



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION NUTRITIVA 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 :
ALEJANDRA LARA ROSALES



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2003



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.

Instituto de
Cronológico e Impres-
são recepção.

Alexandra Lara
Bosales

12/MAY/03


[Handwritten signature]

Jurado asignado:

Presidente **Prof. Angela Sotelo López.**
Vocal **Prof. Lucia Cornejo Barrera.**
Secretario **Prof. Bernardo Lucas Florentino.**
1er. Suplente **Prof. Enrique Martínez Marique.**
2do. Suplente **Prof. Leticia Gil Vieyra.**


Lugar donde se desarrollo el tema:
Laboratorio 111, Departamento de Farmacia.
Conjunto "E" Facultad de Química, Ciudad Universitaria.

Asesor del tema:



M. en C. Bernardo Lucas Florentino

Supervisor Técnico:



Q.F.B. Leticia Gil Vieyra

Sustentante:



Alejandra Lara Rosales

AGRADECIMIENTOS.

Al profesor Bernardo por sus sabios consejos, su apoyo y paciencia, así como el haberme concedido su tiempo, sus conocimientos, su experiencia y su disposición durante la realización de este trabajo.

Mil gracias.

A Lety Gil y todos los integrantes del Laboratorio 111, por su valioso apoyo, comprensión y amistad durante la realización de este trabajo, muchas gracias.

A la M. en C. Adriana Ruiz de Chavéz y al Méd. Veterinario Atonatiu E. Gómez por su asesoría y gran ayuda que me brindaron.

A los miembros del jurado designado por sus valiosas aportaciones durante la revisión del manuscrito de tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de formarme como profesionista ayudándome a forjar la base de un futuro.

A mis padres Gregorio y Ma. Félix, a quienes nunca dejaré de agradecerles el apoyo y el amor que siempre me brindaron para concluir una meta mas en mi vida, esperando sea motivo de satisfacción ver realizados sus deseos.

A mis hermanos Rosy, Oscar y Javier, por su continua e incondicional ayuda, para ustedes con cariño.

A profesores y amigos que no menciono por temor a omitir a alguno de ellos, ya que siempre formaran parte de mi vida, muchas gracias por su ayuda y compañía a lo largo de esta meta.

A TODOS USTEDES MIL GRACIAS.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
1. RESUMEN ..	1
2. OBJETIVOS	2
3. GENERALIDADES	3
3.1 CAPULIN (<i>Prunus serotina</i>)	5
3.2 COMPOSICION QUIMICA DE LA ALMENDRA DE CAPULIN	5
3.3 FACTORES ANTINUTRIMENTALES Y TOXICOS QUE SE ENCUENTRAN PRESENTES EN LA ALMENDRA DE CAPULIN	7
3.3.1 INHIBIDORES DE TRIPSINA	7
3.3.2 ACIDO FITICO	8
3.3.3 GLUCOSIDOS CIANOGENICOS	8
3.3.4 ESTUDIOS TOXICOLOGICOS	10
3.3.4.1 TOXICIDAD AGUDA	10
3.3.4.2 TOXICIDAD SUBCRONICA	12
3.3.4.3 TOXICIDAD CRONICA	12
3.4 PROTEINAS	13
3.4.1 IMPORTANCIA Y CALIDAD	13
3.4.2 AMINOACIDOS	13
3.4.3 NECESIDADES PROTEINICAS	14
3.4.4 EVALUACION DE LA CALIDAD DE LAS PROTEINAS	16
3.4.5 DIGESTIBILIDAD PROTEINICA	17
3.5 PARAMETROS HEMATOLÓGICOS	18
3.5.1 BIOMETRIA HEMATICA	19
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL	21
4.1 SELECCIÓN Y OBTENCION DE LA SEMILLA	22
4.2 MOLIENDA	22
4.3 DESENGRASADO	22
4.4 CARACTERIZACION BROMATOLOGICA	22
4.5 DETERMINACION DE TOXICOS	24
4.5.1 DETERMINACION DE INHIBIDORES DE TRIPSINA	24
4.5.2 DETERMINACION DE FITATOS	25
4.5.3 DETERMINACION DE GLUCOSIDOS CIANOGENICOS	28
4.6 DOSIS LETAL MEDIA (DL50) DE LA HARINA DESENGRASADA	30
4.7 OBTENCION DEL AISLADO PROTEINICO Y PURIFICACION DE LA ALMENDRA DE CAPULIN	31
4.7.1 DIGESTIBILIDAD "in vitro"	33
4.7.2 PERFIL DE AMINOACIDOS	34
4.7.3 DETERMINACION DE TRIPTOFANO	38
4.8 BIOENSAYO NUTRICIONAL	39
4.8.1 DIGESTIBILIDAD "in vivo"	42
5. RESULTADOS Y DISCUSION	45
5.1 CARACTERIZACION BROMATOLOGICA	45
5.2 FACTORES TOXICOS	47
5.3 DOSIS LETAL MEDIA (DL50)	49
5.4 DIGESTIBILIDAD "in vitro"	49
5.5 PERFIL DE AMINOACIDOS	50
5.6 CALIFICACION QUIMICA DE LA PROTEINA	51

6

5.7	BIOENSAYO NUTRICIONAL	53
5.7.1	RELACION DE EFICIENCIA PROTEINICA	53
5.7.2	DIGESTIBILIDAD "in vivo"	55
5.7.3	BIOEMTRIA HEMATICA	57
5.7.4	RELACION PORCENTUAL DE ORGANOS	59
6.	CONCLUSIONES	60
7.	REFERENCIA	61
8.	APENDICES	64
	APENDICE 1	DISPOSITIVO DE EXTRACCION DE GRASA
	APENDICE 2	METODO DE " LA CULEBRA JAPONESA"
	APENDICE 3	TOXICIDAD AGUDA . HOJA DE RESPUESTA DEL COMPORTAMIENTO DE LOS ANIMALES.
	APENDICE 4	PAPEL LOGARITMICO DE PROBABILIDAD PARA LA OBTENCION DEL DL50
	APENDICE 5	HOJA DE REGISTRO DE CONSUMO DE ALIMENTO Y PESO
	APENDICE 6	LISTA DE ABREVIATURAS

1. RESUMEN

En México existe una gran diversidad de la flora cuya potencialidad productiva es alta y que pueden ser fuentes de nutrimentos para la alimentación humana y animal; sin embargo, estos recursos están subaprovechados, tal es el caso del "capulín" (*Prunus serotina*). Estudios recientes han informado que la almendra de capulín se puede considerar como una fuente de proteína y grasa alimenticia, así como de algunos micronutrimentos, en particular de vitamina C y E, hierro y zinc. Sin embargo, el alto contenido de glucósidos cianogénicos limitan su uso. Se han realizado estudios de toxicidad subaguda de la fracción proteínica de la almendra y se ha concluido que es necesario efectuar un proceso de destoxificación para que esta pueda utilizarse ya sea en la alimentación humana y/o animal. Este trabajo tuvo como objetivo realizar un proceso de destoxificación en la fracción proteínica de la almendra de capulín y evaluar la calidad nutrimental de la proteína mediante el ensayo biológico de la Relación de eficiencia proteínica (REP). Se obtuvo el aislado proteínico con un contenido de proteína de un 85% mediante el método de precipitación en el punto isoeléctrico y se determinó el contenido de glucósidos cianogénicos, inhibidores de tripsina y fitatos, los cuales disminuyeron considerablemente a los encontrados en la harina desengrasada de la almendra de capulín. Se realizó el perfil de aminoácidos en el aislado encontrándose que es deficiente en aminoácidos azufrados y triptofano. Se llevó a cabo el ensayo biológico para evaluar la calidad de la proteína del aislado proteínico y se probaron diferentes dietas para de esta manera realizar la suplementación necesaria que corrigiera la deficiencia de los aminoácidos limitantes del aislado proteínico utilizándose otras fuentes de proteína vegetal como arroz, maíz y garbanzo. Los valores obtenidos mostraron que la proteína del aislado proteínico es de mala calidad, (0.4 REP), y se observó que todas las dietas mostraron una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control. En los resultados de la biometría hemática el aislado proteínico presentó valores más bajos en hemoglobina, hematocrito y volumen corpuscular medio.

Con los resultados obtenidos en este estudio se puede concluir que el aislado de proteína de la almendra de capulín no puede proponerse para la alimentación humana y/o animal.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la calidad nutrimental de la fracción proteínica de la almendra de capulín (*Prunus serotina*) y confirmar su inocuidad.

Objetivos Particulares

- Confirmar que la almendra de capulín tiene un potencial como fuente de proteína y grasa dietética, donde la fracción proteínica es adecuadamente biodisponible.
- Determinar la alta concentración de glucósidos cianogénicos en especial en la harina desengrasada y evaluar su grado de toxicidad aguda.
- Realizar el proceso de detoxificación de la fracción proteínica, para obtener el aislado de proteína, que no supere el límite de glucósidos cianogénicos establecido.
- Determinar la digestibilidad "*in vitro*" e "*in vivo*" del aislado proteínico.
- Realizar la complementación necesaria de acuerdo al perfil de aminoácidos y la calificación química, del aislado proteínico de la almendra de capulín.
- Evaluar la calidad nutrimental del aislado proteínico de la almendra de capulín, mediante un ensayo biológico.

3. GENERALIDADES

En México el hambre y la desnutrición son un problema ancestral; así no obstante el aumento en la disponibilidad de los alimentos, más que en la producción todavía se presenta un alto porcentaje de desnutrición protéico-calórica en nuestro país particularmente en las zonas rurales marginales (Figura 1, Tabla 1). En estas comunidades los sectores más afectados son la población infantil ya que las cifras de grave desnutrición escolar son del orden de 32.0 y 38.3 % para niños y niñas respectivamente lo que se traduce en una alta tasa de mortalidad infantil. ⁽¹⁻³⁾

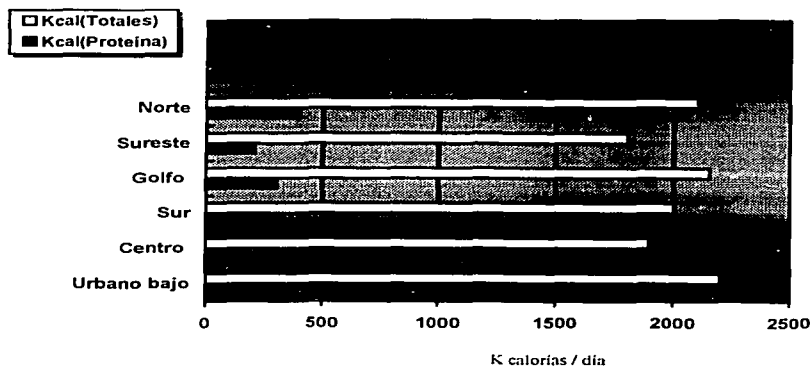


Figura 1.
Consumo calórico y proteínico en el medio rural.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 1.
Principales causas de mortalidad en la
Población Rural marginal en 1990.

No.	CAUSA	TASA *
1	ENFERMEDADES INFECCIOSAS INTESTINALES	83.6
2	DESNUTRICION Y ANEMIAS	43.1
3	SARAMPION Y OTRAS ENFERMEDADES DE LA INFANCIA	34.6
4	INFLUENZA Y NEUMONIA	33.6
5	ENFERMEDADES DEL CORAZON	32.6
6	ACCIDENTES Y VIOLENCIA	31.2
7	TUMORES MALIGNOS	23.6
8	AFECCIONES DEL PERIODO PERINATAL	19.1
9	TUBERCULOSIS PULMONAR	17.8
10	CIRROSIS Y ENFERMEDADES CRONICAS DEL HIGADO	13.0

* Datos por 100,000 habitantes (Boletín mensual de epidemiología, SSA)

Referente a las condiciones reales de la alimentación en estas zonas, todavía hay un gran desconocimiento que incluye hasta lo más básico como son los recursos naturales con que se cuentan. Así tenemos el mito de que en estas comunidades se consume una dieta monótona y poco variada, sin embargo, hay claros ejemplos que muestran todo lo contrario. No obstante en estos entornos indígenas con tal de obtener tierras adecuadas para el sistema intensivo de monocultivos y extensión de ganadería, se destruye la vegetación silvestre o semi-silvestre en forma indiscriminada, lo que pone en peligro el potencial germoplásmico, lo que algunos autores denominan como "erosión genética". Por lo tanto el riesgo de la pérdida de especies vegetales que hasta el momento no ha sido valoradas en su plenitud, en especial aquellas especies actualmente relegadas pero que ocuparon un lugar relevante antes de la conquista española y que pueden ser fuentes potenciales de nutrimentos para el hombre y los animales domésticos. ^(1,4,5)

La discrepancia en el suministro de alimentos y el crecimiento de la población se sigue incrementando, por lo cual es urgente realizar acciones tendientes a su solución. Liener y otros investigadores consideran que una solución a corto plazo, consiste en incrementar la producción de alimentos de origen vegetal de buena calidad nutritiva como son las semillas oleaginosas, ya que éstas tienen una alta eficiencia en el aprovechamiento de la energía solar, y son las más redituables en la producción de

viveres para el hombre; además, en el mercado dinámico y cambiante de los aceites y grasas, se requiere la búsqueda de nuevas fuentes oleaginosas no convencionales. ⁽⁶⁻⁸⁾

Actualmente millones de toneladas de semillas de frutos son descartadas cada año, produciendo problemas de contaminación ambiental y consecuentemente de salud pública. Se menciona que las semillas de los frutos del género *Prunus*, pueden ser un suministro importante tanto de la proteína y grasa alimenticia Dentro de la gran diversidad de la flora mexicana, existen especies cuya potencialidad productiva es alta y pueden ser fuente de nutrimentos para la alimentación humana y animal; sin embargo, estos recursos están subaprovechados, tal es el caso del "capulín" (*Prunus serotina*), no obstante que sus usos se remontan a tiempos prehispanicos. ⁽⁹⁻¹¹⁾

3.1 CAPULIN (*Prunus serotina*).

En el país, el capulín es un arbusto o árbol de gran importancia en las zonas rurales, debido a que la fruta se consume desde tiempo inmemorial, ya que su sabor y apariencia hacen recordar a la cereza, incluso en Norteamérica se le conoce como **american cherry** o **black cherry**, además, en algunas regiones es costumbre consumir la almendra de la semilla tostada. Otros usos que tiene este recurso vegetal, son como madera para fabricar muebles, guitarras, ataúdes y también tiene usos medicinales. Actualmente se les ha dado importancia en la reforestación, ya que es una especie de rápido crecimiento que se desarrolla en suelos pobres; además, sus raíces son profundas y evita la erosión del suelo. ⁽¹²⁻¹⁵⁾

El capulín es una especie de amplio rango de adaptabilidad, tanto al suelo como a las condiciones climáticas adversas (heladas y sequías). Su distribución en nuestro país es amplia; así, se pueden localizar arboles en Baja California Sur, Coahuila, Colima, Chiapas, Chihuahua, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Edo. de México, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas. ^(12,13,16) Además, se pueden encontrar en toda la región andina hasta Ecuador y Bolivia, siendo un árbol fácilmente identificable y representa para los Andes, lo que la palma para las costas.

En México es una de tantas especies que puede considerarse como semi-cultivada o en fase incipiente de cultivo, ya que en el proceso de selección, las plantas sembradas actualmente no difieren mucho de sus antecesores silvestres. Su distribución es tan amplia que se localiza desde zonas templadas (2,200-3,100 m de altitud) hasta regiones bajas de clima tropical. ⁽¹⁴⁾ El capulín es frecuentemente utilizado como un sistema agroforestal ya que es de rápido crecimiento y se desarrolla en suelos pobres. Algunos árboles dan frutos carnosos grandes, éstas son las variedades que se deben de seleccionar y de propagar como se ha hecho alrededor del mundo, ya que el capulín es un alimento de buena calidad y tiene bastante potencial de mejoramiento, esto 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.

3.2 COMPOSICION QUIMICA DE LA ALMENDRA DE CAPULIN.

Se menciona en trabajos recientes que la almendra de capulín (*Prunus serotina*) se puede considerar como una fuente de proteína (30%) y de grasa (40%), así como



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPULIN (*Prunus serotina*)

algunos micronutrientes, en particular de vitamina C y E, y son una buena fuente de hierro y zinc, también se indica que la proteína tiene buena digestibilidad. Con respecto a la fracción proteínica, se menciona desde el punto de vista nutricional, que esta es deficiente de aminoácidos azufrados. ^(17,18) Además, la almendra de capulín es buena fuente de β -glucosidasa, enzima de amplia importancia en ciertas aplicaciones enzimáticas ⁽¹⁹⁻²¹⁾.

3.3 FACTORES ANTINUTRICIONALES Y TÓXICOS QUE SE ENCUENTRAN PRESENTES EN LA ALMENDRA DE CAPULÍN (*Prunus serotina*).

Los alimentos de origen vegetal contienen, de forma natural, una serie de sustancias denominadas "factores antinutricionales", capaces de disminuir la disponibilidad de los nutrientes esenciales.

Estos factores se clasifican en función del tipo de nutrientes con los que interfieren según afecten a la digestión de las proteínas, a la asimilación de los minerales, o aumenten o inactiven el requerimiento de vitaminas.

Las semillas del género *Prunus*, contienen glucósidos cianogénicos, por tal motivo se les ha responsabilizado de envenenamiento en el hombre y animales tanto domésticos como salvajes. ^(9,22,23)

De estudios previos, se ha reportado una alta concentración de glucósidos cianogénicos (amigdalina) en la almendra de capulín (aprox. 200 mg HCN/100g); así como la presencia de fitatos e inhibidores de tripsina y taninos. ^(24,25) Se ha realizado el estudio toxicológico subagudo de la fracción proteínica de la almendra de capulín, del cual se desprende que es necesario efectuar un proceso de detoxificación en la almendra de capulín. ⁽¹⁸⁾

3.3.1 INHIBIDORES DE TRIPSINA.

Estos factores tóxicos son de naturaleza proteínica, las estructuras y propiedades de estas sustancias varían enormemente.

Los inhibidores de tripsina son llamados así por su habilidad para inhibir la actividad de la tripsina que es una enzima proteolítica, la cual se libera del páncreas al tracto digestivo en el hombre y animales. Existen evidencias para indicar que la tripsina en el intestino suprime la secreción de enzimas pancreáticas por inhibición de retroalimentación y que los inhibidores de tripsina provocan un incremento en la secreción de enzimas impidiendo la supresión de la tripsina. Por lo que se les atribuye la hipertrofia del páncreas que regularmente se observa en animales alimentados con dietas que contienen leguminosas crudas. ⁽²⁶⁾

Es un hecho reconocido que las semillas de ciertas leguminosas, al ser incorporadas de esta forma en dietas experimentales para animales, no permiten un crecimiento normal. Se menciona que la inhibición del crecimiento podía ser el resultado de una pérdida endógena de aminoácidos esenciales de un páncreas hiperactivo, que responde, en forma compensatoria a los efectos del inhibidor de tripsina. La pérdida de metionina en esta fase sería particularmente aguda, ya que las proteínas de estas leguminosas son notoriamente deficientes en estos aminoácidos.

GENERALIDADES

Al utilizar semillas en forma cocida desaparece este efecto. La mayoría de los inhibidores de proteasas son destruidos por calentamiento con lo cual se logra mejorar el valor nutricional de las leguminosas. Pueden ser inactivados por tratamiento térmico (hasta un 90% en agua hirviendo durante 3 minutos). También se cree que durante la etapa de germinación van desapareciendo. ⁽²⁶⁾

3.3.2 ÁCIDO FÍTICO.

Se encuentra naturalmente en semillas, leguminosas, cereales y oleaginosas y en menor cantidad en tubérculos y hortalizas en forma de sal de potasio, calcio o magnesio o formando complejos con proteínas y minerales donde su principal función es como almacén de fósforo y metales traza. ⁽²⁷⁾

Los efectos antinutricionales del ácido fítico vienen ligados a su estructura y a los valores de pH que normalmente se encuentran en los alimentos (próximos a la neutralidad) determinan que el ácido fítico se encuentra en forma de anión, con un potencial para formar complejos uniéndose a moléculas con carga positiva tales como cationes o proteínas. Muchos de estos complejos son de naturaleza insoluble, y teniendo en cuenta que la solubilidad es uno de los factores esenciales para que un nutriente sea asimilado por el organismo, la presencia del ácido fítico en un alimento se considera un factor limitante de su valor nutricional. A pH normales el ácido fítico es un fuerte quelante de cationes a valores apropiados de pH y de concentración, causa la precipitación con cationes polivalentes y proteínas. El fenómeno de precipitación provoca una reducción de la biodisponibilidad de minerales traza esenciales y reducción en la digestibilidad de las proteínas. ⁽²⁸⁾

3.3.3 GLUCÓSIDOS CIANÓGENICOS.

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). La toxicidad de estos glucósidos se debe a la liberación de cianuro, el cual, es muy tóxico, y concentraciones relativamente altas de estos tóxicos han sido encontradas en algunas gramíneas, leguminosas, raíces feculentas y almendra de frutas (Tabla 2). ⁽²⁹⁻³¹⁾

Tabla 2.
Alimentos con glucósidos cianogénicos y cantidad de HCN producido.

Planta	Cantidad de HCN (mg/ 100g de muestra.)	Glucósido
Almendras amargas	250	Amigdalina
Raíz de mandioca	53	Linamarina
Sorgo (planta completa)	250	Durrina
Frijol de Lima	10 – 312	Linamarina

La liberación del HCN, a partir de los glucósidos cianogénicos, al masticar o triturar plantas que los contienen, se deben a un proceso enzimático en el cual intervienen dos enzimas, (Figura 2):

El primer paso consiste en la hidrólisis del azúcar catalizado por una β -glucosidasa, que rinde una cianhidrina (aglucon), y un azúcar; la mayoría de las cianhidrinas son inestables y se descomponen espontáneamente en los correspondientes cetona o aldehído y HCN; tal descomposición se acelera por el efecto de la enzima hidroxinitril-liasa. ⁽²⁹⁾ Esta enzima se encuentra en la misma planta y actúan sobre los glucósidos cianogénicos cuando ésta sufre ruptura del tejido debido a daños mecánicos. ⁽³¹⁾

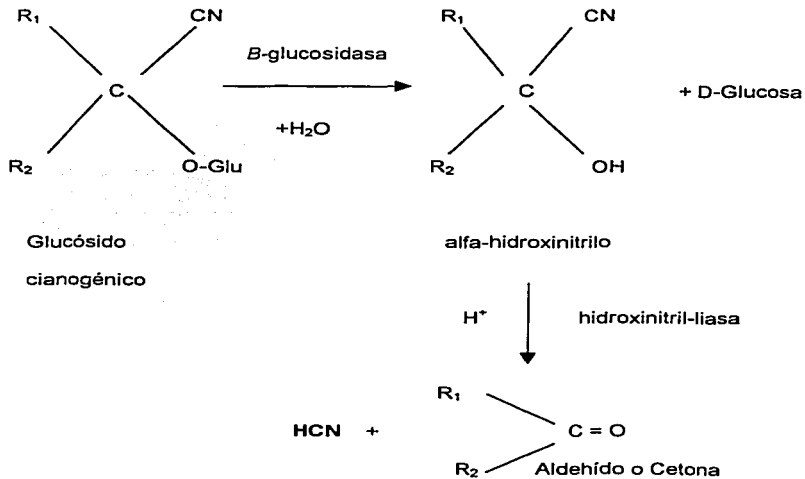


Figura 2.
Liberación de ácido cianhídrico a partir de los glucósidos cianogénicos.

GENERALIDADES

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.

Las características clínicas por envenenamiento agudo con cianuro son: confusión mental, parálisis muscular generalizada, y dolor a la respiración. 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 cianuro ejerce su acción tóxica al unirse al ion férrico del citocromo oxidasa de las mitocondrias, impidiendo con ello la respiración celular.

Los glucósidos cianogénicos son amargos y son termoestables, se pueden eliminar por remojo.⁽²⁹⁾

3.3.4 ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS.

De modo genérico se puede definir la toxicidad de una sustancia como su capacidad de producir efectos nocivos a un organismo vivo. De este modo habrá sustancias con alto grado de toxicidad que producirán efectos nocivos a bajas dosis y sustancias débilmente tóxicas que producirán efectos nocivos sólo si se utilizan o administran en dosis elevadas. Para determinar el nivel de toxicidad de una sustancia es indispensable elegir:

- Dosis (cantidad de sustancia absorbida),
- Vía de administración (oral, intramuscular, subcutánea, etc.),
- Frecuencia de administración (administración única o repetida),
- Grado de toxicidad
- Tiempo (el necesario para que aparezcan los efectos).

Tiempo de exposición.

Los efectos de las sustancias tóxicas están relacionadas con la duración o tiempo de exposición, los estudios toxicológicos se dividen por lo general en tres categorías:⁽³³⁾

- Estudio de toxicidad aguda o a corto plazo (24-48 hrs).
- Estudios de toxicidad a mediano plazo (subcrónicos).
- Estudios de toxicidad a largo plazo (crónicos).

3.3.4.1 TOXICIDAD AGUDA

Los estudios de toxicidad aguda se definen como "los efectos tóxicos adversos que aparecen en un corto período después de la administración de una dosis única o de múltiples dosis en un intervalo de 24 horas⁽³³⁻³⁴⁾. También nos ayuda a establecer, la dosis que provoca la muerte del 50% de los animales de experimentación, conocida también como dosis letal media (DL₅₀).

GENERALIDADES

Esto permite descartar sustancias muy tóxicas, así como en un futuro servir de guía para estudios posteriores dando indicaciones sobre los principales signos de intoxicación.

Por lo general los tóxicos deben de administrarse por la misma vía por la cual los seres humanos quedarían expuestos. Además de seleccionar la vía de administración, se requiere un medio portador para disolver o suspender el tóxico a fin de facilitar su administración. El medio *per se* no debe de tener algún efecto de toxicidad, y no debe de relacionarse con el tóxico. Usualmente se usa agua, solución salina, gomas vegetales y/o derivados de la celulosa.

Los factores ambientales como la temperatura del medio ambiente y la humedad relativa, pueden afectar la toxicidad de una sustancia química, por lo cual se estudia un lote control colateralmente.

También es muy importante elegir a la especie apropiada para llevar a cabo el estudio ya que después de administrarse la sustancia tóxica a los animales, éstos deben de ser examinados, para conocer efectos autónomos, centrales y de conducta (Tabla 3) incluyendo su comienzo, intensidad y duración antes de conocer el número y tiempo de muertes. También debe de observarse la frecuencia de estos efectos no mortales en relación con cada dosificación. ⁽³³⁾

Tabla 3.
Relación entre signos de toxicidad y órganos o sistemas del cuerpo.

SISTEMAS	SIGNOS TOXICOS
A. CONDUCTUAL:	Sedación, inquietud, posición de sentado con la cabeza hacia arriba, fijación de la vista hacia el frente, dejar caer la cabeza, jadeo, depresión severa, mordisqueo de las manos, irritabilidad, hostilidad agresiva y defensiva, temor, confusión.
B. SENSORIAL:	Sensibilidad al dolor, rectificación, córneo, laberinto, sensibilidad al sonido y al tacto; nistagmo, fonación.
C. NEUROMUSCULAR:	Aumento y disminución de la actividad, temblores, convulsiones, ataxia, postración, cola straub, debilidad de extremidad trasera, dolor y reflejos de extremidad (ausentes o disminuidos), tono muscular, muerte.
D. OCULAR	Reflejo pupilar a la luz, lagrimación, midriasis
E. GASTROINTESTINAL	Diarrea, orina con sangre, náusea, diarrea, defecación y orina con Sangre, micción y defecación involuntarias.
F. CUTANEO:	Piloerección, estremecimientos, eritema, edema, necrosis, alopecia.
G. RESPIRATORIO:	Disnea, jadea, apnea.
H. CARDIOVASCULAR	Aumento o disminución del ritmo cardíaco, cianosis, vasoconstricción, Vasodilatación, hemorragia.

Los valores obtenidos de DL₅₀ son útiles en varias formas como lo son:

1. Calificación de productos químicos según su toxicidad relativa (Tabla 4).
2. Evaluación del peligro por dosis excesiva accidental.
3. Planeación de estudios de toxicidad subcrónica y crónica en los animales.

TABLA 4.
Rangos de toxicidad en rata*

Categoría	DL ₅₀ (mg/Kg p.c.)
Extremadamente tóxico	< 1
Altamente tóxico	1-50
Moderadamente tóxico	50-500
Ligeramente tóxico	500 -5000
Prácticamente tóxico	5000 -15,000
Relativamente inocuo	> 15,000

*dosis oral única.

Repetto 1991.

3.3.4.2 TOXICIDAD SUBCRÓNICA.

La toxicidad subcrónica es el conjunto de los efectos observados después de una administración cotidiana repetida o frecuente de una o varias dosis de la sustancia estudiada. La duración de esta prueba dura generalmente en un período de aproximadamente 10% de la vida del animal o tratamientos más cortos de 14 a 28 días para roedores pequeños como el ratón. Su objetivo es determinar los posibles efectos acumulativos en los tejidos y sistemas metabólicos.

Entre las observaciones a realizar se incluyen la inspección diaria del aspecto físico de los animales del ensayo y su comportamiento. Se registran semanalmente el peso corporal, el consumo de alimento y las características de las heces. Periódicamente se hacen estudios hematológicos y oculares, además de análisis bioquímicos de sangre y orina. En circunstancias especiales se hacen pruebas de funcionamiento hepático, renal y gastrointestinal así como mediciones de la presión sanguínea y de la temperatura corporal. Al terminar el experimento en todos los animales se les practica la autopsia, prestando atención a los cambios patológicos macroscópicos, incluyendo los cambios de peso de los principales órganos y glándulas.

3.3.4.3 TOXICIDAD CRÓNICA.

El objetivo general de los ensayos de toxicidad crónica es el evaluar los resultados de la toxicidad resultante de la exposición, durante mucho tiempo, a dosis relativamente bajas, datos que no pudieron observarse en las pruebas subcrónicas. Estos ensayos requieren la administración del producto problema por una ruta apropiada y durante la mayor parte de la vida animal experimental.

Las pruebas de toxicidad crónica diseñan de manera que tanto el grupo tratado como el control estén constituidos por un número suficiente de animales de ambos sexos, de la especie y raza elegidas, para que al terminar el experimento haya un número suficiente de animales de ambos sexos, de la raza y la especie elegidas, para que al terminar el experimento para que haya un número suficiente de supervivientes para la evaluación de los estudios histopatológicos y para el tratamiento estadístico de los resultados. ⁽³³⁾

3.4 PROTEÍNAS

3.4.1 IMPORTANCIA Y CALIDAD.

El vocablo proteína, se deriva de la raíz griega "protos", que significa "de importancia primordial". Las proteínas son los constituyentes principales de los tejidos activos del organismo y su principal función es la de aportar el nitrógeno y los aminoácidos necesarios para la síntesis de las proteínas corporales y sustancias nitrogenadas; por lo que la calidad y cantidad de estos compuestos en la dieta diaria, son parámetros fundamentales a ser considerados. ⁽³⁵⁾

Las proteínas son macromoléculas compuestas por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, formado por unidades llamadas aminoácidos. Las proteínas se pueden clasificar según su estructura química y por la gran variedad que existen, éstas intervienen en numerosos procesos desempeñando diversas funciones tales como: *biológicas* en el organismo humano; *energéticas*, ya que una pequeña cantidad de energía que necesitan las células es suministrada por las proteínas; *plástica*, ya que forman parte del esqueleto celular y participando en la construcción de órganos y tejidos; catalizadora, interviniendo en diferentes reacciones metabólicas; *mediadora*, como el caso de las hormonas, transmitiendo información en el organismo, no es por demás mencionar otra función muy importante que es la de *transportación* ya que las proteínas se encargan de transportar sustancias a través de la sangre y otros líquidos corporales así como la función *contractil* ya que intervienen en la contracción de los músculos.

La determinación del contenido de proteína de un alimento no es suficiente para evaluar su calidad nutricional, ya que existen diversos factores que influyen en su aprovechamiento por el organismo. Estos factores principalmente se refieren a la naturaleza, balance y biodisponibilidad de aminoácidos en cantidades adecuadas para cubrir los requerimientos de un organismo. ⁽³⁶⁾

En muchas partes del mundo, principalmente en los países en desarrollo, son muy escasas las fuentes de proteína de buena calidad. Aún cuando dos alimentos contengan la misma cantidad de proteína, es posible que uno tenga mayor aporte nutricional. ⁽³⁷⁾ En general, las proteínas de buena calidad son aquellas que se digieren fácilmente y contienen aminoácidos indispensables en cantidades que correspondan a los requerimientos de los individuos. ⁽³⁸⁾

3.4.2 AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos son las unidades fundamentales de los polímeros proteínicos, estos compuestos se caracterizan por tener en su molécula un grupo amino y un grupo carboxílico además de contar con un grupo funcional el cual es el que le da la característica particular.

Existen algunos aminoácidos que no pueden ser sintetizados por el organismo, y por lo que deben de ser suministrados mediante la alimentación en proporciones y cantidades adecuadas, estos son los aminoácidos llamados indispensables como son:

- | | |
|----------------|--------------|
| - Fenilalanina | - Treonina |
| - Isoleucina | - Triptofano |
| - Leucina | - Valina |
| - Lisina | - Metionina |

Sin embargo, de entre los ocho aminoácidos indispensables solo cinco limitan la calidad de las proteínas en la dieta del hombre: la lisina, los aminoácidos azufrados (metionina y cistina), treonina y el triptofano. ⁽⁴⁰⁾

Las necesidades de triptofano, fenilalanina y en consecuencia la tirosina se debe a la incapacidad de los animales para sintetizar anillos aromáticos. El triptofano es necesario en la biosíntesis de hormonas y otros compuestos metabólicos.

Cuando la dieta es deficiente en fenilalanina o metionina, hay una deficiencia del mismo modo de tirosina y de cistina, por lo cual estos aminoácidos también deben de ser considerados como indispensables.

Los aminoácidos considerados dispensables, son aquellos que el organismo puede sintetizar en concentraciones suficientes para cubrir sus necesidades si la cantidad de nitrógeno aportado por las proteínas es satisfactoria. ⁽³²⁾

3.4.3 NECESIDADES PROTEÍNICAS.

Se puede establecer una puntuación de la calidad biológica de las proteínas en la dieta a partir de su composición de aminoácidos. Una proteína con contenido deficiente de aminoácidos indispensables tendrá un valor menor que una que los contiene en abundante proporción. Las proteínas de la carne, huevo y la leche tienen la composición de aminoácidos óptima para la alimentación humana, pueden utilizarse como proteína de referencia. Las proteínas contenidas en otros tipos de alimentos pueden sustituir a las proteínas de origen animal a condición de que satisfagan el requerimiento específico de aminoácidos indispensables.

Las necesidades de proteínas de un individuo dependen del origen del aporte calórico debido a que si este último es insuficiente, una parte de las proteínas del régimen alimenticio se emplea para la producción de energía. Las necesidades energéticas se incrementan durante el crecimiento, embarazo y crianza así como durante la producción de secreciones (mujer lactante). ⁽³⁵⁾ Las cantidades indispensables de proteínas que el organismo requiere, se clasifican en dos categorías:

- a) La ración necesaria de aminoácidos indispensables y
- b) La ración necesaria de proteínas totales o nitrógeno total, que el cuerpo debe de obtener para la síntesis de aminoácidos dispensables y de otros elementos nitrogenados de los tejidos.

El comité de expertos de la FAO/ OMS ha valorado los requerimientos proteínicos diarios (Tabla 5) y las necesidades de aminoácidos (Tabla 6) desde la etapa de la niñez a la de adultos. ⁽³²⁾

Tabla 5
Requerimientos Proteínicos diarios *

<u>EDAD (años)</u>	<u>g de proteína/ Kg por día</u>
Lactantes y niños	
0.25 - 0.5	1.86
0.75 - 1.0	1.48
2 - 3	1.13
9 - 10	0.99
Adolescentes	
10 - 11	0.99
14 - 15	0.96
17 - 18	0.86
Adultos ^b	0.75

* Fuente: FAO/OMS/ONU, 1985⁽³²⁾

^b. Durante la gestación se recomienda que la ingesta proteínica se eleve a 6 g/día y en la lactancia una ingesta proteínica diaria adicional de 16 g.

Tabla 6
Requerimientos de aminoácidos sugeridas por la FAO/OMS/ONU. *

Aminoácidos mg/g de proteína	Necesidades requeridas			
	Lactante 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

* FAO/WHO/ONU, 1985⁽³²⁾

** Composición de aminoácidos de la leche de la mujer

Para los adultos, los niveles seguros van de 0.75g/Kg, escolares (10-12 años) 0.99g/Kg; niños (2-5) 1.10g/Kg. Las necesidades de aminoácidos de los niños entre 1 y 2 años pueden ser intermedias entre lactantes y preescolares.

3.4.4 EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LAS PROTEÍNAS.

La evaluación de la proteína de un alimento, normalmente se lleva a cabo partiendo de lo más complejo, comienza con el análisis de nitrógeno y aminoácidos, seguido de una serie de determinaciones químicas específicas, y termina con pruebas biológicas. Debido a que los ensayos con animales han sido ampliamente usados para evaluar la calidad proteínica, han logrado tal reconocimiento, que frecuentemente se considera que los resultados obtenidos suministran toda la información requerida.⁽⁴⁰⁾

Para determinar el valor nutritivo de las proteínas se pueden utilizar métodos químicos o biológicos:

- Métodos químicos

Utilizando los patrones de la FAO/OMS/ONU de 1985 la cantidad adecuada de proteínas que se debe de consumir en cada etapa de la vida puede estimarse 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 forma de evaluar la calidad de las proteínas por métodos químicos.

$$CQ = \frac{\text{mg de aminoácidos por q de proteína a evaluar}}{\text{mg de aminoácidos en la proteína de referencia}} \times 100$$

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.⁽⁴⁰⁾

La calidad de la proteína de un alimento es un parámetro que incide en su valor comercial. Además, existen varias razones que obligan a la industria alimentaria a medir el valor biológico de la proteína de sus productos, entre éstas destacan las regulaciones de la FDA (Food and Drug Administration), sobre todo en casos de exportación, en los que este organismo establece valores mínimos de calidad biológica de la proteína de ciertos alimentos. También es útil la predicción del valor biológico de una proteína o mezclas de éstas, con el propósito de desarrollar nuevos productos o realizar cambios en los ingredientes.⁽⁴¹⁾⁽⁴²⁾

- Métodos biológicos

Una forma de expresar la calidad de una proteína, es por medio de los ensayos biológicos que se basan en medir el crecimiento o la retención de nitrógeno en animales experimentales y la constituye el parámetro relación de eficiencia proteínica (REP), el cual es ampliamente utilizado.

En 1919, Osborne, Mendel y Ferri introdujeron en el concepto de la REP, que después de ser modificado en varias formas, se convirtió en el procedimiento de mayor aplicación en la evaluación de una fuente de proteína, mediante pruebas biológicas.⁽³⁹⁾

La relación de eficiencia proteínica (REP) es la ganancia en peso obtenida por gramo de proteína consumida.

$$\text{REP} = \frac{\text{Ganancia en peso (g)}}{\text{Proteína consumida (g)}}$$

Los valores son medidos, generalmente, usando un grupo de ratas machos destetadas, cuyo peso oscila entre 40-60 g antes del período de aclimatación, que dura de 2 a 4 días. A estos animales se les suministra una dieta que incluye el 10% en peso de la proteína a estudiar, de forma que el aporte proteínico resulte inferior a las necesidades, por un lapso de 28 días.

Con frecuencia los valores del REP experimental se relacionan con los valores de la caseína experimental y los obtenidos de la evaluación estándar, cuyo valor es de 2.5.

3.4.5 DIGESTIBILIDAD PROTEÍNICAS

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.⁽⁴³⁾

El aparato digestivo es la puerta por la cual entran al organismo las sustancias nutritivas. Las proteínas y grasas son demolidas hasta unidades absorbibles principalmente en el intestino delgado: la digestión de los alimentos es un proceso ordenado donde intervienen la acción de un gran número de enzimas digestivas presentes en las glándulas salivales, estómago, páncreas y en la mucosa intestinal.⁽⁴⁵⁾

Los aminoácidos de las proteínas presentes en los alimentos, no siempre se encuentran enteramente disponibles dado que la digestión de la proteína a la absorción de los aminoácidos, pueden resultar incompletas. Los aminoácidos de las proteínas animales suelen ser digeridos y absorbidos en un 90%, en tanto que las de ciertas proteínas vegetales en un 60-70%.

La baja utilización de ciertas proteínas puede ser debida a varios factores; entre ellos tenemos:

- Conformación de la proteína, las proteínas fibrosas e insolubles son atacadas con menor facilidad por las proteasas que las globulinas solubles.
- Fijación de metales, de lípidos, ácidos nucleicos, celulosa u otros polisacáridos pueden dificultar o disminuir la absorción de aminoácidos.
- Presencia de factores antinutricionales, tales como inhibidores de tripsina, o algunos otros, pueden dificultar o disminuir la absorción de aminoácidos.
- El tamaño y área superficial de las partículas proteínicas ingeridas; así, por ejemplo, la molienda fina de la harina, tiende a mejorar la digestibilidad de las proteínas de los cereales.
- El procesado a elevadas temperaturas, a pH alcalino, o en presencia de carbohidratos reductores, suele disminuir la digestibilidad proteínica y la disponibilidad biológica de varios aminoácidos, específicamente lisina.^(32,40)

Por lo cual, el valor potencial de una proteína puede ser determinado por métodos químicos, pero el valor real sólo puede ser determinado teniendo en cuenta las pérdidas inevitables que tienen lugar durante la digestión, la absorción y el metabolismo; ya que las primeras pérdidas de una proteína están representadas por la fracción de nitrógeno que no es absorbida y posteriormente se excreta por las heces.⁽⁴⁵⁾

La digestibilidad de una proteína se define como la proporción de nitrógeno que no es excretado en las heces, y que se supone, por tanto, que ha sido absorbido. Se expresa generalmente con relación a la materia seca como un coeficiente en forma porcentual.

Otros métodos, además del método de digestibilidad "*in vivo*", se han tratado de reproducir en el laboratorio, reproduciendo las reacciones que tienen lugar en el tracto digestivo, de esta manera se han diseñado varias técnicas de digestibilidad "*in vitro*", las cuales tratan de simular la condiciones de temperatura pH, tiempo, etc. del organismo. El método de la AOAC, el fundamento, se basa en la medición de los protones liberados del enlace peptídico durante la proteólisis; lo cual se determina directamente con el pH. Esta técnica no proporciona un valor real en la mayoría de las veces, sin embargo; representa una primera evaluación predictiva de la digestibilidad de una proteína.⁽⁴⁶⁾

3.5 PARAMETROS HEMATOLÓGICOS

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

La sangre es conocida a través de una densa red de arterias y venas a todas las partes del cuerpo, con excepción de los cabellos, uñas, cartilagos y córneas. Por medio de las arterias lleva el oxígeno de los pulmones a los tejidos (sangre arterial) y mediante las venas transporta el anhídrido carbónico de los tejidos a los pulmones, donde es expulsado (sangre venosa). La sangre transporta también sustancias nutritivas del intestino al hígado y a los tejidos, conduce la urea, sustancia química que procede del metabolismo de las proteínas y otros productos de desecho del hígado a los riñones, en donde son filtrados y eliminados por la orina a través de los glomerulos renales.

La sangre cumple, además, otras muchas funciones:

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

La sangre posee 5 componentes: agua, glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas y proteínas plasmáticas.

La parte líquida o plasma representa alrededor del 55% de la sangre y los glóbulos, plaquetas y proteínas plasmáticas, el resto. El volumen de la sangre que posee cada individuo depende de factores tales como: especie, edad, sexo, raza, dieta alimenticia, estatura, peso, etc.⁽⁴⁷⁾

3.5.1 BIOMETRÍA HEMÁTICA

La biometría hemática permite establecer sospechas diagnósticas definidas sobre la enfermedad que causa las alteraciones de la misma. Supone el análisis detallado de cada uno de los datos que informa, los cuales se dividen en tres grupos; serie roja, serie blanca y serie trombocítica.

Serie Roja.

En ella se ven involucrados los siguientes parámetros:

- **Eritrocitos (RBC):** se mide en millones por microlitro de sangre ($\times 10^6/\mu\text{L}$) su función es principalmente el transporte de oxígeno. Su valor normal depende de los factores ya mencionados. El actual empleo de contadores de partículas por citometría de flujo permite calcularlos con gran exactitud.
- **Hemoglobina (Hb):** Se mide en gramos por decilitros (g/dl) y representa la cantidad de esta proteína por unidad de volumen. Este parámetro define si hay o no anemia, si los valores normales son inferiores a los valores normales puede asegurarse que hay anemia. Los valores normales van a depender de la edad, sexo, altura etc.
- **Hematocrito (Hto.):** Se mide en porcentaje por unidad de volumen de sangre(%), y representa la proporción de eritrocitos en el total de la sangre. Este parámetro no se mide directamente, sino que se calcula a partir de la medición de eritrocitos y del volumen corpuscular medio; por lo cual es un parámetro con menor exactitud que el de la hemoglobina y eritrocitos.
- **Volumen corpuscular medio (VCM):** Se mide en femtolitros (fL) es el parámetro más importante de los índices eritrocitarios; ya que permite saber si la anemia es macrocítica (MCV mayor a valores normales) o microcítica (MCV menor a los valores normales).
- **Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM).** Este índice eritrocítico es medido como (g/dl). Puede determinarse dividiendo la Hemoglobina multiplicada por 100 entre Hematocrito.

Serie Blanca

- **Número de Glóbulos Blancos (WBC):** Se mide en miles por microlitro de sangre ($\times 10^3/\mu\text{l}$). Su valor expresa posibles infecciones, por arriba del rango normal de referencia se habla de leucocitosis (infecciones agudas, intoxicaciones metabólicas hemorragia aguda entre otras) y cuando se encuentra por debajo se habla de leucopenia (infecciones bacterianas, infecciones vírales, etc.). El número de leucocitos depende de diferentes factores, tales como edad, sexo, peso etc.,
- **Cuenta diferencial de Glóbulos Blancos:** En la citometría hemática es de gran importancia ya que en la sangre periférica pueden encontrarse cinco tipos diferentes de leucocitos: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos. Todo este sistema está diseñado para defender contra cuerpos extraños y, sin embargo, cada uno de estos sistemas tiene funciones diferentes y en pruebas actuales se sugiere que cada una se comporta como un sistema relacionado pero separado.

Serie Trombocítica

- **Número de Plaquetas:** se mide en número de plaquetas por microlitro de sangre, su principal función es intervenir en la coagulación sanguínea. Cuando el número de plaquetas, se encuentra por arriba del normal, se habla de trombocitosis, cuyas causas son múltiples, padecimientos malignos, anemia por deficiencia de hierro, infecciones agudas, etc., y cuando el valor se encuentra por debajo del rango normal se habla de trombocitopenia y sus causas pueden ser debido a anemias, leucemia aguda, transfusiones sanguíneas, medicamentos citotóxicos, etc. ⁽⁴⁷⁾

En la Tabla 7 se muestran los valores normales de los anteriores parámetros en ratas Wistar.

Tabla 7
Valores normales de parámetros sanguíneos en ratas Wistar.^a

Parámetro	Unidades	Promedio	S.D. *	Rango
Leucocitos (WBC)	(x 10 ³ /μL)	9.92	0.96	8.00 - 11.00
Eritrocitos (RBC)	(x 10 ⁶ /μL)	8.95	0.40	8.15 - 9.75
Hemoglobina (Hb)	(g/dL)	14.6	0.58	13.40 - 15.80
Volumen corpuscular medio (MCV)	(fL)	53.8	2.00	49.8 - 57.8
Hematocrito (PCV)	(%)	47.4	1.50	44.4 - 50.4
Plaquetas	(x 10 ³ /μL)	340	70.0	150 - 450

^a Peso de entre 180-250g
* Desviación estándar.
Derelanks, 1995. ⁽⁴⁸⁾

4 DESARROLLO EXPERIMENTAL

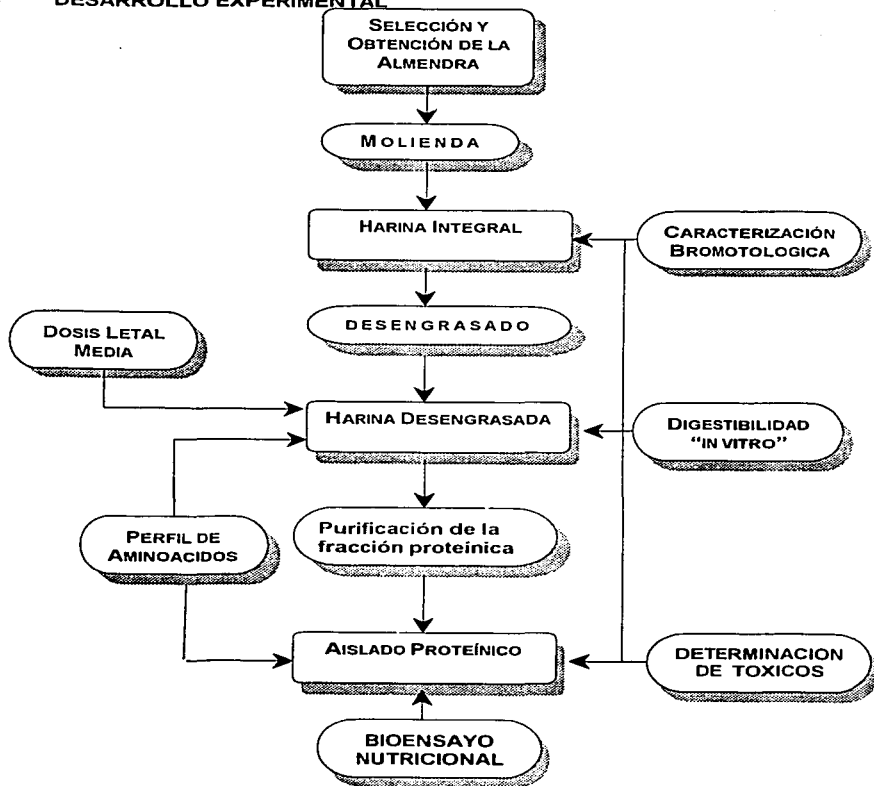


Figura 3. Diagrama general de trabajo

DESARROLLO EXPERIMENTAL

En el diagrama de trabajo (Figura 3) se muestra un panorama general de trabajo; a continuación se describen los puntos más relevantes, de cada uno de los procesos que se llevaron a cabo.

4.1 SELECCIÓN Y OBTENCIÓN DE LA SEMILLA.

Se utilizó aproximadamente 7 Kg de semilla de capulín, la cual se adquirió en la localidad de Huamantla, Tlaxcala y fue clasificada en el herbario del IMSS como *Prunus serotina*. A las semillas se les quitó la cáscara con ayuda del pistilo de un mortero y se obtuvo la almendra íntegra, de este modo se evita la posible hidrólisis de la amígdalina y la oxidación debido a su alto contenido de grasa. ⁽¹⁷⁾⁽⁴⁹⁾

4.2 MOLIENDA.

Las almendras íntegras se fraccionaron en un molino con malla de 2 mm de diámetro y una fracción representativa del lote se molió utilizando una malla de 1 mm de diámetro, para realizar el análisis proximal.

4.3 DESENGRASADO.

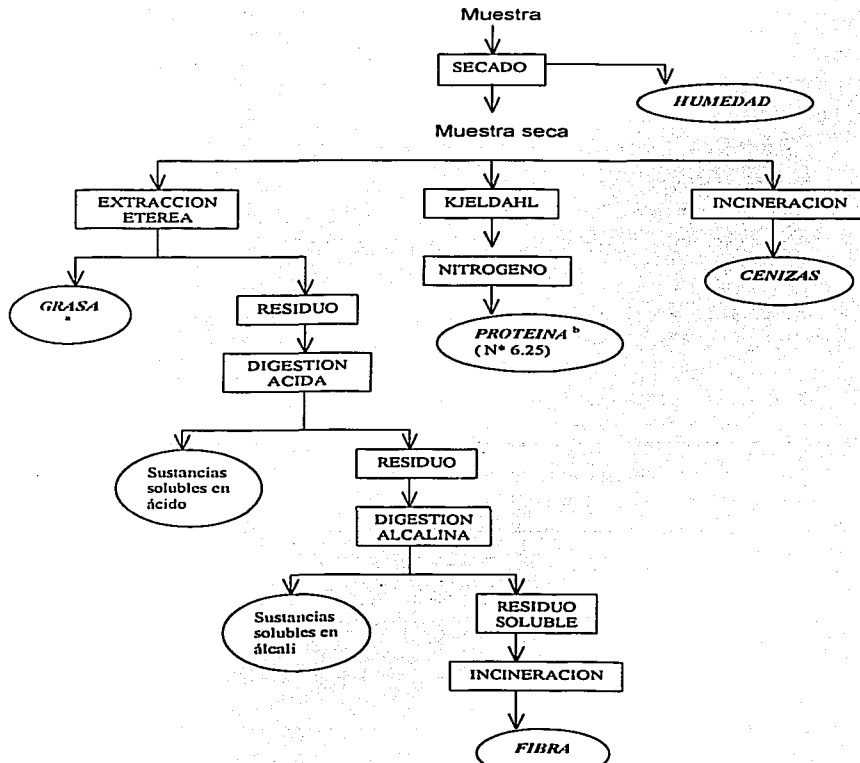
La harina obtenida se colocó en un cartucho de papel filtro y se procedió a desengrasar en un dispositivo tipo Soxhlet (**apéndice 1**), el cual permitió desengrasar de uno a dos Kg. de material, usando hexano como disolvente de extracción. ⁽¹⁸⁾⁽⁴⁹⁾ A la torta residual de la extracción, se le eliminó el exceso de disolvente posteriormente se molió finamente (tamaño de partícula < 1 mm) para obtener la harina desengrasada de almendra capulín, por otro lado se obtuvo la grasa, a la cual se le separó el disolvente de esta forma se obtuvo la grasa cruda, la cual sirvió para otro estudio colateral.

4.4 CARACTERIZACION BROMATOLÓGICA

A las muestras obtenidas de harina integral, harina desengrasada y aislado proteínico de la almendra de capulín se les realizó el análisis proximal de acuerdo a los métodos establecidos por la AOAC con ligeras modificaciones. ⁽⁴⁶⁾

El esquema de Weende (Figura 4), muestra de manera general la realización del análisis proximal, determinándose en las muestras; humedad, proteína, grasa, fibra, cenizas e hidratos de carbono. Las determinaciones se realizaron por duplicado

Figura 4. Esquema de Weende.



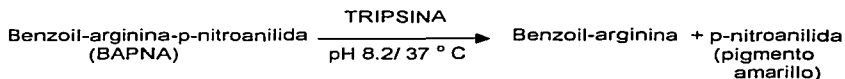
- a. En la determinación de grasa se utilizó éter de petróleo como disolvente.
 b. Para la cuantificación de la proteína se utilizó el digestor TECATOR modelo a/b,20/40 y el destilador TECATOR AUTO KJELTEC No. 1030.

4.5 DETERMINACIÓN DE TOXICOS

4.5.1 DETERMINACION DE INHIBIDORES DE TRIPSINA

La determinación de los inhibidores de tripsina se basa en poner en contacto el extracto acuoso directo o diluido de una muestra con una solución estándar de Tripsina posteriormente se determina la actividad proteolítica remanente usando un sustrato sintético en este caso se utilizó el Benzoil-arginina-p-nitroanilida [BAPNA], el cual produce una coloración que es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de Tripsina y que se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm.

La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



Material y reactivos

- Potenciometro (CORNING mod.10)
 - Parrilla con agitación magnética (THERMOLYNE mod. sp-13025)
 - Baño maría (GRANT mod. SE10)
 - Espectrofotómetro (SEQUOIA TURNER mod. 340)
 - Mezclador de tubos (LAB-LINE mod. Super-mixer)
 - Solución amortiguadora de TRIS pH 8.2 y 0.05M (a)
 - Solución BAPNA (b)
 - Acido acético al 30%
 - Solución estándar de tripsina (c)
 - HCl 0.001N
- a) Solución amortiguadora TRIS (hidroximetil- amino-metano): se pesan 3.03 g de tris y 0.55 g de CaCl₂ · H₂O, disolver en 400 ml de agua destilada, ajustar el pH a 8.2 y aforar a 500 ml
- b) Solución de benzoil-arginina-p-nitroanilida (BAPNA): se disuelven 100 mg de BAPNA en 2.5 ml de dimetil- sulfóxido, la disolución se realiza se calienta en baño de agua a 37 ° C, y se afora a 250 ml con amortiguador Tris previamente calentado 37 ° C. Esta solución debe de ser preparada el mismo día de su uso y se mantiene a 37 ° C.
- c) Solución estándar de Tripsina: se pesa con mucha exactitud 1 mg de tripsina bovina (SIGMA T-8253) y se disuelven en 50 ml de HCl 0.001N. Esta solución contiene 20 µg de tripsina/ ml y esta debe de ser almacenada en refrigeración donde puede durar de 2 a 3 semanas sin pérdida de actividad.

Procedimiento:

Preparación del extracto: Se peso aproximadamente 0.5 g de las muestras respectivas (finamente molidas y desengrasada) de harina desengrasada y aislado proteínico se transfiere a un vaso de precipitados añadir 50 ml de agua destilada y agitar mecánicamente en la parrilla de agitación por espacio de 30 minutos a 200 r.p.m. Posteriormente dejar reposar el extracto por media hora.

10 ml de la suspensión se desestabilizan agregando un volumen de buffer necesario, esta debe de ser diluida de tal manera que 1 ml del extracto produzca una inhibición entre 40 y 60 % esto ayuda a reducir la desviación estándar del método.

Determinación de la actividad: En un tubo de ensaye se adicionan 2 ml de solución BAPNA, recién preparada, luego se agrega 1 ml de muestra y 0.5 ml enzima se meten en baño maría a 37 ° C por 10 minutos y se detiene la reacción con 0.5 ml de ácido acético 30%. Se transfiere a una fotocelda para su lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm, previamente ajustado a 100 % T con agua, es necesario correr un blanco cual tubo el mismo tratamiento y contiene todos los reactivos excepto la muestra en este caso se adiciona 1 ml de agua.

Cálculos:

Definiendo una Unidad de Tripsina como el incremento de 0.01 unidades de Absorbancia (410 nm), bajo las condiciones de prueba, la actividad de los inhibidores de tripsina es expresada en unidades de tripsina inhibida (UTI) por miligramo de muestra:

$$\text{UTI/mg muestra} = \frac{((A_{410}^b - A_{410}^m) \cdot 100) F}{\text{mg mtra} / B}$$

Donde :

A_{410}^b = Absorbancia del blanco
 A_{410}^m = Absorbancia de la muestra.
 F = factor de dilución
 B = aforo al que se llevo la muestra

4.5.2 DETERMINACION DE FITATOS (Método de Haug & Lanztsch 1983)

Esté método se basa en la determinación colorimétrica indirecta del fósforo de fitato en la muestra. El extracto de la muestra es calentado con una solución acidificada de hierro III de concentración conocida de hierro el cual forma un complejo con el fitato.

Se cuantifica el fierro residual que el ácido fítico no alcanza a acomplejar mediante la reacción colorida que se produce con la 2,2 biperidina y que es fácilmente mensurable espectrofotométricamente.

Material y reactivos

- o Parrilla de calentamiento
 - o Balanza de dos platos (Fisher Scientific, mod 821)
 - o Centrifuga (Du Pont Instruments- Sorvall RC 5B)
 - o Espectofotometro (SEQUOIA-TUNER, mod 340).
 - o Mezclador de tubos (LAB-LINE, mod Super-mixer)
 - o HCl 0.2N
 - o HCl 2 N
 - o Ácido tioglicólico
 - o Solución de referencia de fitato (a)
 - o Solución férrica (b)
 - o Solución de 2,2'-Bipiridina(c)
 - o Agua desionizada
- a) Se prepara una solución stock que contenga 150 mg de sal sódica de ácido fítico, (Type V, 97%, SIGMA No. P-5756), sé afora a 100 ml con agua destilada.
- b) Se disuelven 0.2 g de sulfato férrico de amonio. 12 H₂O (Merck Art. 3776) en 100 ml de HCl 2N y sé afora con agua destilada a 1000 ml.
- c) Sé disuelven 10 g de 2,2'- bipiridina (Merck Art. 309B) y 10 ml de ácido tioglicólico (Merck Art. 700) en agua destilada y aforar a 1000 ml. Esta solución es estable por varios meses a temperatura ambiente.

Procedimiento

Curva Patrón. La solución de referencia se prepara diluyendo la solución stock con HCl en un rango de 3 a 30 µg/ml de fitato de fósforo.(Tabla 8)

Tabla 8
Preparación de estándares (Haug & Lantsch)

Tubo	ml de solución standard (1.5 mg/ml)	Aforo a (ml) (HCl 0.2 N)	Concentración final µg P / ml
1	1	100	3.01
2	2	100	6.03
3	4	100	12.0
4	6	100	18.1
5	8	100	24.1
6	10	100	30.1

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Muestras. Se pesan de 0.040 - 0.120 g de muestra (dependiendo del contenido esperado de ácido fítico presente en la muestra) y se colocan en vaso de precipitado de 50 ml, se adicionan 20 ml de HCl 0.2 N y se somete a agitación mecánica a temperatura ambiente durante 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se centrifuga el extracto a 1200 r.p.m. durante 15 minutos a temperatura ambiente, se colecta el sobrenadante y se toma una alícuota de 0.5 ml (Δ) y esta se coloca en un tubo de ensayo, se le adiciona 1 ml de la solución férrica y se tapa con una canica, de manera que quede cubierto completamente. Los tubos se colocan en una gradilla y se ponen en un baño de agua a ebullición por 30 minutos cuidando que el agua cubra el nivel del líquido dentro de los tubos. Transcurridos los 30 minutos esperar a que estos se enfríen. Una vez que los tubos han alcanzado la temperatura ambiente se le agregan 2 ml de solución de 2,2'-bipiridina y se mezcla el contenido. Se mide la absorbancia a 519 nm a los 30 segundos exactos después de haber agregado la 2,2'-bipiridina a cada tubo.

ΔA partir de este paso para la lectura del blanco y de los estándares, se toman 0.5 ml de agua (blanco), o de cada uno de los estándares (3 - 30 $\mu\text{g P/ml}$) y se sigue el análisis. Se utiliza una celda con agua desionizada para calibrar el espectrofotómetro en cero. Se lee la absorbancia del blanco, las muestras problema y los estándares, cada una de estas se les resta por separado al blanco para así obtener la absorbancia corregida respectiva.

Cálculos

Se realiza la curva patrón absorbancia contra concentración, se realiza la regresión lineal, y se interpolan los datos, obteniéndose la concentración del analito presente en las muestras.

$$y = mx + b$$
$$x = (y-b)/m$$

Donde:

- x = Fósforo del ácido fítico ($\mu\text{g/ml}$).
- y = Absorbancia de la muestra
- b = ordenada al origen
- m = pendiente de la recta

$$\% \text{ ácido fítico} = ((P.M. \text{ác. fítico} * P \text{ del ác. fítico}) / 6P) / (\text{peso de muestra} * 1000 \mu\text{g})$$

Donde

- % ácido fítico = mg ácido fítico en 100 g de muestra
- P.M. ác. fítico = 660 g/ mol
- P del ác. fítico = fósforo del ácido fítico ($\mu\text{g/ml}$)
- 6P = 185.8 $\mu\text{g/ mol}$ (equivalente a 6 veces el peso molecular del fósforo).
- Peso de la muestra = g de muestra

4.5.3 DETERMINACIÓN DE GLUCÓSIDOS CIANOGENÍCOS.

El método aprovecha la reacción sensible y específica de Guignard, la cual, consiste en hacer reaccionar picrato de sodio con 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 por el método de Lucas B., Sotelo A.⁽⁵⁰⁾ Este método puede detectar hasta 5.0 μg de HCN, equivalente a 46.0 μg de glucósidos cianogénico (referido con linamarina)

Material y reactivos

- Incubadora (BLUE-Congelador comercial)
- Espectrofotómetro (SEQUOIA-TURNER mod 340)
- Baño de agua con agitación (LAB-LINE INSTRUMENTS)
- Tubos de cultivo con tapón de rosca (Pyrex # 9825 y 9826)
- Micromolino (TECATOR mod CICLO- TEC)
- Congelador comercial
- Papel indicador de HCN (a)
- Solución de β - glucosidasa con activador (b)
- Solución de KCN equivalente a 100 μg HCN/ml (24.1 mg/ 100 ml)
- HCl 0.5 N
- Buffer de fosfatos pH 0 7.0
- Solución de picrato de sodio alcalinizada(c)
- Fécula de maíz comercial.

- a) Papel indicador de HCN. Papel Whatman de # 2 es mojado en una solución de picrato de sodio (c), se deja escurrir y se coloca en una estufa (55-60 ° C), por espacio de 30 minutos. Se cortan tiras de 2 x 10 cm.
- b) Solución de β -glucosidasa con activador: 0.25 g se disuelven en buffer de fosfatos a pH =7, con la precaución de agitarlo suavemente (se forma bastante espuma), una vez disuelta la enzima se adiciona 1.7 g de NaNO_3 que actúa como activador de dicha enzima; todo lo anterior se afora a un volumen de 250 ml con el mismo buffer y se obtiene 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 disuelven en agua destilada 2.5 g de ácido pícrico y a continuación 12.5 g de carbonato de sodio, se afora a 500 ml con agua destilada.

Procedimiento:

Curva Patrón. La curva patrón se realizó con una solución de cianuro de potasio con una concentración de 100 μg HCN / ml. A fin de simular la interacción muestra – HCN liberada, se introdujo en la curva estándar la llamada matriz alimenticia, en este caso fue la fécula de maíz comercial

Tabla 9
Preparación de curva estándar para la determinación
de Glucósidos cianogénicos.

ml de KCN (100 µg HCN/ml)	Matriz alimenticia* (mg)	Buffer de fosfatos pH= 7 (ml)	HCl 0.5N** (en frío)	Concentración de HCN (µg)
0.0	500	5.0	10	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

* Fécula de maíz.

**Se adiciona el HCl 0.5 N después llevarse a cabo la reacción a 40 °C / 4hrs

La curva patrón va de 5 - 60 µg de HCN, ya que fue el rango óptimo encontrado 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. (Tabla 9).

Determinación de ácido cianhídrico: en este caso se puede realizar tanto la determinación cualitativa así como la cuantitativa.

Se partió de material integro; para lo cual, el material es sometido a molienda fina se coloca 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 agregan 5.0 ml de β-glucosidasa (fría), se homogeneiza y se coloca la tira de papel indicador humedecida en la boca del tubo y se cierra herméticamente con un tapón rosca. Posteriormente se coloca en el baño María (40± 1 °C) y con velocidad de agitación de 3.5 oscilaciones/minuto durante 4 horas. Pasado el tiempo, el tubo se coloca en el congelador por 30 minutos.

Se adiciona 1.0 ml de HCl 0.5 N (frío) y se cierra perfectamente el dispositivo, se agita evitando que el líquido no toque el papel indicador Se coloca en la incubadora por espacio de 15 minutos / 60 °C.

Determinación cualitativa: Transcurrido el tiempo se saca de la incubadora y en ese momento se procede a realizar la detección cualitativa. Se consideran positivos aquellos que muestren una coloración café - rojiza en el papel indicador, aun consideran negativos aquellos que no muestren dicha coloración.

Determinación cuantitativa: Se recupera el papel indicador y se coloca en un tubo Pyrex # 9895, se adicionan 20 ml de agua destilada, se tapa y se agita vigorosamente, con el fin de extraer el pigmento de isopurpurina del papa indicador en el agua. Al extraer el pigmento (aproximadamente 2 -5 minutos) se recupera el solvente (agua) y se hace una filtración rápida para eliminar los residuos. El filtrado se coloca en una fotocelda para su

DESARROLLO EXPERIMENTAL

lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm, previamente ajustado a 100 % T con el blanco, el cual contiene todos los reactivos excepto la muestra.

Cálculos

Con los datos obtenidos de la curva estándar, en donde se encuentra relacionado el contenido de HCN y densidad óptica, se interpolaron los datos obtenidos para las muestras obteniendo el correspondiente contenido de HCN.

De la siguiente fórmula se obtienen los mg de HCN por cada 100 g de muestra.

$$\frac{X * 100}{m} = \text{mg HCN} / 100 \text{ g muestra}$$

Donde:

X= mg de HCN

m = mg de muestra

4.6 DOSIS LETAL MEDIA (DL₅₀) DE LA HARINA DESENGRASADA DE LA ALMENDRA DE CAPULÍN.

Los estudios de toxicidad aguda, implican una sola administración de la sustancia química por un período de 24 hrs.

Materiales y reactivos

- Ratones machos blancos cepa NI de 18 – 25 g de peso
- Jaulas de acrílico
- 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 pH 7

Procedimiento

Se realizó la prueba de toxicidad a corto plazo con el concentrado proteínico de la almendra de capulín.

Especie animal: Se utilizaron 25 ratones machos de la cepa NIH de 4-5 semanas de edad, con un peso 23±1 gramos. Los ratones pesados y marcados fueron distribuidos en 5 lotes de 5 ratones cada uno.

Preparación de la muestra: Se usó como vehículo para disolver el concentrado proteínico de la almendra de capulín buffer de fosfatos pH 7 ya que en esta se solubiliza totalmente la muestra. La solución se preparó al momento de la administración. La

DESARROLLO EXPERIMENTAL

concentración que se partió fue de 375 mg / ml de la harina desengrasada, de ahí se fueron realizando las diluciones correspondientes para obtener la DL₅₀.

Dosificación: Para la dosificación se debe de administrar un volumen, el cual sea lo suficientemente grande para medirlo con facilidad, pero a la vez debe de ser recomendable para no producir traumatismo en el animal. El máximo volumen permitido en ratones por vía oral es de 1.0 ml; por lo tanto se define como 1D la dosificación de 0.01 ml / g pc, podemos administrar hasta una dosificación de 5D (5 x 0.01 ml/g pc x 20g pc = 1 ml).

La dosificación seleccionada fue de 4D, para que el volumen mayor no fuera mayor de 1 ml,

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

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

Procedimiento: Los animales permanecieron en ayuno por 12 horas y solamente se les dejó agua. Los ratones fueron pesados y marcados con un orador especial, estos se repartieron en los diferentes lotes de acuerdo a la distribución de la "culebra japonesa" (**apéndice 2**). Se usaron 5 lotes colocando 5 ratones por cada uno de ellos en una misma jaula. Se utilizó un lote control al cual se le administró solo el vehículo (solución de buffer de fosfatos pH 7). Para la administración oral en el ratón, éste se sujetó con la mano izquierda de la nuca y el pescuezo; 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.

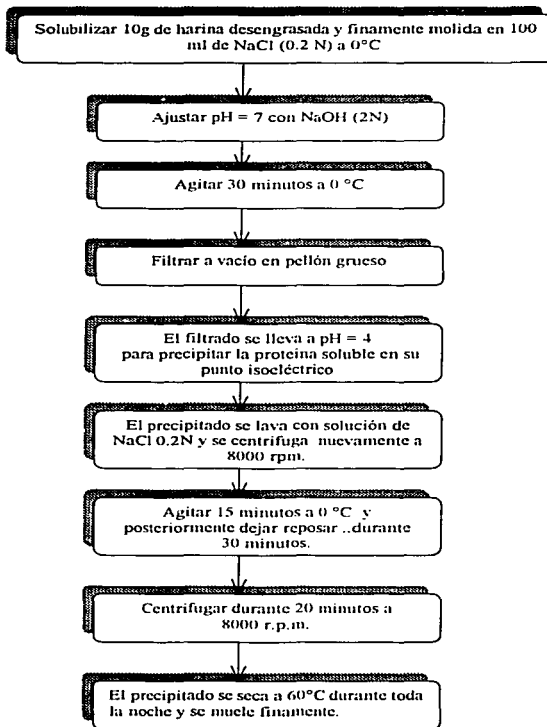
Las dosis a administrar se fueron formulando de acuerdo a los resultados observados en cada concentración administrada. Se fue disminuyendo la concentración del xenobiótico, observando las respuestas de los animales. Los animales recuperados o no afectados se mantuvieron en observación por 48 horas (máximo) con el fin de observar los efectos clínicos, llevando el control con la ayuda de una hoja de respuestas del comportamiento de los animales (**apéndice 3**).

Calculos: La determinación de la dosis letal media (DL₅₀) se determina de acuerdo al método gráfico de Litchfield y Wilcoxon, usando una hoja de papel logarítmico de probabilidad (**apéndice 4**). Como la recta tiene un adecuado ajuste se puede interpolar y obtener el valor de la dosis letal media (DL₅₀), además de los intervalos de confianza.

4.7 OBTENCIÓN DEL AISLADO PROTEÍNICO Y PURIFICACION DE LA ALMENDRA DE CAPULÍN.

Para la realización de la obtención del aislado proteínico, así como su purificación seguimos el procedimiento que se obtuvo en un estudio previo ⁽¹⁸⁾ por el método de precipitación en el punto isoelectrico aprovechando las propiedades de solubilidad de las fracciones proteínicas que la componen, realizando un ligero cambio en la velocidad de centrifugación, para mejorar el rendimiento del aislado proteínico (Figura 5).

Figura 5. Obtención del aislado protéinico de la almendra de capullín.



4.7.1 DIGESTIBILIDAD "in vitro"

Una primera evaluación predictiva de la calidad nutricia de una fuente proteínica, lo constituye la proporción de aminoácidos que son factibles de ser liberados, por acción del sistema enzimático "in vitro" que simule la acción de enzimas digestivas.

Durante la proteólisis son liberados protones del enlace peptídico; por lo tanto, el cambio en el pH estará directamente relacionado a la digestibilidad de la proteína. ⁽⁴⁸⁾ Se determinó la digestibilidad "in vitro" en la harina integral, desengrasada y aislado proteínico.

Material y reactivos

- Parrillas de agitación magnética
- Vaso de doble camisa
- Mangueras
- Baño de agua con agitación (LAB-LINE INSTRUMENTS)
- Potenciometro (CORNING mod. 10)
- Solución A
- Solución B

1. Solución A. Pesar exactamente 227,040 BAEE unidades de tripsina (tipo IX), 1860 BAEE unidades de α -quimiotripsina (tipo II) y 0.520 unidades de peptidasa L-leucina β -naftilamina y disolverlos en 10 ml de agua destilada.

2. Solución B. Pesar 65 unidades de caseína de proteasa bacteriana y disolver en 10 ml de agua destilada.

Procedimiento

Se partió de una cantidad de muestra que contenía 10 mg de N, se disolvió y aforo con 10 ml de agua destilada, durante 1 hora se agito manteniendo la temperatura a 37°C. Posteriormente se ajusto el pH a 8.0 ± 0.03 con HCl o NaOH 0.1N. Inmediatamente se adicionó 1 ml de la solución A; la cual debe encontrarse a 37°C, es agitada durante 10 minutos exactos a la misma temperatura, y transcurrido el tiempo agregó 1 ml de la solución B (debe estar a 37°C) y se agitó durante 9 minutos exactos a 55°C. Transcurrido el tiempo; se cambió la temperatura a 37°C durante 1 minuto. Una vez terminado el tiempo se mide el pH exactamente a los 20 minutos después de haber adicionado la solución A.

Con el fin de obtener resultados confiables se realiza una determinación previa, usando como proteína de referencia caseína; cuyo valor de pH, debe ser de 6.42 ± 0.05 , después de someterla a la acción del sistema multienzimático.

Cálculos

Calculando el porciento de digestibilidad con la siguiente formula utilizada por la AOAC (1990):

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

4.7.2 PERFIL DE AMINOÁCIDOS.

La cuantificación de aminoácidos la harina desengrasada y el aislado proteínico de la almendra de capulín se llevo a cabo previa hidrólisis ácida de la proteína a 145 \pm 1°C por 4 horas, y separación cromatográfica en un autoanalizador de aminoácidos TECHNICON mod. NC-2P⁽⁴⁴⁾. Para tener completo el perfil de aminoácidos indispensables, fue necesario cuantificar por separado el triptofano, lo cual se realizó mediante una hidrólisis básica y su posterior cuantificación espectrofotométrica.⁽⁵²⁾

Material y reactivos

- Autoanalizador de aminoácidos (TECHNICON mod. NC-2P)
- Digestor (TECATOR mod. ab 20/40)
- Tubos de hidrólisis ácida
- Potenciómetro (CORNING mod. 10)
- Rotavapor (BUCHI mod. R)
- Vortex (LAB-LINE mod. 1290)
- Membrana Millipore HATF-02500 (0.45 μ M)
- Microjeringa Hamilton (mod. 1001-LTN)
- HCl 6N
- Estándar de norleucina 5 mM
- Metil - Celosolve al 50%
- Amortiguador de acetato de sodio 4 N (a).
- Sulfato de hidracina (b).
- Ninhidrina (c).
- Solución lavadora (d)
- Amortiguador de dilución (e).
- Hidróxido de sodio 0.1 N
- Amortiguadores de acetatos para regeneración y elución (f).

(a) Amortiguador de acetato de sodio 4N: colocar 3 litros de agua destilada en agitación y adicionar lentamente 1312g de acetato de sodio anhidro para prevenir la cristalización, si se requiere se puede calentar para la completa solubilización de la sal. Añadir 400 ml de ácido acético glacial lentamente, se deja enfriar y aforar a 4 litros.

(b) Sulfato de hidracina: disolver 1.049g de sulfato de hidracina en agua destilada y desionizada, adicionar 0.4 ml de ácido sulfúrico concentrado (R.A.) y 30 ml de solución BRIJ-35 al 20%. Llevar esta solución a un volumen de 4 litros; para su conservación se requiere adicionar 0.8 ml de ácido caprílico.

(c) Ninhidrina: disolver 40 g de ninhidrina en 2 litros de Metil - Celosolve, adicionar lentamente 1 litro del amortiguador de acetato de sodio 4N, y llevar a un volumen de 4 litros.

(d) Solución lavadora: agua - etanol (3:1; v/v) con hidroquinona al 0.01%.

(e) Amortiguador de dilución: se prepara una solución de HCl 0.2N (A) y una solución de NaCl 0.2M (11.69 g/l) (B), se lleva a 200 ml con agua desionizada y se adiciona hidroquinona al 0.01%. El pH de este amortiguador debe ser de 1.5 \pm 0.05.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

(f) Amortiguadores de acetatos de regeneración y elución para la corrida del hidrolizado ácido de una proteína (Tabla 10).

Tabla 10
Composición de amortiguadores.

REACTIVO (GRADO ANALITICO)	BUFFER #1 Regeneración de la resina	BUFFER # 2 Elución de a.a. Ácidos y neutros	BUFFER # 3 Elución de a.a. Básicos	NaOH 0.2N Lavar la resina
Acetato de sodio anhidro CH_3COOH , PM = 82.03	4.1 g	5.0 g	87.0 g	-----
Acido acético glacial CH_3COOH , PM = 60.05	20 ml	15 ml	20 ml	-----
Solución de acetato de zinc (CH_3COO) ₂ Zn.2H ₂ O 0.05M	-----	1.2 ml	2.0 ml	-----
Alcohol etílico absoluto $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$, PM=46.02	78 ml	78 ml	-----	-----
Alcohol bencílico PM = 108.14	-----	-----	11 ml	-----
Hidroquinona PM = 110.1	0.11 g	0.11 g	-----	-----
Solución BRIJ-35AL 20% MERCK # 1962	8.0 ml	8.0 ml	8.0 ml	-----
EDTA (sal disódica) PM = 372.24	0.1 g	-----	-----	0.1 g
NaOH (lentejas) PM = 40	-----	-----	-----	8.0 g
Acido caprílico PM = 144.22	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	-----
Agua desionizada	1.00 L	1.00 LI	1.00 L	1.00 L
PH (ajuste en Potenciometro)	4.00±0.02	4.1±0.02	5.4±0.03	-----
Concentración de Na ⁺	0.05 M	0.06 M	1.06 M	0.20 M
Concentración de Zn ⁺	-----	3x10 ⁻⁴ M	1x10 ⁻³ M	-----

Procedimiento

- a) Preparación de la muestra: se pesó dentro del tubo de hidrólisis la cantidad de muestra necesaria finamente molida y desengrasada, se adicionó con mucho cuidado la cantidad de ácido requerida, humedeciendo totalmente la muestra. Se usaron las fórmulas siguientes para conocer la cantidad de muestra y los ml de HCl requeridos.

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

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

Donde :

A= cantidad de muestra en gramos

B= ml de HCl 6N

%P= porcentaje de la proteína en la muestra

- Se insufló nitrógeno y se cerró perfectamente.
- b) Hidrólisis de la muestra: se colocó el tubo con la muestra en el digestor TECATOR a $145^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 4 horas.
- c) Concentrado del hidrolizado: una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis se dejó enfriar y se transvasó cuantitativamente a un matraz bola de 100 ml, lavando el tubo con agua caliente y solución lavadora. Se agregaron 5 ml de norleucina (estándar). El hidrolizando se concentra en el rotavapor a una temperatura de $75 - 80^{\circ}\text{C}$, llevándolo dos veces a sequedad; con el fin de eliminar el exceso de ácido clorhídrico; a continuación se concentra el hidrolizado en un tercer lavado a un volumen menor de 25 ml.
- c) Filtrado del precipitado: el hidrolizado se filtra a través del papel filtro Whatman de poro cerrado sobre buchner y kitasato al vacío; se aconseja dar un lavado con solución lavadora, para poder enjuagar el matraz bola procurando que el volumen fuerza menor a 25 ml y posteriormente sé aforo a 25 ml; ajustando a un pH de 6.8 ± 0.2 con NaOH 5N e insuflando posteriormente nitrógeno.
- d) Inyección de la muestra: se diluye el hidrolizado en una proporción de 1:1, se filtra a través de un Milipore, descartando las primeras gotas del filtrado y el restante se utiliza para inyectar en el autoanalizador de 100 a 200µl. Previamente hay que correr una solución estándar de aminoácidos que contenga $0.025 \mu\text{M}$ de cada uno, para que de este aminograma se pueda obtener el área de cada uno de los aminoácidos, además, tanto el estándar como en la muestra se debe adicionar una cantidad constante y conocida de aminoácido sintético norleucina, para poder hacer los cálculos basándose en los llamados equivalentes de norleucina de cada uno de los aminoácidos.

Cálculos

Previamente se corre un estándar de aminoácidos con una concentración de $0.025\mu\text{M}$ de cada uno; para que de este aminograma se pueda obtener el área de cada uno de los aminoácidos.

$$EN_{aa} = AN_{STD} / AA_{STD}$$

Donde:

EN_{aa} = Equivalente de norleucina del aminoácido correspondiente.

AN_{STD} = Área de la Norleucina estándar.

AA_{STD} = Área del aminoácido correspondiente en el estándar.

De los aminogramas del estándar y de las muestras 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; así como el área del la norleucina en el correspondiente aminograma, para lo anterior es mejor trabajar con la mitad superior de cada uno de los picos con el fin de evitar trabajar con la línea base que en ocasiones es demasiado irregular.

A continuación se tienen los cálculos a desarrollar para cada uno de los aminoácidos, en donde se expresa su contenido en mg del aminoácido /g de nitrógeno de la muestra (mg_{aa}/gN):

$$A_{aa} = B_{aa} \times h_{aa}$$

$$mg_{aa} / gN = \frac{(A_{aa} \times EN_{aa} \times \mu M \times PM_{aa} \times A)}{(AN_m \times a \times mgN_m)}$$

Donde:

A_{aa} = Área del aminoácido en el aminograma de la muestra.

B_{aa} = Base de la mitad del pico.

h_{aa} = Altura de pico desde la línea base.

EN_{aa} = Equivalentes de norleucina del aminoácido correspondiente.

μM_{aa} = Micromoles del aminoácido en el estándar.

PM_{aa} = Peso molecular del aminoácido.

A = Aforo al que se llevo el hidrolizado en ml.

AN_m = Área de la norleucina en el aminograma de la muestra.

a = Alicuota inyectada en ml.

mgN = Miligramos de nitrógeno de la muestra hidrolizada.

4.7.3 DETERMINACION DE TRIPTOFANO

Debido a que la hidrólisis ácida destruye el triptofano y es el único aminoácido que no se puede leer juntamente con equipos como el autoanalizador o el HPLC en hidrólisis ácida; su determinación se realiza por medio de hidrólisis alcalina o enzimáticas y se cuantifica por técnicas colorimétricas. ⁽⁵²⁾

Material y reactivos

- Digestor (TECATOR mod. ab 20/40)
- Tubo de hidrólisis con rosca.
- Tubos de ensaye.
- Espectrofotómetro (SEQUOIA-TURNER mod 340).
- Potenciómetro (CORNING mod. 10).
- Hidróxido de litio 4N.
- Acido fosfórico concentrado.
- Acido clorhídrico concentrado.
- Solución lavadora (3:1 agua - etanol v/v).
- Solución estándar de triptofano (0.05 mg / ml).
- Solución de p-dimetilamino benzaldehído (DMAB) al 0.5% en HCl concentrado.
- Solución de nitrito de sodio al 0.2%.

Procedimiento:

De acuerdo a las siguientes formulas se adiciona la cantidad de muestra y de LiOH 4N en un tubo de hidrólisis.

$$A = \frac{0.1 \times 100}{\%P}$$

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

Donde:

A= Cantidad de muestra (g)

B= ml de LiOH 4N

%P= porcentaje de proteína en la muestra.

Se insufla nitrógeno y se coloca en el digestor a una temperatura de 145°C durante 8 horas. Transcurriendo el tiempo de hidrólisis se deja enfriar y el contenido se transfiere a un vaso de precipitado, lavando con solución lavadora para tener un volumen a 25 ml. Se ajusta el pH de 6.8± 2 con ácido fosfórico concentrado, y se filtra a vacío con papel Wathman No. 542. Se afora a 25 ml.

La curva estándar se elabora tomando 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 2.0 ml de solución estándar llevando los tubos a 2 ml y adicionando 7.5 ml de DMAB en HCl. Para el blanco se toman 2 ml de muestra y 7.5 ml HCl concentrado. Para los tubos de muestra se toman 2 ml del hidrolizado y se agregan 7.5 ml de DMAB, por duplicado. Tanto los tubos de la curva patrón, como el de la muestra se agitan y se

DESARROLLO EXPERIMENTAL

dejan en la obscuridad durante 15 min. Después se agregan 0.5 ml de nitrito de sodio al 0.2%, se agitan y se dejan otros 15 min. en la obscuridad. Se lee a 590 nm contra el blanco.

Cálculos:

Con los datos obtenidos de la curva estándar, en donde se encuentra relacionado el contenido de μg de triptofano y densidad óptica, se interpolan los datos para las muestras obteniendo el correspondiente contenido de triptofano.

De aquí que los cálculos a realizar se da de acuerdo a las siguientes formulas

1. $\frac{\mu\text{g de triptofano}}{\text{alícuota (ml)}} \times \text{aforo (ml)} = \mu\text{g de triptofano}$
(para desarrollar color)
2. $\frac{\mu\text{g de triptofano}}{B} \times 100 \text{ g de muestra} = \mu\text{g de triptofano}$

Dónde :

B= gramos de muestra

3. $\frac{\mu\text{g de triptofano}}{C} \times 100 \text{ g de proteína} = \mu\text{g de triptofano} / 100 \text{ g de proteína}$

Dónde.

C = gramos de proteína en la muestra

4.8 BIOENSAYO NUTRICIONAL

La calidad nutritiva de la proteína de los diferentes preparados de la almendra de capulín, se evalúa mediante la relación de eficiencia proteínica (REP); definida como la ganancia en peso debido a la ingesta de proteína por un animal en crecimiento. Se emplea una dieta con un contenido de 10% de proteína que se administro a ratas machos Wistar recién destetados durante un periodo de 28 días. ⁽⁴¹⁾⁽³⁹⁾

Materiales y equipo

- Ratas machos Wistar recién destetadas
- Estante de jaulas individuales.
- Balanza granataria para animales de laboratorio.
- Balanza granataria de un platillo.
- Comedores y bebederos para ratas.
- Tubos capilares heparinizados

- Eter etílico para anestesiar
- Equipo automatizado (Sysmex NE – 1500) para citometría hemática

Procedimiento

FORMULACIÓN DE DIETAS.

De acuerdo a la calificación química del aislado de proteína del aislado proteínico que resulto ser deficiente en aminoácidos como la metionina, lisina y triptofano, se realizaron las suplementaciones necesarias para compensar la deficiencia de dichos aminoácidos. Las dietas elaboradas para llevar a cabo el ensayo biológico fueron:

1. Dieta control, empleando como fuente de proteína caseína (CRL).
2. Dieta del Aislado Proteínico (AP).
3. Dieta de Aislado Proteínico, suplementada con triptofano, metionina y lisina (APTML).
4. Dieta de aislado proteínico, suplementado con metionina y lisina (APML).
5. Dieta de aislado proteínico, suplementada con harina de maíz y harina de garbanzo (APMZG).
6. Dieta de aislado proteínico, suplementado con harina de arroz harina de garbanzo (APAG).

Todas las dietas se prepararon al 10% de proteína y fueron isoproteínicas e isocalóricas con respecto a la dieta control. En la Tabla 11 se observa la formulación de cada una de las dietas utilizadas para el bioensayo.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Tabla 11
Formulación de Dietas empleadas en el ensayo Biológico
(g /100 de dieta).

Ingrediente	Control*	AP*	APTML*	APML*	APMZG*	APAG*
Caseína (87.41%P)**	11.44	—	—	—	—	—
Aislado Proteínico (85.81%P)**	—	11.65	11.65	11.65	3.89	3.89
Metionina	—	—	0.20	0.20	—	—
Lisina	—	—	0.30	0.30	—	—
Triptofano	—	—	0.03	—	—	—
Harina de Arroz	—	—	—	—	—	39.18
Harina de Garbanzo	—	—	—	—	16.65	16.65
Harina de Maíz	—	—	—	—	40.66	—
Aceite de Maíz	7.97	7.68	7.68	7.68	5.48	6.61
Mezcla de minerales	4.93	4.70	4.70	4.70	3.91	4.40
Mezcla de vitaminas	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Dextrinas	67.2	67.34	66.84	66.81	28.41	22.63
Agua	3.86	4.41	4.41	4.41	—	2.74
Celulosa	3.60	3.22	3.22	3.22	—	2.90

** Porcentaje de proteína.

* Descripción de Siglas usadas

AP: aislado proteínico

APTML: aislado proteínico +Triptofano(0.03%)+DL Metionina(0.2%)+ Lisina(0.3%)

APML: aislado proteínico +DL Metionina(0.2%)+Lisina (0.3%)

APMZG: Aislado proteínico +Cereal (Harina de maíz)+leguminosa (garbanzo) relación (1:1:1)

APAG: Aislado proteínico + Cereal (harina de arroz)+ leguminosa (garbanzo)relación (1:1:1)

BIOENSAYO

Se utilizaron ratas recién destetadas raza Wistar (21-23 días de nacidas), los animales se distribuyeron en lotes de 6 ratas por cada uno en jaulas individuales de acero de acuerdo a la distribución de "Culebra japonesa" la cual consiste en pesar individualmente los animales al inicio del ensayo y con los pesos ordenados de manera descendente o ascendente se asignan en los diferentes lotes de manera zigzagueante, con el fin de tener una diferencia de peso promedio entre los lotes de menos de un gramo.

DESARROLLO DE LA PRUEBA

El ensayo se realizó durante un período de 28 días colocando las dietas de experimentación correspondiente y agua "*ad libitum*", durante el ensayo se llevo un control del crecimiento en peso y del alimento ingerido de cada uno de los animales (**apéndice 4**).

Cálculos

Con los datos obtenidos se calculo la relación de eficiencia proteínica (REP).

$$REP = \frac{\Delta P}{\Sigma AI \cdot F}$$

Donde:

ΔP = incremento de peso (g).

ΣAI = alimento ingerido total (g).

F = % de proteína en la dieta / 100.

Con los valores del REP obtenido se calculo el REP ajustado según la siguiente formula:

$$REP_{ajustado} = REP_{exp} \times \frac{REP_{caseína (ref.)}}{REP_{caseína (exp)}}$$

Donde.

REP caseína (ref.) = 2.5

ref. = referencia

exp = experimental

4.8.1 DIGESTIBILIDAD "in vivo".

Otro parámetro que se obtuvo del ensayo biológico es el de la digestibilidad "*in vivo*"; la cual se define como la proporción de una proteína que es absorbida por el tracto gastrointestinal, mediante la relación de nitrógeno retenido en la dieta. ⁽⁴²⁾ Está determinación es de mayor valor que la que proporciona la digestibilidad "*in vitro*"; sin embargo, ambas permiten tener un indicador de la calidad de las proteínas.

Material y reactivos.

- o Digestor (TECATOR mod. ab 20/40)
- o Microdestilador (TECATOR auto KJELTEC no. 1030)
- o Tubo de digestión de 75 ml
- o Mortero con pistilo.
- o Tamiz para separar heces
- o Balanza analítica Sartorius
- o Mezcla Digestiva (a)
- o Peróxido de hidrógeno al 30%.
- o Sulfato de Potasio R.A.
- o Solución de NaOH al 40%
- o Solución de ácido bórico con indicadores (b)
- o Solución de HCl 0.01N valorada.

- (a) Mezcla digestiva. Disolver 3 g de sulfato de cobre($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 20 ml de agua destilada, agregar 50 ml de ácido orto fosfórico (H_3PO_4), y adicionar con cuidado resbalando por las paredes 430 ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Se deja agitando la muestra durante 30 min.
- (b) Solución de ácido bórico con indicadores: pesar 20 g de ácido bórico y colocarlo en un matraz aforado de 2L, se adiciona agua destilada hasta disolver y se agregan 20 ml de verde bromocresol(100 mg/ 100 ml CH_3OH) y 14 ml de rojo de metilo (10 mg / 100 ml de CH_3OH), se mezcla vigorosamente.

Procedimiento

Se recolectaron las heces de las ratas empleadas en la determinación del REP durante la última semana y se registro el peso de éstas, así como del alimento consumido durante la recolección de las heces.

Una vez recolectadas las heces se secan a una temperatura de $50 \pm 5^\circ\text{C}$, se pesan y se muelen en el mortero y se homogeneizan para tomar una muestra de aproximadamente 100 mg de esas molidas, se determina el porcentaje de nitrógeno en las heces y el porcentaje de nitrógeno ingerido de acuerdo al contenido de proteína de la dieta evaluada siguiendo el procedimiento para determinar proteína cruda.

Cálculos.

El cálculo de digestibilidad se obtiene mediante la siguiente formula

$$D = \frac{N \text{ absorbido}}{N \text{ ingerido}} = \frac{N_i - N_h}{N_i} \times 100$$

Donde:

- D = digestibilidad
- Ni = Nitrógeno ingerido
- Nh = Nitrógeno en heces

EVALUACION HEMATOLOGICA

Al final del ensayo se realizo nuevamente la biometría hemática La sangre se obtuvo mediante un sangrado ocular; para lo cual primeramente se anestesió al animal, introduciéndolo en un frasco, en cuyo interior se colocó algodón impregnado de éter etílico. Una vez anestesiado, se sujeto con una mano y con la otra se le introduce un tubo capilar heparinizado en la parte posterior del ojo, se comienza a ejercer una ligera presión y se rota suavemente el capilar, la sangre se colecta en un tubo Microtiner[®], se requieren entre 250 y 500 µl. Es importante que al momento de recolectar la sangre se rote suavemente el tubo para evitar la formación de coágulos. Las muestras colectadas fueron analizadas por la Dra. Adriana Ruiz (Jefa de Sección del área de Hematología del Hospital Gabriel Mancera IMSS). Esto para tener la certeza de que los animales utilizados presentaban alguna anomalía hematológica al final del estudio.

EVALUACION DE ORGANOS

Como se había mencionado anteriormente los factores antinutricionales y tóxicos pueden influir en el decremento en peso del hígado, músculo intestinal y otros órganos. Por lo cual al finalizar el bioensayo se extrajeron diferentes órganos como el hígado, el pulmón, el riñón y el intestino, que son los principalmente dañados por sustancias tóxicas, se registro su peso y se observaron la existencia de anomalías, como coloración, tamaño, forma.

Con el peso de los órganos se cálculo la relación porcentual de peso del órgano con respecto al peso corporal de la rata, con la siguiente expresión:

$$\text{Relación Porcentual} = (\text{peso órgano (g)} / \text{Peso corporal del animal (g)}) \times 100$$

Realizando una comparación del peso de los órganos extraídos de los animales respecto a los reportados en la bibliografía.

Tabla 12
Peso de diferentes órganos en rata.

Órgano	Peso del órgano Húmedo (g/100 g peso corporal)
Corazón	0.4
Pulmones	0.6
Hígado	3.0
Un riñón	0.4
Estomago e intestino	2.3

Wayforth, H.B. (1988). "Experimental and surgical technique in the rat"(53).
Harcourt Brace Fonovich, Publishers, London.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 CARACTERIZACIÓN BROMATOLÓGICA

Una vez obtenidos la harina desengrasada y el aislado proteínico, se realizó el análisis proximal, al igual que a la harina integral. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13
Análisis Proximal de la Harina Integral, Desengrasada y Aislado Proteínico de la Almendra de capulín (*Prunus serotina*). (g/100g muestra)*.

Muestra	Humedad	Proteína ^a	Grasa	Cenizas	Fibra	Carbohidratos ^b
Harina Integral	3.03	27.96	44.99	2.52	6.59	14.91
Harina Desengrasada	4.03	48.81	6.32	3.95	7.05	29.84
Aislado Proteínico	5.04	85.81	2.74	2.60	3.28	0.53

* Las determinaciones se hicieron por duplicado

^a Factor de conversión (N x 6.25)

^b Calculado por diferencia

Con los resultados del análisis proximal se corroboró que la almendra de capulín (*Prunus serotina*) es buena fuente de proteína y grasa (44.99% y 27.96% respectivamente):

En la Figura 6 se observan el incremento de la concentración de la proteína conforme se va realizando la obtención del aislado proteínico. Al eliminar el extracto etéreo, la concentración de la proteína se incrementa hasta un 48.81 % de proteína, lo cual en este caso no podemos considerar a la harina desengrasada como un auténtico concentrado proteínico debido a que la concentración de proteína no es mayor al 50%⁽³⁹⁾

Respecto al aislado proteínico el contenido de proteína se incremento hasta un 85.8%, lo cual nos permitió continuar con el estudio y realizar la evaluación proteínica del mismo.

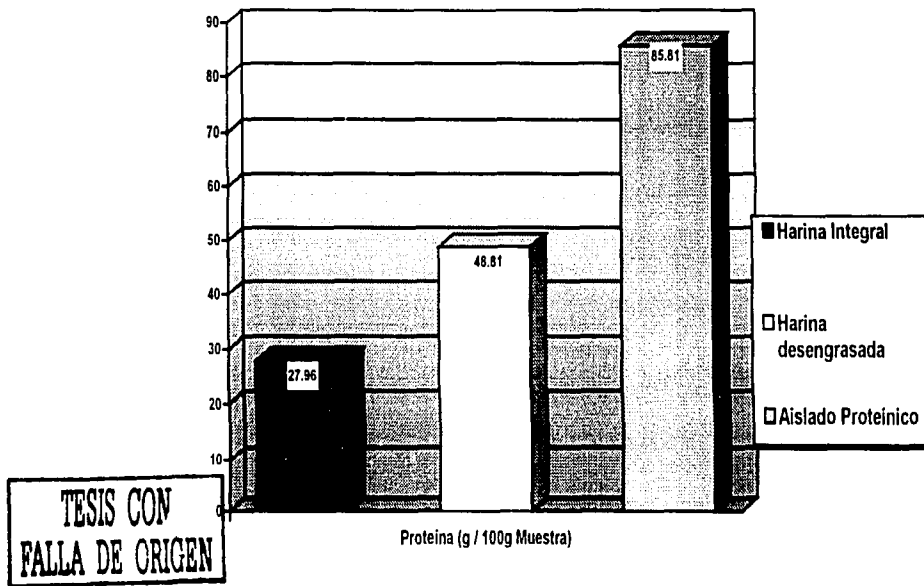


Figura 6. Contenido de proteína en la harina integral, desengrasada y aislado proteínico de la almendra de capulín (*Prunus serotina*)

5.2 FACTORES TOXICOS

Las determinaciones de los factores tóxicos se realizaron por duplicado en las tres muestras (harina integral, desengrasada y aislado proteínico).

Tabla 14
Factores tóxicos en la Harina Integral, desengrasada y aislado proteínico de la almendra de capulín (*Prunus serotina*).

Muestra	Glucósidos cianogénicos mg HCN/ 100 g muestra	Inhibidores de Tripsina UTI/ mg muestra ^a	Fitatos % ácido fítico ^b
Harina Integral	162.71	3.46	0.75
Harina Desengrasada	308.72	5.97	1.31
Aislado Proteínico	7.27	4.20	0.63

a = Expresado en Unidades de Tripsina inhibida por mg de muestra

b = expresado en mg de ácido fítico/ 100g de muestra

En la Tabla 14 y en la Figura 7, se observa que partimos de un material con alto contenido de glucósidos cianogénicos y al realizar la eliminación del extracto etéreo se incrementa considerablemente la concentración de glucósidos cianogénicos, lo cual es lógico ya que se considera que estos tóxicos no son solubles en disolventes orgánicos.

Por lo cual la harina integral y la harina desengrasada de la almendra de capulín se consideran tóxicos, ya que el límite permisible máximo es de 10 a 20 mg de HCN / 100 g de muestra seca. ⁽⁵⁴⁾

En lo que respecta a aislado proteínico se observa que hubo una gran disminución de los glucósidos cianogénicos (7.27 mg HCN/ 100g de muestra), la destoxificación se logra debido a los procesos por medio del cual se obtuvo el aislado proteínico (molienda, solubilización, centrifugación, secado).

Se corrobora de igual manera la presencia de Inhibidores de Tripsina y Fitatos en la almendra de capulín, aunque no se encuentran en mayor proporción es importante considerar la concentración a la cual están presentes ya que para el caso de los inhibidores de tripsina el límite permisible máximo es de 10 UTI/ mg de muestra, mientras que para el caso de los fitatos el límite tolerado es menor a 400 mg/100 g de muestra. En la harina integral, desengrasada y aislado proteínico de la almendra de capulín no exceden de los valores permisibles máximos pero están presentes.

La revisión de estos resultados es muy importante ya que podrían ser uno de los factores que estén afectando la evaluación nutrimental de la proteína en el bioensayo, formando factores acomplejantes e impidiendo la absorción de la proteína.

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

78

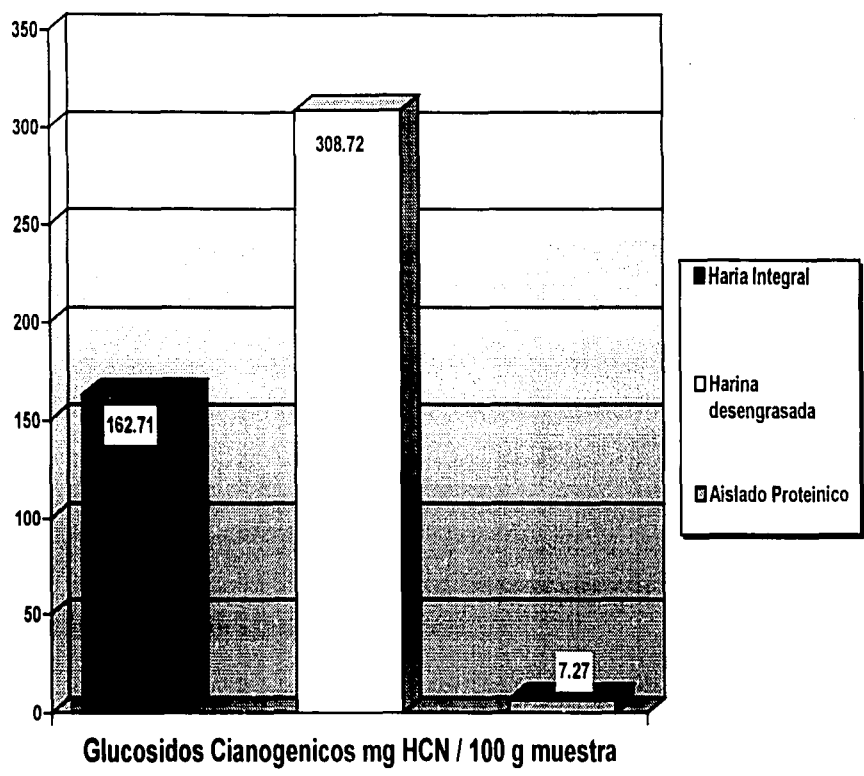


Figura 7. Determinación de Glucósidos Cianogénicos en la harina integral, desengrasada y aislado proteínico de la almendra de capulín (*Prunus serotina*).

5.3 DOSIS LETAL MEDIA (DL₅₀).

Tabla 15
Resultados de la prueba de Toxicidad aguda para la harina desengrasada de la almendra de capulín (*Prunus serotina*)

Dosis mg/Kg	Animales de ensayo	Animales muertos	%Mortalidad
600.0	5	0	0
973.2	5	1	20
1500	5	2	40
3750	5	5	100

Durante la prueba de toxicidad aguda se realizaron varias concentraciones de la harina desengrasada de la almendra de capulín y se observó el comportamiento de los animales, evaluándose los síntomas clínicos.

Los principales síntomas que se observaron durante el bioensayo fueron Ataxia, Aletargamiento, Excitación y Disnea. En la dosis máxima administrada (3750 mg/Kg) los ratones morían en los primeros minutos post-administración de la harina desengrasada, posteriormente conforme la dosis disminuía los síntomas seguían siendo los mismos, pero se recuperaban poco a poco con un intervalo de 10 min. – 20 min. Otra característica importante es que se quedaban tranquilos. Por lo cual, después de su recuperación se mantuvieron en observación por 48 hrs, teniendo una recuperación total sin efecto alguno secundario.

Con los datos obtenidos tenemos que el DL₅₀ para la harina desengrasada con su intervalo de confianza es de:

$$DL_{50} = 1600 \text{ mg/kg (976.80-2620.8 mg/kg)}$$

Límite inferior: 976.80

Límite superior: 2620.8

La dosis letal media obtenida indica que la harina desengrasada tiene un alto grado de toxicidad, por lo que es nula su factibilidad para usarlo como complemento en la alimentación.

5.4 DIGESTIBILIDAD "in vitro".

Se realizó la digestibilidad "in vitro" de la harina integral, desengrasada y del aislado proteínico de la almendra de capulín, para determinar la biodisponibilidad de los aminoácidos. Los resultados se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16
 Digestibilidad "in vitro" de la Harina Integral, Desengrasada y Aislado proteínico de la almendra de capulín (*Prunus serotina*)*.

Muestra	PH	%Digestibilidad
Harina Integral	6.88	79.62
Harina Desengrasada	6.84	80.53
Aislado proteínico	6.59	86.17

* Las determinaciones se hicieron por duplicado.

De lo anterior se deduce, que se puede aprovechar más del 80% de la proteína aislada de la almendra de capulín, lo cual también indica que no existen factores tóxicos o acomediantes que pudieran impedir la absorción de la proteína y como se observa realmente existe un mejoramiento en la absorción de la proteína del aislado proteínico al compararlo con los resultados de la harina integral y la harina desengrasada.

Considerando que los valores reportados para digestibilidad en la harina de soya son de un 86%⁽³⁹⁾, se puede decir que el aislado proteínico de la almendra de capulín presenta una buena biodisponibilidad.

5.5 PERFIL DE AMINOÁCIDOS

Como se observa en la Tabla 17 el contenido de aminoácidos en el aislado proteínico con respecto a la harina desengrasada se observa en el caso de la metionina y la glicina/ alanina hay una disminución, esto debido al proceso de purificación para la obtención del aislado proteínico de la almendra de capulín. Con lo que respecta a los demás aminoácidos se incrementa de cierta manera el contenido de ellos a comparación del concentrado proteínico.

RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla 16

Digestibilidad "in vitro" de la Harina Integral, Desengrasada y Aislado proteínico de la almendra de capulín (Prunus serotina).*

Muestra	PH	%Digestibilidad
Harina Integral	6.88	79.62
Harina Desengrasada	6.84	80.53
Aislado proteínico	6.59	86.17

* Las determinaciones se hicieron por duplicado.

De lo anterior se deduce, que se puede aprovechar más del 80% de la proteína aislada de la almendra de capulín, lo cual también indica que no existen factores tóxicos o acomplejantes que pudieran impedir la absorción de la proteína y como se observa realmente existe un mejoramiento en la absorción de la proteína del aislado proteínico al compararlo con los resultados de la harina integral y la harina desengrasada.

Considerando que los valores reportados para digestibilidad en la harina de soya son de un 86%⁽³⁹⁾, se puede decir que el aislado proteínico de la almendra de capulín presenta una buena biodisponibilidad.

5.5 PERFIL DE AMINOÁCIDOS

Como se observa en la Tabla 17 el contenido de aminoácidos en el aislado proteínico con respecto a la harina desengrasada se observa en el caso de la metionina y la glicina/ alanina hay una disminución, esto debido al proceso de purificación para la obtención del aislado proteínico de la almendra de capulín. Con lo que respecta a los demás aminoácidos se incrementa de cierta manera el contenido de ellos a comparación del concentrado proteínico.

Tabla 17
 Contenido de aminoácidos en la Harina desengrasada y el aislado proteínico de la almendra de capulín (*Prunus serotina*).

Aminoácido	Harina desengrasada (mg de a.a./ g de N)	Aislado proteínico (mg de a.a./g de N)
Metionina	49.81	33.62
Triptofano	35.62	46.25
Lisina	82.78	156.11
Isoleucina	82.91	216.23
Leucina	373.41	416.83
Histidina	127.53	146.11
Fenilalanina	127.53	286.78
Valina	96.83	257.25
Treonina	138.67	168.76
Cistina	45.31	65.55
Tirosina	50.45	148.92
Ac. Aspartico	403.79	643.90
Ac. Glutámico	186.07	1727.8
Glicina/Alanina	854.4	625.010
Prolina	131.01	366.58
Serina	212.65	232.07
Arginina	297.46	646.74

5.6 CALIFICACIÓN QUÍMICA DE LA PROTEÍNA.

El perfil de aminoácidos dio los valores que permitieron realizar una comparación entre el patrón establecido de una proteína de referencia (FAO/OMS/ONU, 1973) y la proteína evaluada, a fin de predecir su calidad biológica. Con este fin se determino la calificación química (CQ) del aislado proteínico de la almendra de capulín proporcionando información sobre los aminoácidos que se encuentran en menor proporción con relación al patrón que se denomina limitante.

Tabla 18
*Calificación química del aislado proteínico de la almendra de capulín
 (Prunus serotina).*

Aminoácido esencial	Requerimientos FAO/OMS/ONU (1973)*	Aislado Proteínico*	Calificación Química del aislado proteínico
Isoleucina	4.0	3.45	86.25
Leucina	7.04	6.66	94.60
Lisina	5.44	2.49	45.77
Metionina/Cistina	3.52	1.57	44.60
Fenilalanina/ tirosina	6.08	6.96	114.47
Treonina	4.00	2.70	67.50
Triptofano	0.96	0.74	77.08
Valina	4.96	4.11	82.86

* (g de aminoácidos/100g de proteína)

En la Tabla 18 se observa la calificación química del aislado proteínico y los aminoácidos limitantes son en primer lugar los azufrados (metionina/cistina) y en segundo lugar tenemos a la lisina. Cabe resaltar que estos resultados concuerdan por los determinados por Alvarado (1999). Al obtener la calificación química con el patrón de la FAO/OMS/ONU de 1985 nos indica que el triptofano también podría considerarse de cierta forma en otro de los aminoácidos limitante, en la almendra de capulín por tal motivo lo tomamos en cuenta en nuestro bioensayo biológico.

5.7 BIOENSAYO NUTRICIONAL.

5.7.1 RELACIÓN DE EFICIENCIA PROTEÍNICA (REP)

Los resultados que se muestran en la en la Tabla 18 son los parámetros obtenidos en el ensayo biológico así como los valores de la REP experimental y la REP ajustado para cada una de las dietas evaluadas.

Tabla 19
Resultados del Bioensayo Biológico*

Dieta	Ganancia en peso (g)**	Alimento ingerido (g)	REP experimental***	REP ajustado
Control	99.06±19.06	333.8 ± 58.3	2.74± 0.19 ^a	2.50
AP	7.31±4.13	145.4 ± 30.8	0.46± 0.15 ^b	0.41
APTML	39.3±8.5	234.2 ± 29.6	1.56± 0.16 ^c	1.42
APML	43.83±9.4	288.9 ± 148.2	1.73 ± 0.18 ^{cd}	1.58
APMZG	58.35±10.25	283.56 ± 36.2	1.93± 0.15 ^{cd}	1.76
APAG	61.27±17.7	292.85 ± 63.4	2.02 ± 0.20 ^d	1.84

* valor promedio ± desviación estándar

** Se expresa como el promedio de la ganancia en peso individual de las ratas utilizadas en cada lote.

AP: aislado proteínico

APTML: aislado proteínico + Triptofano(0.03%)+DL Metionina(0.2%)+ Lisina(0.3%)

APML: aislado proteínico +DL Metionina(0.2%)+Lisina (0.3%)

APMZG: Aislado proteínico + Cereal (Harina de maíz)+leguminosa (garbanzo) relación (1:1:1)

APAG: Aislado proteínico + Cereal (harina de arroz)+ leguminosa (garbanzo)relación (1:1:1)

*** = letra diferente indica diferencia significativa estadística ($\alpha=0.05$).

Según los resultados obtenidos se observa que la mayor ganancia en peso después de la dieta control se obtiene de la dieta APAG siguiendo la dieta APMZG, posteriormente las suplementadas con los aminoácidos limitantes y finalmente la dieta AP, en esta última se observa que la ganancia en peso fue definitivamente deficiente en comparación con las demás dietas. Así mismo los valores se ven reflejados en la REP obtenida, ya que el mayor valor experimental lo presentan tanto las dietas de APAG (2.02) seguida por la dieta APMZG (1.93).

Al realizar el análisis estadístico que consistió en el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de rango múltiple (Prueba de Duncan); se observa que hay diferencia significativa entre las dietas evaluadas y el control, sin embargo, las dietas suplementadas con cereales, leguminosas así como las suplementadas con aminoácidos no existe diferencia significativa entre ellas, excepto el caso de la dieta APTML. En lo que respecta a la dieta del aislado proteínico (AP) se ve que existe diferencia significativa entre el control y las demás dietas. Es decir, la dieta con la que se obtiene menor ganancia en peso y por lo tanto menor relación de eficiencia proteínica es la dieta del aislado proteínico. Esto se puede deber a la presencia de algún factor tóxico o antinutricional presente en el aislado proteínico de la almendra de capulín, ya que al realizar las suplementación con cereales y leguminosas estamos disminuyendo la concentración del aislado proteínico y por tal motivo se observa una mejor respuesta en la relación de eficiencia proteínica en las dietas suplementadas.

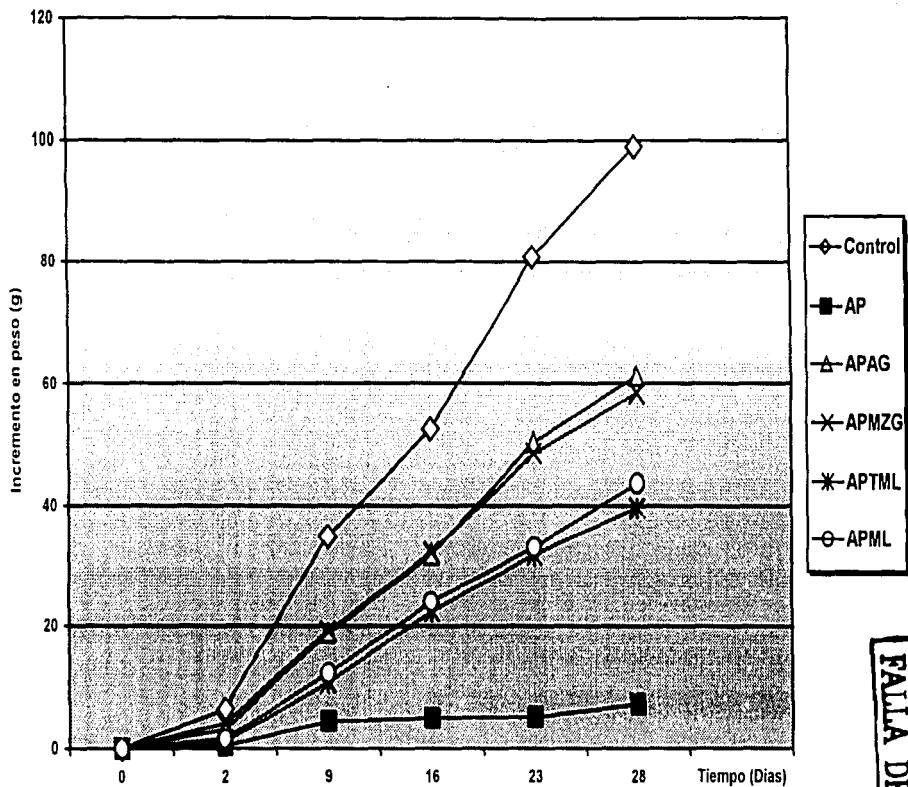


Figura 8. Curvas de crecimiento de ratas Wistar durante el ensayo biológico

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Figura 8 se observa las curvas de crecimiento durante el ensayo biológico donde se demuestra la misma tendencia de los parámetros descritos. La deficiencia de los aminoácidos indispensables como lo son la lisina y metionina, así como la presencia de algún factor antinutricional en el aislado proteínico de la almendra de capulín muestra que el desarrollo del crecimiento de los animales es lento y no el adecuado a comparación de los resultados observados respecto al control y las dietas suplementadas.

5.7.2 DIGESTIBILIDAD "in vivo".

Los resultados se muestran en la Tabla 20, a estos resultados se les realizó un análisis estadístico que consistió en el análisis de varianza de una vía (ANOVA) junto con la prueba de rango múltiple (Prueba de Duncan), determinándose que existe diferencia significativa entre las dietas AP, APMZG, APAG con respecto al control, asimismo se determino que la de mayor digestibilidad se obtiene con la dieta APTML, seguida de APML por lo cual no existe diferencia significativa de estas ultimas con respecto al control. Por lo que se puede concluir que la calidad de la proteína no depende de la digestibilidad de la proteína, ya que como se observa en los resultados la digestibilidad de las dietas utilizadas era buena: Para el caso de las dietas suplementadas con arroz, garbanzo y maíz se observa una menor digestibilidad y esto puede deberse una mayor presencia de fibra o algún factor antinutricional presente en las mismas.

Tabla 20
Digestibilidad "in vivo" de las dietas utilizadas.*

Dieta	%N en dieta	%N ingerido	%N heces	% Digestibilidad**
Control	1.73	1.99 ± 0.36	0.13 ± 0.03	93.55 ± 2.0 ^a
AP ^a	1.72	0.41 ± 0.28	0.10 ± 0.01	81.89 ± 5.0 ^b
APTML ^a	1.72	1.21 ± 0.25	0.08 ± 0.04	93.12 ± 6.1 ^{bc}
APML ^a	1.64	1.13 ± 0.20	0.12 ± 0.02	89.10 ± 4.8 ^{bc}
APMZG ^a	1.69	1.45 ± 0.10	0.33 ± 0.04	77.47 ± 3.2 ^{bd}
APAG ^a	1.64	1.51 ± 0.39	0.31 ± 0.05	77.71 ± 9.2 ^{bd}

a= descripción de las siglas usadas

AP: aislado proteínico

APTML: aislado proteínico + Triptofano(0.03%)+DL Metionina(0.2%)+ Lisina(0.3%)

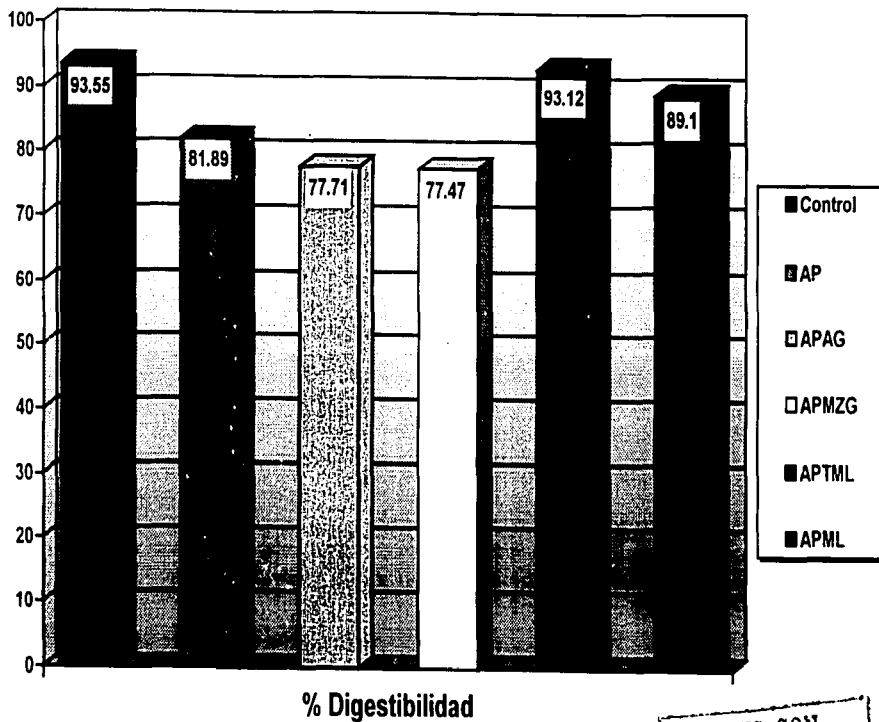
APML: aislado proteínico +DL Metionina(0.2%)+Lisina (0.3%)

APMZG: Aislado proteínico + Cereal (Harina de maíz)+leguminosa (garbanzo) relación (1:1:1)

APAG: Aislado proteínico + Cereal (harina de arroz)+ leguminosa (garbanzo)relación (1:1:1)

** = valor promedio ± desviación estándar.

* = letra diferente indica diferencia significativa estadística (α= 0.05)



% Digestibilidad

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 9. Digestibilidad "in vivo" de las dietas utilizadas de la almendra d capulín (*Prunus serotina*).

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Figura 9 se observan los valores de digestibilidad *"in vivo"* para cada una de las dietas empleadas para el ensayo biológico.

5.7.2 BIOMETRÍA HEMÁTICA

Considerando los parámetros hematológicos como valores predictivos de la salud de los animales, se les realizó una biometría hemática a cada uno de ellos al término del ensayo biológico, los resultados se observan en la Tabla 20, en los cuales al realizarlos el análisis estadístico que consistió en un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de rango múltiple (Prueba de Duncan).

Tabla 20
Biometría Hemática de los animales al final del ensayo.

	CONTROL*	AP*	APTML*	APML*	APMZG*	APAG*
Leucocitos (x10 ³ /mm ³)	6.6±1.3 _a	7.8±3.1 _{a c}	9.9±1.4 _{ab}	7.4±1.7 _{ac}	8.0±2.2 _{ac}	9.0±3.6 _{ac}
Eritrocitos (x10 ⁶ /mm ³)	9.2±0.4 _a	9.6±0.6 _{ab}	9.3±0.1 _a	9.1±0.6 _a	8.9±0.8 _a	10.3±0.6 _b
Hemoglobina (g/dl)	15.8±0.3 _a	14.2±0.4 _{bc}	14.5±0.4 _b	14.3±0.9 _{bc}	14.5±1.0 _{bc}	16.1±0.8 _a
Hematocrito (%)	79.6±2.0 _a	71.5±3.0 _b	73.4±1.6 _b	72.7±5.7 _b	73.3±5.8 _b	81.8±5.2 _a
MCV # (fl)	86.9±2.4 _a	75.9±2.9 _b	79.1±2.0 _c	79.6±2.8 _{cd}	82.8±1.9 _e	79.7±2.2 _c
Plaquetas (x10 ³ /mm ³)	1036±124 _a	1158±98 _{ab}	1049±99 _a	1104±64 _a	1094±158 _a	1284±147 _{ab}

= Volumen corpuscular medio

* = diferencia significativa ($\alpha=0,05$)

AP: aislado proteínico

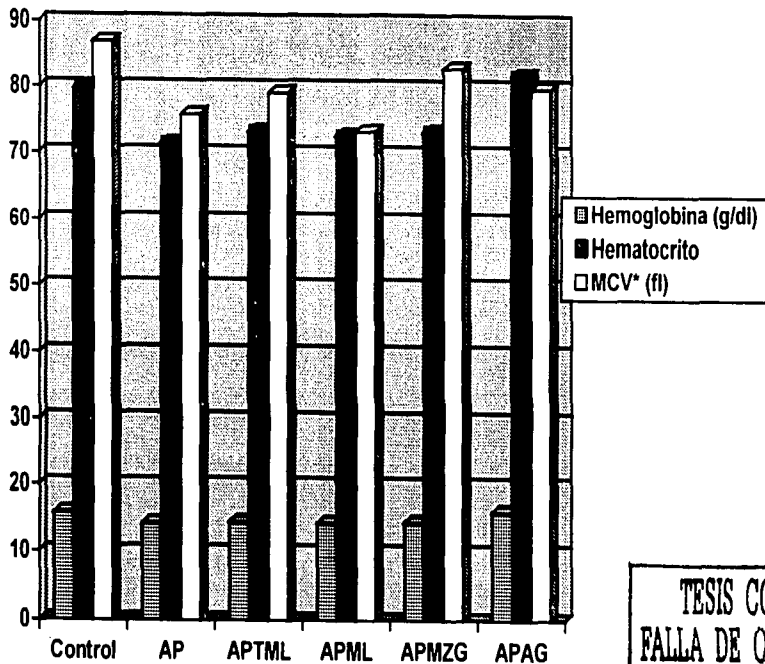
APTML: aislado proteínico +Triptofano(0.03%)+DL Metionina(0.2%)+ Lisina(0.3%)

APML: aislado proteínico +DL Metionina(0.2%)+Lisina (0.3%)

APMZG: Aislado proteínico +Cereal (Harina de maíz)+leguminosa (garbanzo) relación (1:1:1)

APAG: Aislado proteínico + Cereal (harina de arroz)+ leguminosa (garbanzo)relación (1:1:1).

De los resultados anteriores se destaca que tanto en las plaquetas, los eritrocitos y los leucocitos no hay diferencia estadísticamente significativa de las dietas con respecto al control. En cuanto a los valores de hemoglobina, volumen corpuscular medio (MCV) y hematocrito hay diferencia estadísticamente significativa entre las dietas respecto al control. La diferencia numérica entre los valores de las determinaciones con respecto al control no es tan amplia como se muestra en la figura 10, por lo cual no podemos determinar exactamente si el aislado proteínico de la almendra de capulín este afectando de alguna manera la disminución de estos valores en los animales utilizados en el bioensayo.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig 10. VALORES DE HEMOGLOBINA, HEMATOCRITO Y VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO (MCV)* EN LOS ANIMALES AL FINAL DEL ENSAYO

58

5.7.3 RELACIÓN PORCENTUAL DE ÓRGANOS.

Al terminar el ensayo biológico se realizó la necropsia a los animales empleados con el fin de observar posibles anomalías en los órganos. Como se observa en la Tabla 21 se presentan los promedios de los pesos porcentuales del hígado, intestino, pulmón y riñón.

A los promedios de los pesos porcentuales de órganos se les realizó un análisis estadístico que consistió en el análisis de varianza de una vía (ANOVA) junto con la prueba de rangos múltiples (Prueba de Duncan), y muestra que el intestino en la dieta APMZG muestra diferencia significativa respecto al control y en el caso de la dieta AP existe diferencia significativa del peso del riñón e intestino, respecto al control y a las demás dietas. Esto de cierto modo indica que existe algún factor tóxico que esta contribuyendo a la variación del incremento en peso de estos órganos y en especial para el caso de la dieta AP, en el cual como se observo su crecimiento no fue tan favorable.

Cabe mencionar que durante la necropsia no se observaron ninguna morfolopatología en los órganos y el órgano más importante en este caso que sería el hígado, el cual es un buen indicador de la presencia de algún factor tóxico no presenta ninguna anomalía, por lo cual se sugiere continuar con más estudios para determinar que es lo que realmente esta afectando la relación de la eficiencia proteínica de la almendra de capulín y determinar si el porciento en peso ligeramente elevados de intestino en las dietas de AP y APMZG se deba a que durante la necropsia no se haya trabajado adecuadamente y el factor tiempo es muy importante, ya que entre lo que se pesa una muestra y otra puede causar cierto tipo de variaciones en peso de las muestras, o realmente se deba a la presencia de algún otro factor..

Tabla 21
Relación Porcentual de pesos de órganos y peso corporal de ratas utilizadas en el ensayo biológico.

Dieta	Hígado %	Intestino* %	Pulmón %	Riñón* %
Control	4.00±0.17 ^a	4.99±1.41 ^a	1.15±0.35 ^a	1.12±0.18 ^a
AP [*]	4.60±0.43 ^a	7.14±1.34 ^b	1.33±0.22 ^a	1.50±0.21 ^b
APTML [*]	4.04±0.21 ^a	4.69±0.54 ^a	1.25±0.35 ^a	1.23±0.07 ^a
APML [*]	4.32±0.25 ^a	5.22±0.8 ^a	1.30±0.38 ^a	1.27±0.19 ^a
APMZG [*]	4.78±0.83 ^a	6.34±1.24 ^c	1.07±0.52 ^a	1.16±0.08 ^a
APAG [*]	4.32±0.86 ^a	5.62±1.93 ^a	1.15±0.23 ^a	1.21±0.14 ^a

.- = letra diferente indica diferencia significativa estadística (α=0.05)

* = descripción de las siglas usadas

AP: aislado proteínico

APTML: aislado proteínico +Triptofano(0.03%)+DL Metionina(0.2%)+ Lisina(0.3%)

APML: aislado proteínico +DL Metionina(0.2%)+Lisina (0.3%)

APMZG: Aislado proteínico +Cereal (Harina de maíz)+leguminosa (garbanzo) relación (1:1:1)

APAG: Aislado proteínico + Cereal (harina de arroz)+ leguminosa (garbanzo)relación (1:1:1)

6 CONCLUSIONES

- Se confirmó que la almendra de capulín (*Prunus serotina*) es buena fuente de proteína y grasa dietética.
- La alta concentración de glucósidos cianogénicos presente en la harina desengrasada de la almendra de capulín la hace inaccesible el consumo humano y/o animal.
- Con el método empleado para la obtención del aislado proteínico se logró disminuir significativamente la presencia de glucósidos cianogénicos, inhibidores de tripsina y fitatos.
- De acuerdo al perfil de aminoácidos y la calificación química, los aminoácidos limitantes en el aislado proteínico son: lisina y metionina.
- La curva de crecimiento obtenida en el ensayo biológico, indica que la dieta del aislado proteínico obtiene el menor incremento en peso, y por lo tanto presenta la menor relación de eficiencia proteínica, aunque los datos de digestibilidad se observa un mejor índice biológico.
- La relación de eficiencia proteínica indica que la calidad de la proteína es baja (0.46), Pero realizando la suplementación necesaria con otras fuentes de proteína de origen vegetal como maíz, arroz, garbanzo se mejora ligeramente la deficiencia de los aminoácidos indispensables.
- Los estudios de biometría hemática nos muestran que la diferencia numérica entre los valores de hemoglobina, hematocrito y volumen corpuscular medio del aislado proteínico y las dietas suplementadas no es tan amplia, con respecto al control por lo cual esto nos puede indicar la pobre alergenicidad del aislado proteínico de la almendra de capulín.
- La relación porcentual de los diferentes órganos indica que la dieta del aislado proteínico de la almendra de capulín produce anomalías en el intestino y el riñón observándose un incremento en peso de dichos órganos, pero en lo que respecta al hígado, siendo que este es uno de los órganos más importantes que nos puede indicar la presencia de algún tóxico no presenta alguna anomalía.
- Se sugiere continuar estudiando que otros factores antinutricionales podrían estar presentes en el aislado proteínico de la almendra de capulín, para de este modo determinar que es lo que disminuye la relación de eficiencia proteínica.

7 REFERENCIAS

1. Flores, N.(Editor) *¿Producir para la desnutrición?* Centro de Ecodesarrollo, p. 13 - 34, 243-266. México, D.F. (1988).
2. Comisión Nacional de Alimentación. *Encuesta nacional de alimentación en el medio rural, 1989*. Publicación del INNSZ L-86, p. 92-93. México D.F. (1990).
3. Doode, M. Y Pérez, E. P. *Sociedad economía y cultura alimentaria*. CIAD, A.C., p. 9,20,273-302, Hermosillo, (1994).
4. Hernández, J.E. y León, C. *Cultivos marginados (otra perspectiva de 1942)*.FAO: Colección de alimentación y nutrición No. 2, p. IX - XI, 3-33,37-120. Roma. (1986).
5. Lutz . E. *Agriculture and the environment (perspectives on sustainable rural development)*. The world Bank, p. 250-252, Washington D.C. (1998).
6. Liener, I. E. *Toxic constituents of plant foodstuffs*. Academic Press, p. 1-5. N.Y. (1980).
7. Sotelo, A. *Leguminosas silvestres, reserva de proteína para la alimentación del futuro*. Rev. IC y T (México)3(54),29-32 (1981).
8. Derksen,J., Muuse,B. and Caperus,F. *Processing of novel oil crops and seed oils*. In: designer oil crops. Murphy,D (Editor). VCH p.253-281, N.Y. (1994).
9. Kamel B.S. and Kakutda, Y. *Characterization of the seed oil and meal from apricot, cherry, nectarine, peach and plum*. JAOCs 69 (5), 492-494 (1992).
10. Ghandi, V., Mulky, M., Mukerji, B., Iyer, V. and Cherin, K. *Safety evaluation of wild apricot oil*. Food Chem.Toxicol. 35, 583-587. (1987).
11. Gómez E., Burgos L. *Amygdalin content in the seeds of several apricot cultivars*. J. Sci Food Agric., p.77, 184-186. (1988).
12. Martínez M. *Plantas útiles de la flora mexicana*. Ediciones Botas, p. 129 -131, México, D.F. (1959).
13. Martínez, M. *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. Fondo de Cultura Económica, p. 156-157, 1195-1196, México, D.F. (1987).
14. Bostid, F.R. (Editor) *Lost crops of the incas: little -known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation*. National Academy Press, p. 222-227. Whashington, D.C.(1989).

REFERENCIAS

15. Soto, J.C. y Sousa, M. *Plantas medicinales de la cuenca del río Balsas*. Cuadernos del Inst. de Biología No. 25, UNAM, p.48 y 63, México D.F. (1995).
16. Aguilar C. A., y Zolla C. *Plantas tóxicas de México*. Publicación del IMSS Primera edición, p. 173-175 México D.F. (1982).
17. Castillo C. J. *Caracterización bromatológica de varias semillas de frutos con aporte de proteínas y grasa dietética*. Tesis de la Facultad de Química. UNAM. México D.F. (1997).
18. Alvarado, E. L. *Evaluación toxicológica de la fracción proteínica de la almendra de capulín (*Prunus serotina*)*. Tesis de la Facultad de Química, UNAM. México D.F. (1999).
19. Li Chun P., Swain, E. and Poulton, J. *Prunus serotina amygdalin hydrolase and prunasin hydrolase*. Plant Physiol. 100, 282-290(1992).
20. Swain, E., Li Chun P. and Poulton, J. *Development of the potential for cyanogenesis in maturing black cherry (*Prunus serotina*)*. Plant Physiol. 98, 1423- 1428 (1992).
21. Ayllón M.F. *Obtención de un extracto enzimático con actividad B-glucosidasa a partir de semilla de capulín (*Prunus serotina*)*. Tesis de la Facultad de Química, UNAM. México D.F. (1995).
22. Swain, E., and Poulton, J. *Utilization of amygdaline during seeding development of *Prunus serotina**. Plant Physiology. 106, 437-445 (1994).
23. Tuncel, G. Nout, M. And Brimer, L. *Degradation of cyanogenic glucosides bitter apricot seeds (*Prunus armeniaca*) by endogenous and added enzymes as affected by heat treatments and particle size*. Food Chem. 63, 65-69 (1998).
24. Linder E. *Toxicología de Alimentos*, Editorial Acribia, segunda edición, p. 14-19. España (1995).
25. López, M.I. *Determinación de factores tóxicos en varias almendras no tradicionales con potencial aporte de proteína y grasa dietética*. Tesis de la Facultad de Química UNAM. México, D.F. (2000).
26. Nava, R. Y Rodriguez R. *Composición Química y contenido de compuestos tóxicos termolábiles en dos variedades de frijol*. Tesis de la Facultad de Química, México D.F.(1988).

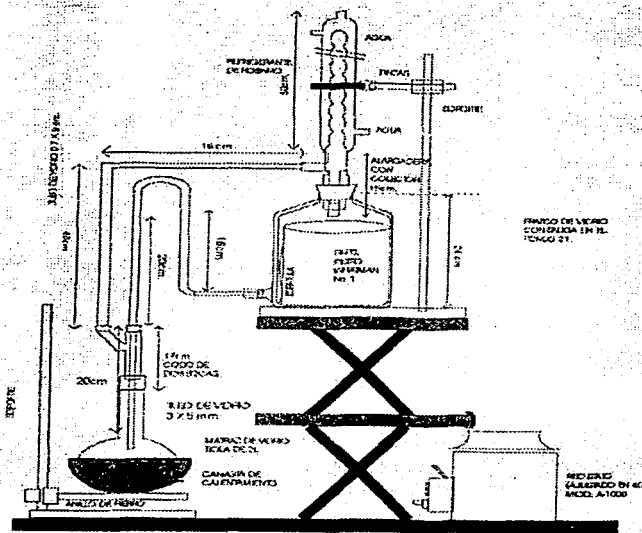
REFERENCIAS

27. Dintzis, F.R. Lehrfeld, J. Nelsen, T., Finney, P. *Phytate content of soft wheat brans as related to kernel size, cultivar, localitation and milling and flour quality parameters*. Cereal Chem. 69,5, p. 577-581. (1992).
28. Mendoza B. *Validación de una metodología para la determinación de ácido fítico en alimentos*. Tesis de la Facultad de Química. México D.F. (2001).
29. Shibamoto T. Y Bjeldanes L. *Introducción a la toxicología de los alimentos..* Editorial Acribia S.A. p. 17-31,63-91, Zaragoza,España (1996).
30. Linner E.. *Toxicología de Alimentos*. Edit. Acriba segunda edición p.14-90 Zaragoza, España (1980).
31. Conn E.E. *Cyanogenic Glycosides*. J.Agr. Food Chem 17 (3), p. 516-519.
32. Robinson, S. *Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos*. Edit Acribia, S.A., p. 107-141, Zaragoza (1991).
33. Lu F. *Toxicología básica*. Editorial Harla, primera edición p. 99-110. México D.F. (1992).
34. Derache R. *Toxicología y seguridad de los alimentos*. Ediciones Omega, p 1-6, 57-64, Barcelona, España (1990).
35. Mitchell S., Helen R. *Nutrición y Dieta*. Editorial. Interamericana, 16 º edición p. 35-56. México, D.F.(1978).
36. Boutrif E. *Recent develoments in proteín qulity evaluation*. Food nutrition and agriculture Alimentation FNA/ ANA 2/3 Vol. p. 36-40(1991).
37. Scheider L.W. *Nutrición. Conceptos básicos y aplicables*. Editorial Mc. Graw-Hill, España (1985).
38. Sarwar G. and Mc. Donough, F.E. *Evaluation of proteín digestibility, corrected aminoacid score method for assessing protein quality of foods*. J. Assoc. Of Anal. Chem. 73(3)p. 347-355 (1990).
39. Pellet L.P and Young V. *Nutrition evaluation of protein foods*. The United Nations University, p. 26-75. Tokio (1980).
40. Fennema O.R. *Química de alimentos*. Editorial Acribia S.A. p. 321-323. Zaragoza España (1993).
41. Cheftel, J.C. *Proteínas alimentarias*. Editorial acribia. P.49-58,116-123. Zaragoza (1989).

REFERENCIAS

42. Mora J.F. *Soporte nutricional especial*. Editorial Médica Panamericana, p. 35-40,56-58, Bogotá, Colombia, (1992).
43. Bateman, J. *Nutrición animal (manual de métodos analíticos)*, Herrero Hnos., p.110,112,170-172, México D.F. (1970).
44. Lucas B. and Sotelo A. *Amino acids determination in pure proteins, foods and feeds using two different acid hydrolysis methods*. Anal Biochem. 123, 349-356 (1982).
45. Mc. Donald,P. *Nutrición animal*. Editorial Acribia tercera edición, p. 200-204,259-263. Zaragoza (1988).
46. AOAC. *Official Methods of analysis of the association of analytical chemistristis*. Herlich, K. (Editor) Vol. 1 p. 17-18, 40-62,69-83.Vol. II p. 1095-1098, Arlington (1990).
47. Ruíz A. *Fundamentos de hematología*. Editorial Médica Panamericana, segunda edición, p. 31-43, México D.F.(1998).
48. Derelanks, M.J. and Hollinger, M.A. *Handbook of toxicology*. CRC. Press, p.518, . . .519,530,531,805, Boca Ratón, (1995).
49. Moreno, E. *Análisis físico y biológico de semillas agrícolas*. Instituto de Biología, UNAM, p. 250-252, México,D.F. (1984).
50. Lucas B. and Sotelo A. *A simplified test for the quantitation of cyanogenic glucosides in wild and cultivated seeds*. Nutr. Rept. Int.29, p. 711-719. (1984).
51. Lucas B. and Sotelo A. *Effect of different alkalies, temperature and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins*. Anal. Biochem. 109, 192-197. (1980).
52. UNAM. *Prácticas de laboratorio de nutrición "Determinación de triptofano"*. Facultad de Química, México D.F. (1982).
53. Waynforth, H.B. *"Experimental and surgical technique in the rat"*, Harcourt Brace . Fonavich, Publishers, p. 240,241,244,245(1988).

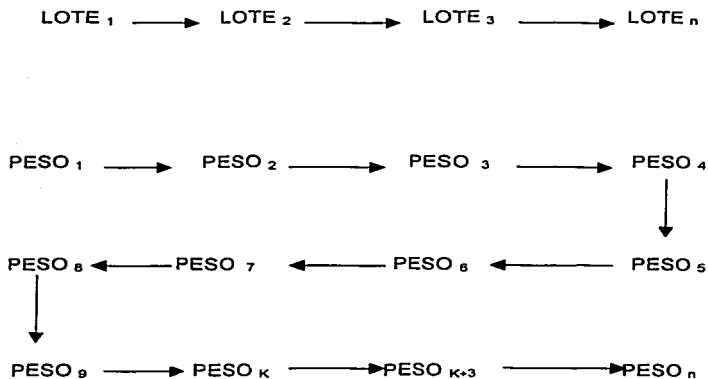
DISPOSITIVO DE EXTRACCIÓN DE GRASA



La extracción de grasa de la harina integral se realizó dejando a reflujó durante 8 horas diarias por 3 días con hexano grado QP.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

METODO DE LA "CULEBRA JAPONESA"



Donde:

$$PESO_1 < PESO_2 < PESO_3 < PESO_{\kappa} < PESO_{\kappa+3} < PESO_n$$

Los animales se pesan y posteriormente se ordenan en forma ascendente o descendente (dependiendo de las condiciones del experimento) basándose en su peso corporal. Finalmente se ordenan de acuerdo al esquema anterior.

Este método se utiliza con a fin de distribuir un conjunto de animales en determinado número de grupos o lotes de tal forma que se tenga la menor variabilidad posible entre los mismos.

Toxicidad aguda__ fecha : _____

Especie: _____ Clave: _____ Cepa: _____ Peso inicial: _____ Peso final: _____ Sexo: _____

Descripción: _____ Edad: _____

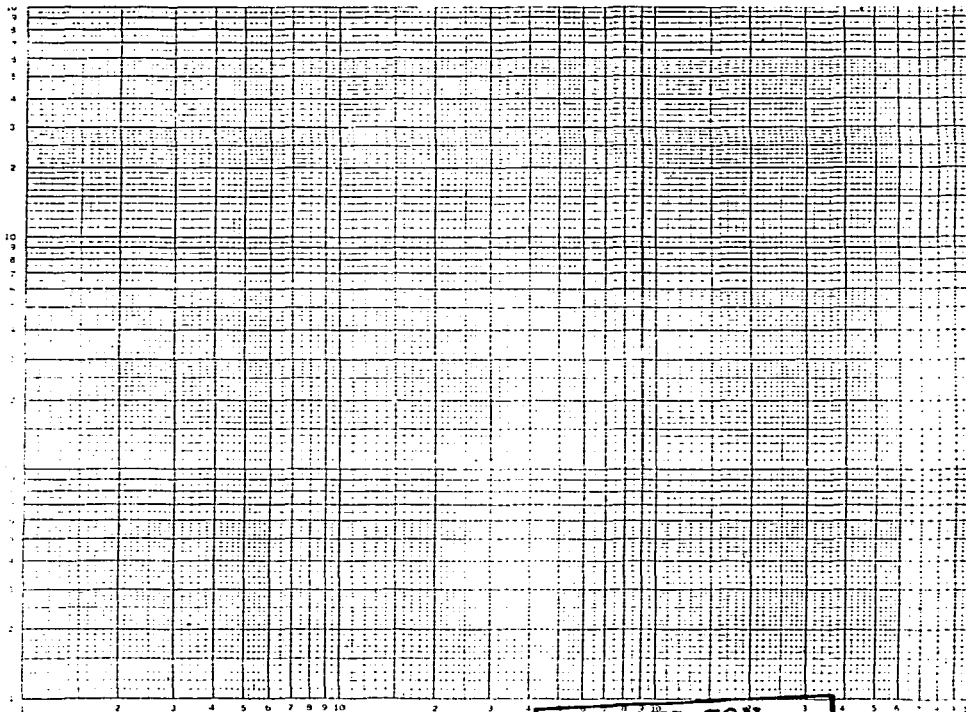
Vehículo: _____ Concentración: _____

Vía: _____ Administración: _____ Dosis: _____ Hora: _____

	Lordosis	Xifosis	Ataxia	Piloerección	Erección Caudal	Agresividad	Aletargamiento	Excitación	Disnea	Cianosis	Hipotermia
Inicio											
1 h											
2 h											
3 h											
4 h											
5 h											
6 h											
7 h											
8 h											
9 h											
10 h											
11 h											
12 h											
24 h											
48 h											
72 h											

Observaciones: _____

PAPEL LOGARITMICO DE PROBABILIDAD PARA LA OBTENCION DEL
 DL_{50}



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

IV

HOJA DE REGISTRO DE CONSUMO DE ALIMENTO Y PESO

RATA:	SEXO:	PESO INICIAL (Pi):			DIETA:	FECHA:
TIEMPO (días)						FINAL:
PESO ANIMAL (Pdia)						PI =
INCREMENTO ACUMULATIVO (Pdia - Pi)						PI - PI =
ALIMENTO INICIAL (I)						
ALIMENTO FINAL (f)						
ALIMENTO INGERIDO (AI = I-f)						E AI =
ALIMENTO ACUMULATIVO (E AI) día						
OBSERVACIONES:						

C

LISTA DE ABREVIATURAS

AP	Dieta de aislado proteínico
APAG	Dieta aislado proteínico+ harina de arroz+ harina de garbanzo
APML	Dieta aislado proteínico+ metionina+lisina
APMZG	Dieta de aislado proteínico+ harina de maíz +harina de garbanzo
APTML	Dieta de aislado proteínico+triptofano+metionina+lisina
CN	cianuro
CRL	Dieta control
CQ	Calificación Química
DL ₅₀	Dosis letal media
HB	Hemoglobina
HCl	ácido clorhídrico
HCN	ácido cianhídrico
LiOH	hidróxido de sodio
MCV	Volumen corpuscular medio
NaCl	cloruro de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
PCV	Hematocrito
RBC	Eritrocitos
REP	Relación de eficiencia proteínica
WBC	Leucocitos

VII