



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DESTOXIFICACION DEL ACEITE CRUDO DE LA
ALMENDRA DE CAPULIN (*Prunus serotina*) y su
EVALUACION TOXICOLOGICA AGUDA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

CLAUDIA PRIOR CRESPO



MEXICO, D. F. EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Biblioteca Central

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Bernardo Lucas Florentino
Vocal	Profra. Lucia Gabriela Bascuñan Termini
Secretario	Profra. I. María de Lourdes Flores Téllez
1er. Suplente	Profra. Rosa María Argote Espinosa
2do. Suplente	Profra. Iliana Elvira González Hernández

Sitio donde se desarrolló el tema: Facultad de Química, UNAM
Laboratorio 111, Edif. E. Farmacia (Posgrado)
Ciudad Universitaria, Coyoacán
México, D.F.

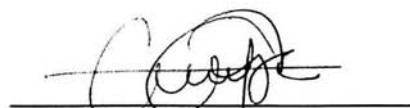
Asesor del tema


M en C. Bernardo Lucas Florentino

Supervisor técnico


Q.F.B. Leticia Gil Vieyra

Sustentante


Claudia Prior Crespo

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recaptional.
NOMBRE: Claudio Priá Crespo

FECHA: 6 de Octubre de 2004

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por la oportunidad de formar parte de esta gran comunidad, de la cual estaré siempre orgullosa de pertenecer.

Al Laboratorio 111, del Edificio "E" por brindar el espacio para desarrollar este trabajo.

Al M. en C. Bernardo Lucas por su paciencia y apoyo para la elaboración de este trabajo, por compartir sus conocimientos; me llevó un gran recuerdo como profesor, mi admiración a usted y su familia.

Al Dr. Jesús Torres Merino del Laboratorio de Ingeniería, de la Facultad de Química, por su ayuda en el desarrollo de este trabajo. Muchas gracias.

Al Laboratorio 212, del Edificio "E" por permitir el uso de su equipo para realizar la hidrogenación.

Al Bioterio del Edificio "A" de la Facultad de Química, por el préstamo de sus instalaciones y material, para efectuar el bioensayo.

A Lety y a Rosita por ayudarme a resolver mis dudas cuando lo necesitaba.

A la profesora Lucía Bascuñan por sus enseñanzas y por la revisión de este trabajo. Mis respetos más sinceros.

A la profesora Lourdes Flores por tomarse su tiempo para la revisión de trabajo.

A todos mis profesores que fueron parte de mi formación como profesionista.

DEDICATORIAS

A mis papás Silvia y Toño por todo su apoyo, por abrirme las puertas para permitir mi desarrollo personal y profesional, por ser como son, por su amor y comprensión, por todo lo que representan para mí, los admiro mucho. Los quiero mucho papás. Este trabajo es suyo.

A mis hermanos Toño y Ale por estar a mi lado, por su cariño y por formar parte de vida. Los quiero.

A mis abuelitos Claudio y Eva; porque siempre los voy a llevar en mi corazón y en mis recuerdos. Los extraño.

A mi abuelita Estela, por su apoyo incondicional, por sus cuidados, por su cariño, muchas gracias abue.

A mi tío Pepe, pues sin tu apoyo este trabajo no hubiera sido posible, te agradezco en nombre mío y de mi hermano la gran ayuda que nos brindaste. Muchas gracias tío.

A toda mi familia por su cariño y su apoyo.

A Alfonso, por tu amistad, tus cuidados, por haber sido la persona que influyó para que encaminará mi profesión, por todos los buenos momentos en FES. Zaragoza. Gracias Poncho.

A Milet, Irak y Bety; agradezco el haberlos conocido, por su apoyo, su compañerismo, por todos los gratos momentos que pasamos juntos, por su amistad que se que durará muchos años más. Los quiero mucho.

A Julio. Clau, Beto y Carlos, por su amistad a través de los años.

A Ñaïs, José Juan, Fer, Noriko, Gaby y a la Sra. Vicky por hacer más divertida mi estancia en el laboratorio.

A Jorge por darme la confianza, el amor y la comprensión durante todo este proceso, por ser el mejor amigo que he tenido. Te amo.

Como no quiero que me falte alguien les dedico este trabajo a todos lo que formaron parte de esta grata experiencia que es ser universitario, ustedes saben quienes son. Muchas gracias por formar parte de mi vida.

INDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2.OBJETIVOS	4
2.1 Objetivos Particulares	4
3.ANTECEDENTES	5
3.1 Capulín	5
3.1.1 Nombres Comunes	6
3.1.2 Características Botánicas	7
3.1.3 Usos	7
3.1.4 Otras Características	8
3.2 Papel en la nutrición de las grasas y aceites	9
3.3 Grasas y Aceites	9
3.3.1 Triglicéridos	10
3.3.2 Ácidos Grasos	10
3.3.2.1 Ácidos Grasos Saturados	10
3.3.2.2 Ácidos Grasos Insaturados	10
3.3.2.3 Isomería de los ácidos grasos insaturados	11
3.3.3.4 Monoglicéridos y Diglicéridos	11
3.3.3 Otros Compuestos Lipofílicos	11
3.3.3.1 Ácidos Grasos Libres	11
3.3.3.2 Fosfátidos	11
3.3.3.3 Esteroles	12
3.3.3.4 Tocoferoles	12
3.3.3.5 Carotenoides y Clorofilas	12
3.3.4 Lípidos potencialmente tóxicos en alimentos	12
3.3.4.1 Ácido Erúico	12
3.3.4.2 Características Físicoquímicas	13
3.3.4.3 Daños Provocados por el consumo de ácido erúico	13
3.4 Proceso General de Obtención de Aceite Vegetal	15
3.4.1 Desgomado	16
3.4.2 Neutralización	17
3.4.3 Decoloración o Blanqueado	17
3.4.4 Deodorización	18
3.4.5 Hidrogenación	19
3.5 Ácidos Grasos <i>Trans</i>	25
3.5.1 Presencia en los alimentos	26
3.5.2 Ácidos grasos <i>trans</i> y enfermedades crónicas	26
3.6 Perfil de Ácidos Grasos	27
3.6.1 Cromatografía de Gases	28
3.7 Parámetros físicos y químicos para la caracterización de grasas y aceites	28
3.7.1 Densidad	28
3.7.2 Índice de Refracción	28
3.7.3 Punto de Fusión	29
3.7.4 Índice de Yodo	30
3.8 Estudio Toxicológico <i>in vivo</i>	31
3.8.1 Variables Generales	32
3.8.1.1 Elección del modelo biológico	33
3.8.1.2 Elección de la vía de administración	33

3.8.1.3 Duración del tratamiento	33
3.9 Toxicidad Aguda	33
4. Metodología	37
4.1 Origen de la semilla	37
4.2 Limpieza y Selección de la Semilla	37
4.3 Descascarado	37
4.4 Parámetros Físicos	38
4.4.1 Dimensiones	39
4.4.2 Peso Hectolitrico	39
4.4.3 Peso de la Semilla y Almendra	40
4.4.4. Relación Cáscara-Almendra	40
4.5 Molienda	41
4.6 Método de Extracción de la Grasa	41
4.7 Refinación del Aceite	43
4.7.1 Desgomado	43
4.7.2 Neutralización	44
4.7.3 Blanqueo	45
4.7.4 Deodorización	46
4.8 Hidrogenación	47
4.9 Determinación de Densidad Calórica	51
4.10 Determinación de Perfil de ácidos grasos	53
4.11 Parámetros Fisico-Químicos	56
4.11.1 Gravedad Específica o Densidad Aparente	56
4.11.2 Punto de Fusión	57
4.11.3 Índice de Refracción	58
4.11.4 Índice de Yodo (Método de Hanus)	59
4.12 Evaluación Biológica	62
4.12.1 Prueba de Toxicidad Aguda	62
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
5.1 Rendimientos	65
5.2 Parámetros físicos de la almendra y semilla de Capulín	66
5.2.1 Relación Cáscara-Almendra	67
5.3 Densidad Calorica del aceite de la Almendra de Capulín	68
5.4 Perfil de Ácidos Grasos	69
5.5 Parámetros Fisicoquímicos	74
5.6 Toxicidad Aguda	77
5.6.1 Relación Porcentual de órganos	77
6. CONCLUSIONES	82
7. RECOMENDACIONES	83
8. BIBLIOGRAFÍA	93

FIGURA 9. DIAGRAMA GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN

36

APÉNDICE.

Apéndice 1. Registro Toxicidad Aguda	84
Apéndice 2. Método de la “culebra japonesa” para la distribución de animales en estudio.	85
Apéndice 3. Numeración de ratones en el estudio de Toxicidad Aguda	86
Apéndice 4. Cromatograma 1. Estándares	87
Cromatograma 2. Aceite Crudo	88
Cromatograma 3. Aceite Refinado	89
Cromatograma 4. Aceite Hidrogenado 5 minutos	90
Cromatograma 5. Aceite Hidrogenado 10 minutos	91

GLOSARIO

92

1. INTRODUCCION

Debido al crecimiento demográfico tan acelerado en las ultimas décadas, se ha originado una escasez de alimentos muy significativa que afecta en su mayoría a la gente de bajos recursos económicos, ya que su acceso a alimentos de alto valor nutritivo es más difícil (FAO, 1997). Esto ha originado que un grupo de investigadores, busque fuentes alternativas de alimentos las cuales son denominadas como "no convencionales" y bien podrían sustituir a los alimentos de difícil adquisición; además, en términos generales, estos alimentos son relativamente de bajo costo, haciéndolos más accesibles (Ferrando, 1980; Murhpy, 1994). Se ha considerado a estos alimentos como una opción muy importante de sustitución debido al alto nivel proteínico que contienen; sin embargo, es importante considerar también que las grasas y aceites son considerados como nutrimentos esenciales en la dieta, ya que proveen la mayor fuente de energía en cualquier alimento, suministran los ácidos grasos esenciales, contribuyen a la sensación de saciedad después de comer, son vehículo de las vitaminas liposolubles y brindan palatabilidad a la comida (Chow, 2000; Akon and Min, 1998; FAO, 1997).

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 proteínico-calórica en el país, particularmente en las zonas rurales marginales, siendo el grupo más vulnerable al problema de la desnutrición es la población infantil en particular los preescolares (Doode y Pérez, 1994; INEGI, 2002).

Paradójicamente a lo anterior, en nuestro país el mal planeado desarrollo agropecuario en comunidades rurales, pone en peligro la conservación de plantas silvestres o de cultivo incipiente, no importando que algunas de ellas tienen un alto potencial alimenticio, y son apreciadas y utilizadas de manera sustentable en dichas comunidades. La destrucción de la vegetación silvestre para obtener tierras para monocultivos pone en peligro la pérdida de especies vegetales que hasta el momento no han sido valoradas en su plenitud (Flores, 1988; Doode y Pérez, 1994; Centurión et al, 2000).

Aquellas plantas silvestres o en cultivo incipiente, si bien por una parte pueden proporcionar macro y micronutrimentos en la alimentación humana o animal; por otra parte, no debe descartarse la presencia en estos recursos vegetales de factores tóxicos o

antinutricionales, que pueden poner en riesgo la salud de aquellos que los consumen en mayor cantidad o frecuencia de lo establecido empíricamente como normal (Kotsonis et al, 1994; Vander Heijden et al, 1999); por lo tanto, cuando se pretende utilizar con fines comestibles una planta silvestre o en cultivo incipiente, es necesario contemplar la posible presencia de factores tóxicos o antinutricionales que se presentan en forma natural. (Liener, 1980; Watson, 1987; Lindner, 1995; Vander Heijden et al, 1999).

Para el caso de un recurso vegetal, como fuente potencial de grasa y proteína como es una oleaginosa, la obtención de preparados proteínicos o lipídicos purificados, como son concentrados o aislados de proteína y aceites refinados, permiten la eliminación de factores tóxicos y antinutricionales presentes en el material original (Mansour et al, 1993; Wanasundara and Shahidi, 1998). La situación anterior, pone ante la necesidad de buscar nuevas fuentes alternativas de grasas y aceites, debido a que la producción nacional es insuficiente. En esta búsqueda se han tomado acciones tales como mejorar la calidad y cantidad de las especies de oleaginosas tradicionales como cártamo, ajonjolí, soya, girasol, canola entre otras, pero esto ha sido insuficiente. Actualmente millones de toneladas de semillas de frutos son descartadas cada año, produciendo problemas de contaminación ambiental y consecuentemente de salud pública y se menciona que las semillas de los frutos del género *Prunus*, pueden ser un suministro importante tanto de proteína y grasa alimenticia (Kamel y Kakuda, 1992; Gandhi et al, 1997). La almendra de capulín se puede considerar como un recurso vegetal debido a que es una autentica oleaginosa, como fuente potencial de grasa (>40%) y proteína (>30%), además de un contenido apreciable de macro y micronutrientes. Por consiguiente, si se quiere aprovechar la semilla de capulín como fuente alimenticia, es indispensable realizar un proceso de detoxificación, con el fin de eliminar o disminuir la presencia de los glucósidos cianogénicos, a la vez, en la fracción grasa llevar a cabo su purificación por un proceso tradicional, con la finalidad de eliminar o disminuir a niveles permitidos el contenido de ácido erúico (Castillo, 1997; Ruiz, 2000; Barbosa, 2003).

En estudios previos se ha caracterizado bromatológicamente y toxicológicamente la fracción proteínica y la fracción grasa de la almendra de capulín (*Prunus serotina*) (Alvarado, 1999; Ayllón, 1995; Barbosa, 2003; Castillo, 1997; Lara, 2003; López, 1997; Ruiz, 2000), donde se obtuvieron los siguientes resultados:

- ✗ Buena fuente de β -glucosidasa. (Ayllón, 1995; López, 1997)
- ✗ Concentraciones elevadas de glucósidos cianogénicos ($>200\text{mgHCN}/100\text{g}$). (Alvarado, 1999)
- ✗ Presencia de factores tóxicos y antinutricionales como fitatos, inhibidores de tripsina y taninos.
- ✗ Deficientes en aminoácidos azufrados en el preparado proteínico de la almendra de capulín, pero rico en aminoácidos esenciales como histidina, leucina, fenilalanina y triptófano. (Alvarado, 1999)
- ✗ Presencia de ácido erúico en concentraciones mayores al 5% en la fracción grasa de la almendra de capulín. (Barbosa, 2003)

2. OBJETIVO GENERAL

Realizar el proceso de purificación tradicional en el aceite crudo de la almendra de capulín (*Prunus serotina*) en donde se incluya como paso adicional la hidrogenación y efectuar las pruebas de toxicidad aguda para corroborar su destoxicación.

2.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener suficiente fracción lípida (aceite crudo) de la almendra de capulín para realizar su purificación y efectuar los bioensayos de toxicidad.
- Complementación de parámetros bromatológicos (densidad calórica y perfil de ácidos grasos) tanto a la materia prima como a los diferentes preparados.
- Determinar los parámetros fisicoquímicos más comunes en el aceite crudo, refinado e hidrogenado.
- Realizar la prueba de toxicidad aguda por vía oral en ratones, del aceite crudo y de los diferentes preparados.

3. ANTECEDENTES.

3.1CAPULÍN (*Prunus serotina*)

La búsqueda de material biológico con potencial proteínico-calórico, no es nueva ni difícil de implantar como recurso agroalimentario, ya que el territorio mexicano cuenta con una gran biodiversidad, debido al amplio mosaico de ecosistemas (Villela y Gerez, 1994; Granados y López, 1996). Dentro de la gran diversidad de la flora mexicana, existen especies cuya potencialidad productiva es alta y que pueden ser fuente de nutrientes para la alimentación humana y animal; sin embargo, estos recursos están infrautilizados. Tal es el caso del capulín (*Prunus serotina*), perteneciente a la familia *Rosaceae*, subfamilia *Prunoidea*. El género *Prunus* se le asigna a un amplio grupo de árboles y arbustos (Figura 1), estas plantas son muy apreciadas por sus frutos deliciosos, los cuales se dan en primavera. Algunas variedades son decorativas (por lo que no producen frutos comestibles), otras desarrollan formas silvestres, algunas tienen una alta producción y calidad, sus flores crecen largas y muy abundantes, se incluyen en este género árboles y arbustos de almendro, albaricoque, cerezo y árboles de durazno. Los sinónimos del nombre científico son *Prunus capuli* (Cav.), *Prunus salicifolia* H.B.K (Kunth), *Prunus serotina* var. *Salicifolia* (Kunth) Koehne, *Cerasus capollin* DC el cual es un árbol o arbusto ampliamente distribuido en el territorio nacional (Martínez, 1959 y 1987; Magaña, 1995; Martínez y Chacolo, 1994; Sánchez, 1981 McVaugh, 1951).



Figura 1. Árbol de Capulín (*Prunus serotina*)



Figura 2. Flor, Fruto y Hoja del Capulín (*Prunus serotina*)

3.1.1 NOMBRES COMUNES.

El capulín, conocido así por su nombre común también es conocido como Capulín blanco en la zona de la República Mexicana y en la mesa central, también se conoce por diversos nombres dentro del mismo país o de acuerdo a la etnia indígena que predomina en la zona como el caso de Michoacán que es conocido como Cerezo; Shencua, Shegua, Xengua (l. Tarasca, Mich.); en otros estados se llama Cusabi (l. Tarahumara, Chih); Uasiqui, Hueco (l. guarigía, Chih), Pakshumk (l. Mixe, Oax.); T-nundaya (l. Mixteca, Oax.); Tzu'uri (l. cora, Nay.); Paté, Shimal-ma-lu (l. chontal, Oax.); Capuli taunday (l. Zapoteco, Oax.); Detze, Ghohto (l. Otomí) (McVaugh, 1951) de tal manera que esta es una especie de amplio rango de adaptabilidad, tanto al suelo como a las condiciones climáticas adversas (heladas y sequías). Su distribución es amplia y se extiende actualmente desde Canadá hasta la región andina de Ecuador y Bolivia, siendo un árbol fácilmente identificable y representa para los Andes, lo que la palma representa para las costas (Bostid, 1989). A pesar de la amplia difusión en Sudamérica, es reconocido por algunos investigadores, que el origen de este árbol es mexicano, ya que el nombre de "capulín", proviene de la palabra azteca "**capuli**". En México es una de tantas especies que puede considerarse como semi-cultivadas o en fase incipiente de cultivo, más en el proceso de selección, las plantas sembradas actualmente no difieren mucho de sus antecesores silvestres. Referente a su distribución en nuestro país, es tan amplia que se localiza desde las regiones montañosas, zonas templadas hasta regiones bajas de clima tropical (2,200-3,100 m); así, podemos localizar árboles en Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Durango, Estado de México, Morelos, Michoacán, Oaxaca, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas, Puebla, Guerrero, Hidalgo, Nayarit, Jalisco, Veracruz, Tlaxcala y el Distrito Federal (Martínez, 1987; Aguilar y Zolla, 1982; Sánchez, 1981).

3.1.2 CARACTERÍSTICAS BOTANICAS

Las características botánicas de este fruto es de una árbol o arbusto monopódico, perennifolio o caducifolio, de 5 a 15 m (hasta 38m) de altura con un diámetro a la altura del pecho de hasta 1.2m.. La copa es ancha de forma ovoide que produce una sombra densa. Hojas estipuladas, simples, alternas, cortamente pecioladas, ovadas a lanceoladas, de 5 a 16 cm de largo por 2 a 5 cm de ancho, margen aserrado; haz verde oscuro y brillante. El tronco es largo y recto en el bosque, pero en los claros es corto y ancho. Ramas alternas, erguido-extendidas, lampiñas, escabrosas por la presencia de muchas lenticelas esparcidas. La corteza es café o grisácea casi lisa y glabra, exceptuando las ramas tiernas que a veces son pubescentes. Tiene flores numerosas, pequeñas y blancas, agrupadas en racimos axiliares colgantes y largos, de 10 a 15 cm, con pedicelos de 5 a 10 mm de largo. El fruto es una drupa globosa, de color negro rojizo en la madurez, de 12 a 20 mm de diámetro, sabor agridulce y algo astringente; conteniendo una sola semilla la cual es esférica y rodeadas por un endocarpio o hueso leñoso, que contiene una almendra de sabor amargo. La raíz es un sistema radical superficial, extendido y medianamente profundo. La mayoría de las raíces ocupan los primeros 60 cm del suelo. La raíz crece muy rápido. Se considera como de sexualidad hermafrodita. (McVaugh, 1951)

3.1.3 USOS.

En nuestro país, el capulín es un árbol de gran importancia desde tiempos precolombinos, debido a que la fruta se consume desde esa época, ya que su sabor y apariencia hacen recordar a la cereza; incluso en España se le conoce como **picota** y en **Norteamérica** se le conoce como **american cherry** o **black cherry**. Los frutos se comen crudos, en conserva como mermelada, en bebidas frescas, licores y se pueden usar en la elaboración de tamales. En algunos lugares también se consume la almendra asada y después de quitar la cáscara que la protege (semilla). Otros usos de este árbol, son como madera para fabricar muebles, guitarras, ataúdes y otros productos, así también como combustible, con fin decorativo para sombra y como ornamento. La semilla contiene del 30 a 40% de aceite semisecante apropiado para la fabricación de jabones y pinturas; como insecticida debido a que las hojas tiernas y las semillas se consideran tóxicas. Las hojas, ramitas, corteza y semillas son venenosas para el ganado, debido al contenido de glucósidos cianogénicos. También se le ha encontrado un uso medicinal, la corteza, hojas (en infusión): se usa como expectorante, estimulante, febrífugo, antiespasmódico, tónico,

sedante y para combatir las diarreas y disentería. El polvo de la corteza aplicado en los ojos desvanece las nubes, aclara la vista y cura las inflamaciones. El fruto en jarabe se usa contra la tos. Los extractos, infusiones y jarabes preparados con las ramas, corteza y raíces, se usan como tónicos y sedantes en el tratamiento de la tisis pulmonar y en la debilidad nerviosa, así mismo se utiliza como antiperiódica. Actualmente se le está dando importancia en la reforestación, ya que es una especie de rápido crecimiento que se desarrolla en suelos pobres; además, sus raíces son profundas y evitan la erosión del suelo (Martínez, 1959; McVaught, 1951; Bostid, 1989).

3.1.4 OTRAS CARACTERÍSTICAS.

Se menciona en trabajos recientes, que la almendra de capulín se puede considerar como una fuente de proteína (>30%) y de grasa (>40%); así, como de algunos micronutrientes, en particular de vitamina C, E y una buena fuente de hierro y zinc, (Bostid, 1989; Castillo, 1997; Ruiz, 2000). Además, la almendra de capulín es buena fuente de β -glucosidasa, enzima de amplia importancia en ciertas aplicaciones enzimáticas (Lara, 2003; Li et al, 1992; Swain and Poulton, 1994; Ayhllon, 1995).

Es común en las semillas del género *Prunus*, la presencia de glucósidos cianogénicos (aprox 200mg HCN/100g), a los cuales se ha responsabilizado de envenenamiento en el hombre y animales tanto domésticos como salvajes (Kamel y Kakuda, 1992; Swain and Poulton, 1994; Tunçel et al, 1998). Así también la presencia de factores antinutricionales y tóxicos como fitatos, inhibidores de tripsina y taninos en el preparado protéico de la almendra y deficiencia en aminoácidos azufrados. Además, en la grasa de la almendra de capulín (*Prunus serotina*), se pudo detectar la presencia de un ácido graso no identificado, que se pensó en un principio que correspondía al ácido eleostéarico, ya que éste se presenta en la grasa de la almendra de la cereza, pariente muy cercano con muchas características semejantes al capulín (Castillo, 1997; Comes et al, 1992; Lara, 2003). Sin embargo, en estudios más recientes sobre la fracción grasa de la almendra de capulín, se observó la presencia de varios ácidos grasos no comunes y del ácido erúico, presentándose este último en una concentración arriba del 5%, que hace que se considere de alto riesgo el consumo de dicha grasa vegetal (Barbosa, 2003).

3.2 PAPEL DE LAS GRASAS Y ACEITES EN LA NUTRICIÓN

Las grasas y los aceites han sido una de las fuentes principales de alimento para el hombre desde la época en que era cazador. Más tarde, cuando llegó a ser un granjero o habitante de las ciudades, las grasas y aceites permanecieron como uno de sus alimentos favoritos. Ya sea de fuentes vegetales o animales o de origen marino, las grasas y aceites representan la fuente de energía más alta por unidad de peso que el hombre puede consumir. (Desrosier, 1997).

En los alimentos, los lípidos pueden estar en forma "visible", separados de su fuente original animal o vegetal, como por ejemplo la mantequilla, tocino, grasas de repostería, o aceites de ensalada, o bien ser constituyentes de alimentos básicos como la leche, queso o carne. Las principales fuentes de aceite vegetal son las semillas de soya, algodón y cacahuete y los frutos oleaginosos de la palma, el coco y la oliva.

Los lípidos en la dieta juegan un importante papel en la nutrición como:

- Suministro de ácidos grasos esenciales.
- Aportan calorías (9 kcal/g) , a diferencia de las aproximadamente 4 kcal/g que se obtienen de los hidratos de carbono y de las proteínas.
- Son transportadores de vitaminas liposolubles como la A, D, E y K.
- Dan palatabilidad a los alimentos.
- Sensación de saciedad tras la comida.

Pero durante décadas han sido el centro de una gran controversia sobre problemas de toxicidad o sobre su papel en el origen de ciertas enfermedades. (Álvarez, 2002; Fennema, 1993; Ziller, 1996).

3.3 GRASAS Y ACEITES.

Las grasas y los aceites son predominantemente triésteres de ácidos grasos y glicerol, llamados comúnmente triglicéridos, que se diferencian entre sí en mayor o menor medida, por su composición en ácidos grasos. Son insolubles en agua y solubles en la mayoría de los solventes. Son menos densos que el agua y a temperatura ambiente varían de consistencia desde líquidos a sólidos. Cuando aparecen sólidos, se les denomina "grasas"; y cuando son líquidos, "aceites". Además de triglicéridos, también incluye monoglicéridos, diglicéridos, fosfátidos, cerebrósidos, esteroides, terpenos, alcoholes grasos, vitaminas liposolubles, y otras sustancias. (Belitz, 1997; Ziller, 1996)

3.3.1 TRIGLICÉRIDOS.

Se componen principalmente de glicerol y ácidos grasos. Cuando todos los ácidos grasos en un triglicérido son idénticos, se le denomina "simple". Sin embargo, los triglicéridos más comunes son los "compuestos", en los que dos o tres residuos diferentes de ácidos grasos están presentes en la molécula. Las propiedades físicas y químicas de las grasas dependen en gran medida de los tipos y proporciones de los ácidos grasos que los constituyen, así como del modo en que se distribuyen en el esqueleto del glicerol. Los ácidos grasos predominantes pueden ser cadenas alifáticas saturadas o no, con un número par de átomos de carbono y un radical carboxilo (Figura 3); y solo un número reducido de estos están presentes en los aceites comestibles ya que tienen cantidades pequeñas de ácidos grasos de cadena ramificada, cíclica o con un número impar de átomos de carbono. (Ziller, 1996)

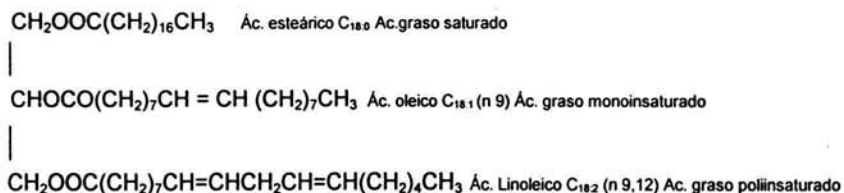


Figura 3. Ejemplo de un triglicérido.

3.3.2 ACIDOS GRASOS.

Los ácidos grasos presentes en los aceites y grasas comestibles se clasifican por su grado de saturación en:

3.3.2.1 ACIDOS GRASOS SATURADOS.

Contienen solamente enlaces carbono-carbono simples, que se denominan "saturados"; y son los menos reactivos químicamente.

3.3.2.2 ACIDOS GRASOS INSATURADOS.

Si un ácido graso contiene uno o más enlaces dobles carbono-carbono se le denomina "insaturado". Cuando se presenta un único doble enlace se le denomina "monoinsaturado"; si contiene más de uno se le llama "poliinsaturado". Los ácidos grasos insaturados son más reactivos químicamente que los saturados. Esta reactividad aumenta con el número de dobles enlaces del ácido graso. (Ziller, 1996)

3.3.2.3 ISOMERIA DE LOS ACIDOS GRASOS INSATURADOS.

La configuración Geométrica del doble enlace se designa generalmente con los prefijos *cis* (del latín, en el mismo lado) y *trans* (del latín, enfrente) (Figura 4), que indican si los grupos alquil están en el mismo o en distinto lado de la molécula.

En la naturaleza de las grasas y aceites alimentarios, generalmente los compuestos se presentan en la configuración *cis*, aunque la forma *trans* es la termodinámicamente más favorable, la mayoría de los someros *trans* proceden de la hidrogenación parcial de las grasas. (Fennema, 1993; Ziller, 1996)



Figura 4. Ejemplo de isomería geométrica.

3.3.2.4 MONOGLICERIDOS Y DIGLICERIDOS.

Son mono y diésteres de ácidos grasos y glicerol. Ambos son importantes agentes emulgentes. Los monoglicéridos se forman en el tracto intestinal como resultado de la digestión normal de los triglicéridos. (Álvarez, 2002).

3.3.3 OTROS COMPUESTOS LIPOFILICOS

3.3.3.1 ACIDOS GRASOS LIBRES.

Son los ácidos grasos no esterificados presentes en una grasa. (Álvarez, 2002)

3.3.3.2 FOSFÁTIDOS.

Son polialcoholes combinados con ácidos grasos, ácido fosfórico y un compuesto nitrogenado. La lecitina, el cual es un importante emulsificante en alimentos y la cefalina son los fosfátidos más comunes de las grasas comestibles. (Álvarez, 2002; Desrosier, 1997).

3.3.3.3 ESTEROLES.

También denominados alcoholes esteroideos, constituyen una familia de sustancia que contienen un núcleo común esteroideo y un radical alcohol. El colesterol es el esteroide mayoritario en las grasas animales pero se encuentran en cantidades traza en los aceites vegetales. Los esteroles de los aceites vegetales se denominan colectivamente "fitoesteroles". (Álvarez, 2002)

3.3.3.4 TOCOFEROLES.

Son componentes minoritarios pero importantes de la mayoría de las grasas de origen vegetal. Sirven como antioxidantes retardando el enranciamiento y son precursores de la Vitamina E. (Álvarez, 2002)

3.3.3.5 CAROTENOIDES Y CLOROFILAS.

Los carotenoides son sustancias coloreadas presentes naturalmente en grasas y aceites. Su color varía desde el amarillo al rojo intenso. La clorofila es el pigmento verde de las plantas que desempeña un papel esencial en el proceso fotosintético. El nivel de clorofila naturalmente presente en un aceite vegetal puede ser suficiente para darle una coloración verdosa. (Álvarez, 2002)

3.3.4 LÍPIDOS POTENCIALMENTE TOXICOS EN ALIMENTOS.

3.3.4.1 ACIDO ERÚCICO.

El único y más abundante ácido mono-insaturado en el reino vegetal, el cual tiene un gran peso molecular, más que el ácido oleico, es el ácido erúrico, el cual es el principal componente en la larga e importante familia de las crucíferas, y también presente en una gran proporción en los ácidos grasos presentes en las semillas pertenecientes a la familia de las tropaeolacea. Aparte de estas dos familias, no se ha detectado con certeza en la composición grasa de otras semillas. (Hildich, 1956).

Las semillas de oleaginosas de la especie *Brassica*, (semillas de colza y nabo) tienen la presencia de dos componentes tradicionales que las distinguen de la mayoría de este tipo de semillas. Ambos componentes, el *Ácido erúrico* y los *glucosinolatos*, son considerados como factores antinutricionales para los humanos y para los animales. Actualmente la situación ha cambiado y se ha dejado de ver este tipo de aceites como no comestibles, pues con éxito se ha podido alterar químicamente, mediante técnicas

biotecnológicas, para eliminar el contenido de ácido erúxico y glucosinolatos. (Designer, 1994). Para el caso del aceite de colza se ha introducido comercialmente, como 3 tipos de aceite de acuerdo a la calidad de la semilla: HEAR (high-erucic-acid con un contenido mayor o igual a 50%), LEAR (low-erucic acid con un contenido aproximado de 3 al 5%), y Canola o conocida como zero-erucic, donde su contenido de ácido erúxico es menor al 2% y menor a 30 micro moles de glucosinolatos alifáticos por gramo presente en aceites comestibles. Por lo tanto el aceite tipo LEAR y el zero-erucic son los más utilizados principalmente como aceites comestibles, mientras el tipo HEAR es utilizado para aplicaciones no comestibles en la industria química. (Designer, 1994; Johnson, 1989) Las especies que contienen ácido erúxico también presentan cantidades pequeñas de ácido linoléico y de ácido eicosanoico. (Swern, 1982)

En trabajos anteriores con aceite extraído a partir de la almendra de la semilla de *Prunus serotina* (Capulín), el perfil de ácidos grasos del aceite mostró elevadas concentraciones de ácido oleico, linoleico y en menores concentraciones pero sobresaliente el ácido erúxico, que sobrepasa el límite establecido para consumo humano, así que mediante un proceso químico para el aceite es posible disminuir el nivel de este ácido graso para poder utilizarlo con fines comestibles. (Barbosa, 2003; Hilditch, 1956)

3.3.4.2 CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS

El ácido erúxico (cis-13-docosenoico; $C_{22}H_{42}O_2$; $C_{22:1}$ n-9) se notificó por primera vez en las semillas oleaginosas de la mostaza en 1849, y constituye un importante ácido graso vegetal. Este tiene un punto de fusión de $33.5^{\circ}C$ y tiene un índice de yodo de 74.7. Es soluble en éter y alcohol etílico. Como resultado de su isomerización de lugar al ácido Brassidico, trans-13-docosenoico, donde su punto de fusión es de $60^{\circ}C$. Ambos ácidos son productos de la síntesis de una extensión de la cadena de los ácidos oleico y oleádico. (Hildich, 1954)

3.3.4.3. DAÑOS PROVOCADOS POR EL CONSUMO DE ÁCIDO ERÚXICO.

El consumo de estos tipos de aceites por los humanos tiene una larga historia, pero solo hasta los años setenta se empezó a llevar una investigación biológica controlada (Mattson, 1973). Se han observado numerosos efectos histopatológicos en varias especies de animales. (Johnson, 1989). Algunos de los daños, ocasionados por el

consumo de aceites con alto contenido en ácido erúxico que han sido reportados son los siguientes:

- La principal lesión es daño en el miocardio, empezando por depósitos de grasa en el músculo cardíaco. Estos estudios se observaron principalmente en ratas, que por ser un modelo biológico más parecido al hombre se puede esperar que los daños sean similares en el humano, pero no se sabe todavía hasta que extremo aparece esta acción en él. Más adelante aparece necrosis del miocardio con inmigración de linfocitos, eosinófilos, células plasmáticas y macrófagos. Más tarde hay una proliferación de fibroblastos y cicatrización. No se conoce exactamente a qué dosis empieza a ser nocivo, los autores varían de 2% a 4% como aporte de calorías de ácido erúxico, para empezar a observar lesiones, pero cuando se aumenta la dosis aparecen lesiones más graves. La deposición de grasa en el músculo cardíaco va acompañada por disminución del glucógeno, que actúa como sustituto de fuente de energía para el corazón. La acumulación de grasa en el músculo cardíaco se presenta desde el primer día y aumenta la deposición con el paso de los días, llegando a aumentar su contenido de lípidos 3 o 4 veces más que lo normal. El contenido de grasa en el corazón de la rata alcanza su máximo al cabo de una semana de iniciarse la alimentación con contenido de ácido erúxico y después desciende debido a la adaptación de las enzimas que degradan las grasas. (Mattson, 1973; Linder, 1995; Johnson, 1989)
- Cabe mencionar que también se ha observado una disminución del crecimiento en animales como cerdos, ratones, hamsters, patos, pavos y en pollos, donde se ha incluido en su dieta como aporte de calorías alrededor de un 10-20% para observar un efecto mínimo, aceite con contenido de ácido erúxico como el aceite de nabo y colza. (Johnson, 1989)
- Después de la absorción intestinal, el ácido erúxico desaparece rápidamente del hígado y del riñón, pero no del bazo y de los suprarrenales. (Jonson, 1989)
- Se ha observado cirrosis en el hígado, daño en riñón, bazo y suprarrenales, degeneración testicular en ratas y anemia hemolítica en las especies estudiadas. (Johnson, 1989; Mattson, 1973)

- La alimentación basada en aceites parcialmente hidrogenados con contenido de ácido erúxico presenta una menor acumulación de lípidos en el músculo cardíaco. Esto se debe a la disminución del ácido erúxico y a la limitada absorción del ácido behénico, el análogo saturado del ácido erúxico y la presencia de ácidos grasos trans.

El origen de esta deposición de grasa en el organismo muy probablemente se deba a una mayor dificultad de las enzimas para degradar el ácido erúxico en comparación, por ejemplo con el ácido palmítico.

El ácido erúxico desacopla el sistema enzimático responsable de la oxidación de ácidos grasos de cadena larga en la mitocondria y posiblemente a nivel de la acil-CoA-deshidrogenasa. También la triglicérido lipasa es muy poco activa frente al ácido erúxico. Cuando la administración se prolonga mucho tiempo la actividad de las enzimas se recupera.

Se ha observado en ratas que fueron alimentadas casi a lo largo de su vida, muestran daños degenerativos muy graves en el hígado, y una alta incidencia en necrosis de riñones. Se ha atribuido la acumulación de ácido erúxico debido a que su velocidad de conversión es muy lenta a diferencia de otros ácidos grasos.

Si el contenido de ácidos grasos saturados del alimento se eleva manteniendo constante el 5% de ácido erúxico las lesiones del miocardio disminuyen. El ácido erúxico o sus metabolitos se incorporan de preferencia en los fosfolípidos de las células del músculo cardíaco, con ello se altera la formación y la función de la membrana celular, especialmente porque estas células destruyen el ácido erúxico, lo que puede tener consecuencias para la función de la membrana. (Linder, 1995)

3.4 PROCESO GENERAL DE OBTENCION DE UN ACEITE COMESTIBLE.

Los aceites de oleaginosas pueden ser extraídos de semillas, seguido de un proceso de refinación para eliminar la materia indeseable y modificar sus propiedades. A pesar de que las grasas provienen de diversas fuentes (animales y vegetal), en general son procesadas para su refinamiento y estandarización y así poder ser consumidas más fácilmente. Para que un aceite comestible sea considerado de buena calidad no deberá tener olores, ni sabores, ni impurezas indeseables y ser estable a la oxidación. Algunos

estudios indican que la oxidación ocurre con mayor facilidad en la cosecha pero los niveles remanentes de los lípidos oxidados permanecen bajos durante el proceso. El procesamiento de los aceites está diseñado en parte para eliminar o destruir productos de la oxidación o factores como ácidos grasos libres y contaminantes metálicos que puedan iniciar o propiciar reacciones oxidativas. (Álvarez, 2002)

Las grasas vegetales se obtienen extrayendo el aceite con solventes. En este proceso el aceite se extrae de la semilla con hexano que después se separa del aceite y se reutiliza. Las desventajas de éste es que es muy inflamable pero debido a su alta volatilidad no queda resto alguno de hexano en el aceite final. Se pueden buscar disolventes alternativos que presenten mayor seguridad y/o características económicas menores. Los aceites y grasas obtenidos directamente tras la extracción se denominan aceites y grasas "crudos". Contienen aún pequeñas cantidades de compuestos naturales que no son glicéridos que serán eliminados a lo largo de una serie de fases del procesamiento llamado refinación. (Álvarez, 2002)

Los aceites utilizados como alimento, requieren de remover todos los extraños componentes para obtener una calidad adecuada para su aplicación como alimento. Durante la refinación, sustancias que afectan la calidad del aceite son removidas o reducidas en su concentración. Esto incluye a los ácidos grasos libres, los hidratos de carbono, fosfolípidos, las proteínas y sus productos de degradación, el agua, pigmentos, compuestos volátiles, pesticidas, aflatoxinas, metales, productos que favorecen la oxidación y otras impurezas del aceite crudo. (Álvarez, 2002; McWilliams, 1989; Watson, 1987)

Los procesos que se llevan a cabo en la refinación son: 1) desgomado; 2) neutralización; 3) blanqueo y 4) deodorización.

La Hidrogenación del aceite también es considerado como parte del proceso de refinación en algunos casos, pero para el nuestro lo consideramos como un proceso independiente. (Watson, 1987)

3.4.1 DESGOMADO.

El procedimiento para eliminar las gomas, resinas, proteínas y fosfolípidos se denomina: Desgomado. Esta operación se puede realizar por dos sistemas: uno que consiste en flocular el aislamiento de la goma para una recuperación y obtención de un subproducto con valor comercial; y el desgomado por tratamiento generalizado sin

separación específica de la goma. Las grasas crudas que se asume tienen un nivel alto de fosfolípidos como la lecitina, cefalina (1,5 - 2.5%), que son solubles en el aceite solo en su forma anhidra, por la cual pueden precipitar por simple hidratación, la cual se efectúa por agregar del 2-3% de agua y este desgomado se puede mejorar por adición de ácido cítrico o fosfórico de esta manera aplicando una centrifugación se consigue separarlos. Al agregar alguno de estos ácidos, y calentando la mezcla a unos 60-70°C, las gomas son hidratadas y floculadas formando un mucílago que es insoluble en el aceite e inmediatamente son eliminadas por sedimentación o centrifugación.

Durante el proceso es posible la recuperación de lecitina como subproducto, que es un gran emulsificante natural utilizado con importancia en la industria alimentaria. (Ziller, 1996; Watson, 1987; Desrosier, 1997, Álvarez, 2002).

3.4.2 NEUTRALIZACIÓN.

El término neutralización generalmente se aplica a la operación de eliminar los ácidos grasos libres y por tradición esta se realiza con el uso de bases, tales como sosa cáustica (hidróxido de sodio al 12-15%) o lechada de cal. Las grasas crudas siempre tienen un contenido de ácidos grasos libres, el cual representa el grado de acidez de dicho aceite. El aumento de la acidez se debe evitar al máximo posible, ya que un nivel alto de estos causan graves pérdidas en el proceso de refinación. El método más común de la neutralización consiste en el empleo de un álcali de concentración conocida, el cual se mezcla con el aceite que se calienta entre 75 a 95°C y después se deja sedimentar la fase acuosa para posteriormente separar esta fase jabonosa por centrifugación y proceder a lavar el aceite varias veces con agua caliente y someterlo nuevamente a centrifugación intensa. La neutralización alcalina realiza una completa eliminación de los ácidos grasos libres que se transforman en jabones insolubles en el aceite. Del mismo modo se combinan con el álcali otras sustancias ácidas y se eliminan algunas impurezas del aceite por adsorción en el jabón formado en el proceso. Se eliminan también todas las sustancias que se insolubilizan por hidratación. (Álvarez, 2002)

3.4.3 DECOLORACIÓN O BLANQUEADO

El término blanqueado se refiere al proceso de eliminación de sustancias coloreadas para purificar aún más la grasa o aceite. Normalmente se realiza después de la neutralización. Se utiliza para eliminar pigmentos (clorofilas, carotenoides, xantinas y gosipol y antocianinas), así como productos de la autooxidación. residuos de jabones

alcalinos, sustancias mucilaginosas, compuestos azufrados, así como parte del insaponificable. (Belitz, 1997; Ziller, 1996).

Otros materiales colorantes que se encuentran en las grasas crudas pueden ser productos de degradación de los colores naturales o el resultado del procesamiento previo o el inadecuado almacenamiento. El proceso de blanqueo es un proceso físico que consiste en mezclar un material adsorbente (arcillas neutras, arcillas ácidas activadas o carbón activado, siendo este el más efectivo aunque tiene sus inconvenientes porque es caro y retiene una gran cantidad de aceite; por esta razón para lograr mejores resultados a veces se mezclan arcillas neutras con 5-10% de carbón activado) con el aceite y se somete a calentamiento (aproximadamente a 85°C) para mayor actividad del adsorbente. El material adsorbente de colorantes son algunas tierras o arcillas, las cuales se obtienen por activación física o química. (Belitz, 1991; Sélér, 1996)

Después del blanqueo de grasas que contienen ácidos grasos poliinsaturados, es común la degradación de hidroperóxidos formados por la autooxidación, produciendo un aumento en el índice de peróxido y desarrollando aromas indeseables. (Álvarez, 2002; Belitz, 1997)

3.4.4 DEODORIZACIÓN .

La deodorización es un proceso de destilación con vapor y a vacío con el objeto de eliminar componentes traza que proporcionarían olores (aldehídos y cetonas), con bajos umbrales de detección por el gusto y el olfato, procedentes en su mayoría de la oxidación del aceite, o sabores no deseados a los aceites y grasas. Esto es posible gracias a las grandes diferencias de volatilidad entre las sustancias que dan olores y sabores a las grasas, y los triglicéridos. Generalmente la presión de vapor de los compuestos odoríferos es relativamente baja y se requerirían de temperaturas demasiado elevadas si la destilación se llevará a cabo a presión atmosférica; de ahí la necesidad de regular esta operación a una presión reducida (vacío) y la corriente de un gas inerte para abatir la temperatura de destilación y evitar el daño y descomposición de la grasa neutra.

Se realiza al vacío también para evitar la hidrólisis no deseada de la grasa. Normalmente se realiza después del desgomado, de la neutralización y el blanqueado. (Ziller, 1996).

Este tratamiento también da lugar a la destrucción térmica de algunas sustancias no volátiles de aroma desagradable, y los compuestos volátiles resultantes son entonces destilados. (Fennema, 1993)

3.4.5 HIDROGENACIÓN

El proceso de la hidrogenación fue originado en la investigación de Sabatier and Senderens durante 1897-1905, demostrando la factibilidad del efecto de la hidrogenación en compuestos orgánicos insaturados, pero estos experimentos eran utilizados solo en una fase. Un proceso para la hidrogenación en fase líquida para aceites fue patentada por Norman en 1903; la cual a su vez fue utilizada por la firma británica de Joseph Crossfield and Sons utilizándola en escala limitada para la hidrogenación del aceite de ballena en Inglaterra en 1906. Posteriormente fue utilizado en Estados Unidos, debido a la alta producción de aceite de algodón, que con el desarrollo de esta técnica fue posible la transformación a una grasa plástica comestible, muy demandada por la tradición y costumbre Norteamericana. En 1909 Procter and Gamble Company patentaron la técnica de hidrogenación de aceite de algodón y en su lugar la dieron a conocer como Shortening (margarina), o Crisco, nombre comercial, que aún hoy en día los norteamericanos se refieren a la manteca; el cual fue lanzando al mercado en 1911.

Es difícil remplazar la importancia del proceso de hidrogenación en la tecnología de aceites y grasas. Este es utilizado en gran escala en el jabón, aceites industriales, en la industria de aceites y grasas comestibles; para convertir aceites líquidos a grasas más duras o plásticas.

Esta técnica ha tenido un gran efecto a nivel mundial en la economía de la agricultura, porque por este medio ha sido posible utilizar aceites vegetales altamente insaturados para obtener subproductos de semillas para la alimentación animal. (Swern, 1982)

La hidrogenación es la adición de hidrógeno a los enlaces etilénicos o dobles enlaces de las cadenas de los ácidos grasos de los triacilglicérols por la reacción de hidrógeno en la presencia de un metal que actúa como catalizador.



Figura 5. Reacción de hidrogenación.

Los objetivos fundamentales de la hidrogenación son tres:

1. Permite la conversión de los aceites líquidos en grasas semisólidas o plásticas más adecuadas para aplicaciones específicas, como en los shortenings. (Ver. Glosario)
2. Reducir el grado de insaturación y por lo tanto, la velocidad de oxidación aumentando la estabilidad.
3. Modificar las características físicas especialmente el comportamiento de fusión y cristalización de un aceite haciéndolo más útil para ciertas aplicaciones específicas. En este caso es especialmente el grado de isomerización *cis-trans* producido durante la hidrogenación (Fennema, 1993, Wong, 1995)

La composición y las características físicas y químicas de los productos hidrogenados, varía de acuerdo a las posiciones de los dobles enlaces, además de la isomerización que acompaña la reacción y es altamente dependiente de las condiciones de hidrogenación así como de la intensidad con que se presentan las reacciones que dan lugar a las transformaciones. (Badui, 1993 ; Swern, 1982)

⌘ Mecanismo

La hidrogenación puede llevarse a cabo siempre y cuando todos los reactivos estén juntos – el aceite insaturado, un líquido, el catalizador(que es sólido) y el gas hidrógeno.

Las tres fases del sistema –gas, líquido y sólido- son puestos juntos en un reactor de calentamiento y agitación con disponibilidad de hidrógeno. El hidrógeno debe ser disuelto en la fase líquido-sólido antes de que la reacción ocurra ya que este tiene que estar disponible para la reacción. El hidrógeno debe estar difuso en el líquido y pasar a la superficie del catalizador. En general, por lo menos uno de los reactivos debe ser químicamente adsorbido en la superficie del catalizador. Como sea, la reacción entre los hidrocarburos insaturados y el hidrógeno, interviene la superficie de intermediarios organometálicos. (Swern, 1982)

Los aspectos químicos de la hidrogenación están lejos de conocerse aún con precisión; pero pueden estar implicadas las siguientes etapas.

1. El doble enlace se absorbe, mediante interacciones de tipo π , en la superficie del catalizador metálico.
2. Un átomo de hidrógeno de la superficie metálica se transfiere a uno de los carbonos del doble enlace, y el otro carbono se une, por un enlace σ , a la superficie de metal.
3. Se transfiere un segundo hidrógeno liberando el producto saturado.

La primera etapa de la reacción es reversible, con el átomo de hidrógeno retenido al metal y "desorbiéndose" la molécula. La isomerización *cis-trans* tiene lugar usualmente con una rotación del enlace C-C. También puede cambiar la posición del doble enlace si la reacción inversa tiene lugar en el grupo metileno vecino del doble enlace. (Figura 5 y 6) (Wong, 1995)

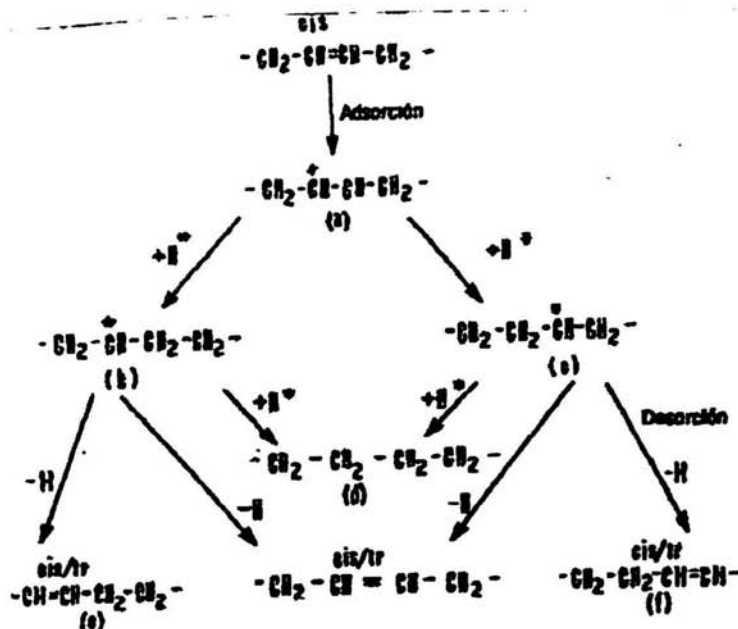


Figura 6. Reacciones de semi-hidrogenación. El asterisco indica la unión con el metal.

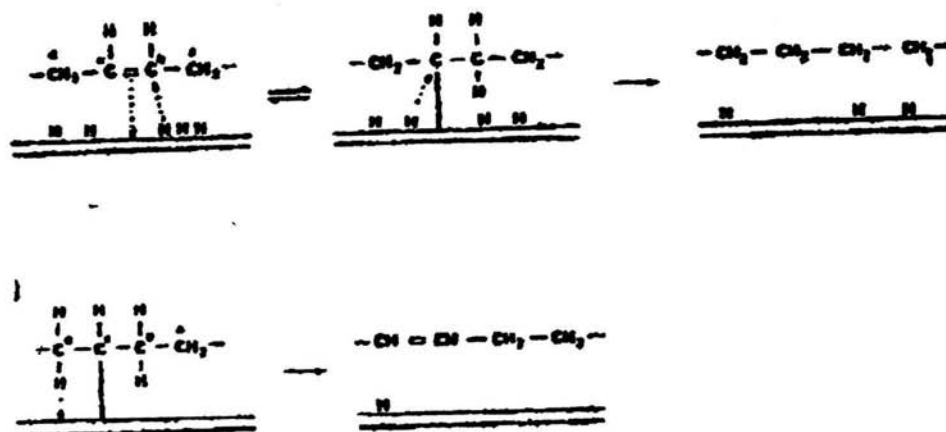


Figura 7. Mecanismo de hidrogenación. (Wong, 1995)

El aceite empleado para la hidrogenación debe ser refinado y con un mínimo de materiales extraños; de preferencia se desea que el contenido de agua no sea mayor a 0.05% ya que si es superior en las condiciones de operación puede inducir la hidrólisis de los triacilglicéridos y la liberación de ácidos grasos que, además de envenenar el catalizador, se concentran en el espacio superior del reactor e impiden la circulación del hidrógeno; los fosfolípidos, los metales, los jabones, el fósforo, CO_2 , amoníaco y azufre llegan a bloquear la superficie activa del catalizador y reducen su eficiencia. La oxidación de los lípidos insaturados, produce hidroperóxidos que se descomponen fácilmente en sustancias que se absorben sobre el metal, de manera que reducen la eficiencia del proceso.

También se requiere un control estricto sobre la pureza y la calidad del hidrógeno ya que es preciso que esté bien seco y libre de gases indeseables.

La hidrogenación parcial puede dar lugar a la formación de una mezcla relativamente compleja de productos de reacción, dependiendo de los dobles enlaces que se hayan hidrogenado, del tipo y grado de isomerización y de las velocidades relativas de las distintas reacciones. (Fennema, 1993)

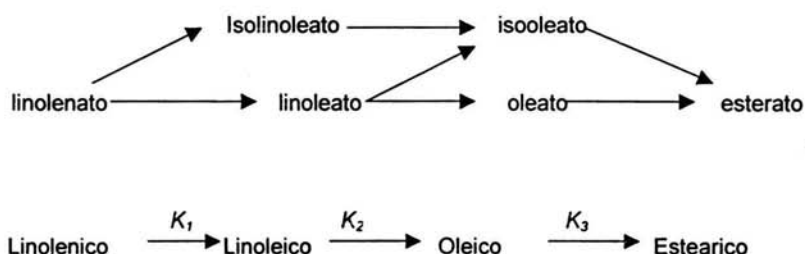


Figura 8 . Ejemplo de posibles reacciones que puede experimentar el linoleato durante la hidrogenación.

El término " selectividad" se refiere a la velocidad de hidrogenación relativa de los ácidos grasos más insaturados con respecto a los menos insaturados.

La selectividad se favorece cuando: a) la concentración de hidrógeno se mantiene baja en la superficie del catalizador; b) se utilizan temperaturas de 160 a 200°C; c) se emplea una mayor cantidad de catalizador; d) se agita lentamente; e) la presión es baja entre 0.5 y 1 atmósferas, y f) se emplean catalizadores muy específicos. (Badui, 1993; Belitz, 1997; Fennema, 1993)

Los 4 principales parámetros de reacción en la hidrogenación son: la temperatura, la presión, agitación y la concentración del catalizador. Por supuesto, el tipo de aceite o el tipo de catalizador, también determina el producto obtenido por la hidrogenación.

⌘ Temperatura: A temperaturas altas se incrementa la solubilidad del hidrógeno en el aceite, la formación de enlaces *trans* aumenta linealmente, aumenta la capacidad de reacción en la superficie del catalizador.

- ⌘ Presión: A bajas presiones el hidrógeno disuelto en el aceite no cubre completamente la superficie del catalizador, lo que permite saturar los dobles enlaces.
- ⌘ Agitación: Ayuda a disolver el hidrógeno, a conseguir una mezcla uniforme entre el catalizador y el aceite, y a disipar el calor de la reacción.
- ⌘ Catalizador: La consideración económica es la que dictamina el uso de un catalizador, y se diferencian en el grado de selectividad que ofrecen. El níquel es distribuido en varios soportes, es el metal utilizado casi invariablemente a nivel comercial para hidrogenar grasas. Sin embargo, también se dispone de otros catalizadores como el cobre, diversas combinaciones de cobre y cromo ; entre estos destacan los del grupo platino cuya efectividad, en orden decreciente es: paladio, rodio y platino; sin embargo no suelen usarse comercialmente porque son muy costosos y sensibles al envenenamiento, en particular el paladio es considerablemente más eficaz (en función de la cantidad de catalizador requerido) que el níquel, aunque produce una gran cantidad de isómeros posicionales y geométricos, favorece la hidrogenación selectiva. La mayoría de los catalizadores comerciales, tienden a aumentar el contenido de ácido esteárico y de ácidos grasos trans. (FAO, 1997; Fennema, 1993; Hernández, 1998; Swern, 1982).

Durante la hidrogenación los dobles enlaces presentes en el aceite, pueden ser saturados o isomerizados. En el caso de ser isomerizados pueden ocurrir dos tipos de isómeros : posicionales y/o geométricos, ambos se forman en la superficie del catalizador.

Los cambios en el grado de saturación y en la configuración de isómeros del ácido graso producidos en la hidrogenación tienen un profundo efecto no sólo en el aumento de la estabilidad sino también en el comportamiento de fusión, indirectamente en el hábito cristalino de los triglicéridos.

Cabe recordar que los ácidos grasos *trans* tienen puntos de fusión mayores que los *cis*. El avance de la hidrogenación se controla fácilmente, midiendo el cambio del índice de refracción, que esta relacionado con el grado de saturación del aceite. Es muy importante controlarla ya que la hidrogenación excesiva provoca la formación de grasas duras y quebradizas compuestas principalmente por triacilglicéridos saturados. Se

controla la intensidad del proceso de hidrogenación para conseguir la estabilidad y/o propiedades físicas requeridos en el producto final. (Badui, 1993; Fennema, 1993, Swern, 1982; Voclavick, 1998; Wong, 1995)

3. 5 ACIDOS GRASOS TRANS

En la hidrogenación industrial de los aceites, se produce una cierta isomerización de los dobles enlaces, pueden cambiar de configuración *cis* a *trans* (isomerización geométrica) o cambiar de posición dentro de la cadena de átomos de carbono (isomerización posicional).

Los ácidos grasos en *trans* son ácidos grasos insaturados que tiene al menos un doble enlace en configuración *trans*. Los ácidos grasos en *trans* más frecuente son los monoinsaturados, pero también pueden encontrarse isómeros diinsaturados con configuraciones *cis*, *trans* o *trans*, *cis*. En los ácidos grasos monoinsaturados en *trans* procedentes de aceites parcialmente hidrogenados, el doble enlace tiende a distribuirse normalmente entre las posiciones 9 y 11, con una gama de 5 a 15. (Fennema, 1993; FAO, 1997).

3.5.1 PRESENCIA EN LOS ALIMENTOS

Los ácidos grasos *trans* se encuentran en las margarinas y grasas de repostería (shortenings) que contienen aceites de pescado o vegetales parcialmente hidrogenados, grasas comerciales para freír. Otras fuentes son la carne de res de los rumiantes por un proceso de hidrogenación que se da en el rumen, la mantequilla y las grasas lácteas. Los ácidos grasos en *trans* representan aproximadamente el 5% del total de los ácidos grasos en productos vacunos y ovinos, mientras que en las grasas hidrogenadas comercialmente pueden representar más del 50%.

De estos el 50% del consumo de ácidos grasos *trans* provienen de alimentos animales; el 50% restante proviene de aceites vegetales hidrogenados.

El consumo promedio de ácidos grasos *trans* se estima en 7 a 8% del consumo de grasas. (Fennema, 1995; FAO, 1997; Mahhan, 1993)

3.5.2 ÁCIDOS GRASOS *TRANS* Y ENFERMEDADES CRÓNICAS

Aunque se sabe que los ácidos grasos *trans* no son equivalentes biológicamente a sus isómeros *cis*, falta un conocimiento preciso con respecto a su acción fisiológica y metabolismo y a sus efectos sobre la salud a largo plazo.

Estudios clínicos y epidemiológicos sugieren que los mayores consumos de ácidos grasos *trans* se relacionan con un aumento en el riesgo de cardiopatía coronaria, cáncer y otros padecimientos crónicos.

Está demostrado que los ácidos grasos *trans* inhiben la desaturación y elongación del ácido linoleico y el linolénico alfa para formar ácidos grasos esenciales de cadena larga.

Los ácidos grasos *trans*:

- ✗ Se considera un aumento de la lipoproteína Lp (a), el cual es un factor independiente del riesgo de las enfermedades cardiovasculares.
- ✗ Los ácidos grasos isoméricos de los aceites vegetales parcialmente hidrogenados parecen generar hipercolesterolemia.
- ✗ Elevan los niveles de las LDL (Lipoproteínas de baja densidad), y pueden reducir los de las HDL (Lipoproteínas de alta densidad) aumentando el riesgo de arteroesclerosis y de enfermedades coronarias del corazón.

Se recomienda a los productores de alimentos que se reduzcan en lo posible la isomerización de los ácidos grasos. Es inaceptable que se utilicen mensajes publicitarios como "bajo en saturados" cuando un producto es rico en isómeros en *trans* (insaturados). Los gobiernos deben vigilar el consumo de los isómeros de los ácidos grasos y regular las declaraciones de propiedades de los productos que los contienen. (FAO, 1997; Mahhan, 1993)

3.6 PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

Los métodos modernos de procesamiento industrial y la preocupación de los aspectos de salud y seguridad de los nuevos aceites y productos grasos que se utilizan en la dieta han conducido al desarrollo de técnicas y procedimientos analíticos para obtener información detallada acerca de su naturaleza, carácter y composición.

Los nuevos procedimientos también son de utilidad para identificar el origen biológico de aceites y grasas y la presencia de grasas extrañas, con la ayuda de la cromatografía de gases se pueden realizar todas estas identificaciones. (Barbosa, 2003)

3.6.1 CROMATOGRFÍA DE GASES.

La composición de ácidos grasos se ha determinado por cromatografía de gases, resonancia magnética, UV, espectroscopia Infrarroja y análisis térmico gravimétrico. La introducción comercial de la cromatografía de gases hizo posible la determinación de los ácidos grasos en los aceites y las grasas tras efectuar la conversión de los ésteres de triglicéridos metílicos que son más volátiles. En la actualidad, gracias a las fases estacionarias novedosas, al avanzado equipo de cromatografía de gases y al uso de columnas capilares que tienen gran poder de resolución, se conoce con detalle la composición isomérica, geométrica y posicional de los triglicéridos en los ácidos grasos. Sin embargo con fines más generales se pueden utilizar procedimientos más sencillos de cromatografía de gases que se basan en columnas no tan específicas y un detector de ionización de flama que permiten obtener perfiles de ácidos grasos con suficiente detalle. (Barbosa, 2003)

Un soluto gaseoso (o el vapor de un líquido volátil) es transportado por una fase móvil gaseosa. La fase estacionaria suele ser un líquido no volátil que recubre el interior de la columna o un soporte sólido de grano fino. Esta forma más común de cromatografía de gases se llama cromatografía de gas-líquido.

Una muestra de líquido volátil se inyecta a través de un septo de goma (un disco delgado) en un puerto volátil de inyección caliente, recubierto de vidrio o metal, donde se vaporiza la muestra. Las muestras gaseosas pueden inyectarse con una jeringa de cierre hermético o a través de una válvula de muestreo de gas. La muestra es arrastrada rápidamente hacia la columna por un gas portador inerte (que suele ser He, N₂ o H₂) que actúa como fase móvil. Después de pasar por la columna que contiene la fase estacionaria, los solutos separados fluyen por un detector, cuya respuesta se visualiza en un registrador o una computadora. No es necesario que la temperatura de la columna sea mayor que el punto de ebullición de todos los solutos. Sólo debe de ser lo bastante elevada para que cada soluto tenga suficiente presión de vapor a fin de ser eluido en un tiempo razonable. El detector se mantiene a mayor temperatura que la columna, de modo que en ésta todos los solutos están en fase gaseosa. Los solutos que salen del cromatógrafo de gases pueden colectarse para su identificación o enviarse directamente a

un espectrómetro de infrarrojo o de masa para el análisis inmediato de cada pico cromatográfico. (Álvarez, 2002; Barbosa, 2003)

3.7 PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE GRASAS Y ACEITES.

Los parámetros físicos y químicos son muy utilizados para poder caracterizar y detectar una posible adulteración. También para identificar los cambios químicos y físicos inducidos por procesos a los que son sometidos como el refinamiento de las grasas y aceites.

3.7.1 DENSIDAD.

La densidad relativa de un aceite (20°C) se define como el cociente entre la masa aparente, que se determina mediante pesada en el aire, de un volumen dado de la grasa a una temperatura ($t^{\circ}\text{C}$) y la del mismo volumen de agua a 20°C; la densidad aparente a una temperatura de $t^{\circ}\text{C}$ es la masa aparente en gramos, determinada mediante una pesada en el aire de 1 ml de grasa a la temperatura t . La densidad de un aceite siempre debe determinarse a una temperatura por lo menos 10°C por encima de su punto de fusión, pero preferiblemente por debajo de 65°C. El valor de la densidad se utiliza principalmente para calcular el peso del aceite contenido en grandes depósitos fijos. El volumen del depósito se puede determinar fácilmente mediante calibrado así como la temperatura. La medida cuidadosa de la densidad del aceite a una temperatura t puede utilizarse, por tanto, para calcular su peso. La gravedad específica de aceites y ceras varía de 0.88 a 0.99 la determinación generalmente se establece con un hidrómetro, balanza hidrostrática o un picnómetro.

La densidad expresa la relación masa del lípido entre la masa del agua. Indica una relación directa con el estado de insaturación e inversa con el peso molecular. Es decir, la densidad de ácidos grasos y glicéridos es mayor, cuanto menor sea su peso molecular y mayor sea su insaturación. (Álvarez, 2002; Ruiz, 2000)

3.7.2 ÍNDICE DE REFRACCIÓN

El índice de refracción de una muestra es un valor que relaciona el ángulo de incidencia de un rayo luminoso sobre una muestra con el ángulo de refracción. Mide el cambio de dirección que se produce cuando un rayo de luz pasa a través de la sustancia

problema. Constituye un medio valioso para comprobar la calidad de aceites y grasas; útil para procesos de identificación, determinar pureza y además para observar el progreso de reacciones como la hidrogenación catalítica y la isomerización. Es una característica importante, debido a la facilidad y rapidez con la que puede ser determinada con precisión, la pequeña cantidad de muestra que se necesita, y la relación que guarda con la estructura de la sustancia.

El índice de refracción varía con la longitud de onda de rayo de luz refractado y con la temperatura; se indica con la notación n^t para $t^{\circ}\text{C}$.

La relación entre el índice de refracción y la estructura de los ácidos grasos y de glicéridos puede ser generalizado de la siguiente manera:

- ✂ El índice de refracción de las grasas y ácidos grasos aumentan con el incremento del largo de la cadena hidrocarbonada.
- ✂ Los índices de refracción de grasas y ácidos grasos aumentan con el número de dobles enlaces y con el incremento en la conjugación.
- ✂ Los índices de refracción de glicéridos simples son considerablemente mayores que aquellos que presentan los ácidos grasos correspondientes.
- ✂ Los índices de refracción de glicéridos mixtos son, en general, cercanos a aquellos que presentan sus correspondientes mezclas o glicéridos simples.
- ✂ Los índices de refracción de los monoglicéridos son considerablemente mayores que aquellos que presentan los correspondientes triglicéridos simples. (Álvarez, 2002; Less, 1992; Ruiz, 2000)

3.7.3 PUNTO DE FUSIÓN

Es una propiedad que se considera de importancia primaria en los aceites y grasas. Los aceites son exactamente una mezcla de triglicéridos los cuales su punto de fusión se encuentra por debajo de la temperatura ambiente, y la grasa tiene un punto de fusión cercano a la temperatura ambiente. Los ácidos grasos puros, ésteres y glicéridos presenta polimorfismo, es decir, son capaces de solidificar en más de una forma cristalina poseyendo cada forma un punto de fusión y densidades distintos.

Los aceites y grasas naturales son mezclas de varios glicéridos, los cuales no tienen un punto de fusión definido, pero si tienen un rango de temperatura a la cual se

fusionan todos los glicéridos; es decir, que la estructura es una característica importante que influye directamente en el punto de fusión. Los puntos de fusión de los ácidos grasos incrementan con el aumento de la longitud de la cadena y disminuyen cuando los ácidos grasos llegan a ser más insaturados. (Álvarez, 2002)

3.7.4 INDICE DE YODO

Se define como el peso de yodo (en gramos) absorbido por 100 gramos de grasa o aceite bajo condiciones estándar.

Los glicéridos de los ácidos grasos no saturados presentes se unen con una cantidad de halógeno y el valor de yodo es una medida del grado de insaturación. El índice de yodo representa el grado de insaturación real solo cuando los doble enlaces no se hallan conjugados y la estructura del ácido graso no impida la entrada del halógeno. En la tabla 1 se indica una clasificación para grasas y aceites algunos de los cuales tienen la propiedad de formar una película fuerte y sólida cuando se desecan en el aire. Tales aceites se conocen como aceites secantes, utilizándose en la elaboración de pinturas y barnices; contienen un gran número de ácidos grasos no saturados. Los aceites clasificados como no secantes, ni se secan, ni forman películas duras. Finalmente la industria admite un tercer grupo, el de los aceites semisecantes, que forman películas con gran lentitud. Las grasas naturales menos insaturados con valores de yodo bajos son sólidas a temperatura ambiente y por el contrario los aceites que están más insaturados son líquidos indicando una relación con el punto de fusión. A medida que aumenta el grado de insaturación, es más probable que la grasa o el aceite sufra enranciamiento por oxidación. (Álvarez, 2002; Ruiz, 2000)

Tabla 1. Clasificación de grasas y aceites según su Índice de Yodo.

Grupo*	Ejemplo	Índice de Yodo
Ceras	-	< 30
Grasas Animales	Mantequilla, Manteca de cerdo	30-70
Aceites No Secantes	Aceite de Oliva, Cacahuete	80-110
Aceites Semisecantes	Aceite de semilla de Algodón, Soya	80-140
Aceites Secantes	Aceite de Linaza, Girasol	125-200

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

3.8 ESTUDIO TOXICOLÓGICO *IN VIVO*

Se considera como tóxica toda la acción fisiológica perjudicial al organismo. De acuerdo a la Ley General de Salud, se denomina tóxico al agente químico que, integrado en el organismo altera procesos bioquímicos fundamentales.

De este modo tendremos sustancias altamente tóxicas que producirán efectos nocivos a bajas dosis y sustancias débilmente tóxicas que acarrearán efectos nocivos sólo si se utilizan o administran en dosis elevadas.

Por lo tanto, la toxicidad de cualquier sustancia, debe considerarse siempre en relación con la dosis, no hay grupo de sustancias tóxicas y otro de sustancias no tóxicas, sino únicamente diferencias en el grado de toxicidad.

Los conceptos como:

- ✗ Dosis, es decir, de cantidad de sustancia absorbida,
- ✗ Vías de administración (ingestión, inyección, etc.)
- ✗ Frecuencia de administración (administración única o repetida),
- ✗ Grado de toxicidad,
- ✗ Tiempo necesario para que aparezcan los efectos, son indispensables para determinar el nivel de toxicidad de un producto.

Actualmente las exigencias de seguridad obligan, en todos los campos, que se evalúen los niveles de riesgo que puede presentar un determinado producto para el hombre y para el medio ambiente. (Cheftel, 1989; Derache, 1990; Ley general de salud, 1994)

3.8.1 VARIABLES GENERALES

Es necesario disponer del máximo de datos que den información sobre las características fisicoquímicas de la sustancia estudiada. Estos datos:

- ✗ Permiten definir las condiciones de manipulación y almacenamiento de dicha sustancia,
- ✗ ciertos modelos experimentales especialmente en relación a la vía o al modo de administración,
- ✗ contribuyen a aportar una explicación para la aparición de algunos fenómenos tóxicos
- ✗ y comprobar que la sustancia estudiada tenga siempre las mismas características.

3.8.1.1 Elección del modelo biológico.

A pesar de que existen especies que presentan similitudes con el hombre, ninguna de ellas permite una extrapolación directa de los efectos encontrados en el animal al caso humano. Dependiendo del tipo de efecto toxicológico estudiado tendremos que el ratón, la rata, el conejo, el perro y el mono u otras especies serán, cada una en un caso determinado, la que más se acerquen a la especie humana.

La elección de una especie depende de los siguiente elementos: modelos biológicos más adecuados (toxicología comparativa), la disponibilidad en un determinado momento, la facilidad de manipulación del animal, las condiciones de manutención que requieren, un período de crecimiento corto, etc. De este modo para los estudios de administración oral, cutánea o por inhalación, los animales preferidos son los roedores, especialmente las ratas y el ratón. (Derache, 1990)

3.8.1.2 Elección de la vía de administración

La mayoría de los estudios realizados dentro del campo de la seguridad en la alimentación eligen la vía oral. En este caso, el producto puede administrarse con ayuda de una sonda esofágica o estomacal, mezclando el tóxico en la comida o en el agua de bebida de los animales. El primer método es el mas utilizado para los estudios cortos, el segundo para los estudios de largos períodos. El estudio de toxicidad aguda necesita utilizar fuertes dosis de sustancias, obteniendo así intoxicaciones en animales; además está autorizada con ciertas reservas, la extrapolación al hombre en caso de absorción masiva voluntaria o accidental. Por lo general los tóxicos deben administrarse por la misma vía por la cual los seres humanos quedarían expuestos. Cuando se ha de administrar un sustancia química por tal modo debe darse por alimentación forzada. Usualmente se requiere un medio portador para disolver o suspender el tóxico a fin de facilitar su administración. Aún cuando el tóxico sea líquido, puede necesitar un diluyente. El medio *per se* debe tener poco o ningún efecto de toxicidad, y no debe reaccionar con el tóxico. Los medios portadores (vehículos) comunes son disolventes como agua, solución salina, gomas vegetales y derivados de celulosa. (Derache, 1990; Lu, 1995)

3.8.1.3 Duración del tratamiento

En función de un cierto número de criterios los efectos esperados pueden aparecer rápidamente o después de un período de latencia. Depende de la especie animal elegida, y de su longevidad. Por ello la duración de estos estudios es muy variable.

Los estudios toxicológicos de acuerdo al tiempo de interacción del agente tóxico con el organismo de prueba se dividen en tres categorías. (Derache, 1990)

- ✗ **Estudios de toxicidad aguda**, los cuales implican una sola administración de la sustancia química bajo el control de una prueba o varias administraciones por un periodo de 24 horas.
- ✗ **Estudio de toxicidad a corto plazo (subagudos o subcrónicos)**. En los cuales intervienen administraciones repetidas, sobre una base diaria o de 5 veces por semana en un periodo de alrededor del 10% de la esperanza de vida del organismo usado, es decir, de 14 a 28 días en ratones.
- ✗ **Estudios de toxicidad a largo plazo (crónicos)**, que implica administraciones repetidas en un periodo de toda la vida de los animales de prueba o cuando menos en una fracción importante de ella por ejemplo 18 meses en ratones.

3.9 TOXICIDAD AGUDA

La evaluación de la toxicidad aguda se efectúa administrando la sustancia o las sustancias problema una sola vez, con el fin de establecer, la dosis que provoca la muerte del 50% de los animales de la experiencia o causa un efecto no deseado.

La toxicidad aguda de una sustancia se expresa por la cantidad en mg/kg necesaria para matar el 50% de los animales de estudio, lo que se acostumbra denominar "DL₅₀" (Dosis Letal Media). (Tabla 2)

Tabla 2. Clasificación de productos tóxicos (por vía oral).

Categoría	DL₅₀ (dosis única) en ratón
Supertóxico	5 mg/ kg o menos
Extremadamente tóxico	5-50 mg/kg
Altamente tóxico	50-500 mg/kg
Moderadamente tóxico	0.5-5 g/kg
Ligeramente tóxico	5-15 g/ kg
Prácticamente no tóxico	> 15 g/kg

El estudio de la toxicidad aguda permite:

- ✗ Calcular una dosis o concentración letal 50, que es por definición la expresión estadística de la dosis o de la concentración única de una sustancia.

- ✂ Definir la naturaleza de los efectos tóxicos observados, estableciendo una relación directa entre su intensidad y la dosis o concentración administrada.
- ✂ Prever, o como mínimo tener información, sobre los riesgos a los que se expone el hombre después de una administración o exposición a dosis especialmente elevada (accidente, intento de suicidio).
- ✂ Y finalmente ofrecer recomendaciones sobre cómo llevar a cabo los estudios toxicológicos de más larga duración.

Se debe realizar sobre grupos homogéneos de animales que reciben la sustancia a estudiar en concentraciones crecientes, de modo que podamos calcular por una fórmula matemática la dosis que provoca la muerte del 50% de los animales. Este valor dosis o concentración letal 50 (DL_{50}), calculado por un procedimiento estadístico debe acompañarse siempre por unos límites de confianza, indicando la estimación del error en el valor obtenido. La vía de administración preferencial es la oral. La vía percutánea (aplicación sobre la piel) y la vía respiratoria (inhalación) pueden también utilizarse. La duración del período de observación de los animales, puede durar de 24 a 48 horas hasta 14 días. Las especies con las que se realizan los estudios de toxicología aguda son el ratón, la rata y ocasionalmente el conejo.

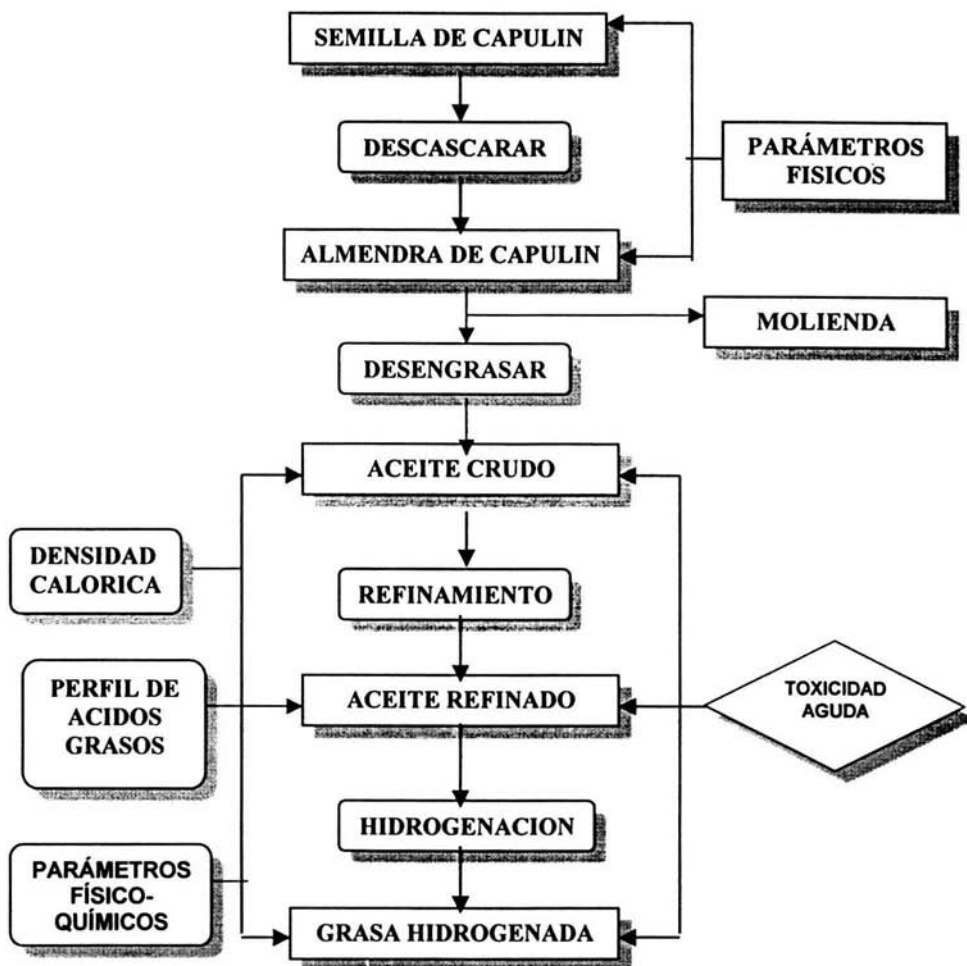
Durante el ensayo de toxicidad aguda anotamos:

- ✂ Los síntomas de intoxicación
- ✂ La mortalidad
- ✂ Las posibles lesiones de los órganos mediante un examen macroscópico realizando una necropsia de los animales que no sobrevivieron durante el período de observación y de los animales supervivientes al final del período.

Los ensayos de toxicidad aguda aportan mucha información, especialmente al observador que sepa identificar los síntomas de intoxicación. Pero estos ensayos tienen limitaciones. No es aconsejable dar excesiva importancia al cálculo de la DL_{50} , con el fin de observar un valor de extrema precisión. Es una variable aleatoria que puede calcularse sin necesidad de sacrificar un número excesivo de

animales, conservando así una mínima ética científica. Por otro lado, los resultados obtenidos (efectos tóxicos) no indican los posibles efectos que se obtendrían después de una administración reiterada de la sustancia a estudiar. (Cheftel, 1989; Derache, 1990; EPA, 1996; Lu, 1995)

FIGURA 9. DIAGRAMA GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN.



4. METODOLOGÍA.

A continuación se presenta la descripción de cada bloque del diagrama de trabajo, destacando los puntos más relevantes.

4.1 ORIGEN DE LA SEMILLA

Las semillas de capulín pertenecen al pueblo de Azayanca, la compra se realizó en Huamantla, municipio de Tlaxcala. La extracción de las semillas se realizó mediante lavados con agua para eliminar la pulpa y se secaron al sol.

4.2 LIMPIEZA Y SELECCIÓN DE LA SEMILLA.

Contando con suficiente semilla de capulín, se procedió a seleccionar la semilla para eliminar cualquier material extraño, así como aquellas semillas dañadas física, química o biológicamente. Debido a que esta semilla tiene un alto contenido de grasa, las semillas seleccionadas, se almacenaron en un recipiente insuflándoles nitrógeno y en refrigeración hasta su uso.

4.3 DESCASCARADO

Fundamento:

Obtener la almendra por un método manual y mecánico, con fin de obtener la mayor cantidad de materia prima necesaria para efectuar la extracción.

Equipo:

✂ Molino de Materiales BICO mod. UD32 (Figura 13)

Material:

✂ Pistilo

✂ Franela

Procedimiento:

Las semillas seleccionadas se romperán con la finalidad de obtener la almendra entera y en esta parte inicial se determinaran parámetros físicos (tamaño, peso, peso hectolítrico entre otros) y también la relación porcentual de cáscara y almendra (Moreno, 1984).

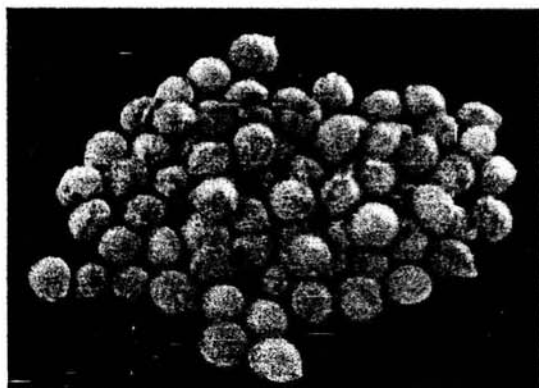


Figura 10. Fotografía de la semilla de Capulín

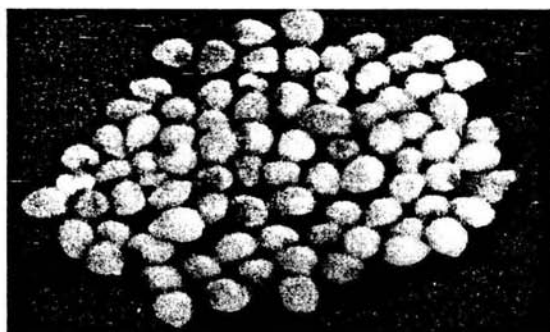


Figura 11. Fotografía de la almendra de Capulín

Para separar la almendra de la cáscara se puede realizar de forma manual, utilizando un pistilo, colocando las semillas sobre un trapo ligeramente húmedo y colocando sobre el un par de puños de la semilla, golpeando sobre ellas en una base fija. Posteriormente recolectar la almendra y desechar la cáscara.

También se puede realizar de manera mecánica mediante un Molino de Minerales BICO mod. UD32, en el cual solo es necesario ajustar la separación de los discos para no pulverizar la cáscara junto con la almendra.

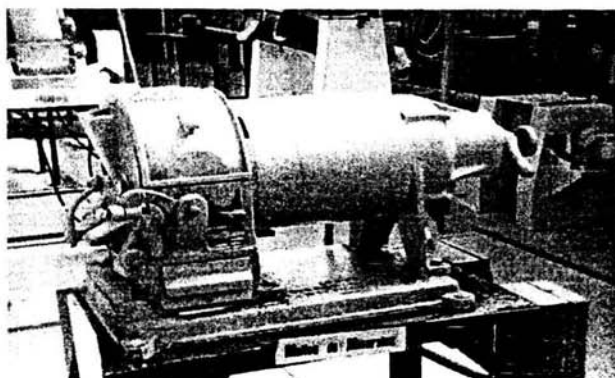


Figura 12. Fotografía del Molino de Minerales BICO mod. UD32

4.4 PARÁMETROS FÍSICOS.

4.4.1 DIMENSIONES.

Se refiere a la toma aleatoria de la materia prima íntegra que se tiene para determinar y caracterizar físicamente la muestra.

Las dimensiones se determinaron tanto para la semilla como para la almendra.

Instrumento.

∅ Vernier Stainless Hardened

Procedimiento:

Se mide con el vernier, el largo y ancho de la almendra; y para el caso de la semilla se mide el diámetro. La determinación se realizó con 20 unidades elegidas aleatoriamente.

4.4.2 PESO HECTOLÍTRICO.

Fundamento:

El peso hectolítrico es el criterio más utilizado para determinar el grado y la calidad de los cereales. Se cuantifica midiendo el peso de una muestra representativa del lote que ocupa un volumen estandarizado, es decir la densidad aparente del grano. Generalmente el valor se expresa en kg/hl (100 litros). Se relaciona con la densidad real del grano. (Serna, 1996)

Material.

- ☞ Probeta 100 ml marca KIMAX No. 20024 $\pm$ 0.60 ml
- ☞ Balanza Analítica

Procedimiento:

La probeta ya tarada previamente se llenó con el material (semilla y almendra), hasta la marca de 100 ml , tratando de acomodar con ligeros golpes sobre la mesa.

Se realizó la determinación cuatro veces. El peso volumétrico corresponde a el peso en gramos de las semillas contenidas en la probeta y entonces se saca la relación de Kg por HL (100 ml). La determinación se realizó 4 veces del mismo lote considerando de manera aleatoria y tratando de homogeneizar previamente el lote.

4.4.3 PESO DE LA SEMILLA Y ALMENDRA.

Fundamento:

Para conocer el peso unitario promedio de la semilla y la almendra que se utilizaron para este estudio.

Material.

- ☞ Balanza Analítica.

Procedimiento:

Tanto de la semilla y de la almendra tomar 50 unidades de cada uno y pesar, esto se realizó 4 veces, de tal manera que el peso obtenido de cada uno dividido entre 50 y se obtiene el peso unitario para la semilla y la almendra respectivamente.

4.4.4 RELACIÓN CÁSCARA-ALMENDRA.

Fundamento:

Para conocer el porcentaje de la semilla que equivale a la cáscara y cuanto a la almendra.

Material.

- ☞ Balanza Analítica
- ☞ 10 puños de semilla tomados aleatoriamente
- ☞ Pistilo

Procedimiento:

Pesar 10 puños de la semilla, y de forma manual, romper la cáscara y separar la almendra y la cáscara. Pesar la cáscara de cada puño. Restar del peso de la semilla de cada puño menos el peso de la cáscara de cada puño. Así se obtiene por diferencia el peso de la almendra, de esta manera se relaciona como el peso equivalente al 100% a la semilla completa y el peso de la almendra por una relación que tendrá su equivalente en porcentaje.

4.5 MOLIENDA.

La almendra entera fue molida en un molino mecánico THOMAS WILEY mod. 4 hasta obtener la almendra fraccionada, utilizando una malla con tamaño de partícula de 4 mm.

4.6 METODO DE EXTRACCIÓN DE LA GRASA.**Fundamento:**

Las grasas vegetales se obtienen extrayendo el aceite con solventes. En este proceso el aceite se extrae con hexano que después se separa del aceite y se reutiliza. Debido a su alta volatilidad, en el aceite final no queda resto alguno de hexano. (Ziller, 1996)

Equipo.

- ✂ Extractor Líquido-Sólido Pignat No. 9604019
- ✂ Rotavapor

Material y Reactivos:

- ✂ Almendra fraccionada (aproximadamente 2.5 kg)
- ✂ Hexano grado Q.P (2 galones)

Procedimiento.

Contando con suficiente almendra de capulín fraccionada (aprox. 2.5 kg) se procedió a desengrasar, utilizando un dispositivo tipo Soxhlet pero en un extractor líquido-sólido a mayor escala (Figura 14) el cual fue lavado y enjuagado perfectamente, y secado previamente. Se llena la calceta contenida en el reactor con la almendra fraccionada, antes de adicionar el disolvente es necesario verificar que el extractor este prendido, junto con la bomba de vacío además que las llaves de los contenedores estén cerradas. Una

verificado lo anterior, se adiciona el disolvente hexano en el reactor aproximadamente 1 galón, se cierra y se programa la temperatura de ebullición del hexano (58.74°C a 585 mm Hg, presión de la Ciudad de México) y se deja en remojo y calentamiento aproximadamente 6 horas durante 3 días consecutivos.

Al término de cada remojo, es necesario esperar a que baje la temperatura del reactor, una vez a temperatura ambiente, se apaga la bomba de vacío y el disolvente junto con el aceite extraído se liberan al contenedor de calentamiento y agitación los cuales se dejan ahí durante toda la noche, revisando las aberturas del contenedor para evitar pérdidas del disolvente

Cada día durante el tiempo que dure la extracción, es necesario recolectar el disolvente que se encuentra en el contenedor de calentamiento y agitación y adicionarlo nuevamente en el reactor para otro calentamiento del disolvente junto con la materia prima, en caso de hacer falta disolvente para llenar el reactor adicionar más disolvente.

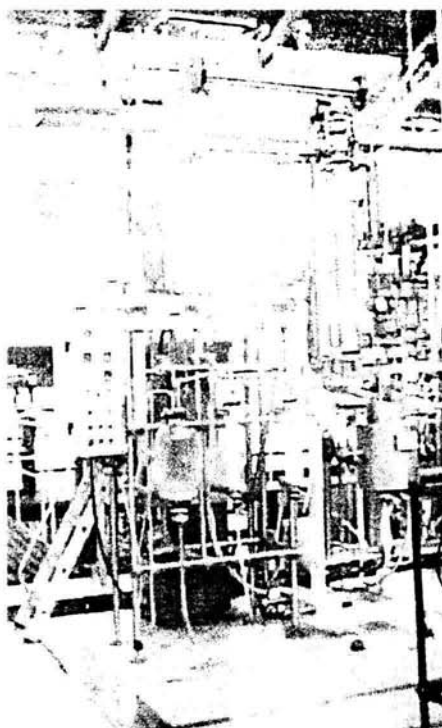


Figura 13. Aparato de Extracción Líquido-Sólido Pignat No. 964019

Una vez terminada la extracción, se procederá a eliminar el disolvente en un rotavapor a 50°C y presión reducida, con la finalidad de obtener la fracción lípida libre de disolvente y que corresponderá al "aceite crudo" del material biológico en estudio. Una vez eliminado el hexano, se deja en la estufa durante una noche a temperatura de 55°C y corriente de aire para evaporar el hexano residual. A este material se le determina densidad calórica y el perfil de ácidos grasos (Álvarez, 2002; Akon and Min, 1998).

4.7 REFINACIÓN DEL ACEITE.

El refinamiento del aceite consta básicamente de los siguientes pasos: Desgomado, Neutralización, Blanqueo y Deodorización.

4.7.1 DESGOMADO.

Fundamento:

Consiste en la eliminación de diversos compuestos que son solubles en el aceite como proteínas, fosfolípidos, hidratos de carbono, gomas o sustancias mucilaginosas, y se eliminan por precipitación con una simple hidratación con adición de un ácido (cítrico o fosfórico), calor y agitación. Al agitar las sustancias se hidratan y flocculan formando una goma mucilaginosa insoluble en el aceite. Estas se dejan sedimentar y después se separan del aceite por centrifugación.

La cantidad de los reactivos que se utilizan, está en relación a la cantidad de aceite que se somete a este proceso.

Material y reactivos.

- ✂ Matraz Erlenmeyer de 1 L.
- ✂ Balanza analítica
- ✂ Parrilla de calentamiento y agitación múltiple THERMOLYNE mod. SP-13025.
- ✂ Centrifuga CLAY-ADAMS, Dynac™.
- ✂ H_3PO_4 al 0.1%

Procedimiento:

- ✂ Determinar previamente el volumen de aceite a refinar, el cual será el volumen de referencia (100%).

- ✂ Mezclar en un matraz Erlenmeyer el aceite con H_3PO_4 al 0.1%, en una proporción del 3% con respecto al volumen de referencia (100%) del aceite a refinar.
- ✂ Calentar la mezcla en la parrilla de calentamiento a $60^\circ C$ durante 5 minutos con agitación.
- ✂ Centrifugar a 2400 r.p.m a temperatura ambiente durante 15 minutos para precipitar los residuos del desgomado.
- ✂ Recuperar el aceite por decantación.

4.7.2 NEUTRALIZACIÓN.

Fundamento:

Se efectúa posteriormente al desgomado para neutralizar los ácidos grasos libres que contengan los aceites, pero también neutraliza los monoglicéridos, los fosfolípidos y los agentes quelantes que pudieran quedar del desgomado, así como hidratos de carbono, resinas, metales y proteínas. El aceite se mezcla con sosa cáustica y calentamiento, convirtiendo los ácidos grasos en jabones solubles en agua. La solución jabonosa se separa entonces del aceite por sedimentación o por centrifugación. El jabón acumulado es removido por medio de lavados de agua caliente. El agua de lavado se separa del aceite también por sedimentación o centrifugación.

Material y Reactivos:

- ✂ Matraz Erlenmeyer de 1 L
- ✂ Potenciómetro CORNING mod. 430.
- ✂ Parrilla de calentamiento y agitación THERMOLYNE mod. SP-13025.
- ✂ Centrifuga CLAY-ADAMS, Dynac™.
- ✂ Balanza analítica.
- ✂ Mechero Bunsen.
- ✂ NaOH al 15%
- ✂ Agitador de vidrio.
- ✂ Agua destilada.
- ✂ Tripié.
- ✂ Tela de asbesto.

Procedimiento:

- ✂ Colocar el aceite previamente desgomado, en un matraz Erlenmeyer.
- ✂ Colocar el matraz con el aceite en una parrilla con agitación.
- ✂ Calibrar previamente el potenciómetro.
- ✂ Una vez calibrado realizar la lectura del pH del aceite.
- ✂ Con una pipeta Pasteur añadir NaOH al 15% hasta obtener un pH neutro (pH=7). Se recomienda realizar este paso lentamente, gota por gota para evitar un aumento mayor del pH.
- ✂ Inmediatamente, colocar el matraz con el aceite neutro en una parrilla de calentamiento y calentar la mezcla a 50°C durante 5 minutos.
- ✂ Centrifugar a 2400 r.p.m. a temperatura ambiente durante 20 minutos.
- ✂ Después, mezclar el aceite con agua destilada en una proporción del 10% con respecto al volumen de referencia (100%) del aceite, y calentar la mezcla a 80°C durante 5 minutos.
- ✂ Centrifugar a 2400 r.p.m. a temperatura ambiente por 25 minutos.

4.7.3 BLANQUEO.**Fundamento:**

El blanqueo se realiza después de la neutralización de los aceites para eliminar las sustancias que le imparten un determinado color, pero también son removidas trazas de metales, partículas coloridas tales como la clorofila, jabones y productos de la oxidación. La eliminación completa de los colorantes puede llevarse a cabo calentando el aceite y tratándolo con adsorbentes, como el carbón activado o tierras diatomeas.

Material y Reactivos:

- ✂ Parrilla de calentamiento y agitación múltiple THERMOLYNE md. SP-13025
- ✂ Papel filtro Whatman # 4 y # 40.
- ✂ Silicato de aluminio.
- ✂ Carbón activado.
- ✂ Vaso de precipitado de 1 L.

Procedimiento:

- ☒ Mezclar el aceite con carbón activado en un porcentaje del 10% con respecto al volumen de referencia (100%) del aceite a blanquear.
- ☒ Adicionar silicato de aluminio, en un porcentaje del 2% con respecto al volumen de referencia (100%) del aceite a blanquear.
- ☒ Calentar en una parrilla de agitación con calentamiento a 90°C durante 5 minutos.
- ☒ Filtrar al vacío el aceite con papel Whatman # 40.
- ☒ Una vez filtrado volver a filtrar al vacío con papel Whatman # 4. (en caso de no haber papel filtro de esta marca y número, se recomienda utilizar uno que sea de poro muy fino)
- ☒ Repetir el proceso de blanqueo en caso de que permanezca color en el aceite.
- ☒ Filtrar las veces que sean necesarias hasta ya no tener partículas de carbón activado en el aceite. Si es necesario filtrar con doble papel filtro.

4.7.4 DEODORIZACIÓN.**Fundamento.**

La deodorización remueve materiales volátiles en el aceite: tocoferoles, esteroides, ácidos grasos libres, herbicidas, pesticidas, gases disueltos y componentes mezclados que imparten cierto sabor. Disminuye el color del aceite y le otorga estabilidad oxidativa, así como una disminución de peróxidos y de ácidos grasos libres. Generalmente la presión de vapor de los compuestos odoríferos es relativamente baja y se requerirán de temperaturas demasiado elevadas si la destilación se llevará a cabo a presión atmosférica; de ahí la necesidad de regular esta operación a un buen vacío y la corriente de un gas inerte para abatir la temperatura de destilación y evitar el daño y descomposición de la grasa neutra.

Material- y Reactivos.

- ☒ Rotavapor
- ☒ Baño de temperatura controlada (80°C) (POLYSTAT Instrument Company Mod. 12002)
- ☒ Tanque de N₂
- ☒ Aceite mineral 1 galón.
- ☒ Matraz Bola con una boca 24/40

- ✂ Termómetro de -20 a 400°C

Procedimiento.

- ✂ Adaptar un recipiente de acero para poder utilizar el baño de temperatura controlada y que además el matraz de bola pueda estar en contacto con el aceite mineral.
- ✂ Encender el baño de circulación y esperar a que alcance la temperatura máxima (110-130°C).
- ✂ Abrir el vacío e inyectar continuamente nitrógeno al sistema de destilación a presión reducida.
- ✂ Sumergir el matraz bola que contiene el aceite previamente decolorado en el aceite mineral a la temperatura de (110-130°C) y dejar 2 horas continuas.
- ✂ Después de este tiempo, retirar el matraz bola del aceite y dejar enfriar.
- ✂ Si se va almacenar por algunos días, inyectarle una atmósfera de nitrógeno al recipiente que va a contener el aceite deodorizado y mantenerlo en refrigeración (4°C).

4.8 HIDROGENACIÓN.

Fundamento:

La hidrogenación en el procesamiento de grasas con fines alimenticios, consiste en convertir aceites líquidos en grasas sólidas o semifluidas; sin embargo, también logra otros propósitos, dentro de los cuales se incluyen asegurar la estabilidad del producto, así como el mejoramiento del color de la grasa; además, para el caso de la grasa de la almendra de capulín, tendrá el propósito de eliminar o disminuir la cantidad significativa de ácido erúico que contiene (Keilens y Hendrix, 1996; Barbosa, 2003)

Equipos.

- ✂ Rotavapor
- ✂ Hidrogenador Parr modelo 391

Material y Reactivos:

- ✂ Embudo de vidrio de filtración de poro fino F
- ✂ Matraces Erlenmeyer 500 ml
- ✂ Embudo Buchner de diámetro mediano
- ✂ Matraces de bola
- ✂ Reactor (botellas de reacción de vidrio grueso 250 ml)

- ☞ Papel filtro (Whatman #40 y 44)
- ☞ Acetato de etilo (R.A.) (1 Galón)
- ☞ Catalizador Pd/C al 5% (Aldrich nO. 596)
- ☞ Tanque de nitrógeno comprimido
- ☞ Tanque de hidrógeno purificado 99.99%

Procedimiento:

La hidrogenación se realizó dividiendo en lotes de acuerdo a la cantidad de aceite refinado, para que el catalizador Pd/C actúe de manera más eficiente en la superficie de contacto. Se colocaron 25 g de aceite refinado por cada lote los cuales se pesaron directamente en el vaso de reacción, el cual tiene que estar limpio y seco, se adicionan 200 ml de acetato de etilo bajo atmósfera de nitrógeno y con el mayor cuidado posible, colocar el 5% de catalizador Pd/C de acuerdo a la cantidad del aceite pesado, este se pesa sobre papel cera y una vez vertido el catalizador en el vaso de reacción, enjuagar el papel utilizado en la tarja con agua corriente para evitar reacción (cuidado de no tirar catalizador al pesarlo y al colocarlo en el vaso de reacción ya que es muy flamable. En caso de que esto sucediera, contar con un trapo húmedo para limpiar el catalizador e inmediatamente poner en contacto con agua para evitar la reacción; evitar de igual manera el contacto sobre la piel, en caso de contacto lavar inmediatamente). Se cubre la boca del vaso de reacción para impedir la entrada de oxígeno, posteriormente se coloca el vaso de reacción en el soporte del hidrogenador después de haberlo tapado herméticamente con el tapón de hule que contiene el tubo que suministra el hidrógeno, se coloca la chaqueta de protección, sujetándola con 2 bandas de contacto al tubo del columpio para evitar cualquier inestabilidad del reactor. Una vez montado el equipo se abre el tanque de hidrógeno hasta que el primer manómetro llegue a una presión de 90 lb/in², manteniéndose esta presión posteriormente se abre la primera llave de paso (la cual está conectada con el vaso de reacción) hasta alcanzar una presión de 60 lb/in² (esta lectura se verifica en un segundo manómetro) manteniéndolo constante, después de abrir la segunda llave de paso y se deja pasar el hidrógeno al vaso de reacción hasta que la presión del segundo manómetro disminuya a 40 lb/in², en este momento se cierra la segunda llave de paso y se abre de nuevo la primera llave con el fin de alcanzar

de nuevo la presión de 60 lb/in². Este procedimiento se lleva a cabo dos veces más, con esto se asegura que el vaso de reacción contiene el suficiente hidrógeno para comenzar la hidrogenación.

Teniendo todo listo, el manómetro de la primera llave debe marcar 60 lb/in² y abierta la segunda llave de paso en el momento de la hidrogenación, se enciende el equipo, tomando el tiempo en que se inició la hidrogenación y registrando el consumo de hidrógeno, por medio de la lectura de la presión que marca el manómetro en contacto con el frasco de reacción, efectuar la hidrogenación a diferentes tiempos. La hidrogenación total se presenta cuando ya no se observa disminución de la presión en el manómetro., lo cual nos indica que no hay más consumo de hidrógeno.

Terminados los tiempos seleccionados para la hidrogenación (5 y 10 minutos) se apaga el equipo, se abre la llave de vacío para eliminar el hidrógeno que no se consumió dentro del vaso de reacción, cerrar el tanque de hidrógeno quitar las tiras de contacto junto con la chaqueta de protección y finalmente retirar el tapón de hule del frasco.

En caso de que este muy caliente el vaso de reacción este se deja enfriar pero no demasiado. Este se filtra al vacío casi inmediatamente para eliminar el catalizador con un embudo buchner de diámetro mediano utilizando hasta 3 o 4 capas de papel filtro del # 40 y 44, en caso de que no se cuente con estos números de papel utilizar uno de poro fino, los residuos dentro del vaso de reacción se enjuagan con el acetato de etilo. Es necesario realizar aunque sea la primera filtración de manera rápida y en caliente, pero recuperando toda la grasa y enjuagando perfectamente el vaso de reacción para poder continuar con los siguientes lotes.

Si el aceite se enfría demasiado (esto puede ocurrir a temperatura ambiente), es muy probable que este se vuelva una grasa sólida, y puede quedar retenido el sólido en el papel filtro, en el vaso de reacción o en su caso en el matraz Erlenmeyer después de filtrar, por lo que representa pérdida de grasa; es necesario calentar el recipiente en baño maría a 70°C hasta que este de nuevo

líquida o se puede colocar acetato de etilo previamente calentado cada vez que sea necesario para enjuagar los residuos de grasa sólidos y el catalizador de las paredes del vaso o matraz después de cada filtración, de esta manera se evita pérdida de grasa, también puede realizarse el calentamiento directamente en la parrilla pero con mucho cuidado, e inmediatamente filtrar. (ver Notas pág. 48)

Con respecto a los residuos del catalizador que quedan en el papel filtro, este se raspa con una espátula y se colocan en un frasco de vidrio con agua corriente, y el papel se moja inmediatamente al chorro de agua para evitar una posible reacción en caso de que no todo el catalizador haya reaccionado en la superficie del aceite.

Para evitar pérdidas de grasa durante la filtración al vacío se recomienda utilizar solo 2 matraces Erlenmeyer, y enjuagar como lo indicado en el párrafo anterior. Repetir las filtraciones que sean necesarias hasta observar que ya no hay residuos de catalizador en el papel, ni en el fondo del matraz. Cuando la cantidad de residuos del catalizador sean considerados muy pequeñas, las filtraciones se realizan al vacío con un embudo de vidrio de poro fino F, adaptando el embudo al matraz utilizando a su vez papel filtro del mismo número utilizado para las filtraciones anteriores para eliminar completamente los residuos del catalizador o alguna otra impureza presente.

Una vez que ya no haya presencia del catalizador, se recupera el disolvente en un rotavapor a una temperatura de 70°C a presión reducida de acuerdo a la temperatura del acetato de etilo (56.9°C). Se recomienda considerar la cantidad de grasa que se sometió a la hidrogenación para elegir el tamaño del matraz bola; así también hacerlo por pequeñas fracciones del volumen total para poder eliminar completamente el disolvente.

¹Una vez eliminado el disolvente se deja el matraz bola aproximadamente 2 horas en la campana para eliminar el resto del disolvente.

-
- o ¹ El volumen final del disolvente no afecta la cantidad de grasa.
 - o El volumen de disolvente para enjuagar durante las filtraciones queda a criterio de la persona que las realice.
 - o Considerar la cantidad adecuada de disolvente para todo el proceso.

Para evitar pérdidas por transvasar la grasa se recomienda dejar la grasa en el mismo matraz bola donde se recupero y si no se va a utilizar inmediatamente insuflarle nitrógeno y mantener en congelación hasta su uso.

4.9 DETERMINACIÓN DE DENSIDAD CALÓRICA.

Fundamento:

La estimación del contenido calórico de los alimentos o dietas es indispensable para el estudio del metabolismo y balance de energía. El principio en el cual se basa la determinación del contenido calórico del material en la bomba calorimétrica, es en la primera ley de la termodinámica, la cual se fundamenta en el enunciado : "la energía en cualquier proceso físico o químico no se crea ni se destruye". En el caso de la bomba calorimétrica, hay una conversión de la energía química en la producción de energía térmica, la cual se detecta por el cambio en la temperatura.

Material y reactivos:

- ✂ Bomba calorimétrica GALLENKAMP, mod. CBB-330-010L.
- ✂ Galvanómetro GAM METRIC LTD.
- ✂ Balanza analítica.
- ✂ Crisoles de acero inoxidable.
- ✂ Mango metálico prensador.
- ✂ Desecador de vidrio.
- ✂ Estufa de secado.
- ✂ Mechales de algodón de 7 cm de longitud.
- ✂ Estándar de Ácido Benzoico certificado

Procedimiento:

- ✂ Realizar una curva patrón con ácido benzoico.
- ✂ La cantidad de muestra depende del contenido calórico esperado, ya que se recomienda que la cantidad pesada libere aproximadamente 9.0 Kcal, para que entre en el rango de detección del instrumento, para materiales con alta densidad como aceite se pesa aproximadamente 4.0 g mientras que para harinas con baja densidad se pesa hasta 1.5 g.

- ✂ La muestra se coloca en un crisol previamente puesto a peso constante, se tara junto con una mecha de algodón, de tal manera que el hilo quede introducido dentro de la muestra.
- ✂ Se procede a pesar en una balanza lo que corresponde al peso preliminar (Pp) se recomienda considerar un exceso aproximado del 10%.
- ✂ El crisol se coloca en la base superior del pilar central de la bomba y con mucho cuidado se introduce la punta suelta de la mecha de algodón en el alambre de ignición. Se coloca con mucho cuidado por encima de la muestra el capuchón de la bomba sobre el anillo metálico el cual se levanta con la mano y con la otra se sostiene el capuchón y se comienza a girar hasta que quede cerrado. Se coloca el sensor del termopar en el orificio del capuchón.
- ✂ Previamente se debe prender el galvanómetro, y verificar, una vez cerrado el sistema que la llave de liberación de presión este cerrada.
- ✂ Abrir el tanque de oxígeno (presión de 30 bars) y abrir la válvula de paso del cilindro de combustión hasta alcanzar aproximadamente la presión de 25 bars, una vez alcanzado, girar la perilla rápidamente hasta cerrar nuevamente quedando fija la presión de oxígeno en el cilindro de combustión aproximadamente 10 segundos.
- ✂ Una vez estable, se calibra el galvanómetro hasta la lectura de cero y se oprime el botón de ignición y en 10 a 15 segundos se lleva a cabo la combustión, notándose por un aumento en la presión del manómetro, que a su vez se traduce en una señal en la escala del galvanómetro. Se debe observar con atención el movimiento del indicador en el galvanómetro, ya que una vez alcanzado el valor máximo empieza a decaer rápidamente. La lectura máxima obtenida en el galvanómetro es directamente proporcional al calor liberado en la combustión.
- ✂ Una vez tomada la lectura, se abre la válvula de salida de los gases de combustión, la cual se localiza en la base de la bomba del lado opuesto a la entrada del oxígeno, a la vez, se desconecta el termopar y una vez liberados los gases de combustión, se procede a abrir la bomba girando el anillo metálico en sentido inverso al cierre. Por último, se cierra la válvula de liberación de gases y el capuchón se enfría a temperatura ambiente o en baño de agua fría, para realizar una nueva determinación.

4.10 DETERMINACIÓN DE PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

Fundamento:

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos después de un proceso de saponificación, son separados y determinados en un cromatógrafo de gases, donde son separados como consecuencia del reparto entre una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria líquida contenida en una columna.

Material y reactivos

- ✂ Cromatógrafo de gases (Perkin Elmer Auto System Gas Chromatograph, Integrador PE Nelson Model 1022)
- ✂ Columna para la separación cromatográfica (Alltech Capillary Column 30x0.32 mm ID x 0.25 μ m. ATTM – SILAR Serie no. 1303512H)
- ✂ Gases: Helio, Hidrógeno, Aire de alta pureza (99.997%)
- ✂ Baño de temperatura controlada (80°C) (POLYSTAT Instrument Company Mod. 12002)
- ✂ Tubos de vidrio con tapón de rosca de teflón (Kimax)
- ✂ Pipetas graduadas de 2 y 4 mL
- ✂ Matraces aforados de 5 mL
- ✂ Jeringa de 10 μ L para inyección en el cromatógrafo (Hamilton)
- ✂ Vórtex (Lab-Line mod. 1290 super mixer)
- ✂ Pipetas pasteur
- ✂ Solución de KOH al 5% en metanol
- ✂ Solución de HCl al 10% en metanol
- ✂ Estándar de ácidos grasos SIGMA F.A.M.E Mix GLC-50 100 mg (Ésteres metílicos de palmitoleato C16:1 n7, oleato C18:1, Eicosanoato C20:0, Erucato C21: 1 n9)
- ✂ Estándar de ácidos grasos (Ésteres Metílicos de Palmitoleato SIGMA No. P-0500, Estearato No. P-2154 y Oleato SIGMA 100 mg (112-80-1))
- ✂ Mezcla de disolventes Tolueno:Hexano (80:20)

Nota: Todo el material de vidrio se lavó perfectamente con agua destilada y posteriormente se lavó primero con tolueno seguido de acetona después metanol y finalmente acetona, (en ese orden) antes de ser utilizado. Todos estos reactivos fueron de grado analítico. (López, 2003)

Procedimiento:**☒ Inyección de estándares.**

Se recomienda que antes de realizar la inyección de la muestra se inyecten primero los estándares a las mismas condiciones del cromatógrafo y no después, para poder identificar la presencia de ácidos grasos correspondientes de la muestra.

Para este caso se utilizó: Estándar F.A.M.E Mix GLC-50 100 mg, este contiene 4 ésteres metílicos conteniendo un 25% de cada uno: Palmitoleato, Oleato, Eicosanoato, Erucato.

Se realizó una dilución de 2 mg del estándar en 1 ml de mezcla tolueno:hexano (80:20) y de esta, se tomó 1 μ l para inyectar en el cromatógrafo. (Ver Cromatograma 1)

Se utilizó otro estándar, realizando una mezcla de ésteres metílicos correspondientes a los ácidos Palmítico, Esteárico y Oleico, el cual fue necesario esterificar utilizando una mezcla de 20 mg de cada uno con el mismo procedimiento que en la esterificación de las muestras de los aceites. No fue necesario diluir, se inyectó 1 μ l de la solución final de 5 ml.

☒ Esterificación de los ácidos grasos

En un tubo con tapón de rosca, se pesan aproximadamente de 20 a 50 mg de aceite, se adicionan 2 mL de KOH al 5% en metanol y se colocan en un baño a 80°C por 1 hora.

Al término de éste tiempo el tubo se dejó enfriar y se agregaron 2 mL de HCl al 10% en metanol y 100 μ L de BF_3 y se volvió a introducir en el baño a 80°C por 1 hora.

Posteriormente se dejó enfriar y se agregaron 4 mL de agua y 2 mL de mezcla tolueno:hexano (80:20), se agitó en un vórtex por espacio de 1 minuto y se separó la fase orgánica, a ésta se vuelve a agregar nuevamente 4 mL de agua y 2 mL de mezcla tolueno:Hexano (80:20) y se separa la fase orgánica.

Finalmente dicha fase se llevó a un volumen final de 5 mL, de ésta solución se tomó 1 µL y se inyectó en el cromatógrafo de gases.

⌘ Inyección de la muestra

Se encendió el cromatógrafo de gases junto con el integrador, posteriormente se abrió la válvula principal del gas acarreador (helio) y gases de combustión (hidrógeno y aire) y se ajustó la presión de salida de estos a las siguientes condiciones:

80 psi para el helio

30 psi para el hidrógeno

40 psi para el aire seco

Se utilizó un programa de temperatura que dio las condiciones físicas adecuadas para la obtención del análisis de composición de los ácidos grasos, estas condiciones fueron las siguientes:

Temperatura inicial del horno: 50°C

Temperatura inicial del detector: 300°C

Temperatura inicial del inyector: 250°C

Presión de gas (flujo): 10 psi

Finalmente se inyectó 1 µL de la muestra previamente esterificada y se realizó el análisis. La esterificación se llevó a cabo por triplicado, y de cada muestra esterificada se hizo una inyección.

⌘ Cálculos

Se calculó el porcentaje de cada ácido graso de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ del ácido graso} = \text{Área ácido graso} / \sum \text{Área ácidos grasos} \times 100$$

4. 11 PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

4.11.1 GRAVEDAD ESPECÍFICA O DENSIDAD APARENTE.

Fundamento:

Se determina la masa por unidad de volumen, expresada en gramos por centímetro cúbico, a una temperatura dada, que es determinada en un picnómetro o matraz aforado previamente calibrado a la misma temperatura con agua.

Material y Reactivos:

- ✂ Matraz aforado 25 ml
- ✂ Baño regulador de temperatura.
- ✂ Balanza analítica.
- ✂ Termómetro.
- ✂ Etanol (Grado Analítico)

Procedimiento:

- ✂ Lavar perfectamente el matraz aforado y dejar secar.
- ✂ Pesar el matraz aforado limpio y vacío (M).
- ✂ En el matraz aforado colocar agua destilada recientemente hervida y fría (temperatura ambiente), hasta la superficie del recipiente.
- ✂ Colocar el matraz en un baño de agua a 50°C durante 30 min.
- ✂ Ajustar el volumen de agua y colocar el tapón. Retirar del baño, secar perfectamente el exterior.
- ✂ Pesar en la balanza analítica con agua a la temperatura de referencia (M').
- ✂ Vaciar el matraz, y enjuagar varias veces con etanol, secar y dejar que se evaporen los residuos.
- ✂ Colocar el aceite en el recipiente perfectamente limpio y seco, llenando hasta la superficie.
- ✂ Colocar el matraz en un baño de agua a 50°C durante 30 minutos.
- ✂ Ajustar el volumen de aceite y colocar el tapón de la misma manera que con agua. Retirar del baño y secar perfectamente el exterior.
- ✂ Pesar en la balanza analítica (M'').
- ✂ El peso específico se obtiene relacionando los valores obtenidos, expresando como peso de aceite/ peso de agua a la misma temperatura.

✂ Si la determinación no se realizó a la temperatura de referencia sumar 0.00068 por cada grado arriba de 20°C, o restar la constante si la temperatura fue menor a la referencia.

✂ Cálculos:

$$\text{Densidad} = (M'' - M') / (M' - M) \times D \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

Donde;

M = peso en gramos del matraz vacío

M' = peso del matraz con agua a la temperatura de referencia (50°C)

M'' = peso del matraz con aceite a la temperatura de referencia (50°C)

D = densidad del agua a la temperatura de la determinación .

4.11.2 PUNTO DE FUSIÓN.

Fundamento:

Las grasas y aceites naturales, como mezclas de glicéridos y otras sustancias, no tienen punto de fusión exacto y bien definido, sino que presenta un rango. No presentan punto crítico de sólido a líquido, este paso lo realizan gradualmente a través de estados pastosos hasta completamente líquidos. El punto de fusión de una grasa viene definido en éste método por dos temperaturas; una, la inicial de ablandamiento deslizante, y otra final de líquido perfectamente fluido. (Herlich, 1995)

Material y Reactivos:

- ✂ Capilares de vidrio (1 mm de diámetro interno)
- ✂ Lente de aumento de vidrio
- ✂ Termómetro graduado (división de 0.2°C)
- ✂ Parrilla de calentamiento y agitación múltiple THERMOLYNE mod. SP-13025.
- ✂ Vaso de precipitado de 500 mL
- ✂ Ligas plásticas
- ✂ Lámpara
- ✂ Sal
- ✂ Mechero Bunsen.

Procedimiento:

- ✂ Llenar el tubo capilar con aceite (aproximadamente 10 mm).
- ✂ Sellar los dos extremos del tubo a la flama.
- ✂ Colocar el tubo capilar con muestra en el congelador durante 24 hrs.
- ✂ Atar a nivel del bulbo del termómetro el capilar con muestra.
- ✂ En caso de tener una idea aproximada del punto de fusión de la muestra, comenzar la determinación a 10°C por abajo del mismo.
- ✂ En este caso se utilizó un baño de hielo con 2 porciones de hielo y una cucharada de sal para alcanzar la temperatura de (-10°C).
- ✂ Una vez alcanzada la temperatura colocar el termómetro con el tubo capilar y comenzar el calentamiento en la parrilla de calentamiento a una tasa de 0.5°C/minuto con agitación moderada para lograr homogeneidad.
- ✂ Colocar la lámpara de tal forma que ilumine el tubo capilar con aceite.
- ✂ Con el lente de aumento observar y tomar como punto de fusión el rango de lectura en el termómetro a la cual la muestra se vuelve transparente.

4.11.3 INDICE DE REFRACCION**Fundamento:**

El índice de refracción de una sustancia dada es la razón de la velocidad de un rayo de luz en el vacío a la velocidad de la luz a través de la sustancia. Por conveniencia práctica se refiere a la relación aire-sustancia. El índice de refracción varía con la longitud de onda del rayo de luz refractado y la temperatura. (Herlich, 1995)

Material y Reactivos:

- ✂ Refractómetro de Abbé OPL No. 2.154 (con circulación de agua)
- ✂ Baño de temperatura controlada (POLYSTAT Instrument Company Mod. 12002)
- ✂ Acetona (G.A.)
- ✂ Agua destilada.

Procedimiento:

- ✂ Calibrar la escala del prisma con el que se lleva a cabo la determinación del índice de refracción con agua destilada. La escala izquierda deberá indicar 0% mientras que la derecha 1.333 a la temperatura de 20°C.

- ✂ La temperatura a la cual debe funcionar el refractómetro es de 50°C. Para tener la escala del prisma a una temperatura constante, se usará circulación de agua utilizando un baño de agua a una temperatura de 50°C, este se conectará al refractómetro por la parte inferior y salir por la superior, verificando que no existan posibles fugas de agua. La temperatura del prisma viene indicada por el termómetro del instrumento.
- ✂ Para leer el índice de refracción se limpia la superficie del prisma mediante un algodón o tela impregnado con acetona.
- ✂ Colocar el refractómetro frente a la fuente luminosa, de preferencia artificial ya sea eléctrica o de sodio.
- ✂ Levantar el espejo metálico y observar por el ocular. El campo deberá aparecer uniformemente iluminado. Girando el tornillo izquierdo se hará visible una línea fronteriza con una zona clara inferior y una oscura superior. Tal línea deberá coincidir con el punto de intersección de los ejes.
- ✂ En el ocular se lee tanto la concentración de sólidos solubles (para el caso de sustancias azucaradas) como el índice de refracción.
- ✂ Se recomienda realizar las lecturas por triplicado con nuevas porciones de la muestra.
- ✂ Calibrar el refractómetro por lo menos cada vez que se cambien los tipos de muestra.
- ✂ Limpiar cada vez que se utilicen nuevas porciones de muestra, evitar trazas de agua ya que afectan las lecturas.

4.11.4 INDICE DE YODO (Método de Hanus)

Fundamento:

Los acilgliceroles de los ácidos grasos insaturados presentes en el aceite se unen mediante sus dobles enlaces (principalmente los de la serie de ácido oleico) a una cantidad de monobromuro de yodo en ácido acético glacial (reactivo de Hanus), el cual es añadido en exceso en la determinación. El halógeno no utilizado es transformado a yodo libre por la adición de solución de yoduro de potasio al 15%. El yodo libre es, entonces titulado con 0.1N de tiosulfato de sodio con almidón como indicador. Por diferencia con un blanco se obtiene la cantidad de monobromuro de yodo adsorbido en la muestra. (Egan, 1991; Hart, 1991, Herlich, 1995)

Material y Reactivos:

- ✂ Matraz de boca ancha de 500 ml con tapón de plástico.
- ✂ Matraz Erlenmeyer.
- ✂ Probeta de vidrio de 50 ml
- ✂ Probeta de 10ml
- ✂ Buretas graduadas de vidrio de 50 ml.
- ✂ Balanza analítica.
- ✂ Horno LAB-LINE imperial III.
- ✂ Solución de Hanus.
- ✂ Ácido acético glacial.
- ✂ Tiosulfato de sodio pentahidratado.
- ✂ Solución de yoduro de potasio al 15% p/v
- ✂ Solución de almidón al 1% p/v
- ✂ Cloroformo
- ✂ Ácido clorhídrico 1N
- ✂ Dicromato de potasio
- ✂ Agua destilada hervida

Preparación de solución de tiosulfato de sodio 0.1N

a) Disolver 25 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 1 litro de agua destilada. Llevar a ebullición por 5 minutos. Transferir en caliente a un frasco de vidrio color ámbar (previamente limpiado con mezcla crómica y enjuagado con agua destilada).

Pesar en una balanza analítica 0.2000 a 0.2300 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ en un matraz erlenmeyer y secar a 100°C durante 2 horas. Disolver en 80 ml de agua destilada (recién hervida y fría) junto con 2 g de KI y añadir 20 ml de HCl 1 N y guardar en la oscuridad durante 10 minutos.

Titular con la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ añadiendo unas gotas de solución indicadora de almidón al 1% hacia el final de la valoración (pasando de color amarillo paja a azul/verdoso y al final con una coloración azul). Calcular la normalidad de la solución $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ mediante la siguiente fórmula.

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

Procedimiento:

- ⌘ Pesar de 0.2000 a 0.2500 g de aceite en un matraz de boca ancha.
- ⌘ Agregar 10 ml de cloroformo y agitar, para disolver el aceite. Es necesario que cada vez que se agite se libere la presión de aire retirando el tapón.
- ⌘ Con la bureta agregar 25ml de la solución de Hanus y dejar reposar en la oscuridad por 30 minutos con agitación ocasional.
- ⌘ Transcurrido el tiempo, añadir 10 ml de solución de KI al 15% y agitar vigorosamente.
- ⌘ Añadir 100 ml de agua destilada (hervida y fría), lavando los residuos que queden en el tapón de plástico.
- ⌘ Titular la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.1 N hasta que el color amarillo de la solución casi desaparezca.
- ⌘ Añadir unas gotas de almidón al 1% y continuar titulando hasta que el color cambie (el color de vire depende del color del aceite). Hacia el final de la titulación, tapar el matraz y agitar vigorosamente para que el yodo remanente en CHCl_3 sea titulado.
- ⌘ Se recomienda repetir por triplicado cada muestra, tratando que los tiempos de reposo sean los mismos.
- ⌘ Realizar un blanco.
- ⌘ Cálculos:

$$\% \text{ Índice de Yodo} = \frac{(B-S) * N * 12.69}{\text{g muestra}}$$

donde:

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

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

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

4.12 EVALUACIÓN BIOLÓGICA

4.12.1 PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA

Fundamento:

Con los diferentes preparados de la grasa cruda de la almendra de capulín se realizó el bioensayo de toxicidad aguda, para lo cual se utilizaron ratones machos de aproximadamente 20 g de peso corporal y se les administró por vía oral, dosis relativamente altas que permitan, que de no presentarse efectos adversos, el material de ensayo se considere como prácticamente no tóxico o relativamente inocuo (Klaassen et al, 1995; Lansdown, 1993). Esta fase del trabajo es un punto determinante del presente trabajo; ya que aquel material biológico que no produzca resultados satisfactorios de toxicidad aguda, y no podría considerarse en un trabajo posterior la evaluación de toxicidad subcrónica y de ser necesario se tendrá que realizar un proceso adicional de detoxificación.

Material y reactivos:

- ☒ Ratones de sexo macho de la cepa CD1
- ☒ Jaulas de acrílico con comederos.
- ☒ Bebederos.
- ☒ Marcador de orejas metálica Whatmann & Co. (ver Apéndice 1)
- ☒ Jeringa hipodérmica de 3 ml.
- ☒ Aguja hipodérmica de 26 x 12.
- ☒ Agujas especiales para administración oral.
- ☒ Aceite de girasol (marca libre "Comercial Mexicana")
- ☒ Solución Isotónica (0.9% NaCl)
- ☒ Balanza granataria para animales de laboratorio con canastilla OHAU mod.700.
- ☒ Balanza Analítica.

Procedimiento:

a) Distribución de los animales:

- ☒ Los ratones son marcados en las orejas para su identificación con un perforador especial (Apéndice 1).

- ✂ Los ratones tienen que estar en ayuno de 12 horas para realizar la administración.
- ✂ El día del experimento, los ratones son pesados.
- ✂ Se reparten en diferentes lotes de acuerdo al número de muestras, y la distribución se realizó por medio de "culebra japonesa" (apéndice 2), colocando como mínimo 5 ratones por lote en una misma jaula.

b) Preparación de la muestra

- ✂ Como la muestra es aceite y en el caso de los aceites hidrogenados están en estado sólido, se considero la temperatura corporal del animal (36-37°C) para atemperarla a una temperatura de 50°C mediante un baño de agua con control de temperatura, con el fin de facilitar la administración, sin dañar al animal.

c) Administración:

- ✂ La dosis única a administrar fue de 15 g/kg de peso corporal (p.c.), y una dosificación 4D, utilizando como vehículo aceite de girasol de cada muestra de aceite previamente atemperado a 50°C.

Cálculos:

$$15 \text{ g / kg p.c.} = 15 \text{ g aceite / 1000 g p.c.}$$

$$4 \text{ D} = 0.04 \text{ ml / g p.c. (gramos peso corporal)}$$

$$(15 \text{ g grasa / 1000 g p.c.}) \times (1 \text{ g p.c. / 0.4 ml}) = 0.375 \text{ g aceite / ml de vehículo.}$$

Vehículo = aceite de girasol

Para preparar 10 ml del aceite con el vehículo =

3.75 g aceite / 10 ml vehículo (aceite de girasol)

- ✂ La administración oral, se realiza sujetando al ratón con la mano izquierda de la nuca y la cola. La jeringa con el aguja especial se introduce lateralmente a través del espacio interdental, y con una suave rotación se avanza dentro del esófago hasta un nivel considerable y se procede a descargar lentamente la muestra.

d) Observaciones:

- ✂ Una vez administrado el agente xenobiótico se restituye el alimento y agua *ad libitum* y se deja a los animales en observación por 14 días con el fin de observar el efecto tóxico del material administrado (EPA, 1996)
- ✂ Se observa a los animales cada hora durante las primeras 10 horas después de la administración con el fin de buscar síntomas físicos como: Lordosis, xifosis, ataxia, piloerección, erección caudal, agresividad, aletargamiento, excitación, disnea, cianosis, hipotermia. (Ver Glosario).
- ✂ Durante el experimento se llevó a cabo un registro de los pesos de los ratones por lote, se pesaron los ratones cada 24 horas los 3 primeros días, posteriormente se realizó cada tercer día, hasta el final del experimento, así también si se presentó alguna de las características antes mencionadas durante el periodo de observación se registraron en los formatos correspondientes. (Apéndice 3)
- ✂ El último día, se pesaron los ratones lo que corresponde al peso final.
- ✂ Los ratones se sacrifican y se realizó la necropsia para obtener los siguientes órganos: riñones, hígado y corazón, lavándolos con solución isotónica 0.9%, secados con papel absorbente y los cuales se observan anotando las características morfológicas, se pesaron inmediatamente para determinar la relación porcentual de órganos, con la siguiente fórmula:

$$\text{Relación porcentual (\%)} = \frac{\text{Peso de órgano (g)}}{\text{Peso corporal final (g)}} \times 100$$

- ✂ Una vez obtenidos estos datos, se realizó un análisis de varianza para determinar diferencia significativa entre los pesos de los órganos analizados y el tipo de aceite utilizado; así también como el peso de los ratones, al final del estudio con respecto al tipo de aceite que les fue suministrado.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 RENDIMIENTOS.

Peso de la almendra fraccionada a extraer: 2436.00 g

Se obtuvo 1056g del aceite crudo de la almendra de capulín.

Rendimiento: 43.35%

Para el proceso de refinación se utilizó 450 ml del aceite crudo.

Se recupero 260 ml de aceite refinado.

Rendimiento: 57.77%

Para el proceso de hidrogenación se utilizó 100 g de aceite refinado para el proceso de 5 minutos y 100 g para el proceso de 10 minutos.

Se obtuvo 83 g de aceite hidrogenado a 10 minutos y 92 g de aceite hidrogenado a 5 minutos.

Rendimiento del proceso de hidrogenación:

Para 10 minutos: 83% de rendimiento

Para 5 minutos: 92% de rendimiento

Con respecto al volumen del aceite crudo, corresponde a lo esperado ya que se reportó con anterioridad que este tipo de almendra tienen un contenido mayor al 40% de grasa (Lara, 2003), considerando que la extracción se llevó a cabo con un equipo diferente es posible obtener un buen rendimiento en la extracción con el uso de este equipo.

La mayor pérdida de aceite se presenta durante el proceso de refinación del aceite crudo, debido a que se llevó a cabo por lotes donde el aceite pasa por múltiples manipulaciones en particular en el blanqueo, porque una parte del aceite que queda adsorbido en el carbón activado, en el silicato de aluminio y a su vez en el papel filtro; lo cual es muy difícil de recuperar, así que se recomienda una nueva extracción con hexano y refinarlo nuevamente para recuperar parte del aceite que queda fijado a él (Belitz, 1997), y de esta manera mejorar el rendimiento del aceite refinado.

Con respecto a los rendimientos obtenidos durante el proceso de hidrogenación, se consideran aceptables considerando el peso inicial del aceite. Las mayores pérdidas en este proceso es durante la filtración del aceite para eliminar el catalizador, y puesto que una vez sometidos a este proceso las características físicas y químicas del aceite cambian, el aceite tiende a convertirse en grasa a temperatura ambiente sobre todo a mayor tiempo de hidrogenación, por este motivo sino se tienen los cuidados necesarios se puede perder el producto por quedar retenido en el papel filtro o en el envase que lo contiene. El mantenerlo a una temperatura adecuada que facilite la filtración ayuda a obtener mejores rendimientos.

5.2 PARAMETROS FISICOS DE LA ALMENDRA Y SEMILLA DE CAPULÍN

En la tabla 3 se presentan los resultados de los parámetros físicos de la semilla y de la almendra de capulín:

Tabla 3. Parámetros físicos de la semilla y de la almendra de Capulín.

	Almendra	Semilla	Almendra ^d	Se milla ^d
Ancho (cm)	0.507 ± 0.083 ^a	-	-	-
Largo (cm)	0.593 ± 0.049 ^a	-	-	-
Diámetro (cm)	-	0.7823 ± 0.0445 ^a	-	-
Peso hectolitrico (g/100ml) ^c	62.8 ± 1.7262 ^b	57.4 ± 1.202 ^b	54.83 ± 1.19 ^e	-
Peso (mg)	63.7 ± 1.759 ^b	189.7 ± 6.538 ^b	120 ^f	360 ^f

a. Promedio de 20 muestras ± su desviación estándar.

b. Promedio de 4 determinaciones ± su desviación estándar.

c. Equivalente a Kg/HL

d. Muestras obtenidas de diferentes mercados de la ciudad de México y del estado de México. (Castillo, 1997)

e. Promedio de 3 determinaciones ± su desviación estándar. (Castillo, 1997)

f. Promedio de 30 unidades sin desviación estándar (Castillo, 1997)

En la tabla 3, se presentan los resultados de los parámetros físicos para la semilla que utilizamos para esta investigación y se comparó con otros resultados obtenidos en un trabajo anterior (Castillo, 1997). Se puede ver, que en el caso del peso hectolítico, existe diferencia significativa, esto puede deberse, que para el caso de la almendra

que se utilizó para comparar los resultados obtenidos las muestras fueron muy heterogéneas debido a que no eran representativas de un mismo lugar, así que estas podían ser mas grandes o más pequeñas, o no haber sido recolectadas en la misma época del año, lo que ocasiona variaciones al comparar estos resultados con los obtenidos para el caso de la semilla que se compró en Huamantla, Tlaxcala. Esto también se observa para el peso tanto de la semilla y la almendra. Considerando que la muestra que se utilizó para este estudio proviene de un mismo lugar y que se compró en la misma época del año, consideramos que los datos obtenidos son característicos para la semilla de capulín de este lugar.

5.2.1 RELACIÓN CÁSCARA-ALMENDRA

Tabla 4. Relación Cáscara-Almendra

Cáscara ^a	Cáscara ^b	Almendra ^a	Almendra ^b
68.736 ± 4.031 %	66.7 %	32.4516 ± 3.0124%	33.33 %

a.-Es el promedio de 10 muestras ± su desviación estándar

b.- Muestras obtenidas de diferentes mercados de la ciudad de México y del estado de México y promedio de 30 unidades (Castillo, 1997)

En el caso de la relación cáscara-almendra de la tabla 4, se puede observar que no existe diferencia significativa al comparar con los resultados de las muestras obtenidas en diferentes lugares, no obstante las diferencias en tamaño y peso de los diferentes lotes de semilla de capulín, si mantienen la relación cáscara: almendra de aproximadamente 67:33 en porcentaje.

5.3 DENSIDAD CALORICA DEL ACEITE DE LA ALMENDRA DE CAPULÍN.

En la tabla 5 se muestran los contenidos energéticos del aceite de capulín crudo y refinado, comparados con los aceites de otras semillas oleaginosas y cereales. (Chávez, 1997).

Tabla 5. Contenido Energético del aceite de la almendra de capulín crudo y refinado y de otros aceites comestibles.

Aceite	KJ/g de muestra	Kcal/g de muestra
Capulín crudo (<i>Prunus Serotina</i>)	38.66 ± 3.24 ^a	9.234 ± 0.77 ^a
Capulín refinado (<i>Prunus serotina</i>)	35.47 ± 1.75 ^a	8.48 ± 0.42 ^a
Cacahuete (<i>Arachis hipogaea</i>)	36.96	8.84
Soya (<i>Glicine max</i>)	36.96	8.84
Maíz (<i>Zea mays L.</i>)	36.96	8.84
Oliva (<i>Olea Europaea</i>)	36.96	8.84

a.- Es el promedio de cuatro determinaciones para cada aceite ± desviación estándar.

De la tabla 5, se observa que el contenido energético del aceite crudo y refinado de la almendra de capulín es similar al de otros aceites comestibles. Se esperaría que los valores del contenido calórico tanto del aceite refinado como del aceite crudo fueran similares, en este caso, para el aceite refinado su valor es similar a los reportados para los otros aceites, pero hay que considerar que los procesos a los que se sometió el aceite, donde se elimina principalmente ácidos grasos libres, fosfatidos, proteínas, e hidratos de carbono el contenido energético debería elevarse. La importancia del elevado contenido energético del aceite es que el rendimiento de la oxidación completa es de 38.6 KJ/g a diferencia de las aproximadamente 16.7 KJ/g que se obtienen de los hidratos de carbono y proteínas. La base de esta gran diferencia en la liberación de calorías es que los ácidos grasos están mucho más fuertemente reducidos y además los triglicéridos son muy apolares y por ello se almacenan casi en forma anhidra, mientras que las proteínas y los hidratos de carbono son mucho más polares, por lo tanto, están hidratados en mayor grado.

Cabe mencionar que no fue posible determinar los valores para los aceites hidrogenados, puesto que la cantidad obtenida durante las hidrogenaciones no era la suficiente para poder realizar las determinaciones.

5.4 PERFIL DE ACIDOS GRASOS.

En la tabla se presentan los porcentajes de los ácidos grasos que se encuentran en el aceite de capulín crudo y refinado obtenidos por cromatografía de gases.

Tabla 6 . Perfil de ácidos grasos en el aceite crudo y aceite refinado de la almendra de Capulín.

Ácidos Grasos	# carbonos e insaturaciones	Aceite Crudo	Aceite Refinado	Aceite Hidrogenado 5 minutos	Aceite Hidrogenado 10 minutos
Ác. Palmítico	C16:0	4.0033	4.9616	8.233	6.610
Ác. Palmítoleico	C16:1	-	0.4981	-	-
Ác. Esteárico	C18:0	3.705	3.8352	25.486	26.595
Ác. Oleico	C18:1 n9 c	33.587	33.045	31.243	45.381
Ác. Vaccénico	C18:1 n7	1.105	1.2817	-	-
Ác. Linoleico	C18:2 n6 c	29.277	32.284	9.940	6.280
Ác. Linolénico	C18:3 n6	0.284	0.196	-	-
Ác. Eicosanoico	C20:1	0.965	5.1673	-	-
Ác. Erúcico ^a	C22:1 n9	6.552	6.846	2.134	0.846
Ác.Eicosatrienoico	C20:3 n3	5.773	4.068	-	-
Ác. Araquidónico	C20:4 n6	4.666	7.1459	-	-
No Identificados ^b		12.676	5.275	22.406	17.287

a.- El nivel máximo permitido es de 5% (Kirk y Sawyre, 1996)

b.- Es la suma de las áreas de picos que no pudieron ser identificados

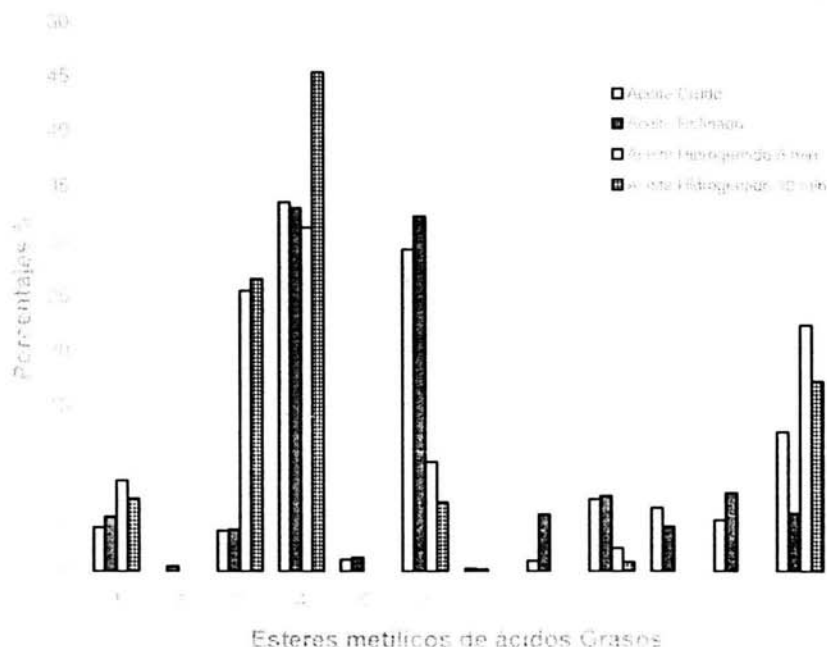
En la tabla se describe el perfil de ácidos grasos del aceite crudo, refinado, hidrogenado a 5 minutos, e hidrogenado a 10 minutos; como era de esperarse (Hilditch, 1956), los niveles de ácido oleico y linoleico son los mayores y en pequeña cantidad se encuentran el ácido γ -linolenico y eicosanoico (Swern, 1982). Además se puede ver que

los niveles de los ácidos presentes son similares para ambos aceites, solo encontrándose un contenido mayor para el ácido araquidónico e eicosanoico para el aceite refinado; así como una disminución en los ácidos grasos no identificados.

Otra diferencia que se encontró en estos aceites es la presencia de ácido palmitoleico para el caso del aceite refinado; si consideramos que el proceso de refinación, específicamente en el desgomado, donde se eliminan los fósfolípidos, los cuales contienen una cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, se esperaría ver disminuida la cantidad de ácidos presentes como el ácido araquidónico y posiblemente eicosanoico. Pero en este caso se observa lo contrario; esto se debió posiblemente a que la reacción de esterificación de estos ácidos no se efectuó de manera adecuada, y se mantuvieron como ácidos grasos libres por lo cual no pudieron ser detectados por el cromatógrafo, si consideramos que estos ácidos grasos son muy inestables a la oxidación por su número de insaturaciones es posible que el aceite crudo haya sufrido algún tipo de daño, específicamente oxidación, debido a que no se mantuvo en condiciones adecuadas posteriormente a su extracción, y de esta manera no haya sido posible la detección del ácido palmitoleico en el aceite crudo, y los niveles del ácido araquidónico e eicosanoico, sean menores a los detectados en el aceite refinado.

Es muy importante resaltar la presencia de Ácido Erúico, que aunque no está en el mismo nivel que el oleico y linoléico, su presencia es mayor al 5% del total de ácidos grasos tanto en el aceite crudo como en el refinado, lo que representaría un riesgo su consumo por lo que es indispensable reducir (<5%) o eliminar su contenido.

Se puede considerar que el someter al aceite de la almendra de la semilla de capulín a un proceso de refinación, el contenido de ácido erúico no disminuye hasta considerarlo aceptable, por este motivo es necesario efectuar la hidrogenación, ya que se ha observado que este proceso disminuye considerablemente los ácidos grasos insaturados de cadena larga.



Grafica 1. Porcentaje del contenido de ácidos grasos presentes en el aceite crudo, refinado, hidrogenado a 5 minutos e hidrogenado a 10 minutos. Donde 1.ác. Palmítico, 2. ác. Palmítoleico, 3. ác. Estearíco, 4. ác. Oleico, 5. ác. Vaccénico, 6. ác. Linoleico, 7. ác. γ -Linolenico, 8. ác. Eicosanoico, 9. ác. Erúxico, 10. ác. Eicosatrienoico, 11. ác. Araquidónico, 12. No identificables.

Comparando los niveles obtenidos para los ácidos grasos presentes en las grasas hidrogenadas con respecto al aceite crudo y refinado, se puede observar que existe una similitud en los ácidos grasos identificados, pero con la diferencia que estos se encuentran en cantidades diferentes. Lo cual era de esperarse pues con este proceso se pretendía disminuir los niveles de ácidos grasos insaturados, en especial el ácido erúxico y conseguir una forma más estable de este aceite, utilizando un catalizador selectivo más afín a las dobles ligaduras.

Cabe mencionar que no era el propósito de esta investigación el controlar la intensidad del proceso de hidrogenación con el fin de conseguir la estabilidad y/o propiedades físicas requeridas para un producto final. El principal propósito de este

proceso, era reducir lo mayor posible los niveles de ácido erúico, sin importar las características físicas del aceite hidrogenado.

Los tiempos utilizados se basaron en trabajos anteriores (Barbosa, 2003) con lo cual se obtuvo una grasa dura y quebradiza a temperatura ambiente, pero con niveles menores al 5% correspondientes al ácido erúico. Esto representa un factor importante, pues la transformación del estado físico del aceite a temperatura ambiente, convirtiéndose en una grasa se debe a que los ácidos grasos insaturados se transforman a ácidos grasos saturados lo cual ocasiona que la composición en la estructura de los cristales cambie (polimorfismo) a unos más definidos. Por lo que hay que considerar en un futuro una aplicación específica que se le quiera dar a este aceite.

Se pudo observar que entre mayor es el tiempo de reacción, se obtiene una grasa más saturada reduciendo el número de los dobles enlaces, pero con presencia de ácidos grasos monoinsaturados, esto se puede observar en la tabla 6, en la gráfica 1, y en los cromatogramas 4 y 5. Los ácidos grasos que están presentes en el aceite hidrogenado a 5 minutos que en el hidrogenado a 10 minutos son los mismos, pero en diferente proporción.

Hay que considerar que durante el proceso de hidrogenación todos los ácidos grasos presentes que sean más insaturados van a reaccionar de manera que llegará a formar un ácido graso más estable, es decir, menos insaturado, así que se esperaba que todos los ácidos grasos presentes en los aceites al desaparecer sus dobles enlaces llegaran a formar parte de los ácidos menos insaturados de acuerdo con sus velocidades relativas de hidrogenación, por este motivo se presenta el aumento de ácido Oleico, y a su vez la disminución del ácido Linoleico el cual se transforma para formar parte del ácido Oleico.

No hay que olvidar que durante este proceso, también se llevan a cabo cambios en la configuración de los ácidos grasos, en los cromatogramas 4 y 5 detectamos una serie de picos que no fue posible identificar, es muy probable que se tratara de isómeros *trans*, por este motivo, se puede observar en la tabla que los niveles de los ácidos grasos no identificados aumentan para ambos tiempos de hidrogenación con respecto a los aceites crudo y refinado.

Para el caso del aceite hidrogenado a 10 minutos, el nivel de ácido oleico aumentó más que en el hidrogenado a 5 minutos, y a su vez disminuyeron los porcentajes de los demás ácidos grasos, incluyendo los no identificados, lo que indica que la

velocidad relativa de reacción de los ácidos con un número de carbonos mayores al ácido oleico (C18:1) se ve favorecida hacia la formación de ácido oleico, y para el caso de los ácidos grasos con un número menor de carbonos que el ácido oleico, se dirige hacia el aumento de ácido esteárico y palmitico y la posible disminución de este ácido se deba a la formación de ácidos grasos menores al palmitico, y con tiempos de retención menores, y en cantidades muy pequeñas por lo que no fueron detectados en los respectivos cromatogramas.

Con la hidrogenación fue posible disminuir el contenido de ácido erúxico a niveles menores al 5%; al aumentar los tiempos de hidrogenación de 5 a 10 minutos, el nivel disminuye aún más conforme se aumenta el tiempo del proceso. Se puede considerar suficiente una hidrogenación de 5 minutos, considerando que las características físicas del aceite lo hacen más manipulable, es decir, no se tienen tantas pérdidas como con el aceite hidrogenado a 10 minutos durante la filtración para eliminar el catalizador y esto se ve reflejado en el rendimiento. Podría considerarse un tiempo menor a 5 minutos, con la única finalidad de sólo disminuir el ácido erúxico a un nivel menor al 5%, Sin embargo, tendría que considerarse el volumen del aceite a hidrogenar y la cantidad de ácidos grasos *trans* presentes, si se pretende que este aceite pueda proponerse como fuente calórica convencional para la alimentación humana o animal.

En el apéndice 4, se presentan los cromatogramas 2,3,4 y 5 se muestran los ácidos grasos presentes en todos los procesos a los que fueron sometidos el aceite crudo, los cuales como se puede observar son muy similares con respecto a los tiempos de retención de los picos identificados en los diferentes procesos.

5.5 PARAMETROS FISICOQUÍMICOS.

Tabla 7. Parámetros fisicoquímicos del aceite crudo, refinado, hidrogenado a 5 minutos e hidrogenado a 10 minutos de la almendra de capulín.

	Aceite Crudo	Aceite Refinado	Aceite Hidrogenado (5 min.)	Aceite Hidrogenado (10 min)
Densidad relativa (50°C)^a	0.9449 ±0.0119	0.966±1.342x10 ⁻³	0.9183±1.069x10 ⁻³	0.893±6.082x10 ⁻⁴
Punto de fusión (°C)^b	2 a 6	4 a 7	48 a 55	54 - 59
Índice de refracción (50°C)^a	1.479±2.08x10 ⁻³	1.480	1.462 ± 5.7x10 ⁻⁴	c
Índice de Yodo (g I₂/g muestra)^a	126.775±2.398	125.25±4.1862	83.7046±2.5739	68.9115±2.949

a. Promedio de 3 determinaciones ± su desviación estándar.

b. Promedio del rango de 3 determinaciones

c. No se pudo realizar la determinación.

En la tabla 7 se presentan los parámetros fisicoquímicos analizados en el aceite de la almendra de capulín, en primer término tenemos: la densidad relativa en el aceite crudo y refinado obtenidos, son muy parecidos a los reportados anteriormente (Barbosa, 2003; Ruiz, 2000). La diferencia en los valores obtenidos por estos aceites se debe principalmente al proceso de refinación puesto que el aceite crudo contiene diferentes compuestos que difieren de los triglicéridos por lo que puede afectar de manera que disminuye su valor con respecto al aceite refinado, y en este trabajo se utilizó el aceite refinado para realizar la hidrogenación. Pero en el caso de los aceites hidrogenados no se contaba con algún dato de comparación, pero considerando que al ser hidrogenados las características físicas y químicas cambian y la densidad relativa tiene una relación directa con el estado de insaturación, que en el caso del aceite crudo y refinado, se encuentran en estado líquido a temperatura ambiente, y el número de insaturaciones es mayor que en el caso de los aceites hidrogenados, considerando el porcentaje de los ácidos grasos presentes (tabla 6), con respecto al número de carbonos e insaturaciones,

podemos decir que también tiene una relación con el peso molecular. Por lo tanto el valor de la densidad es mayor para el aceite crudo y refinado que para los aceites hidrogenados, puesto que al hidrogenar el número de insaturaciones disminuye al igual que su peso molecular, esto se observa al aumentar el tiempo de hidrogenación de 5 minutos a 10, donde se observa una disminución en la densidad. Las condiciones de temperatura (50°C) a las que se sometió esta prueba se debió a que los aceites hidrogenados se solidificaban a temperatura ambiente, por lo que se trató que esta prueba se llevara a cabo con todas las muestras en el mismo estado físico (líquido) y a las mismas condiciones para evitar variaciones en los resultados.

El punto de fusión indica el grado de insaturación y el tamaño de los ácidos grasos presentes tanto en el aceite crudo, refinado y aceites hidrogenados, ya que estos son valores que tienden a disminuir al aumentar las dobles ligaduras y aumentar su valor al disminuir la presencia de insaturaciones, de igual manera, un valor alto de punto de fusión indica que la longitud de los ácidos grasos presentes son menores, como se puede observar los valores del aceite crudo y refinado son pequeños en comparación con los aceites hidrogenados, y al aumentar el tiempo de hidrogenación, el punto de fusión aumenta debido al polimorfismo que ocurre en los cristales al hidrogenar el aceite debido a la saturación de los ácidos grasos presentes.

Al compararlos con datos anteriores (Barbosa, 2003); los datos son mayores pues no representan valores negativos, y son más parecidos a los reportados por Ruiz (2003), pero hay que recordar que se trata de muestras diferentes y que las condiciones en las que se efectuaron las pruebas no son las mismas.

Existe una relación entre el índice de refracción y el índice de yodo, el cual se puede aplicar para la mayoría de las grasas y aceites, incluyendo las que contienen ácido erúico, o son sometidas a un proceso de hidrogenación (Swern, 1982). A medida que disminuye el índice de yodo, el índice de refracción también disminuye. Si consideramos que el índice de refracción nos permite identificar y comprobar la calidad de los aceites, para el aceite crudo y refinado se obtuvo un valor muy similar, lo que nos indica que se trata del mismo aceite, pero en el caso del aceite hidrogenado a 5 minutos, la correlación nos explica la disminución del valor del índice de refracción con respecto al aceite crudo y refinado, debido a la disminución de insaturaciones y de la longitud de los ácidos grasos.

No fue posible obtener el valor del índice de refracción para la grasa hidrogenada a 10 minutos debido a que la temperatura del baño del agua (50°), no fue la suficiente para mantenerla en estado líquido.

Los valores obtenidos para el índice en el caso del aceite crudo y el refinado, son valores son altos con respecto a los aceites hidrogenados, y esto era de esperarse, el índice de yodo proporciona información acerca de las insaturaciones presentes y esto se ve reflejado en los ácidos grasos insaturados presentes en los diferentes procesos a los que se sometió el aceite crudo, si observamos la tabla 6, los valores mayores en el índice de yodo indican un mayor contenido de estos ácidos grasos, los cuales disminuyen al someterlos al proceso de hidrogenación, logrando la disminución en los niveles de ácido erúico debido a la saturación de los enlaces.

Al aumentar el tiempo de hidrogenación la saturación es mayor, disminuyendo aún más el índice de yodo y sobre todo, el contenido de ácido erúico.

Al aceite crudo y refinado lo podemos clasificar por su valor de yodo dentro de los aceites secantes, y los aceites hidrogenados pueden entrar en la clasificación de semi-secante y no secantes.

Comparando los datos obtenidos con los trabajos anteriores (Barbosa,2003; Ruiz, 2000), se esperaba que los índices de yodo sobre todo para el aceite crudo y refinado, fueran mayores, pero cabe mencionar que estas pruebas se realizaron casi al final del trabajo experimental, así que considerando la inestabilidad de las instauraciones, es muy probable que estas hayan sufrido algún daño; por lo que se recomienda realizar estas pruebas inmediatamente después de haber extraído el aceite y sometido a los diferentes procesos.

5.6 TOXICIDAD AGUDA

En el estudio de toxicidad aguda los síntomas clínicos observados fueron, lordosis, cifosis, ataxia, piloerección, erección caudal, agresividad, aletargamiento, excitación, disnea, cianosis e hipotermia (Ver. Glosario), en la apéndice 1 se muestra la forma en la que fueron anotadas las características clínicas observadas durante la prueba.

Este estudio se realizó durante 14 días de acuerdo al protocolo de la EPA (1996), utilizando una única dosis de 15 g/kg de p.c por vía oral para los 5 lotes con 5 ratones con un peso promedio de ratones de 18 gramos. No se observó ningún síntoma que indicara la posibilidad de toxicidad durante la prueba. Ningún ratón murió. Por lo tanto, se puede considerar que el aceite crudo, refinado e hidrogenado de la almendra de la semilla de capulín es prácticamente no tóxico a corto plazo, pero se considera necesario realizar un estudio subcrónico para ampliar su relativa inocuidad a mediano plazo.

Al finalizar este estudio se realizó una necropsia a todos los ratones para calcular la relación porcentual de órganos, utilizando para este estudio: el corazón, el hígado y los riñones, por ser los órganos que intervienen en la absorción y transporte de lípidos.

5.6.1 RELACIÓN PORCENTUAL DE ÓRGANOS.

Se aplicó un análisis estadístico a los pesos finales de los ratones al término de estudio (Tabla 8) y no se encontró diferencia significativa a los que se le aplicó la dosis de aceite de capulín crudo y en sus diferentes procesos contra el control, la misma tendencia ocurrió con todos los órganos estudiados que fue el incrementar su peso a medida que crecieron los ratones; además de que el hecho de no estar sometidos a una dieta individual les permitió consumir todo el alimento deseado durante el tiempo que duró el estudio.

En la tabla 9 se muestran los valores de la relación porcentual de los órganos (hígado, corazón y riñones) extraídos en los ratones a los que se les suministró la dosis con los aceites crudo, refinado, hidrogenado a 5 minutos e hidrogenado a 10 minutos de la almendra de la semilla de capulín durante el estudio de toxicidad aguda.

Los resultados obtenidos de la relación porcentual para cada uno de los órganos extraídos fueron comparados contra el lote control (aceite de girasol) durante el estudio de

toxicidad aguda, en los cuales se presentan valores muy similares al control para el caso de hígado y corazón, al aplicar a los datos un estudio estadístico (análisis de varianza), los datos no presentan diferencia significativa respecto al control, lo que nos indica que no existió un trabajo mayor del hígado para poder metabolizar los diferentes aceites, y para el corazón no representaron un factor de riesgo, pues se encuentran relativamente al mismo nivel que el control.

Al analizar estadísticamente los datos obtenidos de los riñones, se observa diferencia significativa en aceite refinado con respecto al control, pero posiblemente esto se debió a la relación de los pesos corporales finales de los ratones (tabla 6) del lote de aceite refinado son mayores a los pesos finales del lote control. Aunque no podría descartarse un crecimiento anormal, debido al consumo de los ácidos grasos que contiene el aceite refinado. Es interesante notar que no obstante que no se presentó DSE en la relación porcentual del corazón de los preparados que tienen un contenido mayor al 5% de ácido erúxico, si dieron el valor más alto, lo que concuerda con lo reportado en la bibliografía. (Johnson, 1989; Linder, 1995; Mattson, 1973)

Físicamente, el hígado, los riñones y el corazón no presentaron ninguna anomalía física, como diferente tonalidad de color, presencia de manchas, etc.

Se recomienda realizar un perfil lipídico al plasma sanguíneo de los ratones en un estudio subcrónico, para verificar los niveles de colesterol y descartar un posible trabajo excesivo del hígado y riñones, y si el consumo de los aceites hidrogenados no representa un factor de riesgo para la cardiopatía coronaria.

Tabla 8. Pesos de los ratones durante el estudio de toxicidad aguda.

LOTE I: CONTROL			ACEITE DE GIRASOL			CEPA: CD1			TOXICIDAD AGUDA			
Ratón	# Ratón	Peso i	Día 1	Día 3	Día 6	Día 8	Día 10	Día 13	Día 14			
1	25	14.3	15.3	16.9	18.5	18.4	17.3	17.7	18.6			
2	22	17	18.2	19.7	20.3	21.7	21.3	20.7	21.7			
3	6	17.6	20	22.2	23.9	22.3	24.1	25.9	26.9			
4	1	19.6	21.9	26.2	28	28	28.4	26.2	25.9			
5	4	20	21.9	24.1	26.4	24.3	26.9	27.2	27.5			
Media		17.7	19.46	21.82	23.42	22.94	23.6	23.54	24.12			
σ		2.289	2.788	3.648	4.001	3.536	4.449	4.130	3.829			

LOTE II: ACEITE HIDROGENADO 10 MIN.			CEPA: CD1			TOXICIDAD AGUDA			
Ratón	# Ratón	Peso i	Día 1	Día 3	Día 6	Día 8	Día 10	Día 13	Día 14
1	24	15.2	16.5	17.5	20.5	21.7	20.2	20.1	21
2	15	16.9	19.1	20.1	22.7	23.2	22.4	22.6	23
3	12	16.6	18.8	21.2	23.6	24.9	25	24.4	24.8
4	14	19.3	21.8	22.1	24.4	24.6	24.2	22.3	23.4
5	11	20	22	25.6	27	26.4	25.8	24.7	
Media		17.6	19.64	21.3	23.64	24.16	23.52	22.82	23.156
σ		1.994	2.296	2.950	2.378	1.784	2.243	1.854	1.570

LOTE III: ACEITE HIDROGENADO 5 MIN.			CEPA: CD1			TOXICIDAD AGUDA			
Ratón	# Ratón	Peso i	Día 1	Día 3	Día 6	Día 8	Día 10	Día 13	Día 14
1	3	15.9	18.7	19.7	21.5	22.7	23.3	23.6	24.4
2	21	16.8	18.6	20.4	21.7	22.9	23.1	22.9	21.8
3	10	17.7	19.6	19.6	19.1	20.3	20.6	21.2	21.6
4	16	18.7	21.3	22.2	23	22.8	23.4	22.7	23.7
5	0	20	21.8	22.4	23.8	24.3	25.8	25.4	25.5
Media		17.82	20	20.86	21.82	22.6	23.24	23.16	23.4
σ		1.602	1.478	1.352	1.791	1.442	1.842	1.527	1.681

LOTE IV: ACEITE REFINADO				CEPA: CD1		TOXICIDAD AGUDA							
Ratón	# Ratón	Peso i	Día 1	Día 3	Día 6	Día 8	Día 10	Día 13	Día 14				
1	13	16	16.5	19.6	21.8	22.2	20.6	22.8	23.4				
2	20	16.5	17.8	20.1	21.6	22	21.3	22.9	23.1				
3	2	17.8	19.9	22.2	23.6	25.6	23	25.3	25.9				
4	7	18.4	20.8	22.5	24.5	25.8	25.5	27.6	27.4				
5	23	21	22.8	23.8	25.8	26.9	24.8	26.9	27.2				
Media		17.94	19.56	21.64	23.46	24.5	23.04	25.1	25.4				
σ		1.964	2.481	1.750	1.788	2.247	2.129	2.217	2.048				

LOTE V: ACEITE CRUDO				CEPA: CD1		TOXICIDAD AGUDA							
Ratón	# Ratón	Peso i	Día 1	Día 3	Día 6	Día 8	Día 10	Día 13	Día 14				
1	26	16.3	16.8	19.7	20.7	21.7	22.6	21.5	22.6				
2	17	16.5	16.6	18.1	20.3	22	21.9	22.6	22.7				
3	5	17.9	19.6	22.3	25.6	27.2	27.7	27.7	27.6				
4	30	18.2	20.2	21.9	24.2	25	26.2	26.2	25.7				
5	27	22.2	23.2	24.8	25.5	26.5	25.8	26.1	26.2				
Media		18.22	19.28	21.36	23.26	24.48	24.84	24.82	24.96				
σ		2.376	2.722	2.569	2.583	2.531	2.481	2.636	2.221				

Tabla 9. Relación de órganos porcentual del estudio de toxicidad aguda.

RELACION PORCENTUAL DE ORGANOS										
Relación peso órgano/peso corporal * 100										
Aceite de Girasol			Aceite Crudo			Aceite Refinado				
	Hígado	Riñones	Corazón	Hígado	Riñones	Corazón	Hígado	Riñones	Corazón	
ratón 1	5.7032	1.3505	0.6613	5.5911	1.553	0.8747	6.6679	1.632	0.7658	
ratón 2	5.941	1.629	0.5106	5.1242	1.623	0.7242	6.29	1.7177	0.7077	
ratón 3	6.2836	1.6223	0.6371	5.3992	1.5753	0.5684	7.1482	1.9733	0.8057	
ratón 4	6.406	1.675	0.629	5.8544	1.6124	0.6101	6.1423	1.8102	0.5572	
ratón 5	6.909	1.552	0.6509	5.883	1.7923	0.8942	6.0202	1.7761	0.805	
Media	6.249	1.566	0.618	5.570	1.631	0.734	6.454	1.782	0.728	
σ	0.4621	0.1281	0.0612	0.3191	0.0944	0.1486	0.4582	0.1266	0.1037	

RELACION PORCENTUAL DE ORGANOS										
Relación peso órgano/peso corporal * 100										
Aceite de Girasol			Aceite Hidrogenado 5 min.			Aceite Hidrogenado 10 min.				
	Hígado	Riñones	Corazón	Hígado	Riñones	Corazón	Hígado	Riñones	Corazón	
ratón 1	5.7032	1.3505	0.6613	6.356	1.464	0.7152	5.7381	1.5109	0.609	
ratón 2	5.941	1.629	0.5106	5.824	1.623	0.7317	7.31	1.7256	0.9739	
ratón 3	6.2836	1.6223	0.6371	6.829	1.7598	0.5959	6.852	1.5209	0.6569	
ratón 4	6.406	1.675	0.629	4.9713	1.5877	0.6067	6.1905	1.498	0.5397	
ratón 5	6.909	1.552	0.6509	6.22	1.521	0.5481				
Media	6.249	1.566	0.618	6.040	1.591	0.640	6.523	1.564	0.695	
σ	0.4621	0.1281	0.0612	0.6971	0.1124	0.0799	0.6962	0.1082	0.1921	

8. CONCLUSIONES.

- ❧ Se caracterizó la semilla y la almendra de la semilla de capulín mediante la determinación de los parámetros físicos.
- ❧ El perfil de ácidos grasos del aceite de almendra de capulín muestra elevadas concentraciones de ácido oleico, linoleico y en menores concentraciones pero sobresaliente el ácido erúico, ya que el contenido presente de este ácido graso en el aceite crudo y en el refinado es mayor al 5%, por lo que sobre pasa el límite establecido para consumo humano.
- ❧ El contenido energético del aceite de la almendra de capulín es comparable con el de otros aceites comestibles utilizados, por lo que se podría considerar como una fuente alternativa de alimento energético.
- ❧ No es suficiente la refinación para eliminar o disminuir el contenido de ácido erúico presente en el aceite a niveles aceptables.
- ❧ El proceso de hidrogenación, dependiendo de su tiempo de reacción, disminuye el contenido de ácido erúico a niveles menores del 5%.
- ❧ En el estudio de toxicidad aguda el aceite crudo de la almendra de capulín, refinado, hidrogenado a 5 minutos e hidrogenado a 10 minutos no mostró signos de toxicidad, considerándolo relativamente inocuo por vía oral a corto plazo.
- ❧ En el estudio de relación porcentual de órganos no se encontró diferencia significativa entre el hígado y el corazón con respecto al control, pero en los riñones presentó diferencia significativa en el aceite sometido a el proceso de refinación con respecto al control.

7. RECOMENDACIONES.

- ✎ Es necesario llevar a cabo un estudio de toxicidad subcrónica, para ver el efecto provocado a mediano plazo por el consumo del aceite sometido a los diferentes tratamientos
- ✎ De igual manera se recomienda realizar un perfil lipídico del plasma sanguíneo de los ratones, así como una biometría hemática, para poder confirmar que una vez sometido, el aceite, a un proceso de hidrogenación, tiene la posibilidad de ser utilizado como una fuente de aceite comestible para alimentación humana y/o animal.
- ✎ Es conveniente conocer el porcentaje de ácidos grasos *trans* que contienen los aceites sometidos al proceso de hidrogenación para confirmar el efecto en el consumo de aceites hidrogenados

Apéndice 1.

Toxicidad aguda: _____ Fecha: _____

Especie: _____ Cepa: _____ Peso inicial: _____ Peso final: _____ Edad: _____

Descripción: _____

Vehículo: _____ Concentración: _____

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

	Lordosis	Cifosis	Alaxia	Piborección	Erección caudal	Agrasividad	Alargamiento	Excitación	Dianes	Cianosis	Hipotermia
0	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											
36 h											
48 h											
Observaciones: _____											

Apéndice 2.

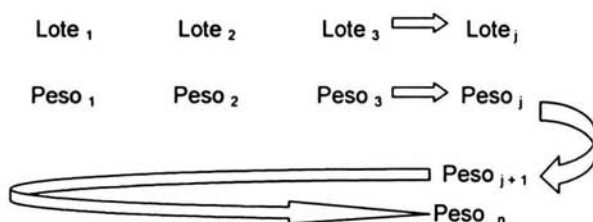
Método de la "culebra japonesa" para la distribución de animales en estudio.

El método de la "culebra japonesa" se aplica con el objeto de distribuir un conjunto de animales en un determinado número de grupos o lotes de tal forma que se tenga ahí el mismo peso promedio por lote.

En este método, los animales se pesan al azar; de acuerdo a su peso, se ordenan en forma ascendente o descendente (dependiendo de las condiciones del experimento).

Con base en la experiencia, se recomienda pesar un número de animales mayor al que se vaya a emplear en el estudio, de tal forma que los animales con mayor y menor peso (los extremos superior e inferior en una campana gaussiana), queden eliminados al ajustar el número de animales a sus lugares correspondientes en los lotes.

Finalmente, los animales se distribuyen en dichos lotes de manera zigzagante como se muestra a continuación.



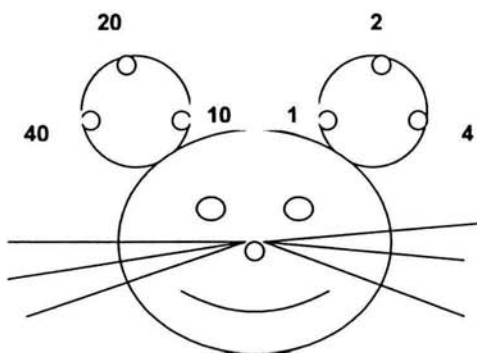
Donde:

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

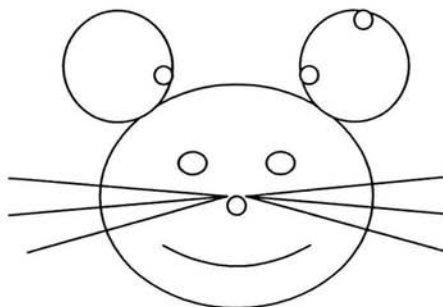
Apéndice 3.

Numeración de ratones en el estudio de Toxicidad Aguda.

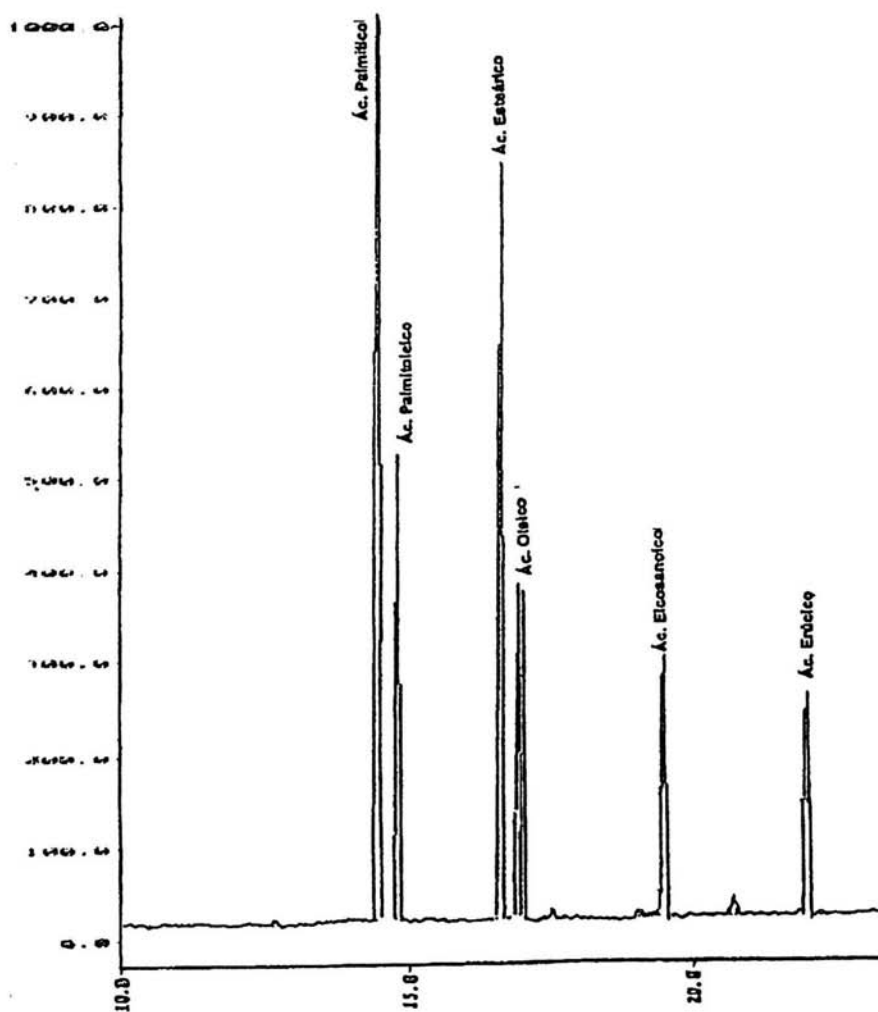
Para poder diferenciar a los ratones, se les hacen pequeñas perforaciones en las orejas, como indica el siguiente diagrama:



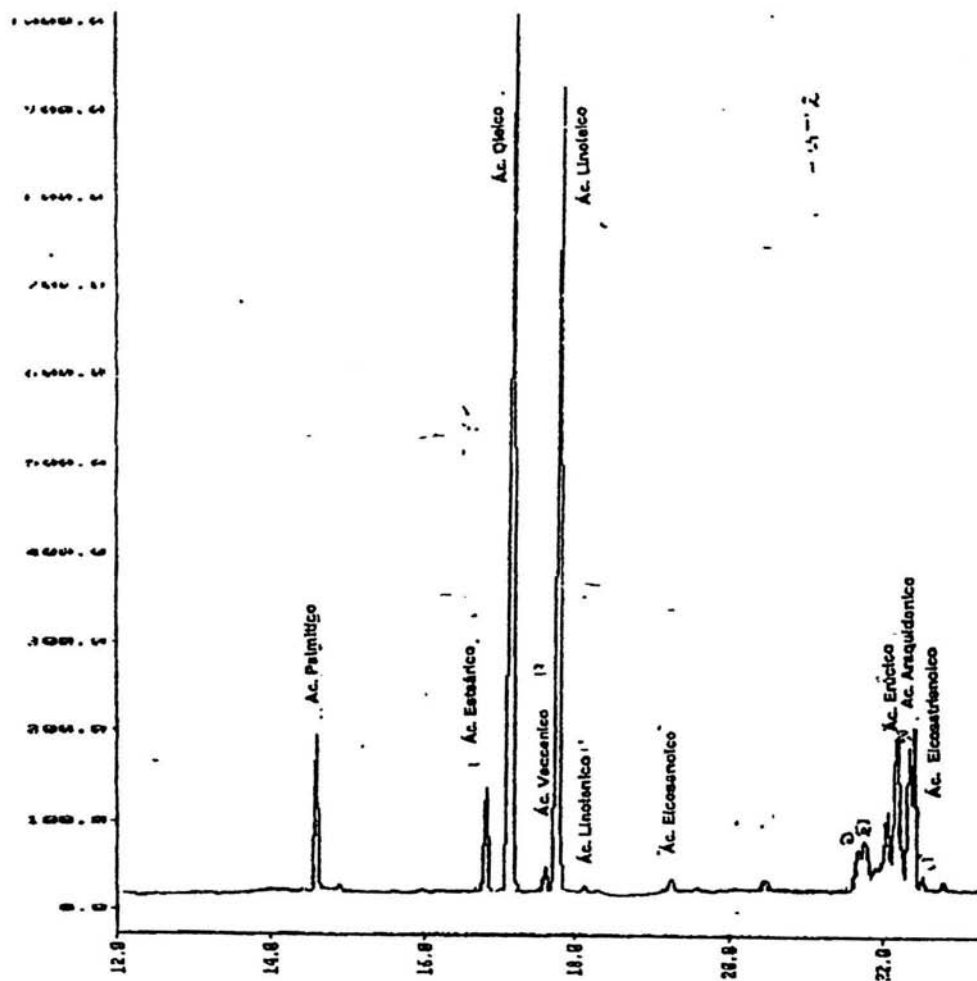
Así, por ejemplo, si queremos marcar a un ratón con el número 13, se realizaría las siguientes perforaciones:



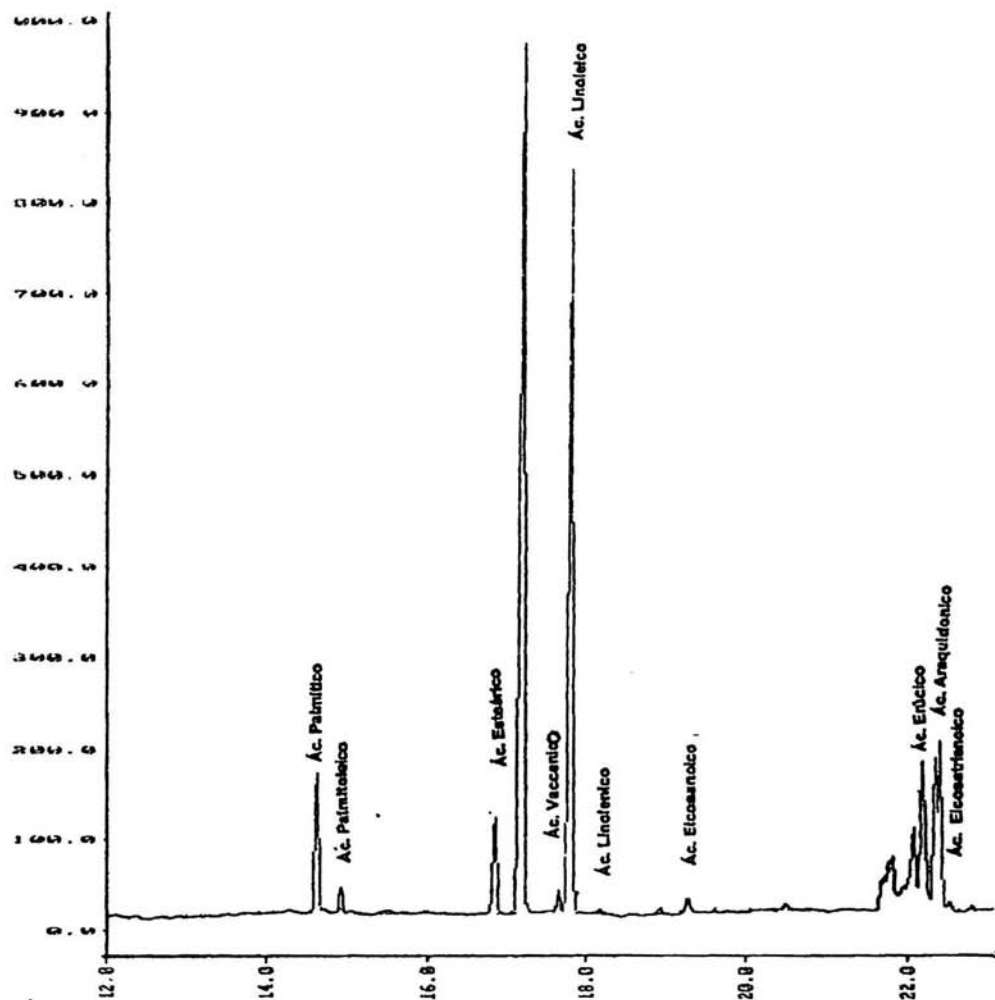
Apéndice. 4 Cromatograma 1.
Estándares (Palmitico, Palmitoleico, Esteárico, Oleico, Eicosanoico, Erúico)



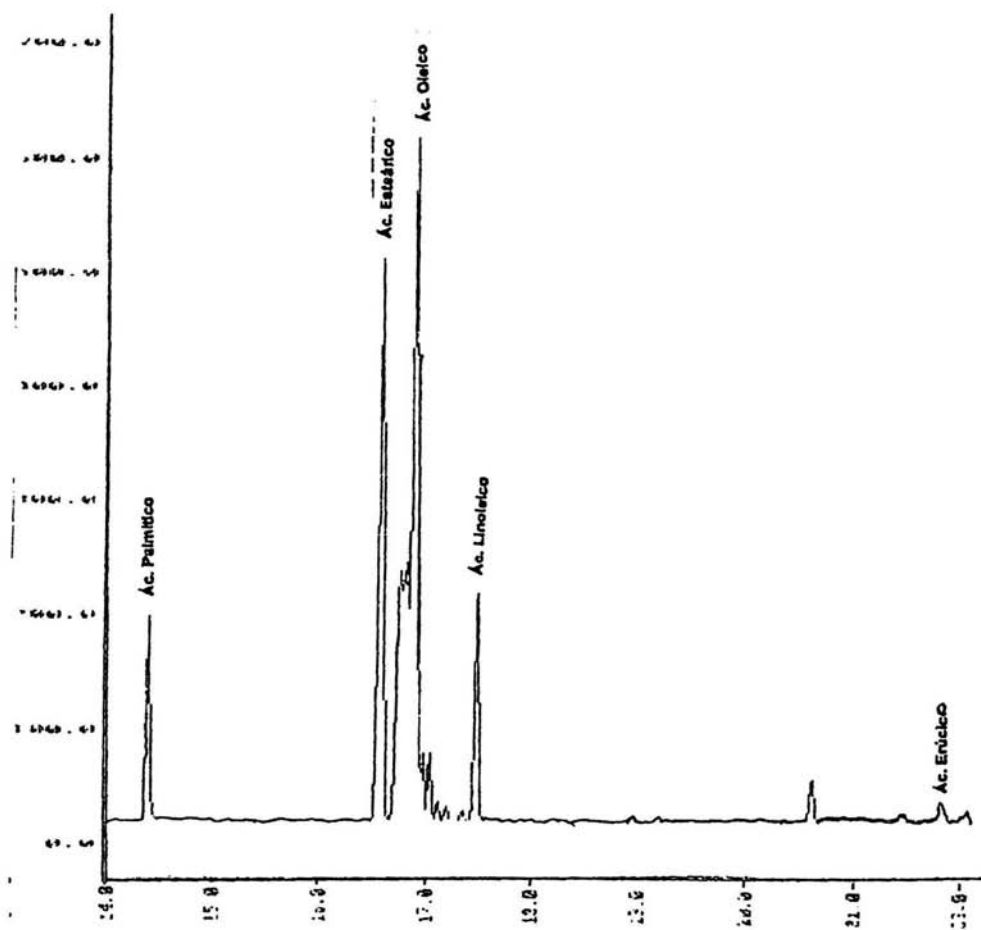
Cromatograma 2. Aceite Crudo



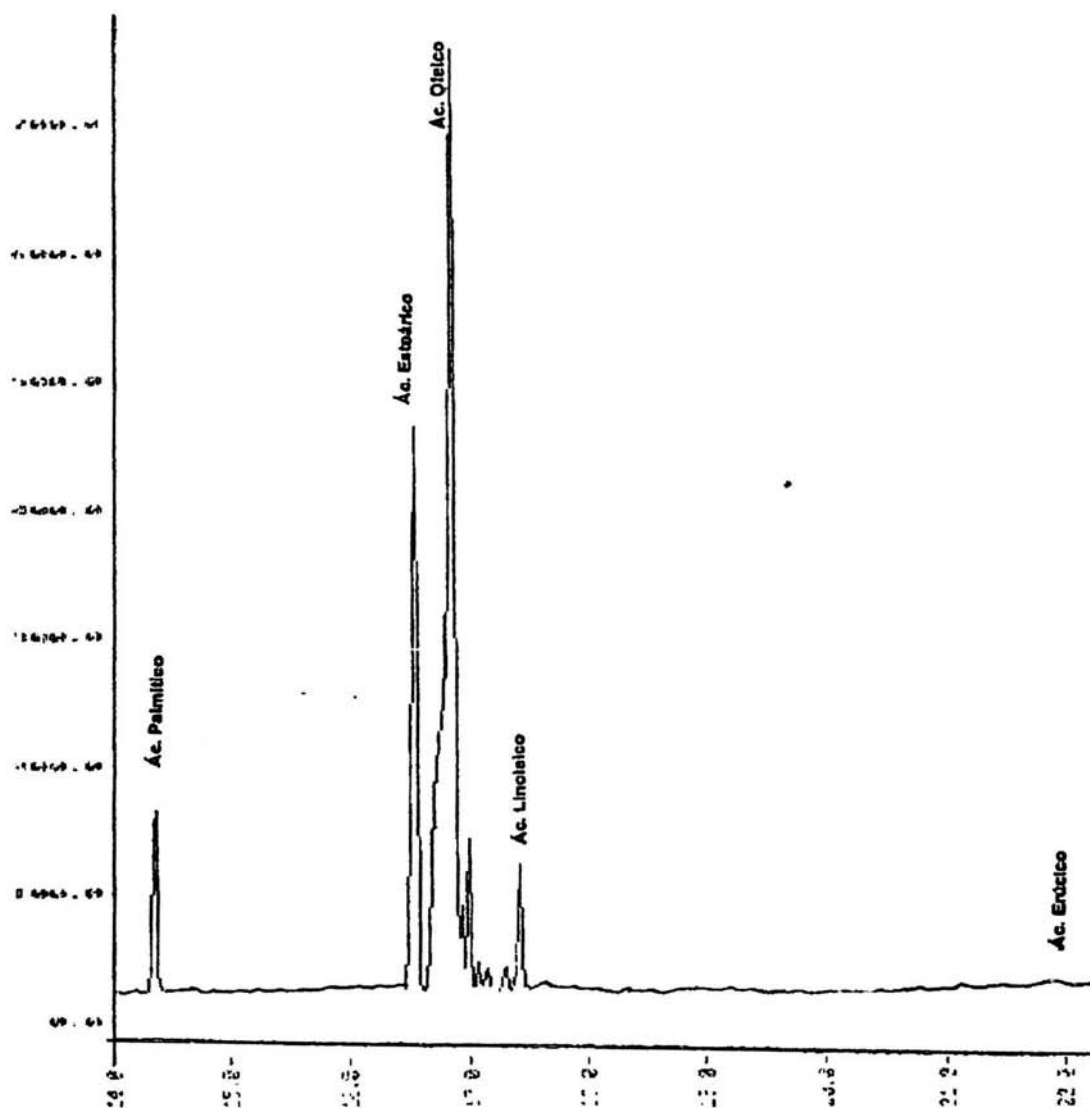
Cromatograma 3. Aceite Refinado



Cromatograma 4. Aceite Hidrogenado 5 minutos



Cromatograma 5. Aceite Hidrogenado 10 minutos.



Glosario.

- ⌘ **Agresividad.** Individuo cuyo patrón conductual se caracteriza por irritabilidad, accesos de ira y actitudes o actos destructivos como manifestaciones dominante de frustración.
- ⌘ **Aletargamiento.** Estado de somnolencia enfermiza, profunda y prolongada, sin fiebre ni infección.
- ⌘ **Ataxia.** Incoordinación de la acción muscular voluntaria, en particular de los grupos musculares usados en actividades como caminar o alcanzar un objeto debido a alguna interferencia con vías del sistema nervioso central o periférico implicadas en el equilibrio de los movimientos musculares.
- ⌘ **Cianosis.** Coloración azul púrpura (morada) de las mucosas y de la piel debida a falta de oxigenación.
- ⌘ **Xifosis.** Curvatura angular de la columna vertebral; la convexidad de la curva es posterior, suele estar en la región torácica y abarca algunas vértebras.
- ⌘ **Disnea.** Frecuencia acelerada de la respiración.
- ⌘ **Erección caudal.** Estado turgente de la cola.
- ⌘ **Exitación.** Hiperactividad.
- ⌘ **Hipotermia.** Temperatura subnormal del cuerpo. Reducción de la temperatura corporal a menos de lo normal.
- ⌘ **Lordosis.** Curvatura hacia delante de la columna vertebral lumbar.
- ⌘ **Piloerección.** Erección del pelo.
- ⌘ **Shortening.** Grasas semisólidas (plásticas). Grasas de repostería o shortenings son grasas que se emplean en la preparación de muchos alimentos. Su nombre lo deben a que aportan una característica de suavidad (en inglés "short") o terneza a los alimentos horneados. Mezclas de aceites vegetales con ciertas grasas animales, o mezclas de aceites vegetales únicamente.

8. BIBLIOGRAFIA:

Aguilar, AA. Y Zolla, C. Plantas tóxicas de México, División de Información Etnobotánica del IMSS, pág. 173-175 México, D.F. (1982).

Ahyllón, F. Obtención de un extracto enzimático con actividad de β -glucosidasa a partir de semillas de capulín (*Prunus serotina*). Tesis de la Facultad de Química, UNAM, México D.F. (1995).

Alvarado, H. E., Evaluación toxicológica de la fracción proteínica de la almendra de capulín (*Prunus serotina*). Tesis de la Facultad de Química, UNAM, México, D.F. (1999)

Álvarez, C.M. Evaluación bromatológica y toxicológica del aceite de la semilla de cacahuanano (*Gliricidia sepium*). Tesis Fac. de Química, UNAM, México, D.F. (2002)

Belitz, H.D. Química de los Alimentos, Editorial Acribia, 2ª edición, pp. 132-206, 691-723, Zaragoza. (1997)

Badui, S.D. Química de los Alimentos, 3ª Edición, pp 213-242. Alahmbra Mexicana, México, D.F. (1993).

Barbosa, S.L. Perfil de ácidos grasos del aceite de almendra de capulín (*Prunus serotina*). Tesis Fac. de Química, UNAM, México, D.F. (2003)

Bostid, F. R. (Editor) Lost crops of the incas. National Academic Press, pp 222-227 Washington, D.C. (1989).

Castillo, J. Caracterización bromatológica de varias semillas de frutos con potencial aporte de proteína y grasa dietética. Tesis Fac. de Química, UNAM, México, D.F. (1997).

Centurión, D., Espinoza, M. y Cázares, G. Catálogo de plantas de uso alimentario tradicional en la región sierra del estado de Tabasco. SIGOLFO, pág. i-iii, Villahermosa (2000).

Chávez A. y Ledesma A. Tabla de Recomendaciones y Valor Nutritivo de los Alimentos de Mayor Consumo en Latinoamérica, pp. 14a. 1997.

Comes, F., Farines, M., Aumelas, A. and Soulier, J. Fatty acids and triacylglycerols of cherry seed oil. JAOCS 69, 1224-1227 (1992).

Denis J. Designer Oil Crops, Breeding Processing and Biotechnolgy, Ed. VCH, pp 27-36, (1994)

Derelanks, M. and Hollinger, M. Handbook of Toxicology. CRC Press, pp. 51-104, 806-807, Boca Raton (1995).

Desrosier, N., Elementos de Tecnología de Alimentos. CECSA, pág 523, 531, México, D.F. (1997).

Doode, M. y Pérez, E.P. Sociedad, economía y cultura alimentaria. CIAD, A.C., pág. 9-20, 273-302, Hermosillo (1994).

EPA, Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.1100 Acute Oral Toxicity; EPA 712-C-96-190, Washington, D.C (1996)

FAO, Grasas y aceites en la nutrición humana. FAO: colección de Alimentación y nutrición No. 57, pág. 1-8, 29-51, Roma (1997).

Fennema, O., Química de los Alimentos. Ed. Acribia, pág 158-161, 221-261; Zaragoza. (1993)

Ferrando, F. Alimentos tradicionales y no tradicionales. FAO: colección de alimentación y nutrición No. 2, pág. IX-XI y 83-130, Roma (1980).

Flores, N. (Editor) ¿Producir para la desnutrición? Centro de Ecodesarrollo, pág. 13-34, 243-266, México, D.F. (1988).

Gandhi, V., Mulky, M., Mukerji, B., Iyer, V. and Cherian, D. Safety evaluation of wild apricot oil. Food Chem. Toxicol. 35, 583-587 (1997).

Granados, D. y López, G. Agroecología. U.A de Chapingo, pág. 37-166, Texcoco (1996).

Harris, C.D. Análisis químico cuantitativo. Iberoamericana, 1ª edición, México D.F., pp. 637-653, 1990.

Hernández, E. Aspectos nutricionales de los ácidos grasos "trans". Rev. Assoc. Nal. Ind. Aceites y Mantecas, 4-16, 37(1998).

Hilditch, T.P. The Chemical constitución of natural fats, Ed. Chapman and Hall; 3ª ed, pp.223-227, 511-512, London. (1956)

Johnson R. and Fritz E. Fatty Acids in Industry, Ed. Macel Dekker, pp. 17-19, 635-640. New York.(1989)

Kamel, B. and Kakuda, Y. Characterization of the seed oil and meal from apricot, cherry, nectarinen, peach and plum. JAOCS 69 (5), 492-494 (1992).

Keilens, M. y Hendrix, M. Desarrollo en la modificación de grasas. Características y beneficios en la hidrogenación. De Smet Grupo Bélgica, pág. 1-2, (Antwerp,1996).

Kirk, R.S. Pearson's Composition and Analysis of Foods, Longman Scientific and Techincal, London, pp. 624 (1995).

Klaassen, C., Amdur, M. and Doull, J. Casarett and Doull's toxicology (the basic science of poisons). 5th edition, McGraw-Hill, pp 3-32, New York. (1995)

Kotsonis, F.N., Mackey, M. and Hjelle, J.J. Nutritional toxicology. Ruven Press pp. 1-48, New York. (1994).

Lara, R.A. Evaluación Nutritiva de la Fracción proteínica de la almendra de capulín (*Prunus serotina*), Tesis Fac. de Química, UNAM, México, D.F. (2003)

Lansdown, A. Animal husbandry. In: Experimental toxicology (the basic issues). Anderson, D. and Conning, D. (Eds.) 2nd edition, Royal Society of Chemistry, pp 82-106, Cambridge (1993).

Laureles, L.R., Variability in fatty acid and triacylglycerol composition of the oil of coconut (*Cocos nucifera* L.) Hybrids and their parentals, J. Agric. Food Chem, 50: 1581-1585, 2002.

Less, R. Métodos Analíticos y de Control de Calidad, 3^a Edición, Ed. Acribia. Pp. 254-256. Zaragoza. (1992)

Li Chun P., Swain, E. and Poulton, J. *Prunus serotina* amygdalin hydrolase and prunasin hydrolase. Plant Physiol. 100, 282-290 (1992).

Liener, I.E. Toxics constituents of plant foodstuffs. Academic Press, pp. 1-237, 53-55, N.Y. (1980).

Lindner, E. Toxicología de los alimentos. Acribia, S.A. 2^a. Edición, pág. 1-103, Zaragoza (1995).

López, C.V., Obtención de un extracto enzimático con actividad de β -glucosidasa de semillas de capulín (*Prunus serotina*). Tesis Fac. de Química, UNAM, México, D.F. (1997)

López, V.G. Estudio de la composición y valor nutritivo de los residuos de uvas (*Vitis vinifera*) y su posible uso en la alimentación animal. Tesis Fac. de Química, UNAM, México, D.F. (2003)

Magaña, A. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas de Tabasco Villa Hermosa, pág. 136-146, México. (1995)

Mahan, K., Escott-Stump, S. Nutrición y Dietoterapia de Krause. 10^a Edición, pp. 52,53, 629, México, D.F. (2001)

Mansour, E., Dworschák, E., Lugasi, A., Barna, E. and Gergely, A. Nutritive value of pumpkin (*Cucurbita pepo* kaka 35) seed products. J. Sci. Food Agric. 61, 73-78 (1993).

Martínez, M. Plantas útiles de la flora mexicana. Ediciones Botas, pág. 421-422, México, D. F. (1959).

Martínez, M. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica, pág. 626 y 1232, México, D. F. (1987).

Mattson, F.H, National Academy of Science. Toxicants occurring naturally in foods, Ed. National Academy of Science; 2^aed, pp. 189-191, Washington, D.C. (1973)

- McWilliams, M. *Foods Experimental Perspectives*. McMillan Publishing Company, pp. 249-252, New York. (1989)
- Moreno, E. *Análisis físico y biológico de semillas agrícolas*. Inst. de Biología, UNAM, pág. 250-274, México, D.F. (1984).
- Murphy, D.J. *Designer oil crops (breeding, processing and biotechnology)*. VCH Publisher Inc. pp. 73-130, 253-281, New York (1994).
- Quilantán, V. Estrategias para la producción y la investigación agronómica de oleaginosas en México. *Rev. Asoc. Nal. Ind. Aceites y Mantecas* 2 (10), 10-16 (1991).
- Quilantán, V. La evolución demográfica de las oleaginosas en la alimentación e industria, ahora y a plazo. *Rev. Asoc. Nal. Ind. Aceites y Mantecas* 2 (12), 17-19 (1992).
- Ruiz, C. A. Evaluación bromatológica y toxicológica de la fracción lipídica de la almendra de capulín (*Prunus serotina*). Tesis Fac. de Química, UNAM, México, D.F. (2000).
- Sach, M. (Editor) *The PAG Compendium*. Vol. D, Worldmark Press, Ltd. pp. D729-D732 and D785-D809, New York. (1975).
- Sánchez, O. La flora del valle de México. *CECSA*, 3ª edición, pág. 191-192, México, D.F. (1981).
- Serna, S.S. *Química, Almacenamiento e Industrialización de los Cereales*, AGT Editor, S.A. pp.81, México, D.F. (1996)
- Sotelo, A., Lucas, B., Garza, L., Gira, F., Characteristics and fatty acid content of the fat of seeds of nine wild mexican plants, *J. Agric. Food Chem*, 38: 1503-1505, 1990.
- Swain, E. and Poulton J. Utilization of amygdalin during seedling development of *Prunus serotina*. *Plant Physiol*. 106, 437-445 (1994).
- Swern, D. *Bayley's industrial oil and fat products*. Vol. 1, 4th edition John Wiley and Sons. pp. 29-30, 284, 413-423. Vol. 2 pp 1-95 N. Y. (1982).
- Tellez, R.M. Evaluación de toxicidad aguda y subaguda de la fracción lipídica de la almendra de calabaza (*Cucurbita pepo*). Tesis Fac. de Química, UNAM, México, D.F. (1999).
- Tunçel, G., Nout, M. and Brimer, L. Degradation of cyanogenic glucosides of bitter apricot seeds (*Prunus armeniaca*) by endogenous and added enzymes as affected by heat treatments and particle size. *Food Chem*. 63, 65-69 (1998).
- Vaclavik, V.A. *Fundamentos de Ciencia de los alimentos*, Ed. Acribia, pp 266 ,267. Zaragoza (1996)

Vander Heijden, K., Younes, M. Fishbein, L. and Millers, S. international food safety handbook (science, international regulations, and control) Marcel Dekkers, pp. 381-395, N.Y. (1999).

Villela, O. y Gerez, P. Biodiversidad y conservación en México. Ed. Técnico Científicas, SA de CV-UNAM, 2ª. Edición, págs. 7-34, 269-276, México, D.F. (1994).

Wanasundara, P. and Shahidi, F. Process-induced chemical changes in food. Plenum Press, pp. 307-327, N. Y. (1998).

Watson, D.H. Natural toxicants in Food. (Progress and prospects). Ellis Harwood, pp. 76-109, 110-124, Chichester (1987).

Watson, S. y Ramstad P. Corn Chemistry and Technology. American Association of Cereal Chemist, pp. 539-543, Minnessota. (1987)

Wilson, A. Experimental design. In: Experimental toxicology (the basic issues). Anderson, D. and Conning, D. (Eds.) 2nd edition, Royal Society of Chemistry, pp 35-55, Cambridge (1993).

Wong, W.S. Química de los Alimentos; Mecanismos y teoría, Ed. Acribia, pp. 18-22. Zaragoza. (1995)

Ziller S. Grasas y aceites alimentarios, Ed. Acribia, pp. 1-11, 35-47. Zaragoza. (1996)

Sitios Consultados

Mc Vaugh(1951). *Prunus serotina* subs. Capuli (Cav.).
http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/60-rosac6m.pdf
 (9-Marzo-03 7:50 pm)
 Buscador: www.yahoo.com

Prunus serotina va. Capuli (Cav.)McVaugh.
http://www.conafor.gob.mx/programas_nacionales_forestales/pronare/Fichas%20Tecnicas/Prunus%20serotina.pdf
 (9-Marzo-03 8:15 pm)
 Buscador: www.yahoo.com

Delfin, I; Chino, S y Gama, J.L.; Plantas de Ornato y Comestible: ¿Inocuas?.
<http://www.tlahui.com/medic/medic10/ftlax6.html> (12-Marzo-03 11:23 am)
 Buscador: www.yahoo.com

United States Department of Agriculture. Black Cherry *Prunus serotnia* Ehrh.var. *virens* (Woot. &Standl.) Mc Vaugh <http://dacbsa.org/00-Fund-trees/USDANRes-BlackCherry.pdf>
 (13-Marzo-2003 1: 50 pm)
 Buscador: www.yahoo.com

BIBLIOGRAFÍA

Rincón de las Plantas Medicinales, Capulín, *Prunus serotina* Eehrenb (Cav) McVaug.
Prunus capuli, Ca. <http://elbuscador.com.mx/elbuscador/00may/rincon.html>
(13-Marzo-03 2:15 pm)

Buscador: www.yahoo.com

The Noble Fundation Plant Image Gallery. Black Cherry (Wild Cherry, Rum Cherry) Trees,
Shrubs & Woody Vines. <http://www.noble.org/imagegallery/woodhtml/blackcherry.html> (24-
Agosto-04 12:46 pm)

Buscador: www.yahoo.com