



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

11
2EJ

FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION QUIMICA Y BIOLOGICA DE LA
GRASA CRUDA Y DESTOXIFICADA DE DOS
SEMILLAS DE ERYTHRINA
MEXICANAS



EXAMEN DE PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

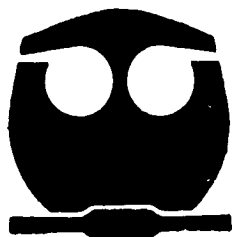
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

ARMANDO CONCA TORRES



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Prof. Ángela Sotelo López
Vocal	Prof. Pedro Valle Vega
Secretario	Prof. Bernardo Lucas Florentino
1er. Suplente	Prof. Miguel Hernández Infante
2o. Suplente	Prof. Hugo Sousa Rojano

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 111, Departamento de Farmacia de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, UNAM.

El presentó trabajo contó con el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) a través de beca para tesis de licenciatura.

Sustentante


Armando Conca Torres

Asesor del tema


M. en C. Bernardo Lucas Florentino

AGRADECIMIENTOS.

Al M. en C. Bernardo Lucas Florentino por todo su interés y ayuda brindada en el desarrollo de este trabajo y muy especialmente por aquella vieja frase de que siempre hay segundas oportunidades.

A todos mis maestros a lo largo de la carrera que me brindaron sus conocimientos, pero más agradezco a aquellos que además me ayudaron a desarrollar mi criterio y fomentaron siempre mi curiosidad.

A todos mis compañeros y compañeras de la 1a. generación de Químicos y Químicas de Alimentos, ya que me hicieron ver que a pesar de las diferencias y por ellas mismas se puede aprender siempre de la gente.

A mis amigos y amigas en el Departamento de Alimentos y Biotecnología que estuvieron conmigo desde antes de la corta migración al edificio de enfrente: Lulú, Jorge, Fabián, Gaby, Juanita, Lupita, Julieta, Mónica, Gloria, Rodrigo, Amelia F. y Agustín R..

A mis compañeros del laboratorio III del Departamento de Farmacia por aguantarme (y aguantarlos) durante casi 11 meses.

Pero principalmente a la Facultad de Química de la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

DEDICATORIAS.

Creo que aquí puedo ser un poco menos solemne que en la página anterior, así que me tomaré ciertas libertades.

Dedico en una forma extremadamente especial este trabajo y toda mi formación anterior a mi gran familia y que a pesar de que no se note en ocasiones mucho, los quiero a todos: a la "gran señora" (y ésto sin asomo alguno de burla) Virginia (Vicky, Lola, Bodo, etc.); a mis hermanos Rosa, Alejandra, Guillermo y Jesús (el p. de p.) que siempre me han apoyado en todo y que a base de muchos topes me han ayudado a madurar; a mi hermano Ezequiel, a Marilú y a las "latas" Guillermo, Alejandro y Mariana.

Y para nada me olvido de los 4 "bodrios" Stepan Arkadievich (Ismael), Fitolais (Rodolfo), la Rana (René) y Noernia (Noé), por aquellas inolvidables e incluso interminables partidas de ajedrez y dominó. Para los 4 chiles tomates.

Por aquellas pláticas filosóficas y por las no tanto, a Víctor y Rolando.

Y "last but not least".

Te dedico esta tesis Tommy porque siempre has estado en los momentos cruciales en estos últimos 3 ó 4 años, fueran ya dulces o amargos. Y sí siempre tendremos cosas en común.

Índice.

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. GENERALIDADES	3
2.1 Situación de los aceites y grasas comestibles en México.	4
2.2 Conceptos generales sobre grasas y aceites.	6
2.3 Generalidades sobre la familia <i>Leguminosae</i> .	7
2.4 Descripción del género <i>Erythrina</i> .	9
2.4.1 Descripción de <i>Erythrina americana</i> .	9
2.4.2 Descripción de <i>Erythrina brevipflora</i> .	11
2.5 Procesamiento de grasas y aceites.	11
2.5.1 Extracción.	12
2.5.2 Desgomado	15
2.5.3 Refinado	15
2.5.4 Blanqueo	16
2.5.5 Desodorización	17
2.5.6 Hidrogenación	18
2.5.7 Frigelización	18
2.5.8 Aleatorización e interesterificación	19
2.6 Metabolismo de grasas	20
2.6.1 Digestión	20
2.6.2 Biosíntesis	22
2.7 Factores químicos y físicos usados en la caracterización de grasas y aceites.	24
2.7.1 Densidad	24
2.7.2 Índice de refracción	24
2.7.3 Punto de fusión	25

2.7.4	Índice de yodo	25
2.7.5	Índice de saponificación	26
2.7.6	Índice de acidez	27
2.8	Índices calóricos	28
2.8.1	Energía gruesa	29
2.8.2	Energía digerible aparente	29
2.8.3	Energía metabolizable aparente	30
2.8.4	Energía neta	30
3.	OBJETIVOS	32
4.	METODOLOGÍA	33
4.1	Material de estudio	33
4.1.1	Obtención de extractos	34
4.2	Evaluación química	34
4.2.1	Gravedad específica aparente	34
4.2.2	Índice de yodo	35
4.2.3	Índice de saponificación	38
4.2.4	Índice de refracción	40
4.2.5	Índice de acidez	41
4.2.6	Punto de fusión	42
4.2.7	Perfil de ácidos grasos (Cromatografía de gases)	42
4.3	Evaluación biológica	44
4.3.1	Índices biológicos nutricionales	44
a)	Fundamento	44
b)	Preparación de dietas.	44
c)	Material.	45
d)	Componentes empleados en la elaboración de dietas.	45
e)	Elaboración.	45

Índice

f)	Periodo de ensaye	45
f.1	Fundamento determinación de la Energía Gruesa.	46
f.2	Material y reactivos.	47
f.3	Determinación.	47
f.4	Cálculos.	49
f.5	Índices calóricos.	49
f.5.1	Energía digerible aparente.	49
f.5.2	Eficiencia energética.	49
f.6	Otros índices.	50
f.6.1	Relación de eficiencia protéica.	50
4.3.2	Estudio toxicológico subagudo.	50
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	52
5.1	Evaluación química.	52
5.2	Evaluación biológica.	60
5.2.1	Índices biológicos nutricionales.	60
5.2.2	Estudio toxicológico subagudo.	72
6.	CONCLUSIONES.	80
7.	APÉNDICE	81
8.	BIBLIOGRAFÍA	85

Lista de tablas.

	Página
Tabla 1. Evaluación química de extractos lipídicos de colorín (<i>Erythrina americana</i>) y patol (<i>Erythrina breviflora</i>).	53
Tabla 2. Estructuras químicas de los alcaloides presentes en los extractos lipídicos de colorín (<i>Erythrina americana</i>) y patol (<i>Erythrina breviflora</i>).	55
Tabla 3. Perfil de ácidos grasos de los extractos lipídicos de colorín (<i>Erythrina americana</i>) y patol (<i>Erythrina breviflora</i>).	57
Tabla 4. Índices biológicos nutricionales. Distribución de las ratas usando el método de culebra japonesa (peso en gramos).	62
Tabla 5. Índices biológicos nutricionales - Energía digerible aparente.	63
Tabla 6. Índices biológicos nutricionales - Eficiencia energética.	66
Tabla 7. Índices biológicos nutricionales - Relación de eficiencia proteica.	70
Tabla 8. Estudio toxicológico subagudo - Distribución de los ratones en base al método de culebra japonesa.	72
Tabla 9. Estudio toxicológico subagudo - Incremento en peso (tomando en cuenta el último día de estudio).	74
Tabla 10. Estudio toxicológico subagudo - Incremento en peso (tomando en cuenta los 42 días de estudio).	76
Tabla 11. Estudio toxicológico subagudo - Relación porcentual peso órgano/peso corporal.	78

Lista de figuras.

	Página
Figura 1. Procesamiento de grasas y aceites I.	13
Figura 2. Procesamiento de grasas y aceites II.	14
Figura 3. Digestión de grasas y aceites en el hombre.	21
Figura 4. Factores que intervienen en la síntesis de lípidos.	23
Figura 5. Relación entre los distintos índices calóricos.	31
Figura 6. Diagrama general de trabajo.	33
Figura 7. Cromatografía de gases. Perfil de ácidos grasos del extracto lipídico de colorín (<i>Erythrina americana</i>).	58
Figura 8. Cromatografía de gases. Perfil de ácidos grasos del extracto lipídico de patol (<i>Erythrina breviflora</i>).	59
Figura 9. Índices biológicos nutricionales - Energía digerible aparente.	65
Figura 10. Índices biológicos nutricionales - Eficiencia energética.	67
Figura 11. Índices biológicos nutricionales - Relación de eficiencia protéica (PER).	71
Figura 12. Estudio toxicológico subagudo - Incremento en peso.	77
Figura 13. Estudio toxicológico subagudo - Relación porcentual peso órgano/peso corporal.	79

1. INTRODUCCIÓN

En el mundo actual, el suministro de alimentos se ha convertido en un problema grave a tratar. Aunado a lo anterior, también se encuentra el aumento de la población mundial. Esta situación afecta en mayor medida al sector de la población de menores recursos económicos, ya que su acceso a alimentos de alto valor nutritivo es más difícil. Una de las muchas soluciones propuestas ha sido el estudio y aprovechamiento de fuentes no convencionales de alimentos. Como criterio de selección se ha puesto énfasis en la fracción proteica y de entre ellas la investigación se ha dirigido a las proteínas de origen vegetal. Sin embargo, es necesario insistir en la importancia del aspecto energético en la alimentación humana. Existen pruebas suficientes que demuestran que otro factor principal causante de la misma no son sólo las proteínas sino también la energía.

Con base en lo anterior y al igual que en el caso de las proteínas, se han dado pasos incipientes en la búsqueda de fuentes no convencionales de grasas y aceites en el reino vegetal. En el presente estudio, la investigación se enfocó a la caracterización química y biológica de los extractos crudos y destoxificados de dos semillas de leguminosas: colorín (*Erythrina americana*) y patol (*Erythrina breviflora*). Como antecedente se tiene un estudio anterior donde se llevó a cabo la caracterización química de las semillas y la evaluación biológica de sus fracciones proteicas.

Previo al estudio, se llevó a cabo la eliminación de alcaloides libres en los extractos lipídicos. La evaluación química de los extractos lipídicos incluyó la determinación de factores fisicoquímicos. En el estudio *in vivo*, se llevó a cabo el cálculo de índices biológicos

nutricionales tales como Energía Digerible Aparente, Relación de Eficiencia Proteica; y un índice que se le denominó de Eficiencia Energética, el cual consideró el incremento en peso de los animales y la energía ingerida como extracto lipídico. Con el objeto de redondear los resultados del anterior estudio, también se llevó a cabo un estudio toxicológico subagudo, donde la dosis administrada a los animales bajo estudio fué el doble de la calculada para el primer estudio biológico.

En la evaluación química se encontró que los extractos de ambas semillas guardan una alta semejanza con los aceites de otras semillas de leguminosas comestibles, siendo el único inconveniente la presencia de alcaloides en los extractos en una concentración relativamente baja. En cuanto al estudio con ratas, se observó que el tratamiento de destoxificación tuvo un efecto benéfico en términos de absorción de los extractos lipídicos, pero no se observó dicho efecto en términos de crecimiento. En el estudio toxicológico con ratones no se detectaron efectos tóxicos ni alteraciones macroscópicas en sus órganos; sin embargo, el extracto de colorín provocó la aparición de una conducta agresiva y nerviosa en los animales a los que se les administró dicho extracto. Lo anterior motiva una investigación más profunda en dicha dirección.

2. GENERALIDADES

De acuerdo a H. G. Buffet (vicepresidente de la compañía Archer Daniels Midland, la empresa procesadora de alimentos más grande del mundo) 'habitamos un mundo en que menos de 20 especies de plantas producen el 90% del suministro de alimentos'(Buffet, 1994). También hay que considerar el problema de la explosión demográfica, la cual se ha acentuado en los últimos años. En la actualidad somos cerca de 6 mil millones de habitantes en el mundo y los recursos que se necesitan para alimentar a este número tan grande de gente cada día son más escasos, tanto en los países calificados como desarrollados como en los subdesarrollados (Keyfitz, 1994). Ambos problemas afectan en mayor medida al sector de la población de menores recursos económicos, ya que su acceso a alimentos de alto valor nutritivo es más difícil.

Una de las muchas soluciones propuestas al problema de la escasez de alimentos tradicionales ha sido el estudio y utilización de fuentes no convencionales de alimentos. Estas fuentes se han escogido en base a la fracción protéica, buscando que ésta sea alta en cuanto a cantidad y calidad. Debido a su amplia distribución en los países en vías de desarrollo y a su costo relativamente bajo, la investigación se ha dirigido al estudio de las proteínas de origen vegetal buscando la obtención de materiales alimenticios con características nutricionales tales que puedan funcionar como sustitutos o fuentes suplementarias de la proteína animal (Tenorio, 1993).

Sin embargo, es necesario insistir en la importancia del aspecto energético en la alimentación humana. Hasta hace un siglo se creía en general que la desnutrición infantil se

debía principalmente a la insuficiencia y deficiencia de las proteínas en la dieta. Ahora existen pruebas suficientes que demuestran que otro factor principal causante de dicha desnutrición no son sólo las proteínas sino también la energía. En el caso de muchos niños, ambos factores son inadecuados debido a la poca cantidad de alimento consumido o a un consumo adecuado de alimento pero de baja densidad calórica. Lo anterior no es de extrañar ya que los lípidos siempre han sido el nutrimento o alimento más costoso, lo cual, aunado a la pobreza, a la no disponibilidad de los alimentos adecuados y al general subdesarrollo social, lleva a que se sigan dietas no propias tanto cualitativa como cuantitativamente (FAO, 1980).

2.1 Situación de los aceites y grasas comestibles en México.

De acuerdo a los datos proporcionados por la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH), al cierre del primer semestre del año 1994 la producción de los 10 principales cultivos básicos logró su mayor nivel desde 1990, alcanzando un total de 9.74 millones de toneladas, 37.57 por ciento mayor a la cifra registrada para el mismo periodo de 1993 (7.08 millones de toneladas).

Sin embargo, aún cuando se puntualiza que la producción de maíz aumentó en un 70.0 por ciento y la de frijol en un 1.1 por ciento (por citar los granos básicos que representan el 78.1 por ciento del total de la producción), hay que hacer notar que en el renglón de las oleaginosas se observó el fenómeno inverso: la variación porcentual fue de

-32.65 por ciento al tenerse una producción de 26.4 miles de toneladas, comparadas con las 39.2 miles de toneladas de 1993 (Reyes, 1994).

Lo anterior parece ser el reflejo de una situación en la que a pesar de que las innovaciones tecnocientíficas agrícolas han incrementado los rendimientos unitarios de la mayoría de los cultivos, los mayores incrementos productivos de granos básicos se han dado sustituyendo otras siembras por las de sustento humano y animal, aunado a la expansión de áreas en estos cultivos, aunque en menor escala. En este reemplazo de cultivos, las oleaginosas han sido los cultivos más afectados (Quilantán, 1992).

Esta situación nos pone en la necesidad de buscar nuevas fuentes de grasas y aceites debido a que el total de la producción nacional es insuficiente. En esta búsqueda se han tomado acciones tales como el mejorar tanto cuantitativa como cualitativamente las especies aceiteras tradicionales (ajonjolí, cártamo, girasol, canola), pero esto ha sido insuficiente debido a la reducción de áreas dedicadas a oleovegetales, como ya se mencionó anteriormente. También se ha procurado la conversión por medio de la ingeniería genética de plantas oleaginosas propias de la manufactura en variedades alimenticias no tóxicas tales como ciertas especies del género *Brassica*, a las cuales se les ha eliminado en gran medida el contenido de ácido erúxico en el aceite y de glucósidos en la pasta, los cuales son tóxicos tanto para el hombre como para las especies animales. Actualmente se trabaja en la reducción de glucósidos cianogénicos en la jojoba y la higuerrilla y en la modificación en el contenido de ciertos ácidos grasos, como es el α -linolénico en la soya y en la canola (Quilantán, 1991).

No obstante, también está la posibilidad de buscar y estudiar fuentes no convencionales con una concentración relativamente alta de grasa con el objeto de usar la fracción lipídica para posible consumo humano y animal (Sotelo *et al*, 1990). Algunas especies que son factibles de usarse para este fin pertenecen a la familia de las leguminosas, ya que uno de los mayores productos industriales de los frutos de los miembros de esta familia es el aceite. Por ejemplo, en el frijol de soya representa cerca del 20 por ciento del contenido del frijol, pero alrededor del 40 por ciento desde el punto de vista de su valor comercial. Sin embargo, el aceite obtenido en su forma cruda no es comercialmente viable sino que deben llevarse a cabo varios procesos de purificación y modificación con el objeto de obtener aquellas propiedades adecuadas para su uso en la alimentación (Stauffer, 1989).

2.2 Conceptos generales sobre grasas y aceites.

Las grasas y aceites son sustancias hidrofóbicas, insolubles en agua, de origen vegetal o animal que se hallan constituidas principalmente por ésteres de glicerol y ácidos grasos, llamados triacilgliceroles. Las grasas sólo se distinguen de los aceites por sus puntos de fusión: a temperatura ambiente las grasas son sólidas, mientras que los aceites son líquidos.

Las grasas pertenecen a un grupo heterogéneo de compuestos orgánicos conocidos como lípidos, los cuales se caracterizan principalmente por su solubilidad en disolventes orgánicos. En este grupo se hallan, además de las grasas, compuestos como ceras, fosfolípidos, esteroides, vitaminas liposolubles, glucolípidos, cerebrósidos y compuestos relacionados (Bowers, 1992).

El término de **ácidos grasos** se aplica en general a los ácidos carboxílicos que se hallan formados por un grupo carboxilo unido al final de una cadena hidrocarbonada. La mayoría de los ácidos grasos que se presentan en la naturaleza tiene una cadena hidrocarbonada lineal formada por un número par de átomos de carbono. Todos aquellos ácidos grasos que no tienen dobles enlaces en la cadena hidrocarbonada se les denomina **saturados**, mientras que los que si contienen dobles enlaces se les llama **insaturados**.

Para el ser humano hay 2 ácidos grasos **indispensables** (no sintetizados por el organismo): linoléico (*cis,cis-9,12*-octadecadienoico) y α -linolénico (*cis,cis,cis-9,12,15*-octadecatrienoico). Se cree que el organismo puede sintetizar el ácido araquidónico (5,8,11,14-eicosatetraenoico) a partir del α -linoléico mediante una serie de pasos que involucran la elongación de la cadena y deshidratación (Swern, 1979).

2.3 Generalidades sobre la familia *Leguminosae*.

La familia *Leguminosae* abarca 3 subfamilias, a saber:

- I *Caesalpinioideae* (principalmente árboles en sabanas tropicales y bosques de África, Sudamérica y Asia).
- II *Mimosoideae* (pequeños árboles y arbustos, la mayoría encontrados en el hemisferio sur).
- III *Papilionoideae* (también conocida como *Faboideae*; distribuidas en todo el mundo).

Comprende alrededor de 650 géneros con 18,000 especies lo cual la hace la tercer familia de las plantas fanerógamas más grande después de *Compositae* y *Orchidaceae*. Vale la pena hacer notar que un tercio de todas las especies de leguminosas descritas se hallan contenidas en 6 géneros principalmente:

- *Acacia* (1,200 spp)
- *Astragalus* (2,000 spp)
- *Cassia* (520 spp)
- *Crotalaria* (600 spp)
- *Indigofera* (700 spp)
- *Mimosa* (400 spp)

De las 3 subfamilias, la *Papilionoideae* es la más grande y comprende 32 'tribus', comparada con 5 en *Caesalpinioideae* y 5 en *Mimosoideae*. En *Papilionoideae* se incluyen todas las leguminosas económicamente importantes y muchas especies destinadas a pastura y forraje. Sin embargo, las otras dos subfamilias contienen muchas especies de considerable importancia económica. En general, el número de especies domesticadas es muy pequeño en proporción al total.

Una característica propia de las semillas de leguminosas es su alto contenido de proteína. Considerando lo anterior, parecería sorprendente el hecho de que no se haya llevado a cabo una explotación más extensa de las mismas. Sin embargo, la gran mayoría de las leguminosas se hallan generalmente bien protegidas contra la depredación por parte del hombre y muchos otros organismos. De hecho, las especies menos protegidas o cuya protección es fácilmente salvable son las más explotadas. Dicha protección se halla

constituida por una amplia variedad de compuestos tóxicos y antinutricionales, tales como alcaloides, aminoácidos no protéicos, lectinas, inhibidores de proteasas y compuestos cianogénicos.

Las semillas de legumbres y los granos de cereales proveen al hombre de aproximadamente 70% de sus requerimientos de proteína. Sin embargo, éstas proteínas carecen en muchos casos de aminoácidos indispensables específicos, los cuales es necesario suministrar por otras vías (Smartt, 1990; Christou, 1992).

2.4 Descripción del género *Erythrina*.

Erythrina es un género perteneciente a la subdivisión de las angiospermas, orden de los rosales y se halla dentro de la familia de las leguminosas. Se halla constituido por 108 especies de amplia distribución en las regiones tropicales del mundo. Los estudios más relevantes son los referentes a la completa o parcial caracterización de los alcaloides constituyentes de las semillas y de algunas otras partes de las plantas.

2.4.1 Descripción de *Erythrina americana*.

También conocida como colorín (Puebla, México, Morelia), chocolín (Hidalgo), chilicate (Baja California, Sonora), zomplante (Morelos, Guerrero), chak-mool-ché (maya, Yucatán) (Martínez, 1987). Se cultiva en las regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios. En México su cultivo se lleva a cabo en terrenos tropicales y medianamente

fértiles y su desarrollo es menor en tierras relativamente pobres. Se propagan con facilidad por medio de semillas o estacas.

Alcanza de 4 a 5 metros de altura; su tallo es amarillento e irregular y sus ramas espinosas. Las hojas son trifoliadas, con hojuelas de 10 cm de largo, casi cordiformes o deltoides y en la mayoría de los casos glabras, provistas de estípulas.

Su follaje es frondoso y caduco, de color verde claro; en ocasiones se ven ejemplares únicamente con flores, las cuales son de color rojo vivo y se producen en conjuntos terminales cónicos; constan de un estambre largo de alrededor de 6 cm y la quilla es pequeña (aproximadamente 1 cm), de color blanquecino. El androceo consta de 10 estambres repartidos en dos grupos, uno de nueve y otro aislado. El gineceo está rodeado en su base por un nectario y consta de un ovario alargado y comprimido, con un estilo simple que termina en un estigma pequeño.

El fruto es una legumbre de aproximadamente 20 cm de largo y 2 cm de ancho, con un estrangulamiento que limita los lóculos donde se alojan las semillas, las cuales son de color rojo vivo, escarlata o naranja como las flores; su testa es lisa y brillante.

Las semillas de varias especies son reportadas como muy tóxicas. Se han usado como veneno para pequeños animales en algunas regiones. En algunas regiones del país, las flores se cocinan, aún cuando se sabe que actúan como hipnóticos débiles (Raven, 1974; Krukoff, 1974; Aguilar *et al*, 1981).

2.4.2 Descripción de *Erythrina breviflora*.

Conocida como colorín quemador (Temastelpec, México) (Martínez, 1987), patol. Se encuentra ampliamente distribuida en México, pero la hay principalmente en Morelos, Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Jalisco y el Estado de México.

Es un arbusto de aproximadamente 2.0 a 2.5 m. de altura con un follaje ralo. El número de frutos viables es muy reducido. La cantidad de vainas por arbusto es de aproximadamente 15 a 30. Presenta grandes semejanzas con *Erythrina americana*, y las características que las diferencian son el tamaño de las hojas, las cuales llegan a medir de 14 a 16 cm. El fruto es de color canela, con florecimiento largo y puntiagudo con las puntas alargadas en uno de los extremos y estrangulamientos que limitan los lóculos donde se alojan las semillas, las cuales crecen en un número de 1 a 2 por cada vaina (Raven, 1974; Krukoff, 1974).

2.5 Procesamiento de grasas y aceites.

Hasta hace relativamente poco tiempo, los aceites y grasas comestibles se extraían de su fuente natural por medios mecánicos y se empleaban en su forma cruda sin ninguna clase de refinamiento o purificación. Los principales aceites vegetales tradicionalmente consumidos en otros países en esta forma son los aceites de maní, de coco, de la semilla de la mostaza, de colza, de palma, de oliva y de sésamo. Por otro lado, en cuanto a las grasas animales podemos contar al tocino, el sebo y los aceites de pescado y mamíferos marinos (FAO, 1980).

Durante los últimos 60 años, las grasas y aceites vegetales se han obtenido por métodos más eficaces de prensado mecánico y por extracción con disolventes; además se

someten a técnicas de refinamiento con el objeto de hacerlos lo más suaves e incoloros posible. Esto último ha sido como resultado del cambio en las exigencias del consumidor.

Las técnicas de refinamiento comprenden lavado, refinado con álcalis, blanqueo y desodorización (Fig. 1), por citar las más comunes. Al aceite o grasa resultante todavía pueden aplicárseles otros tratamientos tales como hidrogenación, aleatorización y frigelización con el objeto de destinarlos a diversos fines alimenticios (Fig. 2).

A continuación se describirán en forma general los tratamientos anteriormente mencionados:

2.5.1 Extracción.

La extracción puede llevarse a cabo mediante presión o por extracción con disolventes, dependiendo de las diferentes características de las diversas fuentes naturales de grasas y aceites. En general, los objetivos de la extracción son: (a) obtener la grasa o aceite lo menos dañado posible y lo más libre posible de impurezas no deseables; (b) obtener la grasa o aceite en un rendimiento tal que sea conveniente económicamente hablando; y (c) obtener una fracción grasa del más alto valor económico posible (Swern, 1979). Tiene como inconvenientes la presencia de residuos de disolvente no deseados después de la extracción, la probable presencia de sustancias tóxicas tales como aflatoxinas e isotiocianatos después del prensado y leves alteraciones de los aceites si el calentamiento es muy elevado.

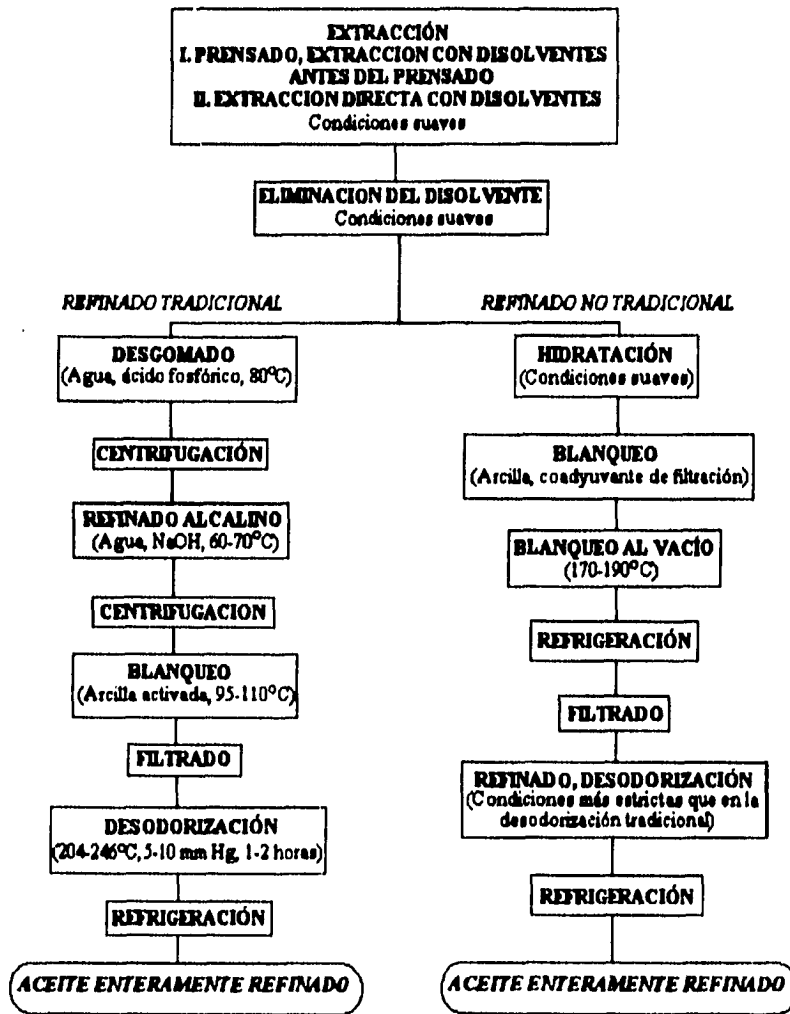


Figura 1. Procesamiento de grasas y aceites I

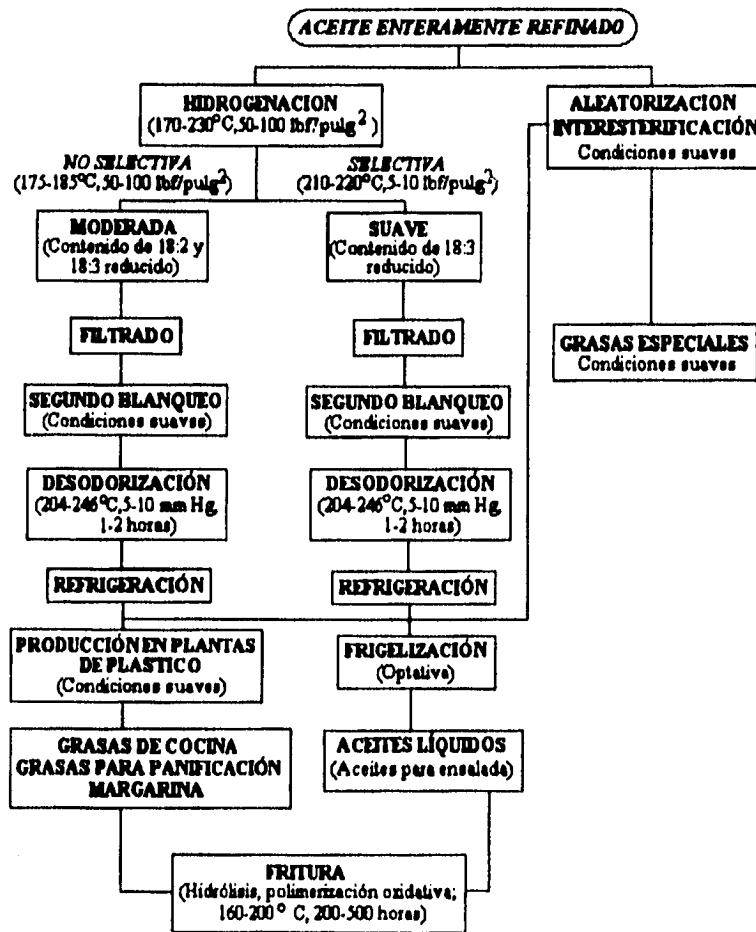


Figura 2. Procesamiento de grasas y aceites II

2.5.2 Desgomado.

El desgomado de los aceites se lleva a cabo casi siempre mediante hidratación de los fosfátidos y otros materiales semejantes, lo cual los hace insolubles en el aceite. Estos otros materiales pueden ser:

- componentes no oleosos hidratables, principalmente carbohidratos y proteínas, los cuales son eliminados parcialmente con este tratamiento.
- clorofila (también parcialmente eliminada), especialmente si se emplea ácido fosfórico en el tratamiento.

Es común el uso de ácido fosfórico con el objeto de eliminar también los fosfátidos no hidratables (Rossell, 1991).

2.5.3 Refinado.

Los aceites crudos tienen alrededor de 94 a 98% de triacilgliceroles, dependiendo del tipo y de la calidad de la fuente natural, mientras que los aceites refinados y desodorizados contienen más del 99% de triacilgliceroles. La diferencia estriba en los componentes que son removidos durante el refinado:

- ácidos grasos libres.
- fosfátidos hidratables y no hidratables.
- pigmentos (carotenoides, clorofilas, gósipoles, etc.).
- materia insaponificable (esteroles, hidrocarburos, tocoferoles).

- azúcares libres y glicolípidos
- lípidos oxidados
- compuestos conteniendo elementos traza, e.g. hierro, cobre, calcio, magnesio, azufre.

El tratamiento con álcali apenas ejerce efectos sobre los triacilglicerolos, que son los componentes de interés, nutricionalmente hablando.

Después de la centrifugación para separar la materia saponificada, se lleva a cabo un lavado con agua suave, procurando que las concentraciones de calcio y magnesio sean mínimas para asegurar un correcto lavado (Rossell, 1991).

2.5.4 Blanqueo.

El blanqueo consiste en tratar los aceites refinados con pequeñas cantidades de tierras activadas (0.5%), que con frecuencia van mezcladas con un 0.05% de carbón activado. Estas tierras activadas consisten principalmente en bentonitas o montmorilonita, que en estado natural tienen poco poder decolorante. Estas tierras son activadas mediante tratamiento con ácido sulfúrico o clorhídrico. Sin embargo, pueden también absorber aceite, además de que el carácter ácido de estas tierras hace que se produzcan cantidades medibles de ácidos grasos conjugados derivados de los ácidos poliénicos presentes. Asimismo, los ácidos grasos peroxidados se descomponen para dar lugar a compuestos conjugados. Durante el blanqueo al vacío puede darse la formación de isómeros de posición y geométricos de los ácidos grasos más activos presentes.

Con el blanqueo se da la supresión de carotenoides, clorofila y productos de descomposición, pigmentos del tipo del gosipol y agentes tóxicos tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos (en caso de usar carbón absorbente en mayor cantidad) (FAO, 1980).

2.5.5 Desodorización.

La desodorización elimina ácidos grasos libres, varios aldehídos y cetonas, alcoholes, hidrocarburos y compuestos varios derivados de la descomposición de peróxidos y pigmentos, los cuales contribuyen al sabor y aroma del aceite. Al mismo tiempo se da la supresión parcial de esteroides y tocoferoles tanto libres como esterificados, así como de residuos de plaguicidas, compuestos clorados y micotoxinas.

Comúnmente se lleva a cabo haciendo pasar vapor de agua por capas de aceite en bandejas a temperaturas de 204-246°C. A estas temperaturas puede ocurrir cierta isomerización, haciendo pasar de *cis* a *trans* la configuración natural de los ácidos linoléico y α -linoléico. Hay otras técnicas alternas de desodorización, las cuales emplean delgadas películas de aceite a través de las cuales se sopla el vapor, haciendo el proceso más corto y provocando menos efectos colaterales (FAO, 1980).

2.5.6 Hidrogenación.

La hidrogenación es el proceso en el cual se incrementa el grado de saturación de una grasa o aceite por adición de hidrógeno al enlace π de un ácido graso insaturado en un triacilglicerol. La hidrogenación puede ser completa (todos los dobles enlaces son convertidos a enlaces sencillos), o parcial (algunos dobles enlaces son convertidos). La reacción es bastante compleja ya que hay que superar una barrera energética grande, además de que se necesita de un catalizador, e.g. níquel, para que la reacción proceda.

Además de la adición de hidrógeno al enlace π , también ocurre una migración de los dobles enlaces a lo largo de la cadena hidrocarbonada y una ligera isomerización geométrica de *cis* a *trans* de los ácidos grasos insaturados.

La hidrogenación permite aumentar la estabilidad de ciertas sustancias grasas por reducción del nivel de ácido α -linolénico, para lo cual se realiza una hidrogenación ligera. Se usa principalmente para producir mantecas y margarinas a partir de aceites, ya que conforme avanza la hidrogenación el punto de fusión se eleva (Swern, 1979).

2.5.7 Frigelización.

La frigelización sirve para suprimir triacilgliceroles de punto de fusión más elevado enfriando el aceite a temperaturas bajas, produciendo un aceite líquido que se mantiene claro a temperaturas de refrigeración. Cuando se emplea en la elaboración de aceites como el de semilla de algodón o de materiales parcialmente hidrogenados que contengan

triacilgliceroles ricos en ácidos grasos saturados o de configuración *trans*, la supresión de estos compuestos incrementa la proporción de ácidos grasos insaturados en el producto final, y por tanto, puede considerarse beneficiosa desde el punto de vista nutricional. Los triacilgliceroles de punto de fusión más elevado que se separan de los aceites sin hidrogenar pueden ser empleados como matrices de grasas sólidas para margarinas y grasas de panificación (FAO, 1980).

2.5.8 Aleatorización e interesterificación.

Este proceso se desarrolla en seco y en ausencia de oxígeno a temperaturas bajas o moderadas y sirve para reordenar los ácidos grasos en las moléculas de triacilgliceroles con el fin de obtener una distribución más aleatoria. Esto tiene como resultado la modificación de la consistencia en el aceite y un aumento en su punto de fusión cuando se trata de un solo aceite. Cuando están presentes dos aceites se denomina interesterificación. Un empleo frecuente de este proceso se encuentra en la obtención de una grasa plástica a partir de un aceite poliéxico, interesterificado con una cantidad menor de grasa enteramente saturada. El valor nutricional del ácido α -linoléico no se ve alterado (FAO, 1980).

2.6 Metabolismo de grasas.

2.6.1 Digestión

El metabolismo de las grasas en el organismo empieza desde la cavidad bucal donde una enzima localizada en la saliva comienza a digerir la grasa. Sin embargo, esta enzima requiere de un medio más ácido por lo que es llevada al estómago junto con la grasa para llevar a cabo una digestión limitada. Cabe mencionar que la digestión en el estómago es más importante en los infantes que en los adultos, debido a que su capacidad digestiva intestinal no se halla completamente desarrollada. Además, una lipasa que se halla en la leche materna contribuye a esta digestión.

En el estómago se lleva a cabo el rompimiento del complejo lipido-proteína presente en los alimentos, liberando la grasa para formar una emulsión de "aceite en agua" que pasa al intestino delgado y se mezcla con la bilis y el jugo pancreático (Fig. 3).

La bilis contiene sales biliares que permiten a las gotas de aceite adquirir una carga eléctrica negativa, la cual atrae a una proteína llamada "co-lipasa". Así mismo, esta proteína atrae a la lipasa pancreática, la cual es la principal enzima encargada de la digestión de las grasas, separando los ácidos grasos de las posiciones 1 y 3 de los triacilgliceroles dando como productos ácidos grasos libres y 2-monoacilgliceroles. Además, el jugo pancreático también tiene fosfolipasas, las cuales liberan uno de los ácidos grasos de los diacilfosfogliceroles, dando lisofosfolípidos.

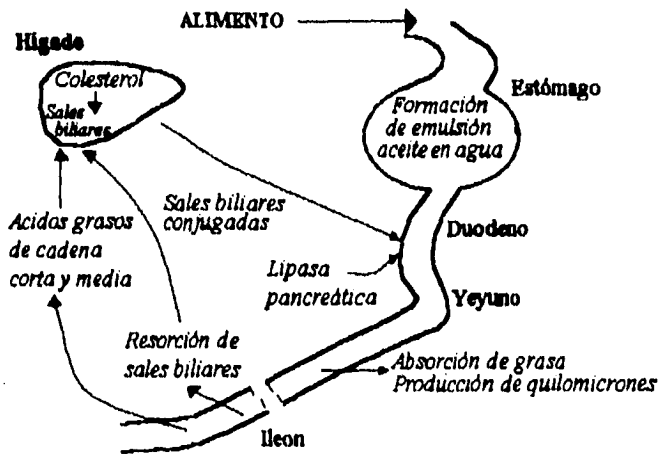


Figura 3. Digestión de grasas y aceites en el hombre

En general, el proceso global de esta digestión es la de convertir las grasas en derivados más hidrofílicos que sean más capaces de interactuar con el agua. Al proceder la digestión, los monoacilgliceroles y los ácidos grasos libres dejan la superficie de las partículas de grasa y son incorporadas a unas micelas formadas por agregados de sales biliares, lisofosfolípidos, ácidos grasos de cadena larga y monoacilgliceroles. Los ácidos grasos de cadena corta son absorbidos por otra ruta. En el seno hidrofóbico de la micela se hallan moléculas muy hidrofóbicas, tales como colesterol, carotenoides, tocoferoles, etc..

Los productos de la digestión son absorbidos a partir de las micelas a través de la membrana de los enterocitos (células absorbentes primarias en el intestino delgado). Ya dentro del enterocito, el flujo de material graso se mantiene mediante la unión de los ácidos grasos a una proteína y por la continua reconversión de los 2-monoacilgliceroles en

triacilgliceroles. Los ácidos grasos se reactivan mediante esterificación con la coenzima A y así formar los triacilgliceroles. A partir de los diacilgliceroles se vuelven a sintetizar los fosfolípidos, los cuales junto con otras proteínas "empaquetan" a los triacilgliceroles en los llamados quilomicrones para transportarlos a través del torrente sanguíneo a otros tejidos. Estos quilomicrones también pueden contener en su interior pequeñas cantidades de vitaminas liposolubles, colesterol, ésteres de colesterol y otros compuestos liposolubles.

De esta forma, los triacilgliceroles y los fosfolípidos son absorbidos en un 90%; el colesterol es absorbido más lentamente y con menor eficiencia. Las sales biliares pasan a la parte más distal del intestino delgado donde una porción es reabsorbida y recirculada al hígado, cerrando el circuito. Las sales que no son absorbidas pasan al intestino grueso donde son parcialmente metabolizadas por los microorganismos presentes. Esto mismo ocurre con el material graso no absorbido, de tal forma que el material graso de las heces es bastante diferente al de la dieta ingerida.

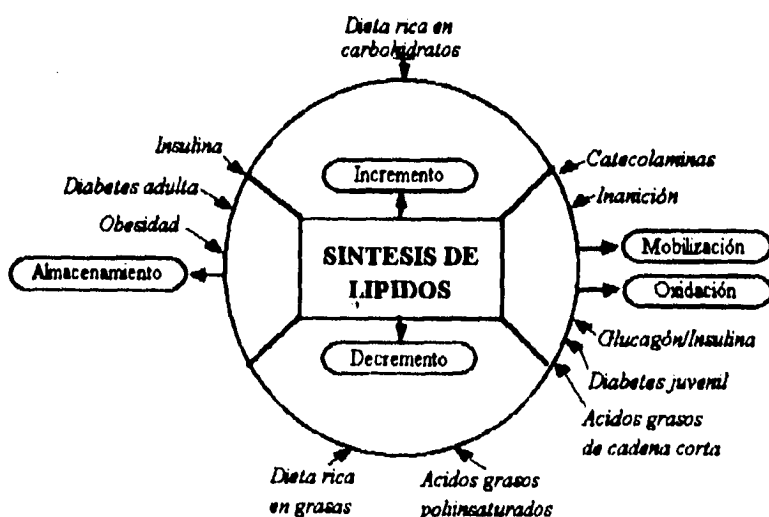
Los ácidos grasos de cadena corta y media pasan directa y rápidamente al torrente sanguíneo y llegan al hígado donde son metabolizados inmediatamente.

2.6.2 Biosíntesis.

En un organismo sano, la biosíntesis de lípidos es regulada a partir de diversos factores como se muestra en la Figura 4. Una dieta rica en carbohidratos y la insulina tienden a acelerar la síntesis de lípidos. Las dietas ricas en grasa y en especial los ácidos grasos poliinsaturados provocan una disminución en la síntesis. Durante el consumo de alimentos,

la concentración de insulina se eleva, lo que se refleja en el almacenamiento de grasa, la cual, si es excesiva conduce a la obesidad. La gente con diabetes adulta (tipo 2) tiende a tener una concentración de insulina muy alta y acumulan grasa excesivamente. Por otro lado, durante el ayuno se liberan las catecolaminas y la proporción glucagón/insulina es alta. Bajo estas condiciones se favorece la movilización de lípidos y los ácidos grasos liberados son oxidados para proveer de energía. Lo anterior puede ocurrir en la diabetes juvenil (tipo 1) en la cual se carece de insulina. Los ácidos grasos de cadena corta presentes en la dieta son rápidamente oxidados en el hígado y no son almacenados.

Un claro conocimiento de la regulación normal de los procesos que intervienen en el control de la biosíntesis de lípidos es importante para poder combatir enfermedades asociadas con defectos en el metabolismo de los lípidos (Gurr, 1992).



* Tomado de Gurr, 1992

Figura 4. Factores que intervienen en la síntesis de lípidos.

2.7 Factores químicos y físicos usados en la caracterización de grasas y aceites.

2.7.1 Densidad.

En términos absolutos, densidad es definida como el peso de una sustancia por unidad de volumen; en los líquidos es expresada como g/cm^3 . Para grasas y aceites es común emplear la densidad relativa, que es el cociente entre la masa de la sustancia y la masa de un volumen igual de agua a una temperatura dada. La densidad de los ácidos grasos y los acilgliceroles es mayor mientras menor sea su peso molecular y mayor su grado de insaturación (Swern, 1979).

2.7.2 Índice de refracción.

Es una constante física para medir el fenómeno mediante el cual, cuando un rayo de luz monocromática pasa de una sustancia transparente a otra de diferente densidad, éste se desvía o **refracta**, excepto cuando penetra perpendicularmente a la superficie que separa ambas sustancias. En grasas y aceites es usada con frecuencia para dar idea sobre la identidad y pureza de las muestras, así como para seguir el curso de algunas reacciones.

La relación entre el índice de refracción y la estructura y composición de los ácidos grasos y acilgliceroles puede resumirse en los siguientes puntos:

- el índice de refracción de grasas y ácidos grasos aumenta al crecer la cadena hidrocarbonada.

- el índice de refracción de grasas y ácidos grasos aumenta con el número de dobles enlaces en la molécula y al aumentar el grado de conjugación entre éstos.
- el índice de refracción de los acilgliceroles simples es más alto que el del ácido graso correspondiente.
- el índice de refracción de los monoacilgliceroles es considerablemente más alto que el de los correspondientes triglicéridos simples (Swern, 1979; Jenkins, 1951).

2.7.3 Punto de fusión.

El punto de fusión es una propiedad física útil ya que da idea sobre la identidad del compuesto. Los puntos de fusión de los ácidos grasos son directamente proporcionales a la longitud de la cadena hidrocarbonada y disminuyen al aumentar el grado de insaturación de los ácidos grasos (Swern, 1979).

2.7.4 Índice de yodo.

Se define como la cantidad de yodo (en gramos) absorbido por 100 gramos de grasa o aceite bajo condiciones estándar. El índice de yodo representa el grado de insaturación real sólo cuando los dobles enlaces no se hallan conjugados y la estructura del ácido graso no impida la entrada del halógeno. Se ha propuesto una escala para clasificar las grasas y aceites basada en su índice de yodo, la cual se presenta a continuación:

Grupo	Índices de yodo**
Ceras	muy bajos
Grasas animales	30-70
Aceites no secantes	80-110
Aceites semisecantes	80-140
Aceites secantes	125-200

** Pritchard, 1991.

*Algunos autores relacionan también la propiedad secante de una grasa o aceite con el contenido de ácido linoléico. En general, cuando la concentración de este ácido llega a un 35%, el aceite o grasa no se considera para consumo humano y sí como secante (Swern, 1979).

La reacción se puede llevar a cabo mediante el método de Wijs empleando monocloruro de yodo, o por el método de Hanus, la cual usa monobromuro de yodo en ácido acético (Swern, 1979).

2.7.5 Índice de saponificación.

La reacción de hidrólisis de una grasa o aceite con un álcali para dar glicerol y las sales de los ácidos grasos es conocida como saponificación. De tal forma, el índice de saponificación se define como el número de miligramos de hidróxido de potasio necesarios para neutralizar los ácidos grasos resultantes de hidrolizar 1 gramo de muestra.

Los ésteres de los ácidos grasos de masa molecular baja requieren mayor cantidad de álcali para la saponificación. De tal modo, el índice de saponificación es inversamente proporcional al promedio de las masas moleculares de los ácidos grasos de los acilgliceroles presentes. Sin embargo, el índice de saponificación no es tan útil para la identificación como

el índice de yodo debido a que muchos aceites tienen índices de saponificación semejantes. Sin embargo, es muy usado para detectar la posible adulteración de una grasa en particular con aceite de coco, aceite de nuez de coco y grasa de mantequilla, los cuales contienen una elevada proporción de ácidos grasos de bajo peso molecular. Además, la presencia de hidrocarburos parafínicos se puede detectar por la aparición de turbidez al añadir agua a la solución etanólica del aceite o grasa saponificados (Egan *et al*, 1991).

2.7.6 Índice de acidez.

El índice de acidez se define como el número de miligramos de hidróxido de potasio requeridos para neutralizar los ácidos grasos libres de 1 gramo de muestra. El resultado también puede expresarse en términos de porcentaje de ácidos grasos libres, asumiendo que los ácidos grasos presentes tienen un peso molecular equivalente al del ácido oléico.

El índice de acidez es usado comúnmente como un indicador del grado al cual se han descompuesto los acilgliceroles del aceite por acción de las lipasas o por alguna otra causa, tales como el calor y la luz. Así mismo, como la rancidez es acompañada usualmente de una presencia relativamente alta de ácidos grasos libres, la determinación es usada como una indicación general de la condición y comestibilidad de los aceites (Egan *et al*, 1991).

2.8 Índices calóricos.

Aún cuando se ha hecho énfasis en la investigación biológica para el desarrollo de métodos *in vitro* que permitan al investigador trabajar con pocas células individuales, estos métodos no resultan satisfactorios para ser aplicados al hombre o incluso a la especie de la cual fueron las células inicialmente obtenidas.

Para poder evaluar con mayor confianza los factores involucrados en el funcionamiento de organismos más complejos, se requiere de estudios en dicho organismo intacto, i.e. realizar pruebas biológicas *in vivo*.

La rata ha sido desde hace mucho tiempo empleada como organismo de estudio a nivel nutricional debido a que su utilización metabólica de los nutrientes es muy parecida a la del hombre. Otras razones por las cuales la rata es ampliamente utilizada son:

- es un animal omnívoro y puede ser alimentado con la misma dieta siempre y cuando dicha dieta sea adecuada desde el punto de vista nutricional.
- es fácil de manejar y de cuidar.
- pueden alojarse varios individuos en una área relativamente pequeña.
- es prolífico y puede reproducirse a partir de las 10 semanas de edad.
- el periodo después del destete, en el cual siguen creciendo y ganando peso y largo, lo cual es de gran utilidad en aquellos estudios donde la ganancia en peso y tamaño son usados como indicadores en el transcurso de un experimento.

Sin embargo, el empleo de ratas también tiene sus desventajas. Uno de los principales es el de que estos animales son muy propensos a sufrir de enfermedades de tipo

respiratorio, provocadas por alteraciones de temperatura en su hábitat. Otro problema es la llamada coprofagia, i.e. en cierto momento son capaces de ingerir sus propias heces (hasta en un 50-60%), pudiéndoles provocar enfermedades y alterar los resultados de la investigación (Yang, 1974).

Algunos de los índices de tipo calórico usados con mayor frecuencia se mencionan a continuación:

2.8.1 Energía gruesa (EG).

Es la cantidad de calor resultante de la oxidación de un alimento, dieta o cualquier otra sustancia. La determinación de ésta se hace en una bomba calorimétrica. Los valores de EG de los diferentes nutrimentos varían, pero generalizando son: 4.10 kcal/g para carbohidratos, 5.65 kcal/g para proteínas y 9.45 kcal/g para grasas (Church, 1986).

2.8.2 Energía digerible aparente (DE).

En un estudio experimental *in vivo*, de la Energía Gruesa de la dieta se le resta la energía fecal, dando como resultado la energía digerible aparente (Church, 1986).

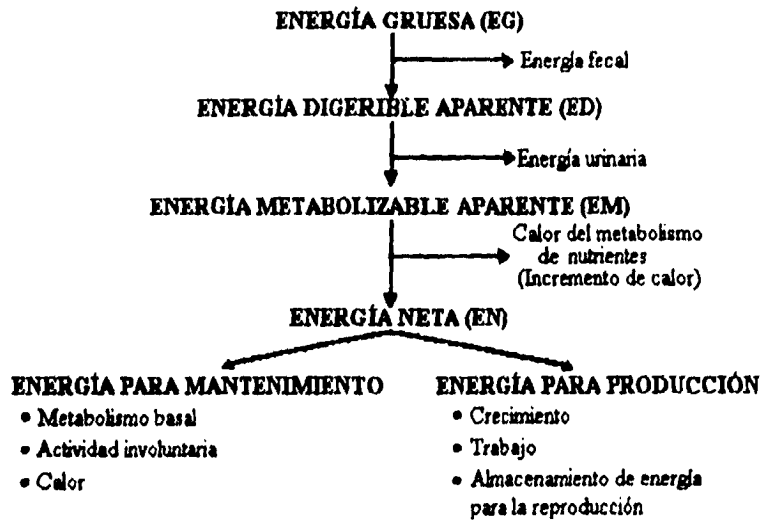
2.8.3 Energía metabolizable aparente (EM).

Se define como la EG del alimento consumido menos el contenido energético de heces y orina. La EM es comúnmente empleada para la evaluación de alimentos y dietas estandarizadas, i.e. que se conozca su contenido energético (Church, 1986).

2.8.4 Energía neta (EN).

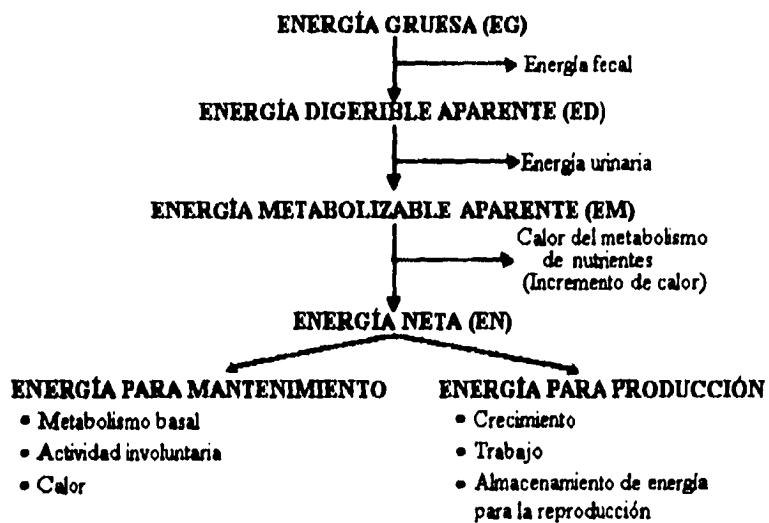
La EN de un alimento es la proporción disponible de éste que el animal emplea para su mantenimiento (trabajo muscular, reparación de tejidos, regulación de la temperatura corporal, etc.) o para varios procesos productivos, como recobrar y retener la energía en los tejidos. Se calcula restando a la EM el incremento de calor (IC), llamado también efecto dinámico específico, y puede ser definido como el calor producido durante la digestión de los nutrientes (Church, 1986).

La relación entre estos distintos índices se muestra en la Figura 5.



* Tomado de Church, 1986.

Figura 5. Relación entre los distintos índices calóricos



* Tomado de Church, 1986.

Figura 5. Relación entre los distintos índices calóricos

3. OBJETIVOS.

3.1 Objetivo general.

- Caracterizar tanto química como biológicamente la grasa cruda y destoxificada de dos semillas del género *Erythrina* mexicanas.

3.2 Objetivos particulares.

- Caracterizar químicamente la grasa cruda y destoxificada del colorín (*Erythrina americana*) y patol (*Erythrina breviflora*).
- Determinar si el tratamiento de destoxificación de las grasas tiene un efecto benéfico en el aspecto nutricional de las mismas.
- Determinar si la grasa cruda y destoxificada de ambas semillas presenta un efecto tóxico en pruebas *in vivo*.

4. METODOLOGÍA

4.1 Material de estudio

En el presente estudio fueron utilizados extractos lipídicos crudos y destoxificados de las semillas *Erythrina americana* y *Erythrina breviflora*. El diagrama general de trabajo se presenta en la Figura 6.

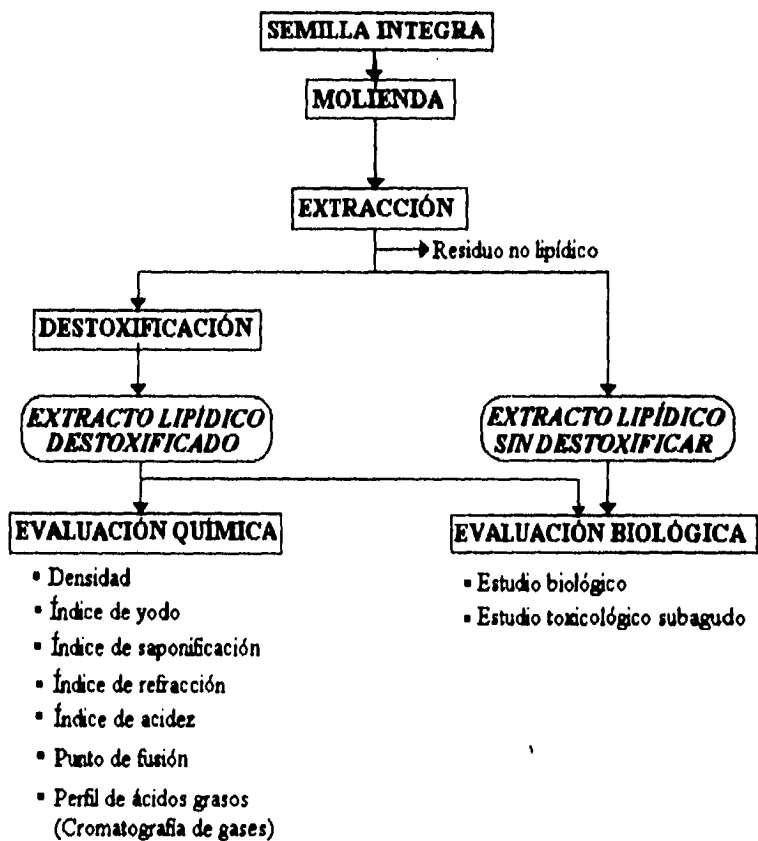


Figura 6. Diagrama general de trabajo.

4.1.1 Obtención de extractos.

La semilla íntegra fué molida en un molino **Thomas-Wiley Model 4**, usando una malla con aberturas de 2 mm. de diámetro. La harina obtenida fué entonces insertada en un frasco de vidrio para llevar a cabo la extracción (capacidad: 1 kg.), envuelta en papel filtro de tal manera que se evitaran las pérdidas por el flujo del disolvente. El disolvente usado fué hexano grado Q.P. y se usó un sistema de extracción continua tipo Soxhlet durante 15 horas. El disolvente fué eliminado de la fracción lipídica mediante rotaevaporador, seguido de secado en estufa a 60°C.

Las grasas destoxificadas se obtuvieron de acuerdo al método descrito por Sotelo, *et al* (1993), en donde la fracción lipídica de la semilla se somete a lavados con ácido sulfúrico 2N, con la finalidad de extraer los alcaloides libres que se hallan en dicha fracción. Es conveniente aclarar que para el presente estudio se entiende como destoxificado el estar libre de alcaloides.

A los extractos (tanto los destoxificados como los no destoxificados) se les insufló nitrógeno y se guardaron en congelador para su conservación y posterior uso.

4.2 Evaluación química.

4.2.1 Gravedad específica (aparente).

a) Materiales y reactivos.

- Picnómetro de 50 ml.
- Baño de temperatura controlada **GRANT Mod. SE10**.
- Balanza analítica.
- Éter etílico.
- Etanol.

b) Determinación.

Limpiar cuidadosamente el picnómetro con mezcla crómica. Enjuagar y secar completamente. Llenar picnómetro con agua recientemente hervida y enfriada a 20°C y colocar en el baño de temperatura controlada a 25°C. Después de 30 minutos, ajustar el nivel de agua en el picnómetro y su capilar; retirar del baño, secar cuidadosamente y pesar. Enjuagar repetidamente con etanol y después con éter. Secar, dejar evaporar cualquier residuo de éter y secar. Determinar por diferencia el peso de agua contenida en el picnómetro a 25°C.

Limpiar y secar picnómetro cuidadosamente. Llenar con muestra de aceite a 20°C y colocar en el baño a 25°C. Después de 30 minutos ajustar el nivel de aceite en el picnómetro y su capilar; retirar del baño, secar cuidadosamente y pesar. Obtener el peso de la muestra por diferencia entre el picnómetro lleno con la muestra y el picnómetro vacío.

Obtener la gravedad específica aparente de la muestra dividiendo el peso del aceite entre el peso del agua (ambos medidos en el mismo picnómetro).

4.2.2 Índice de yodo (Método de Hanus).

a) Fundamento.

Los acilgliceroles de los ácidos grasos insaturados presentes en la grasa (principalmente los de la serie del ácido oleico) se unen mediante sus dobles enlaces a una cantidad definida de monobromuro de yodo (reactivo de Hanus), el cual es añadido en exceso en la determinación. La cantidad de halógeno restante es titulada con solución valorada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ y por diferencia con un blanco se obtiene la cantidad de monobromuro de yodo adsorbido por la muestra (Egan, 1991).

b) Material y reactivos.

- Matracas Erlenmeyer con tapón de vidrio de 500 ml.
- Probeta de vidrio de 10 ml.
- Buretas graduadas de vidrio de 50 ml.
- Balanza analítica.
- Ácido acético glacial.
- Yodo.
- Tiosulfato de sodio.
- Bromo.
- Solución de yoduro de potasio al 15% w/v.
- Solución de almidón al 1% w/v.
- Cloroformo.
- Ácido clorhídrico 1N.
- Dicromato de potasio.

c) Preparación de solución de tiosulfato de sodio 0.1 N.

Disolver 25 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 1 litro de agua destilada. Llevar a ebullición moderada y mantener durante 5 minutos. Transferir en caliente a un frasco contenedor (de preferencia de color ámbar) previamente limpiado con mezcla crómica y enjuagado con agua destilada hervida. Guardar en la oscuridad en un lugar templado. No regresar residuos de reactivo al frasco.

Pesar en balanza analítica 0.2000 a 0.2300 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (secado a 100°C durante 2 horas) en matraz Erlenmeyer. Disolver en 80 ml de agua destilada junto con 2 g de KI. Añadir 20 ml de HCl 1 N y guardar inmediatamente en la oscuridad durante 10 minutos. Titular con la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, añadiendo unas gotas de solución indicadora de almidón al 1% hacia el final de la valoración (Helrich, 1990). Calcular la normalidad de la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ mediante la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\text{g K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \times 1000}{\text{ml Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 49.032}$$

d) Preparación de solución de Hanus.

Disolver 13.615 g de yodo en 825 ml de ácido acético glacial con calentamiento. Enfriar y titular 25 ml de esta solución con solución de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0.1 N. Por otro lado, tomar 3 ml de bromo y disolver en 200 ml de ácido acético glacial. Tomar 5 ml de esta última solución y añadir 15 ml de solución de KI al 15%; titular con solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.1 N. Calcular la cantidad de solución de bromo requerida para duplicar el contenido de halógeno de la solución inicial de yodo mediante la siguiente relación:

$$X = B / C$$

donde X= ml de solución de bromo requerida; B= 800 x equivalentes de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ por ml de la solución inicial de yodo; y C= equivalentes de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ por ml de la solución de bromo. Si es necesario, diluir la solución ya mezclada con ácido acético glacial hasta la concentración deseada.

d) Determinación.

Pesar 0.2500 g de aceite en un matraz Erlenmeyer con tapón de vidrio y disolver en 10 ml de cloroformo (CHCl_3). Con la bureta graduada, añadir 25 ml de solución de Hanus y dejar reposar en la oscuridad durante 30 minutos, con agitación ocasional. Para resultados más precisos, es conveniente cumplir con los mismos tiempos de drenado de bureta y estancia en la oscuridad en todas las determinaciones.

Añadir 10 ml de la solución al 15% de KI; agitar vigorosamente y añadir 100 ml de agua destilada recientemente hervida y enfriada, cuidando de lavar cualquier residuo que quede en el tapón de vidrio. Titular con solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.1 N hasta que el color amarillo de la solución casi desaparezca. Añadir unas cuantas gotas de solución de almidón

al 1% y continuar titulando hasta que el color azul de la solución desaparezca completamente. Hacia el final de la titulación, tapar matraz y agitar vigorosamente para que el yodo remanente en solución en CHCl_3 sea también titulado.

Llevar a cabo 2 blancos bajo las mismas condiciones.

f) Cálculos.

$$\text{Índice de yodo} = \frac{(B - S) \times N \times 12.69}{\text{g muestra}}$$

donde:

B= ml de solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gastados en blanco

S= ml de solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gastados en muestra

N= normalidad de la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

4.2.3 Índice de saponificación.

a) Fundamento.

Los ácidos grasos de los acilglicérols de la grasa son liberados con una solución de KOH en etanol (la cual se añade en exceso), obteniéndose glicerol y las sales respectivas de los ácidos grasos. El KOH sin reaccionar se titula con HCl 0.5N y por diferencia con un blanco se determina la cantidad de KOH empleado para saponificar la muestra.

b) Materiales y reactivos.

- Balanza analítica.
- Matraces de bola de fondo plano de 250 ml.
- Matraz de fondo plano con cuello largo de 1 litro.
- Condensador de aire
- Buretas graduadas de 50 ml.
- Canastilla de calentamiento.
- Mortero.

- Hidróxido de potasio.
- Óxido de calcio granulado.
- Etanol.
- Ácido clorhídrico 0.5N.
- Solución indicadora de fenolftaleína al 1% w/v en metanol.

c) Preparación de solución etanólica de KOH .

Triturar 40 g de KOH en un mortero junto con 45 g de CaO granulado y mezclar. De 1 litro de etanol, añadir 100 ml a la mezcla en el mortero y transferir a un matraz con cuello largo. Transferir cuantitativamente la mezcla con ayuda de varias porciones de etanol. Añadir el etanol restante al matraz, agitar vigorosamente durante 5 minutos e invertir el matraz, dejando reposar la solución. Repetir la agitación varias veces durante el día. Dejar reposar durante toda la noche. Filtrar la solución para eliminar el CaO y guardar en un frasco con tapón de vidrio.

d) Determinación.

Pesar en balanza analítica 0.5000 g. de la grasa en un matraz de fondo plano de 250 ml. Añadir con la bureta 50 ml de la solución de KOH. Conectar el matraz al condensador de aire y llevar hasta ebullición, manteniendo ésta hasta que la muestra esté totalmente saponificada (aproximadamente 30 minutos). Enfriar y titular con HCl 0.5N usando fenolftaleína al 1% como indicador. Llevar a cabo un blanco bajo las mismas condiciones que la muestra.

e) Cálculos.

$$\text{Índice de saponificación} = \frac{28.05 \times (B - S)}{\text{g muestra}}$$

donde:

B= ml de HCl 0.5N gastados en blanco.

S= ml de HCl 0.5N gastados en muestra

4.2.4 Índice de refracción.

a) Materiales.

- Refractómetro de Abbé OPL No. 2,154.

b) Determinación.

Determinar el índice de refracción del aceite a 20 o 25°C, haciendo circular agua a dicha temperatura a través del prisma del aparato. Colocar el refractómetro de tal manera que reciba la luz difusa del día o de alguna fuente artificial (e.g. lámpara de sodio) de frente al analista.

Abrir el prisma girando el tornillo que lo mantiene cerrado; añadir unas cuantas gotas del aceite y con una varilla de vidrio expandir la muestra en toda la superficie del prisma. Girar el tornillo para cerrar el prisma y dejar la muestra unos minutos a que se atempere a la temperatura del agua circulante.

La medición se basa en la posición de la llamada *frontera o borde de reflejo total* en relación a las caras del prisma. Llevar este borde al punto de intersección indicado a través del ocular con ayuda del tornillo correspondiente, de tal manera que el campo de visión se halle dividido en una mitad luminosa y otra oscura. En el otro ocular leer directamente en la escala el índice de refracción.

El refractómetro puede calibrarse con agua destilada siguiendo el procedimiento previamente descrito. El cero de la escala de la derecha vista a través del ocular debe coincidir con el cero de la escala móvil. En caso contrario, hacer la corrección correspondiente en las lecturas.

4.2.5 Índice de acidez.

a) Materiales y reactivos.

- Matraces Erlenmeyer de 250 ml.
- Bureta graduada de 50 ml.
- Etanol.
- Solución indicadora de fenolftaleína al 1%.
- Hidróxido de sodio 0.1 N.

b) Determinación.

Neutralizar 50 ml de etanol con NaOH 0.1 N, usando fenolftaleína como indicador, hasta obtener una coloración levemente rosada. Pesar de 1 a 10 g de aceite o grasa fundida en el matraz Erlenmeyer y añadir el etanol neutralizado. Titular con NaOH 0.1 N agitando constantemente hasta que el color rosa permanezca durante 15 segundos. Preferentemente, la titulación no debe consumir más de 10 ml, de otra forma se pueden separar las 2 fases. Esto no ocurre si se usa alcohol neutro caliente como disolvente.

c) Cálculos.

$$\text{Índice de acidez (mg KOH/g muestra)} = \frac{\text{ml}_{\text{NaOH}} \times N_{\text{NaOH}} \times 56.1}{\text{g muestra}}$$

En el caso de querer expresar el índice de acidez como % de ácido oléico se usa la siguiente expresión:

$$\% \text{ ácido oléico} = \frac{\text{ml}_{\text{NaOH}} \times N_{\text{NaOH}} \times 0.282}{\text{g muestra}} \times 100$$

Ambas expresiones se relacionan aproximadamente de la siguiente forma:

$$\text{Índice de acidez (mg KOH/g muestra)} = 2 \times \% \text{ ácido oleico}$$

4.2.6 Punto de fusión.

a) Materiales.

- Capilares de vidrio (1 mm de diámetro interno).
- Lente de aumento de vidrio.
- Parrilla de calentamiento y agitación.
- Termómetro graduado (mínima división de 0.2°C).

b) Determinación.

Llenar capilar con la muestra hasta tener una columna de aproximadamente 10 mm de longitud. Sellar el capilar a la flama cuidando de no quemar la muestra. Guardar en condiciones de refrigeración (4-10°C) durante 16 horas.

Tomar el capilar y atarlo al termómetro de tal que el fondo de la columna de la muestra en el capilar coincida con el bulbo del termómetro. Suspender en un recipiente de 600 ml lleno a la mitad de agua. En el caso de tener una idea aproximada del punto de fusión de la muestra, comenzar la determinación a 10°C por abajo del mismo. Comenzar el calentamiento a una tasa de 0.5°C/min, llevando a cabo una agitación moderada para lograr homogeneidad en dicho calentamiento.

Tomar como punto de fusión la lectura en el termómetro a la cual la muestra se vuelve transparente. Generalmente, éste no es un punto en la escala, sino más bien un rango. Reportar dicho rango.

4.2.7 Perfil de ácidos grasos (Cromatografía de gases).

a) Materiales y reactivos.

- Tubo de ensaye con tapón de rosca.
- Baño maria eléctrico.
- Cromatógrafo de gases **HP 5890** con detector de ionización de flama.

- Columna de acero inoxidable empacada con 20% de etilenglicol succinato sobre Chromosorb WHP 80/100 mesh
- Éter etílico.
- Solución al 1% de metóxido de sodio en metanol.

b) Determinación.

En un tubo de ensayo con tapón de rosca se colocan 0.5 ml de la grasa o aceite a evaluar, cuidando de haber eliminado la mayor parte del disolvente empleado en la extracción previa. Se añaden 5 ml de éter etílico y 3 ml de la solución al 1% de metóxido de sodio en metanol. Tapar el tubo y poner en baño maría a 70°C durante unos cuantos segundos. Agitar y enfriar en el congelador. Agregar agua destilada hasta el cuello del tubo con el objeto de lavar las paredes del tubo; agitar para lavar la capa etérea. Tomar 1.5 μ l e inyectar en el cromatógrafo de gases.

c) Condiciones del cromatógrafo.

Gas portador: nitrógeno, flujo= 20 ml/min; aire, flujo= 400 ml/min; hidrógeno, flujo= 30 ml/min. Temperatura del inyector y detector: 240°C. Temperatura del horno: 80 - 200°C (10°C/min).

Los ácidos grasos en las muestras fueron identificados mediante comparación de sus tiempos de retención con los tiempos de retención de estándares (Helrich, 1990).

4.3 Evaluación biológica.

4.3.1 Índices biológicos nutricionales..

a) Fundamento.

En las ratas, el periodo después del destete en el cual siguen creciendo y ganando peso es largo, lo cual es de gran utilidad en aquellos estudios donde la ganancia en peso y tamaño son usados como indicadores en el transcurso de un experimento, y en este caso del valor nutricional de los aceites empleados (Yang, 1974).

b) Preparación de dietas.

Para llevar a cabo la evaluación biológica tanto de las grasas no destoxificadas como de las destoxificadas, se deben elaborar dietas isoproteicas y isocalóricas con respecto a una dieta referencia, de tal manera que el nutrimento en estudio (en este caso la grasa) sea la única variable.

Tanto la dieta de referencia como las de estudio se elaboran en base a una dieta ideal. Un ejemplo común de dicho tipo de dieta se presenta en la siguiente tabla:

DIETA IDEAL	
Componente	g / 100 g dieta
Proteína	10.00
Sacarosa	20.00
Glucosa	20.00
Dextrina	19.00
Manteca vegetal	4.00
Aceite	10.00
Mezcla de minerales	4.00
Mezcla de vitaminas	2.00
Celulosa	11.00

c) Material.

- Balanza granataria.
- Mezcladora **HOBART Mod. N-50**

d) Componentes empleados para la elaboración de las dietas.

- Caseína (SIGMA #C-3400)
- Sacarosa (grado alimenticio)
- α -D-glucosa (SIGMA # G-5000)
- Dextrina (SIGMA # D-2131)
- Manteca vegetal (grado alimenticio)
- Aceite de maíz (grado alimenticio)
- Mezcla de minerales (Rogers Harper TEKLAD Cat. #170760)
- Mezcla de vitaminas (Rogers Harper TEKLAD Cat. #40060)
- Celulosa (Rogers Harper TEKLAD Cat. #160390)

e) Elaboración.

Cada uno de los componentes es pesado en balanza granataria. La caseína se homogeneiza junto con los demás componentes sólidos a excepción de la mezcla de vitaminas. A continuación se adicionan la manteca vegetal (previamente derretida) y el aceite correspondiente y finalmente la mezcla de vitaminas. Todo se mezcla hasta tener una dieta completamente homogénea. La dieta se coloca en un recipiente de plástico de boca ancha y se guarda en condiciones de refrigeración ($4 \pm 2^{\circ}\text{C}$) para su conservación.

f) Periodo de ensaye.

Se utilizan ratas macho **Wistar** recién destetadas (21-23 días de nacidas). Las ratas se dividen en grupos de tal manera que se tengan de preferencia lotes con igual número de

c) Material.

- Balanza granataria.
- Mezcladora **HOBART Mod. N-50**

d) Componentes empleados para la elaboración de las dietas.

- Caseína (SIGMA #C-3400)
- Sacarosa (grado alimenticio)
- α -D-glucosa (SIGMA # G-5000)
- Dextrina (SIGMA # D-2131)
- Manteca vegetal (grado alimenticio)
- Aceite de maíz (grado alimenticio)
- Mezcla de minerales (Rogers Harper TEKLAD Cat. #170760)
- Mezcla de vitaminas (Rogers Harper TEKLAD Cat. #40060)
- Celulosa (Rogers Harper TEKLAD Cat. #160390)

e) Elaboración.

Cada uno de los componentes es pesado en balanza granataria. La caseína se homogeneiza junto con los demás componentes sólidos a excepción de la mezcla de vitaminas. A continuación se adicionan la manteca vegetal (previamente derretida) y el aceite correspondiente y finalmente la mezcla de vitaminas. Todo se mezcla hasta tener una dieta completamente homogénea. La dieta se coloca en un recipiente de plástico de boca ancha y se guarda en condiciones de refrigeración ($4 \pm 2^\circ\text{C}$) para su conservación.

f) Periodo de ensayo.

Se utilizan ratas macho **Wistar** recién destetadas (21-23 días de nacidas). Las ratas se dividen en grupos de tal manera que se tengan de preferencia lotes con igual número de

ratas en cada uno y se asignan a cada lote en base a su peso inicial y utilizando la distribución de "culebra japonesa" (ver Apéndice 1) con el objeto de tener la menor variabilidad posible entre los lotes.

Cada rata es colocada en una jaula individual, dotándosele con un comedero donde se le pone la dieta correspondiente (procurando que se halle en un ligero exceso determinado por el registro periódico de su ingesta) y un bebedero con agua administrada *ad libitum*. Debajo de cada jaula se colocan charolas de papel manila para la recolección de heces, cambiándose cuando ya se hallen demasiado húmedas.

A lo largo de todo el tiempo de estudio se registra el peso de cada rata y el alimento ingerido, procurando recoger aquel alimento que sea tirado por el animal (el cual no es considerado como ingerido por el mismo), cambiando el agua del bebedero periódicamente para evitar la aparición de hongos y desechando las heces en las charolas. En las últimas semanas del estudio se recolectan las heces individualmente en frascos de vidrio, separándolas de restos de alimento mediante el empleo de un tamiz y secadas en estufa a 60°C para evitar su contaminación.

Para el cálculo de los índices calóricos es necesario conocer la densidad calórica de las dietas respectivas, así como de las heces. Ésta se realizó en una bomba calorimétrica y a continuación se describe la metodología, la cual corresponde a la llamada Energía Gruesa (EG).

f.1 Fundamento determinación de la Energía Gruesa (EG).

La energía gruesa o densidad calórica de un alimento o dieta es la cantidad de energía que proporciona un gramo del mismo alimento o dieta (Church, 1976). Para obtener la energía gruesa de una muestra, ésta se somete a una combustión total dentro de un recipiente cerrado en presencia de un exceso de oxígeno, lo cual nos brinda la confianza de una combustión completa.

Para esta determinación se usó una bomba calorimétrica **GALLENKAMP, MOD. CBB-330-010L**. En ella, el aumento de temperatura como resultado de la combustión de la muestra se detecta en un galvanómetro de alta sensibilidad, traduciendo dicho aumento en una señal eléctrica, lo cual se puede leer en la escala del galvanómetro. Es necesaria la elaboración de una curva patrón de una sustancia de densidad energética conocida para poder, a su vez, traducir las lecturas del galvanómetro en unidades de energía.

f.2 Material y reactivos.

- Balanza analítica.
- Bomba calorimétrica **GALLENKAMP, MOD. CBB-330-010L**
- Galvanómetro **GAM METRIC LTD.**
- Crisoles de acero inoxidable de 2.54 cm. de diámetro.
- Mango metálico prensador.
- Mechas de algodón de 7 cm. de longitud.
- Ácido benzoico (estándar termoquímico de la British Chemical Standards; valor calórico: 26,454 Joules/g. ó 6.3184 kcal/g.).

f.3 Determinación.

Las muestras deben estar finamente molidas; aún cuando el secado es conveniente, éste depende de las características propias de la muestra. La cantidad de muestra estará determinada por el tipo de material y como referencia se debe pesar una cantidad de muestra que proporcione aproximadamente 4 kcal. Para materiales de alta densidad calórica serán suficientes 0.4 g., mientras que para muestras de baja densidad calórica, como la urea, se requiere de 1.5 g.

Dentro del crisol se coloca una cantidad de muestra ligeramente superior a la descada, junto con la mecha de algodón y no se necesita que sea exacta. A continuación se compacta la muestra y la mecha con el mango metálico prensador y se toma el peso

definitivo. El crisol se coloca en la parte superior del pilar central de la bomba y el extremo de la mecha se introduce en el alambre de ignición.

Hay que tener cuidado de que el anillo sellador de la bomba se halle en perfectas condiciones y que sea flexible; en caso contrario aplicar un poco de grasa o, dado el caso, reemplazarlo. Colocar el anillo sellador en el canal circular, levantar el anillo estriado y enroscar el cilindro de la bomba lo suficiente como para que coincidan ambas roscas. Bajar el cilindro de la bomba junto con el anillo estriado sobre el anillo segurador y terminar de girar el cilindro hasta que se cierre completamente. Introducir la terminal del termopar en la parte superior del cilindro de la bomba.

Abrir el tanque de oxígeno, previo ajuste de la válvula de reducción de flujo. Girar la perilla de paso de oxígeno en el panel de control de la bomba y dejarla abierta hasta tener una presión dentro del cilindro de 25 atmósferas. De no llegar a esta presión, ajustar de nueva cuenta la válvula de reducción o checar el contenido de oxígeno en el tanque. Cerrar la perilla de paso de oxígeno y cuidar que no haya reducción en la presión, lo cual sería indicio de la existencia de una fuga en alguna de las conexiones.

Dejar que la temperatura del termopar se estabilice con respecto a la del cilindro. Ajustar la escala en el galvanómetro a cero con el ajuste grueso primero (parte inferior del galvanómetro) y posteriormente con el ajuste fino (perilla central). Checar que la válvula del lado derecho de la base del cilindro se halle cerrada. Presionar el botón rojo de ignición en el panel central de la bomba y esperar a que inicie la combustión, lo cual se verá por una notable deflexión de la aguja del manómetro.

La lectura en el galvanómetro llega a un máximo, después de la cual baja un poco para volver a subir hasta estabilizarse en una lectura máxima durante unos momentos. Esta última lectura es la que se debe tomar. Abrir la válvula del lado derecho de la base del cilindro de la bomba para dejar escapar los gases producto de la combustión, quitar el termopar y el cilindro de la bomba en forma inversa a la descrita anteriormente. Enfriar el

cilindro de la bomba y enjuagar con agua destilada. Secar para la siguiente determinación, siendo recomendable hacer las determinaciones por duplicado.

f.4 Cálculos.

Elaborar una curva patrón con ácido benzoico de densidad calórica conocida. Se recomienda tener suficientes puntos en la curva de modo que se cubra toda la escala en el galvanómetro (0.1 a 0.8 gramos). Hacer una gráfica colocando en las abscisas el contenido energético y en las ordenadas la lectura en el galvanómetro. Hacer una combustión exclusivamente de una de las mechas empleadas de tal modo que posteriormente se haga la corrección en la lectura de las muestras.

f.5 Índices calóricos.

Una vez determinada la densidad calórica de las dietas y las heces, se procede al cálculo de los distintos índices calóricos.

f.5.1 Energía digerible aparente (ED).

$$ED = \frac{E_i - E_f}{E_i} \times 100$$

donde:

E_i: Energía ingerida

E_f: Energía fecal

f.5.2 Eficiencia energética (EE).

$$EE = \frac{\text{Ganancia en peso}}{E_i}$$

cilindro de la bomba y enjuagar con agua destilada. Secar para la siguiente determinación, siendo recomendable hacer las determinaciones por duplicado.

f.4 Cálculos.

Elaborar una curva patrón con ácido benzoico de densidad calórica conocida. Se recomienda tener suficientes puntos en la curva de modo que se cubra toda la escala en el galvanómetro (0.1 a 0.8 gramos). Hacer una gráfica colocando en las abcisas el contenido energético y en las ordenadas la lectura en el galvanómetro. Hacer una combustión exclusivamente de una de las mechas empleadas de tal modo que posteriormente se haga la corrección en la lectura de las muestras.

f.5 Índices calóricos.

Una vez determinada la densidad calórica de las dietas y las heces, se procede al cálculo de los distintos índices calóricos.

f.5.1 Energía digerible aparente (ED).

$$ED = \frac{E_i - E_f}{E_i} \times 100$$

donde:

E_i: Energía ingerida

E_f: Energía fecal

f.5.2 Eficiencia energética (EE).

$$EE = \frac{\text{Ganancia en peso}}{E_i}$$

f.6 Otros índices.

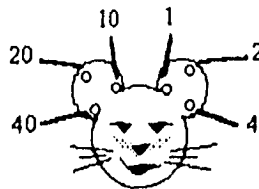
f.6.1 Relación de eficiencia protéica (PER).

$$PER = \frac{\text{ganancia en peso (g)}}{\text{proteína ingerida (g)}}$$

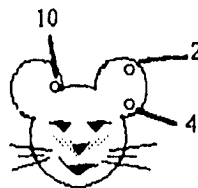
4.3.2 Estudio toxicológico subagudo.

Se usan ratones macho (cepa CFW) recién destetados, y son divididos en lotes de igual tamaño de preferencia, repartiéndolos en dichos lotes de acuerdo a la distribución de "culebra japonesa".

Cada ratón es marcado mediante perforaciones en las orejas, de acuerdo al siguiente esquema:



De este modo, por ejemplo, al ratón identificado con el número 16 se le hacen las siguientes perforaciones:



Los ratones son colocados en cajas de plástico con tapa metálica, adecuada de tal manera que en la misma tapa se les ponga el alimento y un bebedero con agua, ambos administrados *ad libitum*. El alimento administrado a los ratones es 5001, elaborado por PMI Feeds Inc. y cuya composición es la siguiente:

Proteína cruda- no menos de	23.0%
Grasa cruda- no menos de	4.5
Fibra cruda- no más de	6.0
Cenizas- no más de	8.0
Minerales añadidos- no más de	2.5

Durante todo el tiempo de estudio se registra el peso de cada ratón y cada semana se cambia el agua del bebedero para evitar la aparición de hongos.

Para la administración de aceites cuando se hace por vía oral se lleva a cabo con ayuda de jeringas de plástico y puntas especiales de acero inoxidable curvas con final redondeado del #18 x 1 - 1/4"). Los aceites se atemperan a 37°C en un baño maría. Con objeto de tener un estudio más completo, también se lleva a cabo la observación del comportamiento que presenten los animales a lo largo del experimento. Al final del mismo se lleva a cabo la disección de los animales y la extracción de órganos tales como hígado, riñones y bazo para registrar su peso final y evaluar visualmente su estado.

Con el peso de los órganos se lleva a cabo una relación de peso del órgano con respecto al peso corporal final del ratón correspondiente como se muestra en la siguiente expresión:

$$RP = \frac{\text{Peso órgano (g)}}{\text{Peso corporal final (g)}} \times 100$$

donde:

RP: relación porcentual entre el peso del órgano con respecto al peso corporal

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En estudios anteriores se ha llevado a cabo el análisis proximal de las semillas íntegras y en el renglón de grasa se reportan valores de 17.48% para la semilla de colorín (*Erythrina americana*) y de 14.25% para la semilla de patol (*Erythrina breviflora*) (Jiménez, 1994). Con base en estos datos podemos considerar a estas semillas como de interés ya que su contenido en grasa las hace factibles de poder explotarse como una fuente alternativa de grasa y aceite, previo estudio químico, toxicológico y biológico, que el presente trabajo pretende iniciar.

5.1 Evaluación química.

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de los distintos parámetros propuestos para definir el perfil químico de las muestras de grasa estudiadas. Se presentan los datos bibliográficos correspondientes al maíz (*Zea mays*), girasol (*Helianthus annuus*), soya (*Glycine max*) y manteca de cerdo con fines de comparación. Se observa que los valores de los distintos parámetros tanto para el colorín como para el patol son muy semejantes entre sí. Como era de esperarse, el índice de yodo de los extractos lipídicos de ambas semillas es mayor al correspondiente a una grasa de origen animal (manteca) debido al mayor grado de insaturación de los ácidos grasos que conforman los triacilglicérols de los aceites de origen vegetal, aunque su valor sea ligeramente menor comparando con los valores de los aceites de las semillas que se presentan en la Tabla 1..

	Colorín (<i>Erythrina americana</i>)	Patol (<i>Erythrina breviflora</i>)	Maíz (<i>Zea mays</i>)(NOM, 1976)	Girasol (<i>Helianthus annuus</i>) (Swern, 1979)	Soya (<i>Glycine max</i>) (Swern, 1979)	Manteca de cerdo (Swern, 1979)
• Índice de yodo (Hanus) (g I ₂ /100 g aceite)	84.7910 ± 0.6832	89.8003 ± 1.6585	103 - 120	125 - 136	125 - 130	46 - 70
• Índice de saponificación (mg KOH/g aceite)	173.6104 ± 1.3830	180.4953 ± 1.1216	187 - 193	188 - 194	189 - 195	195 - 202
• Densidad relativa (25/25°C)	0.9069 ± 0.0005	0.9122 ± 0.0018	0.910 - 0.926	0.915 - 0.919	0.917 - 0.921	0.858 - 0.864
• Índice de refracción (25°C)	1.4640 ± 0.0006	1.4637 ± 0.0005	1.470 - 1.477	1.472 - 1.474	1.470 - 1.476	
• Índice de acidez (mg KOH / g)	0.6142 ± 0.0031	1.7421 ± 0.0296	máximo: 0.1	-----	-----	máximo: 1
• Punto de fusión (°C)	18-19	21-22	- 15	-----	-----	-----

Tabla 1. Evaluación química de extractos lipídicos de colorín (*Erythrina americana*) y patol (*Erythrina breviflora*).

Tomando en cuenta los índices de saponificación, de refracción y la densidad relativa es de notar que los valores obtenidos son muy parecidos a los de los aceites vegetales comestibles. Sin embargo, es de observar una diferencia muy marcada entre los extractos de las semillas y los aceites vegetales en cuanto a su índice de acidez. En la bibliografía se hace una generalización por parte del Codex Alimentarius donde se establece que para grasas y aceites no procesados es permisible hasta un valor de 4.0 en el índice de acidez (expresado como mg KOH/g) y de 0.6 para grasas y aceites procesados (Egan, 1991). Con base en esta información, podemos decir que los valores de índice de acidez obtenidos para ambos extractos lipídicos se halla en valores congruentes, tomando en cuenta que se trata de extractos lipídicos a los cuales no se les ha llevado a cabo ningún tipo de procesamiento, por lo cual cuentan todavía con una amplia variedad de compuestos aparte de los triacilglicerolos y de los ácidos grasos libres.

Tomando los valores de punto de fusión para ambos extractos vemos que guardan concordancia con el % de ácidos grasos insaturados respectivos determinado por cromatografía de gases (Tabla 3). Esta concordancia la podemos comparar con aquella que se observa para el zapotillo, donde Sotelo, *et al* (1990) reportan un punto de fusión de 26.1°C, teniendo un índice de yodo de 95.82 y un % de ácidos grasos insaturados de 71.53. Con base al índice de yodo podríamos esperar un punto de fusión ligeramente mayor al obtenido para los extractos, sin embargo, éste abatimiento del punto de fusión puede explicarse considerando todos los demás compuestos presentes en éstos extractos crudos.

Por otro lado, gracias a la colaboración del Dr. Marcos Soto (Universidad de Chapingo), se consiguieron los datos concernientes al contenido de alcaloides de los extractos lipídicos crudos y la caracterización de los mismos. El extracto lipídico de colorín tiene una concentración de alcaloides de 96 mg/100 g extracto, mientras que el extracto de patol contiene 36 mg/100 g de extracto. Los alcaloides presentes en el extracto lipídico de colorín son β -Erythroidina, Erysodina y Erysovina. Por otro lado, en el extracto lipídico

de patol sólo se hallaron trazas de Eryrodina. Las estructuras de estos alcaloides se presentan en la Tabla 2.

<p>β-Erythroidina (3β)-1,2,6,7-tetradehidro-14,17-dihidro-3-metoxi-16(15H)-oxaerythrinan-15-ona</p>	
<p>Eryrodina (3β)-1,2,6,7-tetradehidro-3,15-dimetoxierythrinan-16-ol</p>	
<p>Erysovina (3β)-1,2,6,7-tetradehidro-3,16-dimetoxierythrinan-15-ol</p>	

* Dictionary of Natural Products, 1994

Tabla 2. Estructuras químicas de los alcaloides presentes en los extractos lipídicos de colorín (*Erythrina americana*) y patol (*Erythrina breviflora*).

La presencia de estos alcaloides enriquece el cuadro general que se empezó a describir en estudios anteriores donde también se detectó la presencia de alcaloides en las harinas desengrasadas de ambas semillas (Jiménez, 1994). Guerrero (1982) reporta una DL₅₀ (en rata, vía oral) de 6,000 mg/kg de peso corporal del extracto etéreo de la semilla de colorín, lo cual nos permite calificar a dicho extracto de acuerdo a Luxon, S.G. (1992) de moderada a ligeramente tóxico. Esta información permitió justificar los estudios biológicos hechos con los extractos lipídicos en este trabajo.

En la Tabla 3 se presenta el perfil de ácidos grasos de ambos extractos determinado mediante cromatografía de gases, junto con maíz y otras dos leguminosas con fines de comparación tomados de Sotelo, *et al* (1990). Así mismo, en las Figuras 7 y 8 se muestran los cromatogramas obtenidos para colorín y patol respectivamente.

En ambos extractos el ácido graso que se encuentra en mayor cantidad es el oléico ($C_{18:1}, \Delta^9$), seguido de linoléico ($C_{18:2}, \Delta^{9,12}$) y palmítico (C_{16}). La cantidad de ácido oléico presente es significativa (>45%) y puede considerarse que ambas semillas son una buena fuente de este ácido graso, comparable al maíz e incluso superior a las otras dos semillas que se presentan en la misma tabla. Por otro lado, también la cantidad de ácido linoléico es de importancia (>20%) y es de considerar ya que este ácido graso se halla dentro de los llamados ácidos grasos indispensables, aún cuando su concentración en los extractos sea menor al de maíz, ojo de águila y maguacata. En cuanto al ácido α -linolénico (otro ácido graso indispensable), su concentración es mayor a la de las otras tres semillas pero no es tan alta como para poder presentar propiedades secantes que limitaran su posible uso como alimento, así como para sufrir reacciones de oxidación que pudieran afectar la calidad del aceite. El extracto lipídico de colorín tiene un nivel de ácidos grasos indispensables de 24.4%, mientras que el de patol es de 29.9%.

El porcentaje de ácidos grasos insaturados (%AGI) para colorín y para patol es de 71.2 y 71.0, respectivamente. Lo anterior se menciona para relacionarlo con el índice de yodo, ya que para el extracto de ojo de águila se reporta un índice de yodo de 125.17 (%AGI= 88.86) y para el de maguacata de 99.69 (%AGI= 72.96) (Sotelo, *et al*, 1990). Observando estos datos, puede decirse que los valores de índice de yodo obtenidos para el colorín y patol concuerdan con su contenido de ácidos grasos insaturados: para colorín el índice de yodo fué de 84.79 (%AGI=71.2) y para patol de 89.80 (%AGI=71.0).

Ácido graso	Composición en %				
	Colorín	Patol	Maíz (NOM, 1976)	Ojo de águila (<i>Cassipouia crista</i>) (Sotelo, <i>et al</i> , 1990)	Maguacata (<i>Pithecolobium flexicaule</i>) (Sotelo, <i>et al</i> , 1990)
Palmitico (C ₁₆)	14.8	11.6	7.0 - 13.0	8.06	15.34
Esteárico (C ₁₈)	4.9	3.2	2.0 - 4.0	3.08	9.39
Oléico (C _{18:1} , Δ ⁹)	46.8	45.1	35.0 - 45.0	17.38	32.60
Linoléico (C _{18:2} , Δ ^{9,12})*	20.6	25.1	35.0 - 45.0	71.48	39.27
Linolénico (C _{18:3} , Δ ^{9,12,15})*	3.8	4.8	máximo 1.0		
Araquídico (C ₂₀)	3.2	4.9	máximo 0.05		1.38
No identificados	5.9	5.3			
Insaturados	71.2	71.0		88.86	72.96

* Ácidos grasos indispensables.

Tabla 3. Perfil de ácidos grasos de los extractos lipídicos de colorín (*Erythrina americana*) y patol (*Erythrina breviflora*).

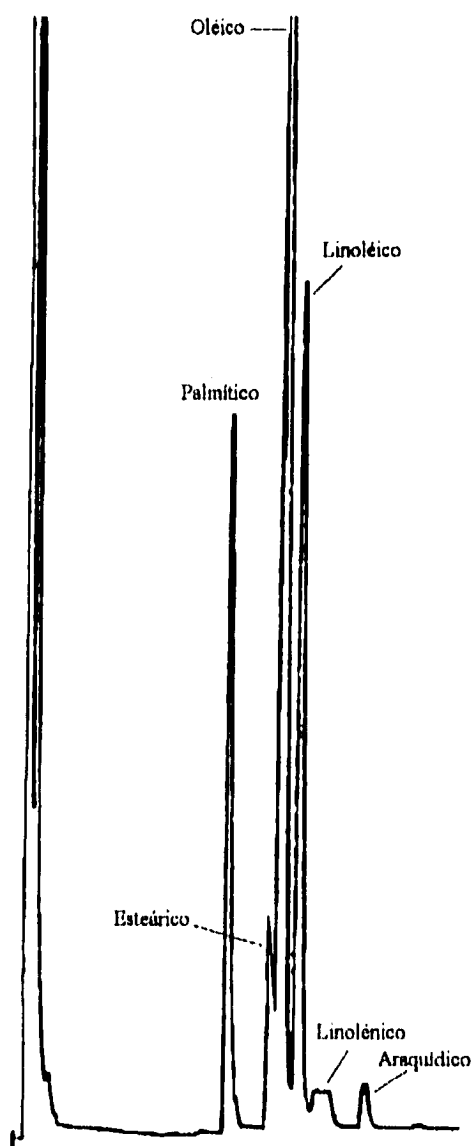


Figura 7. Cromatografía de gases. Perfil de ácidos grasos del extracto lipídico de colorin (*Erythrina americana*).

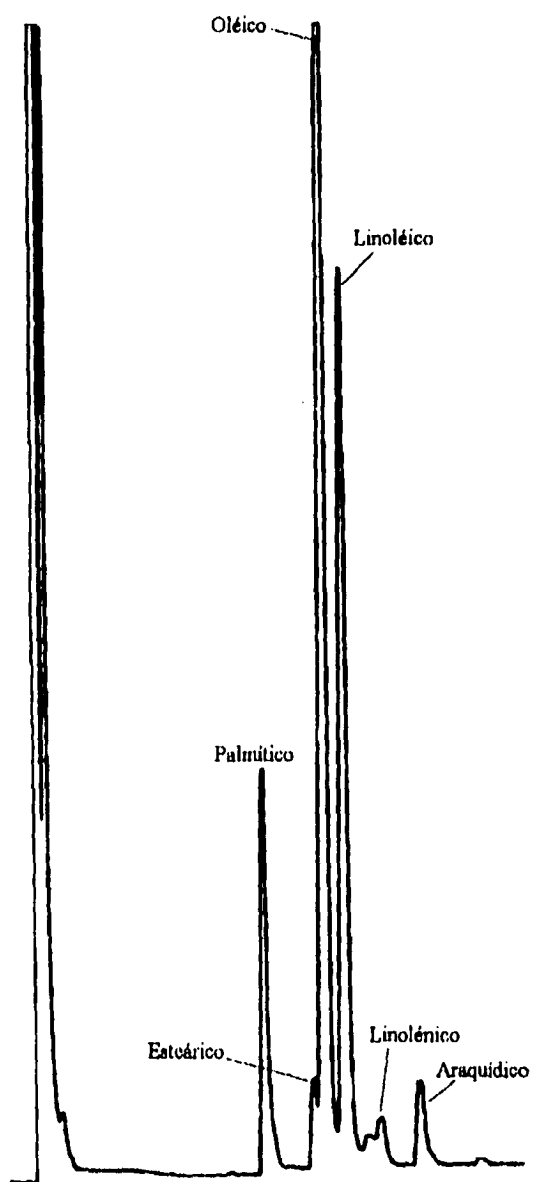


Figura 8. Cromatografía de Gases. Perfil de ácidos grasos del extracto lipídico de patol (*Erythrina breviflora*).

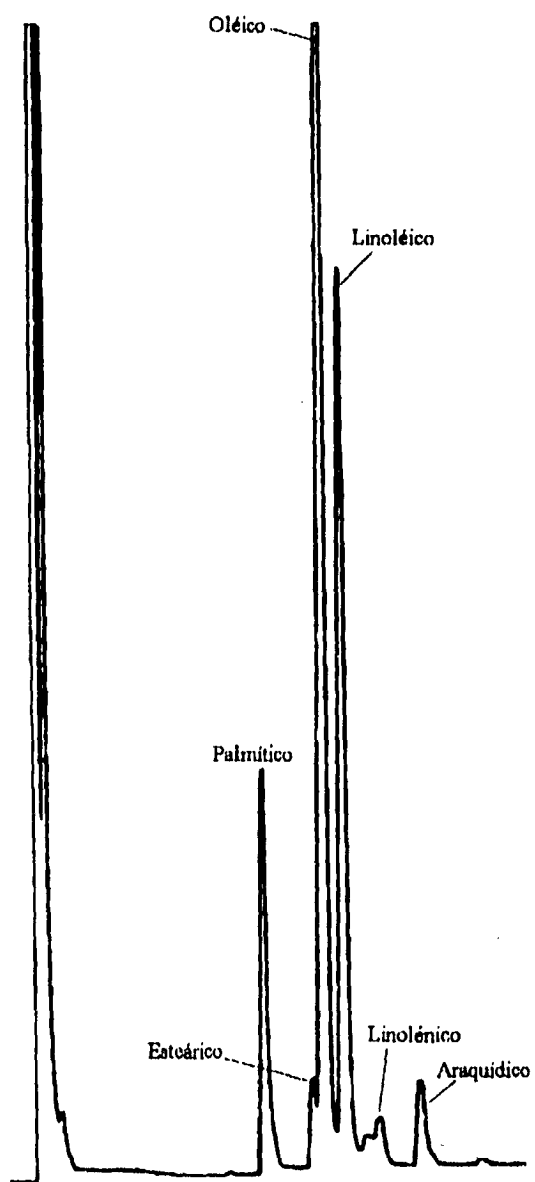


Figura 8. Cromatografía de Gases. Perfil de ácidos grasos del extracto lipídico de patol (*Erythrina breviflora*).

5.2 Evaluación biológica.

5.2.1 Índices biológicos nutricionales.

Se elaboraron en total 4 dietas de estudio y una dieta de referencia (empleando aceite de maíz). En la elaboración de las mismas se manejó un nivel de proteína del 10% (el recomendado en la bibliografía para estudios de este tipo) y de los aceites de un 10%, aún cuando hay ciertos autores que argumentan que a este nivel se promueve la ingesta calórica, la obesidad y la incidencia de tumores mamarios y prefieren un nivel del 5% (Rao, 1986).

La proteína usada en la elaboración de las dietas fue Caseína (SIGMA # C-3400) cuya composición es la siguiente:

Componente	g / 100 g dieta
Proteína	89.19
Cenizas	0.58
Grasa	0.23

En base a los datos anteriores se hicieron los cálculos para obtener un 10% de proteína, obteniéndose una cantidad de 11.21 g de caseína que aportan:

	g / 100 g dieta
Proteína	10.00
Cenizas	0.06
Grasa	0.02

De tal modo, las dietas quedaron con la siguiente composición:

DIETA EXPERIMENTAL	
Componente	g / 100 g dieta
Proteína (Caseína)	11.21
Sacarosa	20.00
Glucosa	20.00
Dextrina	19.00
Manteca vegetal	3.98
ACEITE	10.00
Mezcla de minerales	3.94
Mezcla de vitaminas	2.00
Celulosa	9.87

El número total de ratas Wistar empleadas fué de 30, con un peso promedio de 44.49 \pm 1.19 g (rango = 4.4 g), lo cual habla de una variación relativamente pequeña tratándose de éste tipo de estudios. Se hicieron 5 lotes de 6 ratas cada uno, los cuales quedaron conformados como se muestra en la Tabla 4.

Rata	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5
1	42.20	42.60	42.80	42.80	43.00
2	43.90	43.80	43.60	43.20	43.20
3	44.00	44.20	44.40	44.50	44.50
4	45.30	45.10	44.70	44.50	44.50
5	45.40	45.50	45.50	45.50	45.60
6	46.60	46.00	46.00	46.00	45.80

Tabla 4. Índices biológicos nutricionales. Distribución de las ratas usando el método de culebra japonesa (peso en gramos).

Las dietas también fueron asignadas al azar:

Lote	1	2	3	4	5
Dieta	Patol sin destoxificar	Colorín destoxificado	Colorín sin destoxificar	Patol destoxificado	Maíz (referencia)

Los resultados obtenidos de Energía Digerible Aparente (EDA) se presentan en la Tabla 5, así como en la Figura 9 se presentan en forma gráfica. Cabe aclarar que para el cálculo de este índice se tomaron en cuenta los últimos 11 días del estudio biológico (tiempo en el cual se recolectaron las heces).

	Destoxificado			Sin Destoxificar	
	Maíz	Colorín	Patol	Colorín	Patol
Rata 1	89.3360	87.5164	88.1540	88.6092	85.5740
Rata 2	89.6193	86.5516	87.3975	85.6654	86.6442
Rata 3	89.2969	86.7765	88.2394	88.2672	87.5044
Rata 4	86.8033	86.4987	87.6680	77.9471	88.6173
Rata 5	89.4295	87.3914	88.8790	88.2238	87.0399
Rata 6	89.3193	87.7270	87.8156	87.0945	86.8862
Media	88.9674	87.0769	88.0256	85.9679	87.0443
Desv. est.	1.0067	0.5320	0.5210	4.0754	1.0033

Tabla 5. Índices biológicos nutricionales - Energía digerible aparente (%).

A los datos se les hizo un Análisis de Varianza de Una Vía. Aún cuando en éste no se detectó diferencia significativa entre las distintas dietas, se llevó a cabo la prueba de rango múltiple de Duncan al 95%, donde sí se pudo detectar que hay una diferencia significativa entre la dieta control (Maíz) y la dieta elaborada con Colorín sin destoxificar (CSD). Las dietas quedarían ordenadas de menor a mayor valor de EDA y agrupadas de acuerdo a la prueba de Duncan conforme se muestra a continuación:

Colorín sin destoxificar	85.9679 ^a
Patol sin destoxificar	87.0443 ^{ab}
Colorín destoxificado	87.0769 ^{ab}
Patol destoxificado	88.0256 ^{ab}
Maíz (Control)	88.9674 ^b

	Destoxificado			Sin Destoxificar	
	Maíz	Colorín	Patol	Colorín	Patol
Rata 1	89.3360	87.5164	88.1540	88.6092	85.5740
Rata 2	89.6193	86.5516	87.3975	85.6654	86.6442
Rata 3	89.2969	86.7765	88.2394	88.2672	87.5044
Rata 4	86.8033	86.4987	87.6680	77.9471	88.6173
Rata 5	89.4295	87.3914	88.8790	88.2238	87.0399
Rata 6	89.3193	87.7270	87.8156	87.0945	86.8862
Media	88.9674	87.0769	88.0256	85.9679	87.0443
Desv. est.	1.0067	0.5320	0.5210	4.0754	1.0033

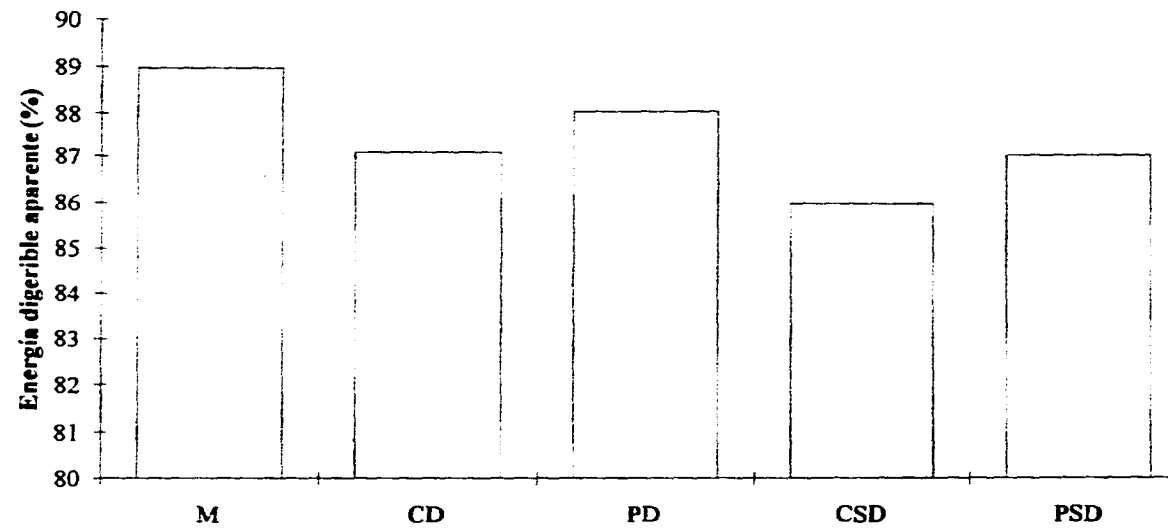
Tabla 5. Índices biológicos nutricionales - Energía digerible aparente (%).

A los datos se les hizo un Análisis de Varianza de Una Vía. Aún cuando en éste no se detectó diferencia significativa entre las distintas dietas, se llevó a cabo la prueba de rango múltiple de Duncan al 95%, donde si se pudo detectar que hay una diferencia significativa entre la dieta control (Maíz) y la dieta elaborada con Colorín sin destoxificar (CSD). Las dietas quedarían ordenadas de menor a mayor valor de EDA y agrupadas de acuerdo a la prueba de Duncan conforme se muestra a continuación:

Colorín sin destoxificar	85.9679 ^a
Patol sin destoxificar	87.0443 ^{ab}
Colorín destoxificado	87.0769 ^{ab}
Patol destoxificado	88.0256 ^{ab}
Maiz (Control)	88.9674 ^b

Con este análisis podemos decir que, aún cuando no hay diferencia significativa entre las dietas a un $\alpha = 0.05$, sí es posible ver cierta tendencia entre las mismas, ya que las dietas elaboradas con extracto lipídico destoxificado tienen un valor de EDA mayor al de aquellas elaboradas con extractos no destoxificados, lo cual nos indica que la destoxificación de los extractos (entendiéndose ésta como eliminación de alcaloides) sí tiene un efecto benéfico sobre la calidad del extracto, reflejado como una mayor asimilación del mismo por parte de los animales en estudio. Además, dicha tendencia guarda relación con el contenido de alcaloides descrito previamente, ya que, tanto para los extractos destoxificados como para los que no lo están, se observa un valor de EDA mayor para las dietas elaboradas con extracto lipídico de patol que para las elaboradas con extracto lipídico de colorín, concordando con el mayor contenido de alcaloides de éste último. Podemos entonces decir que los alcaloides presentes en los extractos crudos interfieren en la asimilación de los mismos, tal vez interfiriendo con la lipasa encargada de escindir los triacilgliceroles en unidades más sencillas, o interfiriendo a nivel de mucosa intestinal que es donde se lleva a cabo la absorción.

Cabe también mencionar que los valores obtenidos de EDA se hallan muy cercanos a los valores reportados de Digestibilidad Verdadera (donde se toma en cuenta también la energía en orina) el cual es de alrededor de 90 a 92% para aceites vegetales en general⁽¹¹⁾. En este estudio no se tomó en cuenta la fracción de orina debido a que la técnica tentativa a utilizar daba resultados de contenido energético en orina demasiado variables como para poder obtener conclusiones confiables.



Clave: M: Maiz CD: Colorin destoxificado PD: Patol destoxificado CSD: Colorin sin destoxificar PSD: Patol sin destoxificar

Figura 9. Índices biológicos nutricionales - Energía digerible aparente.

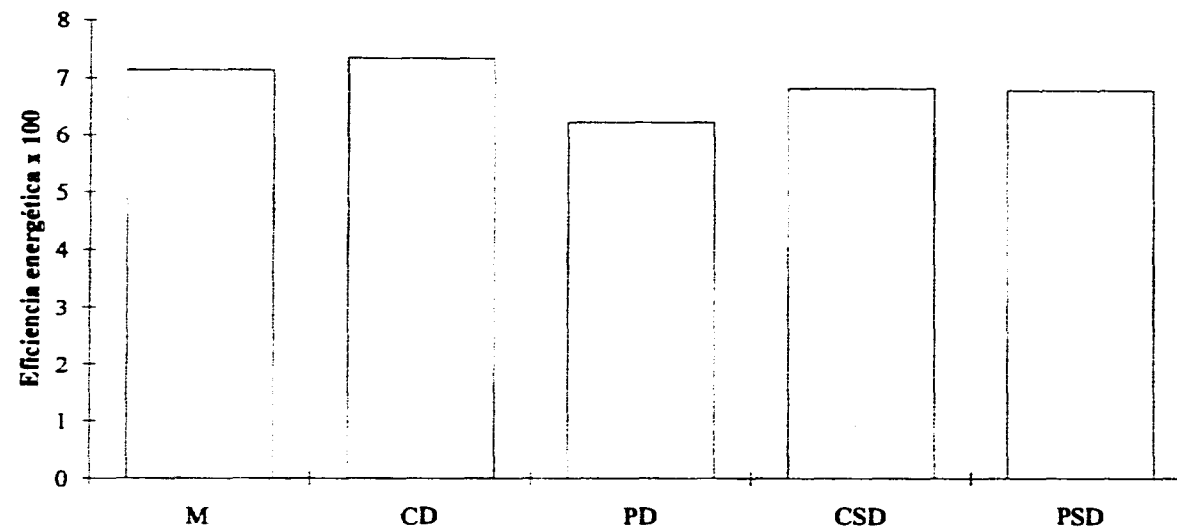
En la Tabla 6 se presentan los datos obtenidos de Eficiencia Energética (EE) tomando en cuenta los 21 días de estudio y en forma gráfica se presentan en la Figura 10.

	Eficiencia Energética x 100 (%)				
	Destoxificado			Sin Destoxificar	
	Maíz	Colorín	Patol	Colorín	Patol
Rata 1	7.2623	6.9623	6.1562	6.6713	6.4900
Rata 2	7.0931	7.2715	6.0858	7.1960	7.0022
Rata 3	6.9108	7.3300	6.7257	6.4910	6.8666
Rata 4	7.4452	7.5203	6.5002	6.9488	6.4310
Rata 5	7.6106	7.7074	5.4534	7.0981	7.2247
Rata 6	6.5714	7.3432	6.4667	6.6720	6.8406
Media	7.1489	7.3558	6.2313	6.8462	6.8092
Desv. est.	0.3761	0.2504	0.4481	0.2769	0.3030

Tabla 6. Índices biológicos nutricionales - Eficiencia energética.

A estos datos también se les hizo un Análisis de Varianza de una Vía donde se detectó una diferencia altamente significativa entre las dietas. Se realizó la prueba de rango múltiple de Duncan al 95% y las dietas quedaron agrupadas de la siguiente manera:

Patol Destoxificado	6.2313 ^a
Patol sin Destoxificar	6.8092 ^b
Colorín sin Destoxificar	6.8462 ^b
Maíz	7.1489 ^{bc}
Colorín Destoxificado	7.3558 ^c



Clave: M: Maiz CD: Colorin destoxificado PD: Patol destoxificado CSD: Colorin sin destoxificar PSD: Patol sin destoxificar

Figura 10. Índices nutricionales- Eficiencia energética

En el caso del colorín, la diferencia entre el aceite destoxificado y el no destoxificado en cuanto a sus valores de EE (estadísticamente diferentes entre si) sí guarda relación con el tratamiento de eliminación de alcaloides, ya que el aceite sin destoxificar tiene un valor de EE menor al del aceite de colorín destoxificado. Sin embargo, en el caso del patol esta relación no se observa sino que se nota un comportamiento contrario, i.e. el aceite de patol destoxificado tiene un valor menor y diferente estadísticamente hablando del aceite de patol sin destoxificar. Comparando entre ambas semillas, a pesar de que en el análisis de EDA el de colorín resulta ser menos asimilado que el aceite de patol, en el análisis de EE se puede observar que es el aceite de colorín el que se aprovecha más en el proceso de crecimiento reflejado como aumento en el peso corporal de los animales en estudio.

Con objeto de confirmar estas aseveraciones, se hizo de nuevo el cálculo de EE pero ahora tomando en cuenta los últimos 11 días del estudio para poder entonces tomar el valor de energía adsorbida en vez del valor de energía ingerida (ya que la primera es la que realmente fué utilizada por los animales para su metabolismo). La tendencia observada es la misma que la descrita arriba.

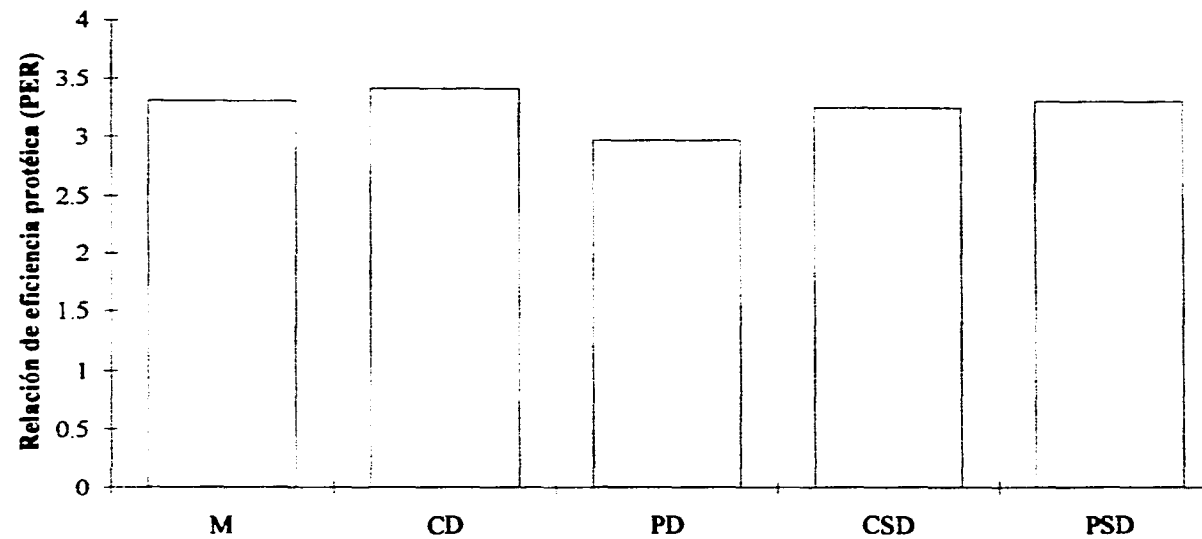
Se hizo también el cálculo de Relación de Eficiencia Protéica, cuyos resultados se presentan en la Tabla 7 y en la Figura 11. A los datos obtenidos se les llevó a cabo un Análisis de Varianza de una Vía, donde se detectó una diferencia altamente significativa entre los tratamientos. Al realizar la prueba de rango múltiple de Duncan al 95%, los grupos quedaron ordenados en orden ascendente de PER de la siguiente manera:

Patol destoxificado	2.9750 ^a
Colorín sin destoxificar	3.2533 ^b
Maíz	3.3083 ^b
Patol sin destoxificar	3.3083 ^b
Colorín destoxificado	3.4167 ^b

Como es de notar, la dieta elaborada con aceite de patol destoxificado presenta el menor valor de PER y es significativamente diferente con respecto a las demás dietas, las cuales no difieren entre sí. Este comportamiento de la dieta de patol destoxificado sigue la misma tendencia mostrada en el cálculo de Eficiencia Energética, donde también ésta dieta era la de menor valor en este índice y estadísticamente hablando era diferente a los demás tratamientos. Esto corrobora lo dicho anteriormente de que, a pesar de que el aceite de patol se asimila en mayor medida que el de colorín y no había diferencia con respecto a la dieta control, ésta asimilación del aceite no se refleja a nivel de crecimiento del animal, lo cual nos puede hablar de la posible existencia de algún factor, el cual puede ser la presencia de compuestos diferentes a los alcaloides, que interfiera en los procesos de formación de tejido. Por último, el tratamiento de destoxificación no parece ejercer efecto benéfico a nivel de desarrollo corporal, lo cual puede corroborar lo dicho anteriormente.

Relación de eficiencia protéica (PER)					
	Maíz	Colorín	Patol	Colorín sin	Patol sin
		destoxificado	destoxificado	destoxificar	destoxificar
Rata 1	3.36	3.23	2.94	3.17	3.15
Rata 2	3.28	3.38	2.91	3.42	3.40
Rata 3	3.20	3.41	3.21	3.09	3.34
Rata 4	3.45	3.49	3.10	3.30	3.13
Rata 5	3.52	3.58	2.60	3.37	3.51
Rata 6	3.04	3.41	3.09	3.17	3.32
Media	3.3083	3.4167	2.9750	3.2533	3.3083
Dev. est.	0.1744	0.0477	0.2145	0.1297	0.1463

Tabla 7. Índices biológicos nutricionales - Relación de eficiencia protéica (PER).



Clave: M: Maíz CD: Colorín destoxificado PD: Patol destoxificado CSD: Colorín sin destoxificar PSD: Patol sin destoxificar

Figura 11. Índices biológicos nutricionales - Relación de eficiencia protéica (PER).

5.2.2 Estudio toxicológico subagudo.

Se usaron 12 ratones cepa CFW con un peso promedio de 17.37 ± 0.99 g (rango = 2.80 g) y fueron divididos en 3 lotes de 4 ratones cada uno. Dichos lotes quedaron conformados como se muestra en la Tabla 8.

Rata	Lote 1	Lote 2	Lote 3
1	16.20	16.20	16.40
2	17.20	16.80	16.80
3	17.30	17.50	17.70
4	19.00	18.70	18.70

Tabla 8. Estudio toxicológico subagudo - Distribución de los ratones en base al método de culebra japonesa (peso en gramos)

La dosis de los aceites a administrar se dió en base al peso corporal del animal conforme a las siguientes aproximaciones:

- $1D = 0.01$ ml / g. peso corporal
- **Dosis a administrar = 4D** (0.04 ml / g. peso corporal)

Esta dosis se escogió apoyado en una estimación en la ingesta promedio en el estudio biológico previo, haciendo los siguientes cálculos:

- Ingesta aproximada en 48 horas = 25 g.
- 25 g. alimento = 2.5 g. aceite (10% aceite en la dieta)
- 2.5 g. grasa = 2.8 ml aceite (asumiendo una densidad de 0.9 g/ml)

- 2.8 ml aceite / 129 g. rata más pesada
- 0.0217 ml / g. peso corporal \approx 2D

De esta manera, y debido también a la disponibilidad del material de estudio, se escogió la dosis de 4D y el uso de 2 aceites (Colorín destoxificado, Patol destoxificado) y un aceite de referencia (Maiz), los cuales fueron asignados a los lotes, quedando como a continuación se muestra:

Lote	1	2	3
Aceite	Maiz	Colorin destoxificado	Patol destoxificado

Los datos de incremento en peso se presentan en la Tabla 9. A estos datos se les hizo un Análisis de Varianza de una Vía y no se detectó diferencia significativa entre los 3 distintos lotes. Tampoco se detectó diferencia entre los 3 tratamientos al realizar la prueba múltiple de Duncan al 95%.

Con el objeto de observar si la administración de los aceites por vía oral tuvo alguna influencia en el incremento en peso de los animales pero ahora a lo largo de todo el tiempo de estudio, se elaboró un gráfico de incremento en peso contra tiempo, cuyos datos se presentan en la Tabla 10 y el gráfico resultante de ellos en la Figura 12, donde cada punto es un promedio de 4 valores.

	Incremento en peso (g)		
	Maíz	Colorín	Patol
Rata 1	8.4	13.9	11.4
Rata 2	13.3	9.9	8.6
Rata 3	13.7	15.7	12.9
Rata 4	15.6	16.2	13.1
Media	12.750	13.925	11.500
Dev. est.	3.069	2.859	2.0769

**Tabla 9. Estudio toxicológico subagudo - Incremento en peso
(tomando en cuenta el último día de estudio).**

Analizando la Figura 12 podemos observar que hay una etapa inicial en donde no se observa una ganancia significativa en peso, la cual podemos considerar como la fase de adaptación de los animales al aceite que se les administró. Los animales que más tardaron en adaptarse fueron a los que se les administró el extracto de patol destoxificado. A partir de allí ya se dió el incremento en peso de los animales. En cuanto a éste último, no hay una diferencia significativa entre los tres distintos tratamientos, y haciendo un análisis de regresión lineal, se encontró que las pendientes para los tres tratamientos son semejantes (maíz= 0.3527, colorín= 0.3725 y patol= 0.3373). Con lo anterior podemos decir que la administración de los extractos destoxificados no tuvo influencia en el incremento en peso de los animales en estudio en comparación con el control, ya que cuando hay un problema de toxicidad o antinutricional, se presenta una declinación en el peso corporal de los animales bajo experimentación, tomando en cuenta que la dosis administrada fué relativamente alta.

Con los datos obtenidos del peso de los órganos extraídos de los ratones (a saber hígado, riñones y bazo) se hizo el cálculo de relación porcentual entre el peso del órgano con respecto al peso corporal (RP). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 11 y en la Figura 13.

A los datos de la Tabla 11 se les analizó con un Análisis de Varianza de una Vía y no se detectó diferencia significativa ni para hígado, riñon ni bazo. También se hizo la prueba de rango múltiple de Duncan al 95% y tampoco se detectó diferencia significativa entre los 3 aceites en los 3 órganos ya mencionados. Sin embargo, en la Figura 13 y en el caso del hígado podemos ver que para el extracto de colorín destoxificado el peso del hígado con respecto al peso corporal es ligeramente mayor al del control (maíz) y al del extracto de patol destoxificado. Esto indica que hubo un mayor desarrollo del hígado debido a una posible hiperactividad hepática ocasionada por el aceite administrado. Lo anterior guarda relación con el comportamiento de los animales en el lote donde se administró el extracto de colorín destoxificado durante el estudio. En él, los animales, a partir de la segunda semana de estudio presentaron un comportamiento diferente al otro lote de prueba y al del control, ya que se mostraron altamente nerviosos, hipersensibles, con hiperventilación, taquicardia e incluso con una conducta ligeramente agresiva. Lo anterior nos permite decir que, pese a que el extracto de colorín destoxificado no provocó un decremento en la ganancia de peso en los animales ni produjo alteraciones macroscópicas en los órganos mencionados, sí parece contener otras sustancias ajenas a los alcaloides que provocan un efecto a nivel de sistema nervioso, lo cual puede deberse a la concentración de alcaloides relativamente baja que ya se describió anteriormente, o a que éstos alcaloides tengan un bajo efecto farmacológico..

Incremento en peso (g)						
Días	Maíz		Colorín		Patol	
	Media	Desv. est.	Media	Desv. est.	Media	Desv. est.
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	-0.28	0.98	-0.70	0.36	0.10	0.75
4	0.23	1.14	-0.20	0.22	0.13	1.02
7	0.63	1.70	0.28	0.46	-0.05	1.47
9	2.10	1.51	0.55	0.47	-1.25	1.81
11	2.75	1.99	2.03	0.95	-0.15	2.22
14	3.45	2.24	2.68	0.74	1.03	1.84
16	5.15	2.19	3.83	1.42	2.30	2.11
18	5.55	2.09	4.30	1.54	3.20	2.02
21	7.25	2.17	6.68	1.80	5.48	2.26
23	8.48	2.94	8.07	2.17	6.53	2.46
25	9.28	2.71	9.28	2.58	7.07	2.75
28	10.23	2.65	10.00	2.73	8.38	2.91
30	10.55	2.71	10.35	2.69	9.13	2.89
32	12.5	2.75	10.70	2.75	9.40	2.58
35	11.88	2.87	12.13	2.90	11.43	2.60
37	11.53	3.21	11.23	2.78	9.98	2.23
39	11.33	3.35	11.50	2.86	10.25	2.17
42	12.75	3.07	13.93	2.86	11.50	2.08

**Tabla 10. Estudio toxicológico subagudo - Incremento en peso
(tomando en cuenta los 42 días de estudio).**

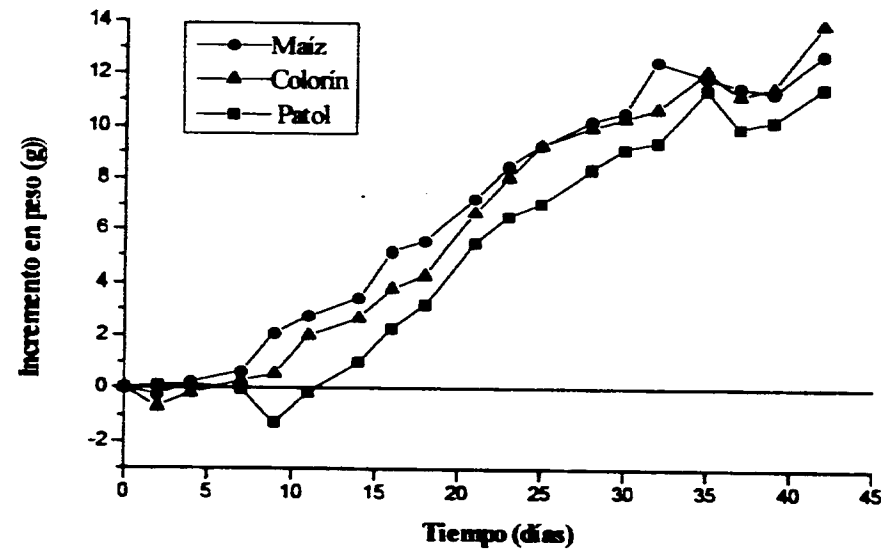


Figura 12. Estudio toxicológico subagudo - Incremento en peso

Relación peso órgano/peso corporal *100									
	Maíz			Colorín			Patol		
	Hígado	Riñones	Bazo	Hígado	Riñones	Bazo	Hígado	Riñones	Bazo
Rata 1	4.9927	1.3832	0.4161	5.5555	1.4230	0.3822	5.2289	1.5948	0.5385
Rata 2	5.5729	1.4678	0.3932	5.0182	1.2569	0.2825	4.5760	1.2252	0.4024
Rata 3	4.1677	1.5645	0.3165	6.9056	1.5232	0.4708	3.7983	1.0205	0.3293
Rata 4	4.5976	1.3171	0.3750	4.9733	1.4252	0.4064	5.1299	1.3767	0.4648
Media	4.8327	1.4332	0.3752	5.6132	1.4071	0.3855	4.6833	1.3043	0.4338
Desv. est	0.5975	0.1071	0.0426	0.9013	0.1105	0.0782	0.6562	0.2425	0.0891

Tabla 11. Estudio toxicológico subagudo - Relación porcentual peso órgano/peso corporal

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

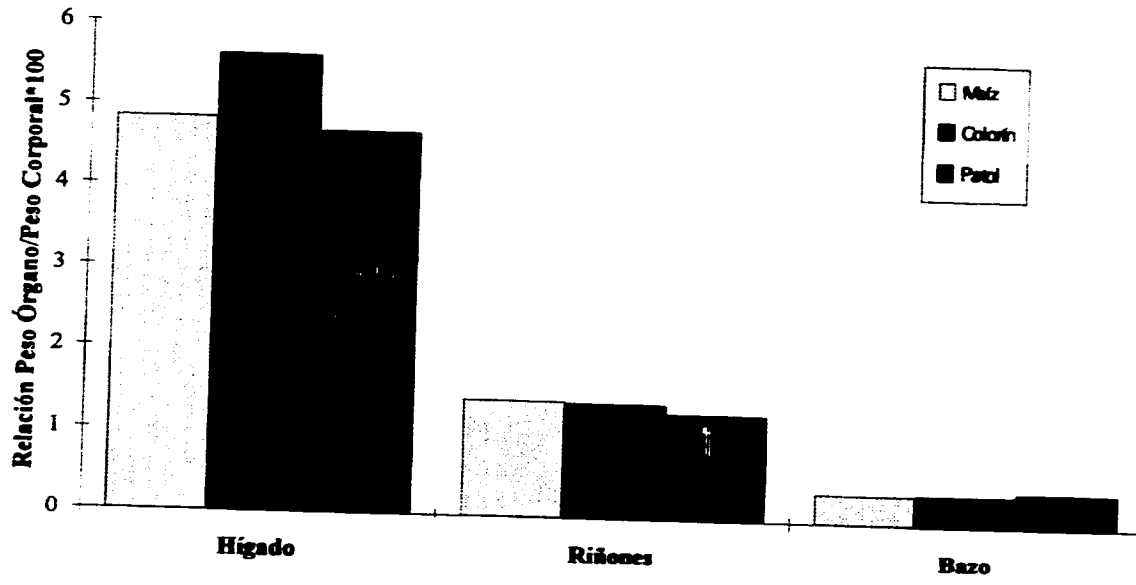


Figura 13. Estudio toxicológico subagudo - Relación porcentual peso órgano/peso corporal

6. CONCLUSIONES.

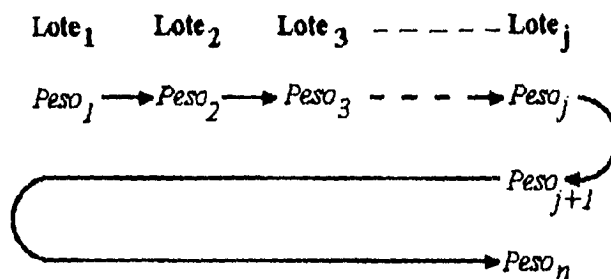
- ◆ Las características químicas de los extractos lipídicos de colorín y de patol son muy semejantes entre sí y guardan también semejanza con las características de otros aceites de leguminosas comestibles.
- ◆ Tanto el extracto de patol como el de colorín son una fuente rica de ácido oléico y contienen además una cantidad significativa de ácido linoléico (considerado como un ácido graso indispensable) comparados con otros aceites vegetales comestibles.
- ◆ El tratamiento de destoxificación de los extractos lipídicos tuvo un efecto benéfico en la absorción de dichos aceites en los animales bajo estudio, siendo el extracto lipídico de patol el que se absorbió en mayor cantidad en comparación con el extracto de colorín. Sin embargo, dicho tratamiento no ejerció efecto alguno en el aprovechamiento de dichos extractos para efectos de crecimiento, donde además de la absorción se contempla la retención, siendo el extracto de patol el menos eficiente a este respecto. Sobre lo anterior valdría la pena realizar la determinación de la Energía Metabolizable para confirmar estos resultados.
- ◆ Por vía oral, el extracto lipídico de patol no ejerció efecto tóxico alguno en los animales bajo estudio, sin embargo el extracto lipídico de colorín ejerció un efecto tóxico a nivel sistema nervioso, el cual se vio reflejado como una conducta agresiva y nerviosa en los animales. Lo anterior es un obstáculo para el uso del aceite de la semilla de colorín como una fuente alternativa de aceite comestible, hasta que no se investigue con más profundidad este punto.

7. APÉNDICE.

Método de "culebra japonesa" para la distribución de animales en estudio.

El método de la "culebra japonesa" se aplica con el objeto de distribuir un conjunto de animales en un determinado número de grupos o lotes de tal forma que se tenga la menor variabilidad posible entre los mismos.

En este método, los animales se pesan al azar. Posteriormente, se ordenan en forma ascendente o descendente (dependiendo de las condiciones del experimento) en base a su peso corporal. Con base en la experiencia, se recomienda pesar un número de animales mayor al que se vaya a emplear en el estudio, de tal forma que los animales con mayor y menor peso (los extremos superior e inferior en una campana gaussiana) queden eliminados al ajustar el número de animales a sus lugares correspondientes en los lotes. Finalmente, los animales se distribuyen en dichos lotes de manera zigzagueante como se muestra a continuación:



donde:

$$Peso_1 < Peso_2 < Peso_3 \dots < Peso_j < Peso_{j+1} \dots < Peso_n$$

El ordenamiento y distribución se puede realizar en forma manual. Sin embargo, también se puede hacer uso del siguiente programa de computación desarrollado en lenguaje

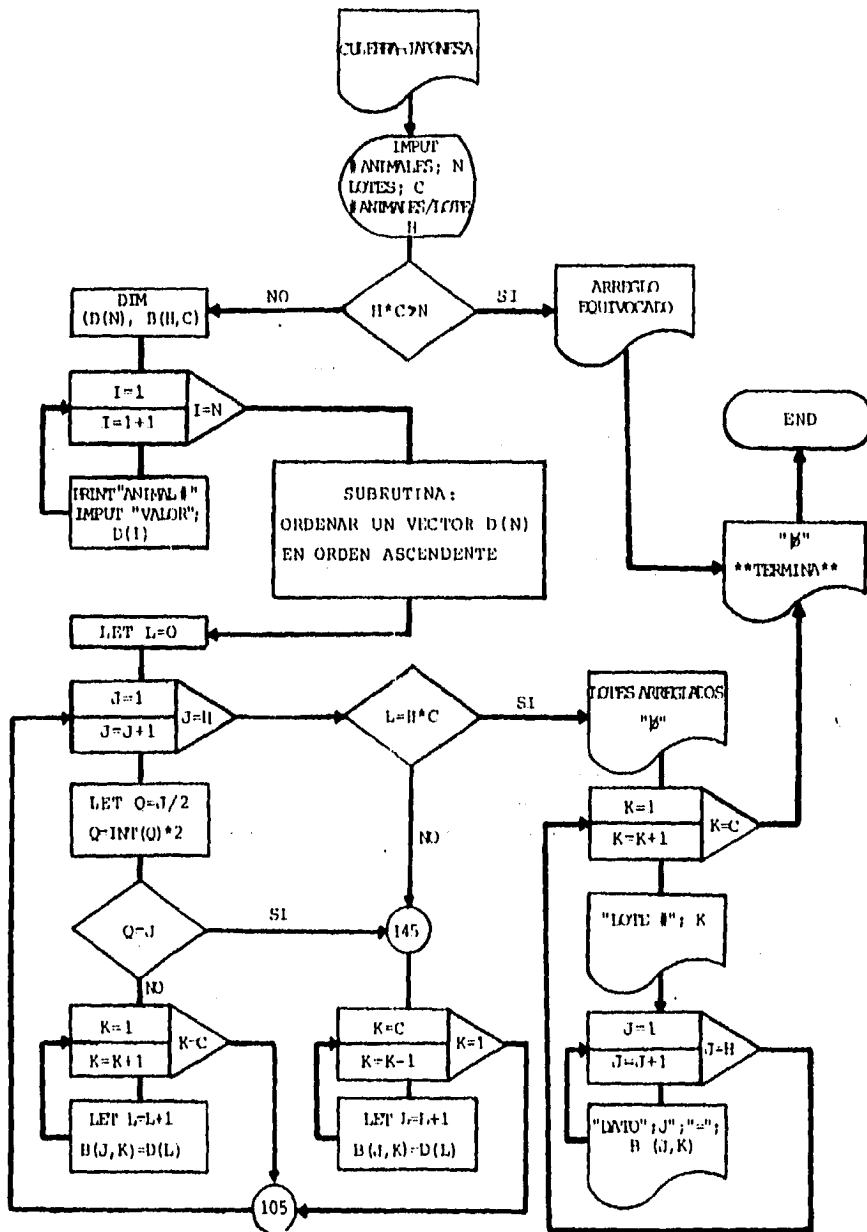
BASIC:

```
005      CLEAR: PRINT "CULEBRA JAPONESA"
007      REM ORDENA DATOS EN UN ARREGLO BIDIMENSIONAL
008      REM DE ACUERDO A LA CULEBRA JAPONESA
010      INPUT "NÚMERO DE ANIMALES"; N
011      INPUT "CUÁNTOS LOTES?"; C
012      INPUT "NÚMERO DE ANIMALES/LOTE?"; H
013      IF H*C > N THEN LPRINT "ARREGLO EQUIVOCADO": GOTO 200
017      DIM D(N), B (H, C)
020      FOR I=1 TO N
025      PRINT "ANIMAL #"; I
030      INPUT "VALOR?"; D(I)
035      NEXT I
040      LET M=0: LET R=0
045      FOR K=1 TO N
050      IF D(K)=M THEN 80
055      LET L=K: LET R=D(L)
060      LET D(L)= D(L-1): LET D(L-1)=R
065      IF L-2=0 THEN 83
070      IF D(L-2)=R THEN 83
075      LET L=L-1: GOTO 60
080      LET M=D(K)
083      NEXT L
100      LET L=0: REM L=CONTADOR
```

```

105     FOR J=1 TO H
110     LET Q=J/2: Q=INT(Q)*2
115     IF Q=J THEN 145
120     FOR K=1 TO C
125     LET L=L+1
130     LET B(J,K)=D(L)
135     NEXT K
140     NEXT J
143     IF L=H*C THEN 170
145     FOR K=C TO 1 STEP-1
150     LET L=L+1
155     LET B(J,K)=D(L)
160     NEXT K
165     NEXT J
170     LPRINT "LOTES ARREGLADOS"
171     LPRINT " "
175     FOR K=1 TO C
177     LPRINT USING "###", "LOTE #", K
180     FOR J=1 TO H
185     LPRINT USING "###", "DATO #", J, "=", USING " ###.##", B(J,K)
190     NEXT J
193     LPRINT " "
195     NEXT K
200     LPRINT " "
205     LPRINT "***** TERMINA *****"
210     END

```



8. BIBLIOGRAFÍA.

- ☐ Aguilar, M. Y.; Giral, F.; Espejo, O.; Alkaloids from the flowers of *Erythrina americana*; *Phytochemistry*, Vol. 20, No. 8, 1981, pp. 2061-2062.
- ☐ Bowers, J.; Food Theory and Applications; Macmillan Publishing Company; 2nd. ed.; 1992, p. 201-238.
- ☐ Buffett, H.G.; Hablemos de Biodiversidad; *Periódico Reforma*, 25 de septiembre de 1994, p. 22A.
- ☐ Christou, P.; Genetic Engineering and In Vitro Culture of Crop Legumes; Technomic, Publishing Company, Inc.; U.S.A.; 1992; pp. 1-8.
- ☐ Church, D.C.; Pond, W.G.; Basic Animal Nutrition and Feeding; O & B Books; Oregon, 1976, pp. 84-88.
- ☐ Dictionary of Natural Products, Vol. 2; Chapman & Hall; Great Britain; 1994; pp. 2247, 2250, 2255.
- ☐ Egan, H.; Kirk, R.S.; Sawyer, R.; Análisis Químico de Alimentos de Pearson; Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V.; México, 1991; p. 519-537.
- ☐ FAO; Las grasas y aceites en la nutrición humana, Colección FAO: Alimentación y Nutrición, No. 20, Roma, 1980, pp. 16-17, 48-58.
- ☐ Guerrero, R. L. M.; Estudio comparativo de la composición química y factores tóxicos de dos variedades de *Erythrina*; Tesis UNAM, Facultad de Química, 1982.

- ☞ Gurr, M. I.; *Role of Fats in Food and Nutrition*; 2nd. edition; Elsevier Applied Science; Belfast, 1992; pp. 77-95.
- ☞ Helrich, K. (ed.); *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, Vol. II; 15th. ed.; AOAC, Inc.; U.S.A., 1990; pp. 951-986.
- ☞ Jenkins, G.L.; DuMez, A.G.; Christian, J.E.; Hager, G.P.; *Química Farmacéutica Cuantitativa*; Editorial Atlante, S.A.; México, 1951; pp. 240-241.
- ☞ Jiménez, L. V.; *Eliminación de los Componentes Tóxicos de Dos Semillas del Género Erythrina y su Evaluación Bromatológica*; Tesis, Facultad de Química, UNAM, 1994.
- ☞ Keyfitz, N. ; *Demographic Discord*; *The Sciences*; Vol 34 (5) 1994, pp. 21-27.
- ☞ Krukoff, B.A.; Barneby, R.C.; *Conspectus of species of the genus Erythrina*; *Lloydia*; Vol. 37, No. 3, 1974, pp. 332-459.
- ☞ Luxon, S.G. (ed.); *Hazards in the Chemical Laboratory*; 5th. ed., Royal Society of Chemistry; Cambridge, U.K.; 1992; p. 77.
- ☞ Martínez, M.; *Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas*; Fondo de Cultura Económica; México, 1987; p. 1,112.
- ☞ Molinar, M.G.; *Valor energético de diversos alimentos determinado por medio de una bomba calorimétrica y métodos biológicos*; Tesis Universidad La Salle; México, 1988; pp. 44-45.
- ☞ NOM-F-30 1976; Norma Oficial Mexicana para "Aceite comestible refinado de maíz".

- ▣ Pritchard, J.L.R. (eds.); *Analysis of Oilseeds, Fats and Fatty Foods*; Rossell, J. B.; Elsevier Applied Science; England, 1991; pp. 443-489.
- ▣ Quilantán, V.L.; *Estrategias para la Producción y la Investigación Agronómica de Oleaginosas en México*; Revista *ANIAME* (Asociación Nacional de Industriales de Aceites y Mantecas Comestibles); Año V, Vol. 2, No. 10, 1991, pp. 10-16.
- ▣ Quilantán, V.L.; *La Evolución Demográfica y de las Oleaginosas en la Alimentación e Industria, Ahora y a Plazo (novedades oleaginosas)*; Revista *ANIAME* (Asociación Nacional de Industriales de Aceites y Mantecas Comestibles); Año VI, Vol. 2, No. 12, 1992; pp. 17-19.
- ▣ Rao, G.N.; *Dietary Considerations in Toxicology Studies* in "Laboratory Animal Science. Laboratory Animal Studies in the Quest of Health and Knowledge.- Proceedings"; Rothchild, H.A.; Rosenkranz, H.; Moura, F.A. (eds.); Brazil, 1986; pp. 39-48.
- ▣ Raven, P.; *Erythrina (Fabaceae): Achievements and opportunities*; *Lloydia*; Vol. 37, No. 3, 1974, pp. 221-230.
- ▣ Reyes, S.A.; *Periódico Reforma*; 30 de agosto de 1994; pp. 15A, 28A.
- ▣ Smartt, J.; *Grain Legumes. Evolution and Genetic Resources*; Cambridge University Press; Cambridge, U.K.; 1990; pp. 1-8.
- ▣ Sotelo, A.; Lucas, B.; Garza, L.; Giral, F.; *Characteristics and Fatty Acid Content of the Fat of Seeds of Nine Wild Mexican Plants*; *J. Agric. Food Chem.*; 1990, 38, 1503-1505.

- ☐ Sotelo, A.; Soto, M.; Lucas, B.; Giral, F.; Comparative Studies of the Alkaloidal Composition of Two Mexican *Erythrina* Species and Nutritive Value of the Detoxified Seeds; *J. Agric. Food Chem.*; 1993, 41, 2340-2343.

- ☐ Stauffer, C.E.; 'Refined Oils' in *Legumes. Chemistry, Technology and Human Nutrition*; Matthews, R.H. (de.); Marcel Dekker Inc.; U.S.A.; 1989; pp. 47.

- ☐ Swern, D. (ed.); *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*; John Wiley & Sons, Inc.; U.S.A., 1979; Vol. I, pp. 16-38, 186-189, 192-196, 217-221, 242-245, 430-476; Vol. II, pp. 175-178, 228-230.

- ☐ Tenorio, J. M. E. ; Evaluación Proteico-Calórica de Dos Semillas de *Erythrina* Destoxificadas; Tesis, Facultad de Química, UNAM; 1993, pp. 1-2.

- ☐ Yang, M.G.; Mickelsen, O.; *Laboratory Animals in Nutritional Research* in 'Methods of Animal Experimentation; Gay, W.I.; Academic Press, Vol. V, New York, 1974; pp. 1-16.