiente. Así podría aumentarse considerablemente la concentración de triptófano -especialmente en grandes plantaciones en las que el gran volumen del agua de riego permitiría el uso de una gran masa de triptófano-, a la par que se evitaría la espectrofotometría de las muestras de las soluciones de riego, pues ya se conocería la concentración de triptófano.

En cuanto a posibles debilidades del experimento, debe destacarse el hecho de que las soluciones de etanol y espinaca se saturaban y no llegaban a disolverse del todo. Al quedar pequeñas partículas de espinaca en la solución, tuvieron que filtrarse y en el papel de filtro quedaban algunos restos de espinaca, por lo que las concentraciones con las que se ha trabajado son ligeramente mayores a las concentraciones reales. Una solución a este problema podría ser pesar el resto de espinaca que queda en el papel de filtro tras filtrar la muestra (una vez que el etanol se hubiera evaporado y el fino polvo de espinaca estuviera seco) y restárselo al peso de la muestra. Asimismo, también se podría trabajar con una menor masa de espinaca o un mayor volumen de etanol para asegurar que las soluciones no se saturasen.

Por otro lado, al preparar las muestras de solución madre y etanol para el espectrofotómetro, se observó que las partículas de cacao no llegaban a disolverse del todo,

induciendo dispersión en la absorbancia. Para solucionar el problema de la escasa solubilidad del cacao, debido a su contenido en grasa, puede recurrirse al proceso de alcalización del cacao con un agente alcalinizante como el carbonato de potasio para reducir su contenido en grasa y hacerlo más soluble en agua (Fore, 2012). Además, podría calentarse la solución madre puesto que el aumento de la temperatura aumenta la solubilidad de las partículas (Wallace, 2014).

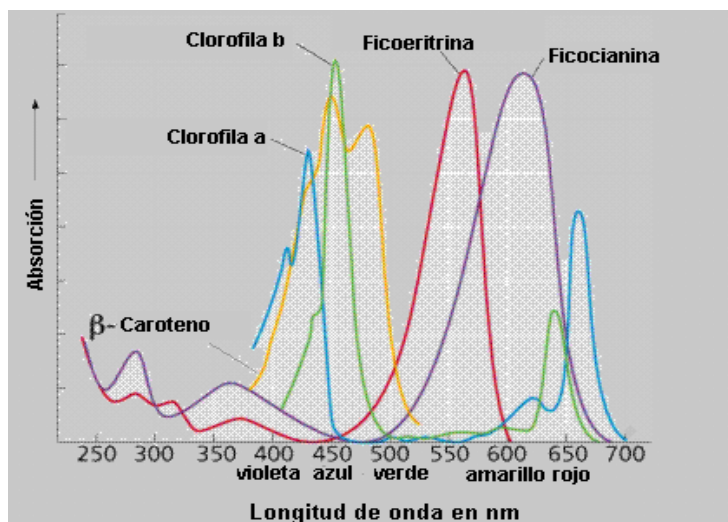


Figura 4. Gráfico que representa la absorción de los pigmentos de las plantas a distintas longitudes de onda. (Raisman & Gonzalez, 2000)

Por otro lado, los betacarotenos¹², presentes en las espinacas (0,05626 mg/g) (USDA, 2011), tienen una longitud de onda en el espectro de absorción de entre 280-290 nm (figura 4), lo que ha podido provocar que en la espectrofotometría parte de la luz absorbida se debiera a los betacarotenos y no al triptófano. Para solucionar este problema, sería conveniente aislar el aminoácido. Esto puede hacerse añadiendo papaína a las muestras e incubándolas a 64°C durante 16

horas. Así, la papaína rompería los enlaces peptídicos y dejaría libre los aminoácidos. A continuación se añadiría el reactivo colorimétrico que en el caso del triptófano es el reactivo de Hopkins-Cole (ácido glioxílico, ácido acético glacial y magnesio). Este reactivo reaccionaría con el triptófano, tiñendo la muestra de un color violeta. Se someterían estas muestras a espectrofotometría con una longitud de onda de 560 nm (Attaway, 2011). De esta manera se asegura que lo único que absorba la luz sea el producto de la reacción del triptófano con Hopkins-Cole, cuya absorbancia sería proporcional a la del triptófano.

La posibilidad de aumentar la concentración de triptófano en las espinacas hasta obtener un suplemento alimenticio proporciona al depresivo una alternativa a los antidepresivos para evitar sus efectos secundarios (fatiga, mareos, insomnio...) (William, 2013) e incluso la posible adicción a estos medicamentos. También permitiría evitar que personas que no sufren trastornos depresivos severos consumieran medicamentos que no necesitan (Kirsch, Deacon, & Huedo-Medina, 2008). Además, las espinacas son verduras con un alto contenido en otros nutrientes como el hierro y en vitaminas A y C (USDA, 2011), que se incorporaría en el organismo del consumidor, pudiendo incluirse también en las dietas destinadas a la pérdida de peso, pues estas verduras contienen un 0% de grasa y su alto

¹² Los carotenos son pigmentos orgánicos encontrados en las plantas y en organismos unicelulares como algas y hongos que funcionan como promotores de las vitaminas. En concreto el betacaroteno es la más eficaz provitamina A de nuestros alimentos. (González, 2011)

contenido en triptófano estimularía la producción de serotonina, involucrada en la sensación de saciedad del individuo (Ross, 2012). Por todo ello, las implicaciones éticas, económicas y farmacéuticas de la presente investigación son remarcables.

En conclusión, se ha comprobado que existe una relación de proporcionalidad directa muy fuerte ($R_s=1$) entre la concentración de triptófano de la solución de riego y la concentración de triptófano de las hojas de *Spinaca Oleracea* en el rango estudiado, llegando a aumentar la concentración de triptófano en un 51,6 %.

Apéndices

Apéndice 1: Materiales

- 25 macetas de 15 cm de diámetro
- 100 semillas de espinacas
- 8,75 kg de mantillo
- Agua
- 120 gr de cacao en polvo sin azúcar al 72 %
- Jeringuilla 50 ml
- 1 recipiente de 1 l
- 5 recipientes de 250 ml

Apéndice 2: Materiales para la recta de calibrado

- Pipeta de 1 ml
- Pipeta de 5 ml
- 500 ml de etanol
- Cubeta de cuarzo
- Matraz de disolución de 100 ml
- Espectrofotómetro
- Cuentagotas
- Solución madre

Apéndice 3: Materiales para el análisis de las muestras de espinacas

- Muestras de hojas de cada maceta de espinacas (cuatro o cinco hojas por maceta)
- Nitrógeno líquido
- Mortero
- Cucharilla de metal
- 1,25 l de etanol
- 5 matraces de disolución de 50 ml
- Vaso de precipitados
- Papel de filtro
- Embudo
- Cuentagotas
- Cubeta de cuarzo
- Espectrofotómetro
- Balanza
- Recipiente de plástico para pesar la muestra

Referencias

- Anónimo. (23 de Abril de 2014). *La nueva España*. Obtenido de El 40% de los españoles padece ansiedad o depresión: <http://www.lne.es/vida-y-estilo/salud/2014/04/23/40-espanoles-padece-ansiedad-o/1575210.html>
- Arenas Sosa, I., & López Sánchez, J. L. (2004). *Métodos de laboratorio*. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología, Cuernavaca.
- Attaway, M. (4 de Mayo de 2011). *CIMMYT*. Obtenido de Cuantificación de triptófano en maíz: <https://www.youtube.com/watch?v=OmEbwacIRY0>
- Belitz, H., Grosh, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*. Springer Science & Business Media.
- Borris, H., & Kreith, M. (Febrero de 2006). *Agricultural Marketing Resource Center*. Obtenido de Commodity Profile: Spinach : <http://aic.ucdavis.edu/profiles/Spinach-2006.pdf>
- Bravo, H. (3 de Junio de 2011). *Innatia*. Obtenido de Antidepresivos naturales: Alimentos ricos en triptófano para la falta de serotonina: <http://web.ua.es/en/cae/documentos/p-psicoeducational/foods-that-produce-serotonin.pdf>
- Brown, T., & Wallace, P. (1989). *Psicología Fisiología*. Mexico: Mc Graw Hill .
- Cash, M. (n.d). *Tryptophan*. Obtenido de Stick model of L-tryptophan with electrostatic potential map.: <http://tryptophan.net/trp/trp.html>
- Committee, C. F. (1995). *Manual de fertilizantes para horticultura*. México: Uteha-Noriega Editores.
- Cortés-Franch, I., & González López-Varcárcel, B. (2014). *Informe SESPAS 2014*. Sociedad española de salud pública y administración sanitaria. Gaceta Sanitaria.
- Fore. (27 de Febrero de 2012). *Ingredients Supply*. Obtenido de ALKALIZED VS NATURAL COCOA POWDER: <https://www.ingredient-supply.com/blog/alkalized-vs-natural-cocoa-powder>
- Gill, S., & von Hippel, P. (1989). *Calculation of Protein Extinction Coefficients of Amino Acid Sequence Data*. University of Oregon, Institute of Molecular Biology and Department of Chemistry. Oregon: Academic Press. Obtenido de ResearchGate: <http://www.thinkpeptides.com/peptidemeasuring.html>
- Goldberg, J. (2 de Julio de 2014). *WebMD*. Obtenido de Causes of depression: <http://www.webmd.com/depression/guide/causes-depression>
- Gonzalez Losada, S. (2004). *Métodos de Análisis de datos en Ecología*. Córdoba: Universidad de Alcalá.

- González, M. (1 de Agosto de 2011). *La Guía Química* . Obtenido de Carotenos: <http://quimica.laguia2000.com/elementos-quimicos/caroteno>
- Hare, & Loer. (2004). *BMC Evolutionary Biology*. Obtenido de Serotonin and Dopamine Biosynthesis pathways: <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/4/24/figure/F1?highres=y>
- Harris, D. (2007). *Análisis químico cuantitativo* . Elche: Reverté.
- J. González, M. (12 de Agosto de 2012). *WATERANDTURF Group*. Recuperado el 23 de Mayo de 2014, de La importancia de conocer el agua para el riego de superficies de césped natural (Parte 1): <http://www.waterandturf.com/la-importancia-de-conocer-el-agua-para-el-riego-de-superficies-de-cesped-natural-parte-1/>
- Jean-Claude, B., & Neylon, C. (12 de Diciembre de 2009). *Nature Precedings*. Obtenido de Open Notebook Science Challenge: Solubilities of Organic Compounds in Organic Solvents: <http://precedings.nature.com/documents/4243/version/3/files/npre20104243-3.pdf>
- Kirsch, I., Deacon, B. J., & Huedo-Medina, T. B. (26 de Febrero de 2008). *Plos Medicina*. Obtenido de Initial Severity and Antidepressant Benefits: A Meta-Analysis of Data Submitted to the Food and Drug Administration: <http://www.plosmedicine.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pmed.0050045>
- Leathwood, P. (1987). *Journals Cambridge ORG*. Obtenido de Tryptophan availability and serotonin synthesis : http://journals.cambridge.org/download.php?file=%2FPNS%2FPNS46_01%2FS0029665187000223a.pdf&code=c5d7b8e0369f22ff13924f0d065b8fde
- Llaquet, L. (26 de Mayo de 2014). *Diario del prisma*. Obtenido de Depresión, la principal causa de enfermedad entre los jóvenes españoles: <http://diarioelprisma.es/depresion-jovenes/>
- Olguin, S. (19 de Marzo de 2010). *Plantas para curar*. Obtenido de Usos medicinales y aplicaciones curativas de la espinaca: <http://www.plantasparacurar.com/usos-medicinales-y-aplicaciones-curativas-de-la-espinaca/>
- Pagura, J., & Katz LY, M. R. (25 de Enero de 2011). *National Center for Biotechnology Information*. Obtenido de Antidepressant use in the absence of common mental disorders in the general population.: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21294990>
- Pedrajas Cabrera, J. R. (n.d). *Universidad de Jaen*. Recuperado el 26 de Enero de 2014, de Utilización del espectrofotómetro en prácticas de Bioquímica: <http://www4.ujaen.es/~pedrajas/Espectrofotometria.swf>

- Raisman, J., & Gonzalez, A. M. (Enero de 2000). *Hipertextos del área de Biología* . Obtenido de Fotosíntesis: conceptos previos: <http://www.biologia.edu.ar/plantas/fotosint1.htm>
- Rigo, E. (12 de Junio de 2013). *Medciencia*. Obtenido de ¿Cómo funcionan los antidepresivos? : <http://www.medciencia.com/como-funcionan-los-antidepresivos/>
- Ross, J. (2012). *The Diet Cure*. Paperback. Obtenido de AMINO ACIDS.
- Salín Pascual, R. (Septiembre de 2006). *Ciencia Y Desarrollo El Conocimiento A Tu Alcance* . Obtenido de LA SEROTONINA Y LOS ESTADOS ANÍMICOS: <http://www.cyd.conacyt.gob.mx/199/Articulos/LaSerotonina/Laserotonina01.htm#a>
- Skoog, D., West, D., & Holler, J. (1996). *Fundamentos de Química Analítica*. Reverte.
- Sun, W. (1998). *The IUCN Red List of Threatened Species*. Obtenido de Ginkgo biloba: <http://www.iucnredlist.org/details/32353/0>
- Timms, D. P. (Junio de 2014). *Royal College of Psychiatrists*. Obtenido de Antidepressants: <http://www.rcpsych.ac.uk/mentalhealthinformation/mentalhealthproblems/depression/antidepressants.aspx>
- USDA. (7 de April de 2011). (USDA) - *Nutrient Database for Standard Reference*. Obtenido de Full Report (All Nutrients): 19165, Cocoa, dry powder, unsweetened: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/6146?fg=&man=&lfacet=&count=&max=25&sort=&qlookup=cocoa+powder&offset=&format=Full&new=&measureby=>
- USDA. (7 de Diciembre de 2011). *National Nutrient Database for Standard Reference*. (United States Department of Agriculture) Obtenido de Agricultural Research Service: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3202?fg=&man=&lfacet=&count=&max=25&sort=&qlookup=spinach+raw&offset=&format=Full&new=&measureby=>
- W. McGilvery, R. (1977). *Conceptos bioquímicos*. Barcelona: Reverte.
- Wallace, S. (16 de Agosto de 2014). *OMANHENE The cocoa bean company* . Obtenido de The details . . . What is Dutched cocoa powder and why does it matter?: <http://www.omanhene.com/post-number-2-of-2-the-details-what-is-dutched-cocoa-powder-and-why-does-it-matter/>
- William, C. (30 de Septiembre de 2013). *Antidepressants*. London , United Kingdom .