

38  
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

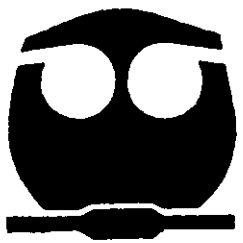


EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

“EVALUACION DE TOXICIDAD AGUDA Y  
SUBAGUDA DE LA FRACCION LIPIDICA DE LA  
ALMENDRA DE CALABAZA”  
(*Cucurbita pepo*).

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA DE ALIMENTOS  
P R E S E N T A  
ROSA MARIA TELLEZ GONZALEZ



MEXICO, D. F.,

1999

TESIS CON  
FALLA EN COPIEN

27 1436



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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. Pedro Valle Vega

Vocal. Prof. Bernardo Lucas Florentino


Secretario. Prof. I. María de Lourdes Flores Téllez

1er. Suplente. Prof. Carlos A. Torres Avila

2o. Suplente. Prof. Leticia Gil Vieyra

Sitio donde se desarrolló el tema: Lab. 111, Departamento de Farmacia, Conjunto "E",  
Facultad de Química, UNAM.

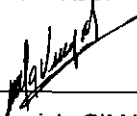
ASESOR TEMA DE TESIS



---

M. en C. Bernardo Lucas Florentino

ASESOR TÉCNICO



---

Q.F.B. Leticia Gil Vieyra

SUSTENTANTE



---

Téllez González Rosa María

## AGRADECIMIENTOS

- ◆ A Dios y María, por darnos lo más valioso y lo principal para lograr nuestros propósitos: la vida.
- ◆ Al M. en C. Bernardo Lucas F., por permitirme colaborar, en la realización de una pequeña parte de este proyecto, por su apoyo, paciencia y conocimientos que también brinda.
- ◆ A la Q.F.B. Leticia Gil Vieyra, por su paciencia y ayuda desinteresadas.
- ◆ A la Dra. Adriana Aurelia Ruíz de Chavez Ochoa (Hospital Gabriel Mancera, IMSS), por su valiosa colaboración en la realización de las biometrías hemáticas, por su disponibilidad e interés al ayudar a la UNAM y en particular a una servidora.
- ◆ Al M. en C. Miguel Hernández Infante (Centro Médico Siglo XXI), por su valiosa ayuda en la realización de los cromatogramas de la fracción lipídica de la almendra de calabaza.
- ◆ A los profesores Isabel, Lucía y Héctor (Bioterio del Conjunto "E", Facultad de Química, UNAM), por el apoyo que desde un principio nos ofrecieron, así como por la paciencia y dedicación al querer que siempre hiciéramos las cosas bien.
- ◆ A la Sra. Vicky, porque gracias a ella contamos siempre con material limpio y ordenado en el lugar de trabajo, además por su paciencia y don de escuchar a la gente.

## DEDICATORIAS

- ◆ A mis padres: José Isidro Téllez Maya y Magdalena González de la O, por toda su paciencia, comprensión, cariño, apoyo y confianza que siempre me han brindado. Por enseñarme todo aquello que se necesita para poder ser lo que hasta hoy soy. Por ser mis padres, los adoro.
- ◆ A mis hermanos: José Isidro y José Manuel. Espero siempre tenerlos a mi lado, los quiero mucho.
- ◆ A mis abuelitos: Carmen Téllez Solis (QEPD), María Maya Chavez (QEPD), Rosa de la O Barranco (QEPD) y Reyes González Díaz.
- ◆ A Ana Mary.
- ◆ A mis tíos: Javier, Víctor, Juan, Ventura, Cirilo, Elena, Gabina, Martín, Apolinar, Simón y Francisco.
- ◆ A la Familia Martínez Martínez (Juan, Raquel, Carmen, Juan Carlos, Eduardo y Daniel).
- ◆ A Virginia García Ortega.
- ◆ A Pilar, Vivian, Raquel, Adriana Rodea, Miriam, Ana, Angélica, Karina, Corina, Elizabeth, Katy, Andrea, Edith, Adriana Rodríguez, Carlos Etien, Roxana, Alex, Sonia, Ana María, Brisa, Jessica, a aquellas amistades que conocí y que dejamos de frecuentarnos: Lourdes y Rosa.

# INDICE

	Pág.
1. Introducción.	1
2. Generalidades.	4
2.1 Perspectivas de las oleaginosas hacia el futuro.	5
2.2 Generalidades de <i>Cucurbita</i> .	7
2.3 Importancia de las grasas.	8
2.4 Clasificación de los ácidos grasos.	9
2.5 Aspectos nutricionales de las grasas.	10
2.6 Ácidos grasos esenciales.	10
2.7 Enfermedades cardiovasculares por grasas.	11
2.8 Procesado de grasas y aceites.	12
2.9 Factores químicos y físicos utilizados en la caracterización de grasas y aceites.	18
2.10 Toxicidad aguda a corto y largo plazo.	22
2.11 Sangre.	26
2.12 Enfermedades más comunes de la sangre.	31
2.13 Biometría hemática.	32
3. Objetivos.	37
4. Desarrollo de actividades.	38
4.1 Materia prima (semilla íntegra).	39
4.2 Descascarado.	39
4.3 Molhenda.	39
4.4 Caracterización bromatológica de la harina de la almendra de calabaza.	40
4.5 Separación de la fracción lipídica.	40
4.6 Obtención del aceite crudo.	40
4.7 Purificación del aceite crudo.	41

4.8	Caracterización fisicoquímica de los aceites crudo y refinado.	42
4.9	Determinación de ácidos grasos.	51
4.10	Realización del estudio de toxicidad aguda.	52
4.11	Realización del estudio de toxicidad subaguda.	55
5.	Resultados y Discusión.	58
5.1	Contenido de almendra en la semilla de calabaza.	58
5.2	Evaluación bromatológica.	59
5.3	Rendimiento obtenido después del proceso de refinamiento.	60
5.4	Evaluación de parámetros fisicoquímicos.	60
5.5	Perfil de ácidos grasos.	65
5.6	Estudio de toxicidad aguda.	68
5.7	Estudio de toxicidad subaguda.	70
6.	Conclusiones.	95
7.	Apéndices.	97
7.1	Enfermedades cardiovasculares por grasas (definiciones).	97
7.2	Numeración de ratones para el estudio de toxicidad aguda.	98
7.3	Método de "culebra japonesa" para la distribución de los animales bajo experimentación.	99
7.4	Definiciones de las características clínicas observadas en el estudio de toxicidad aguda.	100
7.5	Cromatograma del aceite crudo de la almendra de calabaza.	101
7.6	Cromatograma del aceite refinado de la almendra de calabaza.	102
8.	Bibliografía.	103

## INDICE DE TABLAS

	Pág.
No.1 Producción de algunas semillas oleaginosas en México	7
No.2 Escala para clasificación de grasas y aceites según su índice de yodo.	20
No.3 Posibles signos tóxicos durante un estudio de toxicidad aguda.	25
No.4 Parámetros hematológicos identificados en la realización de una biometría hemática.	36
No.5 Denominación toxicológica utilizada para diferentes rangos de toxicidad.	53
No.6 Contenido de almendra en la semilla de calabaza.	58
No.7 Análisis bromatológico de la harina integral de la almendra de calabaza.	59
No.8 Parámetros fisicoquímicos de los aceites crudo y refinado de la almendra de calabaza.	64
No.9 Perfil de ácidos grasos de los aceites crudo y refinado de la almendra de calabaza.	67
No.10 Características clínicas observadas en el estudio de toxicidad aguda.	69
No.11 Alimento ingerido para el lote de aceite de maíz.	71
No.12 Alimento ingerido para el lote de aceite crudo de almendra de calabaza.	72
No.13 Alimento ingerido para el lote de aceite refinado de almendra de calabaza.	72
No.14 Consumo de alimento observado para los tres lotes de los diferentes aceites.	73
No.15 Ingesta de agua para el lote de aceite de maíz.	76
No.16 Ingesta de agua para el lote de aceite crudo de almendra de calabaza.	76
No.17 Ingesta de agua para el lote de aceite refinado de almendra de calabaza.	77
No.18 Ingesta de agua observada para los tres lotes de los diferentes aceites.	78
No.19 Incremento en peso para los tres lotes de los diferentes aceites.	81
No.20 Peso porcentual del hígado al final del estudio.	84
No.21 Fórmula roja de las biometrías hemáticas para el lote de aceite de maíz.	85
No.22 Fórmula blanca de las biometrías hemáticas para el lote de aceite de maíz.	86



No.23	Fórmula roja de las biometrías hemáticas para el lote de aceite crudo de almendra de calabaza.	87
No.24	Fórmula blanca de las biometrías hemáticas para el lote de aceite crudo de almendra de calabaza.	88
No.25	Fórmula roja de las biometrías hemáticas para el lote de aceite refinado de almendra de calabaza.	89
No.26	Fórmula blanca de las biometrías hemáticas para el lote de aceite refinado de almendra de calabaza.	90
No.27	Fórmula trombocítica de las biometrías hemáticas realizadas para los tres diferentes aceites.	91
No.28	Parámetros de las biometrías hemáticas que presentan diferencia significativa con respecto al grupo control.	92

## INDICE DE FIGURAS

	Pág.	
No. 1	Niveles de producción de semillas oleaginosas en México	6
No. 2	Niveles de importación de semillas oleaginosas en México	6
No. 3	Representación esquemática de los componentes de la sangre.	28
No. 4	Diagrama general de trabajo.	38
No. 5	Gráfica de consumo de alimento acumulativo para los tres lotes de los diferentes aceites a una dosis de 15 g/ Kgpc. en el estudio de toxicidad subaguda.	74
No. 6	Gráfica de ingesta de agua acumulativa para los tres lotes de los diferentes aceites en el estudio de toxicidad subaguda.	79
No. 7	Gráfica de incremento en peso para los tres lotes de los diferentes aceites en el estudio de toxicidad subaguda.	82

## 1. INTRODUCCION

En los últimos siglos la selección de plantas designadas a la agricultura se ha acentuado hasta el extremo que en la actualidad el hombre depende de unas cuantas especies vegetales que suministran el 90% de nuestros viveres. La situación anterior nos hace más vulnerables al depender de unas cuantas especies vegetales, a la vez de tener una dieta relativamente restringida.

Un factor intimamente relacionado con los alimentos, lo constituye la tasa de crecimiento poblacional. No obstante que ha habido un notorio aumento en la disponibilidad de los alimentos, tal incremento no ha ido aparejado al crecimiento poblacional. La discrepancia en el suministro de alimentos y crecimiento de la población, se sigue ampliando; por lo cual es urgente realizar acciones tendientes a una solución, una de las cuales consiste en estudiar sistemáticamente aquellos alimentos de restringido consumo, que algunos autores denominan como "No convencionales".

Nuestro país no esta ajeno, ya que hay suficiente información que pone de manifiesto el alto grado de desnutrición en una gran parte de la población, en especial, en las zonas marginadas tanto urbanas como rurales.

La aseveración anterior se basa en la observación a corto plazo, o sea, su toxicidad aguda; pero referente a su toxicidad crónica, definitivamente hay pocos estudios al respecto, incluso tal aspecto no es totalmente apreciado por los consumidores actuales. Hay que hacer notar; que aunque no se presente una reacción violenta o drástica a corto plazo (minutos u horas) después de la ingesta de un determinado alimento, se pueden presentar trastornos subclínicos, por la ingesta prolongada y repetitiva de un alimento que contenga sustancias tóxicas o antinutricionales, a una concentración que no permita una adecuada destoxicación de éstos componentes indeseables y a largo plazo pueden causar una anomalía anatómica y/o fisiológica que en muchos de los casos es

irreversible; por tal motivo, es prioritario definir los aspectos de toxicidad subaguda o crónica, antes de proponer un alimento no convencional para una mayor difusión en su consumo.

En base a lo previamente descrito, para el caso de la almendra de calabaza, y específicamente aquella que se consume en la Huasteca Potosina y que corresponde botánicamente a *Cucurbita pepo*, se ha iniciado su caracterización bromatológica, para conocer el potencial nutricional, del cual destaca su alto contenido de proteína y grasa; además, en la determinación química de tóxicos y factores antinutricionales que con más frecuencia se presentan en los alimentos de origen vegetal, los resultados mostraron que éstos compuestos indeseables se encontraron en bajas concentraciones o incluso ausentes. Al respecto, cabe señalar que solo el contenido de saponinas fue significativo; sin embargo, el efecto dañino de este tipo de compuestos todavía está en discusión.

En varias zonas de la República Mexicana se acostumbra consumir almendra de calabaza (tostada) como botana y es por esa razón que se consume en baja proporción, siendo también discontinuo este consumo. Sin embargo, en zonas como la Huasteca Potosina, esta semilla podría formar parte de la dieta básica, como un complemento de la misma, aumentando así el consumo por dicha almendra, por lo que se vuelve necesaria la evaluación de la toxicidad aguda y subaguda de dicha almendra.

En el presente trabajo, se incluye la determinación de los parámetros fisicoquímicos que nos permiten caracterizar a las grasas y aceites comestibles, así mismo la información bromatológica, con la que ya se contaba, se enriqueció por medio de la determinación del contenido de ácidos grasos presentes en el aceite crudo y refinado de almendra de calabaza. Posteriormente se llevó a cabo el estudio de toxicidad aguda por medio del cual se establecería si el aceite crudo de almendra

de calabaza tenía algún efecto dañino sobre los animales bajo experimentación, a una dosis prácticamente no tóxica.

Con objeto de poder determinar si el material de estudio era inocuo en un tiempo más prolongado se llevó a cabo el estudio de toxicidad subaguda, en el cual se proporcionó a los animales una dosis mayor (el doble) de la que se había establecido para el estudio de toxicidad aguda.

En la evaluación de los parámetros fisicoquímicos se encontró que ambos aceites (crudo y refinado de almendra de calabaza) guardan semejanza con los aceites de otras semillas oleaginosas comestibles. Al realizar los pasos básicos iniciales del proceso de refinamiento sobre el aceite crudo, no se altera significativamente el contenido de ácidos grasos.

Al realizar el estudio toxicológico agudo no se detectó ningún efecto dañino en el comportamiento de los animales bajo estudio; sin embargo, al realizar el estudio de toxicidad subaguda se pudo percatar que, a nivel fisiológico, y sólo para el caso del aceite crudo, se detecta una ligera disminución de los valores de hemoglobina (Hb) y hematocrito (Hto). Lo cual motiva a una investigación más profunda en dicha dirección.

## 2. GENERALIDADES

Muchas semillas de calabaza son utilizadas directamente para consumo humano en países del Medio Oriente. además, también es usada como alimento animal. Sin embargo en países como Nigeria; una *cucurbita* tropical, la calabaza acanalada, es cultivada por la presencia de aceite en su semilla (Al-Khalifa, 1996; Lazos, 1986).

Muchas semillas cucurbitáceas son ricas en aceite y proteína. Aunque este aceite no ha sido utilizado a nivel industrial, si ha sido usado como aceite de cocina en algunos países de Africa y del Medio Oriente (Al-Khalifa, 1996; Lazos, 1986; Kamel *et al.*, 1982).

La semilla de calabaza contiene aproximadamente 41% de grasa cruda y 31% de proteína cruda (Yoon. *et al.*, 1983; Lazos, 1986). El alto potencial nutritivo de vegetales foliáceos tal como lo son las cucurbitáceas justifica su amplio consumo (Lazos, 1986).

Algunos autores mencionan que el aceite de *Cucurbita pepo* es más rico en ácido linoleico que en ácido oleico (Khan, *et al.*, 1985; Lazos, 1986; Kamel, *et al.*, 1982). Mientras que otros indican que el ácido graso predominante sigue siendo el ácido linoleico, al que le sigue el ácido palmítico y posteriormente el ácido oleico (Yoon, *et al.*, 1983).

El aceite de la semilla de calabaza contiene bajas concentraciones de ácidos grasos saturados totales, lo cual puede ser una ventaja desde el punto de vista de poderlo adicionar a la dieta como una fuente baja en grasa saturada lo cual puede beneficiar a pacientes con problemas cardiovasculares (Al-Khalifa, 1996). Y al comparar dicho aceite con otras especies del genero *Cucurbita* y *Citrullus* presenta gran diferencia en su proporción de ácidos grasos saturados (%AGS), ácidos grasos monoinsaturados (%AGMI) y ácidos grasos poliinsaturados (%AGPI), debido a factores diversos, entre los que se incluyen:

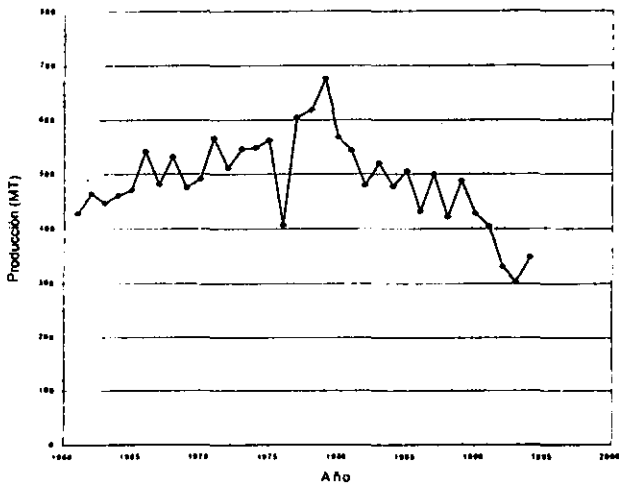
tiempo de cosecha, variedad, fuente, condiciones de secado, variación estacional, condiciones de suelo, condiciones de almacenamiento y nivel de madurez (Yoon, *et al.*, 1983).

## 2.1 PERSPECTIVAS DE LAS OLEAGINOSAS HACIA EL FUTURO.

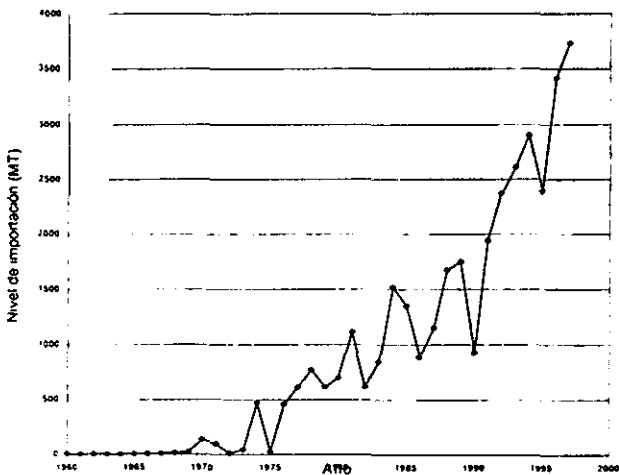
En los últimos años el consumo de aceites ha mostrado un ritmo de crecimiento superior al de la población. El continuo crecimiento de las importaciones de productos oleaginosos ha dado como resultado una fuerte dependencia frente al mercado internacional para el abastecimiento de aceites (INIFAP, 1998).

El gran reto que enfrenta la actividad agrícola mundial, es satisfacer, la creciente demanda de granos y oleaginosas, lo que provocará, de acuerdo con los especialistas, un escenario de mayores precios promedio a los que se registran actualmente. En los próximos años, uno de los más importantes objetivos de la agricultura mundial y de las políticas agrícolas será desarrollar nuevas medidas de protección de tierras cultivables y programas de rotación de cultivos, con el propósito de aumentar el número de hectáreas cultivables (Perspectivas, 1998).

En las figuras que se muestran a continuación se aprecia que la producción nacional de semillas oleaginosas ha determinado que los requerimientos de consumo se satisfagan de manera creciente con importaciones:



**FIGURA No. 1 NIVELES DE PRODUCCION DE SEMILLAS OLEAGINOSAS EN MEXICO (FAO, 1994)**



**FIGURA No. 2 NIVELES DE IMPORTACION DE SEMILLAS OLEAGINOSAS EN MEXICO (SAGAR, 1997)\***

\* En el análisis se contemplan las siguientes semillas: algodón, cacahuete, cártamo, girasol, ajonjolí y soya

En la tabla que se presenta a continuación podemos comparar la producción de algunas semillas oleaginosas con respecto a la producción de semilla de calabaza.

**TABLA No. 1**

**PRODUCCION DE ALGUNAS SEMILLAS OLEAGINOSAS (SAGAR, 1997).**

TIPO DE SEMILLA	PRODUCCION TOTAL (MT)
Algodón	632.1
Cártamo	163.3
Cacahuete	137.2
Girasol	2.4
Calabaza	0.5

## 2.2 GENERALIDADES DE *Cucurbita*.

Son plantas herbáceas, de tallos largos que se arrastran por el suelo, o se enganchan a toda clase de soportes mediante zarcillos (Messiaen, 1979). Se caracterizan por ser de una consistencia camosa, suculenta y tener una corteza resistente que puede variar desde semiblanda a muy dura, de tallos flexibles cubiertos de pelos e incluso espinas; hojas alternas (Matons, 1947).

Las cucurbitáceas se cultivan generalmente, por la carne de sus frutos, consumida cruda o cocida, y más raramente por las semillas oleaginosas o por follaje cocido, a modo de espinacas (Messiaen, 1979).



Existen más de 750 variedades de calabaza cultivadas como comestibles. Se encuentran distribuidas por todo el mundo, cuyo origen geográfico cabe situarlo en México, América Central y América del Sur. En algunos pueblos como ocurre en Asia, constituyen parte importante del régimen alimenticio popular (De Soroa, 1968; Maroto, 1989).

*Cucurbita pepo*. Es la especie cuya variabilidad es mayor, tanto por el aparato vegetativo como por la forma de sus frutos. Pueden ser de color blanco, verde claro, diversamente coloreadas de verde claro y verde oscuro, o verde oscuro únicamente (en estado inmaduro). Las plantas pueden ser de tallos delgados, o enanas, con tallos muy gruesos de unos 20 cm de largo (Messiaen, 1979).

### 2.3 IMPORTANCIA DE LAS GRASAS.

Entre las funciones de las grasas y de los aceites (Madrid, *et al.*, 1997) están:

- Función energética, ya que al ser oxidadas producen 9 Kcal/g, cantidad superior a la de los hidratos de carbono y proteínas (4 Kcal/g).
- Son vehículo para las importantes vitaminas liposolubles, tales como la A, D, K y E.
- Aportan la vitamina F, cuya carencia puede producir trastornos diversos.
- Favorecen la absorción del calcio.
- Influyen en gran medida sobre la sensación de saciedad tras la comida y hacen a los alimentos más apetitosos, por la textura que brindan a los mismos (Ziller, 1996).

Los triglicéridos representan normalmente más del 95% en peso de la mayoría de las grasas y aceites alimentarios. Entre los constituyentes minoritarios se encuentran monoglicéridos y diglicéridos, ácidos grasos libres, fosfátidos, esteroides, alcoholes grasos, vitaminas liposolubles y otras sustancias (Ziller, 1996).

## 2.4 CLASIFICACION DE LOS ACIDOS GRASOS.

Las propiedades físicas y químicas de las grasas dependen en gran medida de los tipos y proporciones de los ácidos grasos que lo constituyen en el esqueleto de glicerol. La variabilidad de éstos parámetros es el resultado de las exigencias del animal o planta que los produce.

Clasificación: Los ácidos grasos presentes en los aceites y grasas comestibles se clasifican por su grado de saturación (Ziller, 1996) en:

- Ácidos grasos saturados. Contienen solamente enlaces carbono-carbono simples, que se denominan "saturados"; y son los menos reactivos químicamente.
- Ácidos grasos insaturados. Si un ácido graso contiene uno o más enlaces dobles carbono-carbono se le denomina "insaturado". Cuando un ácido graso presenta un único doble enlace se le denomina "monoinsaturado". Si contiene más de uno se le llama "poliinsaturado".
- Ácidos grasos poliinsaturados. De todos ellos los más interesantes son los ácidos linoleico, linolénico, araquidónico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico, que contienen respectivamente 2, 3, 4, 5 y 6 dobles enlaces. Los aceites de origen vegetal son las principales fuentes de ácidos linoleico y linolénico. Los aceites procedentes del pescado contienen grandes cantidades de una gran variedad de ácidos grasos de cadena larga con tres o más enlaces dobles, entre los que se incluyen los ácidos eicosapentaenoico y docosahexaenoico (Ziller, 1996).

## 2.5 ASPECTOS NUTRICIONALES DE LAS GRASAS.

En distintos aspectos de la nutrición humana y zootécnica, tanto en el de contribuir a la salud, como en el de conversión del alimento en trabajo físico y también como meta industrial, interesa conocer las propiedades de las grasas, su grado de disponibilidad y exigencias, así como su composición. Hay conocidos aproximadamente 40 ácidos grasos, de los cuales cada aceite de semillas, o de frutos contiene de 3 a 4 en cantidades apreciables y generalmente, otros tantos como máximo, en dosis muy pequeñas. Las propiedades específicas de cada uno influyen, por tanto, en las del respectivo aceite (De Soroa, 1968).

Las grasas son un componente principal y esencial de la dieta humana junto con los carbohidratos y proteínas.

Algunos alimentos ricos en grasa son fuente de vitaminas liposolubles, y la ingestión de grasa mejora la absorción de estas vitaminas independientemente de su origen. Las grasas son indispensables para lograr una dieta apetitosa y proporcionada y aportan ácidos grasos esenciales como el linoleico y linolénico (Ziller, 1996).

## 2.6 ACIDOS GRASOS ESENCIALES (Mora, 1997).

El ácido linoleico y el ácido linolenico son los ácidos grasos esenciales, ya que el organismo no los puede sintetizar y deben, por consiguiente, ser obtenidos de la dieta. La absorción de ellos es llevada a cabo a lo largo de todo el intestino delgado, con un 90% de eficiencia y son almacenados en los tejidos adiposos para posteriormente, ser oxidados para la producción de energía.

Entre sus funciones están:

- Precursores de eicosanoides: prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos.
- Actividad enzimática o como cofactor.

Las principales alteraciones fisiológicas conocidas son:

- Los requerimientos son incrementados por recambio celular aumentado (quemaduras, embarazo, inflamación, etc.).
- Niveles bajos absolutos de ácidos grasos esenciales producen deficiencia absoluta de los mismos que se ve en enfermedad gastrointestinal con mala absorción de grasa.

## 2.7 ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES POR GRASAS.

El factor de riesgo número uno es el cigarro, con un 22% de atribución. La presión alta representa un 20% y el nivel de colesterol plásmatico otro 18%. La obesidad después de tener efectos en la presión sanguínea, representa otro 5%. El 35% restante esta relacionado al sexo, edad y cuestiones hereditarias (McNamara, 1998).

La causa de los ataques cardiacos es la arterioesclerosis la cual construye depósitos grasos dentro de las paredes de las arterias. El engrosamiento de las arterias restringe eventualmente el flujo sanguíneo al corazón y puede causar un ataque cardiaco. Cuando la sangre que fluye es restringida hacia el cerebro, el resultado es un ataque de parálisis cerebral (ver apéndice 7.1).

Un ataque cardiaco provocado por un coágulo sanguíneo en la arteria coronaria indica comúnmente colesterol acumulado en la pared del vaso sanguíneo (Chapman, 1993).

El colesterol es una sustancia precursora de la producción de los ácidos biliares en el organismo humano; éstos compuestos son necesarios para una adecuada absorción de las grasas durante el proceso de digestión de los alimentos. Ayuda en la producción de ciertas hormonas que intervienen en la regulación del almacenamiento de sodio y potasio en el cuerpo humano y es indispensable para la producción de hormonas sexuales.

Desafortunadamente, en algunas personas los depósitos anormales de colesterol en los tejidos y en el torrente sanguíneo están relacionados con varios problemas de salud como la aterosclerosis, arterioesclerosis, la hipertensión arterial, la diabetes *mellitus* y la formación de cálculos biliares. El grado en que el colesterol es un factor de riesgo para la enfermedad coronaria depende por completo de la forma como es transportado por la sangre (Braverman, 1994).

Es un hecho que un consumo elevado de grasa saturada resulta en un aumento en los niveles de colesterol plasmático mientras que la sustitución de grasas saturadas por grasas polinsaturadas resulta en una disminución de estos niveles (Ordovas, 1996).

## 2.8 PROCESADO DE LAS GRASAS Y ACEITES.

Las grasas y los aceites alimentarios proceden de plantas oleaginosas y fuentes animales. Las grasas de origen animal se obtienen normalmente por fusión o calentamiento de tejidos animales que permiten separarlos de las proteínas y de otros materiales naturalmente presentes. Las grasas vegetales se obtienen extrayendo el aceite con solvente o exprimiendo la semilla oleaginosa mediante presión. El método de prensado ha sido sustituido por el de extracción con solvente, sola o combinada, con un prensado previo (lo

cual mejora el rendimiento), el aceite se extrae con hexano, que después se separa del aceite y se reutiliza.

Los aceites y grasas obtenidos directamente tras la fundición o la extracción se denominan aceites y grasas "crudos". Contienen aun pequeñas cantidades de compuestos naturales que no son glicéridos que serán eliminados a lo largo de una serie de pasos del procesado. No todos los compuestos no glicéridos son materiales indeseables. Los tocoferoles, por ejemplo, desempeñan funciones importantes como: proteger al aceite de la oxidación y aportar vitamina E (Ziller, 1996).

### 2.8.1 DESGOMADO.

Los aceites crudos que poseen niveles relativamente altos de fosfátidos, pueden ser desgomados antes del refinado para eliminar la mayoría de estos compuestos. El proceso generalmente conlleva el tratamiento del aceite crudo con una cantidad limitada de agua para hidratar los fosfátidos y conseguir separarlos por centrifugación. El desgomado sirve además para obtener emulgentes naturales tan valiosos como la lecitina (Ziller, 1996).

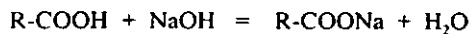
Se ha observado que los fosfátidos se encuentran en los aceites en disolución coloidal solamente cuando los aceites están en estado anhidro. Si al aceite se le añade agua, aunque sea en pequeña cantidad, dichas sustancias se esponjan y precipitan. El proceso de precipitación se favorece con el aumento de la temperatura (Bernardini, 1981)

### 2.8.2 NEUTRALIZACION.

Generalmente el proceso de refinado se realiza sobre aceites vegetales para reducir el contenido en ácidos grasos libres y para eliminar otras impurezas como fosfátidos, proteínas y sustancias mucilaginosas. El método de refinado más importante y más ampliamente extendido es el tratamiento de la grasa o el aceite con una solución alcalina.

Se produce así una importante reducción de los ácidos grasos libres a través de su conversión en jabones solubles en agua. Los fosfátidos, las sustancias proteínicas y mucilaginosas son solubles en el aceite sólo en forma de anhídridos y por medio de su hidratación con el cáustico u otra solución de refinado se separan fácilmente (Ziller, 1996).

La neutralización de las grasas y aceites se efectúa generalmente saponificando los ácidos grasos libres con una solución de hidróxido de sodio ó más raramente con otras soluciones (por ejemplo hidróxido de potasio) y separando por medios físicos (decantación o centrifugación) los jabones insolubles precipitados en los aceites. Reacción química de saponificación (Bernardini, 1981):



### 2.8.3 LAVADO DE LOS ACEITES.

Es necesario que el aceite neutro producido, bien sea por decantación o por centrifugación, se lave convenientemente para eliminar las trazas de jabón que siempre existen en estos aceites (Bernardini, 1981).

### 2.8.4 BLANQUEADO O DECOLORACION.

El término blanqueado se refiere al proceso de eliminación de sustancias coloreadas para purificar aún más la grasa o aceite. Normalmente el blanqueado se realiza después del refinado.

El blanqueo de los aceites se logra mediante un proceso de adsorción. Los materiales polares, que están disueltos o suspendidos en el aceite en concentraciones relativamente bajas, se adsorben en las superficies de las partículas sólidas de un material adsorbente. La adsorción de compuestos esta regida en una forma importante por el número

de centros de adsorción disponibles y, así mismo, por la concentración del material polar en el aceite (Mag, 1992).

Básicamente las funciones del blanqueo son eliminar o reducir los niveles de los siguientes contaminantes en el aceite neutralizado: pigmentos, productos de oxidación (fosfátidos), jabones y trazas de metales.

En aceites comestibles, como por ejemplo el de soya ha permitido una mejora en el sabor (Samperio, 1996).

El material más ampliamente utilizado es tierra o arcilla de blanqueado activada con ácido, a veces llamada bentonita. También se ha empleado, aunque en grado limitado, la sílica gel y el carbón activo (Ziller, 1996).

#### 2.8.5 DESODORIZACION.

La desodorización es un proceso de destilación con vapor y a vacío con el objeto de eliminar componentes traza que proporcionarían olores o sabores no deseados a los aceites y grasas. Normalmente se realiza después del refinado y el blanqueo.

La desodorización de las grasas y aceites es simplemente una eliminación de componentes relativamente volátiles empleando vapor de agua. Esto es posible gracias a grandes diferencias de volatilidad entre las sustancias que dan olores o sabores a las grasas y aceites, y los triglicéridos. La desodorización se realiza en vacío para facilitar la eliminación de sustancias volátiles, evitando la hidrólisis no deseada de la grasa, y para hacer un uso más eficiente del vapor.

La desodorización no tiene efectos significativos sobre la composición en ácidos grasos de la mayoría de los aceites y grasas (Ziller, 1996).



### 2.8.6 FRACCIONAMIENTO.

Es la eliminación de sólidos a temperaturas seleccionadas. La modalidad de fraccionamiento más utilizada es la cristalización, en la que una mezcla de triglicéridos se separa de dos o más fracciones de diferentes puntos de fusión basándose en la solubilidad a temperaturas dadas. Se emplea frecuentemente el término "fraccionamiento en seco" para describir procesos de fraccionamiento como la winterización o el prensado (Ziller, 1996).

Si un aceite se enfría a una temperatura determinada, los triglicéridos de punto de fusión elevado (estearina) se cristalizan, mientras que los que tienen una temperatura de fusión baja continúan líquidos. Entonces la estearina puede separarse del aceite (oleína) dividiéndose la grasa/aceite en dos fracciones (Madrid, *et al.*, 1997).

La winterización o invernalización es un método en el que una pequeña cantidad de material cristaliza y se separa del aceite por filtración para evitar la formación de turbiedad en el aceite líquido a temperatura de refrigeración (Ziller, 1996).

### 2.8.7 HIDROGENACION.

La hidrogenación es un proceso por el que se añade hidrógeno directamente a los puntos de insaturación de los ácidos grasos. La hidrogenación de las grasas ha surgido por la necesidad de:

- Convertir aceites líquidos en aceites de consistencia semisólida, que son de mayor utilidad en ciertos usos alimentarios e
- Incrementar la estabilidad térmica de una grasa o aceite.

La hidrogenación es un proceso de vital importancia en lo que se refiere a nuestro abastecimiento de grasa como alimento, ya que imparte la estabilidad deseada y otras propiedades a muchos productos grasos comestibles. El nivel de ácidos grasos insaturados

presentes en algunos aceites se reduce con el fin de alcanzar ciertas propiedades funcionales en muchas aplicaciones alimentarias. La hidrogenación es el único método práctico de impartirles esas propiedades (Ziller, 1996).

El gas hidrógeno se añade a los dobles enlaces de los ácidos grasos de las moléculas del triglicérido, en presencia de un catalizador adecuado (normalmente níquel). Esto da como resultado un aumento en la estabilidad térmica y oxidativa de la grasa o aceite.

Durante el proceso de hidrogenación hay migración de dobles enlaces, y los enlaces "CIS" pueden ser isomerizados en parte a la forma "TRANS". Como resultado de la hidrogenación hay cambios químicos y físicos, el principal es el aumento del punto de fusión de la grasa, aumento del color blanco, consistencia y dureza. Por esta razón el proceso también se conoce como "endurecimiento" (Saint Martin, *et al.*, 1998).

#### 2.8.8 INTERESTERIFICACION.

Es un proceso que permite un reordenamiento o redistribución de los ácidos grasos en el esqueleto de glicerol de la molécula.

Este fenómeno denominado interesterificación, se lleva a cabo por reacciones catalizadas a baja temperatura. Bajo ciertas condiciones los ácidos grasos se distribuyen de una manera más aleatoria que la que presentaban inicialmente. La interesterificación no modifica el grado o el estado isomérico de los ácidos grasos, si no que se transfieren íntegros de una posición a otra (Ziller, 1996).

## 2.9 FACTORES QUIMICOS Y FISICOS USADOS EN LA CARACTERIZACION DE GRASAS Y ACEITES.

### 2.9.1 DENSIDAD.

En términos absolutos, densidad es definida como el peso de una sustancia por unidad de volumen; en los líquidos es expresada como  $\text{g/cm}^3$ . 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).

### 2.9.2 INDICE DE REFRACCION.

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 de éstos.
- El índice de refracción de los acilgliceroles simples es más alto que el del ácido graso correspondiente.

- El índice de refracción de los monoacilglicérols es considerablemente más alto que el de los correspondientes triglicéridos simples (Swern, 1979; Jenkins, 1951).

### 2.9.3 PUNTO DE FUSION.

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).

### 2.9.4 INDICE 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 solo cuando los dobles enlaces no se hallan conjugados y la estructura del ácido graso no impida la entrada del halógeno.

De acuerdo a su índice de yodo, las grasas y los aceites también pueden ser clasificados como se indica en la tabla No. 2.

**TABLA No. 2**

ESCALA PARA CLASIFICACION DE GRASAS Y ACEITES SEGÚN SU INDICE DE YODO.

GRUPO*	INDICES DE YODO**
Ceras	Muy bajos
Grasas animales	30 - 70
Aceites no secantes	80 - 110
Aceites semisecantes	80 - 140
Aceites secantes	125 - 200

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

\*\* Pritchard.1991.

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

### 2.9.5 INDICE DE SAPONIFICACION.

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 (KOH) 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 acilglicérols presentes. Sin embargo, el índice de saponificación no es útil para la identificación como el índice de yodo debido a que muchos aceites tienen índices de saponificación semejantes. Y sí 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 porción 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).

#### 2.9.6 INDICE DE ACIDEZ.

El índice de acidez se define como el número de miligramos de hidróxido de potasio (KOH) requeridos para neutralizar los ácidos grasos simples 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 equivalentes al del ácido oleico.

El índice de acidez es usado comúnmente como un indicador del grado al cual se han descompuesto los acilglicérols 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).

## 2.10 TOXICIDAD AGUDA A CORTO Y LARGO PLAZO.

De acuerdo a la Ley General de Salud vigente, se denomina tóxico al agente químico que, integrado en el organismo altera procesos bioquímicos fundamentales para la vida (Ley general de salud, 1994).

La palabra tóxico debe ser considerada como sinónimo de nocivo o perjudicial con respecto a los efectos de las sustancias químicas. Una sustancia química puede ser nociva para sistemas esenciales presentes en varias especies de organismos, pero capaz de ejercer su efecto perjudicial sólo en unas pocas de éstas especies debido a mecanismos protectores presentes en las especies resistentes. La toxicidad es una propiedad relativa de una sustancia química y puede ser directa o indirectamente deseable o indeseable hasta donde afecte al hombre, por siempre se refiere a un efecto nocivo sobre algún mecanismo biológico. Esto indica que, lo que puede ser considerado nocivo para un espécimen biológico puede ser relativamente inocuo para otro (Loomis, 1986).

Los efectos de las sustancias tóxicas están relacionados con la duración o tiempo de exposición. A fin de estudiar los diferentes efectos asociados con diversos tiempos de exposición, los estudios toxicológicos se dividen por lo general en tres categorías (Lu, 1992) y son:

- Estudios de toxicidad aguda, los cuales implican una sola administración de la sustancia química bajo el control de una prueba por varias administraciones por un periodo de 24 horas.
- Estudios de toxicidad a corto plazo (también conocidos como subagudos o subcrónicos). En los cuales intervienen administraciones repetidas, sobre una base

diaria o de 5 veces por semana en un periodo de alrededor del 10% de la duración de vida, es decir, de 14 a 28 días en ratones.

- Estudios de Toxicidad a largo plazo, (también conocidos como crónicos) que implica administraciones repetidas en un periodo de toda la vida de los animales de prueba o cuando menos una fracción importante de ella como por ejemplo 18 meses en ratones.

### 2.10.1 ESTUDIOS DE TOXICIDAD AGUDA.

Para llevar a cabo la realización de un estudio de toxicidad aguda existen varios parámetros que deben ser definidos:

- Selección de la especie animal. En general, la rata y el ratón son los que se seleccionan para determinar la dosis letal al 50% ó " $DL_{50}$ ". Su preferencia emana del hecho de que son económicos, se consiguen con facilidad y son fáciles de manejar. Además existen más datos toxicológicos acerca de esta especie de animales, hecho que facilita comparaciones de las toxicidades de otras sustancias químicas.
- Vía de administración. Por lo general los tóxicos deben de administrarse por la misma vía por la cual los seres humanos quedarían expuestos, la ruta oral es la que se utiliza más comúnmente. Cuando se ha de administrar una sustancia química debe darse por alimentación forzada, usualmente se requiere un medio portador para disolver o suspender el tóxico a fin de facilitar su administración. Aún cuando el tóxico sea líquido puede necesitar un diluyente. El medio *per se* debe tener poco o ningún efecto de toxicidad, y no debe reaccionar con el tóxico. Portadores comunes como el agua, solución salina, gomas vegetales y derivados de celulosa.



- Factores ambientales. El enjaulamiento puede afectar la  $DL_{50}$  de una sustancia química en varias formas. El tipo de jaula y el tipo de materiales de la cama pueden afectar la reacción de los animales a la sustancia tóxica.

Después de administrar la sustancia tóxica a los animales, éstos deben ser examinados no solo para conocer el número y tiempo de muertes, sino también para conocer los efectos autónomos, centrales y de conducta, incluyendo su comienzo, intensidad y duración. También debe observarse la frecuencia de estos efectos no mortales en relación en cada grupo de dosificación (Lu, 1992).

En la tabla que se presenta a continuación se muestran, de manera más amplia, los posibles signos tóxicos que pueden ser vistos durante un estudio de toxicidad aguda.

**TABLA No. 3**

**POSIBLES SIGNOS TOXICOS DURANTE UN ESTUDIO DE TOXICIDAD AGUDA**

(Lu, 1992).

SISTEMAS	SIGNOS TOXICOS
Conductual	Sedación, inquietud, posición de sentado con la cabeza hacia arriba, fijación de la vista hacia el frente, dejar caer la cabeza, jadeo, irritabilidad, hostilidad agresiva y defensiva, temor, confusión.
Sensorial	Sensibilidad al sonido y al tacto.
Neuromuscular	Aumento y disminución de la actividad, temblores, convulsiones, postración, cola "Straub", dolor, muerte.
Ocular	Reflejo pupilar a la luz, lagrimeo.
Gastrointestinal	Diarrea, defecación, orina con sangre.
Cutáneo	Piloerección, estremecimientos.

**2.10.2 ESTUDIOS DE TOXICIDAD SUBAGUDA.**

Los seres humanos están expuestos con mayor frecuencia a productos químicos en niveles subletales, pero por tiempos más largos. Para evaluar la naturaleza de los efectos tóxicos en estas situaciones se realizan estudios a corto y largo plazo (Lu, 1992).

El objetivo de los ensayos de toxicidad subaguda es evaluar de forma general y caracterizar todos los efectos de los compuestos cuando son administrados reiteradamente a los animales de experimentación, de ordinario, en dosis diarias.

La vía de administración de un compuesto a ensayar se limita a la oral cuando se da diariamente durante varias semanas (Loomis, 1986).

Siempre que sea posible, todos los animales que se encuentran muertos o moribundos deben someterse a un examen patológico general. Si el estado de los tejidos lo permite, también deben realizarse exámenes histológicos. Además deben determinarse los pesos de varios órganos, en valores absolutos o en términos de los pesos relativos al peso corporal, puesto que sirven como indicadores útiles de toxicidad (Lu, 1992).

## 2.11 SANGRE.

La sangre es el líquido orgánico que bajo el impulso de la actividad cardíaca circula en un sistema de vasos cerrado, con objeto de mantener las funciones vitales en los diferentes tejidos y órganos. Desempeña funciones respiratorias, nutritivas, depurativas y de defensa.

La sangre es conducida a través de una densa red de arterias y venas a todas las partes del cuerpo, con excepción de los cabellos, uñas, cartilagos y córneas. Por medio de las arterias lleva el oxígeno de los pulmones a los tejidos (sangre arterial) y mediante las venas transporta el anhídrido carbónico de los tejidos a los pulmones, donde es expulsado (sangre venosa). La sangre transporta también las sustancias nutritivas del intestino al hígado y a los tejidos, y conduce la urea, sustancia química procedente del metabolismo de

las proteínas, y otros productos de desecho del hígado a los riñones, en donde son filtrados y eliminados por la orina a través de las vías urinarias (Lock, *et al.* 1991).

La sangre cumple, además, otras muchas funciones (Lock, *et al.* 1991):

- Transporta las hormonas desde las glándulas que las segregan a los órganos que las utilizan.
- Distribuye el calor al cuerpo de manera uniforme.
- Posee además, la capacidad de coagularse espontáneamente fuera de los vasos, en caso de herida, limita la hemorragia e inicia el proceso de cicatrización.
- Desempeña una importante función protectora contra las bacterias o cualquier otro agente que pueda ser causa de enfermedades.

La sangre posee cinco componentes principales: agua, glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas y proteínas plasmáticas (Lock, *et al.* 1991):

La parte líquida o plasma representa alrededor del 55% de la sangre y los glóbulos, plaquetas y proteínas plasmáticas, el resto. El volumen de sangre que posee cada individuo depende de factores tales como: especie, edad, sexo, raza, dieta alimenticia, estatura, peso, altura de la ciudad en la que se vive, etc. (Lock, *et al.* 1981).

En la siguiente figura se muestra la representación esquemática de los componentes de la sangre.

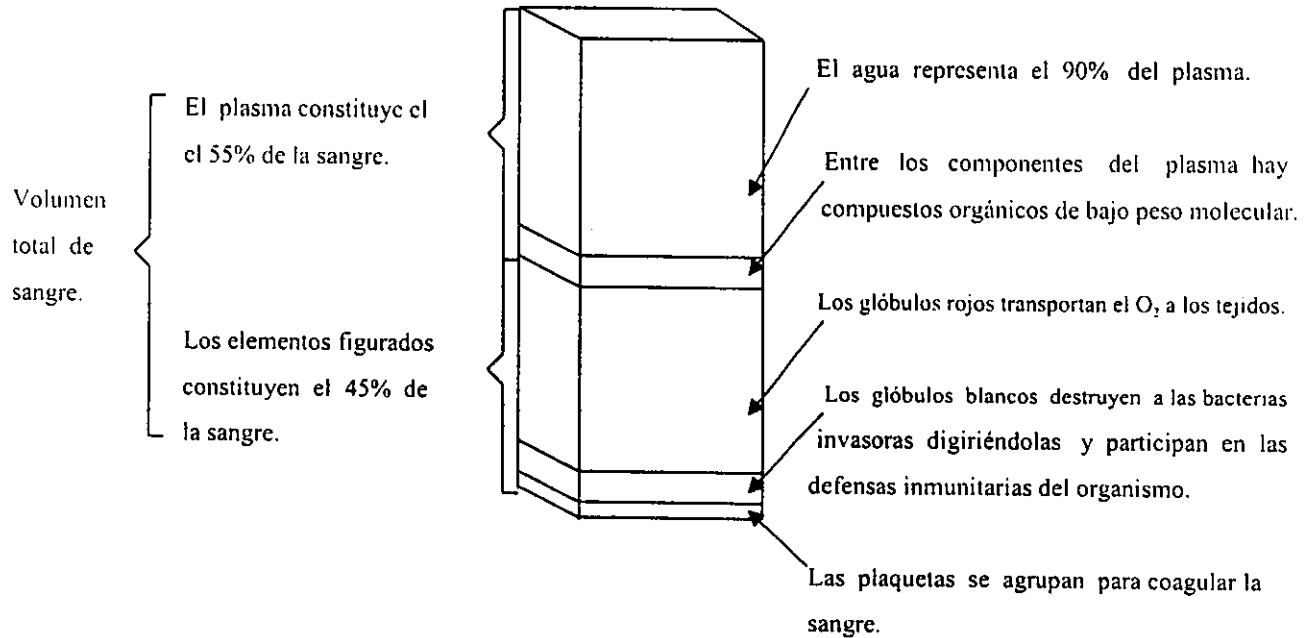


FIGURA No. 3. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LOS COMPONENTES DE LA SANGRE (Lock, *et al.* 1981).

### 2.11.1 GLOBULOS ROJOS (Eritrocitos).

Son células sin núcleo con forma de disco, adelgazado por los bordes. Su diámetro es de unos 7.1 milésimas de milímetro y, por tanto, solo pueden ser vistos con ayuda del microscopio. Tienen una vida media de 120 días y son constantemente reemplazados por nuevos glóbulos producidos por la médula ósea. Transportan el oxígeno de los pulmones a las células del organismo y el anhídrido carbónico (sustancia de desecho) de las células a los pulmones. Contienen a la hemoglobina, pigmento que da a la sangre su color característico, la cual es rica en hierro (Lock, *et. al*, 1981).

### 2.11.2 HEMOGLOBINA.

Pigmento contenido en los glóbulos rojos que da a la sangre su color característico, cumple la importante función de transportar el oxígeno a los tejidos. En efecto, en los pulmones, la sangre capta el oxígeno inspirado -mediante una unión química entre el oxígeno y el hierro contenido en la hemoglobina- y lo transporta a los diferentes tejidos del cuerpo, en los que resulta indispensable para los procesos químicos que producen la energía necesaria para la vida (Lock, *et al*. 1981).

### 2.11.3 GLOBULOS BLANCOS (Leucocitos).

Llamados los "Soldados de la Sangre", son ligeramente mayores que los glóbulos rojos y de forma más esférica. Una de sus funciones principales consiste en defender el organismo contra las bacterias u otras sustancias extrañas.

Cuando las bacterias u otros invasores entran en la sangre, un determinado grupo de glóbulos blancos -los neutrófilos- salen de los vasos sanguíneos atravesando su pared justamente en el punto de la invasión, rodean al invasor, lo engloban y lo digieren. Si la infección es grave, la médula ósea produce casi inmediatamente un exceso de nuevos

glóbulos blancos para hacer frente a la situación de emergencia. También ayudan a eliminar los tejidos muertos y los coágulos, permitiendo la cicatrización de las heridas.

La sangre contiene también otro tipo de glóbulos blancos, los linfocitos que, aun siendo incapaces de digerir materiales extraños, revisten enorme importancia en el proceso de formación de los anticuerpos, las sustancias específicas encargadas de combatir los gérmenes que puedan penetrar en el organismo.

Los linfocitos, como se ha indicado, desempeñan en cambio un papel importante en los procesos inmunitarios. Algunos de ellos, precisamente los relacionados con la memoria inmunitaria (los encargados de “recordar” durante mucho tiempo las características de los antígenos que han penetrado anteriormente en el organismo) tienen una vida mucho más larga que las otras células de la sangre, ya que viven más de 1 año, mientras que los glóbulos rojos viven por término medio 120 días, las plaquetas 10 días y los otros glóbulos blancos 10 horas (Lock, *et al.* 1981)

#### 2.11.4 PLAQUETAS (Trombocitos).

Son los elementos más pequeños de la sangre (su diámetro es de 2-3 milésimas de milímetro) y son incoloras. Tienen la propiedad de agruparse entre sí y de producir una sustancia, la tromboplastina, capaz de poner en marcha el proceso de coagulación de la sangre. De esta forma contribuyen a cerrar las heridas de los pequeños vasos y de los capilares (Lock, *et al.* 1981).

#### 2.11.5 PROTEINAS PLASMATICAS.

La albúmina, que ejerce un papel de suma importancia en la regulación del paso de los líquidos de la sangre a los tejidos y viceversa. Las globulinas que comprenden las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -globulinas, entre las cuales las  $\gamma$  ostentan un importante papel en la defensa contra las

bacterias y sus venenos o toxinas (en efecto, los anticuerpos son en gran parte  $\gamma$ -globulinas); la protrombina, que interviene en el proceso de coagulación de la sangre; el fibrinógeno, que, con las transformaciones que sufre cuando la sangre sale de un vaso por una herida, ayuda a detener la hemorragia; y las proteínas conjugadas, unidas a otros elementos entre los cuales se pueden enumerar las lipoproteínas (que transportan las grasas), la transferrina (que transporta el hierro), las mucoproteínas y las glucoproteínas (que transportan los azúcares) (Lock, *et al.* 1981).

## 2.12 ENFERMEDADES MAS COMUNES DE LA SANGRE.

Las enfermedades que con mayor frecuencia afectan a la sangre, son:

- Anemia. Es debida a la disminución de los glóbulos rojos o del contenido de su pigmento, la hemoglobina.
- Poliglobulia. Consiste en la superabundancia de glóbulos rojos; es lo contrario de ciertas anemias.
- Agranulocitosis. Es una disminución muy notable de los granulocitos, hasta su desaparición.
- Leucemia. Es una enfermedad en la que se registra un notable aumento de los glóbulos blancos inmaduros (blastos) circulantes.
- Hemofilia. En esta enfermedad la sangre del sujeto no se coagula de forma normal, por lo que las heridas dan lugar a hemorragias completamente desproporcionadas.



- Trombosis. Causada por la formación de coágulos de sangre (trombos) en un vaso sanguíneo; fenómeno que se produce con mayor frecuencia cuando la circulación es lenta, como consecuencia de un traumatismo, por un defecto de las paredes del vaso sanguíneo, o a causa de una alteración en la composición de la sangre (Lock *et al.* 1981).

### 2.13 BIOMETRIA HEMATICA.

La biometría hemática, permite establecer sospechas diagnósticas definidas sobre la enfermedad que causa las alteraciones de la misma y ahorrar al médico y al paciente tiempo, esfuerzos e incluso erogaciones económicas.

La biometría hemática (BH) supone el análisis detallado de cada uno de los datos que informa, los cuales pueden dividirse en tres grandes grupos: datos de la serie roja, de la serie blanca y de la serie trombocítica (Ruiz, 1994).

#### 2.13.1 SERIE O FORMULA ROJA.

Los datos que la BH informa para la serie roja son los siguientes:

- Hemoglobina (*Hb*). La Hb se mide en gramos por decilitro (g/dL) y representa la cantidad de esta proteína por unidad de volumen. Este parámetro debe ser el único a emplear para definir si hay anemia o no, es decir, solo si las cifras de hemoglobina son inferiores a los valores normales puede asegurarse que existe anemia. Las cifras "normales" o "de referencia" de la hemoglobina son variables y dependen de: edad, sexo, altura del sitio de residencia, etcétera.

- Hematocrito (*Hto*). Se mide en porcentaje (%) y representa la proporción de eritrocitos en el total de la sangre. Este parámetro no debe emplearse para establecer la existencia de anemia. Los valores normales del hematocrito también dependen de las variables antes mencionadas.
- Número de glóbulos rojos (*GR*). Se mide en millones por microlitro ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ). Su valor normal depende también de los factores señalados para los otros dos parámetros eritrocíticos (Hb y Hto).
- Volumen corpuscular medio (*VCM*). Se mide en femtolitros (fL). Es el más importante de los índices heritrocitarios; ya que, debido a la valoración del tamaño de los hematíes se diagnostica si existe anemia o no. Los valores de VCM permiten saber si una anemia es macrocítica (VCM mayor a los límites normales) o microcítica (VCM menor a los límites normales).
- Hemoglobina corpuscular media (*HCM*). Se expresa en picogramos (pg) y representa la cantidad promedio de hemoglobina en cada eritrocito. Este valor puede ser calculado dividiendo un parámetro (Hb) entre un índice (GR) y multiplicando el cociente por 10. Este índice debe ser el único que se emplee para referirse a la cantidad de hemoglobina contenida en cada eritrocito, es decir, se hablará de hipocromia y normocromia cuando el valor de HCM sea subnormal o normal, respectivamente.
- Concentración de hemoglobina corpuscular media (*CHCM*). Este índice eritrocítico, es medido como (g/dL). Este valor puede determinarse dividiendo la Hb multiplicada por 100 entre el Hto (Ruiz, 1994).

### 2.13.2 SERIE O FORMULA BLANCA.

Los datos que la BH proporciona son:

- Número de glóbulos blancos (*GB*). Se mide en miles por microlitro ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ). El número de leucocitos depende de mucho factores como edad, peso, hábito tabáquico, consumo de hormonas anticonceptivas, etcétera. Cuando la GB se encuentra por arriba de los valores normales se habla de leucocitosis y cuando se encuentra por debajo de leucopenia. Dentro de las causas de leucopenia, pueden señalarse las infecciones bacterianas, infecciones virales, infecciones por rickettsias y otras infecciones (Ruiz, 1994).
- Cuenta diferencial de glóbulos blancos. Hacer la cuenta diferencial de las variedades de glóbulos blancos es de gran importancia en la BH. Normalmente en sangre periférica pueden encontrarse los siguientes tipos de leucocitos: neutrófilos o polimorfonucleares (incluye las formas con núcleo segmentado, las de núcleo "en banda" y los metamielocitos), eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos (Ruiz, 1994).

### 2.13.3 SERIE O FORMULA TROMBOCITICA.

Número de Plaquetas (Plaquetas). Las causas de trombocitopenia son: leucemia, anemia aplástica, anemia perniciosa, transfusiones sanguíneas, etcétera. Cuando la cuenta plaquetaria se encuentra por encima se habla de trombocitosis, cuyas causas son también múltiples: padecimientos malignos, anemia por deficiencia de hierro, infecciones agudas, cirrosis hepática, etcétera (Ruiz, 1994).

Los parámetros hematológicos que pueden ser identificados en la realización de una BH, son mostrados en la tabla No. 4, en donde además aparecen, algunos de los valores normales encontrados en ratones.

TABLA No. 4

PARAMETROS HEMATOLOGICOS IDENTIFICADOS EN LA REALIZACION DE  
UNA BH

NOMENCLATURA UTILIZADA*	PARAMETRO*	MEDIDO EN:**
GR	Glóbulos rojos	[7.9-10.0] ( x 10 <sup>6</sup> / μL )
Hb	Hemoglobina	[12.7-16.2] ( g / dL )
Hto.	Hematocrito	[41-49] ( % )
VCM	Volumen corpuscular medio	[-----] ( fL )***
HCM	Concentración media de hemoglobina	[13-19] ( pg )
CHCM	Concentración de hemoglobina corpuscular media	{-----} ( g / dL )***
GB	Glóbulos blancos	[4.5-12.8] ( x 10 <sup>3</sup> / μL )
NEUTR	Neutrófilos	[-----] ( % )***
LINFO	Linfocitos	[75-88] ( % )
MONO	Monocitos	1.7 ( % )
EOS	Eosinófilos	[0.2-0.9] ( % )
BASO	Basofilos	0.0 ( % )
Plaquetas	Plaquetas	[-----] ( x 10 <sup>3</sup> / μL )***

\* I.u. 1995

\*\* I.u. 1995, Melby, 1976.

\*\*\* No se localizaron esos parámetros en la bibliografía consultada.

### 3. OBJETIVOS

#### OBJETIVO GENERAL.

- ◆ Evaluar toxicológicamente mediante bioensayos en animales de laboratorio la fracción lipídica de la almendra de calabaza (*Cucurbita pepo*).

#### OBJETIVOS PARTICULARES.

- ◆ Determinar los parámetros fisicoquímicos más comunes, en los aceites crudo y refinado de la almendra de calabaza (*Cucurbita pepo*), así como su contenido en ácidos grasos.
- ◆ Determinar si el aceite crudo de semilla de calabaza presenta algún efecto dañino a corto plazo (estudio de toxicidad aguda).
- ◆ Establecer si el proceso de refinamiento presenta algún efecto benéfico a nivel fisiológico para los animales en estudio.
- ◆ Determinar si los aceites crudo y refinado de almendra de calabaza presentan efectos dañinos en un estudio de toxicidad subaguda.

#### 4. DESARROLLO DE ACTIVIDADES.

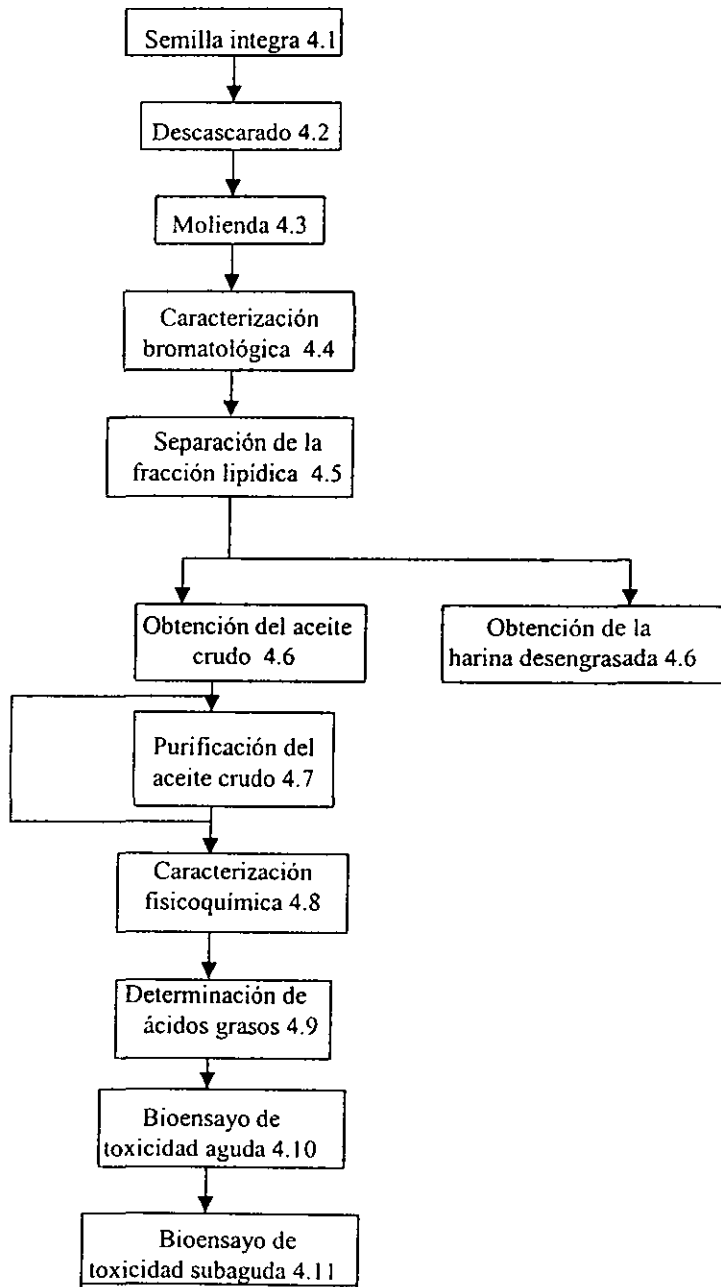


FIGURA No. 4 DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO.

A continuación se da una explicación más detallada de cada uno de los pasos mostrados en el diagrama de trabajo.

#### 4.1 SEMILLA INTEGRAL.

Para llevar a cabo la realización del presente estudio se parte de la semilla íntegra de calabaza, como materia prima, que botánicamente corresponde a *Cucurbita pepo*; dicha semilla fue recolectada en el municipio de Aquismón, S.L.P.

#### 4.2 DESCASCARADO.

Dicha semilla tuvo que haber sido desprovista de la cáscara, bajo proceso manual y se pesaron por separado tres porciones de la semilla de calabaza, cada porción fue descascarada y se pesó por separado la almendra y la cascara, esto con la finalidad de pelar la cantidad de pepita necesaria para obtener aproximadamente 1 Kg. de almendra de la misma y de esta forma poder obtener el aceite suficiente para la realización de los dos ensayos (toxicidad aguda y toxicidad subaguda).

#### 4.3 MOLIENDA.

La almendra de calabaza íntegra y descascarada fue molida en un molino **Thomas-Wiley Model 4** usando mallas de 5 mm y posteriormente malla de 2 mm de diámetro. Se utilizarían mallas de esas dimensiones, debido a que si se utilizaban diámetros más pequeños habría una gran pérdida del aceite, quedando apelmazada la harina y dificultando la molienda.



#### 4.4 CARACTERIZACION BROMATOLOGICA.

A la harina de semilla de calabaza obtenida del paso anterior se le determinaron los siguientes parámetros bromatológicos: humedad, cenizas, grasa, proteína, fibra y carbohidratos asimilables (calculados por diferencia). Todos ellos determinados por los métodos establecidos en el AOAC.

#### 4.5 SEPARACION DE LA FRACCION LIPIDICA.

Para llevar a cabo la separación o extracción de la fracción lipídica, se montó un dispositivo tipo Soxhlet, en el que la harina se colocó en un frasco de vidrio (con capacidad de 1 Kg.) envuelta en papel filtro de tal manera que se evitaran pérdidas por el flujo del disolvente. El disolvente utilizado fue hexano grado Q.P., la temperatura utilizada para la extracción fue de 50-55°C y la extracción tuvo una duración aproximada de 28 horas.

#### 4.6 OBTENCION DEL ACEITE CRUDO.

Del paso anterior se separó el extracto hexanoico, del cual se eliminó el disolvente de la micela con la ayuda de un rotavapor, seguido de secado en estufa a 60°C. Este extracto libre de hexano se denominó “grasa cruda”. Se le insufló nitrógeno y se almacenó a temperatura baja, con la finalidad de evitar autoxidación, hasta su posterior uso.

Cabe mencionar que por otro lado, se obtuvo simultáneamente, la harina desengrasada de la semilla de calabaza, la cual forma parte de otro estudio.

#### 4.7 PURIFICACION DEL ACEITE CRUDO.

En esta etapa se realizaron los pasos básicos iniciales del proceso de refinamiento para un aceite vegetal, los cuales consistieron en:

##### 4.7.1 DESGOMADO.

Mezclar el aceite con un 5% de ácido fosfórico al 0.1%, calentar la mezcla a una temperatura de 54°C y separar por centrifugación a 4000 rpm.

##### 4.7.2 NEUTRALIZACION.

Adicionar al aceite hidróxido sódico al 15%, el suficiente para neutralizar el total de ácidos grasos libres (expresados como % de ácido oleico), calentar la mezcla a baño María a 54°C, centrifugar la mezcla a 4000 rpm. Para realizar el lavado del aceite, éste se mezcla con agua caliente en una proporción del 5%, se agita y se somete a una nueva centrifugación (a 4000 rpm).

##### 4.7.3 BLANQUEO.

Añadir a la mezcla 2.0% de silicato aluminico y combinarlo con 0.4% de carbón activado, separar por filtración rápida con papel Whatman de celulosa del No. 541 y finalmente pasar el aceite a una filtración al vacío con un embudo milipore de tamaño de poro "M" (ASTM 10-15). Con todo esto se pretende eliminar la mayor parte de componentes contaminantes y de posibles tóxicos presentes en la grasa inicial. Al contar con la cantidad obtenida de aceite refinado y la cantidad inicial de aceite crudo, obtener el rendimiento de dicho proceso.

#### 4.8 CARACTERIZACION FISICOQUIMICA.

En esta etapa se llevó a cabo la determinación de los siguientes parámetros :

##### 4.8.1 GRAVEDAD ESPECIFICA (RELATIVA).

a) Materiales y reactivos (grado analítico, si no se indica otro).

- Picnómetro de 50 mL.
- Baño de temperatura controlada GRANT Mod. SE10.
- Balanza analítica.
- Eter etílico.
- Etanol.

b) Determinación.

Limpiar cuidadosamente el picnómetro con mezcla crómica. Enjuagar y secar completamente, llenar picnómetro con agua destilada 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, después con éter y secar. Determinar por diferencia el peso de agua contenida en el picnómetro a 25°C.

Limpiar y secar el 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 relativa de la muestra dividiendo el peso del aceite entre el peso del agua (ambos medidos en el mismo picnómetro).

#### 4.8.2 PUNTO DE FUSION.

##### a) Materiales.

- Capilares de vidrio (1 mm de diámetro interno).
- Lente de aumento de vidrio (o lupa).
- Parrilla con agitación.
- Termómetro graduado (mínima división de  $0.2^{\circ}\text{C}$ ).

##### b) Determinación.

Llenar el 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 ( $4-10^{\circ}\text{C}$ ) durante 16 horas.

Tomar el capilar y atarlo al termómetro de tal modo que el fondo de la columna de la muestra del 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  $10^{\circ}\text{C}$  por abajo del mismo. Comenzar el calentamiento a una tasa de  $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , 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.

#### 4.8.3 INDICE DE YODO (Método de Hanus).

##### a) Fundamento.

Los acilgliceroles de los ácidos grasos saturados 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 tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ), y por diferencia con un blanco se obtiene la cantidad de monobromuro de yodo absorbido por la muestra (Egan, 1991).

##### b) Material y reactivos (grado analítico, si no se indica otro).

- Matraces Erlenmeyer con tapón de vidrio de 500 mL.
- Probeta de vidrio de 10 mL.
- Buretas graduadas de vidrio de 50 mL.
- Balanza analítica.
- Acido acético glacial.
- Yodo.
- Tiosulfato de sodio (0.1N).
- Bromo.
- Solución de yoduro de potasio al 15% p/v.
- Solución de almidón al 1% p/v.
- Cloroformo.
- Acido clorhídrico 1 N.
- Dicromato de potasio.

c) Preparación de solución de tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) 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 añadir los residuos de reactivo al frasco.

Pesar en balanza analítica 0.20 a 0.23 g de dicromato de potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) (secado a  $100^\circ\text{C}$  durante 2 horas) en matraz Erlenmeyer. Disolver en 80 mL de agua destilada junto con 2g 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 :

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

d) Preparación de la 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 ésta 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 ;  $B = 800 \times$  equivalentes de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  por mL de la solución inicial de bromo 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.

c) Determinación.

Pesar 0.25 g de aceite en un matraz Erlenmeyer con tapón de vidrio y disolver en 10 mL de cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ). 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  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0.1N hasta que el color amarillo de la solución casi desaparezca. Añadir unas cuantas gotas de solución de almidón al 1% y continuar titulado 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  $\text{CHCl}_3$  sea también titulado.

Llevar a cabo dos 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 el blanco.

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

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

#### 4.8.4 INDICE DE SAPONIFICACION.

##### a) Fundamento.

Los ácidos grasos de acilgliceroles de la grasa son liberados con una solución de hidróxido de potasio (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 0.5 N y por diferencia con un blanco se determina la cantidad de KOH empleado para saponificar la muestra.

##### b) Materiales y reactivos (grado analítico, si no se indica otro).

- Balanza analítica.
- Matraces de bola de fondo plano de 250 mL.
- Matraces de fondo plano con cuello largo de 1 litro.
- Condensador.
- Buretas graduadas de 50 mL.
- Canastilla de calentamiento.
- Mortero.
- Hidróxido de potasio.
- Óxido de calcio granulado.
- Etanol.



- Acido Clorhídrico 0.5 N.
- Solución indicadora de fenolftaleína al 1% p/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 durante 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 una balanza analítica 0.50 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 al matraz 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 el blanco.

S= mL de HCl 0.5N gastados en la muestra..

#### 4.8.5 INDICE DE REFRACCION.

a) Materiales.

- Refractómetro de Abbe OPL No. 2,154.

b) Determinación.

Determinar el índice de refracción del aceite a 20 ó 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 (por ejemplo 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 extender 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 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 halla 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 a las lecturas.

#### 4.8.6 INDICE DE ACIDEZ.

a) Material y reactivos (reactivo analítico si no se indica otro).

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

b) Determinación.

Neutralizar 50 mL de etanol con NaOH 0.1N, 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 0.1N 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.

$$\text{Indice de acidez (mg KOH/g muestra)} = \frac{\text{mL NaOH} \times \text{N NaOH} \times 56.1}{\text{g muestra}}$$

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

$$\% \text{ ácido oleico} = \frac{\text{mL NaOH} \times \text{N NaOH} \times 0.282}{\text{g muestra}} \times 100$$

Ambas expresiones se relacionan aproximadamente de la siguiente forma:

Índice de acidez (mg KOH/g muestra) = 2 x % ácido oleico.

#### 4.9 DETERMINACION DE ACIDOS GRASOS.

Los ácidos grasos de ambos aceites (crudo y refinado de semilla de calabaza) fueron separados y cuantificados en un cromatógrafo de gases **Hewlett-Packard** modelo 5890 utilizando una columna capilar de 100 m. de longitud y con CP-Sil 88% como fase estacionaria. Las condiciones de separación fueron las siguientes:

- Temperatura del inyector: 270°C.
- Temperatura del detector de ionización de flama: 300°C.
- Temperatura inicial de la columna: 105°C durante 22 minutos con un incremento posterior de 15°C cada minuto hasta alcanzar 230°C y mantenerla así durante 15 minutos.
- Gas acarreador: Helio.
- Estándares de referencia (Poli Science, USA).

Los ácidos grasos de los aceites crudo y refinado de la almendra de calabaza se identificaron por su comparación con los tiempos de retención de los estándares de referencia.

##### a) Cálculos.

En los cromatogramas de los aceites crudo y refinado de la almendra de calabaza, se obtienen, además de los tiempos de retención, las áreas de los diferentes ácidos grasos y con ellos se puede determinar el porcentaje correspondiente a cada ácido graso que se encuentre en el aceite, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de "X" ácido graso} = \frac{\text{Area parcial}}{\text{Area total}} \times 100$$

#### 4.10 TOXICIDAD AGUDA.

Una que vez que se tenían las fracciones lipídicas designadas como "aceite crudo" y "aceite refinado". se diseñó el bioensayo de toxicidad aguda, para lo cual, se designaron tres lotes (aceite de maíz o control, aceite crudo y aceite refinado de almendra de calabaza), se contó con 15 ratones en total (para ser asignados 5 ratones por lote) a los que se les puso en ayuno por 12 horas. Posteriormente fueron marcados por medio de perforaciones en las orejas (ver apéndice 7.2) y fueron asignados a un lote específico de acuerdo al método de "culebra japonesa" (ver apéndice 7.3).

Los ratones fueron colocados en cajas de plástico de acuerdo a su lote establecido, dichas cajas tenían en la parte superior (o techo) una reja en la que, en una parte se les colocaba el alimento y en otra se les insertaba el bebedero y en el piso de dicha caja tenían paja desperdigada, esto con la finalidad de que las condiciones, que ya tenían desde un principio, no variaran.

Los aceites fueron atemperados a 37°C en baño María. Se administró una sola dosis (7.5 g aceite/ Kg pc) por vía oral., llevada a cabo con jeringas de plástico de 1 mL de capacidad y puntas especiales de acero inoxidable con final redondeado del No. 18 x 1-1/2". Y cada hora durante las primeras 10 horas y posteriormente a las 24, 48 y 72 horas, se hacían observaciones acerca del comportamiento del animal. Las características observadas eran las siguientes: lordosis, cifosis, ataxia, piloerección, erección caudal, agresividad, aletargamiento, disnea, cianosis e hipotermia (en el apéndice 7.4 se da una breve

descripción de cada una de éstas características). Y si algún animal fallecía se le realizaría la necropsia para identificar el motivo de su muerte.

La dosis utilizada nos indicaría si el material por evaluar, correspondía a prácticamente no tóxico o casi inocuo, de acuerdo a la escala de grado de toxicidad de sustancias xenobióticas, que se describe en la tabla No. 5.

**TABLA No. 5**  
DENOMINACION TOXICOLOGICA UTILIZADA PARA DIFERENTES RANGOS  
DE TOXICIDAD (Woodard, 1965).

DENOMINACION	DL <sub>50</sub> (en rata, dosis oral única).
Extremadamente tóxico	< 1 mg/Kg
Altamente tóxico	1 - 50 mg/Kg
Moderadamente tóxico	50 - 500 mg/Kg
Ligeramente tóxico	0.5 - 5 g/Kg
Prácticamente no tóxico	5 - 15 g/Kg
Relativamente inocuo	15 g/Kg

Para ambas pruebas (toxicidad aguda y subaguda) la fracción lipídica de la almendra de calabaza se utilizaron ratones de la cepa NIH (siglas del instituto donde fueron criados los animales: National Institute of Health) del bioterio del edificio "E" de la facultad de Química, UNAM.

Las condiciones del bioterio, son las siguientes:

- Temperatura:  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
- Humedad Relativa: 55-60%.
- Recambios de aire en los cuartos: 15 en una hora.
- Filtración con filtrohepa (campanas de flujo laminar de 3 micras).
- Ciclo de oscuridad: 12 horas luz/ 12 horas oscuridad.

Se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*. El alimento que se les dio fue Nutricubos, elaborado por Purina S.A. de C.V., cuya composición es la siguiente:

COMPONENTE	PORCENTAJE
Humedad máxima	12.0
Proteína mínima	23.0
Grasa mínima	3.0
Fibra máxima	6.0
Cenizas máxima	7.0
ELN (x diferencia)	49.0
Calcio máximo	1.0
Fósforo mínimo	0.6

#### 4.11 TOXICIDAD SUBAGUDA.

Una vez que la fracción lipídica no manifestó toxicidad aguda, se estuvo en condiciones de desarrollar el bioensayo de toxicidad subaguda; en donde, por medio de pellets, previamente molidos, fueron adicionados los aceites, en sus respectivos lotes (aceite control o de maíz, aceite crudo y aceite refinado de almendra de calabaza) con la finalidad de no causarle estrés al animal ya que si la administración se hacía de manera oral, se corría el riesgo de una mala administración que, en el peor de los casos, se reflejaría en la pérdida del animal lo cual no es conveniente para ningún tipo de estudio. Este ensayo se realizó con una sola dosis que fue de 15 g de aceite/Kg de pc, durante 4 semanas en ratones jóvenes con un peso inicial aproximado de 18 g. En este caso aparte de realizar las observaciones clínicas rutinarias acerca del comportamiento del animal se hizo un seguimiento de otros parámetros que se explicarán más adelante.

Se contó con 12 ratones en total (y se asignaron 4 animales por lote de acuerdo al tipo de aceite: de maíz, crudo o refinado de almendra de calabaza), éstos animales siguieron, al igual que para el ensayo de toxicidad aguda, la distribución de “culebra japonesa” (apéndice 7.3) y no se marcaron de las orejas, como se hizo en el ensayo anterior, debido a que fueron colocados en jaulas individuales en un estante de metal (rack). A éstas jaulas se les insertó una reja con aberturas más pequeñas, para poder colocarles el alimento (pellets) sobre la misma. Adicional a esto se hicieron charolas con papel manila y fueron colocadas debajo de cada jaula, con el objeto de poder recuperar el alimento que se caía junto con las heces por las aberturas. También se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*.



Durante el tiempo de estudio se registró el peso individual de los ratones cada tercer día; cantidad de alimento ingerido por semana, así mismo, se les colocaba el alimento suficiente que se calculaba les alcanzaría hasta la siguiente semana; se media el volumen de agua ingerida por semana y cada semana el agua era cambiada del bebedero para evitar la aparición de hongos.

Para poder conocer el efecto del aceite crudo y del aceite refinado de almendra de calabaza, comparados con el aceite de maíz (control), a nivel sanguíneo, fueron realizadas 3 sangrías (la primera se realizó al inicio ó día 0 ; la segunda, en la fase intermedia ó día 14 y la tercera, en la parte final del experimento ó día 28), que consistían en extraer 0.5 mL de sangre como mínimo, por punción ocular en el animal, transferida por medio de capilares heparinizados a tubos Microtainer (Becton Dickinson) con EDTA-K como anticoagulante, donde fueron mezclados por inversión suave y mantenidos a temperatura ambiente. Para la realización de la sangría se requería, forzosamente, que los animales estuvieran anestesiados (adormilados), lo cual se conseguía colocando en un frasco de vidrio, o bien en un desecador, pequeños pedazos de algodón humedecidos con éter etílico, se colocaba al ratón dentro del frasco o desecador hasta que éste dejara de moverse, pero teniendo la precaución de que siguiera respirando pausadamente. Se llevaba a cabo la sangría tomando el capilar con los dedos pulgar e índice y metiéndolo por un costado del ojo, por la parte de atrás, con ayuda de pequeños giros de los dedos para, finalmente recolectar la sangre en los tubos Microtainer.

Las muestras fueron transportadas hasta el sitio de análisis donde fueron procesadas aproximadamente dos horas después de ser obtenidas. Previo al análisis se mezclaron por inversión mecánica suave y fueron analizadas en un equipo Sysmex NE 1500.

Es importante mencionar que se debe de tener la precaución de que la muestra no tenga coágulos ya que éstos tapan los conductos del equipo; sin embargo éstos pueden ser extraídos de la muestra cuando están todavía en el tubo Microtainer con ayuda de aplicadores de madera, sólo que esta muestra, no es adecuada para el estudio.

Para contar con resultados confiables de la biometría hemática es de suma importancia que durante la realización de una sangría, se cumpla con las siguientes indicaciones:

- Tener la suficiente rapidez, para realizarla en un periodo corto de tiempo.
- Contar con buena habilidad, para no dañar al animal ni hacerlo sufrir demasiado ya que podría despertar de la anestesia.
- Tener agilidad en el momento de recibir la sangre en el tubo Microtainer y también para, al mismo tiempo que es recibida, agitar ligeramente el tubo con el dedo meñique con el fin de que el anticoagulante que se encuentra en las paredes del mismo se mezcle con la muestra de sangre y de esta manera evitar que se coagule.

Al final del experimento, se llevó a cabo la disección de los animales y la extracción del hígado para registrar su peso final y evaluar visualmente su estado.

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

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

en donde RP = Relación porcentual del hígado con respecto al peso corporal.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1 CONTENIDO DE ALMENDRA EN LA SEMILLA DE CALABAZA.

En la tabla siguiente son mostrados los contenidos de almendra y de cáscara de la semilla de calabaza.

**TABLA No. 6**

#### CONTENIDO DE ALMENDRA EN LA SEMILLA DE CALABAZA

PESO DE LA ALMENDRA (g)	PESO DE LA CASCARA (g)
7.30	2.91
7.27	2.99
7.18	3.02
Promedio = $7.25 \pm 0.06$	Promedio = $2.27 \pm 0.06$

Como podemos observar el 70.90% corresponde a la cantidad de almendra en la semilla de calabaza y el 29.09% a la cáscara, lo cual nos indica que por cada Kg de semilla de calabaza se obtienen 725g de almendra.

## 5.2 EVALUACION BROMATOLOGICA.

En la tabla No. 7 se muestran los datos obtenidos del análisis bromatológico que se realizó con el fin de corroborar el alto contenido de grasa que se encuentra presente en la almendra de calabaza.

Como podemos observar el porcentaje de grasa (46.47%) corresponde casi al 50% de la composición de dicha semilla por lo que, podemos señalar a la almendra de calabaza como fuente importante de grasa.

**TABLA No. 7**

**ANALISIS BROMATOLOGICO DE LA HARINA INTEGRAL DE LA  
ALMENDRA DE CALABAZA (*Cucurbita pepo*).**

DETERMINACION	HARINA INTEGRAL (base húmeda g/100g muestra)**	HARINA INTEGRAL (base seca g/100g muestra)
Humedad	5.19 ± 0.65	-----
Cenizas	5.37 ± 0.28	5.66
Grasa	44.06 ± 0.32	46.47
Proteína (N X 6.25)	37.76±0.18	39.83
Fibra	5.79±1.77	6.11
Carbohidratos	1.83 ± 1.44	1.93

\* Hidratos de carbono asimilables calculados por diferencia.

\*\* Valor promedio de las determinaciones realizadas por cuatuplicado.

### 5.3 RENDIMIENTO OBTENIDO EN EL PROCESO DE REFINAMIENTO.

Se partió de 250 g de aceite crudo.

- Después de pasar por la etapa de desgomado se tuvieron 243.9 g de aceite.
- Posteriormente, al terminar la etapa de neutralización se tuvieron 210.7 g (aquí también va incluido el lavado del aceite).
- Finalmente, después de la etapa de blanqueo se tuvieron 204.6 g de aceite.

Realmente la merma de aceite durante todo el proceso fue poca (45.4 g), siendo el rendimiento obtenido de 81.88%. Como podemos observar la etapa en la cual hay mayor pérdida de aceite es la de neutralización, esto puede deberse en parte a que del aceite original (crudo) fueron eliminados los ácidos grasos libres y otras impurezas como fosfátidos, proteínas y sustancias mucilaginosas (que pudieran haber permanecido de la etapa anterior); así como del lavado que se hace posterior a la neutralización, ya que al remover el agua de lavado, se pudo ir algo de aceite.

### 5.4 EVALUACION DE PARAMETROS FISICOQUIMICOS.

En la tabla No. 8 se muestran los siguientes parámetros fisicoquímicos: índice de yodo, índice de saponificación, índice de refracción, índice de acidez, densidad relativa y punto de fusión. Adicional a ellos, y con fines de comparación, se presentan los datos bibliográficos correspondientes al aceite de maíz, manteca de cerdo y los valores (en rango) que generalmente existen en el grupo oleico/linoleico de los aceites comerciales más comúnmente consumidos.

En el caso del índice de acidez, se observa que sobrepasa al valor establecido para el grupo oleico/linoleico, pero este caso solo se da para el aceite

crudo de almendra de calabaza (2.47% de ácido oleico), lo cual era de esperarse ya que los valores de índice de acidez para el grupo oleico/linoleico toma en cuenta a los principales aceites comestibles los que, anteriormente han pasado por una fase de neutralización de los ácidos grasos libres, por lo tanto, en la grasa refinada de almendra de calabaza, el valor de índice de acidez, medido como % de ácido oleico es aceptable (0.24% de ácido oleico).

En el caso del índice de yodo es de esperarse que aquellos aceites que tienen un porcentaje mayor de ácidos grasos insaturados (%AGI) tengan también un valor alto de índice de yodo y, teniendo que el aceite de maíz contiene un 87% de ácidos grasos insaturados a él corresponderá un valor mayor de índice de yodo, en el caso del aceite refinado de la almendra de calabaza contiene un porcentaje un poco mayor de ácidos grasos insaturados comparado con el crudo y ambos (crudo y refinado) tienen un valor inferior al del aceite de maíz, por lo que se observa que el aceite refinado presenta un valor un poco superior de índice de yodo al del aceite crudo (101.71 y 96.60 g I<sub>2</sub>/100 g aceite respectivamente). Por lo que podemos decir que los valores de índice de yodo obtenidos para el aceite crudo y refinado de la almendra de calabaza concuerdan con su contenido de ácidos grasos insaturados. Para el caso del aceite crudo el índice de yodo fue de 96.60 (%AGI= 74.25) y para el caso del aceite refinado de 101.71 (%AGI= 74.33).

Con respecto al índice de saponificación, se puede observar que para el caso del aceite crudo de almendra de calabaza es menor que para el aceite refinado de almendra de calabaza (209.24 y 227.69 mg KOH/g aceite respectivamente), en cambio el aceite de maíz presenta un bajo índice de saponificación comparado con los dos aceites en estudio (187-193 mg KOH/g aceite), lo cual se relaciona con su

contenido de ácidos grasos que, como podemos observar en la tabla No. 9, en el caso del aceite de maíz solo hay un ácido graso saturado que tiene influencia sobre su índice de saponificación [ácido palmítico ( $C_{16,0}$ ), que lo presenta en un 11%] en cambio para los aceites crudo y refinado de almendra de calabaza, existen dos ácidos grasos saturados que influyen el aumento en su índice de saponificación [ácido palmítico (16.515% en el aceite crudo y 16.365% en el caso del aceite refinado) y el ácido estearico ( $C_{18,0}$ ) (8.490% en el aceite crudo y 8.515% en el aceite refinado)], por lo que podemos decir que evidentemente, el índice de saponificación se incrementa con el porcentaje de ácidos grasos de cadena corta o media.

También podemos observar que en el aceite refinado se tiene un mayor índice de saponificación que en el aceite crudo, lo cual también podría ser atribuido a las impurezas que existen en el aceite crudo y que, posiblemente son las que abaten ligeramente el índice de saponificación del aceite crudo.

En lo que respecta al punto de fusión lo que se espera obtener es que si tenemos una alta concentración de ácidos grasos insaturados, el punto de fusión disminuye; por lo que esto lo podemos observar en el aceite de maíz el cual tiene un porcentaje de ácidos grasos insaturados de 87.0%, y se tiene reportado un punto de fusión de  $-15^{\circ}\text{C}$ , si tomamos este aceite característico como muestra podemos decir también que, ya que los aceites en estudio mostraron un porcentaje de ácidos grasos insaturados de 77.25% para el caso del aceite crudo y de 74.33% para el caso del aceite refinado, debemos de esperar un punto de fusión más alto que el que se da para el caso del aceite de maíz, encontrándose que para el aceite crudo el punto de fusión es de  $2.6-5.5^{\circ}\text{C}$  y para el caso del aceite refinado es de  $3.1-6.6^{\circ}\text{C}$ .

Sin embargo la diferencia que existe en el porcentaje de ácidos grasos insaturados de la dos muestras en estudio es muy pequeña (0.08%), así como la diferencia que existe en el punto de fusión (aproximadamente  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), a esto podemos decir que probablemente la gran cantidad de compuestos que existen en el aceite crudo abaten ligeramente el punto de fusión del mismo y por eso resulta menor.



TABLA No. 8

PARAMETROS FISICOQUIMICOS DE LOS ACEITES CRUDO Y REFINADO DE LA ALMENDRA DE CALABAZA

(*Cucurbita pepo*).

PARAMETRO	ACEITE CRUDO DE ALMENDRA DE CALABAZA	ACEITE REFINADO DE ALMENDRA DE CALABAZA	GRUPO OLEICO/LINOLEICO (Swern, 1979)	ACEITE DE MAIZ (NOM 1976)	MANTECA DE CERDO (Swern,1979)
Densidad relativa (25/25°C)	0.9157	0.9096	0.909-0.920	0.910-0.926	0.858-0.864
Punto de fusión (°C)	2.6-5.5	3.1-6.6	-5 a 29	-15	—
Índice de yodo (Hanus) (g I <sub>2</sub> /100g aceite)	96.60	101.71	77-117	103-120	46-70
Índice de saponificación (mg KOH/g aceite)	209.24	227.69	187-200	187-193	195-202
Índice de refracción (25°C)	1.471	1.470	1.436-1.474	1.470-1.477	—
Índice de acidez (% ácido oleico)	2.47	0.24	≤ 0.50	Máximo 0.1	Máximo 1

Si observamos la densidad relativa y el índice de refracción podemos darnos cuenta de que los valores obtenidos, para los aceites crudo y refinado, son muy parecidos entre sí y también entran en el rango del grupo oleico/linoleico. Tenemos que a mayor densidad aumenta el grado de insaturación por lo que, a los aceites estudiados (con un grado de insaturación menor al del aceite de maíz) le corresponde un valor de densidad relativa ligeramente inferior (0.910-0.926 para el caso del aceite de maíz, 0.9157 para el caso del aceite crudo y 0.9096 para el caso del aceite refinado), lo cual concuerda para el caso de la manteca de cerdo, que tiene un valor bajo de densidad (0.858) pero posee un valor alto de ácidos grasos saturados (43.0%). Asimismo el índice de refracción aumenta conforme aumentan los dobles enlaces en la molécula por lo que el aceite de maíz (con el mayor grado de insaturación), tiene un índice de refracción de 1.470-1.477, el aceite crudo 1.470 y el refinado 1.469.

#### 5.5 PERFIL DE ACIDOS GRASOS.

En la tabla No. 9 se puede observar el perfil de ácidos grasos de los aceites crudo y refinado de la almendra de calabaza, así como del aceite de maíz, de soya, de palma, manteca de cacao y manteca de cerdo con el propósito de comparación. En los apéndices 7.5 y 7.6 se muestran los cromatogramas para el aceite crudo y refinado de almendra de calabaza.

El aceite, tanto crudo como refinado, de almendra de calabaza, tiene un contenido de ácido oleico y linoleico muy cercano a los aceites comestibles tradicionales por lo que se puede incluir dentro del grupo oleico-linoleico como se observa de dicha tabla; además, a diferencia del aceite de soya y los aceites comestibles, tiene un contenido sumamente bajo de ácido linolenico (<1.0%) lo que lo hace atractivo desde el punto de vista de su

estabilidad. Su contenido de ácidos grasos poli-insaturados (AGPI) es adecuado ya que está balanceado con el tipo de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI). Por otro lado, el contenido de ácidos grasos saturados (AGS) es intermedio entre los aceites vegetales tradicionales y las grasas animales, lo que lo hace interesante, ya que es bien conocido que los AGS no son aconsejables para la salud, pero este aceite se puede considerar como muy flexible ya que no requeriría una significativa hidrogenación para la elaboración de "shortenings" (mantecas vegetales), que son indispensables en la industria alimenticia y, consecuentemente no se produciría un significativo contenido de ácidos grasos "trans", que al parecer no son adecuados para la salud.

Por lo anterior, el aceite de almendra de calabaza tiene un perfil de ácidos grasos muy interesante.

TABLA No. 9

PERFIL DE ACIDOS GRASOS DE LOS ACEITES CRUDO Y REFINADO DE LA ALMENDRA DE CALABAZA

(*Cucurbita pepo*).

ACIDO GRASO	NOMBRE DEL ACIDO GRASO	ACEITE CRUDO DE ALMENDRA DE CALABAZA (%)	ACEITE REFINADO DE ALMENDRA DE CALABAZA (%)	ACEITE DE MAIZ (%)	ACEITE DE SOYA (%)	ACEITE DE PALMA (%)	MANTECA DE CACAO (%)	MANTECA DE CERDO (%)
C <sub>14 0</sub>	Mirístico	0.155	0.130			1		4
C <sub>16 0</sub>	Palmitico	16.515	16.365	11	12	48	26	26
C <sub>16 1</sub>	Palmitoleico	0.093	0.093					
C <sub>18 0</sub>	Estearico	8.490	8.515	2	4	5	34	13
C <sub>18 1</sub>	Oleico	36.785	36.475	28	23	38	34	29
C <sub>18 2</sub>	Linoleico	37.125	37.490	58	53	9	3	3
C <sub>20 0</sub>	Araquídico	0.435	0.450				1	
C <sub>20 1</sub>	Gadoleico	0.108	0.113					
C <sub>18 3</sub>	Linolénico	0.141	0.160	1	8			1
No Identificados		0.173	0.200					
Total de Insaturados		74.252	74.331	87	84	47	37	33

## 5.6 ESTUDIO TOXICOLOGICO AGUDO.

La tabla No. 10 muestra los parámetros observados durante la realización del estudio de toxicidad aguda para el aceite de maíz (control), aceite crudo de almendra de calabaza y harina integral de almendra de calabaza, en donde solo se pudo detectar una ligera erección caudal tanto en los dos aceites (aceite de maíz y aceite crudo de almendra de calabaza) como en la harina integral de almendra de calabaza; y piloerección, ésta solo se vio en el aceite control y en el aceite crudo de almendra de calabaza. Como podemos ver, ambos parámetros detectados (piloerección y erección caudal) se muestran en el aceite control y no hubo ningún parámetro que se mostrara en el aceite crudo o en la harina integral de almendra de calabaza y que no lo mostrara el control por lo que, tomando esto en cuenta, podemos decir que el aceite crudo de almendra de calabaza no causa ningún efecto que uno de los aceites vegetales más comúnmente consumidos no lo cause.

Asimismo, durante este estudio no se observó ninguna muerte, lo que indica que el aceite crudo resulta prácticamente no tóxico (dosis = 7.5 g/Kg pc), según los rangos de toxicidad mostrados en la tabla No. 5.

**TABLA No. 10**

**CARACTERISTICAS CLINICAS OBSERVADAS EN EL ESTUDIO DE  
TOXICIDAD AGUDA.\***

CARACTERISTICA OBSERVADA	ACEITE DE MAIZ (CONTROL)	HARINA INTEGRAL DE ALMENDRA DE CALABAZA	ACEITE CRUDO DE ALMENDRA DE CALABAZA
Lordosis			
Cifosis			
Ataxia			
Piloerección	*		*
Erección caudal	*	*	*
Agresividad			
Aletargamiento			
Exitación			
Disnea			
Cianosis			
Hipotermia			

\* Administración única por vía oral a grupos de 5 ratones por lote (aceite de maíz y aceite crudo de almendra de calabaza) a una dosis de 7.5 g aceite/Kg pc

\* Los lugares que son ocupados por una estrella indican que sí presentó la característica observada. de tal manera que los lugares vacíos indican la no existencia de ese signo clínico.

## 5.7 ESTUDIO TOXICOLOGICO SUBAGUDO.

En el caso del estudio toxicológico subagudo se utilizaron 12 ratones de la cepa NIH con peso promedio de  $18.9 \text{ g} \pm 1.4 \text{ g}$  y fueron divididos en 3 lotes de 4 ratones cada uno.

Dichos lotes quedaron conformados de la siguiente manera:

RATON	LOTE DE ACEITE DE MAIZ	LOTE DE ACEITE CRUDO DE ALMENDRA DE CALABAZA	LOTE DE ACEITE REFINADO DE ALMENDRA DE CALABAZA
1	17.0	18.0	18.0
2	19.6	19.5	19.0
3	19.7	20.0	16.0
4	20.4	20.0	20.0
Promedio	$19.2 \pm 1.5$	$19.4 \pm 0.9$	$18.3 \pm 1.7$

En este estudio, como ya se mencionó, el pellet normal fue molido y a esa harina de pellet, se le adicionó el aceite. Dependiendo del lote, se incorporó aceite de maíz (control), aceite crudo y aceite refinado de almendra de calabaza, en donde, de acuerdo a la dosis de 15 g aceite/ Kg pc-día, por cada gramo de pellet se adicionaron 98.0 mg de aceite.

En las tablas 11, 12 y 13 se muestran los valores del consumo de pellets para los diferentes tipos de aceites : aceite de maíz, aceite crudo y aceite refinado de almendra de calabaza respectivamente. En donde cada tabla muestra los valores individuales de lo que consumió cada animal por semana y su valor promedio.

En la tabla No. 14 se engloban los valores tanto del consumo de alimento promedio como del consumo acumulativo de cada lote de animales, para ser mejor observados en la figura No. 5 donde cada línea corresponde a un lote específico y cada punto corresponde al valor acumulativo de los 4 animales que conformaban cada lote.

**TABLA No. 11**

**ALIMENTO INGERIDO PARA EL LOTE DE ACEITE DE MAIZ**

RATON	ALIMENTO CONSUMIDO (g)			
	1a. semana	2a. semana	3a. semana	4a. semana
AM <sub>1</sub>	47.0	37.1	33.4	37.5
AM <sub>2</sub>	43.7	34.9	34.3	35.3
AM <sub>3</sub>	39.9	32.0	31.2	35.7
AM <sub>4</sub>	48.7	33.0	33.5	38.6
Promedio	44.82	34.25	33.1	36.77
$\sigma$	3.88	2.25	1.33	1.55



**TABLA No. 12**

ALIMENTO INGERIDO PARA EL LOTE DE ACEITE CRUDO DE ALMENDRA DE CALABAZA

RATON	ALIMENTO CONSUMIDO (g)			
	1a. semana	2a. semana	3a. semana	4a. semana
AC <sub>1</sub>	39.0	27.9	26.6	28.7
AC <sub>2</sub>	31.2	36.1	36.0	41.9
AC <sub>3</sub>	32.7	35.7	31.4	33.3
AC <sub>4</sub>	32.0	37.4	29.2	43.3
Promedio	33.72	34.27	30.8	36.8
$\sigma$	3.57	4.31	3.98	6.98

**TABLA No. 13**

ALIMENTO INGERIDO PARA EL LOTE DE ACEITE REFINADO DE ALMENDRA DE CALABAZA

RATON	ALIMENTO CONSUMIDO (g)			
	1a. semana	2a. semana	3a. semana	4a. semana
AR <sub>1</sub>	43.0	32.8	29.6	32.4
AR <sub>2</sub>	40.7	36.3	34.9	42.2
AR <sub>3</sub>	41.1	30.8	29.0	39.6
AR <sub>4</sub>	47.2	39.5	32.6	40.2
Promedio	43.0	34.85	31.52	38.6
$\sigma$	2.97	3.84	2.75	4.28

TABLA No. 14

CONSUMO DE ALIMENTO OBSERVADO PARA LOS TRES LOTES DE LOS DIFERENTES ACEITES

TIPO DE ACEITE	PRIMERA SEMANA		SEGUNDA SEMANA		TERCERA SEMANA		CUARTA SEMANA	
	Consumo parcial (g)	Consumo acumulativo (g)	Consumo parcial (g)	Consumo acumulativo (g)	Consumo parcial (g)	Consumo acumulativo (g)	Consumo parcial (g)	Consumo acumulativo (g)
Aceite de maiz	44.82±3.88 *	44.82	34.25±2.25 *	79.07	33.10±1.33 *	112.17	36.77±1.55 *	148.95
Aceite crudo	33.72±3.57 **	33.72	34.27±4.31 **	68.00	30.80±3.98 **	98.80	36.80±6.98 *	135.60
Aceite refinado	43.00±2.97 *	43.00	34.85±3.84 *	77.85	31.52±2.75 *	109.37	38.60±4.28 *	147.97

\* Indica que no existe diferencia significativa entre esos lotes.

\*\* Indica la existencia de diferencia significativa de ese lote, con respecto al grupo control.

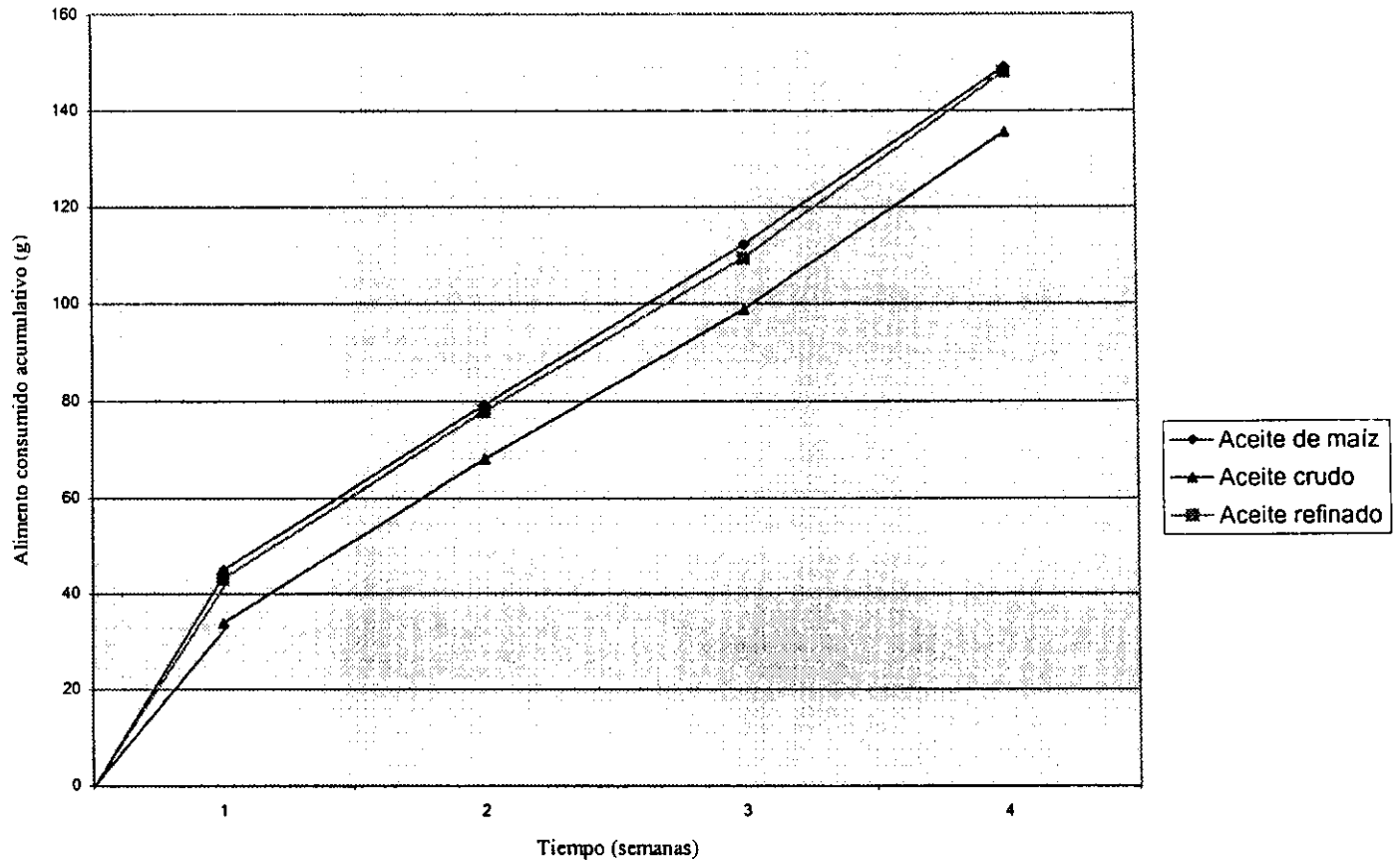


FIGURA No. 5 GRAFICA DEL CONSUMO DE ALIMENTO ACUMULATIVO PARA LOS TRES LOTES DE LOS DIFERENTES ACEITES A UNA DOSIS DE 15 g/Kgpc.

Analizando la figura No. 5, se percibe que los ratones a los que se les proporcionó aceite crudo en los pellets comieron en menor cantidad (135.6 g) que los de los otros dos lotes de aceites (147.97 g para el aceite refinado y 148.95 g para el aceite de maíz) y que el lote que consumió más alimento fue al que se le proporcionaron pellets con aceite de maíz. Sin embargo en la tabla No. 14, se observa que en la 1a. semana, los que comieron más fueron los ratones a los que se les proporcionó aceite de maíz en los pellets, después los del aceite refinado y finalmente los del aceite crudo. Pero en la 2a. semana los animales del aceite control y aceite refinado bajaron considerablemente su alimentación, en la 3a. semana todos los lotes disminuyeron la cantidad de alimento consumido y finalmente en la 4a. semana todos aumentaron la cantidad de alimento consumido (quedando 1o. el aceite refinado, 2o. el aceite crudo y 3o. el aceite control). Esto nos indica que en un principio todos comieron bien, pero que probablemente el alimento que se les proporcionaba no era de su agrado y por eso disminuyeron su consumo.

Esto fue analizado con pruebas de análisis de varianza y de rango múltiple, en donde el aceite crudo muestra a la 1a., 2a. y 3a. semanas diferencia significativa comparada con la de los otros dos lotes, y en la 4a. semana esta diferencia significativa ya no se da, lo que nos indica que los tres lotes consumían aproximadamente la misma cantidad de alimento, por lo que se puede pensar que se adaptaron (acostumbraron) a ese tipo de alimentación. Para el caso del volumen ingerido de agua, también se hicieron tres tablas (Nos. 15, 16 y 17) en donde se muestra la cantidad de agua ingerida por cada animal (por semana), así como el valor promedio de cada lote. Y en la tabla No. 18 se observan los valores tanto de la ingesta promedio como de la ingesta acumulativa por lote, para ser mejor observados en la figura No. 6, donde cada línea corresponde a un lote específico y cada punto corresponde al valor acumulativo de los 4 animales que conformaban el lote.

**TABLA No. 15**

**INGESTA DE AGUA PARA EL LOTE DE ACEITE DE MAIZ**

RATON	INGESTA DE AGUA (mL)			
	1a. semana	2a. semana	3a. semana	4a. semana
AM <sub>1</sub>	66	64	58	62
AM <sub>2</sub>	56	64	53	58
AM <sub>3</sub>	58	60	52	50
AM <sub>4</sub>	54	50	52	51
Promedio	58.5	59.5	53.7	55.2
$\sigma$	5.26	6.61	2.87	5.74

**TABLA No. 16**

**INGESTA DE AGUA PARA EL LOTE DE ACEITE CRUDO DE ALMENDRA DE  
CALABAZA**

RATON	INGESTA DE AGUA (mL)			
	1a. semana	2a. semana	3a. semana	4a. semana
AC <sub>1</sub>	60	65	60	74
AC <sub>2</sub>	72	64	64	74
AC <sub>3</sub>	58	55	52	58
AC <sub>4</sub>	52	54	59	50
Promedio	60.5	59.5	58.7	64.0
$\sigma$	8.39	5.80	4.99	12.0

**TABLA No. 17**

INGESTA DE AGUA PARA EL LOTE DE ACEITE REFINADO DE ALMENDRA DE  
CALABAZA

RATON	INGESTA DE AGUA (mL)			
	1a. semana	2a. semana	3a. semana	4a. semana
AR <sub>1</sub>	64	56	54	63
AR <sub>2</sub>	76	60	60	62
AR <sub>3</sub>	54	66	58	60
AR <sub>4</sub>	66	66	58	52
Promedio	65.0	62.0	57.5	59.2
$\sigma$	9.02	4.90	2.52	4.99

**TABLA No. 18**

**INGESTA DE AGUA OBSERVADA PARA LOS TRES LOTES DE LOS DIFERENTES ACEITES**

TIPO DE ACEITE	PRIMERA SEMANA		SEGUNDA SEMANA		TERCERA SEMANA		CUARTA SEMANA	
	Ingesta parcial (mL)	Ingesta acumulativa (mL)	Ingesta parcial (mL)	Ingesta acumulativa (mL)	Ingesta parcial (mL)	Ingesta acumulativa (mL)	Ingesta parcial (mL)	Ingesta acumulativa (mL)
Aceite de maíz	58.5 ± 5.26 *	58.5	59.5 ± 6.61 *	118.0	53.7 ± 2.87 *	171.7	55.2 ± 5.74 *	226.9
Aceite crudo	60.5 ± 8.39 *	60.5	59.5 ± 5.80 *	120.0	58.7 ± 4.99 *	178.7	64.0 ± 12.0 *	242.7
Aceite refinado	65.3 ± 9.02 *	65.3	62.0 ± 4.90 *	127.3	57.5 ± 2.52 *	184.8	59.2 ± 4.99 *	244.1

\* Indica que no existe diferencia significativa entre esos lotes.

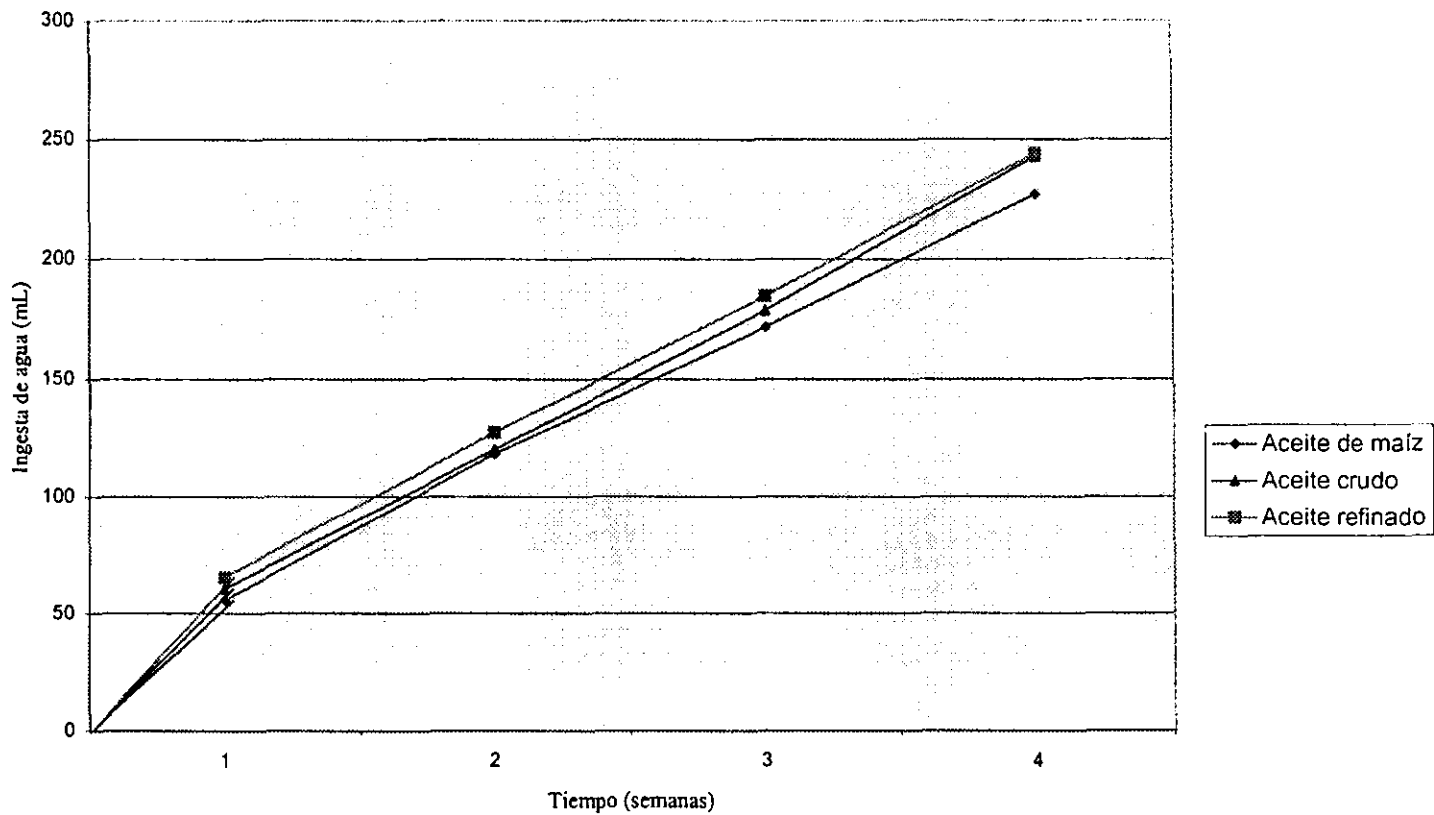


FIGURA No. 6 GRAFICA DE LA INGESTA DE AGUA ACUMULATIVA PARA LOS TRES LOTES DE LOS DIFERENTES ACEITES.



En las tablas Nos. 15, 16 y 17, también se observa que, al igual que en el alimento consumido, todos los animales disminuyen su volumen de agua ingerido hasta la tercera semana y en la 4a. semana todos éstos volúmenes aumentan, estos resultados se manifiestan mejor en la figura No. 6. Sin embargo, al realizar la prueba de análisis de varianza y de rango múltiple ninguno de los lotes para el aceite crudo ni refinado, en ninguna semana mostró diferencia significativa con respecto al grupo control, por lo que se puede decir que los tres lotes siguieron un patrón semejante en sus valores de ingesta de agua.

En cuanto a los resultados del incremento en peso, éstos son mostrados en la tabla No. 19 y en la figura No. 7, en donde se observa que el lote de aceite crudo de almendra de calabaza siempre tuvo un incremento en peso menor que los otros dos lotes, esto puede ser explicado con los resultados del consumo de alimento en donde también se observa que dicho lote consumió una menor cantidad de alimento, de ahí que resulte un menor incremento en peso. También se observa que el lote de aceite refinado de almendra de calabaza consumió una mayor cantidad de alimento, por lo que es reflejado en su mayor incremento en peso.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

**TABLA No. 19**

**INCREMENTO EN PESO PARA LOS DIFERENTES LOTES**

DIAS	ACEITE DE MAIZ		ACEITE CRUDO		ACEITE REFINADO	
	Promedio (g)	$\sigma$	Promedio (g)	$\sigma$	Promedio (g)	$\sigma$
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	2.75	0.73	2.65	0.41	2.12	1.42
5	3.35	0.87	3.32	0.33	3.42	0.56
7	4.50	0.98	3.75	1.21	4.40	0.40
9	5.07	1.09	4.12	1.22	5.07	0.31
12	6.30	0.99	5.47	1.58	6.55	0.34
14	6.57	0.92	5.65	1.43	7.25	0.13
16	6.97	0.78	6.20	1.83	7.92	0.36
19	7.75	0.97	6.67	2.23	7.62	0.51
21	7.07	0.85	6.22	2.49	7.50	0.53
23	8.25	0.85	7.35	2.35	8.32	0.45
26	8.65	0.75	7.95	2.60	9.50	0.73
28	8.72	0.68	8.20	3.05	10.10	1.41

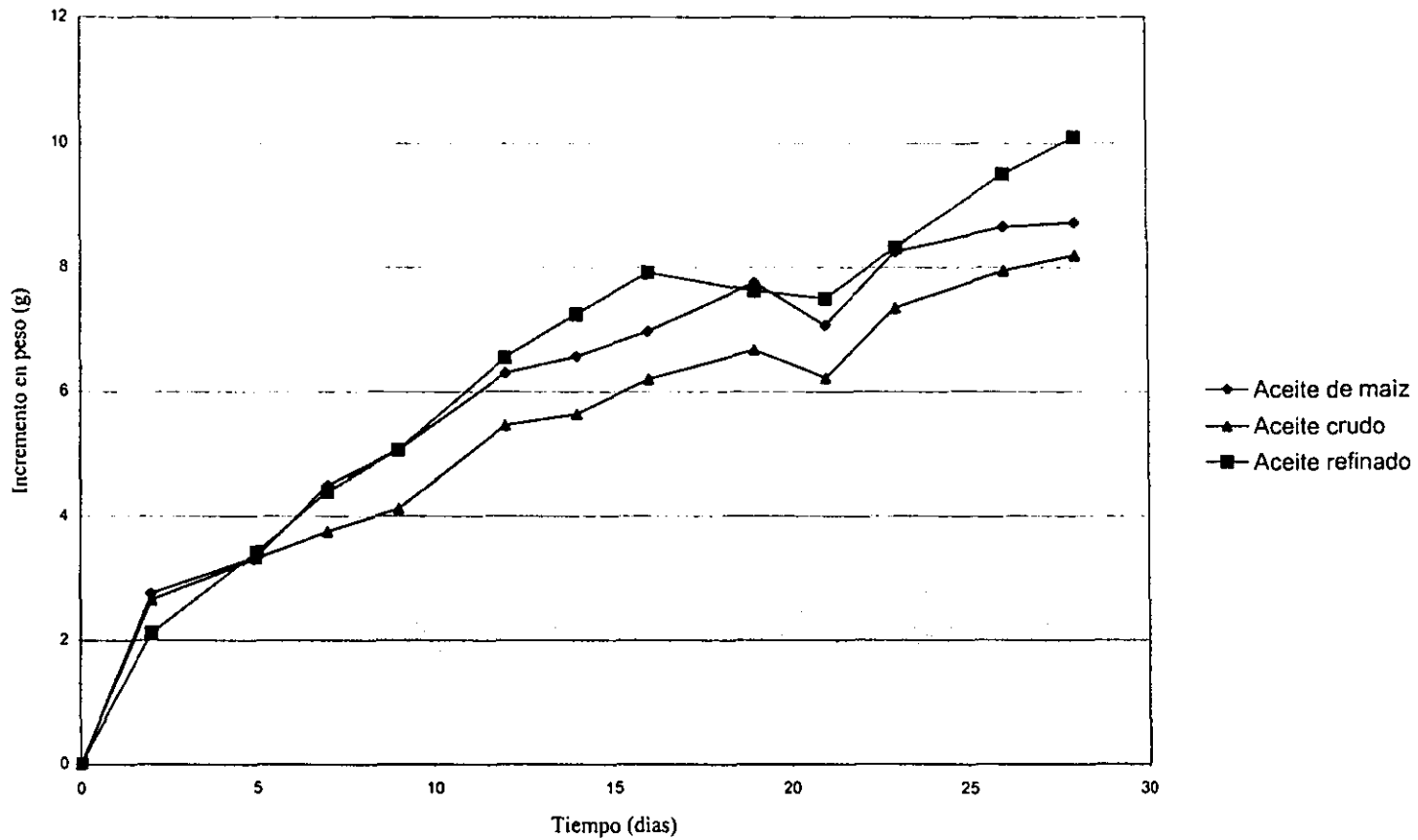


FIGURA No. 7 INCREMENTO EN PESO PARA LOS TRES LOTES DE LOS DIFERENTES ACEITES

En la tabla No. 20 se encuentra el peso porcentual del hígado para los tres lotes de ratones, en donde se observa que el aceite de maíz y el aceite crudo tienen prácticamente el mismo valor promedio (5.51 y 5.54 % respectivamente), para el caso del aceite refinado es un poco inferior al de los otros dos (5.29 %); pero aún así, no existe diferencia significativa. Lo cual nos indica que no existe ningún daño severo en los aceites que pueda afectar a los animales, de lo contrario esto también afectaría sus órganos, como en el caso del hígado, encontrándose una disminución considerable de su valor porcentual como reflejo de algún efecto dañino de lo que consumieron.

En lo que se refiere a los resultados de las biometrías hemáticas, éstos son mostrados de la siguiente manera: en las tablas 21, 23 Y 25 los resultados de la fórmula roja [Glóbulos rojos (GR), Hemoglobina (Hb), Hematocrito (Hto), Volumen corpuscular medio (VCM), Concentración media de hemoglobina (HCM) y Concentración corpuscular media de hemoglobina (CHCM)] en donde por cada lote de animales que consumió un aceite específico se realizó una tabla; la fórmula blanca [Glóbulos blancos (GB), Neutrófilos (Neutr), Linfocitos (Linfo), Monocitos (Mono), Eosinófilos (Eos) y Basófilos (Baso)] se da en las tablas 22, 24 Y 26, igualmente una tabla para cada lote de animales designado para un aceite específico y la fórmula trombocítica en la tabla No. 27 (en donde son mostrados todos los valores del contenido de plaquetas para los diferentes lotes de aceites). Todo esto con la finalidad de poder manejar los datos de una forma más sencilla.

**TABLA No. 20**

**PESO PORCENTUAL DEL HIGADO AL FINAL DEL ESTUDIO**

LOTE	No. DE RATON	PESO DEL RATON (g)	PESO DEL HIGADO (g)	PESO PORCENTUAL DEL HIGADO (g)
Aceite de Maiz	AM <sub>1</sub>	26.2	1.4	5.34
	AM <sub>2</sub>	29.0	1.5	5.17
	AM <sub>3</sub>	28.1	1.6	5.69
	AM <sub>4</sub>	29.1	1.7	5.84
Promedio		28.1	1.55	5.51 ± 0.31
Aceite crudo	AC <sub>1</sub>	23.1	1.4	6.06
	AC <sub>2</sub>	32.2	1.8	5.59
	AC <sub>3</sub>	25.9	1.4	5.41
	AC <sub>4</sub>	29.3	1.5	5.12
Promedio		27.62	1.50	5.54 ± 0.39
Aceite refinado	AR <sub>1</sub>	29.1	1.8	6.19
	AR <sub>2</sub>	28.5	1.4	4.91
	AR <sub>3</sub>	27.4	1.5	5.47
	AR <sub>4</sub>	28.4	1.3	4.58
Promedio		28.35	1.50	5.29 ± 0.70

**TABLA No. 21**

**FORMULA ROJA DE LAS BIOMETRIAS HEMATICAS PARA EL LOTE DE ACEITE  
DE MAIZ**

No. RATON	GR (x10 <sup>6</sup> /μL)	Hb (g/dL)	Hto (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)
<b>ETAPA INICIAL*</b>						
AM <sub>3</sub>	9.66	16.3	58.6	60.7	16.9	27.8
AM <sub>4</sub>	9.14	15.8	55.9	61.2	17.3	28.3
<b>ETAPA INTERMEDIA</b>						
AM <sub>1</sub>	10.44	17.7	66.9	64.1	17.0	26.5
AM <sub>2</sub>	9.99	16.9	63.2	63.3	16.9	26.7
AM <sub>3</sub>	9.80	16.6	61.6	62.9	16.9	26.9
AM <sub>4</sub>	9.58	17.0	63.1	65.9	17.7	26.9
<b>ETAPA FINAL</b>						
AM <sub>1</sub>	10.97	18.9	72.5	66.1	17.2	26.1
AM <sub>2</sub>	10.46	17.8	68.1	65.1	17.0	26.1
AM <sub>3</sub>	10.51	17.7	67.7	64.4	16.8	26.1
AM <sub>4</sub>	10.37	18.2	68.9	66.4	17.6	26.4

\* Al inicio del experimento, sólo fueron elegidos a los dos ratones de mayor peso, tomando como consideración que los demás animales tendrían valores semejantes en los parámetros de las BH.

**TABLA No. 22**

**FORMULA BLANCA DE LAS BIOMETRIAS HEMATICAS PARA EL LOTE DE  
ACEITE DE MAIZ**

No. RATON	GB ( $\times 10^3 \mu\text{L}$ )	Neutr (%)	Linfo (%)	Mono (%)	Eos (%)	Baso (%)
<b>ETAPA INICIAL*</b>						
AM <sub>3</sub>	2.92	2.4	92.1	2.1	2.4	1.0
AM <sub>4</sub>	2.02	1.5	88.1	6.9	2.5	1.0
<b>ETAPA INTERMEDIA</b>						
AM <sub>1</sub>	4.01	3.5	86.5	8.8	1.0	0.2
AM <sub>2</sub>	5.47	1.5	90.1	7.7	0.7	0.0
AM <sub>3</sub>	6.88	1.6	91.1	6.9	0.3	0.1
AM <sub>4</sub>	3.51	1.4	89.5	7.7	1.1	0.3
<b>ETAPA FINAL</b>						
AM <sub>1</sub>	4.05	3.2	83.5	11.9	1.2	0.2
AM <sub>2</sub>	6.24	1.5	91.8	5.5	1.0	0.2
AM <sub>3</sub>	5.76	1.4	89.4	8.3	0.9	0.0
AM <sub>4</sub>	6.35	3.5	88.3	6.8	1.1	0.3

\* Al inicio del experimento, sólo fueron elegidos a los dos ratones de mayor peso, tomando como consideración que los demás animales tendrían valores semejantes en los parámetros de las BH.

**TABLA No. 23**

FORMULA ROJA DE LAS BIOMETRIAS HEMATICAS PARA EL LOTE DE ACEITE

CRUDO DE ALMENDRA DE CALABAZA

No. RATON	GR ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	Hb (g/dL)	Hto (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)
<b>ETAPA INICIAL*</b>						
AC <sub>3</sub>	9.08	15.3	54.2	59.7	16.9	28.2
AC <sub>4</sub>	8.63	14.9	53.4	61.9	17.3	27.9
<b>ETAPA INTERMEDIA</b>						
AC <sub>1</sub>	10.02	16.5	62.3	62.2	16.5	26.5
AC <sub>2</sub>	9.91	16.2	59.9	60.4	16.3	27.0
AC <sub>3</sub>	9.68	17.0	62.1	64.2	17.6	27.4
AC <sub>4</sub>	9.23	16.4	60.9	66.0	17.8	26.9
<b>ETAPA FINAL</b>						
AC <sub>1</sub>	10.26	16.8	66.1	64.4	16.4	25.4
AC <sub>2</sub>	9.73	16.2	61.7	63.4	16.6	26.3
AC <sub>3</sub>	10.18	17.6	67.1	65.9	17.3	26.2
AC <sub>4</sub>	9.98	17.4	65.1	65.2	17.4	26.7

\* Al inicio del experimento, sólo fueron elegidos a los dos ratones de mayor peso, tomando como consideración que los demás animales tendrían valores semejantes en los parámetros de las BH.



**TABLA No. 24**

**FORMULA BLANCA DE LAS BIOMETRIAS HEMATICAS PARA EL LOTE DE  
ACEITE CRUDO DE ALMENDRA DE CALABAZA**

No. RATON	GB (x10 <sup>3</sup> /μL)	Neutr (%)	Linfo (%)	Mono (%)	Eos (%)	Baso (%)
<b>ETAPA INICIAL*</b>						
AC <sub>3</sub>	3.58	3.3	88.0	6.7	1.7	0.3
AC <sub>4</sub>	2.77	3.2	85.6	8.6	2.2	0.4
<b>ETAPA INTERMEDIA</b>						
AC <sub>1</sub>	10.02	1.2	90.5	7.1	1.2	0.0
AC <sub>2</sub>	9.91	1.9	88.6	8.0	1.4	0.1
AC <sub>3</sub>	9.68	2.2	88.3	8.6	0.9	0.0
AC <sub>4</sub>	9.23	4.2	82.1	9.9	3.8	0.0
<b>ETAPA FINAL</b>						
AC <sub>1</sub>	7.23	1.6	92.9	4.6	0.8	0.1
AC <sub>2</sub>	8.25	2.5	88.0	8.7	0.7	0.1
AC <sub>3</sub>	5.21	1.5	90.8	6.9	0.8	0.0
AC <sub>4</sub>	9.10	**	**	**	0.8	0.0

\* Al inicio del experimento, sólo fueron elegidos a los dos ratones de mayor peso, tomando como consideración que los demás animales tendrían valores semejantes en los parámetros de las BH.

\*\* Señala que esos valores no los dio el equipo de medición, posiblemente debido a una falta en la cantidad de muestra.

**TABLA No. 25**

**FORMULA ROJA DE LAS BIOMETRIAS HEMATICAS PARA EL LOTE DE ACEITE  
REFINADO DE ALMENDRA DE CALABAZA**

No. RATON	GR (x10 <sup>6</sup> /μL)	Hb (g/dL)	Hto (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)
<b>ETAPA INICIAL*</b>						
AR <sub>2</sub>	9.49	15.5	56.2	59.2	16.3	27.6
AR <sub>4</sub>	9.35	15.3	53.4	57.1	16.4	28.7
<b>ETAPA INTERMEDIA</b>						
AR <sub>1</sub>	9.79	16.5	60.4	61.7	16.9	27.3
AR <sub>2</sub>	9.67	16.5	59.2	61.2	17.1	27.9
AR <sub>3</sub>	10.29	17.2	64.4	62.6	16.7	26.7
AR <sub>4</sub>	9.32	16.7	58.1	62.3	17.9	28.7
<b>ETAPA FINAL</b>						
AR <sub>1</sub>	10.08	17.5	65.3	64.8	17.4	26.8
AR <sub>2</sub>	11.01	18.3	68.5	62.2	16.6	26.7
AR <sub>3</sub>	10.48	18.0	66.9	63.8	17.2	26.9
AR <sub>4</sub>	***	***	***	***	***	***

\* Al inicio del experimento, sólo fueron elegidos a los dos ratones de mayor peso, tomando como consideración que los demás animales tendrían valores semejantes en los parámetros de las BH.

\*\*\* Señala que la medición de esos parámetros no pudo ser realizada debido a que la muestra tenía gran cantidad de pequeños coágulos, lo que originaría que los resultados obtenidos no fueran confiables.

**TABLA No. 26**

**FORMULA BLANCA DE LAS BIOMETRIAS HEMATICAS PARA EL LOTE DE  
ACEITE REFINADO DE ALMENDRA DE CALABAZA**

No. RATON	GB (x10 <sup>3</sup> $\mu$ L.)	Neutr (%)	Linfo (%)	Mono (%)	Eos (%)	Baso (%)
<b>ETAPA INICIAL*</b>						
AR <sub>2</sub>	2.25	1.8	84.4	10.7	2.7	0.4
AR <sub>4</sub>	5.95	5.8	84.2	6.1	3.2	0.7
<b>ETAPA INTERMEDIA</b>						
AR <sub>1</sub>	8.13	1.8	**	0.2	1.1	0.1
AR <sub>2</sub>	10.06	**	**	**	0.8	0.1
AR <sub>3</sub>	7.68	1.9	95.2	1.4	1.0	0.5
AR <sub>4</sub>	8.48	0.4	95.2	1.7	1.8	0.9
<b>ETAPA FINAL</b>						
AR <sub>1</sub>	7.06	3.7	86.1	9.4	0.7	0.1
AR <sub>2</sub>	7.39	3.0	88.5	7.5	0.9	0.1
AR <sub>3</sub>	9.22	1.0	91.6	6.6	0.5	0.3
AR <sub>4</sub>	***	***	***	***	***	***

\* Al inicio del experimento, sólo fueron elegidos a los dos ratones de mayor peso, tomando como consideración que los demás animales tendrían valores semejantes en los parámetros de las BH.

\*\* Indica que ese dato no fue dado por el equipo de medición, posiblemente debido a la falta de cantidad de muestra.

\*\*\* Señala que la medición de ese parámetro no pudo ser realizada debido a que la muestra tenía pequeños coágulos, lo que posiblemente originaría que los resultados obtenidos no fueran confiables.

**TABLA No. 27**

**FORMULA TROMBOCITICA DE LAS BIOMETRIAS HEMATICAS PARA LOS TRES  
DIFERENTES ACEITES**

ACEITE DE MAIZ		ACEITE CRUDO DE ALMENDRA DE CALABAZA		ACEITE REFINADO DE ALMENDRA DE CALABAZA	
No. ratón	Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	No. ratón	Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	No. ratón	Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )
<b>ETAPA INICIAL*</b>					
AM <sub>3</sub>	618	AC <sub>3</sub>	374	AR <sub>2</sub>	560
AM <sub>4</sub>	542	AC <sub>4</sub>	611	AR <sub>4</sub>	429
<b>ETAPA INTERMEDIA</b>					
AM <sub>1</sub>	503	AC <sub>1</sub>	389	AR <sub>1</sub>	831
AM <sub>2</sub>	448	AC <sub>2</sub>	509	AR <sub>2</sub>	663
AM <sub>3</sub>	547	AC <sub>3</sub>	452	AR <sub>3</sub>	652
AM <sub>4</sub>	454	AC <sub>4</sub>	777	AR <sub>4</sub>	277
<b>ETAPA FINAL</b>					
AM <sub>1</sub>	551	AC <sub>1</sub>	495	AR <sub>1</sub>	441
AM <sub>2</sub>	439	AC <sub>2</sub>	472	AR <sub>2</sub>	467
AM <sub>3</sub>	566	AC <sub>3</sub>	396	AR <sub>3</sub>	459
AM <sub>4</sub>	485	AC <sub>4</sub>	495	AR <sub>4</sub>	***

\* Al inicio del experimento, sólo fueron elegidos a los dos ratones de mayor peso, tomando como consideración que los demás animales tendrían valores semejantes en los parámetros de las BH.

\*\*\* Señala que la medición de ese parámetro no pudo ser realizada debido a que la muestra tenía gran cantidad de pequeños coágulos, lo que posiblemente originaría, que los resultados obtenidos no fueran confiables.

También los datos resultantes de las biometrías hemáticas fueron sometidos a prueba de análisis de varianza y prueba de rango múltiple. Siendo, los parámetros en los cuales se encuentra diferencia significativa (a un nivel de confianza del 95%), los siguientes:

**TABLA No. 28**

**PARAMETROS QUE PRESENTAN DIFERENCIA SIGNIFICATIVA CON RESPECTO AL GRUPO CONTROL**

ETAPA	PARAMETRO	OBSERVACION (diferencia con respecto al grupo control)
Intermedia	Globulos blancos	En el aceite refinado ↑
	Linfocitos	En el aceite refinado ↑
	Monocitos	En el aceite refinado ↓
Final	Hemoglobina	En el aceite crudo ↓
	Hematocrito	En el aceite crudo ↓
	Concentración de hemoglobina corpuscular media	En el aceite refinado ↑
	Eosinofilos	Tanto en el aceite crudo como en el refinado ↓

↑ Indica que el lote mencionado, tuvo un aumento en el valor del parámetro correspondiente.

↓ Indica que el lote mencionado, tuvo una disminución en el valor del parámetro correspondiente.

En este trabajo solo serán analizados aquellos parámetros que son significativamente diferentes entre sí a los 28 días.

Por medio de todas las observaciones anteriores, podríamos argumentar que, para una dosis relativamente alta (15 g/Kg pc), los ratones que consumieron pellets con aceite crudo de almendra de calabaza presentan, desde el punto de vista hematológico, dos parámetros afectados (Hb y Hto) no es posible establecer si éstos parámetros sólo se encuentran en la zona del rango inferior para los valores normales de los mismos (debido a que en la bibliografía consultada no se encontraron los rangos normales para la cepa NIH en las condiciones de la Ciudad de México) o si, posiblemente, podría tratarse de una anemia (si existiese tal, tampoco es posible establecer el grado, por la misma razón).

Sin embargo no se observa una notable declinación en el peso corporal de los animales bajo experimentación y tampoco se encuentra diferencia significativa, ni en el incremento en peso ni en cuanto al alimento ingerido al final del estudio (4a. semana), lo cual motiva a una investigación más amplia al respecto.

El valor de la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), es considerado como un parámetro que refleja el estado general de los individuos. El incremento de la concentración de hemoglobina corpuscular media, refleja un incremento en la concentración de hemoglobina por glóbulo rojo, lo que nos indica una mejor síntesis de ésta proteína en los animales y con ello un mejor estado fisiológico del grupo de animales alimentado con los pellets que contenían aceite refinado de almendra de calabaza.

También podemos observar que el valor de Eosinófilos, al ser comparado con el lote de aceite de maíz, disminuye tanto para el lote del aceite crudo como para el lote de aceite refinado. Tomando en cuenta que los eosinofilos se incrementan en padecimientos con existencia de alergias, la disminución de los mismos es una evidencia de la poca alergenicidad que presentan los animales ante el consumo de los aceites de almendra de calabaza.

Todos los demás parámetros entran en el margen de aceptación que se da por el grupo control. Es oportuno mencionar que para llevar a cabo las pruebas de análisis de varianza y de rango múltiple se tomó como referencia únicamente al grupo control (o de aceite de maíz) ya que como se menciona en la parte de generalidades, éstos parámetros suelen ser afectados por factores como : edad, sexo, clima, altura de la ciudad en la que se trabaja, etc.. por lo que se decidió tomar como referencia los datos obtenidos por el grupo control y no los valores bibliográficos.

## 6. CONCLUSIONES

- ◆ Las características fisicoquímicas de los aceites crudo y refinado de la almendra de calabaza son muy semejantes entre sí y guardan también semejanza con las características fisicoquímicas de uno de los aceites vegetales más comúnmente consumidos (aceite de maíz).
- ◆ Al llevar a cabo los pasos básicos iniciales del proceso de refinamiento (desgomado, neutralización y blanqueo) sobre el aceite crudo de la almendra de calabaza, no se altera de manera significativa el contenido ni la proporción de los ácidos grasos presentes en el aceite.
- ◆ Tanto el aceite crudo como el refinado del aceite de calabaza son una fuente rica en ácido linoleico y oleico, de los cuales el primero es considerado como un ácido graso indispensable.
- ◆ El aceite crudo de semilla de calabaza, durante el estudio de toxicidad aguda, no mostró ningún efecto dañino, sobre los animales en estudio, que no fuese observado para el aceite control (aceite de maíz) por lo que el aceite crudo de semilla de calabaza resulta "prácticamente no tóxico".



- ◆ El aceite crudo de semilla de calabaza, durante el estudio de toxicidad subaguda, produjo disminución de dos parámetros hemáticos: hemoglobina y hematocrito, pudiendo tratarse de una anemia, probablemente ligera ya que no se presenta una notable disminución en el peso de los animales, en el consumo de alimento ni en el peso porcentual del hígado. Vale la pena investigar con mayor profundidad este punto.
  
- ◆ El proceso de refinamiento, resulta benéfico desde el punto de vista organoléptico del aceite (conservación, apariencia, etc.) y también desde el punto de vista fisiológico, en donde ya no se presentan problemas a nivel sanguíneo. Es también un punto que motiva a una investigación más amplia al respecto.
  
- ◆ Para contar con resultados confiables de la biometría hemática es de suma importancia que durante la realización de una sangría se cumpla con las indicaciones señaladas en la metodología respectiva.

## 7. APENDICES

### APENDICE 7.1

#### ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES POR GRASAS (DEFINICIONES).

- **ARTERIOESCLEROSIS.** Endurecimiento de las arterias por alteración de la estructura de sus paredes, con los consiguientes trastornos circulatorios. En la mayoría de los individuos no aumenta tanto que incapacite las arterias; en ciertos casos, en cambio, los depósitos de grasa en una arteria pueden reducir de tal forma su luz que haga extremadamente dificultoso el flujo sanguíneo a través de ella. Esta forma de arterioesclerosis, se denomina "aterosclerosis" y puede conducir a muy graves consecuencias: si es el flujo de sangre hacia el corazón el que es bloqueado, se producirá un ataque cardíaco; si esta comprometido el flujo de sangre al cerebro, se registrará un ataque de apoplejía (Lock, et al 1983).
- **AOPLEJIA** (también denominado ataque apopléctico). Lesión cerebral a consecuencia de la obturación de una arteria (embolia), o bien de la hemorragia debida a su rotura, en el cerebro suele provocar pérdida repentina del conocimiento y, como afecta a la parte del cerebro que controla los movimientos, parálisis cerebral más o menos total.

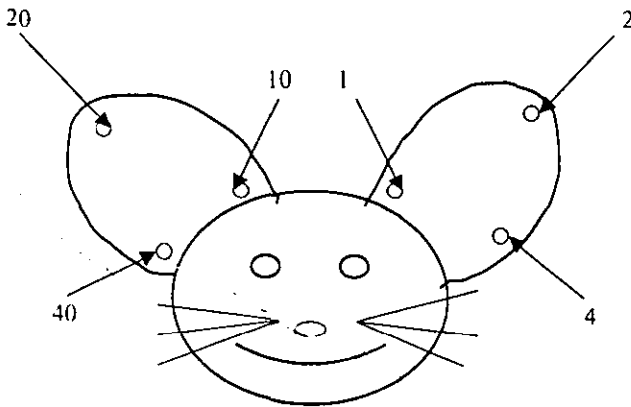
Las causas remotas más comunes del ataque apopléctico son la hipertensión (alta presión sanguínea), la arterioesclerosis (endurecimiento de las arterias) y lesiones de las válvulas cardíacas. Las causas inmediatas son la trombosis, la embolia y la hemorragia cerebral (Lock, et al 1983).

- **ATAQUE CARDIACO.** Denominación popular de la trombosis de las arterias coronarias, en la que uno de los dos vasos, que nutren al músculo cardíaco queda bloqueado por un trombo o émbolo (Lock, et al 1983).

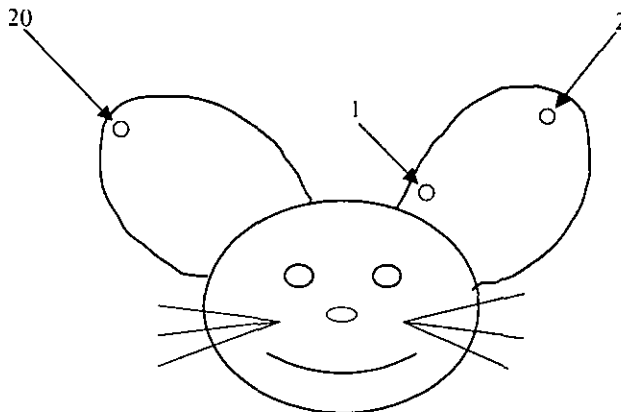
## APENDICE 7.2

### NUMERACION DE RATONES EN EL ESTUDIO DE TOXICIDAD AGUDA.

Para poder diferenciar a los ratones, se les hacen pequeñas perforaciones en las orejas, como indica el diagrama siguiente:



Así por ejemplo, el ratón identificado con el número 23 contará con las siguientes perforaciones:

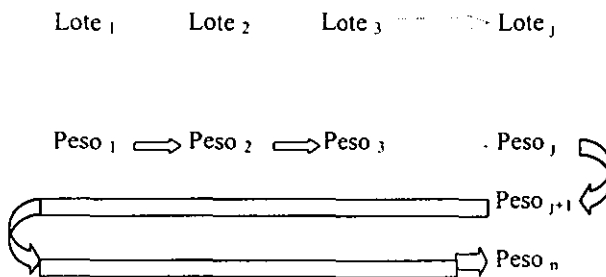


### APENDICE 7.3

#### METODO DE "CULEBRA JAPONESA" PARA LA DISTRIBUCION 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 en 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:

$$\text{Peso}_1 < \text{Peso}_2 < \text{Peso}_3 \dots \dots \dots < \text{Peso}_j < \text{Peso}_{j+1} \dots \dots \dots < \text{Peso}_n$$

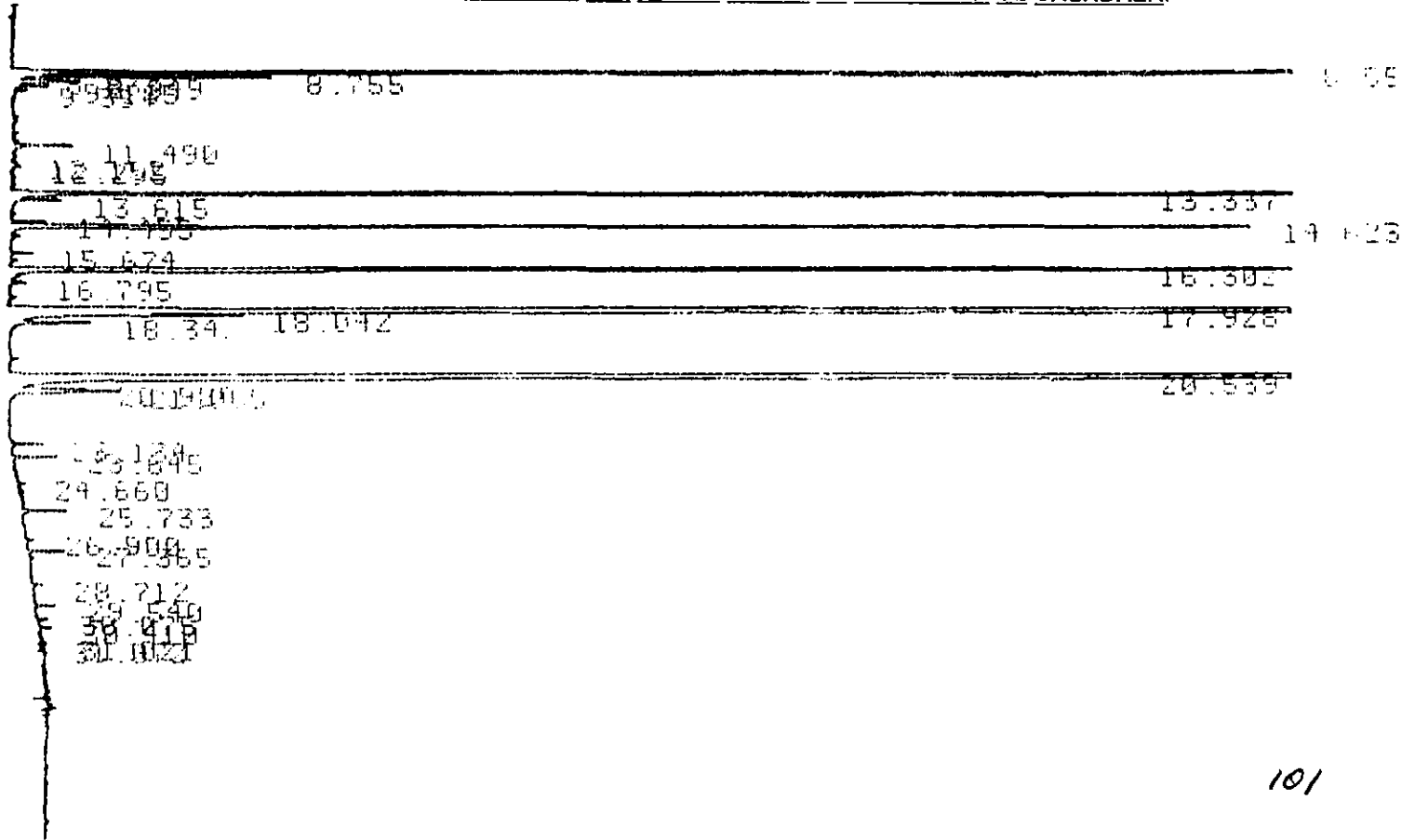
## APENDICE 7.4

### DEFINICIONES UTILIZADAS PARA EL ESTUDIO DE TOXICIDAD AGUDA.

- **AGRESIVIDAD.** Individuo cuyo patrón conductual se caracteriza por irritabilidad, accesos de ira y actitudes ó actos destructivos como manifestaciones dominantes de frustración (Gennaro, 1984).
- **ALETARGAMIENTO.** Estado de somnolencia enfermiza, profunda y prolongada, sin fiebre ni infección (García-Pelayo, 1982).
- **ATAXIA.** Incoordinación de la acción muscular voluntaria, en particular de los grupos musculares usados en actividades como caminar o alcanzar un objeto debido a alguna interferencia con las vías del sistema nervioso central o periférico implicadas en el equilibrio de los movimientos musculares (Gennaro, 1984).
- **CIANOSIS.** Coloración azul púrpura (morada) de las mucosas y de la piel debida a la presencia de cantidades excesivas de hemoglobina reducida en los capilares (Gennaro, 1984).
- **CIFOSIS.** Curvatura angular de la columna vertebral; la convexidad de la curva es posterior, suele estar en la región torácica y abarca algunas vértebras (Gennaro, 1984).
- **DISNEA.** Respiración difícil o acelerada (Gennaro, 1984).
- **ERECCION CAUDAL.** Estado turgente de la cola (Gennaro, 1984).
- **EXCITACIÓN.** En este estudio fue utilizada como sinónimo de hiperactividad.
- **HIPOTERMIA.** Temperatura subnormal del cuerpo. Reducción de la temperatura corporal a menos de lo normal (Gennaro, 19884).
- **LORDOSIS.** Curvatura hacia delante de la columna vertebral lumbar (Gennaro, 1984).
- **PILOERECCION.** Erección del pelo (Gennaro, 1984).

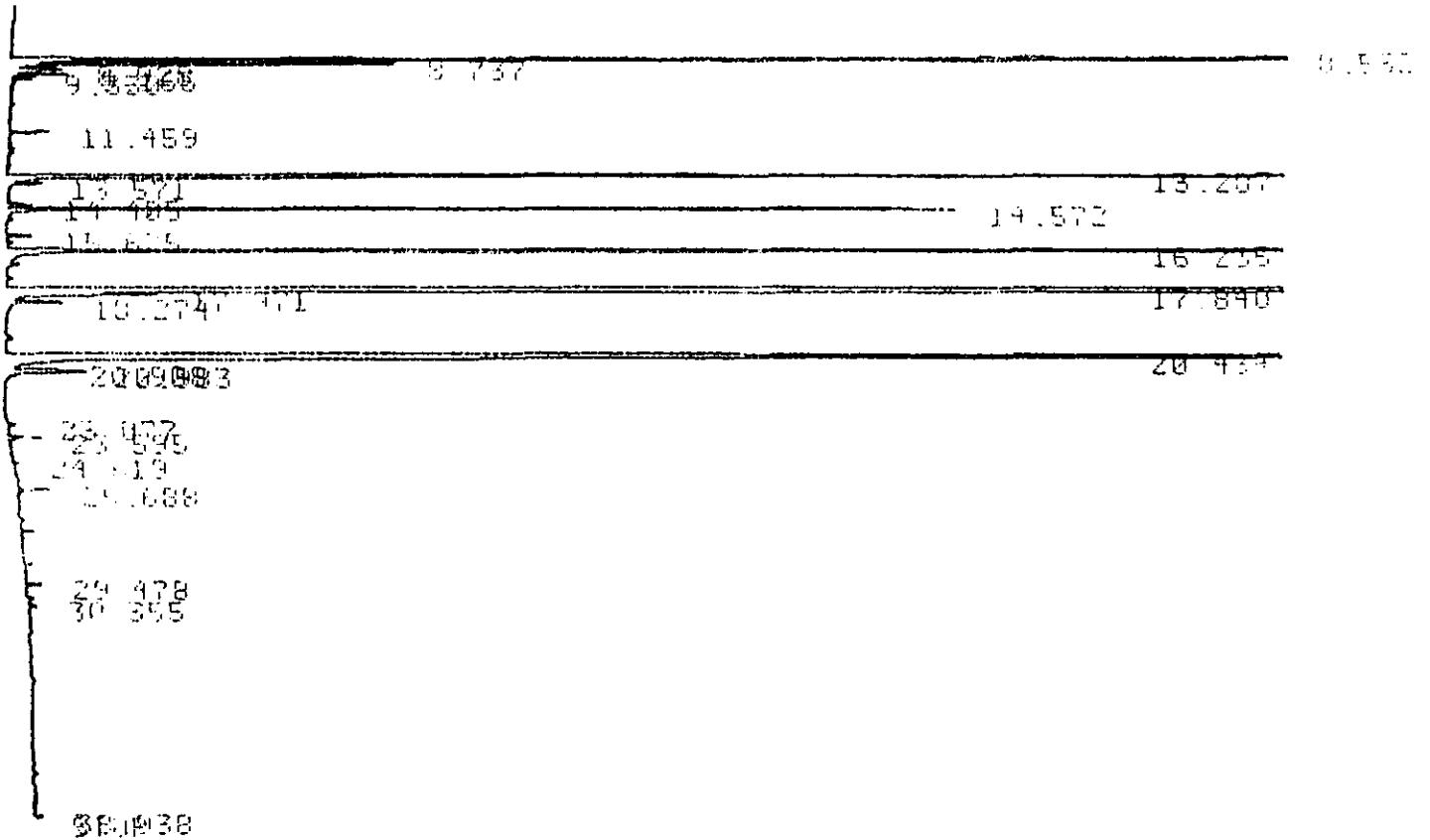
APENDICE 7.5

CROMATOGRAMA DEL ACEITE CRUDO DE ALMENDRA DE CALABAZA.



APENDICE 7.6

CROMATOGRAMA DEL ACEITE REFINADO DE ALMENDRA DE CALABAZA.



## 8. BIBLIOGRAFIA

- ◆ Al-Khalifa, A.S., Physicochemical characteristics, fatty acid composition and lyxoygenase activity of crude pumpkin and melon seed oil, *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 44, pp. 964-966, (1996).
- ◆ Becerra, R.J., El panorama de los aceites en el siglo XXI Asociación nacional de industrias de aceites y mantecas comestibles (ANIAME), Año XII, Vol. 5, No. 25 pág. 4-12, (1998).
- ◆ Bernardini, E., Tecnología de aceites y grasas, Alhambra, 1a. edición, pág. 140-151, 164, 234-236, 263-284, 317-324, 354-360, 363-368, Madrid, (1981).
- ◆ Braverman, V., Dichos y hechos sobre el colesterol, *Soyanoticias*, Año XXIII, No. 237, pág. 11-14, (1994).
- ◆ Chapman, N., Mitos acerca de la grasa en la dieta y la enfermedad coronaria, *Soyanoticias*, Año XXI, No. 235, pág. 9-13, (1993).
- ◆ De Soroa y Pineda, J.M., Diccionario de agricultura, Editorial Labor, 1a. reimpresión, pag. 167-168. 288, Madrid, (1968).
- ◆ De Soroa y Pineda J.M., Elayotecnia, Dossat S.A., 5a. edición, pág. 13-19, Madrid, (1967).
- ◆ Egan H.; Kirk, R.S.; Sawyer, R., Análisis químico de alimentos de Pearson; Compañía Editorial Continental S.A. de C.V.; pág. 519-537, México, (1991).
- ◆ Garcia-Pelayo y Gross, R., Diccionario enciclopédico Larousse, Larousse, 5a. edición, pag. 432, México, (1982).



- ◆ Gennaro, A.; Hart, A.; Nora, J.; Stander, R.; Weiss, L., Diccionario enciclopédico de las ciencias médicas, Mc Graw-Hill, 4a. edición, volúmenes 1-4, pág. 154, 269, 265, 419, 495, 518, 712, 833, 1076, México, (1984).
- ◆ Jenkins, G.L.; Dumez, A.G.; Christian, J. E.; Hager, G.P., Química farmacéutica cuantitativa; Atlante S.A., 1a. edición, pág. 240-241, México, (1951).
- ◆ Kamel, B.S.; De Man, J.M. and Blackman, B., Nutritional, fatty acid and oil characteristics of different agricultural seeds, J. food technol, Vol. 17, pp. 263-269 (1982).
- ◆ Khan, S. A.; Muhammad, D.; Khan, M.; Javea I.; Bhatti, M.K., The fatty acid of indigenous resources for possible industrial applications, Part. VII, Investigation of the species of cucurbitaceae family, J. Sci. Ind. Res., Vol. 28, No. 1, pp 27-30, (1985).
- ◆ Lazos, E.S., Nutritional, fatty acid and oil characteristics of pumpkin and melon seeds, J. food science, Vol. 51. No. 5, pp. 1382-1383 (1986).
- ◆ Lock, S.; Smith, A.; Ballentyne, J.; Von Biljon P.J.; Recaldin D.; Yudkin, J.; Miani, A., Diccionario médico familiar, Selecciones de Reader Digest, 1a. edición, pág. 647-652. México (1981).
- ◆ Loomis, T., Fundamentos de toxicología, Acribia, 1a. edición, pag. 229-230, Zaragoza, (1986).
- ◆ Lu, G.R.; Bithell, T.C.; Foerster, J.; Athens, J.W.; Lukens, J.N., Wintrobe hematología clínica, Intermédica, 9a. edición, volumen 3, pag. 2010-2011, Argentina, (1995).
- ◆ Lu. Frank, Toxicología básica, Harla, 1a. edición, pág. 99-110, México, (1992).
- ◆ Madrid, A.; Cenzano I. y Cenzano J.M., Manual de aceites y grasas comestibles, Mundiprensa, 1a. edición, pág. 11-25, 38-42, 46-48, 81-85, 99-110, Madrid, (1997).

- ◆ McNahamara, D.J., La relación entre los lípidos de la dieta y su nivel en el plasma, Soyanocticias, Año XXVII, No. 252, pág. 6-10, (1998).
- ◆ Mag, T.G., El blanqueo, Soyanocticias, Año XXI, No. 228, pág. 1-11, (1992).
- ◆ Maroto, J.B., Horticultura herbácea especial, Mundi-Prensa, 1a. edición, pag. 456-465, Madrid, (1989).
- ◆ Matons, A., Diccionario de agricultura, zootecnia y veterinaria, Hispanoamericana, 2a. edición, pag. 482-483, Barcelona, (1947).
- ◆ Melloy, C.E.; Altman, H.N., Handbook of laboratory animal science, CRC Press Inc., 1a. edición, volumen 3, pp. 449-450, U.S.A., (1976).
- ◆ Messiaen, C.M., Las hortalizas, Blume, 1a. edición, pag. 206-214, 225-230, México, (1979).
- ◆ Mora, R.J., Soporte nutricional especial, Médica Interamericana, 2a. edición, pág. 27-33, 119-121, 287-295, Bogotá (1997).
- ◆ Oil Word, El gran reto para el futuro: granos vs oleaginosas, Asociación nacional de industrias de aceites y mantecas comestibles(ANIAME), Año XII, Vol. 5, No. 25, pág. 28-32, (1998).
- ◆ Ordovas, J., Acidos grasos trans, lípidos plásmáticos y enfermedad coronaria, Soyanocticias, Año XXV, No. 247, pág. 6-8, (1996).
- ◆ Pritchard, J.L. (eds); Analysis of seeds, fat and fatty foods; Rossell, J.B.; Elsevier Applied Science, England, pp. 443-489, (1991).
- ◆ Reglamento de la Ley General de Salud en materia de control sanitario de actividades, establecimientos, productos y servicios, título vigesimosegundo, sección de sustancias tóxicas, capítulo único, artículos: 1214-1217.

- ◆ Ruíz, A.G., Fundamentos de hematología, Medica Panamericana, 1a. edición, pág. 25-35, México, (1994).
- ◆ Saint, Martin Posada B.; González, M.S., Propiedades funcionales y principales reaccionesquimicas del aceite de soya, Soyanoicias, Año XXVII, No. 252, pág. 11-20, (1998).
- ◆ Sainz de Robles, F., Diccionario español de sinónimos y antonimos, Aguilar, 8a. edición, pág. 63, Madrid, (1981).
- ◆ Samperio, J.M., El blanqueo no solo como reducción del color, Soyanoicias, Año XXV, No. 245, pág. 10-13, (1996).
- ◆ Subsecretaría de agricultura y ganadería INIFAP, Iniciativa para reactivar la producción de semillas oleaginosas y fortalecer la integración de la cadena agroindustrial, Asociación nacional de aceites y mantecas comestibles (ANIAME), Año XII, Vol. 5, No. 25, pág. 2-10 (Anexo), (1998).
- ◆ Swern, D., Bailey's Industrial Oil and fat products; John Wiley & Sons, 4a. edición, Vol 1, pág. 186-189, 192-196, 217-221, 242-245, U.S.A., (1979).
- ◆ Woodard, G., Principles in grug administration in Gay, W.I., Methods of animal experimentation, Academic Press, Vol 1, pp. 343-359, (1965).
- ◆ Yoon, H. S.; Oh, M. J.; Choi, Ch., Studies on the development of food resources from waste seeds, Part. III, Han'guk, Nonghwa Hakhoechi, Vol. 26, No. 3, pp. 163-168, (1983).
- ◆ Ziller S., Grasas y aceites alimentarios, Acribia S.A., 7a. edición, pág. 27-33, 119-121, 287-295, Zaragoza, (1996).