

201

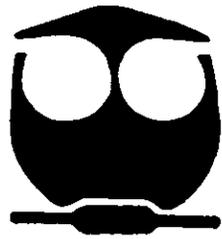


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION TOXICOLOGICA DE LA FRACCION
PROTEINICA DE LA ALMENDRA DE CAPULIN
(Prunus serotina)

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
EDNA LORENA ALVARADO HERNANDEZ



MEXICO, D.F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

278954



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

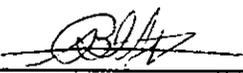
Jurado asignado:

Presidente	Prof. Angela Sotelo López
Vocal	Prof. Pedro Valle Vega
Secretario	Prof. Bernardo Lucas Florentino
1er Suplente	Prof. Leticia Gil Vieyra
2do Suplente	Prof. Enrique Martínez Marírique

Sitio donde se desarrollo el tema:

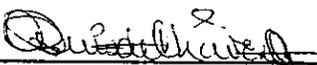
Laboratorio 111, Departamento de farmacia de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, UNAM.

Asesor del tema:



M. en C. Bernardo Lucas Florentino.

Supervisor técnico:



M. en C. Adriana A. Ruiz de Chávez O.

Sustentante:



Edna Lorena Alvarado Hernández.

Dedico esta tesis con todo mi cariño a mis padres: Chivis y Teo

*Por que sin ustedes, yo no habría logrado todo lo que he
anhelado..... muchas gracias por todo.*

A mis hermanos: Gris, Sergio, Toño, Jorge y Julio César

*Por ser un ejemplo a seguir en todos los aspectos y por el apoyo que
siempre me dan.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer infinitamente al profesor Bernardo Lucas por brindarme la oportunidad de trabajar con él, por el apoyo incondicional que siempre lo caracterizó y por su confianza.

A la MSc Adriana Ruiz de Chávez por su valiosa aportación y disposición para la realización de este trabajo.

A la profesora Angela Sotelo López por permitirme trabajar en el laboratorio.

A Lety Gil por su apoyo y amistad.

A Doña Vicky, por todos sus consejos y entusiasmos.

A mis queridos amigos Bety y Mario, por aquellos inolvidables días que pasamos juntos en el laboratorio.

A Laura y Sindhy por la amistad y cariño que me tienen.

A Adriana Jurado por alentarme siempre en todo lo que hago.

A mis amigos de la generación: Josefina, Domingo, Juan, Araceli, Erick, Juan José, Jorge y Carlos, por aquellas experiencias inolvidables que vivimos.

A Toño E y C, Nata, Claudia, Ariadne, Arturo y Ricardo, por su gran amistad, confianza y ayuda incondicional que siempre tendré.

Y sobre todo a mis chiquitos: Isis, Ivan, Karen y Jorgito, que día con día me alegran con sus besos.

INDICE

1. Introducción	1
2. Objetivos	3
3. Generalidades	4
3.1. Capulín (<i>Prunus serotina</i>)	5
3.2. Glucósidos cianogénicos	5
3.3. Definición de Toxicología.	7
3.3.1. Toxicidad	7
3.3.2. Toxicidad aguda	8
3.3.3. Toxicidad subaguda	11
3.4. Proteínas	13
3.4.1. Valor nutritivo de las proteínas	14
3.4.2. Necesidades de aminoácidos	15
3.4.3. Digestibilidad	17
3.5. Citometría Hemática	17
3.5.1. Sangre	18
3.5.2. Serie roja	18
3.5.2. Serie blanca	20
3.5.3. Serie trombocítica	21
4. Metodología	22
4.1. Caracterización bromatológica de la almendra	23
4.2. Separación de la fracción lipídica.	25
4.3. Obtención del concentrado proteínico	26
4.4. Caracterización química	26
4.4.1. Determinación de glucósidos cianogénicos	26
4.4.2. Determinación de aminoácidos	31
4.4.3. Calificación química (CQ)	42
4.4.4. Determinación de la digestibilidad <i>in vitro</i>	42
4.5 Toxicidad aguda	43
4.6. Destoxificación	46
4.7. Toxicidad subaguda	52

5. Resultados y Discusión	58
5.1. Parámetros físicos de la semilla	58
5.2. Caracterización de la almendra	58
5.3. Separación de la fracción lipídica	59
5.4. Caracterización química del concentrado proteínico	59
5.4.1. Contenido de glucósidos cianogénicos	60
5.4.2. Perfil de aminoácidos	62
5.4.3. Calificación química de la proteína	63
5.4.4 Toxicidad aguda	64
5.5. Destoxificación	66
5.6. Caracterización química del aislado proteínico	71
5.6.1. Contenido de glucósidos cianogénicos	72
5.6.2. Perfil de aminoácidos	73
5.6.3. Calificación química de la proteína	75
5.6.4. Digestibilidad <i>in vitro</i>	75
5.6.5. Toxicidad aguda y subaguda	76
6. Conclusiones	89
7. Bibliografía	91
Apéndice	95

1. INTRODUCCION

Desde sus inicios la humanidad ha sustentado una lucha continua para cubrir sus necesidades primarias, entre las que destaca la alimentación. Nuestros ancestros seleccionaban sus alimentos en base al sistema empírico de ensayo-error, el cuál fue muy drástico, y desde el punto de vista toxicológico solo podían evidenciar un efecto tóxico a corto plazo. Pero un aspecto que no pudo ser visualizado y que incluso en la actualidad no es totalmente apreciado, es el factor de la toxicidad crónica ocasionada por la ingesta continua de algunos alimentos que contienen sustancias tóxicas, pero que por su concentración o bajo efecto farmacológico no manifiestan síntomas clínicos inmediatos (1, 2, 3).

Además, la búsqueda de material biológico con potencial proteínico - calórico no es nuevo ni difícil de implantar como un recurso agroalimentario, ya que nuestro país cuenta con una gran biodiversidad, la cual, actualmente esta subaprovechada (4, 5). México en la actualidad importa una cantidad significativa de semillas oleaginosas, lo que, se traduce en una erogación cuantiosa que se puede disminuir si se aprovechan íntegramente algunos de los recursos naturales silvestres o semi-silvestres con que cuenta la República Mexicana (4, 6, 7).

Se menciona que las nueces o almendras de las semillas del género *Prunus*, pueden ser una buena fuente tanto de proteína como de grasa dietética (8, 9). Precisamente de estudios previos, donde se caracterizaron bromatológicamente varias almendras de semillas de frutas no convencionales, una almendra que presentó un gran potencial fue la almendra de la semilla de

capulín (*Prunus serotina*), ya que ésta presentó un contenido relativamente alto tanto de proteína (> del 30 %), como de grasa (> del 40 %).

Además, la misma mostró un contenido apreciable de algunos minerales y vitaminas que son escasos en la dieta humana y animal (9, 10). No obstante que la almendra de capulín es buena fuente de macro y micronutrientes; también, en estudios realizados en la parte del análisis químico de tóxicos, se pudo detectar la presencia de algunos de ellos, dentro de los que destacan los glucósidos cianogénicos, que liberan ácido cianhídrico (HCN). (3, 11-14); por lo que, para proponer que esta especie vegetal no tradicional sea fuente significativa de macro y micronutrientes en la dieta básica de cualquier comunidad, fue necesario efectuar un proceso de purificación y destoxificación, aprovechando las propiedades de solubilidad de la fracción proteínica y de los glucósidos cianogénicos, obteniendo así un aislado proteínico libre de tóxicos y con un contenido de proteína mayor del 80%, deficiente en algunos aminoácidos como la lisina, pero rico en histidina, leucina, fenilalanina y triptófano. Así también, se realizó el estudio de toxicidad aguda y subaguda con ratones de laboratorio, dándoles el material a evaluar en una sola administración y en administraciones repetidas respectivamente durante un periodo de tiempo para determinar la inocuidad del material, llevando a cabo un control del incremento de peso de los ratones, como del alimento consumido, así como también, del comportamiento, de los parámetros sanguíneos y de la digestibilidad (3, 6), resultando inocuo el material evaluado al final del estudio, por lo que, es posible proponer al aislado proteínico de la almendra de capulín, como un suplemento proteínico en la dieta.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

- * Evaluar la toxicidad aguda y subaguda de la fracción proteínica de la almendra de capulín (*Prunus serotina*).

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- * Separar la fracción lipídica de la almendra de capulín.
- * Caracterizar químicamente la fracción proteínica de la almendra de capulín.
- * Destoxificar la fracción proteínica.
- * Obtener un aislado proteínico de la almendra de capulín.
- * Realizar el bioensayo de toxicidad aguda en ratones.
- * Realizar el bioensayo de toxicidad subaguda en ratones, determinado parámetros clínicos y subclínicos.
- * Evaluar la digestibilidad "*in vivo*" e "*in vitro*" del aislado proteínico.

3. GENERALIDADES

3.1. Capulín (*Prunus serotina*)

Sinónimos del nombre científico: *Prunus capuli*

Nombre vulgar: capulín, capulín blanco, cerezo, cusabi, jeco, entre otros.

Arbol de 10 a 15 metros; hojas lanceoladas, aserradas, flores blancas en amentos, fruto globoso de 1 - 2 cm, negro rojizo comestible con una semilla. Las zonas de cultivo son Hidalgo, San Luis Potosí, Veracruz, Oaxaca, Michoacán, Jalisco, Colima, Nayarit, Valle de México, Guanajuato, en lugares fríos y templados (9).

Desde Venezuela hasta el Perú podemos encontrar alrededor de las grandes villas árboles de capulín (*Prunus serotina*). Es un árbol fácilmente identificable y representa para los Andes lo que la palma representa para las zonas costeras. A pesar de que se localiza en los Andes se piensa que puede ser de origen mexicano, ya que, su nombre viene de la palabra azteca capuli (7, 15).

El capulín es el primo de la cereza negra grande; tiene un sabor y apariencia similar, sin embargo se transporta como si fuera uva y su sabor se relaciona con el de la ciruela, estos frutos son redondos, brillantes, púrpuras o negros. Su pulpa es verde, carnosa y jugosa. La piel es delgada, pero lo suficientemente fuerte para evitar que el fruto se rompa. Las áreas de cultivo van desde los Andes hasta las latitudes tropicales, éstos árboles crecen en áreas templadas (2200 - 3100 m de altitud, a una temperatura de 10 a 20 °C). También se ha cultivado en zonas subtropicales y calientes.

El hueso es grande con respecto al tamaño del fruto. Su propagación como cultivo se debe al aprovechamiento de su **semilla** y cualquier mejoramiento del árbol se ha logrado mediante injertos y germinación. Los árboles son

extremadamente vigorosos. Las flores y frutos aparecen al tercer e incluso segundo año de vida; algunos árboles producen frutos carnosos y grandes, estas son las variedades que se deben seleccionar y propagar por capullos o injertos. Aunque es un árbol conocido en las Américas y los mejores frutos se encuentran en los Andes, se le debe mayor difusión en los países de América Latina. Por ejemplo, en Quito se han plantado árboles en zonas urbanas y sus frutos son consumidos por los niños escolares. Aunque no se puede comparar con el cultivo de cereza, el capulín es un alimento de buena calidad y tiene mucho potencial de mejoramiento (7, 9, 15).

La almendra de la semilla de capulín puede ser considerada como fuente de proteína (su porcentaje es mayor al 30%), deficiente en aminoácidos azufrados. Su aceite tiene un contenido elevado de vitamina E y la presencia de un ácido insaturado de alto peso molecular no identificado. Otra característica importante de la almendra de la semilla de capulín es su alto contenido de zinc en la almendra, capaz de competir con fuentes de origen animal (9, 10).

Además, en la almendra de la semilla de capulín se ha detectado la presencia de sustancias tóxicas, tales como, glucósidos cianogénicos (10, 13, 14).

3.2. Glucósidos cianogénicos.

Los glucósidos cianogénicos constituyen un grupo de sustancias naturales ampliamente distribuidas, que originan por hidrólisis una cetona o un aldehído, un azúcar y el ácido cianhídrico (HCN), el cual, es muy tóxico; concentraciones relativamente de estos tóxicos son encontradas en algunas gramíneas, leguminosa, raíces feculentas y almendras de frutas (14, 16, 17).

La liberación del HCN, a partir de los glucósidos cianogénicos, al masticar o triturar las plantas que los contienen, se debe a un proceso enzimático en el que intervienen dos enzimas. El primer paso consiste en la hidrólisis del azúcar, catalizada por la β -glucosidasa, que rinde una cianhidrina (aglucon) y un azúcar; la mayoría de las cianhídrinas son inestables y se descomponen espontáneamente en los correspondientes cetona o aldehído y HCN; tal descomposición se acelera por el efecto de la enzima hidroxinitriliasa (14). Estas enzimas se encuentran en la misma planta y actúan sobre los glucósidos cianogénicos cuando ésta sufre ruptura del tejido debido a daños mecánicos (16, 19).

En vista de que la liberación del HCN ocurre solamente cuando se daña el tejido celular, se ha sugerido que la función de estos compuestos, es la de proteger a las plantas del ataque de sus depredadores y de acuerdo a estudios más recientes, parece que tienen una función muy importante en la biosíntesis de ciertos aminoácidos (20).

Los glucósidos cianogénicos pueden dividirse en 4 grupos de acuerdo a la estructura química de aglucon:

1. Glucósidos derivados de 2-hidroxi-2-fenilacetónitrilo, como el caso de la amigdalina.
2. Glucósidos derivados de aglicones alifáticos saturados, como el caso de la linamarina.
3. Glucósidos con un aglucon conteniendo un doble enlace en posición α , β al grupo nitrilo, como acacipetalina.
4. Glucósidos con un aglucon acíclico insaturado, como gynocardina.

La amígdalina fue el primer glucósido cianogénico del que se tuvo conocimiento, fue aislado en 1830 de las semillas de almendra amarga (*Prunus amygdalus*), y es el más estudiado y conocido hasta el momento (22); en Estados Unidos no se permiten variedades cuyo contenido de HCN sea superior a 20 mg / 100 g de muestra (18).

Las características clínicas por envenenamiento agudo con HCN, son confusión mental, parálisis muscular generalizada, y paro respiratorio. La dosis letal mínima por vía oral se ha estimado en 0.5 - 3.5 mg / Kg de pc, el cianuro ingerido es rápidamente absorbido por la parte superior del tracto gastrointestinal, pasa rápidamente a través de la piel, y el gas es rápidamente absorbido por los pulmones. El HCN ejerce su acción tóxica al unirse al ion férrico de la citocromo oxidasa de las mitocondrias, impidiendo con ello la respiración celular (14, 16, 18).

3.3. Definición de toxicología.

La toxicología es la ciencia que estudia los venenos. Etimológicamente procede del griego *toxicon*, que significa "vida de amor", paradoja que se repite en otros idiomas, como en inglés y alemán, donde *gift* (veneno) también quiere decir regalo (23).

3.3.1. Toxicidad.

De modo genérico podemos definir la toxicidad de una sustancia como su capacidad de producir efectos nocivos a un organismo vivo. De este modo habrá sustancias altamente tóxicas que producirán efectos nocivos a bajas dosis y sustancias débilmente tóxicas que acarrearán efectos nocivos sólo si se utilizan o

administran en dosis elevadas. Vemos pues, que los conceptos de dosis (cantidad de sustancias absorbida), de vías de administración (oral, intramuscular, subcutánea, etc), de frecuencia de administración (administración única o repetida), de grado de toxicidad y de tiempo necesario para que aparezcan los efectos, son indispensables para determinar el nivel de toxicidad de un producto.

Los efectos de las sustancias tóxicas están relacionados con la duración o tiempo de exposición (24, 23). A fin de examinar los diferentes efectos asociados con diversos tiempos de exposición, los estudios toxicológicos se dividen por lo general en tres categorías:

- 1) *Estudios de toxicidad aguda o a corto plazo (24 - 48 hs).*
- 2) *Estudios de toxicidad a mediano plazo* (también conocidos como subagudos o subcrónicos).
- 3) *Estudios de toxicidad a largo plazo* (conocidos como crónicos).

3.3.2 Toxicidad aguda.

Los estudios de toxicidad aguda implican una sola administración de la sustancia química y se define como “los efectos tóxicos adversos que aparecen en un corto periodo después de la administración de una dosis única o de múltiples dosis en un intervalo de 24 horas” (24).

El procedimiento inicial consiste en investigar una serie de rangos de dosis que nos indiquen que el material por evaluar, corresponde a prácticamente no tóxico o casi inocuo, de acuerdo a la escala de grado de toxicidad de sustancias xenobióticas (cuadro 1). Esto requiere además de seleccionar una vía de

administración, preparar el compuesto de una forma adecuada para su administración por la vía seleccionada, y elegir una especie apropiada.

Cuadro 1. Rangos de toxicidad (13, 23).

DENOMINACION	DL₅₀ (en rata, dosis oral única)	
Extremadamente tóxico	< 1	mg / kg pc
Altamente tóxico	1–50	mg / kg pc
Moderadamente tóxico	50–500	mg / kg pc
Ligeramente tóxico	0.5–5	mg / kg pc
Prácticamente no tóxico	5–15	mg / kg pc
Relativamente inocuo	> 15	mg / kg pc

Selección de la especie animal. En general, la rata y el ratón son los animales que se seleccionan; 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 estas especies de animales, hecho que facilita comparaciones de las toxicidades de otras sustancias químicas.

Vía de administración. Por lo general los tóxicos deben administrarse por la misma vía por la cual seres humanos quedarían expuestos. La vía oral es la que se utiliza más comúnmente. En este caso, el producto puede administrarse con ayuda de una sonda esofágica. Usualmente se requiere de 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 son disolventes como: agua, solución salina, gomas vegetales, y derivados de celulosa.

El volumen del tóxico en solución o suspensión puede afectar la toxicidad; volúmenes grandes de un líquido pueden causar efectos desfavorables para el animal.

Elección de la dosis. El estudio de toxicidad aguda necesita utilizar fuertes dosis de sustancias, para inducir intoxicaciones en animales.

Factores ambientales. El enjaulamiento puede afectar la toxicidad de una sustancia química, así como también, la temperatura del medio ambiente y la humedad relativa, por lo que, se estudia colateralmente un lote control.

Observaciones y exámenes. 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 (14, 23, 24). Algunas de las observaciones que deben hacerse y que señalan toxicidad son las siguientes:

- * Lordosis: curvatura de la columna vertebral caracterizado por un movimiento ondulante del lomo.
- * Xifosis: curvatura dorsal de la columna vertebral caracterizado por un movimiento ondulante en la cadera.
- * Disnea: frecuencia anormal de la respiración.
- * Cianosis: coloración azulada en la piel debido a la falta de oxigenación.
- * Ataxia: falta de coordinación muscular manifestada por un trastorno del equilibrio.

- * Piloerección: Se caracteriza por erección del pelo.
- * Erección caudal: erección de la cola.

Deben practicarse autopsias a todos los animales que hayan muerto y también cuando menos a algunos de los sobrevivientes. La autopsia puede proporcionar información útil acerca del órgano objetivo, especialmente cuando la muerte no se presenta poco después de la administración de la dosis.

3.3.3. Toxicidad subaguda.

La toxicidad subaguda (o subcrónica) se basa en la administración o aplicación cotidiana de diversas dosis o concentraciones de la sustancia estudiada en un periodo de alrededor de 10 % del ciclo de vida del animal de experimentación.

Las especies escogidas son generalmente ratas o ratones, y dentro de los otros animales no roedores, el perro o el mono. La duración de los estudios es generalmente de 14 días hasta 3 meses.

Vía de administración. El producto químico debe administrarse por la vía del uso o exposición destinados en seres humanos. En el caso de la mayoría de los productos químicos la vía común es la oral. El procedimiento que se prefiere aplicar consiste en incorporar el producto químico en la dieta, aunque a veces se utiliza como vehículo el agua para beber. Este último método es recomendable cuando la sustancia química puede reaccionar con un componente de la dieta.

Dosificación. Es recomendable seleccionar tres dosis: una que sea lo suficientemente alta para producir signos definidos de toxicidad, una dosis baja que se espere no induzca ningún efecto tóxico o una dosis intermedia y debe

completarse con un grupo control. Estos animales no recibirán el producto químico sometido a prueba sino que se les debe dar el vehículo o excipiente que se utilice.

Observaciones y exámenes.

- * **Peso corporal y consumo de alimentos:** Estos aspectos deben determinarse semanalmente. La pérdida de peso corporal es un índice simple, aunque sensible de efectos tóxicos. El consumo de alimentos es así mismo un indicador útil. Además, una disminución marcada en el consumo de alimentos puede inducir efectos que imiten o empeoren las manifestaciones tóxicas del producto químico.
- * **Observaciones generales:** Entre estas se deben contar el aspecto, conducta o comportamiento y cualquier anomalía.
- * **Pruebas de laboratorio:** Los exámenes hematológicos suelen incluir, la concentración de hemoglobina, la cuenta de eritrocitos, leucocitos y de plaquetas. A todos los animales se les deben tomar muestras sanguíneas antes de iniciar el tratamiento, a la semana, al mes y al final de la prueba según sea la duración del ensayo.
- * **Examen posmórten:** Siempre que es posible, todos los animales que se encuentren muertos o en proceso de morir se les debe realizar la necropsia. Además, deben determinarse los pesos de varios órganos, en valores absolutos o en términos de relación porcentual, puesto que sirven como indicadores útiles de toxicidad (24).

3.4. Proteínas.

Son macromoléculas compuestas de unidades llamadas aminoácidos, estos compuestos se caracterizan por tener en su molécula un grupo amino y un grupo carboxílico, de los cuales se conocen más de 140 que se encuentran en distintos tejidos de origen animal y vegetal, así como en los microorganismos, pero de todos estos, sólo funcionan 20 como monómeros o constituyentes básicos de las proteínas, que al unirse en combinaciones y cantidades diferentes, forman miles de distintas proteínas.

Estas sustancias desempeñan funciones biológicas en el organismo humano, entre las que se cuenta principalmente la regeneración y la formación de tejidos, la síntesis de enzimas, anticuerpos, hormonas y como constituyente de la sangre, entre otras; forman parte del tejido conectivo y muscular de los animales y de otros sistemas rígidos estructurales. Los órganos del hombre están compuestos fundamentalmente por proteínas (25).

Las proteínas contienen aproximadamente 16% de nitrógeno, lo cual, proporciona un medio útil para la cuantificación de proteína en un alimento, ya que, el nitrógeno multiplicado por el factor 6.25 ($100 / 16$) da una medida de la cantidad de proteína; pero como no todo el nitrógeno de los alimentos se encuentra en forma de proteína, el valor solo es aproximado y se llama "proteína cruda".

3.4.1. Valor nutricional de las proteínas.

Los niveles de proteína propuestos son aquellos considerados como necesarios para mantener la salud y las necesidades fisiológicas de la mayor parte de los individuos de un grupo de población; sin embargo, las necesidades reales son de α - aminoácidos, y por tanto, la composición en aminoácidos de las proteínas de la dieta es extremadamente importante; existen ocho aminoácidos estrictamente esenciales para la nutrición adecuada:

- * Valina, leucina, isoleucina, treonina, fenilalanina, triptófano, lisina, y metionina

Aunque algunos de ellos, por ejemplo el triptófano, se necesitan directamente para la biosíntesis de hormonas y otros compuestos metabólicamente activos. Sin embargo, de entre los ocho aminoácidos esenciales, solo cinco limitan la calidad de las proteínas en la dieta del hombre: la lisina, los aminoácidos azufrados (metionina y cistina), la treonina y el triptófano (26).

La tirosina y la cistina también se clasifican como aminoácidos esenciales, puesto que no pueden ser sintetizados en cantidades adecuadas cuando la dieta es deficiente en fenilalanina o metionina respectivamente.

Las necesidades de triptófano, fenilalanina y en consecuencia, de tirosina, se deben a la incapacidad de los animales para sintetizar anillos aromáticos. Un α -aminoácido o cualquier otro constituyente de la dieta es esencial para los animales, en primer lugar, cuando éste no lo puede sintetizar y en segundo lugar, cuando un componente de la dieta por sí mismo o uno de sus derivados metabólicos es necesario para llevar acabo las funciones bioquímicas y un

crecimiento normal. La arginina y la histidina no se incluyen en la lista, aunque estos aminoácidos son esenciales para los niños, sin embargo, se cree que pueden ser sintetizados en cantidades suficientes por los adultos.

Las necesidades proteínicas mínimas de las diferentes proteínas alimentarias son una cantidad variable, que viene determinada por la proporción relativa de aminoácidos esenciales presentes en diferentes proteínas. En consecuencia, la dependencia de una única fuente de proteína puede dar lugar a una ingesta proteínica insuficiente en algunos de los aminoácidos esenciales; por ejemplo, los cereales son deficientes en lisina mientras que las legumbres lo son en aminoácidos azufrados (26).

3.4.2. Necesidades de aminoácidos.

El comité de expertos de la FAO / OMS ha valorado las necesidades de aminoácidos en los niños (cuadro 2) a partir de los datos obtenidos mediante experimentos alimentarios. No obstante, aunque no han variado los datos estimados acerca de las necesidades de aminoácidos, el patrón de necesidades de aminoácidos por gramo de proteína se basa actualmente en las distintas necesidades del hombre desde la infancia hasta la madurez (cuadro 2).

Utilizando los patrones de FAO / OMS / ONU de 1985 la cantidad adecuada de proteínas que deben consumir los niños más jóvenes, los de edad preescolar y los adultos puede estimarse separadamente a partir de su composición en aminoácidos, para lo cual, se determinan calificaciones químicas (C.Q) relacionadas con el patrón FAO / OMS para los aminoácidos individuales, siendo esta una forma de evaluar la calidad de las proteínas por métodos químicos.

Cuadro 2. Necesidades de aminoácidos sugeridas por la FAO/OMS/ONU.

Aminoácidos	Necesidades requeridas (mg/g de proteína)				
	Lactantes media (rango)*		Preescolares (2-5 años)	Edad escolar (10-12 años)	Adultos
Histidina	26	(18 - 36)	19	19	16
Isoleucina	46	(41 - 53)	28	28	13
Leucina	93	(83 - 107)	66	44	19
Lisina	66	(53 - 76)	58	44	16
Metionina+cistina	42	(29 - 60)	25	22	17
Fenilalanina+tirosina	72	(68 - 118)	63	22	19
Treonina	43	(40 - 50)	34	28	9
Triptófano	17	(16 - 17)	11	9	5
Valina	55	(44 - 77)	35	25	13
Total					
Incluyendo histidina	460	(408 - 588)	339	241	127
Sin incluir histidina	434	(390 - 552)	320	222	111

* Composición de aminoácidos de la leche de la mujer

La calificación química expresa la relación entre el por ciento de cada aminoácido en la muestra y el por ciento del mismo aminoácido en la proteína de referencia. Para la proteína a analizar, el aminoácido limitante es el componente que determina el valor global de la proteína (26).

3.4.3. Digestibilidad.

La digestibilidad de las proteínas se considera como un indicador de su calidad, y es una de las primeras determinaciones para saber la disponibilidad de los aminoácidos que la componen. Los alimentos de origen animal tienen una mayor digestibilidad que las de origen vegetal, lo anterior se atribuye al contenido menor de fibra en los alimentos de origen animal, hay una menor velocidad de tránsito en el tracto intestinal, lo que en consecuencia hace que halla una mayor absorción de nutrientes. Además la estructura terciaria de las proteínas de origen animal es menos compleja que las de los vegetales, por lo que son más fácilmente digeridas por las enzimas intestinales.

Otros factores que disminuyen la digestibilidad en las proteínas de origen vegetal, son la presencia de factores tóxicos y antinutricionales (27).

3.5. Citometría hemática. Índices y parámetros.

El término de citometría hemática se refiere a la medición de las células de la sangre (*citos* = célula, *metros* = medida, *haematos* = sangre). El término de biometría hemática es incorrecto (*bios* = vida, *metros* = medida), ya que no se trata de la medida de la vida, sin embargo, es el que más se emplea para solicitarlo a los diversos laboratorios clínicos. Existen otros términos que se utilizan cotidianamente, pero el término de citometría hemática (CH) es el que mejor describe al estudio de laboratorio destinado a informar sobre número y características de las células de la sangre (28).

3.5.1. Sangre.

La sangre esta compuesta de plasma y elementos celulares, que incluyen leucocitos (glóbulos blancos), plaquetas (trombocitos) y eritrocitos (glóbulos rojos). El plasma representa más o menos el 55% del volumen sanguíneo, en tanto que los eritrocitos forman el 45% y los leucocitos y plaquetas el 1%. Las variaciones de los elementos sanguíneos son con frecuencia el primer signo de enfermedad.

Las células sanguíneas viajan a través de los vasos y son distribuidas a todos los tejidos corporales. Los eritrocitos contienen la proteína vital hemoglobina que se encarga del transporte de oxígeno y bióxido de carbono, los leucocitos (de los que los equipos automatizados clasifican en cinco tipos) se ocupan de la defensa contra antígenos extraños. Las plaquetas son necesarias para la hemostasia. Los eritrocitos y plaquetas actúan sin abandonar la circulación; pero los leucocitos, por medio de diapédesis (paso a través de las paredes vasculares) pasan a los tejidos donde desarrollan su actividad de defensa contra antígenos extraños invasores.

La interpretación correcta de la CH obliga el análisis detallado de los datos que informa, los cuales pueden dividirse en tres grandes grupos: los correspondientes a la serie roja, la serie blanca y la serie trombocítica (29).

3.5.2. Serie roja.

Los de la serie roja comprende los siguientes parámetros:

Hemoglobina (Hb) y definición de anemia. La Hb se cuantifica en gramos por decilitro (g / dL) y representa la concentración de esta proteína por unidad de volumen. Este parámetro debe ser el único a emplear para definir si hay o no

anemia, 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 depende de: edad, sexo, altura del sitio de residencia, etcétera. La Hb se mide directamente por medio de un método colorimétrico de punto final y es necesario establecer los valores de referencia, tomando en cuenta las variables anotadas.

Hematocrito (Hct). Mide en porcentajes (%) y representa la proporción de eritrocitos en el total de la sangre. Este parámetro no debe emplearse para establecer la existencia de anemia. Los rangos normales de referencia del hematocrito dependen también del sexo, de la edad y altura del sitio de residencia.

Número de glóbulos rojos (Rbc). Informa en millones por microlitro (número de glóbulos rojos $\times 10^6 / \mu\text{L}$). Su valor normal depende también de los factores señalados. El empleo actual de contadores de partículas por citometría de flujo permite calcularlos con gran exactitud.

Volumen globular medio (VGM). Se mide en femtolitros (fL). Este índice eritrocítico, medido directamente en la citometría de flujo, es de gran valor en el esclarecimiento de la causa de una anemia. Los valores del VGM permiten conocer si una anemia es macrocítica (VGM mayor a los límites normales) o microcítica (VGM menor a los límites normales).

Hemoglobina corpuscular media (HCM). Se expresa en picogramos (pg) y representa la cantidad promedio de hemoglobina en cada eritrocito.

Concentración corpuscular media de hemoglobina (MCHC). Este índice eritrocítico, medido como porcentaje (%), es uno de los parámetros de mayor

utilidad en lugares donde se emplea tecnología manual, es el único parámetro confiable que se calcula para inferir el grado de hipocromía o normocromia de los eritrocitos.

3.5.3. Serie blanca

Los datos que la CH proporciona son: número de glóbulos blancos, cuenta diferencial y alteraciones de los mismos.

Número de glóbulos blancos (WCB). Se mide en millones por microlitro (número de glóbulos blancos $\times 10^3 / \mu\text{L}$). El número de leucocitos depende de muchos factores como edad, peso, consumo de hormonas anticonceptivas, etcétera. Cuando los WBC se encuentran por arriba del rango normal de referencia se habla de leucocitosis y cuando se encuentra por abajo se habla de leucopenia; hay muchas causas de leucocitosis, como, infecciones agudas (neumonía meningitis, apendicitis, amigdalitis), intoxicaciones metabólicas (acidosis) o envenenamiento por químicos o venenos, hemorragia aguda entre otras. Dentro de las causas de leucopenia, pueden señalarse las infecciones bacterianas (septicemia, tuberculosis miliar, tifoidea, brucelosis, etcétera); infecciones virales y otras infecciones.

La cuenta diferencial de las variedades de glóbulos blancos es de gran importancia en la CH. En sangre periférica pueden encontrarse los siguientes tipos de leucocitos: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos, aunque existen otros tipos de leucocitos, los equipos automatizados únicamente tienen capacidad para clasificarlos en estos cinco grandes grupos (28). Todo el sistema

de leucocitos está diseñado para defender contra cuerpos extraños. Sin embargo, cada uno de estos tipos de células, tienen diferentes funciones y pruebas actuales sugieren que cada una se comporta como un sistema relacionado pero separado (29, 30).

3.5.4. Serie trombocítica.

Número de plaquetas (Plt). Algunas de las causas de trombocitopenia son: leucemia aguda, anemia perniciosa, medicamentos citotóxicos, etcétera. Cuando la cuenta plaquetaria se encuentra por arriba de los rangos de referencia, se habla de trombocitosis, cuyas causas pueden ser muchas: padecimientos malignos, anemia por deficiencia de hierro, infecciones agudas, etcétera (28).

4. METODOLOGIA

A continuación se presenta el diagrama de flujo de los bloques del trabajo desarrollado (figura 1) con el fin de visualizarlo en forma integral.

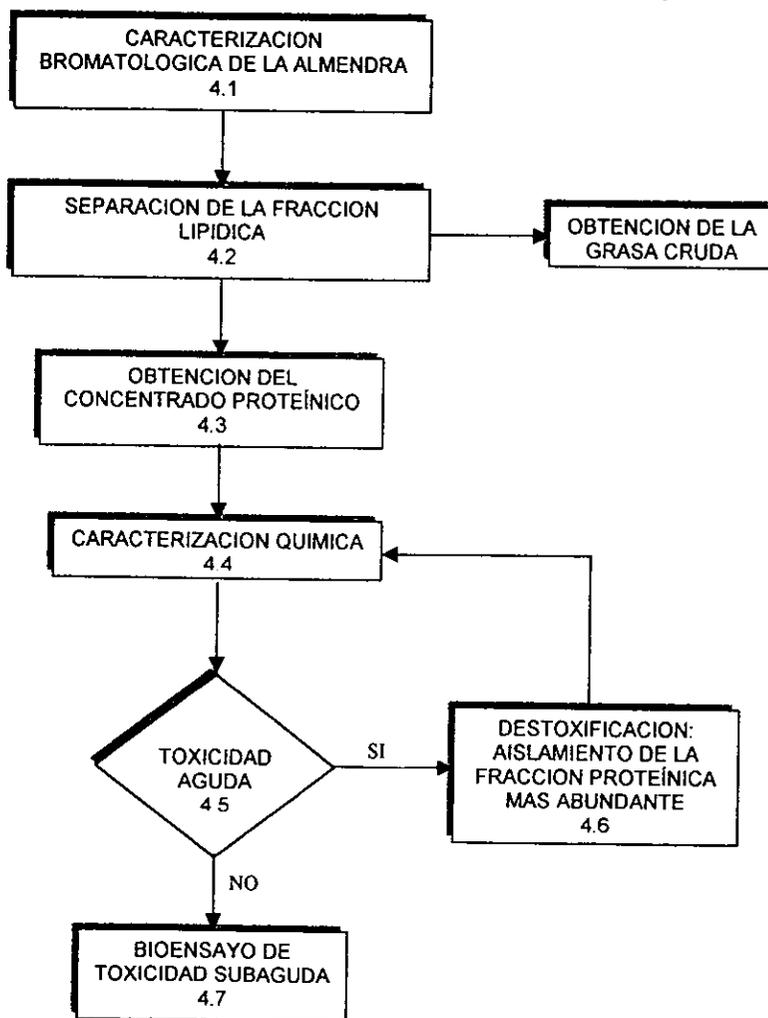


Figura 1. Diagrama de trabajo.

4.1. Caracterización bromatológica de la almendra.

4.1.1. Materia prima.

Se contaba con material recolectado de semillas de capulín (*Prunus serotina*) de distintas regiones, por lo que se homogeneizó el material antes de tomar una muestra representativa del lote para corroborar su mayor similitud con los lotes antes analizados (9).

4.1.2. Pelado y molienda de la almendra.

El descascarillado de la almendra se hizo con ayuda de un mortero y un pistilo, colocando sobre el mortero unas cuantas semillas de capulín para después golpearlas suavemente con el pistilo con el fin de romper la cáscara y obtener la almendra entera, las cuales, se iban guardando en atmósfera de nitrógeno para su conservación. Se tomó una fracción representativa del lote y se molieron en un molino con malla de 1 mm de diámetro, para el análisis proximal. Las demás almendras se fraccionaron en un molino con malla de 2 mm de diámetro para el proceso de extracción de grasa.

4.1.3. Análisis proximal.

FUNDAMENTO: El análisis proximal o sistema analítico Weende se desarrolló en Alemania hace más de 100 años, en la estación experimental que lleva su nombre(31). Este sistema se ha criticado mucho, pero hasta la fecha nadie ha desarrollado otro mejor que sea tan practicado y aceptable. Las determinaciones se hicieron con las técnicas reportadas en el AOAC (32).

El análisis proximal de la almendra se realizó de acuerdo al esquema Weende (figura 2).

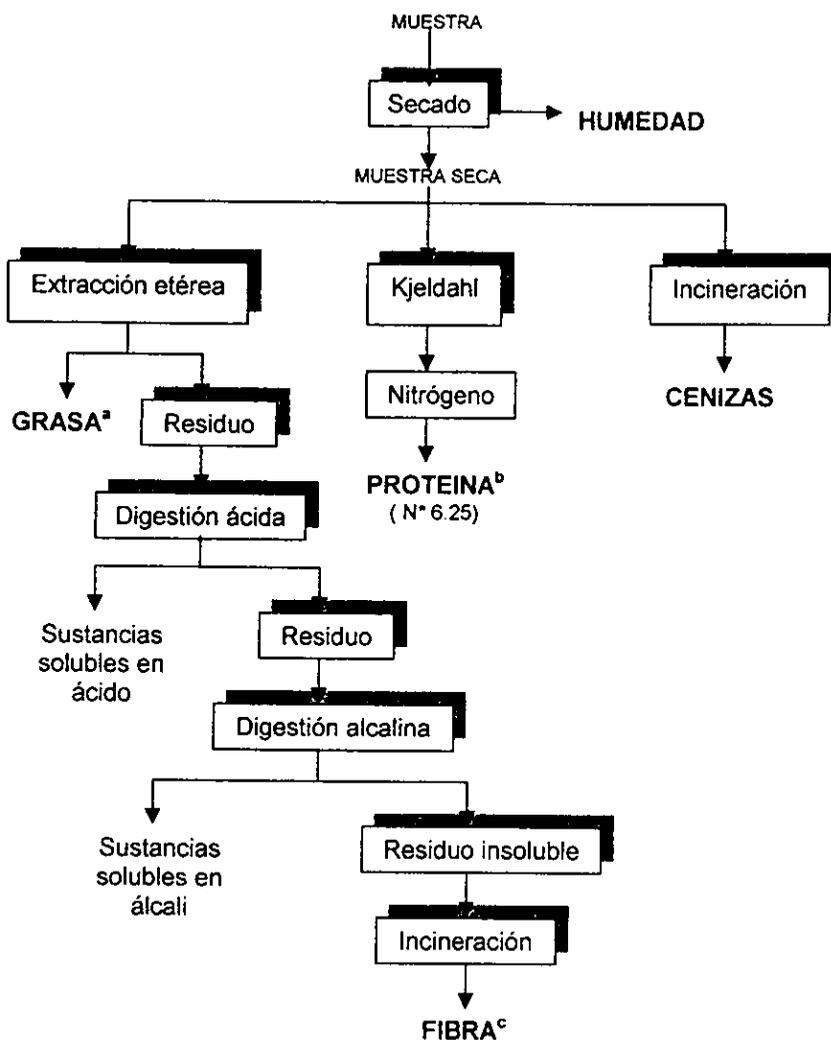


Figura 2. Esquema Weende

- En la determinación del contenido de grasa se utilizó éter de petróleo como disolvente.
- Para la cuantificación de la proteína se utilizó el Digestor Tecator Model a / b, 20 / 40 y el autoanalizador KJELTEC 1030.
- En el análisis de la Fibra se utilizaron filtros California (Lanconco) y diámetro interno de 76 mm; además, se utilizó silicato de aluminio en vez de asbesto.

4.2. Separación de la fracción lipídica.

Se montó un dispositivo (figura 3) que permitió trabajar con 1 Kg de semilla parcialmente fraccionada y se extrajo la grasa con hexano grado QP.

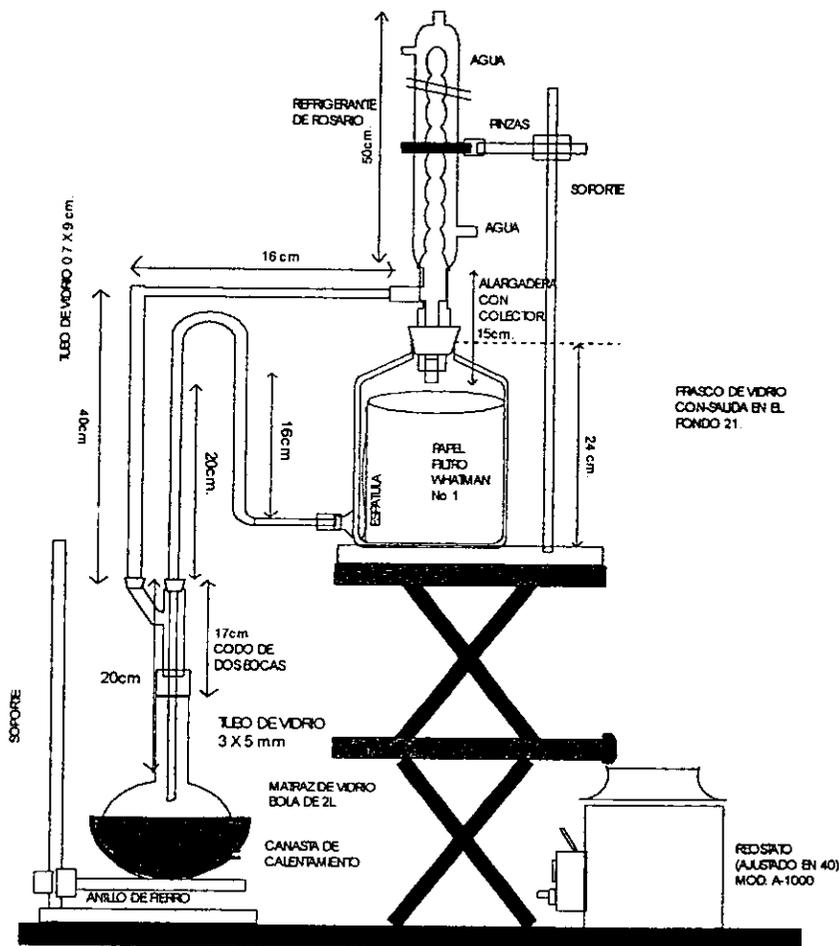


Figura 3. Dispositivo de extracción

* El dispositivo se dejó a reflujo para la extracción de la grasa durante 8 horas diarias por 3 días.

4.3. Obtención del concentrado proteínico.

A la harina desengrasada obtenida de la separación de la fracción lipídica, se le dejó toda la noche a temperatura ambiente con corriente de aire, para quitar residuos de hexano; se le determinó el análisis proximal, para confirmar que se trataba de un auténtico concentrado proteínico. Además, de estudios previos (9), se tenía conocimientos de que la almendra de capulín contiene glucósidos cianogénicos, por lo que se determinó el contenido de estos tóxicos.

A la grasa se le eliminó el disolvente con un rotavapor. Este extracto libre de hexano se le denominó "grasa cruda", a la cual, se le insufló nitrógeno y se almaceno a temperatura baja para su posterior evaluación en otro trabajo de tesis.

4.4. Caracterización química.

4.4.1. Determinación de glucósidos cianogénicos.

FUNDAMENTO: El presente método aprovecha la reacción sensible y específica de Guignard, la cual, consiste en hacer reaccionar picrato de sodio con el HCN para producir isopurpurina (compuesto colorido). Para poder cuantificar el HCN total que se libera se hace uso de una hidrólisis enzimática con una β -glucosidasa del correspondiente glucósido cianogénico (33). Este método puede detectar hasta 5.0 μg de HCN, equivalente a 46.0 μg de glucósido cianogénico (referido con linamarina).

MATERIALES Y REACTIVOS.

- * Incubadora marca BLUE-M
- * Congelador comercial

- * Espectrofómetro Sequoia - Torner mod 340
- * Baño de agua con agitación marca LAB-LINE INSTRUMENTS
- * Tubos de cultivo con tapón de rosca PYREX # 9825 y 9826
- * Micromolino marca Tecator mod CYCLO-TEC
- * Papel indicador de HCN (a)
- * Solución de β -glucosidasa con activador (b)
- * Solución de KCN equivalente a 100 μ g HCN / mL (24.1 mg / 100mL)
- * HCl 0.5 N
- * Buffer de fosfatos pH = 7.0
- * Solución de picrato de sodio alcalinizada (c)
- * Fécula de maíz comercial

(a). Papel indicador de HCN: Papel Whatman del # 2 se mojó en una solución de picrato de sodio (c), se dejó escurrir y se colocó en una estufa, a una temperatura de 55 – 60 °C, por espacio de 30 minutos. Se cortaron tiras de 2 X 10 cm.

(b). Solución de β -glucosidasa con activador: 0.25 g de se disolvieron con buffer de fosfatos a pH = 7, con la precaución de agitarlo suavemente (de lo contrario se hubiera formado una gran cantidad de espuma); una vez disuelta la enzima se le adicionó 1.7 g de NaNO_3 que actúo como activador de dicha enzima; todo lo anterior se aforó a un volumen de 250 mL con el mismo buffer y así tuvimos una concentración de 1.0 mg de β -glucosidasa / mL y 0.08 M de NaNO_3 .

(c). Solución de picrato de sodio alcalinizada: Se disolvieron en agua destilada 2.5 g de ácido pícrico y a continuación 12.5 g de carbonato de sodio, aforando a un volumen de 500 mL con agua destilada.

PROCEDIMIENTO:

CURVA ESTANDAR. Para la elaboración de la curva estándar de referencia, se uso una solución de cianuro de potasio con una concentración de 100 µg HCN / mL. Además con el fin de simular la interacción muestra – HCN liberada, se introdujo en la curva estándar la llamada matriz alimenticia, que en este caso fue fécula de maíz comercial.

TUBOS PARA LA CURVA ESTANDAR

mL solución estándar	Matriz alimenticia	Buffer pH = 7	HCl 0.5N (en frío)	Concentración de HCN (µg)
0.00	500 mg	5.0 mL	1.0 mL	Blanco
0.05	"	"	"	5.0
0.10	"	"	"	10.0
0.20	"	"	"	20.0
0.30	"	"	"	30.0
0.40	"	"	"	40.0
0.50	"	"	"	50.0
0.60	"	"	"	60.0

→ 40°C / 4hrs

La curva estándar va de 5 - 60 µg de HCN, ya que fue el rango óptimo encontrado en la respuesta concentración de HCN vs DO ($r = 0.99$) en donde se cumple la ley de Lambert – Beer. Dicha serie de tubos se trabajaron en la misma forma que para la liberación de HCN en la muestra.

PREPARACION DE LA MUESTRA. Cuando se requiere determinar con suma precisión el contenido de HCN en una muestra fresca, es necesario partir del material íntegro; para lo cual, el material se sometió a una molienda fina e inmediatamente se paso a un frasco que cerraba perfectamente y si no se va a realizar en ese momento la determinación, se procede a colocar la muestra ya molida en el congelador.

PROCEDIMIENTO DE ANALISIS. Liberación del HCN de la muestra. Se colocó en un tubo de cultivo Pyrex # 9826 de 20 – 500 mg de muestra, dependiendo de su contenido aproximado de glucósidos cianogénicos (cuando no se tiene información se coloca la cantidad máxima de 500 mg); a continuación se le adicionaron 5.0 mL de solución de β - glucosidasa (fría), se homogeneizó y se procedió a colocar la tira de papel indicador humedecida (aproximadamente con ocho gotas de agua) en la boca del tubo y se cerro herméticamente con un tapón de rosca.

Una vez que se tuvo el anterior dispositivo se colocó en el baño María que estaba a una temperatura de $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, con el control de velocidad de agitación ajustado a 3.5 oscilaciones/ minuto, durante 4 horas. Al final de dicho tiempo se saco el tubo y se colocó en el congelador por 30 minutos.

Transcurrido el anterior tiempo se saco el tubo y se destapo para adicionarle 1.0 mL de HCl 0.5 N (frío); hay que hacer notar que si se usan los tapones adecuados, la tira de papel indicador queda adherida a dicho tapón y no se presentan problemas de manipulación en este paso.

Una vez adicionado el HCl, se volvió a cerrar perfectamente, se homogeneizo teniendo la precaución de que el líquido no tocaba el papel indicador y se colocó en la incubadora por espacio de 15 minutos a la temperatura de 60 °C. Transcurrido el tiempo se saco de la incubadora y en ese momento se procedió a realizar visualmente la detección cualitativa, ya que aquellos tubos que no mostraron ni siquiera ligera coloración café – rojiza en el papel indicador, se consideraron negativos; en tanto que aquellos que si mostraron, aunque sea una tenue coloración, se consideraron positivos y se procedió a su detección cuantitativa.

DETERMINACIÓN CUANTITATIVA. Con cuidado se procedió a recuperar el papel indicador y se colocó en un tubo de cultivo Pyrex # 9895, se le adicionaron 20 mL de agua destilada (medidos con bureta) se tapo y se agitó vigorosamente con el fin de extraer el pigmento de isopurpurina del papel indicador en el agua. Después de extraer el pigmento (aproximadamente de 2 – 5 minutos) se recupero el solvente (agua), eliminando los residuos por una simple filtración con papel de filtración rápida. El filtrado se colocó en la fotocelda para su lectura con el espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm; previamente ajustado a 100 % T con el blanco correspondiente (todos los reactivos, excepto la muestra).

CALCULOS: Una vez que se tuvo elaborada la curva estándar, en donde se encuentra relacionado el contenido de HCN vs DO expresado en densidad óptica (A), se paso el valor obtenido de % T a densidad óptica (DO).

$$DO = \text{Log} \frac{1}{\%T/100}$$

Con el dato de absorbancia se puede interpolar o calcular de acuerdo a la ecuación de la regresión lineal el correspondiente contenido de HCN (x).

$$\frac{x \times 100}{M} = \text{mgHCN} / 100 \text{ gmuestra}$$

donde:

x = μg de HCN

M = mg de muestra.

4.4.2. Determinación de aminoácidos.

FUNDAMENTO: La cromatografía de intercambio iónico con resinas específicas, acopladas a bombas especiales que mantienen un flujo constante de las soluciones eluyentes y aparatos de registro electrónico automático, han permitido el desarrollo de los llamados autoanalizadores de aminoácidos, que realizan el análisis de una proteína con increíble rapidez y una adecuada precisión.

La naturaleza de las condiciones de hidrólisis ácida completa, juega un papel de gran importancia en el análisis de aminoácidos de una muestra proteínica con el fin de obtener su composición. La hidrólisis ácida es el procedimiento generalizado disponible para la gran variedad de proteínas; y es costumbre tratar la proteína con 2.5 a 5000 veces su peso con HCl 6 N y mantener la solución bajo reflujo por espacio de 18 a 24 horas; sin embargo en el procedimiento que se utilizó, se usó la modificación del tiempo y la temperatura, además de adicionar fenol (0.1 %) al ácido clorhídrico para la hidrólisis de la proteína. La muestra se hidrolizó durante 4 horas a una temperatura de 145 ± 1 °C, para después separarla por cromatografía en columna (34).

EQUIPO Y MATERIALES.

- * Autoanalizador de aminoácidos marca Technicon, mod NC-2P.
- * Digestor marca Tecator, mod Ab 20 / 40.
- * Potenciómetro marca CORNING, mod 10.
- * Rotavapor marca BUCHI, mod R.
- * Vortex LAB - LINE INSTRUMENTS, mod Super - mixer No.1290.
- * Microjeringa marca HAMILTON, mod 1001 - LTN.
- * Tubos de cultivo de pared gruesa con tapón de rosca y cubierta de teflón PYREX No.9826.

REACTIVOS Y SOLUCIONES.

- A. Acido clorhídrico 6 N con 0.1 % de fenol
 - B. Metil-celolve al 50%
 - C. Estándar interno de norleucina 0.1 μ M
 - D. Amortiguador de acetato de sodio 4 N (a).
 - E. Sulfato de hidrazina (b).
 - F. Ninhidrina (c).
 - G. Solución lavadora (d).
 - H. Amortiguador de dilución (e).
 - I. Amortiguadores de acetatos para regeneración y elución (f).
 - J. Hidróxido de sodio 0.1 N
- (a). Amortiguador de acetato de sodio 4 N. Se colocaron aproximadamente 3 litros de agua destilada en un dispositivo de agitación, se adicionaron lentamente 1312 g de acetato de sodio anhidro para prevenir la cristalización; si se

requiere se puede calentar para la completa solubilización de la sal. Una vez fría la solución se le añadieron 400 mL de ácido acético glacial lentamente y se dejó enfriar. Por último se aforó a 4 litros. NOTA: El pH de este amortiguador debe ser de 5.51 ± 0.02 ; si se requiere ajustar se debe usar álcali o ácido concentrado, ya que, 4.0 g de NaOH apenas incrementa dicho amortiguador en 0.04 unidades de pH.

- (b). Sulfato de hidrazina. Se pesaron 1.049 g de sulfato de hidrazina que se disolvieron en agua bidestilada y desionizada, a continuación se adicionaron 0.4 mL de ácido sulfúrico concentrado (RA) y 30 mL de solución BRIJ - 35 al 20 %, se llevó esta solución a un volumen de 4 litros; para su conservación se requirió adicionar 0.8 mL de ácido caprílico como conservador. Evitando agitar vigorosamente por que esta solución tiende a la formación de abundante espuma.
- (c). Ninhidrina. Se disolvieron 40 g de ninhidrina en 2 litros de metil – celosolve, a continuación, se adicionó lentamente 1 litro del amortiguador de acetato de sodio 4 N. Por último se aforó a un volumen de 4 litros.
- (d). Solución lavadora. Agua – etanol (3:1; v / v) con hidroquinona al 0.01 % como agente antioxidante.
- (e). Amortiguador de dilución. Se preparo una solución de ácido clorhídrico 0.2 N (A) y una solución de cloruro de sodio 0.2 M (11.69 g / L) (B). Se tomaron 50.0 mL de (A) y 33.3 mL de (B), se aforaron a 200 mL con agua destilada y adicionó hidroquinona al 0.01 %. El pH del amortiguador debe ser de 1.50 ± 0.05 .

(f). Amortiguadores de acetatos de regeneración y elución para la corrida del hidrolizado ácido de una proteína. Columna de 470 mm X 5 mm:

REACTIVO (grado analítico)	BUFFER #1 Regeneración de la resina	BUFFER # 2 Elución de aa ácidos y neutros	BUFFER # 3 Elución de aa básicos	NaOH 0.2N Lavar la resina
Acetato de sodio (anhidro) (PM=82.03)	4.10 g	5.00 g	87.00 g	--
Acido acético glacial (PM=60.05)	20.00 mL	15.00 mL	20.00 mL	--
Solución de acetato de zinc 0.5M (110g/L)	--	1.00 mL	2.00 mL	--
Alcohol etílico (absoluto) (PM=46.02)	78.00 mL	78.00 mL	--	--
Alcohol benzílico (PM=108.14)	--	--	11.00 mL	--
Hidroquinona (antioxidante) (PM = 110.1)	0.11 g	0.11 g	--	--
Solución BRIJ-35 AL 20% (MERCK # 1962)	8.00 mL	8.00 mL	8.00 mL	--
EDTA (sal disódica) (PM= 372.24)	0.10 g	--	--	1.00 g
Hidróxido de sodio lentejas (lentejas) (PM=40)	--	--	--	8.00 g
Ácido caprílico (conservador) (P.M=144.22)	0.20 mL	0.20 mL	0.20 mL	--
Agua destilada y desionizada	1.00 L	1.00 L	1.00 L	1.00 L
pH (ajuste en el potencio- metro en escala expandida)	4.00 ± 0.02	4.10 ± 0.02	5.4 ± 0.02	--
Concentración de Na ⁺ (M)	0.05 M	0.06 M	1.06 M	0.20 M
Concentración de Zn ⁺⁺ (M)	0.00 M	3.0X10 ⁻⁴ M	1.0X10 ⁻³ M	0.00 M

Forma de preparar las soluciones amortiguadores:

1. En un recipiente con agitación se puso la mitad del volumen de agua (0.5 L) y se disolvieron todos los componentes sólidos (sales).
2. Después se adicionaron los reactivos líquidos o las soluciones correspondientes a excepción del ácido caprílico, el cual se adicionó hasta después de ajustar el pH.
3. Una vez disueltos todos los reactivos en la mitad del volumen, se procedió a adicionar más cantidad de agua hasta llevar a un volumen aproximado de 900 mL con el fin de tener margen para poder proceder a ajustar el pH.
4. Se ajusto el pH del amortiguador al pH deseado con la ayuda de un potenciómetro de escala expandida; el cual, previamente se calibró con exactitud con un buffer de referencia (de preferencia de pH = 4.00).
5. Una vez ajustado el volumen se aforó en un matraz volumétrico de 1 L. Para evitar problemas se adicionan 2 o 3 gotas de ácido caprílico, que rompieron la espuma formada.
6. Al amortiguador ajustado y aforado, se filtró por medio de papel filtro con ayuda de vacío, con la finalidad de eliminar cualquier partícula extraña, ya que estas soluciones pasan a través de la resina de intercambio iónico.
7. En el recipiente final del amortiguador se adicionó la cantidad especificada de ácido caprílico (como conservador) y a continuación se vació el amortiguador ya aforado y filtrado a dicho recipiente.

PROCEDIMIENTO:

Se pesó dentro del tubo de hidrólisis la cantidad de muestra necesaria (fórmula 4.1) finamente molida y desengrasada (cuando el contenido sea mayor del 5 %). A continuación se adicionó con mucho cuidado la cantidad de ácido

requerida (fórmula 4.2), tratando de que toda la muestra se humedeciere con el reactivo de hidrólisis; de ser necesario para lo anterior se puede ayudar con un agitador mecánico (Vortex).

$$A = \frac{0.05 \times 100}{\%P}$$

fórmula 4.1

$$B = \frac{4 \times 100}{\%P}$$

fórmula 4.2

donde:

A = cantidad de muestra en gramos

B = mL de ácido (HCl 6 N)

$\%P$ = porcentaje de proteína en la muestra

Se insufló nitrógeno de alta pureza, se cerro perfectamente con el tapón de rosca y cubierta de teflón. El material se sometió a condiciones de hidrólisis en el digestor Tecator a $145^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 4 horas (contadas a partir del momento en que se colocó en el digestor).

Una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis se dejó enfriar, se transvasó cuantitativamente a un matraz de bola de 100 mL, lavando la boquilla con agua desionizada, se añadió al tubo 5.0 mL de norleucina que se transvasó cuantitativamente al matraz, se adicionó agua lavadora al tubo y se transvasó nuevamente al matraz, repitiendo una segunda vez este procedimiento con agua lavadora. El hidrolizado obtenido en el matraz de bola se trabajó en el rotavapor llevándolo a sequedad con el fin de eliminar el exceso de ácido clorhídrico; a continuación se agregó agua desionizada al matraz para resuspender el hidrolizado y poderlo filtrar a través de papel filtro No. 52 con ayuda de vacío; se consideró conveniente dar lavados de 5.0 mL para enjuagar el matraz de bola, procurando que el volumen fuera menor de 25.0 mL, se ajustó el pH = 6.8 ± 0.2

con ayuda de un potenciómetro, añadiendo NaOH 5 N para ajustarlo, posteriormente se aforó a 25.0 mL y se le insufló nitrógeno; se guardó en congelación hasta su uso.

Para inyectar el anterior hidrolizado en el autoanalizador, se diluyó con el amortiguador de dilución (pH = 1.5), en una proporción de 1:1 (o sea que el aforo real del hidrolizado es de 50.0 mL) de esta dilución, se procedió a filtrar una parte a través del dispositivo Millipore, para lo cual, se descartaron las primeras cinco gotas del filtrado y el restante se utilizó para inyectar en el autoanalizador de 100 a 200 μ L. En este caso se inyectaron 100 μ L. Previamente hay que correr una solución estándar de aminoácidos que contenga 0.025 μ M de cada uno, para que de este aminograma se pueda obtener el área de cada uno de los aminoácidos, además tanto en el estándar como en la muestra se debe de adicionar una cantidad constante y conocida del aminoácido sintético norleucina, para poder hacer los cálculos en base a los llamados equivalentes de norleucina de cada uno de los aminoácidos.

CALCULOS: De los aminogramas del estándar y de la muestra se identificaron los picos correspondientes a cada uno de los aminoácidos por su tiempo de retención y se calculó el área bajo la curva de cada uno de los aminoácidos [A], así como el área de norleucina en el correspondiente aminograma; para lo anterior, fue conveniente trabajar con la mitad superior de cada uno de los picos, para evitar trabajar con la línea base que en ocasiones es demasiado irregular, usando la siguiente fórmula:

$$[A] = \text{ancho de la mitad del pico} \times \text{altura del pico}$$

Se determinaron los equivalentes de norleucina de cada uno de los aminoácidos en el estándar:

$$E.Naa = \frac{ANstd}{Astd}$$

donde:

$E.Naa$ = equivalente de norleucina del aminoácido correspondiente.

$ANstd$ = área de norleucina del estándar.

$Astd$ = área del aminoácido correspondiente en el estándar.

Se determinaron los μM de aminoácido [B]:

$$B = \frac{[A]}{ANm} \times E.Naa \times \mu Mstd$$

donde:

ANm = área de norleucina de la muestra.

$\mu Mstd$ = micromoles del aminoácido correspondiente.

Se determinaron los gramos de aminoácido [C]:

$$C = \frac{[B] \times P.M.}{10^6}$$

donde:

$P.M.$ = peso molecular del aminoácido correspondiente.

Se determinaron los miligramos de aminoácido / g de N [D]:

$$D = \frac{[C] \times A \times 1000}{a \times gN}$$

donde:

A = aforo.

a = alícuota (inyección al autoanalizador).

gN = gramos de nitrógeno en la muestra.

4.4.3. Determinación de triptófano.

FUNDAMENTO: Debido a que la hidrólisis ácida (que se usa comúnmente para la determinación de la mayoría de los aminoácidos de una proteína), destruye completamente el triptófano, se hace uso de la hidrólisis alcalina, y en la actualidad ésta ha quedado restringida para el caso particular de triptófano y tirosina, y aunque se reporta una gran variedad de reactivos para llevarla a cabo, el uso de LiOH parece producir buenos resultados en muestras alimenticias; una vez obtenido el triptófano libre, se determina por cromatografía en columna (35).

MATERIALES Y REACTIVOS.

- * Micro – jeringa HAMILTON, mod. 1001 –LTN.
- * Digestor marca TECATOR Mod. Ab 20 / 40.
- * Potenciómetro marca CORNING, Mod. 10.
- * Autoanalizador de aminoácidos marca TECHNICON, mod. NC – 2P.
- * Hidróxido de litio 4N.
- * Tubos de cultivo de pared gruesa con tapón de rosca PYREX No. 9826.
- * Ácido orto - fosfórico concentrado (85%).
- * Amortiguador de acetatos de sodio 4N (a).
- * Amortiguador de acetatos para regeneración y elución (b).
- * Metil – celosolve al 50%.
- * Sulfato de hidrazina (c).
- * Ninhidrina (d).
- * Solución lavadora (e).

Las soluciones a, c, d y e se preparan de la misma manera en el punto 4.4.2.

(b). Amortiguadores para la corrida del hidrolizado alcalino de una proteína

REACTIVO (grado analítico)	BUFFER #1 Regeneración de la resina	BUFFER # 2 Elución de aa del hidrolizado alcalino	NaOH 0.2N Lavar la resina
Acetato de sodio (anhidro) (PM=82.03)	4.10 g	85.0 g	--
Acido acético glacial (PM=60.05)	11.80 mL	15.00 mL	--
Solución de acetato de zinc 0.5M (110g/L)	--	2.00 mL	--
Alcohol etílico (absoluto) (PM=46.02)	78.00 mL	--	--
Alcohol benzílico (PM=108.14)	--	11.00 mL	--
Hidroquinona (antioxidante) (PM = 110.1)	0.11 g	--	--
Solución BRIJ-35 AL 20% (MERCK # 1962)	8.00 mL	8.00 mL	--
EDTA (sal disódica) (PM= 372.24)	0.10 g	--	1.00 g
Hidróxido de sodio lentejas (lentejas) (PM=40)	--	--	8.00 g
Ácido caprílico (conservador) (P.M=144.22)	0.20 mL	0.20 mL	--
Agua destilada y desionizada	1.00 L	1.00 L	1.00 L
pH (ajuste en el potencio- metro en escala expandida)	3.90 ± 0.02	5.50 ± 0.02	--
Concentración de Na ⁺ (M)	0.05 M	1.03 M	0.20 M
Concentración de Zn ⁺⁺ (M)	0.00 M	1.0X10 ⁻⁴ M	0.00 M

PROCEDIMIENTO:

En un tubo de cultivo de pared gruesa y tapón de rosca, se colocó la cantidad de muestra de acuerdo al contenido de proteína con la fórmula siguiente:

$$mg \text{ de muestra} = \frac{0.1 \times 100}{\% \text{ Proteína}}$$

A continuación se adicionó con cuidado la cantidad de álcali, teniendo la precaución de no salpicar la muestra en la pared del tubo.

$$mL \text{ de álcali} = \frac{4 \times 100}{\% \text{ de proteína}}$$

Una vez que se tuvo la cantidad de muestra y álcali adecuada, se cerró el tubo perfectamente y se colocó en el digestor a 145°C. El tiempo de hidrólisis va de 4 a 8 horas de acuerdo al % de proteína de la muestra.

Tiempo de hidrólisis	
% de proteína	Tiempo (horas)
9 a 35	8
35 a 65	6
Más de 65	4

Transcurrido el tiempo de hidrólisis, se dejó enfriar el tubo y se transvaso cuantitativamente a un vaso de precipitados, se agrego 5 mL de arginina y se ajusto el pH del hidrolizado con ácido orto – fosfórico concentrado (6.6 - 7.0). Se filtró con papel Whaman # 542 dando algunas lavadas, con solución lavadora al vaso; el hidrolizado ya filtrado se pasa a un matraz de bola para eliminar el exceso de disolvente con ayuda de un rotavapor, para poder aforar a 25 mL. Una vez que se tiene el hidrolizado listo, se procede a inyectar al autoanalizador de aminoácidos 100 µL, con una microjeringa Hamilton. Previamente hay que correr una solución estándar de aminoácidos que contenga 0.025 µM de triptófano, para de esta poder calcular el área que nos servirá como referencia para los cálculos, que se hacen de la misma forma que en el punto anterior.

4.4.4. Calificación química (CQ).

FUNDAMENTO: Se basa en señalar la cantidad del aminoácido indispensable que esta en mayor deficiencia en la proteína en estudio, al compararla con el nivel presente en una proteína de referencia; en este caso, se tomo como referencia las necesidades de aminoácidos sugeridos por la FAO (cuadro 2). El aminoácido que se encuentra en menor cantidad con respecto al estándar, es el aminoácido limitante, puesto que determina la utilidad de la proteína (26).

La calificación química para cada aminoácido se calculan mediante la siguiente relación:

$$CQ. = \frac{Ay \times Ee}{Ae \times Ey} \times 100$$

donde:

A = aminoácido esencial

y = problema

E = total de aa esenciales

e = estándar

4.4.4. Digestibilidad "in vitro".

FUNDAMENTO: En la actualidad se han desarrollado y tratado de establecer procedimientos "in vitro" capaces de sustituir a los procedimientos "in vivo", los cuales, tratan de igualar las condiciones de digestión para determinar la biodisponibilidad de las proteínas (36).

MATERIALES Y REACTIVOS.

- * Frascos de digestibilidad.
- * Potenciómetro CORNING Mod 10.
- * Baño de agua con agitación marca. LAB – LINE INSTRUMENTS.

- * Solución A. (a)
- * Solución B. (b)

- (a). Solución A: 227040 BAEE unidades de tripsina (tipo IX) + 1860 BAEE unidades de α -quimotripsina (tipo II) + 0.520 L– leucina β -naftilamina unidades de pepsidasa en 10 mL de agua
- (b). Solución B: 65 unidades de caseína de proteasa bacteriana en 10 mL de agua.

PROCEDIMIENTO:

Se partió de una cantidad de muestra que contenía 10 mg de N, se le adicionaron 10 mL de agua destilada y se mantuvo en agitación durante 1 h a una temperatura de 37 °C. Después se ajustó a pH = 8 ± 0.03 con adición de HCl y NaOH 0.1 N. Inmediatamente se adicionó 1 mL de la solución A y se dejó 10 minutos exactos con agitación a 37 °C; transcurrido el tiempo, se añadió 1 mL de la solución B y se dejó 9 minutos con agitación a 55 °C, pasado el tiempo, se colocó la muestra en un baño a 37 °C durante 1 minuto e inmediatamente se midió el valor de pH, a los 20 minutos de haber adicionado la solución A.

El por ciento de digestibilidad se obtiene, sustituyendo el valor de pH obtenido, en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de digestibilidad} = 234.84 - 22.56 (\text{pH})$$

4.5. Toxicidad Aguda

FUNDAMENTO: Los estudios de toxicidad aguda, implican una sola administración de la sustancia química por un periodo de 24 horas (24).

MATERIALES Y REACTIVOS.

- * Ratonos blancos cepa NHI de 18-25 g de peso machos.
- * Jaulas de acrílico con comederos y bebederos.
- * Marcador de orejas metálico.
- * Jeringa hipodérmica de 1.0 mL
- * Agujas especiales para la administración oral.
- * Balanza granataria para animales de laboratorio.
- * Solución de buffer de fosfatos a pH = 7

PROCEDIMIENTO:

SELECCION DE LA ESPECIE ANIMAL. Para este estudio se escogieron ratones machos de 3-4 semanas de edad con un peso aproximado de 18 a 20 g.

PREPARACION DE LA MUESTRA. Por lo general los tóxicos deben administrarse por la misma vía por la cual los seres humanos quedarían expuestos. La ruta oral es la que se utiliza más comúnmente. Usualmente se requiere un medio portador para disolver o suspender el tóxico a fin de facilitar su administración.

Se usó como vehículo para disolver el concentrado proteínico de la almendra del capulín una solución de buffer de fosfatos a pH = 7 porque se solubilizó totalmente la muestra. La solución debe prepararse al momento de la administración.

DOSIFICACION. Para la dosificación se debe administrar un volumen, el cual sea lo suficientemente grande para medirlo con facilidad, pero a su vez debe ser lo recomendable para no producir traumatismo al animal. Con respecto a lo

anterior, el máximo volumen permitido en ratones por vía oral es de 1.0 mL; por lo tanto, si se define como 1D la dosificación de 0.01 mL / g pc, podemos administrar hasta una dosificación de 5D (5 X 0.01mL /g pc X 20 g pc = 1.0 mL).

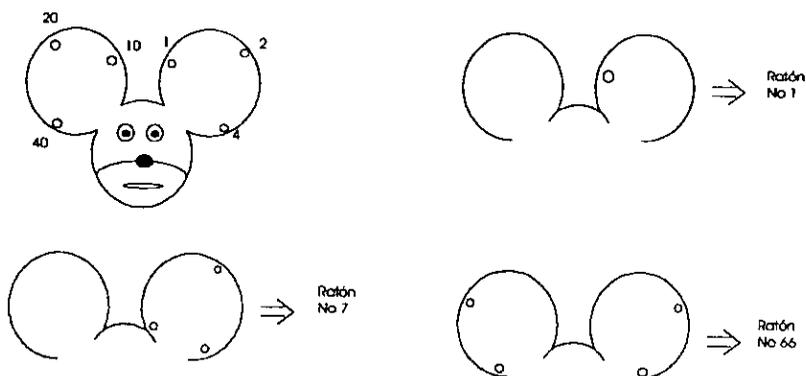
La dosis a administrar fue de 15.0 g / Kg pc, la cual, es la dosis máxima para que pueda considerarse inocuo un agente xenobiótico y la dosificación seleccionada fue de 4D, para que el volumen administrado no fuera mayor de 1 mL, por lo que se preparó una suspensión del material con la concentración siguiente:

$$\frac{15 \text{ mg xenobiótico}}{\text{g p.c.}} \times \frac{1.0 \text{ g p.c.}}{0.04 \text{ mL}} = 375 \text{ mg / mL}$$

La cantidad de solución administrada se calculó de la siguiente manera:

$$4D = 0.04 \text{ mL / g de peso del animal}$$

ENSAYO. Una vez que se tuvo la dotación de animales, se les suprimió el alimento la noche anterior al experimento y solamente se les dejó el agua, ya que, se debe realizar la administración con 12 horas de ayuno. Los ratones fueron pesados y marcados con un orador especial de acuerdo a la siguiente anotación acumulativa:



Los animales marcados se repartieron en los diferentes lotes de acuerdo a la distribución de "culebra japonesa" (apéndice I), se colocaron como mínimo 5 ratones por lote en una misma jaula. Se utilizó un lote como control, al cual, se le administró solo el vehículo. Para la administración oral en el ratón, éste se sujetó con la mano izquierda de la nuca y el pescuezo; la jeringa llena con la aguja especial se introdujo lateralmente a través del espacio interdental, y con una suave rotación se avanzó dentro del esófago hasta un nivel conveniente para después descargar el líquido.

Una vez administrado el agente tóxico se restituyó el alimento y se dejó a los animales en observación por espacio de 48 horas (máximo) con el fin de observar los efectos clínicos (apéndice II).

4.6. Destoxificación: aislamiento la fracción proteínica más abundante.

Si en el bioensayo de toxicidad aguda, el material a probar, resulta con grado significativo de toxicidad, se tendrá que destoxificar haciendo una purificación del material, tratando de obtener un aislado de proteína. Para realizar lo anterior, se aprovechan las propiedades de solubilidad de las diferentes proteínas que componen a esta fracción; por lo cual será requisito conocer la curva de solubilidad.

4.6.1. Curva de solubilidad de la fracción proteínica.

FUNDAMENTO: Los valores de solubilidad pueden variar de acuerdo con el camino seguido para establecer las condiciones de pH, fuerza iónica, temperatura y concentración iónicas finales (37).

EQUIPO Y MATERIAL.

- * Potenciómetro CONRNING modelo 10
- * Bomba de agua
- * Frascos de digestibilidad y mangueras
- * Parrilla de calentamiento y agitación modelo PC-320

REACTIVOS Y SOLUCIONES.

A. Solución de hidróxido de sodio 2N

B. Solución de ácido clorhídrico 2N

PROCEDIMIENTO:

Se montó un dispositivo como el de la figura 4; se pesó 1.0 g de harina desengrasada y finamente molida en un micromolino de 1 mm de diámetro; se colocaron en un frasco para digestibilidad y se agregaron 20 mL de solución salina 0.2 N a 0 °C con agitación constante. Se ajustó el pH adicionando NaOH 2 N o HCl 2 N hasta los pH deseados (pH = 3, 5, 7, 9, 11, 13); se agitó durante 30 minutos a 0 °C. Se dejó reposar 30 minutos y se tomaron 20 μ L del sobrenadante. Por último se determinó el por ciento de proteína soluble en cada muestra, por el método de Lowry, y se gráfico el % de proteína soluble vs pH.

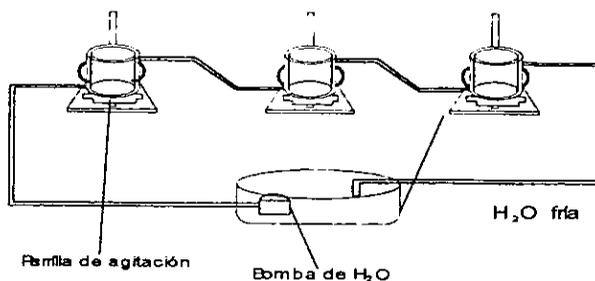


Figura 4. Dispositivo para los ensayos de solubilidad

4.6.2. Selección del medio de filtración adecuado.

Una vez solubilizada la fracción proteínica más abundante fue necesario filtrar la solución para eliminar los polisacáridos, para lo cual, se requirió determinar el medio de filtración adecuado que permitiera retener la mayor cantidad de impurezas, pero sin retener proteína.

- (a). Se pesó 1.0 g de muestra en 20 mL de NaCl en el dispositivo de la figura 4.
- (b). Se ajustó el pH al cual se obtuvo un mayor contenido de proteína soluble y se agitó durante 30 minutos a 0 °C.
- (c). Se tomaron tres muestras de 5.0 mL cada una, se filtraron a vacío en papel Watman No. 541, en papel medio, y en papel grueso respectivamente.
- (d). El medio de filtración, con los sólidos totales se secaron y se pesaron, para determinar la cantidad de sólidos retenidos.
- (e). De cada filtrado se tomaron alícuotas de 50 μ L cada una por triplicado y se le determinó el % de proteína soluble por el método de Lowry para cuantificar en donde existía mayor cantidad de proteína soluble y menor impurezas.

4.6.3. Determinación de proteína soluble por el método de Lowry.

Modificación del método de Lowry que da una respuesta fotométrica lineal.

FUNDAMENTO: Se basa en la reacción del fosfomolibdato, en solución alcalina, con los residuos de tirosil de las proteínas; se utiliza Cu^{2+} para incrementar la sensibilidad de la reacción. El color azul que se forma es bastante estable y tiene un máximo de absorbancia a 650 nm (38).

EQUIPO Y MATERIAL

- * Baño María con termostato y homogenizador marca Grant mod SE10
- * Pipeta automática Labsystems de 200 – 1000 μL y de 50 - 100 μL
- * Espectrofotómetro Sequoia - Torner mod 340 y fotoceldas

REACTIVOS Y SOLUCIONES.

A. Reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma cat 2790)

B. Hidróxido de sodio 1.0 N

C. Albúmina bovina (Sigma cat A - 3425)

D. Solución I: tartrato de sodio y potasio y carbonato de sodio (a)

E. Solución II: tartrato de sodio y potasio y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (b)

F. Solución III: (c)

(a). Solución I: Disolver 2.0 g de tartrato de sodio y potasio y 100 g de carbonato de sodio en 500 mL de solución 1 N de NaOH y aforar a 1000 mL con agua

(b). Solución II: Disolver 2.0 g de tartrato de sodio y potasio, 1.0 g de CuSO_4 pentahidratado en 90 mL de H_2O . Aforar a 100 mL con solución 1 N de NaOH.

(c). Solución III: Un volumen del reactivo de Folin – Ciocalteu se diluye en 15 volúmenes de agua. Esta solución se preparó diariamente y debía tener una normalidad entre 0.15 N y 0.18 N cuando se titula a $\text{pH} = 10$ con NaOH.

PROCEDIMIENTO:

CURVA ESTANDAR. Se utilizó una solución de albúmina bovina cuya concentración era equivalente a 360 μg / mL en agua destilada.

La curva de calibración o estándar cumple con la ley de Lambert y Beer en el rango de 36 – 324 μg de proteína.

Los estándares fueron sometidos al mismo procedimiento de análisis que las muestras problema.

CURVA DE CALIBRACION

Tubo	μL de solución estándar	μL de agua	Concentración (μg)
Blanco	0	1000	0
1	25	975	9
2	50	950	18
3	75	925	27
4	100	900	36
5	200	800	72
6	300	700	108
7	500	500	180
8	700	300	252
9	900	100	324

Se rotularon los tubos, se ajusto el volumen a 1.0 mL con agua destilada; se añadieron 0.9 mL de la solución I con agitación suave para permitir que se mezclaran; se colocaron en baño de María a 50 °C por 10 minutos, después de los cuales, se sacaron y se dejaron a temperatura ambiente (21 °C – 25 °C), ya fríos se les agregó 0.1 mL de la solución II. Se conservaron a temperatura ambiente por 10 minutos y después se trataron con 3.0 mL de la solución III, la cual fue, adicionada de manera rápida y con cierta presión para asegurar que se mezclaran en cuestión de 1 a 2 segundos.

Los tubos fueron nuevamente colocados en el baño de agua a 50 °C por 10 minutos y enfriados a temperatura ambiente, para finalmente proceder a la lectura de la densidad óptica a 650 nm.

4.6.4. Diagrama de bloques para la obtención del aislado proteínico.

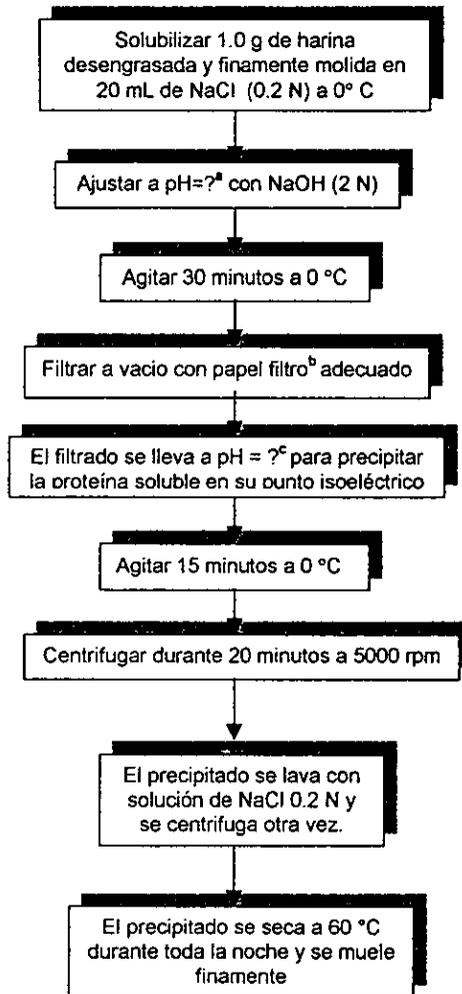


Figura 5. Diagrama general para aislar la fracción proteínica

- Ajustar el pH al cual se obtuvo mayor solubilización de la proteína.
- Filtrar con el papel filtro donde se obtenga mayor contenido de proteína soluble en el filtrado y eliminación de mayor residuo.
- Ajustar el pH al punto isoeléctrico de la proteína para su precipitación.

4.7. Toxicidad subaguda.

FUNDAMENTO: Los seres humanos están expuestos con mayor frecuencia a productos químicos en niveles mucho más bajos que los que son agudamente fatales, pero están expuestos en periodos o tiempos más largos. Para evaluar la naturaleza de los efectos tóxicos en estas situaciones más reales, se realizan estudios de toxicidad a corto y largo plazo (24).

MATERIALES Y REACTIVOS.

- * 15 ratones machos cepa NHI de 18 - 25 g de peso.
- * Rack jaulas de acero inoxidable con comederos y bebederos.
- * Balanza granataria para animales de laboratorio.
- * Balanza analítica para pesar el alimento.
- * Tubos capilares heparinizados.
- * Microtainer brand tubes con EDTA, Becton Dickinson Vacutainer No. 365973
- * Desecador con atmósfera de éter etílico para anestesiarse.
- * Equipo automatizado marca Sysmex NE – 1500 para citometría hemática.

PROCEDIMIENTO:

SELECCION DE LA ESPECIE. Para los estudios de toxicidad generalmente se eligen ratones, por su fácil manipulación, porque son económicos y se consiguen con facilidad. Para el estudio se ocuparon ratones machos de la especie NHI de 3 - 4 semanas de edad, de 15 – 19 g de peso corporal, a fin de observar su crecimiento durante el bioensayo.

PREPARACION DE LA MUESTRA. La administración oral se utiliza comúnmente con ayuda de una sonda esofágica, pero para periodos largos resulta ser estresante para el animal; por lo que, la administración se dio por vía oral, pero por medio de pellets (alimento para ratones usado en el bioterio).

Para la preparación de la muestra se utilizaron pellets de composición conocida (cuadro 3), los cuales se molieron finamente y se mezclaron con la harina de la muestra según la dosis a emplear; se adicionó la cantidad de agua necesaria para formar una pasta y se elaboraron pellets de 2 X 1 cm², se secaron a una temperatura de 50 - 60°C durante toda la noche y se dejaron enfriar para después guardarlos en un frasco.

Cuadro 3. Composición de los pellets*.

Determinación	%
Humedad	12.0
Proteína	23.0 - 23.4
Grasa	4.5
Fibra	5.3 - 6.0
Cenizas	6.9 - 8.0
Carbohidratos	49.0

* marca Ralston Rations (importada por la empresa Purina)

DOSIFICACION. Para la dosificación se utilizó una dosis de 15.0 g / kg pc y se sabe de estudios previos (39) que un ratón de 25 g de peso corporal consume un promedio de 5 g de alimento por día.

Así tenemos que:

$$\frac{15 \text{ g muestra}}{1000 \text{ g p.c.}} \times \frac{25 \text{ g p.c.}}{\text{ratón}} = 0.375 \text{ g muestra / ratón}$$

Además:

$$\frac{0.375 \text{ g muestra}}{\text{día}} \times \frac{1 \text{ día}}{5 \text{ g de alimento}} = 0.375 \text{ g muestra / 5.0 g de alimento}$$

Por lo tanto:

$$\frac{0.375 \text{ g de muestra}}{4.625 \text{ g de harina de pellets}} \left. \vphantom{\frac{0.375 \text{ g de muestra}}{4.625 \text{ g de harina de pellets}}} \right\} 7.5\%$$

Entonces para obtener la dosis de 15.0 g / kg pc se elaboraron nutricubos o pellets con el 7.5 % del material a estudiar.

DISTRIBUCION DE LOS ANIMALES. Se pesaron los ratones y se repartieron en tres lotes de acuerdo a la distribución de la "culebra japonesa", con un mínimo de 5 ratones por lote, en jaulas individuales.

SANGRADO OCULAR. Se procedió a realizar el sangrado ocular, para lo cual, se uso una cámara provista de éter etílico, en donde se colocó al ratón por espacio de unos minutos hasta observar que ya estaba anestesiado, a continuación se sacó rápidamente y se sujetó de la nuca, con la mano izquierda, sobre la mesa de cirugías; se introdujo un tubo capilar heparinizado por la parte posterior del ojo para recolectar aproximadamente 250 µL de sangre en un tubo Microtainer, que se agitó de inmediato, para incorporar el anticoagulante. El sangrado, para este estudio, se realizó también a la mitad y al final del estudio.

ADMINISTRACION. Se colocó una cantidad conocida de alimento y agua (ligeramente acidulada para evitar la formación de hongos) cada tercer día al alcance del ratón y se colocó una charola de papel amarillo debajo de cada jaula con el objeto de recolectar el alimento desintegrado que no se consumió.

Los animales y el alimento se pesaron tres veces por semana y se llevó el registro de los datos obtenidos (apéndice III) durante todo el estudio. Al finalizar el estudio se elaboraron gráficas del incremento corporal (crecimiento) y consumo de alimento, así como también, se hizo un análisis estadístico entre los lotes para determinar si existía diferencia significativa.

CITOMETRIA HEMATICA. Las muestras de sangre fueron transportadas y procesadas de inmediato, en un equipo automatizado marca Sysmex NE – 1500 de industrias Hitachi, del Japón y se obtuvieron 18 parámetros de la citometría hemática. Al igual que casi todos los citómetros de flujo, la sangre anticoagulada es fraccionada y posteriormente diluida para realizar las cuantificaciones necesarias. La determinación de hemoglobina se hace por el método colorimétrico de punto final, basándose en la formación de sulfohemoglobina; mientras que, por el método de impedancia cuantifica y clasifica los diversos tipos de células que constituyen la sangre.

La variabilidad del equipo automatizado, en los análisis clínicos, ha llevado a calcular el coeficiente de variación (CV) de un procedimiento analítico, que se determina de manera estadística dentro de los programas internos de control de la calidad que deben realizarse. Este coeficiente de variación refleja numéricamente la reproducibilidad y confiabilidad que se tiene para esa cuantificación, bajo las condiciones de trabajo en que se realiza cotidianamente. Mientras más pequeño sea el coeficiente de variación menor es la variabilidad, por lo que, se hicieron análisis estadísticos con los datos obtenidos de la sangre de todos los ratones, pero en este caso, se tomaron en cuenta los coeficientes de variación del método

(cuadro 4) para obtener el rango de variabilidad de cada parámetro, y establecer si existía o no diferencia significativa entre los parámetros de los distintos lotes.

Cuadro 4. Coeficientes de variación del equipo.

Serie roja	RCB	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC
	1.2	1.4	1.4	0.8	1.2	1.3
Serie blanca	WBC	NEUT	LYM	MONO	EOS	BASO
	2.9	2.9	6.3	16.4	4.7	7.2
Serie trombocítica	PLT					
	2.7					

OBSERVACIONES. Durante todo el estudio se observa el comportamiento de los ratones y se hace una evaluación de las mismas características, que en la toxicidad aguda (apéndice II).

4.7.1. Digestibilidad *"in vivo"*.

FUNDAMENTO: La digestibilidad *"in vivo"* de una proteína alimenticia puede ser obtenida por bioensayos con animales de laboratorio, lo cual, sería idealmente la forma de obtenerla, pero son costosos y consumen mucho tiempo; se basa en determinar el porcentaje de la proteína que es absorbida de la dieta (40).

MATERIALES Y REACTIVOS.

- * Tamiz para separar heces.
- * Mortero grande con pistilo.
- * Soluciones para determinación de proteína (ver figura 2)

PROCEDIMIENTO:

Se pesan las heces recolectadas de cada ratón, durante la última semana del ensayo toxicológico, y se guardan en frascos de plástico debidamente rotulados. Se registra el alimento ingerido durante la recolección de las heces.

Las heces de cada ratón se muelen con ayuda de un mortero y se homogeneizan para tomar una muestra de aproximadamente 100 mg de heces molidas. Se determina el % de nitrógeno en el total de las heces de cada ratón y se calcula la digestibilidad de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$D = \frac{N_{\text{ingerido}} - N_{\text{fecal}}}{N_{\text{ingerido}}} * 100$$

5. RESULTADOS Y DISCUSION.

5.1. Parámetros físicos de la semilla.

Se hizo un lote homogéneo con los huesos de capulín de las distintas regiones de donde fueron recolectados y se tomo una muestra representativa del lote (250 g) al cual se le peso la cáscara y la almendra, obteniendo la proporción que se presenta en el cuadro 5.

Cuadro 5. Proporción de la almendra en la semilla.

	%
Cáscara	73
Almendra	27

La almendra es de forma más o menos ovalada, de color beige claro y presentó una proporción menor comparada con las estudiadas anteriormente (9), en donde, la proporción de la almendra fue del 33%, es decir, solo se puede aprovechar aproximadamente la tercera parte de las semillas de capulín. Dicha variación es debido a que los huesos de capulín fueron recolectados en diferentes regiones.

5.2. Caracterización bromatológica de la almendra.

Se determinó el análisis proximal de la almendra (cuadro 6) para corroborar su mayor similitud con los lotes antes estudiados (9).

Cuadro 6. Análisis proximal de la almendra integra de capulín.

Determinación (% peso) *	Base húmeda	Base seca
Humedad	3.66	-
Proteína**	30.00	31.14
Grasa***	43.11	44.74
Cenizas	2.53	2.63
Fibra	4.78	4.96
Carbohidratos	15.92	16.52

* Las determinaciones se hicieron por duplicado.

** Para proteína se uso el factor de 6.25

*** El contenido de grasa se realizo con éter de petróleo (reactivo analítico RA)

La composición de la almendra fue muy similar a los lotes antes estudiados (9), con un alto % de proteína y grasa, lo que significa que hay una gran semejanza en la composición de las almendras de distintas regiones.

5.3. Separación de la fracción lipídica.

La fracción extraída con hexano, una vez que se le elimina el disolvente por medio de un rotavapor, se le denomina "grasa cruda"; a continuación se le insufló nitrógeno y se guardo bajo congelación para su posterior estudio en otro trabajo colateral.

5.4. Caracterización química del concentrado proteínico.

A la harina desengrasada libre de disolvente, obtenida de la separación lipídica, se le hizo el análisis proximal por medio del sistema Weende (cuadro 7) para conocer el aporte de los macronutrientes.

Cuadro 7. Análisis proximal del concentrado proteínico.

Determinación (% en peso)*	Base húmeda	Base seca
Humedad	4.15	-
Proteína**	52.36	54.63
Grasa***	5.38	5.61
Cenizas	4.55	4.75
Fibra	5.92	6.18
Carbohidratos	27.64	28.84

* Las determinaciones se hicieron por duplicado.

** Para la proteína se uso el factor de 6.25

*** El contenido de grasa se realizo con éter de petróleo (reactivo analítico RA)

Como se concluye del cuadro 5.3, la harina contiene más del 50 % de proteína, por lo que se considera un auténtico "concentrado proteínico", lo que lo hace una fuente de proteína similar a las tortas residuales de oleaginosas; así mismo, por la disminución de la grasa los carbohidratos aumentaron ligeramente.

5.4.1. Contenido de glucósidos cianogénicos.

Dado que se sabe que la almendra de capulín contiene glucósidos cianogénicos, fue necesario hacer la caracterización química de este tóxico en el "concentrado proteínico" y también en la almendra íntegra de capulín. Para determinar el contenido de glucósidos cianogénicos se desarrollo la curva estándar de ácido cianhídrico (HCN). El cuadro 8 muestra los datos de la curva estándar, mientras que la curva de calibración se presenta en la figura 6.

Cuadro 8. Datos de la curva estándar.

Tubos	µg de HCN	Densidad óptica * (λ = 520 nm)
Blanco	0	0
1	5	0.045
2	10	0.076
3	20	0.132
4	30	0.215
5	40	0.223
6	60	0.318

* Se uso un espectrofotómetro Sequoia - Tomer mod 340

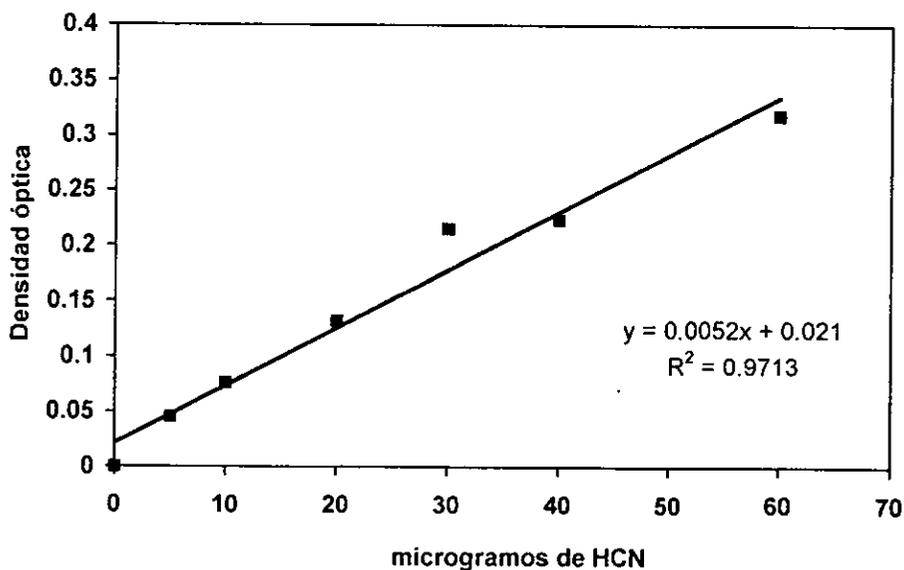


Figura 6. Curva de calibración para determinar la concentración de glucósidos cianogénicos.

Los resultados se presentan a continuación (cuadro 9) para el "concentrado proteínico" y para la almendra integra de capulín.

Cuadro 9. Contenido de glucósidos cianogénicos.

	Glucósidos cianogénicos (mg de HCN / 100 g de muestra)
Almendra	198.17
Concentrado proteínico	369.03

Como se puede concluir del cuadro 9 la concentración de glucósidos cianogénicos se incrementó en el concentrado proteínico, lo cual es lógico de esperar, si consideramos que estos tóxicos no son solubles en disolventes orgánicos.

El contenido de glucósidos cianogénicos que presentan tanto la almendra como el concentrado proteínico se considera tóxico, ya que, el límite permisible máximo es de 10 a 20 mg de HCN / 100g de muestra seca (18).

Además la dosis mínima letal del HCN por vía oral, ha sido estimada entre 0.5 y 3.5 mg / Kg de pc (16,17) lo cual significa que 200 mg pueden ser una dosis letal para un humano adulto de aproximadamente 58 Kg de peso, por lo que, es necesario evaluar la toxicidad aguda o a corto plazo del concentrado proteínico de la almendra de capulín.

5.4.2. Perfil de aminoácidos.

A continuación se presenta la composición de aminoácidos del concentrado proteínico y las necesidades requeridas de aminoácidos para lactantes y adultos sugeridas por la FAO / OMS / ONU (1985).

Cuadro 10. Contenido de aminoácidos del concentrado proteínico.

Aminoácido	Concentrado Proteínico (mg de aa / g N)	Concentrado proteínico (g aa / 100g de proteína)	Necesidades requeridas para lactantes * (g aa / 100 g de proteína)	Necesidades requeridas para adultos (g aa / 100 g de proteína)
Metionina	38.90	0.623	1.6	0.85
Triptófano	103.17	1.651	1.7	0.50
Lisina	172.10	2.754	6.6	1.60
Isoleucina	174.30	2.789	4.6	1.30
Leucina	303.59	4.857	9.3	1.90
Histidina	101.85	1.629	2.6	1.60
Fenilalanina	209.15	3.346	3.5	0.95
Valina	151.89	2.430	5.5	1.30
Treonina	107.03	1.712	4.3	0.90
Cistina	51.62	0.826	2.3	0.85
Tirosina	446.12	7.138	4.5	0.95
Ac aspártico	535.27	8.564	-	-
Ac glutámico	1144.00	18.304	-	-
Glicina / alanina	692.17	11.075	-	-
Prolina	99.37	1.589	-	-
Hidroxiprolina	-	-	-	-
Serina	159.96	2.559	-	-
Arginina	439.65	7.034	-	-

* Composición de aminoácidos de la leche de la mujer.

5.4.3. Calificación química de la proteína (CQ).

La calificación química (CQ) de los aminoácidos indispensables (cuadro 11) fue calculada considerando la histidina como indispensable para los niños y sin histidina en adultos, que es, considerada como no indispensable.

Cuadro 11. CQ de aminoácidos indispensables del concentrado proteínico

Aminoácidos	CQ (Lactantes) *	CQ (Adultos) *
Histidina	96.92	-
Isoleucina	93.70	87.60
Leucina	80.74	> 100
Lisina	64.50	67.92
Metionina / cistina	53.30	33.61
Fenilalanina / tirosina	> 100	> 100
Treonina	61.57	74.99
Triptófano	> 100	> 100
Valina	68.31	73.78

* El SQ se calculó tomando como patrón las necesidades requeridas por la FAO / OMS / UNU (1985) para lactantes y adultos.

Del cuadro anterior se puede concluir, que el aminoácido limitante en el concentrado proteínico es el total de azufrados (metionina + cistina), tanto para lactantes como para adultos, por lo que es el componente que determina el valor global de la proteína, a pesar de que cubre totalmente las necesidades requeridas de triptófano y fenilalanina / tirosina.

5.4.4. Toxicidad aguda.

Se realizó la prueba de toxicidad a corto plazo con el concentrado de la aimendra de capulín, a una dosis única de 15.0 g de xenobiótico / Kg pc por vía oral, la cual es, la dosis máxima para considerar inocuo el material en estudio, por lo que se utilizó una solución con una concentración de 375 mg / mL de la muestra, usando como vehículo buffer de fosfatos a pH = 7 (ver metodología 4.5.2).

Se utilizaron 10 ratones machos de la cepa NIH de 3 - 4 semanas de edad con un peso de 19.66 ± 0.972 gramos. Los ratones pesados y marcados fueron distribuidos en dos lotes de 5 ratones cada uno. Uno de los lotes se utilizó como grupo control al cual se le administró únicamente el vehículo.

La dosis a administrar se dio basándose en el peso corporal del animal utilizando una dosificación 4D asegurando con esto que no se administrará más de 1.0 mL de solución a cada ratón. A continuación se presentan como quedaron conformados los lotes y los mililitros de solución que se les administró a los ratones (cuadro 12).

Cuadro 12. Distribución de los lotes y cantidad de solución administrada.

	ratón	Peso (g)	mL administrados
Control	20	18.2	0.72
	4	19.1	0.76
	13	19.3	0.77
	15	20.4	0.81
	7	20.5	0.82
	ratón	Peso (g)	mL administrados
Concentrado proteínico	0	18.6	0.75
	1	19.1	0.76
	6	19.7	0.79
	12	20.4	0.81
	3	21.3	0.85

Durante la prueba de toxicidad aguda se observó el comportamiento de los animales, evaluándose las características que se muestran en el cuadro 13, en donde se presenta con una X algunos aspectos alcanzados a observar, ya que todos los ratones del lote, al que se les administro el concentrado, proteínico murieron en menos de 3 minutos después de la administración de la muestra; el grupo control no mostró ninguna de las características evaluadas.

Dado el alto grado de toxicidad que presentó el concentrado proteínico y su nula factibilidad para usarlo como complemento en la alimentación, no se procedió a hacer la toxicidad subaguda y fue necesario hacer una destoxificación, por lo que, se purifico la fracción proteínica más abundante del concentrado proteínico para obtener un aislado proteínico libre de glucósidos cianogénicos.

5.5. Destoxificación. Obtención del aislado proteínico

5.5.1. Curva de solubilidad.

El contenido de proteína soluble a diferentes pH's se determinó por el método de Lowry a partir de la gráfica de la curva de calibración (cuadro 14 y figura 7). Los resultados obtenidos se muestran en forma gráfica en la figura 8 denominada curva de solubilidad, de la cual, se puede observar que a pH de 7.0 se obtiene la mayor cantidad de proteína soluble y a pH de 4.0 se obtiene la menor cantidad de proteína soluble, es decir, el punto isoeléctrico al cual precipita la fracción proteínica más abundante; siendo éstas las condiciones óptimas para aislar la fracción proteínica más abundante a partir del concentrado proteínico.

Cuadro 13. Características de comportamiento que se presentaron en el lote del concentrado proteinico.

TOXICIDAD AGUDA											
Descripción: Proteina concentrada de la almendra de capulín											
Vehículo: Buffer de fosfatos											
Via : oral											
Dosis: 15g /Kg p.c.											
Hora	Lordosis	Xifosis	Ataxia	Piloerección	Erección caudal	Agresividad	Aletargamiento	Excitación	Disnea	Cianosis	Hipotermia
Inicio			X				X	X	X		X
1h											
2h											
3h											
4h											
5h											
6h											
7h											
8h											
9h											
10h											
11h											
24h											
72h											

X = Si se observa

Cuadro 14. Datos de la curva de calibración.

Tubos	µg de proteína	Densidad óptica* (λ = 650 nm)
Blanco	0	0.000
1	9	0.060
2	18	0.101
3	27	0.145
4	36	0.200
5	72	0.339
6	108	0.472
7	180	0.707
8	252	0.982
9	324	1.184

* Se uso un espectrofotómetro Sequoia - Tomer mod 340

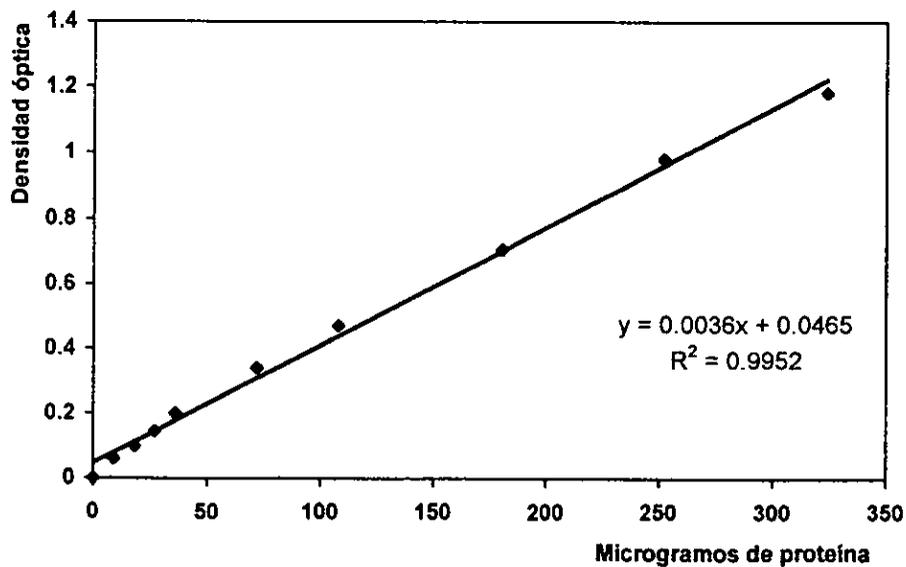


Figura 7. Curva de calibración.

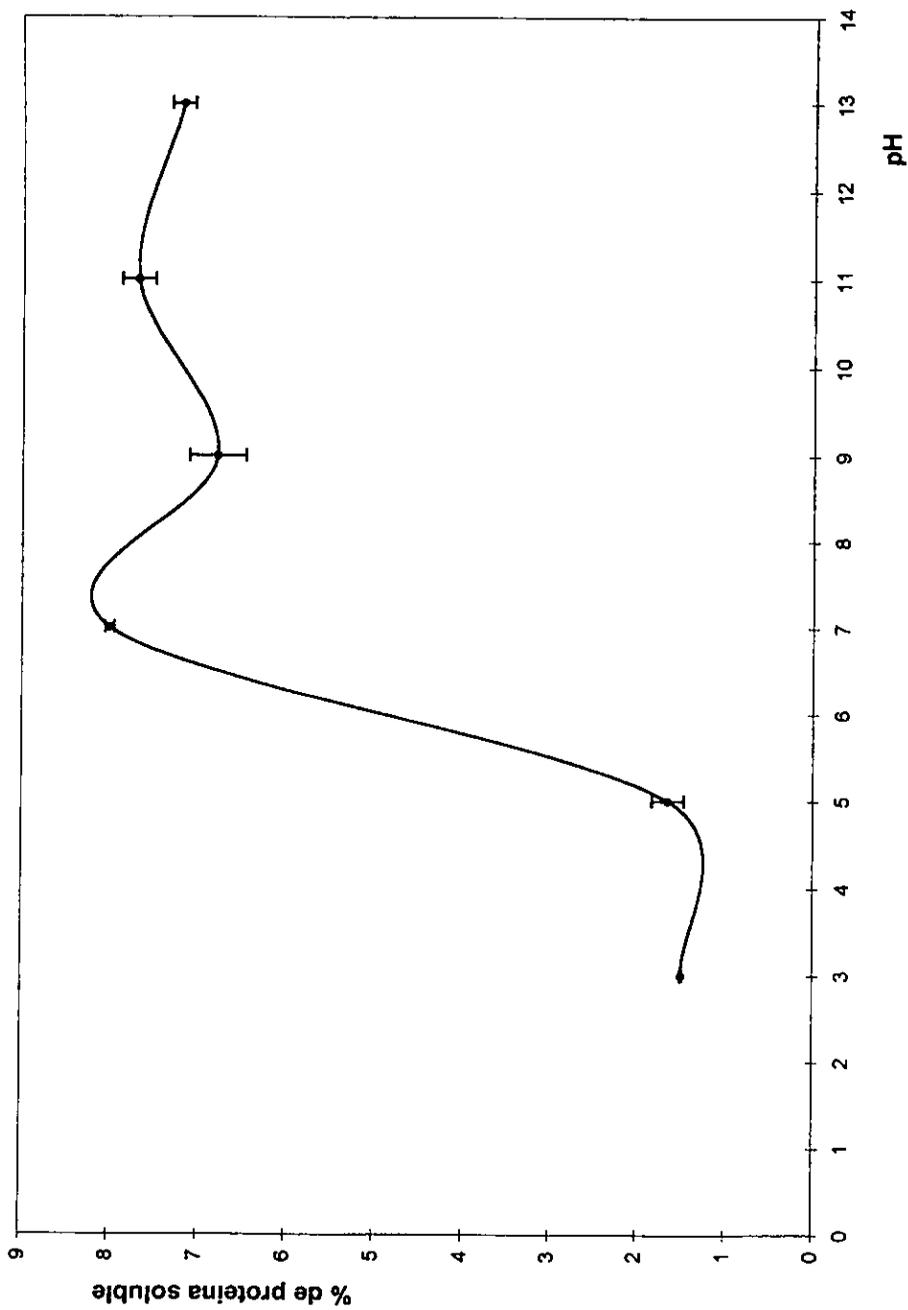


Figura 8. Curva de solubilidad¹

1. La gráfica muestra la curva de solubilidad de la proteína a diferentes pH's

5.5.2. Selección del medio de filtración.

Se probaron tres diferentes medios de filtración (papel Watman No. 541, pellón medio y pellón grueso) para filtrar la proteína solubilizada y así separar las impurezas, para lo cual, se determinó el contenido de proteína soluble en el filtrado, así como también, la cantidad de residuo que quedó atrapado en el medio de filtración (cuadro 15) y elegir el medio de filtración, que retuviera mayores impurezas sin retener proteína, para la purificación de la proteína.

Cuadro 15. Determinación de proteína soluble en el filtrado.

Tipo de papel	mg de proteína / mL *	Residuo (gramos)
Papel Watman No.541	24.89	0.0673
Pellón medio	29.45	0.0691
Pellón grueso	29.16	0.1112

* Las determinaciones se hicieron por triplicado.

Del cuadro 15 se deriva que el filtrado obtenido con el pellón grueso y medio presentan mayor cantidad de proteína soluble y no existe diferencia significativa entre ellos. El residuo obtenido con el pellón grueso es mayor, además, presenta diferencia significativa con respecto a los otros, lo cual, sugiere una mayor retención de impurezas que el pellón medio, por lo que, se escoge el grueso para realizar la filtración de la proteína solubilizada en el proceso de aislamiento de la fracción proteínica.

5.5.3. Condiciones finales para la obtención del aislado proteínico.

A continuación se presentan las condiciones finales (cuadro 16) para la obtención del aislado proteínico (ver diagrama de bloques para la obtención del aislado proteínico).

Cuadro 16. Condiciones finales para obtener el aislado proteínico

Parámetros	Condiciones
Relación harina/agua	1.0 g de harina / 20 mL de solución
pH al cual hay más proteína soluble	7
pH en el que se precipita la proteína	4
Medio de filtración	Pellón grueso
Velocidad de agitación	30 rpm
Revoluciones para la centrifugación	5000 rpm
Temperatura	0 °C

5.5.4. Rendimiento.

Aunque el objetivo del presente trabajo, no abarca la optimización del proceso de obtención del aislado; a continuación se dan algunos detalles:

La purificación se realizó con diferentes cantidades iniciales de harina desengrasada y finamente molida (75 g, 100 g, 150 g y 200 g), obteniendo mayores rendimientos cuando se trabajaba con menor cantidad de harina. El rendimiento del aislado proteínico fue del 36 – 40 %.

5.6. Caracterización química del aislado proteínico.

A la harina obtenida de la purificación (aislado proteínico) se le determinó el análisis proximal (cuadro 17).

Cuadro 17. Análisis proximal del aislado proteínico de la semilla de capulín.

Determinación (% en peso) *	Base húmeda	Base seca
Humedad	5.95	-
Proteína **	80.67	85.74
Grasa ***	0.85	0.90
Cenizas	3.21	3.41
Fibra	1.54	1.64
Carbohidratos	7.78	8.27

* Las determinaciones se hicieron por duplicado.

** Para la proteína se uso el factor de 6.25

*** El contenido de grasa se realizo con éter de petróleo (reactivo analítico RA).

La proteína aislada de la semilla de capulín presenta un contenido elevado de proteína, con respecto al concentrado proteínico de la misma semilla, por lo que, se le considera un aislado proteínico de la almendra de capulín.

5.6.1. Contenido de glucósidos cianogénicos.

El contenido de glucósidos cianogénicos en el aislado no se pudo detectar con precisión, ya que, se obtuvieron densidades ópticas por abajo del límite de detección del método, por lo que, se considera que contiene menos de 1.0 mg de HCN / 100 g de muestra, lo cual indica, que esta casi libre de éste tóxico y que no presenta riesgo alguno para continuar con una mejor caracterización química y los bioensayos respectivos.

5.6.2. Perfil de aminoácidos.

Cuadro 18. Contenido de aminoácidos del aislado proteínico

Aminoácido	Aislado proteínico (mg de aa/ g de N)	Aislado proteínico (g de aa / 100 g proteína)	Concentrado proteínico (g aa / 100g de proteína)
Metionina	54.80	0.877	0.623
Triptófano	83.01	1.33	1.651
Lisina	137.84	2.20	2.754
Isoleucina	133.20	2.13	2.789
Leucina	450.05	7.20	4.857
Histidina	140.53	2.25	1.629
Fenilalanina	338.90	5.42	3.346
Valina	171.09	2.74	2.430
Treonina	171.04	2.74	1.712
Cistina	81.47	1.30	0.826
Tirosina	214.24	3.43	7.138
Ac aspártico	824.24	13.19	8.564
Ac glutámico	1609.62	25.75	18.304
Glicina / alanina	1016.53	16.26	11.075
Prolina	298.83	4.78	1.589
Hidroxiprolina	-	-	-
Serina	196.90	3.15	2.559
Arginina	632.96	10.13	7.034

En la figura 9 se observa, que el contenido de algunos aminoácidos en el aislado proteínico cambiaron con respecto al concentrado proteínico debido al proceso de purificación, como son la lisina, el triptófano, la isoleucina y la tirosina.

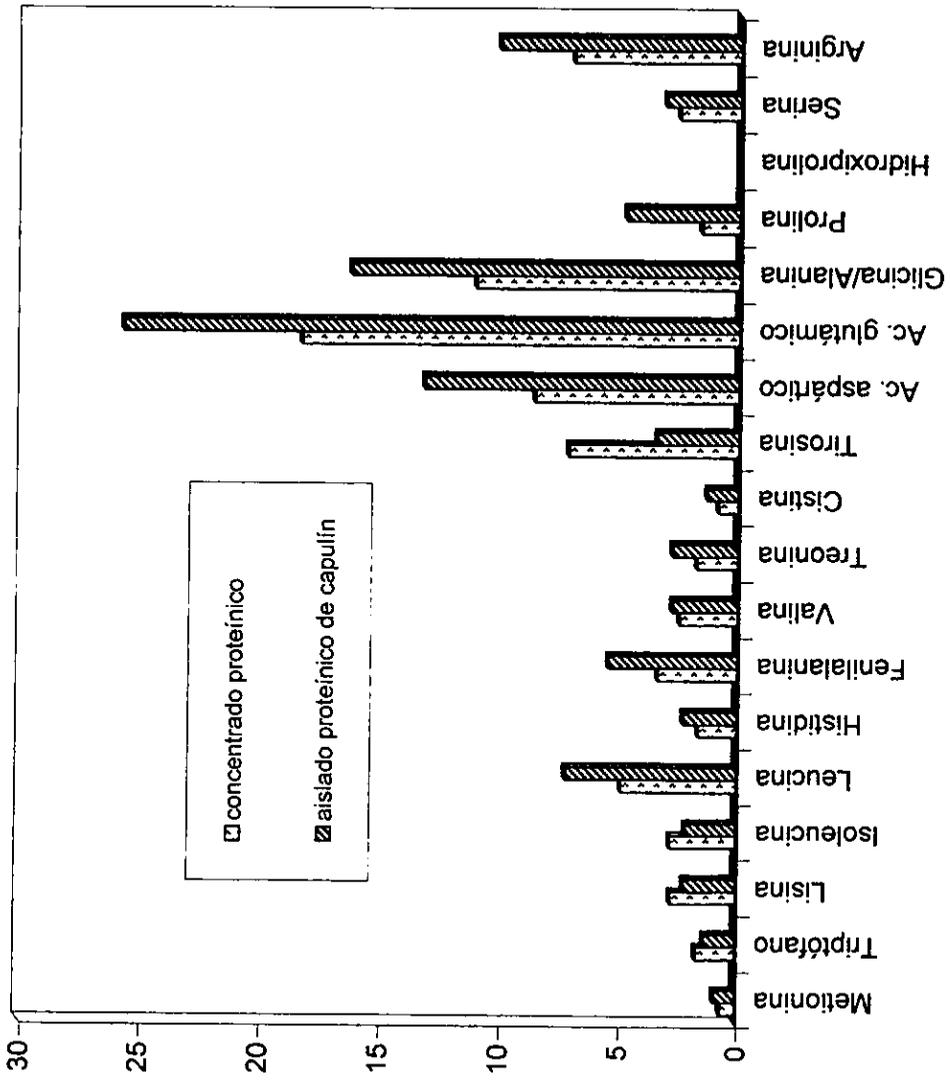


Figura 9. Perfil de aminoácidos

74

5.6.3. Calificación química de la proteína (SQ)

Cuadro 19. SQ de aminoácidos indispensables del aislado proteínico

Aminoácidos	SQ (Lactantes) *	SQ (Adultos) *
Histidina	> 100	-
Isoleucina	67.4	61.96
Leucina	> 100	> 100
Lisina	48.60	52.08
Metionina / cistina	75.53	48.47
Fenilalanina / tirosina	> 100	> 100
Treonina	92.60	> 100
Triptófano	> 100	> 100
Valina	72.43	79.58

* El S.Q. se calculó tomando como patrón las necesidades requeridas por la FAO / OMS / ONU (1985) para lactantes y adultos.

Del cuadro 19 se concluye, que el aislado proteínico cubre con las necesidades de histidina, leucina, fenilalanina / tirosina, treonina y triptófano tanto para lactantes como para adultos, pero limitante en lisina para lactantes y limitante en lisina, así como, metionina para adultos, por lo que, el valor global de la proteína es de 48.6 para lactantes y de 48.47 para adultos.

5.6.4 Digestibilidad "in vitro".

Se realizó la digestibilidad "in vitro" de la harina aislada de capulín para determinar la biodisponibilidad de los aminoácidos. Los resultados se presentan a continuación (cuadro 20).

Cuadro 20. Digestibilidad *"in vitro"* de la harina del aislado proteínico.

Ensayo	pH	Digestibilidad
1	6.66	84.59
2	6.63	85.26
3	6.84	80.26
Promedio	6.71 ± 0.11	83.45 ± 2.55

Del cuadro anterior, se deduce, que se puede aprovechar más de 80% de la proteína aislada de la almendra, lo cual, sugiere que no existen factores tóxicos o acomplexantes que pudieran impedir la absorción de la proteína.

5.6.5. Toxicidad aguda y subaguda.

Se hizo el bioensayo de toxicidad aguda con el aislado proteínico y no se observó ningún signo de toxicidad en el comportamiento de los animales (cuadro 21), por lo que, se procedió a realizar el ensayo de toxicidad subaguda. Para este estudio se usaron 15 ratones machos cepa NHI con un peso promedio de 16.76 ± 1.5 gramos y se distribuyeron en tres lotes de cinco ratones cada uno.

Para la administración de la muestra se prepararon pellets adicionándoles el aislado proteínico en dos niveles de concentración; a un lote se le administró una dosis diaria mayor de 15.0 g / Kg pc (pellets con 10% de aislado, que corresponde a una dosis de 20.0 g / Kg pc) y a otro lote se le administró una dosis menor de 15 g / g pc (pellets con 5% de aislado, que corresponde a una dosis de 10 g / Kg pc); y se uso otro lote como grupo control al cual se le administraron pellets sin aislado. Los lotes quedaron distribuidos como se muestra en el cuadro 22.

Cuadro 21. Características de comportamiento que se evaluaron en el lote del aislado proteínico.

TOXICIDAD AGUDA											
Descripción: Proteína aislada de la almendra de capulín											
Vehículo: Buffer de fosfatos											
Vía : oral											
Dosis: 15g /Kg p.c.											
Hora	Lordosis	Xifosis	Ataxia	Piloerección	Erección caudal	Agresividad	Aletargamiento	Excitación	Disnea	Cianosis	Hipotermia
Inicio											
1h											
2h											
3 h											
4 h											
5 h											
6 h											
7 h											
8 h											
9 h											
10 h											
11 h											
24 h											
72 h											

X = Si se observa

Cuadro 22. Distribución de lotes de acuerdo al peso de los ratones (g)

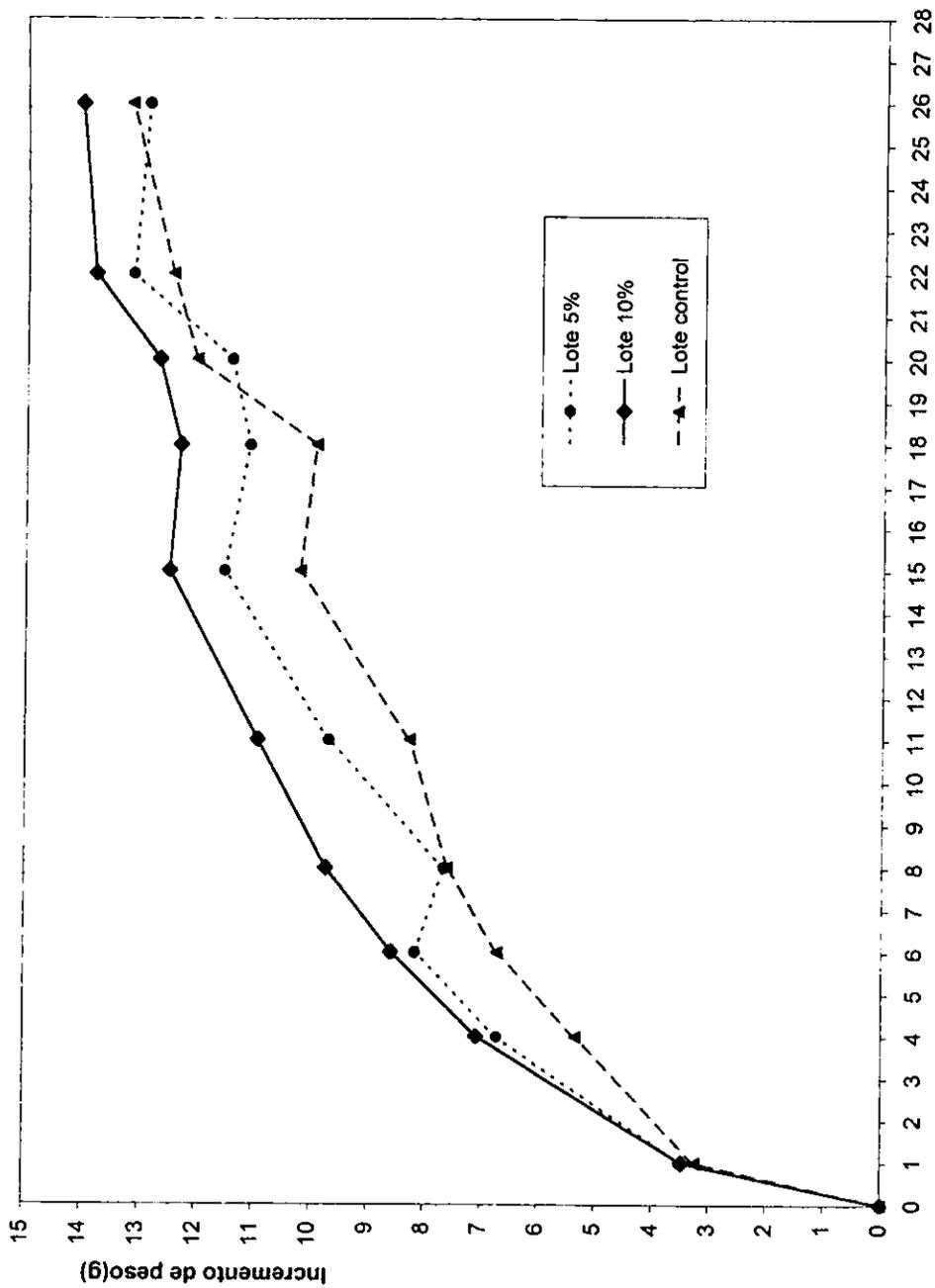
Ratón / Lote	CONTROL (pellets sin aislado)	AISLADO 5 % (pellets con 5 % de aislado)	AISLADO 10 % (pellets con 10 % de aislado)
1	19.5	19.0	18.7
2	16.5	17.3	18.5
3	16.3	16.3	16.2
4	15.8	15.9	16.0
5	15.7	15.0	14.7

La duración de la prueba subaguda fue de 26 días por la limitada cantidad de material que se obtuvo de aislado proteínico para el ensayo toxicológico.

Durante el estudio se hizo una evaluación del incremento en peso con el objeto de observar si la administración del aislado proteínico influía en el crecimiento de los animales, para lo cual, se desarrollo un gráfico de incremento en peso contra el tiempo (figura 10), en donde cada punto es el promedio de los cinco ratones de cada lote (cuadro 23).

Cuadro 23. Incremento de peso acumulativo durante el ensayo.

Días	CONTROL (g)	AISLADO 5 % (g)	AISLADO 10 % (g)
1	3.24 ± 0.11	3.50 ± 0.56	3.48 ± 0.48
4	5.34 ± 1.47	6.72 ± 0.76	7.08 ± 0.56
6	6.72 ± 2.60	8.16 ± 0.83	8.58 ± 0.94
8	7.60 ± 1.81	7.66 ± 1.94	9.74 ± 1.48
11	8.28 ± 1.58	9.70 ± 1.74	10.94 ± 1.60
15	10.22 ± 1.20	11.54 ± 0.60	12.50 ± 1.00
18	9.94 ± 1.88	11.10 ± 1.50	12.32 ± 2.60
20	12.04 ± 1.70	11.42 ± 1.10	12.70 ± 1.70
22	12.46 ± 1.00	13.16 ± 0.90	13.82 ± 1.50
26	13.18 ± 0.40	12.88 ± 0.90	14.04 ± 2.20



Tiempo (días)

Figura 10. Incremento de peso acumulativo.

79

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

De la gráfica se infiere que el incremento en peso presenta una ganancia para los tres lotes, siendo aparentemente mayor para el lote al que se le administro pellets con 10 % de aislado, pero después de realizar un análisis de varianza de una vía a los datos de incremento en peso, se concluye que no existe diferencia significativa entre los lotes. De lo anterior podemos decir que la administración del aislado proteínico de la almendra de capulín no influyo en el crecimiento de los animales, ya que cuando hay problemas de toxicidad se presenta un decremento del peso.

También se llevo a acabo el registro del consumo de alimento de los ratones a lo largo del ensayo toxicológico (cuadro 24) para correlacionarlo con el crecimiento. A continuación se presenta la gráfica del consumo promedio de alimento acumulativo contra el tiempo (figura 11).

Cuadro 24. Consumo de alimento acumulativo (g)

Días	CONTROL	AISLADO 5 %	AISLADO 10 %
11	61.12 ± 10.7	61.72 ± 4.4	63.22 ± 1.81
15	81.96 ± 10.0	86.40 ± 4.3	87.38 ± 1.76
18	96.72 ± 7.02	102.92 ± 4.9	105.58 ± 3.50
20	108.94 ± 6.5	114.42 ± 3.8	116.86 ± 2.43
22	120.34 ± 6.4	126.16 ± 3.7	127.66 ± 2.94
26	143.20 ± 6.1	148.82 ± 4.1	147.78 ± 6.30

El consumo de alimento fue similar en los tres lotes, con el análisis de varianza se concluye que no existe diferencia significativa, por lo que, el de los ratones está relacionado con el alimento consumido y al parecer el aislado no presenta problemas de palatabilidad.

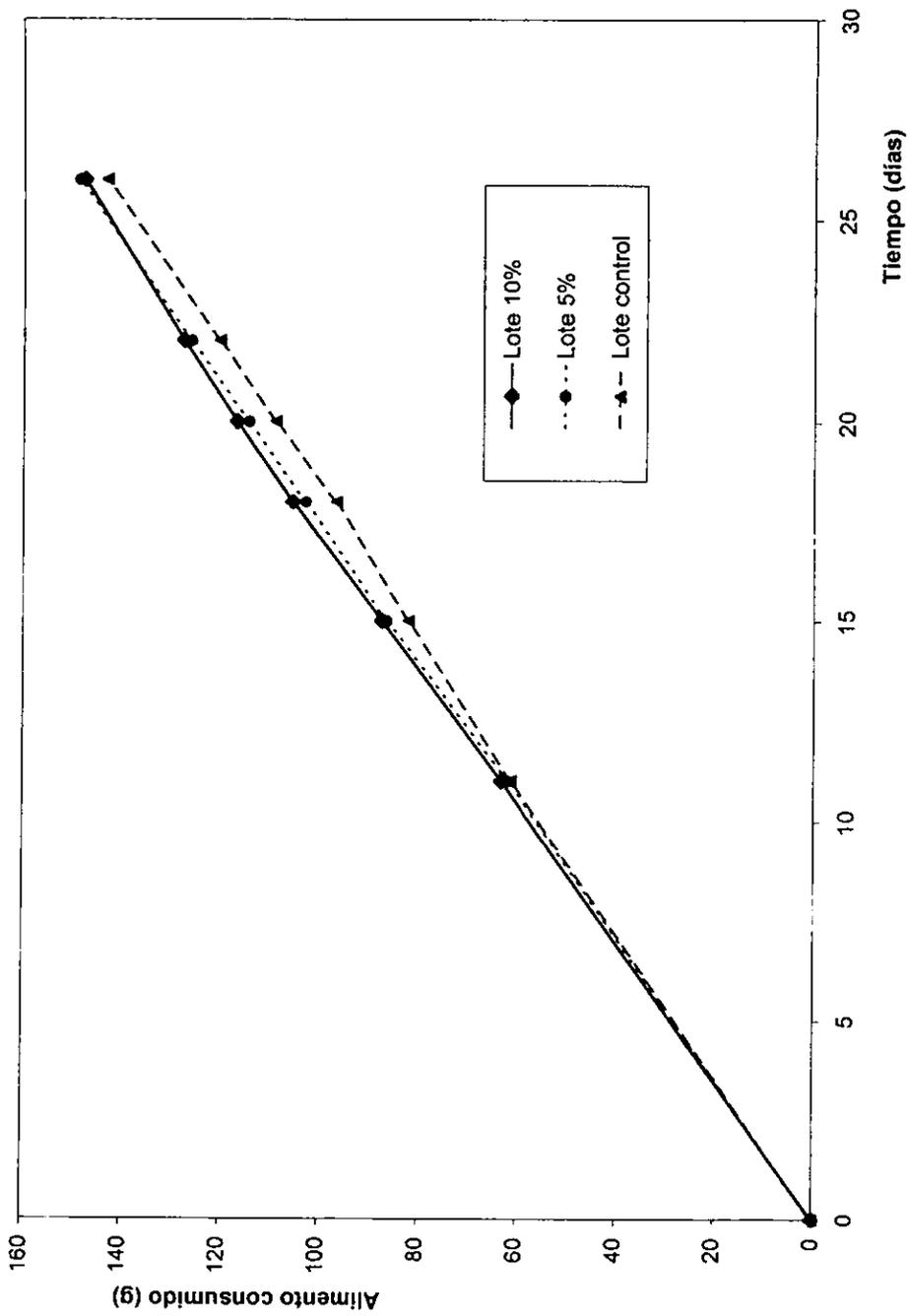


Figura 11. Consumo de alimento acumulativo

5.6.5. Digestibilidad “*in vivo*” y eficiencia alimenticia.

A continuación se presentan los resultados de digestibilidad “*in vivo*” de las distintas dietas y la eficiencia alimenticia (cuadro 25) junto con el incremento de peso final, así como el consumo final de alimento de cada lote.

Cuadro 25. Digestibilidad “*in vivo*” y eficiencia alimenticia.

Dieta	Incremento de peso final (g)	Alimento consumido final (g)	Eficiencia alimenticia	Digestibilidad <i>In vivo</i>
Control	13.18 ± 0.44	143.2 ± 6.1	9.22 ± 0.56	80.49 ± 2.31
Aislado 5 %	12.88 ± 0.91	148.8 ± 4.1	8.65 ± 0.52	79.36 ± 2.60
Aislado 10 %	14.04 ± 2.23	147.8 ± 6.3	9.47 ± 1.23	81.32 ± 4.61

Del cuadro anterior podemos observar que la eficiencia alimenticia, aunque parece ser mayor para el aislado al 10 %, no es así, ya que, haciendo un análisis de varianza de una vía, no se encontró diferencia significativa entre los tres lotes, lo que corrobora que no se presentaron problemas de toxicidad.

En cuanto a la digestibilidad, las dietas no presentaron diferencia significativa entre las mismas, concluyendo con esto, que la absorción de las proteínas no se vio afectada por el nivel de aislado proteínico adicionado a las dietas, ya que cuando existe la presencia de factores tóxicos disminuye la digestibilidad.

Comparando la digestibilidad obtenida “*in vitro*”, se concluye que es una determinación muy semejante a la realizada “*in vivo*” con animales, ya que, no existe diferencia significativa entre las digestibilidades obtenidas por los dos métodos y con la ventaja de que se realiza en menor tiempo.

5.6.6. Observaciones clínicas.

A lo largo de todo el estudio se observó el comportamiento de cada animal, evaluándose las mismas características que en la toxicidad aguda, en el cual, no se observó ninguna característica que indicará signos de toxicidad (cuadro 26).

5.6.7. Parámetros hematológicos.

Se realizó un seguimiento de los parámetros hematológicos de los animales, al inicio del estudio, a los 15 días y al final del estudio de cada ratón, para determinar posibles efectos subclínicos en los diferentes lotes.

Los resultados obtenidos de cada parámetro para todos los ratones se encuentran en el apéndice IV, divididos en la denominada serie roja, la serie blanca y la serie trombocítica o plaquetaria, a los cuales, se les realizó un análisis de varianza de una vía, al final del estudio para detectar si había diferencia significativa entre los diferentes lotes y además se tomó en cuenta el rango de variabilidad del método con respecto al control, para confirmar en caso de existir diferencia significativa si ésta también estaba fuera del rango propio del método.

A continuación se presentan los valores promedios de cada parámetro hematológico (cuadros 27, 28 y 29), en donde, se presentan en sombreado los parámetros donde se observó diferencia significativa, además de estar fuera del rango de variabilidad del método.

Se observa que en la serie roja no hay diferencia significativa entre los lotes y los valores caen dentro del rango de variabilidad del método, por lo que, no hay alteraciones de la serie roja en la sangre.

Cuadro 26. Características de comportamiento que se evaluaron en el lote del aislado proteínico.

TOXICIDAD SUBAGUDA										
Descripción: Proteína aislada de la almendra de capulín										
Vehículo: pellets										
Vía : oral										
		Dosis: 15 g / Kg pc.								
Lordosis	Xifosis	Ataxia	Piloerección	Erección caudal	Agresividad	Aletargamiento	Excitación	Disnea	Cianosis	Hipotermia
InICIO										
1										
4										
6										
8										
11										
13										
15										
18										
20										
22										
26										

X = Si se observa

Cuadro 27. Citometría hemática de la serie roja

SERIE ROJA	INICIO			15 DIAS			26 DIAS		
	CONTROL	AISLADO 5%	AISLADO 10%	CONTROL	AISLADO 5%	AISLADO 10%	CONTROL	AISLADO 5%	AISLADO 10%
	Globulos rojos RCB ($\times 10^9/\mu\text{L}$)	9.094 ± 0.16	9.348 ± 0.28*	9.3 ± 0.219*	9.624 ± 0.40	9.56 ± 0.301*	9.79 ± 0.30	9.600 ± 0.11	9.99 ± 0.47*
Hemoglobina HGB (g/dl)	14.52 ± 0.47	14.9 ± 0.4*	14.6 ± 0.43*	15.24 ± 0.66	15.56 ± 0.33*	15.88 ± 0.50	15.56 ± 0.27	16.22 ± 0.73*	15.34 ± 1.80*
Hematócritio HCT (%)	53.78 ± 1.41	55.32 ± 1.32*	54.42 ± 1.53*	56.76 ± 2.30	57.42 ± 0.64*	58.56 ± 1.26	56.3 ± 1.30	58.42 ± 2.49*	56.02 ± 4.40*
Volumen Globular Medio MCV (fl)	59.14 ± 1.32	59.2 ± 0.66*	58.48 ± 0.60*	58.98 ± 1.07	60.1 ± 1.50*	59.8 ± 1.34	58.5 ± 1.04	58.48 ± 0.92*	59.28 ± 2.96*
Hemoglobina corpuscular media MCH (pg)	15.98 ± 0.37	15.94 ± 0.32*	15.74 ± 0.45*	15.84 ± 0.58	16.28 ± 0.17*	16.2 0.34	16.16 ± 0.43	16.24 ± 0.30*	16.16 ± 0.32*
Concentración media de hemoglobina corpuscular MCHC (g/dl)	27 ± 0.30	26.94 ± 0.59*	26.88 ± 0.55*	26.86 ± 0.60	27.1 ± 0.47*	27.14 0.52	27.68 ± 0.90	27.76 ± 0.72*	27.3 ± 1.23*
Plaquetas PLT ($\times 10^9/\mu\text{L}$)	574.8 ± 97.2	601.0 ± 76.8*	568 ± 106.2*	634.0 ± 37.6	610.8 ± 68.6*	547 ± 63.0 ^b	539.6 ± 95.1	511.8 ± 93.9*	509.0 ± 97.3*

a. No presenta diferencia significativa entre las dietas.

b. Presenta diferencia significativa con respecto al control.

†. El valor se encuentra por arriba de los límites del rango de variabilidad del método

‡. El valor se encuentra por abajo de los límites del rango de variabilidad del método

Cuadro 28. Citometría hemática de la serie blanca

SERIE BLANCA	INICIO			15 DIAS			26 DIAS		
	CONTROL	AISLADO 5%	AISLADO 10%	CONTROL	AISLADO 5%	AISLADO 10%	CONTROL	AISLADO 5%	AISLADO 10%
	Glóbulos blancos WBC (x 10 ⁶ /μL)	2.90±1.16	2.80±1.27*	2.13±1.09 [↓]	7.26±2.84	5.93±0.71 [↓]	5.908±1.65 [↓]	6.99±1.51	7.23±1.92*
Neutrófilos NEUT (%)	1.88±0.56	1.96±0.90*	2.22±0.74 [↑]	4.84±2.58	4.52±1.28*	5.37±1.80*	5.2±1.4	2.96±0.81 [↓]	4.16±1.39 [↓]
Linfocitos LYMPH (%)	81.71±4.79	83.06±5.8*	79.82±2.35*	82.52±5.38	85.7±2.6*	82.8±3.67*	83.7±3.3	87.48±1.58 ^b	86.3±1.66*
Monocitos MONO (%)	16.42±4.76	14.98±5.19*	17.96±2.65*	12.64±3.01	9.78±1.39*	14.6±6.46*	11.04±1.99	9.56±0.89*	9.54±1.06*
Eosinófilos EO (%)	3.36±1.73	3.44±1.11*	3.18±1.67*	0.74±0.56	0.86±0.45*	0.78±0.62*	1.22±0.47	0.3±0.15 [↓]	1.0±0.96*
Basófilos BASO (%)	0.48±0.37	0.52±0.58*	0.44±0.41*	0.42±0.50	0.22±0.04*	0.24±0.26*	0.16±0.15	0.04±0.05*	0.2±0.12*

↑. El valor se encuentra por arriba de los límites del rango de variabilidad del método

a. No presenta diferencia significativa entre las dietas.

b. Presenta diferencia significativa con respecto al control.

↓. El valor se encuentra por abajo de los límites del rango de variabilidad del método

Cuadro 29. Citometría hemática de la serie trombocítica.

SERIE TROMBOCÍTICA	INICIO			15 DIAS			26 DIAS		
	CONTROL	AISLADO 5%	AISLADO 10%	CONTROL	AISLADO 5%	AISLADO 10%	CONTROL	AISLADO 5%	AISLADO 10%
	Plaquetas PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	574.8 \pm 97.2	601.0 \pm 76.8*	568 \pm 106.2*	634.0 \pm 37.6	610.8 \pm 68.6*	547 \pm 63.0 ^b	539.6 \pm 95.1	511.8 \pm 93.9 ^a

- a. No presenta diferencia significativa entre las dietas.
- b. Presenta diferencia significativa con respecto al control.

- ↑. El valor se encuentra por arriba de los límites del rango de variabilidad del método.
- ↓. El valor se encuentra por abajo de los límites del rango de variabilidad del método.

En cuanto a la serie blanca al final del estudio, para el grupo de ratones alimentados con el aislado proteínico al 5 %, se tuvo diferencia estadísticamente significativa con respecto al control en:

- a) Linfocitos, pero esta diferencia no es mayor al coeficiente o rango de variación del método, por lo que se concluye que no existe tal disparidad.
- b) Neutrófilos, cuya variación si es mayor al rango de variación del método, por lo que, se considera que si existe la desigualdad entre los grupos.
- c) Eosinófilos, con una divergencia superior al coeficiente de variación del método de análisis, por lo que, se deriva que ésta diversidad si es real.

Dado que los valores que presentaron los neutrófilos y los eosinófilos con respecto al control fueron menores, es indicativo de la baja alergenicidad del material evaluado.

6. CONCLUSIONES.

Como resultado del estudio realizado a la fracción proteínica de la almendra de capulín (*Prunus serotina*), tenemos que:

El material obtenido después de la extracción con hexano se considera un auténtico concentrado de proteína, ya que, el contenido de la misma es mayor al 50 %, pero inaccesible para el consumo humano y / o animal, ya que, su alto contenido de glucósidos cianogénicos es muy elevado y lo hace sumamente tóxico.

Se puede obtener un aislado de proteína a partir de la purificación del concentrado proteínico, empleando las propiedades de solubilidad de las fracciones proteínicas que lo componen.

Este tratamiento de purificación del concentrado proteínico bastó para eliminar casi en su totalidad, a los glucósidos cianogénicos que causaban problemas; pero a la vez se modificó el contenido de los aminoácidos con respecto al concentrado.

El aislado de la almendra de capulín contiene más del 80% de proteína, deficiente en lisina, y rico en aminoácidos esenciales como la histidina, la leucina, la fenilalanina y el triptófano.

Para el aislado proteínico no detecto toxicidad aguda, ya que no se observaron alteraciones en el comportamiento de los ratones.

La prueba de toxicidad subaguda realizada con niveles de 5 % y de 10 % del aislado proteínico, administrados por vía oral a los ratones, permite concluir que el material biológico evaluado es inocuo, debido a que:

- a) No hubo diferencia significativa en el incremento del peso de los ratones.
- b) La única diferencia significativa encontrada para eosinófilos y neutrófilos en las sangres de los ratones, del grupo alimentado con el aislado proteínico al 5 %, indica la pobre alergenidad del material que se evaluó.
- c) No se encontraron diferencias significativas en el resto de los parámetros sanguíneos durante el ensayo, lo que indica, que no induce signos de enfermedad, por lo que, es inocuo.
- d) La absorción de las proteínas no se ve afectada por la adición del aislado proteínico a los diferentes niveles, ya que la digestibilidad *in vivo* no presentó diferencia significativa entre las diferentes dietas administradas.

La digestibilidad obtenida *in vitro* no presenta diferencia significativa con respecto a la obtenida *in vivo*, por lo tanto, se puede ahorrar tiempo en esta determinación y con los mismos resultados.

Las semillas oleaginosas son las fuentes proteínicas menos costosas y con mayor disponibilidad en el mundo pero la principal dificultad al explotarlás para el consumo humano es su toxicidad, por lo que, la destoxificación del material es indispensable para su aprovechamiento.

7. BIBLIOGRAFIA.

1. Leopold AC and Ardrey R. (1972). Toxic substances in plants and the food habits of early man. *Science* 176, pp 512 - 514.
2. Coon JM. (1974) Natural food toxicants (a perspective). *Nutr Rev* 32, pp 321 - 332.
3. Ferrando F. (1980) Alimentos tradicionales y no tradicionales. FAO, colección de alimentación y nutrición No. 2, pp 143 - 263, Roma.
4. Barba AA y Luna RS. (1989) Los recursos vegetales de México. Tópicos de investigación y Posgrado ENEP – Zaragoza, pp 22 – 32. México, DF.
5. Flores N (Editor). (1988) ¿Producir para la desnutrición?. Centro de ecodesarrollo, pp 13 - 34 y 243 - 266, México, DF.
6. Conca TA. (1995) Evaluación química y biológica de la grasa cruda y destoxificada de dos semillas de *Erythrina* mexicanas. Tesis, Facultad de Química, UNAM, México, DF.
7. Bermejo JE y León J. (1992) Cultivos marginados (otra perspectiva de 1492). FAO, colección de producción y protección vegetal No. 26, pp IX - XII y 3 - 33, Roma.
8. Kamel BS and Kakuda Y. (1992) Characterization of the seed oil and meal from apricot, cherry, nectarine, peach and plum. *JAOCS* 69, 492-494.
9. Castillo CJ. (1997) Caracterización bromatológica de varias semillas de frutos con potencial aporte de proteína y grasa dietética. Tesis, Facultad de Química. UNAM. México, DF.
10. Ayllón MF. (1995) Obtención de un extracto enzimático con actividad de β -glucosidasa a partir de semillas de capulín (*Prunus serotina*). Tesis, Facultad de Química, UNAM. México, DF.
11. Chun PL, Swain E and Poulton JE. (1992) Development of the potencial for Cyanogenesis Maturing Black Cherry (*Prunus serotina* Ehrh) Fruits. *Plant Physiol.* 98, 1423 – 1428.

12. Kukori GW. (1985) Purification and caracterización of cyanogen specif Beta – Glucosidasas from mature Pprunus serotina seeds; Diss Abstr Int B 1986, 47(3), 1038.
13. Ballantine B, Mares T and Tomer P. (1993) General & aplied toxicology. Stockton, Press, vol I, pp 413 - 431, NY.
14. Shibamoto T y Bjeldanes L. (1996) Introducción a la toxicología de los alimentos. Editorial Acribia, SA, pp 17 - 31 y 63 - 91, Zaragoza, España.
15. Bostid FR (Editor). (1989) The crops of the incas. National Academy Press, pp 162 -189, Washington, DC.
16. Liener IE. (1980) Toxic constituyents of plant foodstuffs, pp 143 - 157, NY.
17. Conn EE. (1969) Cyanogenic Glycosides; J Agr Food Chem 17 (3), 519 – 516.
18. Linder E. (1995) Toxicología de Alimentos, Acribia, SA, 2ª edición, pp 14 – 19. España.
19. Conn EE. (1973) Cianogenetic glucosides in: Toxicants occurring naturally in food; National Academic of Sciences (Eds), 2th Edition, pp 290 – 308. Washington, DC.
20. Li CP, Swain E and Poulton JE. (1992) Prunus serotina amigdalín hidrolase and prunasin hidrolase. Plant Physiol 100(1), 282 – 290.
21. Schoeneberger H, Gross R, Cremer HD, Elmadea I. (1981) Composition and Protein Quality of Lupinos Mutabilis. German Agency for Technical cooperation, National Institute of Health, Lima, Perú. And Institute of Nutrition, University of Giessen, West Germany.
22. Winkler WO. (1951) Report on hydrocyanic glucosides. J Assoc of Chem 34 (3), 541 – 547.
23. Repetto M. (1991) Toxicología fundamental. Editorial Científico - Médica, pp 21-32. Barcelona, España.
24. Derache R. (1990) Toxicología y seguridad de los alimentos. Ediciones Omega, pp 1 -6 y 57 - 64. Barcelona, España.
25. Badui D. (1995) Química de Alimentos. Editorial Alhambra Mexicana, pp 125 - 129 y 133. México, DF.

26. Robinson SD. (1991) Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Acribia S.A. pp. 107 – 139. Zaragoza, España.
27. Fisher P, Bender A. (1989) Valor nutritivo de los alimentos. Editorial Noriega Limusa, pp 69 - 85. México, DF.
28. Ruíz G. (1994) Fundamentos de Hematología. Editorial. Medica Panamericana, pp 26 - 35. México, DF.
29. Shirlyn B. (1991) Hematología clínica. El Manual Moderno. pp 1 - 3.
30. Hillman R. (1977) Manual de Hematología. Editorial. El Manual Moderno, pp 114 - 118.
31. Bateman JV. (1970) Nutrition animal (manual de métodos analíticos); Herrero Hnos. pp 110 – 112 y 170 – 172, México, DF.
32. Herlich K. (1990) (Editor) Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists 15th Edition Vol. I and II pp 17 - 18, 40 – 62, 69 – 83 and 1012, published by AOAC, Arlington.
33. Lucas B and Sotelo A. (1984) A Simplified test for the quantitations of cyanogenic glucosides in wild and cultivated seeds; Nutr. Rep. Int 29 (3) pp. 711 – 719.
34. Lucas B. And Sotelo A. (1982) Amino acid determination in pure proteins, foods and feeds using two different acid hidrolisis methods. Analytical Biochem. 123, 349 – 356.
35. Lucas B. And Sotelo, A. (1980) Effect of different alkalies, temperature, and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins and of foods. Analytical Biochem. 109, 192 – 197.
36. Herlich K. (1990) (Editor) Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists 15th Edition Vol. II pp 1097, published by AOAC, Arlington.
37. Fennema OR. (1993) Química de Alimentos. Editorial Acribia S.A. pp 321 - 323. Zaragoza, España.
38. Hartree EF. (1972) Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response; Analytical Biochem No 48 pp 422 – 423, Cambridge, England.

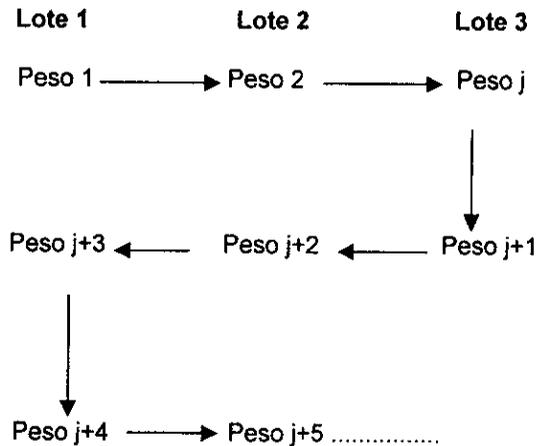
39. Téllez GRH. (1999) Evaluación de toxicidad aguda y subaguda de la fracción lípida de la almendra de calabaza (*Cucurbita pepo*). Tesis, Facultad de Química. UNAM. México, DF.
40. Aragon E; Lucas B. Manual de Prácticas de Laboratorio de Nutrición. Facultad de Química. División de Ingeniería. Departamento de Alimentos y Biotecnología. México DF.
41. Alfonso HG. (1988). Algunas consideraciones sobre las plantas tóxicas para los animales domésticos. Ediciones del CENSA, pp 6 - 10 y 84 - 92. La Habana, Cuba.
42. Eyjolfsson R. (1970) Recent advances in chemistry of cyanogenic glucosides. Fortsch Chem Organ Naturst (28), 74 - 108.

APENDICE I

Método de "culebra japonesa" para la distribución de animales en estudio (Conca, 1995)

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

En este método, los animales se pesan y posteriormente se ordenan en forma ascendente o descendente (dependiendo de las condiciones del experimento) en base a su peso corporal. Finalmente los animales se distribuyen en lotes de acuerdo al esquema siguiente:



APENDICE II

Hoja de respuesta del comportamiento de los animales.

TOXICIDAD AGUDA											
Fecha: _____											
Especie: _____		Clave: _____		Cepa: _____		Peso inicial: _____		Peso final: _____		Edad: _____	
Descripción: _____											
Vehículo: _____											
Concentración: _____											
Vía: _____											
Administración: _____											
Hora	Lordosis	Xifosis	Ataxia	Piloerección	Erección caudal	Agresividad	Aletargamiento	Excitación	Disnea	Cianosis	Hipotermia
Inicio											
1h											
2h											
3h											
4h											
5h											
6h											
7h											
8h											
9h											
10h											
11h											
24h											
72h											

X = Si se observa

APENDICE IV

Parámetros hematológicos. 1

Serie roja	INICIO						15 DIAS			26 DIAS		
	Control	Aislado 5%	Aislado 10%	Control	Aislado 5%	Aislado 10%	Control	Aislado 5%	Aislado 10%	Control	Aislado 5%	Aislado 10%
	Glóbulos rojos	9.13	9.32	9.38	10.14	9.57	9.89	9.79	10.20	10.45	9.79	10.20
RBC	9.22	9.37	9.29	9.36	10.01	9.64	9.54	10.70	9.58	9.54	10.70	9.58
(X 10 ⁶ /μL)	9.09	9.37	9.36	9.40	9.26	9.91	9.56	9.74	9.66	9.56	9.74	9.66
Hemoglobina	8.81	8.87	8.94	9.11	9.65	10.16	9.51	9.83	10.25	9.51	9.83	10.25
HGB	14.7	15.4	14.5	15.3	15.6	15.7	15.4	16.9	16.6	15.4	16.9	16.6
(g/dL)	14.3	15.1	15.3	15.2	16.1	16.2	15.4	17.0	16.0	15.4	17.0	16.0
	14.9	15.0	14.5	14.5	15.2	16.0	15.3	15.6	15.5	15.3	15.6	15.5
	14.9	14.6	14.7	14.9	15.3	16.4	15.9	16.2	16.4	15.9	16.2	16.4
	13.8	14.4	14.1	16.3	15.4	15.1	15.8	15.4	12.2	15.8	15.4	12.2
Hematócrito	53.9	55.6	54.7	58.6	57.5	57.3	56.9	59.9	59.6	56.9	59.9	59.6
HCT	53.0	55.3	55.3	55.7	58.2	58.5	54.7	62.0	56.9	54.7	62.0	56.9
(%)	55.6	57.0	54.6	55.1	57.6	59.1	57.6	57.7	56.9	57.6	57.7	56.9
	54.5	55.4	55.7	54.6	57.4	60.4	55.1	56.2	58.3	55.1	56.2	58.3
	51.9	53.3	51.8	59.8	56.4	57.5	57.2	56.3	48.4	57.2	56.3	48.4
Volumen globular	59.0	58.4	58.3	57.8	60.1	57.9	58.1	58.7	57.0	58.1	58.7	57.0
Medio MCV	57.5	59.0	59.5	58.3	58.1	60.7	57.3	57.9	59.4	57.3	57.9	59.4
(fL)	61.2	59.6	58.3	58.6	62.2	59.6	59.6	59.2	58.9	59.6	59.2	58.9
	59.1	58.9	58.4	59.9	59.5	59.4	57.9	57.2	56.9	57.9	57.2	56.9
	58.9	60.1	57.9	60.3	60.6	61.4	59.6	59.4	64.2	59.6	59.4	64.2
Hemoglobina corpuscular	16.1	16.2	15.5	15.1	16.3	15.9	15.7	16.6	15.9	15.7	16.6	15.9
Media	15.5	16.1	16.5	15.9	16.1	16.8	16.1	15.9	16.7	16.8	16.6	16.7
MCH	16.4	15.7	15.5	15.4	16.4	16.1	15.8	16.0	16.0	16.1	16.0	16.0
(pg)	16.2	15.5	15.4	16.4	16.1	16.1	16.7	16.5	16.0	16.1	16.5	16.0
	15.7	16.2	15.8	16.4	16.5	16.1	16.5	16.2	16.2	16.1	16.5	16.2
Concentración media de Hemoglobina corpuscular	27.3	27.7	26.5	26.1	27.1	27.4	27.1	28.2	27.9	27.1	28.2	27.9
MCHC (g/dL)	27.0	27.3	27.7	27.3	27.7	27.7	27.7	27.4	28.1	27.7	27.4	28.1
	26.8	26.3	26.6	26.3	26.4	27.1	26.6	27.0	27.2	27.1	27.0	27.2
	27.3	26.4	26.4	27.3	27.0	27.2	28.9	28.8	28.1	27.2	28.8	28.1
	26.6	27.0	27.2	27.3	27.3	26.3	27.6	27.4	25.2	27.6	27.4	25.2

Parámetros hematológicos. 2

Serie	INICIO			15 DIAS			26 DIAS		
	Control	Aislado 5%	Aislado 10%	Control	Aislado 5%	Aislado 10%	Control	Aislado 5%	Aislado 10%
blanca	4.86	4.33	3.94	7.42	4.67	8.37	7.16	7.92	9.56
Globulos blancos WBC (X 10 ⁶ /μL)	3.10	3.95	2.33	11.20	6.09	4.66	9.49	10.12	3.71
	2.19	1.41	1.75	6.88	6.37	6.69	5.49	5.25	4.81
	2.24	2.35	1.21	7.57	6.42	4.30	6.50	7.08	7.04
	2.15	1.98	1.46	3.27	6.09	5.52	6.31	5.80	3.34
Neutrófilos NEUT (%)	1.6	1.6	1.5	5.8	2.6	*	5.9	1.8	4.1
	1.3	2.0	2.1	4.4	5.7	6.9	5.0	3.7	2.7
	1.7	1.4	1.7	8.7	4.5	6.3	7.1	2.5	3.4
	1.8	1.3	2.4	3.4	4.1	2.8	3.2	3.7	6.4
	2.8	3.5	3.4	1.9	5.7	5.5	4.8	3.1	4.2
Limfocitos LYMPH (%)	85.8	90.8	78.7	80.6	89.9	54.0	81.0	89.1	86.5
	81.9	80.3	79.0	84.2	83.1	79.8	85.1	85.5	88.1
	85.8	81.6	82.3	74.1	85.9	81.0	79.6	89.1	87.7
	74.1	86.8	76.9	87.5	85.5	88.1	87.7	86.6	84.8
	80.9	75.8	82.2	86.2	84.1	82.4	85.4	87.1	84.4
Monocitos MONO (%)	12.6	7.5	19.8	13.6	7.5	*	13.1	9.1	9.4
	16.8	17.7	18.9	11.4	11.2	13.3	9.9	10.8	9.2
	12.3	17.0	16.0	17.2	9.6	12.7	13.3	8.4	8.9
	24.1	11.9	20.7	9.1	10.4	9.1	9.1	9.7	8.8
	16.3	20.7	14.4	11.9	10.2	12.1	9.8	9.8	11.4
Eosinófilos EO (%)	3.1	4.6	1.5	0.7	0.4	0.6	1.4	0.1	0.6
	2.3	1.8	3.1	0.6	0.7	1.7	1.1	0.4	0.3
	6.4	4.3	1.7	1.7	0.3	1.7	1.8	0.2	0.8
	2.2	3.0	4.1	0.4	1.6	0.2	0.5	0.3	0.6
	2.8	3.5	5.5	0.3	1.1	1.1	1.3	0.5	2.7
Basófilos BASO (%)	0.8	1.4	0.0	0.3	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2
	0.3	0.0	0.9	1.3	0.2	0.6	0.1	0.1	0.0
	0.9	0.7	0.6	0.1	0.2	0.0	0.4	0.0	0.2
	0.4	0.0	0.0	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0	0.3
	0.0	0.5	0.7	0.3	0.3	0.4	0.2	0.0	0.3

Parámetros hematológicos. 3.

Serie Trombocítica	INICIO			15 DIAS			26 DIAS		
	Control	Aislado 5%	Aislado 10%	Control	Aislado 5%	Aislado 10%	Control	Aislado 5%	Aislado 10%
734	696	626		661	719	539	617	610	528
533	640	702		652	593	658	515	565	582
536	605	545		660	623	527	392	561	474
480	490	535		625	533	506	546	424	361
591	574	416		572	586	509	628	399	604