



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACION TOXICOLOGICA Y BIOENSAYO  
NUTRITIVO PRELIMINAR DE LA ALMENDRA DE  
CALABAZA (*Cucurbita argyrosperma*) CONSUMIDA  
EN CUETZALAN PUEBLA.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS  
P R E S E N T A :  
ORTIZ RIVERA VANESSA AMELIA



MEXICO, D. F.



2005

EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

m. 343667



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Jurado asignado:**

Presidente Prof. Bernardo Lucas Florentino.

Vocal Prof. Lucía Gabriela Bascuñan Termini



Secretario Prof. I. María de Lourdes Flores Téllez

1er. Suplente Prof. Leticia Gil Vieyra

2do. Suplente Prof. Iliana Elvira González Hernández

Sitio donde se desarrolló el tema. Laboratorio 111, Departamento de Farmacia (Posgrado) del Conjunto E. Cd. Universitaria, México D.F.

Asesor del tema: M. en C. Bernardo Lucas Florentino.



Supervisor técnico: Q.F.B. Leticia Gil Vieyra.



Sustentante. Vanessa Amelia Ortiz Rivera.



## AGRADECIMIENTOS

- ❖ A el Maestro Bernardo Lucas Florentino por permitirme trabajar a su lado para desarrollar esta Tesis, por los conocimientos que me transmitió y or el tiempo que me dedicó.
- ❖ A la Q.F.B. Leticia Gil Vieyra por su apoyo en la parte técnica y por su entusiasta participación para que obtuviéramos una Tesis bien elaborada.
- ❖ A la Q. Rosa María Argote por su apoyo y entusiasta participación en algunas técnicas analíticas.
- ❖ A M. en C. Isabel Gracia por su apoyo y disponibilidad en el bioterio del conjunto E de la Facultad de Química.
- ❖ A la M.V.Z. Lucia Macias Rosales por su entusiasta participación en el desarrollo de las pruebas de toxicidad.
- ❖ A la M. en C. Adriana A. Ruiz de Chávez Ochoa por su apoyo en el análisis de las muestras de sangre después del estudio de toxicidad subcrónica.
- ❖ A las maestras Lucia Gabriela Bascuñan Termini y María de Lourdes Flores Téllez por el tiempo que dedicaron para la revisión de este trabajo.
- ❖ A la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la Facultad de Química por haberme permitido formarme dentro de Ella.

## DEDICATORIAS

- ❖ A mi **Madre** por haberme apoyado siempre, desde el inicio de mi vida y porque es un gran ejemplo que quiero seguir.
- ❖ A mi **Dios** por haberme prestado vida y el valor suficiente para poder llegar hasta este punto de mi vida; porque siempre ha estado conmigo, ya que mi buena suerte es mas que eso, es su apoyo incondicional al ofrecerme siempre oportunidades que yo debo aprovechar.
- ❖ Al Dr. Luis Álvarez Chimalpopoca por el apoyo que me dio desde antes de nacer y que me ha dado hasta ahora, por su ejemplo de ser humano, sobre todo con la comunidad indígena a la cual aprendí a querer y respetar a través de él y de mi madre.
- ❖ Al Lic. Delfino Elizarraras por su apoyo y cariño durante toda mi vida.
- ❖ A mis abuelitos el Sr. Pedro Rivera Torres y la Sra. Santa Ana Vega Miranda por ser un ejemplo a seguir.
- ❖ A mi hermana, Rosalinda, por ser un ejemplo a seguir, ya que sin su ejemplo de dedicación al estudio quizá no llegaría hasta donde he llegado.
- ❖ A mis sobrinos Luisito Antonio y Jimenita Yaxen por que son un pedacito de vida que me motiva a seguir adelante y espero algún día ser un ejemplo para ellos.
- ❖ A Jorge López por su apoyo en todo desde hace mucho tiempo.
- ❖ Al Ing. José Carlos Álvarez Rivero por su invaluable e incondicional apoyo para la obtención de este logro y en espera de nunca decepcionar su confianza en mí.
- ❖ A la familia Lugo Palacios por el apoyo y ánimo que me han dado.
- ❖ Al Sr. Guillermo Vie por el cariño que siempre me demostró, por el ánimo de seguir siempre adelante y por que su sola presencia fue símbolo de respeto y cariño.
- ❖ A la Familia Cruz Peña el cariño que siempre me ha demostrado.
- ❖ A los maestros de mi querida Facultad que me dieron una formación universitaria que me obliga a ser diferente que los demás y me obliga a poner en alto el nombre de la Universidad, en especial al Maestro José Luz.
- ❖ A mis compañeros, pero en especial a mis Amigos que me hicieron una vida más llevadera durante el transcurso de la carrera, que al ser varios no quisiera decir sus nombres con temor de olvidar a alguno.
- ❖ A mis compañeros del laboratorio 111, en donde se desarrolló este trabajo por su apoyo en algunas técnicas de trabajo y por hacerme pasar buenos ratos dentro de él.

- ❖ A la Sra. Viky por su amistad y por el cariño que nos expresa a todos y cada uno de los que hemos legado a este laboratorio.
- ❖ A mis compañeros y amigos de trabajo, Grupo CENCON, por su amistad y apoyo para llegar a este momento.
- ❖ A mis compañeros y amigos del Centro Piloto en donde aprendí muchas cosas y pasé momentos muy agradables.
- ❖ A mi país por ser tan maravilloso, y esperando poder ayudarlo mediante mi formación como Químico de alimentos.
- ❖ A mis maestras Iris, Lupita, Marcela, Silvia y María Luisa de mi muy querida escuela secundaria que con su ejemplo y cariño ayudaron a mi formación académica y personal y me alentaron a estudiar una carrera de Química.
- ❖ A la Familia Gamboa Ávila por su apoyo y animo para conseguir este logro.
- ❖ A José de Jesús Gamboa Ávila por su invaluable, pero sobre todo incondicional apoyo y cariño en todo momento desde que nos conocimos, ya que mucho del nombre que título que estoy a punto de obtener es gracias a El.
- ❖ A Salvador Ortiz, que a pesar de todo, le debo la vida.

❖ INDICE.

	Página
1. Introducción. ....	1
2. Objetivos.	
2.1 General. ....	2
2.2 Particulares. ....	2
3. Antecedentes	
3.1 Generalidades de las cucurbitas. ....	3
3.2 Proteínas .....	5
3.2.1 Contenido proteínico .....	5
3.2.2 Calidad de la proteína .....	6
3.2.3 Disponibilidad de los aminoácidos .....	6
3.2.4 Determinación del valor nutritivo de los alimentos .....	6
3.2.4.1 Bioensayos .....	7
3.2.4.2 Métodos químicos. ....	7
3.3 Lípidos. ....	8
3.3.1 Aceites y grasas comestibles .....	9
3.3.1.1 Extracción mecánica. ....	10
3.3.1.2 Extracción con disolventes. ....	10
3.3.2 Refinación química y física de los aceites y grasas .....	11
3.3.2.1 Refinación química. ....	11
3.3.2.1.1 Desgomado. ....	11
3.3.2.1.2 Neutralizado .....	11
3.3.2.1.3 Decoloración. ....	12
3.3.2.2 Refinación física. ....	12
3.4 Ácido fólico. ....	12
3.4.1 Biodisponibilidad de los minerales .....	14
3.4.2 Biodisponibilidad de las proteínas .....	15
3.5 Oligosacáridos .....	15
3.6 Estudio toxicológico <i>in vivo</i> .....	16
3.6.1 Estudio de toxicidad aguda. ....	17
3.6.2 Estudio de toxicidad subaguda o subcrónica. ....	18
3.6.3 Toxicidad crónica .....	19

3.6.4 Rangos de toxicidad. ....	20
4. Metodología. ....	21
4.1 Diagrama de flujo. ....	21
4.2 Metodología. ....	23
4.2.1 Descascarado. ....	23
4.2.2 Parámetros físicos. ....	23
4.2.3 Fraccionamiento. ....	23
4.2.4 Humedad. ....	24
4.2.5 Grasa. Cruda. ....	25
4.2.6 Proteína cruda. ....	26
4.2.7 Desengrasado. ....	28
4.2.8 Refinamiento de la fracción lipídica. ....	28
4.2.8.1 Desgomado. ....	28
4.2.8.2 Neutralizado. ....	29
4.2.8.3 Blanqueo. ....	30
4.2.9 Perfil de ácidos grasos. ....	31
4.2.10 Evaluación química del aceite refinado. ....	33
4.2.10.1 Punto de fusión. ....	33
4.2.10.2 Gravedad específica. ....	34
4.2.10.3 Índice de refracción. ....	35
4.2.10.4 Índice de acidez. ....	36
4.2.10.5 Índice de yodo. ....	37
4.2.10.6 Índice de saponificación. ....	39
4.2.11 Proteína verdadera. ....	40
4.2.12 Oligosacáridos. ....	43
4.2.13 Determinación de ácido fólico. ....	44
4.2.13.1 Método de Haugh y Lantzsh. ....	44
4.2.13.2 Método de Fruhbeck. G. ....	46
4.2.14 Toxicidad aguda. ....	49
4.2.15 Toxicidad subcrónica. ....	51
4.2.16 Relación de Eficiencia Proteínica. ....	53
4.2.16.1 Digestibilidad <i>in vivo</i> . ....	57
5. Resultados y análisis de resultados. ....	59
5.1 Parámetros físicos. ....	59

5.2 Descascarado. ....	59
5.3 Análisis bromatológico de la harina integral y desengrasada. ....	59
5.4 Determinación de ácido fólico. ....	60
5.5 Determinación de oligosacáridos. ....	61
5.6 Evaluación química del aceite refinado. ....	62
5.7 Toxicidad aguda. ....	65
5.8 Toxicidad subcrónica. ....	66
5.9 Bioensayo nutritivo. ....	72
6. Conclusiones. ....	75
7. Recomendaciones .....	76
8. Anexos	
8.1 Anexo 1. Glosario empleado en las observaciones de los signos clínicos de los bioensayos. ....	77
8.2 Anexo 2. Cuadro empleado para el seguimiento del estudio de toxicidad aguda. ....	78
8.3 Anexo 3. Cuadro empleado para el seguimiento del estudio de la toxicidad subcrónica y la R.E.P. ....	79
8. Bibliografía. ....	80

## 1 INTRODUCCIÓN.

México es un país con una gran biodiversidad, motivo por el cual tiene una gran riqueza en su reino vegetal. Los vegetales más consumidos son maíz, chile, frijol y calabaza; sin, embargo en el país no existe una dieta que contenga los elementos nutricionales necesarios, ya que la alimentación de cada zona está influenciada por sus costumbres y cultura, además del nivel socioeconómico. Estos son algunos de los factores que favorecen la desnutrición calórico-proteico en nuestro país. La desnutrición se presenta con mayor asiduidad en el medio rural, aunque su severidad y su frecuencia difiere de una región a otra. En general, el sureste parece ser la región más afectada por problemas de nutrición, debido en parte a que una gran proporción de la población habita en zonas rurales pobres. tal es el caso de los estados de Yucatán, Chiapas, Quintana Roo, San Luis Potosí, Oaxaca, Hidalgo, Puebla y Guerrero; en los cuales se evidencian las altas tasas de desnutrición, basándose en la talla y peso inferiores que el promedio nacional entre los niños de su edad. Los grupos más afectados por la desnutrición son los niños menores de cinco años y las mujeres embarazadas o en etapa de lactancia, que tienen mayores necesidades nutrimentales y están expuestas a la influencia de creencias erróneas acerca de su alimentación.

En general las dietas de la población marginada, habitualmente, aunque no siempre, habitante del medio rural, aportan cantidades insuficientes de energía, de proteínas y de algunas vitaminas y nutrimentos inorgánicos, además de que existen patrones dietéticos que son poco variable, y por lo mismo pobres e inadecuados.

Dado que México es una nación de grandes contrastes donde por un lado prevalece la heterogeneidad geográfica, económica, social y cultural de la población se encuentran deficiencias nutrimentales específicas, resultado de la privación social y la pobreza; por lo que es necesario buscar alimentos de alto contenido calórico-proteico, y que además sean de fácil adquisición, por lo que se ha procedido a buscar alimentos no convencionales, es decir, alimentos de consumo poco frecuente, y es también por esto que hay poca información sobre ellos, por lo tanto, antes de proponer el consumo o el incremento en el consumo de dichos alimentos es necesario realizar algunos estudios como son la evaluación bromatológica, la toxicidad que el alimento pudiera causar y su calidad nutricional.

La almendra de calabaza tiene un alto contenido de proteína y grasa, motivo por el cual proponer incrementar su consumo implica valorar su posible riesgo a la salud por un mayor consumo o frecuencia de lo establecido empíricamente como normal; y su calidad nutritiva, ya que por su alto contenido de grasa y proteína, podría ayudar a abatir el nivel de desnutrición debida a la deficiencia calórica-proteínica.

## 2 OBJETIVOS.

### 2.1 General.

•Realizar el estudio toxicológico y nutricional a través de un bioensayo de la fracción proteínica y lipídica de la almendra de calabaza (*Cucúrbita argyrosperma*).

### 2.2 Particulares.

•Refinar el aceite de la almendra de calabaza.

Determinar el contenido de los ácidos grasos del aceite crudo y refinado.

•Caracterizar fisicoquímicamente ambos aceites.

•Realizar estudios de toxicidad aguda con ratones mecho de la cepa ICR de la harina integral, harina desengrasada y aceite crudo de la almendra de calabaza.

•Realizar estudios de toxicidad subcrónica con ratones mecho de la cepa ICR de la harina integral, harina desengrasada y aceite crudo de la almendra de calabaza.

. Realizar el estudio de relación de eficiencia proteínica (REP) con ratas macho de la cepa WINSTAR de la harina integral y de la harina desengrasada.

### 3. ANTECEDENTES.

#### 3.1 Generalidades de las cucurbitas.

Generalmente se da el nombre de calabaza a los frutos de varias especies del género *Cucurbita* de la familia de las cucurbitáceas. Son plantas herbáceas, de tallos largos que se arrastran por el suelo, o se enganchan a toda clase de zarcillos. Los frutos se caracterizan por ser de consistencia carnosa, succulenta y tener corteza resistente que puede variar desde semiblanda a muy dura. Existe una infinidad de variaciones así en la forma como en el tamaño y colores verdes, amarillos, rojas, combinadas u homogéneas. (Alonso, 1980, Matons 1947, Messiaen 1979).

Uno de los grupos de plantas con mayor número de especies utilizadas como alimento humano es la familia de las cucurbitáceas. Sus flores, tallos jóvenes, frutos tiernos y frutos maduros son consumidos como verdura. Las semillas son consumidas enteras, asadas o tostadas y molidas en diferentes guisos (Bermejo, 1982).

Las especies *Cucurbita argyrosperma*, *C. moschata*, *C. máxima*, y *C. pepo* han aportado desde tiempos remotos productos alimenticios imprescindibles en la dieta de las comunidades rurales y de algunas urbanas del continente Americano (Bermejo, 1982).

Diversos autores sitúan el origen de las calabazas en América y más concretamente en México. Se tienen evidencias a través de hallazgos encontrados en sitios como las Cuevas de Ocampo, Tamaulipas, que permiten afirmar que en la época prehispánica ya se cultivaban calabazas pertenecientes a la especie *C. pepo* L., desde hace 7000 años A.C. y de *C argyrosperma Huber* desde 1000 años D.C. (Martínez 1996).

Aparentemente *C. pepo* L. Se distribuye desde el norte de la Ciudad de México hasta el sur de Canadá, teniendo una distribución similar *C argyrosperma Huber*, la cual se extiende hacia el noroeste de México y suroeste de los Estados Unidos (Martínez 1996).

Con respecto a las características de la semilla estudiada en el presente trabajo se destaca lo siguiente:

Nombre botánico: *Cucurbita argyrosperma* Huber.

Sinónimo botánico: *Cucurbita mixta*.

Familia: Cucurbitáceas.

Nombres comunes: castellano: calabaza, calabaza pinta, calabaza pipiana (México), calabaza pipiancha (Cuetzalan, Puebla), pipián (México, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica), saquil, pipitaria (Guatemala); inglés: cushaw (Estados Unidos) (Bermejo, 1982).

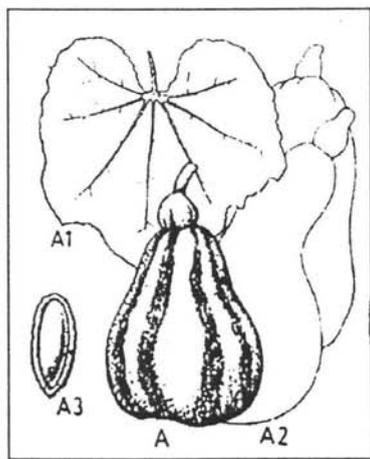


Figura No. 1. Ilustración de la *Cucurbita argyrosperma* Huber . A1. hoja; A2. frutos; A3. semilla

Cabe resaltar que el tamaño de la semilla de esta calabaza es mayor en relación a la de otras calabazas, lo cual le confiere un valor comercial importante.

Tabla No. 1 Dimensiones de algunas semillas de calabaza.

Especie	Dimensiones de semilla	
	Largo (mm)	Ancho (mm)
<i>C. pepo</i>	21.3	9.1
<i>C. moschata</i>	18.7	9.5
<i>C. argyrosperma</i>	24.2	9.9

Martínez, F.R. Evaluación del potencial aceitero de la semilla de calabaza 19996.

Después del descascarado de la semilla se obtienen la almendra, la cual tiene un potencial aceitero importante, ya que además de su alto contenido de aceite en su interior, cuenta con un gran número de frutos por planta cuenta con numerosas semillas cada uno (Martínez, 1996).

Muchas semillas cucurbitáceas son ricas en grasa y proteína (aproximadamente 41 % de grasa y 31 % de proteína cruda), aunque esta grasa no ha sido utilizada a nivel industrial, si ha sido utilizada como aceite de cocina en algunos países de África y del Medio Oriente, el aceite de *C. pepo L* es comúnmente consumido como aceite para ensaladas en Eslovenia, Hungría y en algunas partes del sur de Austria. El aceite es verde oscuro y tiene un alto contenido de ácidos grasos libres. El contenido de aceite de esta semilla es de aproximadamente 50% y sus cuatro ácidos grasos predominantes son el palmítico, esteárico, oleico y linoléico. Estos ácidos grasos conforman el 98% del total de ácidos grasos, otros ácidos grasos se encuentran a niveles menores del 0.5% (Al-Kalifa, 1996; Murkovic M. *et-al*, 1996; Yoon, *et-al*, 1983).

Con respecto a los tóxicos naturales encontrados en *C. pepo L* se ha observado una alta concentración de fosfatos de inositol ya que se ha reportado un nivel de 40.5 mg / g, cuyo valor es más alto que el de la soya, (10.8 mg / g), otros tóxicos se encuentran en niveles no significativos (Salgado J, 1992) y en un estudio realizado por Queiroz-Neto (1994) en *C. máxima* se encontró que las semillas de éstas cucurbitáceas no son tóxicas por vía oral para ratas y puercos en estudios de toxicidad aguda y subcrónica.

### 3.2 Proteínas.

Las proteínas son complejas sustancias orgánicas nitrogenadas que constituyen esencialmente el protoplasma de las células tanto animales como vegetales, y tienen un papel fundamental en su estructura y función. Las plantas son capaces de sintetizar sus proteínas a partir de sustancias inorgánicas, pero los animales no pueden hacerlo. Por este motivo deben obtener del exterior, por medio de la alimentación los elementos constituyentes de las proteínas, denominados aminoácidos, los que les permitirán sintetizar sus propias proteínas (Cervera, 1993).

El principal papel atribuido a las proteínas es de carácter estructural y funcional. Por este motivo, aunque son nutrimentos energéticos, un organismo en buen equilibrio nutricional no utiliza para la combustión más que un 20% aproximadamente de dicha energía. El valor nutritivo de un alimento como fuente proteínica refleja su aptitud para satisfacer las necesidades de nitrógeno y aminoácidos del consumidor y para asegurar un crecimiento y un mantenimiento adecuados, lo anterior está en función de los siguientes factores mencionados a continuación (Cervera, 1993; Fennema, 1993):

#### 3.2.1 Contenido proteínico.

Los alimentos base de la dieta con contenidos proteínicos inferiores al 3% no cubren las necesidades proteínicas de los seres humanos, aunque sean ingeridos en cantidades que suministran más calorías de las

necesarias. Por el contrario, una dieta de cereales (8-10% de proteína) satisface las necesidades proteínicas de los adultos. (Fennema, 1993).

### **3.2.2 Calidad de la proteína.**

La calidad, el valor o el balance de una proteína alimentaria depende del tipo y de la cantidad de aminoácidos que contiene y representa una medida de la eficacia con que puede ser utilizada por un organismo. Las proteínas de los cereales suelen ser pobres en lisina y carecen, en ocasiones, de triptofano y treonina. Las semillas oleaginosas y los frutos secos suelen ser deficientes en metionina. A aquellos aminoácidos esenciales para los que es mayor el déficit, con respecto a las necesidades se les denomina "limitantes". (Fennema, 1993).

Cuando la composición de aminoácidos de la dieta difiere mucho de la ideal se habla de un "desequilibrio de aminoácidos" y puede llevar consigo una eficacia reducida de la utilización de los aminoácidos, un retraso del crecimiento, un incremento de la susceptibilidad a las enfermedades y/o un deterioro permanente de la capacidad mental de los niños. (Fennema, 1993)

### **3.2.3 Disponibilidad de los aminoácidos.**

Los aminoácidos de las proteínas presentes en la dieta no siempre son totalmente disponibles. Los aminoácidos de las proteínas animales suelen ser digeridos y absorbidos en una extensión del 90%, en tanto que las de ciertas proteínas vegetales pueden ser digeridos y absorbidos en un 60-70%. La baja utilización de ciertas proteínas puede ser debida a varios factores, tales como: conformación de la proteínas; las proteínas fibrosas e insolubles son menos fácilmente atacadas por las proteasas que las globulinas solubles; fijación de metales, lípidos, ácidos nucleicos, celulosa u otros polisacáridos a las proteínas, lo que puede dificultar su digestión. La presencia de factores antinutrimientales; tales como inhibidores de tripsina y quimotripsina. Entre los distintos individuos se dan diferencias biológicas que influyen en su capacidad de digestión de proteínas y la absorción de los aminoácidos (Fennema, 1993).

### **3.2.4 Determinación del valor nutritivo de los alimentos.**

Como las proteínas tienen diferentes valores nutritivos resulta útil su determinación. Para efectuar esta valoración pueden utilizarse procedimientos químicos y procedimientos biológicos.

#### 3.2.4.1 Bioensayos.

Los ensayos biológicos se basan en la determinación del crecimiento o la retención de nitrógeno en animales experimentales como la rata, o en seres humanos, en función del consumo de proteína. Para obtener datos confiables y significativos es necesario utilizar varios animales en cada ensayo y analizar estadísticamente los resultados, además se deberán estandarizar las condiciones de ensayo. Generalmente se mantiene bajo el nivel proteínico de la dieta, que es del 10% en peso, de manera que el consumo proteínico se mantenga por debajo de las necesidades y sea adecuado el suministro de energía y otros nutrimentos. En estas condiciones, el crecimiento resulta lento, la proteína es eficazmente utilizada muy poca se degrada para su conversión en energía y de los resultados experimentales resaltan las diferencias en el valor nutritivo de las distintas proteínas y reflejan el máximo de cada una de las sometidas a ensayo. Sin embargo, el valor obtenido en el ensayo sobrevalora el comportamiento que la proteína va a tener en las condiciones prácticas de su consumo por los seres humanos (Fennema, 1993).

La relación de la eficiencia proteínica (REP), más conocida como PER (protein efficiency ratio), es el peso en gramos ganado por las ratas por cada gramo de proteína consumida. Las fuentes de imprecisión de este método derivan de que el resultado obtenido depende de la cantidad de proteína consumida por las ratas y de que las ratas crecen más rápido que los niños. Por todo ello, este método sobrevalora la calidad de las proteínas (Fennema, 1993).

$$\text{REP} = \text{ganancia de peso en gramos} / \text{proteínas ingeridas en gramos}$$

#### 3.2.4.2 Métodos químicos.

En la mayor parte de los métodos químicos se estima el valor nutritivo de una proteína basándose en su contenido en aminoácidos esenciales y en comparación del mismo con las necesidades del hombre. La calificación química de una proteína, se define como:

$$\text{C. Q.} = \frac{\text{mg del aminoácido esencialmente limitante por gramo de la proteína ensayada}}{\text{mg del mismo aminoácido por gramo de proteína de referencia}} \times 100$$

$$\text{mg del mismo aminoácido por gramo de proteína de referencia}$$

La referencia es el patrón aminoacídico FAO 1973, que está basado en las necesidades de aminoácidos esenciales de los niños de corta edad, y que reemplaza como estándar a la proteína de huevo entero que se usaba antes (Fennema, 1993).

La correlación entre los resultados de los bioensayos y de las predicciones químicas mejora cuando se corrige la calificación química teniendo en cuenta la digestibilidad global de la proteína, que puede ser rápidamente determinada por medio de ensayos enzimáticos *in vitro* (Fennema, 1993).

Las semillas de las leguminosas han sido tradicionalmente consumidas por el hombre y constituyen un importante complemento proteínico de los cereales. Sin embargo el uso de oleaginosas como fuentes de proteínas para el consumo directo de los seres humanos está notablemente menos desarrollado, excepto en el Oriente, en donde se emplea la soya para la elaboración de salsas y ciertos alimentos tradicionales tales como el tofu (Cervera, 1993; Fennema, 1993).

Técnicamente resulta posible preparar harinas, concentrados y purificados proteínicos de diversas semillas oleaginosas, tales como algodón, girasol y colza. Sin embargo la soya es la fuente primordial de tales preparados que se utilizan en proteínas de diversos alimentos para la sustitución parcial de la carne (Cervera, 1993).

A muchas semillas oleaginosas se les extrae el aceite y se obtienen dos fracciones, la grasa cruda y una torta residual. En el caso de las semillas de soya se obtiene como resultado un concentrado proteico que contiene, tras su deshidratación, alrededor de un 65-75% de proteína. Si posteriormente se solubilizan en agua alcalinizada se obtiene un purificado proteínico que contiene no menos de un 90% de proteína. (Fennema O. 1993)

### 3.3 Lípidos.

Los lípidos son sustancias de composición química extremadamente variable. En su estructura molecular se encuentra casi exclusivamente C, H, y O, aunque existen formas más complejas (Cervera, 1993).

Tanto en los alimentos que los contienen como en el cuerpo humano, el 95% o más de las grasas está en forma de triglicéridos, con sus característicos ácidos grasos. Los triglicéridos constituyen la forma química principal de almacenamiento de las grasas. Tanto en los alimentos como en el organismo humano están formados por la unión del glicerol con tres ácidos grasos. Las grasas son nutrimentos altamente energéticos y ésta es su función de mayor referencia. Por lo tanto el aporte adecuado de lípidos es imprescindible para lograr el consumo calórico diario suficiente (Cervera, 1993).

### 3.3.1 Aceites y grasas comestibles.

Las grasas comestibles son los productos de origen vegetal o animal, cuyos constituyentes principales son triglicéridos naturales de los ácidos grasos, conteniendo componentes menores de otros lípidos, como son fosfolípidos, gomas, ceras, entre otros (Lawson, 1999).

Como se menciona en el texto de Producción, análisis y control de calidad de aceites y grasas comestibles (1988), los procedimientos para la obtención de grasas comestibles de las semillas o frutos oleaginosos y de los tejidos o depósitos adiposos de los animales son los siguientes:

- Presión, previa trituración o no, de la materia prima.
- Fusión, por tratamiento térmico de la materia prima, sin sobrepasar la temperatura de 100 °C.
- Extracción con disolventes permitidos, seguida de la eliminación completa de éstos.

En el mismo texto se encuentra que los disolventes que se utilicen para la extracción de grasas comestibles, deberán reunir los siguientes requisitos:

- Ser productos de características químicas bien definidas, sin que exista la posibilidad de que contengan impurezas que tengan una clara acción nociva sobre el organismo.
- Ser fácilmente separables, por destilación con o sin arrastre de vapor, de la mezcla grasa-disolvente, pudiéndose eliminar hasta los últimos residuos, sin someter el aceite a calentamientos excesivos.
- El disolvente destilará en un 99.99% a una temperatura que no sobrepase los 95 °C.
- No contendrá residuos metálicos especialmente plomo, que puedan quedar retenidos por el aceite.

Las grasas de origen vegetal son muy abundantes y juegan un papel de primer orden en la alimentación humana. Se encuentra en semillas y frutos diversos, tales como, la oliva, soya, girasol, cacahuete, maíz y algodón, por mencionar algunos.

Para obtener el aceite de las semillas oleaginosas, estas deben ser limpiadas y descascarilladas previamente, después troceadas y molidas antes de la extracción de su aceite por cualquiera de los dos siguientes sistemas citados a continuación:

### 3.3.1.1 Extracción mecánica.

Las semillas molidas pasan a un acondicionador para obtener un producto homogéneo que llega a una prensa de tornillo donde a elevadas presiones y en un solo paso se procede a la separación del aceite de la torta proteica. El aceite obtenido es separado de impurezas gruesas en un tamiz vibratorio. El abrillantamiento y limpieza final del aceite se llevan a cabo en un filtro, con lo que se obtiene un aceite crudo filtrado (Lawson, 1999).

La torta proteica separada en la prensa es descargada sobre un tornillo sinfin que alimenta una estación de pesado y ensacado, o unos rodillos trituradores de la torta proteica. Esta torta proteica puede ser desengrasada aún más en una planta de extracción por disolventes. También puede ser utilizada directamente como alimento de ganado o, si ha sido tratada higiénicamente, puede pasar a una instalación para obtención de proteína para la alimentación humana (Fennema, 1993).

### 3.3.1.2 Extracción por disolventes.

En el sistema de extracción por disolventes, se puede partir de las semillas oleaginosas o de la torta proteica obtenida por el sistema de extracción mecánica, ya que aún contiene un 11-15% de aceite que se puede reducir al 2-4%. El hexano es el disolvente más ampliamente utilizado debido a su elevado carácter volátil, en el aceite después de su obtención queda un residuo de hexano mínimo o nulo (Lawson, 1999).

Si se parte directamente de las semillas, éstas, al igual que en el método anterior deben ser limpiadas, descascarilladas y trituradas en unos rodillos, pasando a un acondicionador para homogenizar el producto, que pasa a un molino, con lo que se divide finalmente permitiendo así una mejor extracción del aceite en el extractor, donde un disolvente de las materias grasas arrastra a éstas, siendo separadas por un rotavapor, a la vez que se recupera el disolvente y vuelve al extractor. La harina desengrasada es transportada a un separador de disolvente para eliminar trazas del mismo aún presentes en la harina. El disolvente recuperado vuelve también al extractor (Lawson, 1999).

Usando la extracción con disolventes se extrae de las semillas de soya o de algodón del 9-12% más de aceite y con menos impurezas que usando la presión mecánica. Además en la extracción con disolventes el calentamiento es mínimo y así el aceite producido es de mejor calidad (Lawson, 1999).

### 3.3.2 Refinación química y física de aceites y grasas.

Las grasas crudas obtenidas por los métodos anteriores tienen ciertas sustancias, entre ellas, ácidos grasos libres, pequeñas cantidades de proteína, fosfolípidos, fosfátidos, ceras, resinas y pigmentos coloreados, los cuales pueden proporcionar una serie de defectos importantes, dentro de los que destacan: elevada acidez (1-10% o incluso más), olores desagradables, coloración excesiva, inestabilidad y formación de espuma y humo durante la fritura en profundidad. Por lo tanto, todas estas sustancias deben ser eliminadas o reducidas en etapas posteriores a la obtención de aceites. La única manera de conseguir una grasa o aceite sin éstos inconvenientes es sometiéndolo a un proceso de refinación. Los sistemas de refinado son los mencionados a continuación (Lawson, 1999):

#### 3.3.2.1 Refinación química.

Son varias las etapas necesarias para el refinado químico:

##### 3.3.2.1.1 Desgomado (condicionamiento de gomas).

Generalmente, los aceites crudos se desgomam para eliminar los fosfolípidos y los fosfátidos en el molino de aceite o en la planta de extracción. Estos fosfolípidos y fosfátidos se hidratan con pequeñas cantidades de agua para hacerlos insolubles en el aceite. En la operación de desgomado, las gomas se separan en forma continua con un sistema controlado de temperatura y en presencia de ácido fosfórico (Lawson, 1999; Ziller, 1996).

##### 3.3.2.1. Neutralización.

El primer paso en la planta de refinado es hacer reaccionar el aceite crudo con una sustancia alcalina para eliminar los ácidos grasos libres, ya que la cantidad excesiva puede contribuir a un sabor no satisfactorio de la grasa y reducir su vida útil. La sustancia alcalina a utilizar es la sosa, la cual se mezcla con el aceite para desacidificar. La duración del contacto de la sosa con el aceite es muy corto, en los procesos tradicionales es de 5-10 minutos. La grasa pasa a un proceso de centrifugación, que es de tipo hermética, en donde se elimina el jabón formado de la reacción de los ácidos grasos libres y el álcali. de esta manera se consiguen las siguientes ventajas: reducción de pérdidas de grasa o aceite, trabajo en continuo y desaparición de posibles emulsiones, y se obtiene finalmente un producto neutro (Lawson, 1999, Ziller, 1996).

Las temperaturas durante estas etapas suelen ser del orden de 85-95 °C, sin peligro de afectar el color de la grasa debido a la rapidez con que se realizan estas operaciones (Lawson, 1999).

### 3.3.2.1.3 Decoloración.

El término "decoloración" o "blanqueado" se refiere al tratamiento que se aplica para eliminar los colores y las sustancias que producen color, tales como pigmentos rojos, amarillos y verdes que están presentes en el aceite crudo (Lawson H, 1999).

El procedimiento habitual de decoloración se lleva a cabo por adsorción de los pigmentos sobre un material adsorbente. La tierra de batán; por ejemplo, es una tierra decolorante natural formada por silicato de aluminio hidratado. El carbón activo (sic) también se utiliza como decolorante en un menor grado. Los pigmentos se adsorben sobre la tierra o la arcilla y, estas se separan del aceite por filtración (Lawson, 1999; Ziller, 1996).

### 3.3.2.2 Refinación física.

En la refinación física, el punto más importante está en el desodorizador, donde la corriente de vapor sometida al vacío se hace pasar a través del producto arrastrando los ácidos grasos libres y las sustancias volátiles causantes del mal olor (Lawson, 1999).

El aceite o grasa a refinar es calentado y después sometido a vacío, y entonces se dosifican tierras decolorantes para la eliminación del vapor. Dos filtros se encargan posteriormente de eliminar completamente el agente blanqueador presente en el producto. A través de un desaireador, se pasa la grasa al desodorizador (20)

Los ácidos grasos son eliminados hasta conseguir un producto con solo un 0.05% o menos, a la vez que se produce la eliminación de olores extraños (20).

### 3.4 Acido fitico.

El ácido fitico (mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexa-dihidrogen fosfato) es una de las sustancias que se presenta ampliamente distribuida en semillas y/o granos, leguminosas, nueces, semillas oleaginosas, raíces y tubérculos. Los cereales y leguminosas tienen niveles de 0.4% a 6.4% en peso. En la mayoría de las semillas se encuentra primariamente como una reserva de fosfato, en una cantidad del 60-90% del total del fósforo (Rickard & Thompson, 1995; Reddy, 1982).

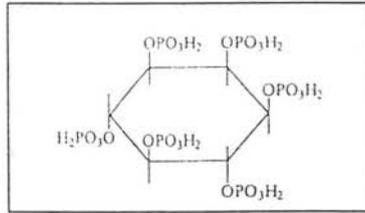
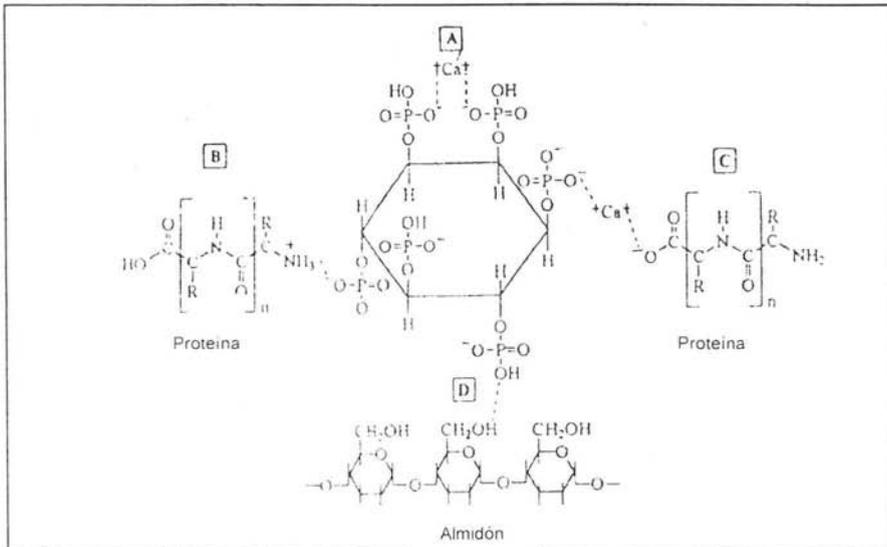


Figura No. 2 Estructura básica del ácido fitico, con su respectiva estereoisomería.

Este compuesto es considerado como un agente antinutricional debido a su habilidad para enlazar minerales, proteínas y almidones a pH fisiológico (Rickard & Thompson, 1995).



Algunos de los factores que intervienen en la biodisponibilidad de los nutrientes arriba mencionados son los siguientes (Reddy, 1982):

- La capacidad de portadores endógenos en la mucosa intestinal para absorber minerales esenciales unidos a fitatos y otras sustancias dietéticas.
- La concentración de ácido fitico en los alimentos.
- La concentración de minerales en los alimentos.
- La digestión o hidrólisis de fitatos por fitasas en el intestino.
- Inhibición de fitasas.

En semillas dicotiledóneas como nueces y semillas oleaginosas, el ácido fitico es encontrado con proteínas en cristales de tipo globulares, por lo que a menudo es aislado o concentrado con la fracción proteínica de estos alimentos. El ácido fitico se acumula rápidamente en las semillas durante el periodo de maduración. La presencia de este compuesto dentro de las semillas dicotiledóneas ha sido encontrado en un amplio rango de plantas: *Cucurbita máxima*, *Cucumis sativus*, *Glycine max*, *Vicia faba*, entre otros (Reddy, 1982; Richard & Thompson, 1997).

### 3.4.1 Biodisponibilidad de los minerales.

Frecuentemente, la deficiencia de minerales ha sido observada en personas de condición socioeconómica baja, quienes consumen alimentos ricos en fitatos, en combinación con ingestas marginales de minerales y elementos traza y bajo consumo de elementos que aumentan la absorción de minerales como ácido ascórbico y proteínas de origen animal (Reddy, 1982).

El ácido fitico es el factor primario en productos de soya en la reducción de la biodisponibilidad del zinc, y de la absorción de hierro en el salvado más que el contenido de fibra y otros constituyentes. Este compuesto se encuentra principalmente en forma de sal de cationes mono y divalentes, zinc, hierro, calcio, magnesio y potasio. (Brune, 1991; Reddy, 1982; Zhou 1992).

Algunos estudios han demostrado que el ácido fitico reduce la biodisponibilidad de minerales tanto en animales como en humanos. Esta biodisponibilidad depende de la especie, la edad del animal de experimentación, y el nivel de actividad de fitasas en el tracto gastrointestinal de especies específicas (Rickard & Thompson, 1995; Reddy, 1982). Por ejemplo, las ratas en comparación con los humanos, tienen actividad intestinal de fitasas, por lo que hay mayor disponibilidad de los minerales que están formando complejos con el ácido fitico (Heaney, 1991).

Estudios en animales y humanos indican que la utilización del zinc en el crecimiento fue inhibido por la relación molar de ácido fitico/zinc mayor de diez (Rickard & Thompson, 1995). En un estudio realizado con ratas por Zhou J.R. (1992) se encontró una relación lineal negativa entre la ganancia en zinc en la tibia y los niveles de ácido fitico dietético; ratas con altos niveles de ácido fitico (2.14%) tienen una reducción en la ganancia en peso y baja ganancia en zinc en tibia. La reducción de ácido fitico en aislados de soya dan como resultado un incremento significativo de la biodisponibilidad de zinc. La relación molar ácido fitico/zinc en la dieta puede ser usado para predecir el efecto de ácido fitico en la biodisponibilidad del zinc. Los valores mayores a 20 han sido reportados como retención baja en zinc y reducción del crecimiento.

En relación a la biodisponibilidad del hierro, en un estudio llevado a cabo por Reddy (1996), con humanos, observó que la adición de 300 mg de ácido fítico produce una reducción dramática en la absorbancia de hierro de 21.69% a 2.15%.

### 3.4.2 Biodisponibilidad de proteínas.

En estudios *in vitro* se ha encontrado un incremento en la digestibilidad de proteínas con la extracción de ácido fítico endógeno por remojo, fermentación, germinación o irradiación. Aunque este proceso también remueve otros factores antinutrientales los cuales también afectan la digestibilidad de proteínas como son los taninos (Rickard & Thompson, 1995).

La separación de ácido fítico ha mostrado que afecta la relación de aminoácidos de la proteína *in vitro*. Una reducción de este compuesto (51%) en harina de semilla de colza por diálisis con o sin tratamiento de fitasas incrementa la disponibilidad de metionina, leucina y fenilalanina comparado con la harina sin tratamiento. Sin embargo, a partir de una reducción por encima del 89% no se observa un incremento en los aminoácidos mencionados. Por otra parte, se ha observado que la adición de ácido fítico o sus productos de hidrólisis a niveles mayores del 5% en dietas de caseína no altera la digestibilidad, utilización o ganancia en peso en modelos de roedores. Además, variaciones en el contenido de ácido fítico de aislado de proteína de soya no afectan la digestibilidad de proteínas, eficiencia proteínica y valor biológico (Rickard & Thompson, 1995).

En un estudio con humanos, el balance de nitrógeno no fue afectado por el consumo de 2.5 g de ácido fítico purificado adicionado a la dieta. Sin embargo, el consumo de pan integral de trigo rico en ácido fítico (endógeno), da como resultado un balance negativo de nitrógeno. Este efecto adverso, sin embargo fue atribuido al alto contenido de fibra dietética (Rickard y Thompson, 1995).

### 3.5 Oligosacáridos

Esta clase de carbohidratos, que poseen en su molécula de 2 a 10 unidades de azúcar, son solubles en agua y muy abundantes en la naturaleza. La síntesis natural se produce por transferencia de unidades glicosilo a partir de nucleótidos o por ruptura y degradación enzimática de polisacáridos. (Fennema, 1993)

Los oligosacáridos rafinosa, estaquiosa y verbascosa están ampliamente distribuidos en plantas superiores y se acumulan durante la maduración en las semillas. En alimentos y piensos, los azúcares de la familia de la rafinosa causan flatulencia, debido a la carencia de actividad de  $\alpha$ -galactosidasa en humanos y de mucosa intestinal en animales, así, estos carbohidratos escapan a la digestión y son metabolizados por

bacterias existentes en el tracto intestinal bajo en hidrógeno, dióxido de carbono y metano. En relación al contenido de oligosacáridos en hortalizas, se encuentra que la estaquiosa es el principal oligosacárido productor de flatulencia en calabazas y pepinos, pero este contenido no excede el 2% (Naczek *et-al*, 1995)

### 3.6 Estudio toxicológico *in vivo*.

De modo genérico se puede definir la toxicidad de una sustancia como su capacidad de producir efectos nocivos a un organismo vivo. De este modo, se tienen 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. Uno de los conceptos fundamentales de la toxicología es que sólo la dosis determina la toxicidad. Como observó Paracelso (1493-1541), "todas las sustancias son venenosas; no hay ninguna que no sea venenosa. La dosis es lo que diferencia el veneno del remedio" (Derache, 1990; Shibamoto, 1996).

Los orígenes históricos de la toxicología deben datarse en el momento en el que nuestros antecesores prehistóricos intentaron comer una serie de productos para obtener alimentos convenientes. Observando qué recursos naturales podían satisfacer a los hombres sin producirle enfermedades ni la muerte, los pueblos primitivos desarrollaron hábitos alimentarios que permitieron la supervivencia y el desarrollo de la especie. Pero en la actualidad, para evaluar el riesgo tóxico se utiliza la experimentación en otros organismos vivos (Derache, 1990; Shibamoto, 1996).

Antes de iniciar un estudio toxicológico es necesario disponer del máximo de datos que proporcionen información sobre las características fisicoquímicas de la sustancia estudiada: identificación de la muestra o sustancia, composición, naturaleza y concentración de impurezas y solubilidad entre otros. Estos datos permiten definir las condiciones de manipulación y almacenamiento de la sustancia; permiten definir ciertos modelos experimentales, especialmente en relación a la vía o al modo de administración (Derache, 1990).

En relación a la elección de la especie de estudio, ninguna permite una extrapolación directa de los efectos observados en el animal al caso humano, por lo que para elegirla frecuentemente depende de los conocimientos de la toxicología comparativa. De este modo para los estudios de administración por vía oral, cutánea o por inhalación, los animales preferidos son los roedores, especialmente la rata (Derache, 1990).

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 modo es el más utilizado para los estudios cortos, el segundo para los estudios de largos periodos (Derache, 1990).

Los efectos de las sustancias tóxicas están relacionadas con la duración o tiempo de exposición. A fin de examinar los diferentes efectos asociados con diversos tiempos de exposición, los estudios toxicológicos se dividen por lo general en tres categorías: estudios de toxicidad aguda, los cuales implican una sola administración de la sustancia química bajo el control de una prueba o varias administraciones en un período de 24 horas; el estudio de toxicidad a mediano plazo (también conocidos como subagudos o subcrónicos), en los cuales intervienen administraciones repetidas, generalmente sobre una base diaria o de cinco veces por semana, en un período de alrededor de 10% de la duración de vida, es decir 3 meses en ratas o 1 ó 2 años en perros, sin embargo algunos investigadores han utilizado también duraciones más cortas, como tratamientos de 14 y 28 días; estudios de toxicidad a largo plazo, que implican administraciones repetidas en un período de toda la vida de los animales de prueba o cuando menos una fracción importante de ella, por ejemplo, 18 meses en ratones, 24 meses en ratas (Lu, 1992; Shibamoto, 1996)

### 3.6.1 Estudios de toxicidad aguda.

La toxicidad aguda de una sustancia se definió (Hagan, 1959) como "los efectos tóxicos adversos que aparecen en un corto periodo después de la administración de una dosis única o de múltiples dosis repartidas en un intervalo de 24 horas", y esta es la primera prueba de toxicidad a que se somete una sustancia (Derache, 1990).

El estudio de la toxicidad aguda permite: calcular una dosis o concentración letal 50, que es por definición " la expresión estadística de la dosis única o de la concentración única de una sustancia que provocaría supuestamente la muerte al 50% de los animales (Gehring, 1973); prever, o como mínimo tener la información sobre los riesgos a los que se expone el hombre después de una administración o exposición a dosis especialmente elevada; ofrecer recomendaciones sobre como llevar a cabo los estudios toxicológicos de más larga duración (Derache, 1990).

Usualmente se requiere de un medio portador para disolver o suspender el tóxico o la muestra a fin de facilitar su administración. Aun cuando este sea líquido, puede necesitar un diluyente. El medio *per se* debe tener poco o ningún efecto de toxicidad, y no debe reaccionar el tóxico. Portadores comunes son disolventes como agua, solución salina, gomas vegetales y derivados de celulosa (Lu, 1992).

El volumen del tóxico en solución o suspensión puede afectar la toxicidad. Volúmenes excesivamente grandes de un líquido pueden causar efectos desfavorables para el animal. Por otra parte, si se reduce el volumen, la concentración será más elevada, un hecho que puede incrementar la toxicidad. Por

consecuente, cuando se ha de administrar una dosis alta de un tóxico a un animal, puede ser aconsejable utilizar dosis divididas (Lu, 1992).

Después de administrar la sustancia tóxica a los animales, éstos deben ser examinados no solo para conocer el número y el tiempo en que ocurren las muertes, sino también para conocer los efectos autónomos, centrales y de conducta, incluyendo su comienzo, intensidad y duración (Lu, 1992; Shibamoto, 1996).

### **3.6.2 Estudio de toxicidad subaguda o subcrónica.**

Los seres humanos están expuestos con mayor frecuencia a productos químicos en niveles mucho más bajos que los que son agudamente fatales, pero están expuestos en periodos o tiempos más largos. Para evaluar la naturaleza de los efectos tóxicos en estas situaciones más reales, se realizan estudios de toxicidad a mediano y largo plazo (Lu, 1992).

La toxicidad subcrónica es el conjunto de efectos observados después de una administración cotidiana repetida o frecuente de una o varias dosis de la sustancia estudiada. Este estudio proporciona información sobre los efectos tóxicos principales de una sustancia y los órganos diana implicados; indicaciones sobre la reversibilidad o irreversibilidad de los efectos, precisando si estos son acumulativos o retardados; y finalmente orientación para la elección de dosis que puedan utilizarse para los estudios a más largo tiempo (Derache, 1990).

Las especies escogidas son generalmente roedores: ratas y ratones, y dentro de los otros animales no roedores, el perro o el mono. Para el caso de los roedores el estudio dura desde 14 días hasta 3 meses. La dosis suele seleccionarse con base a la información obtenida de los estudios de toxicidad aguda. En estudios realizados en ratas, los niveles de dosificación pueden ser concentraciones constantes y expresarse en mg/kg de dieta, o de dosificación constante y expresarse en mg/kg de peso corporal de los animales. A medida que crece el animal, se presentan cambios en el peso del cuerpo y también en el consumo de alimento. En el régimen de dosis constante, la concentración de la muestra debe ajustarse en forma periódica para mantener una dosis relativamente constante de mg/kg de peso corporal. Esto suele hacerse en intervalos semanales durante el período de crecimiento rápido y cada dos semanas de ahí en adelante (Lu, 1992).

Durante el experimento se observan los animales detalladamente para evidenciar los efectos tóxicos potenciales de la sustancia en cuestión (Derache, 1990; Lu, 1992; Shibamoto, 1996):

- Observación clínica: inspección diaria del aspecto físico y estado de salud general de los animales del ensayo y su comportamiento.
- Peso corporal y consumo de alimento: estos aspectos deben determinarse en base semanal. La pérdida de peso corporal es un índice simple aunque sensible de efectos tóxicos. El consumo de alimentos es asimismo un indicador útil. Además, una disminución marcada en el consumo de los alimentos puede inducir efectos que imiten o empeoren las manifestaciones tóxicas de la muestra.
- Pruebas de laboratorio: los exámenes hematológicos suelen incluir el hematocrito, la hemoglobina, la cuenta de eritrocitos y la cuenta de leucocitos diferenciales. Debido al bajo volumen de sangre de las ratas, sólo la mitad de ellas se monitorean en diversos intervalos, mientras que las otras se monitorean al final. Se pueden indicar pruebas especiales como la cuenta de reticulocitos, la cuenta de plaquetas, metahemoglobina y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD).
- Examen *postmortem*: siempre que es posible, todos los animales que se encuentran muertos o en proceso de morir deben someterse a un examen patológico general. Si el estado de los tejidos lo permite, también deben realizarse exámenes histológicos. Además deben determinarse los pesos en fresco de varios órganos, en valores absolutos o en términos de los pesos corporales, puesto que sirven como indicadores útiles de toxicidad. Los órganos que suelen pesarse son el hígado, los riñones, glándulas suprarrenales, corazón, cerebro, tiroides, testículos u ovarios.

### 3.6.3 Toxicidad crónica

La toxicidad crónica permite la visualización de los efectos tóxicos después de la administración o aplicación repetida diariamente o frecuentemente de una o más dosis de la sustancia en estudio durante un periodo de tiempo largo, superior a 90 días. Esta duración puede ser de 18 meses para los roedores y hasta de 12 ó 14 meses o incluso más para los no roedores. La elección de la dosis o de concentraciones se realiza en función de los resultados obtenidos durante los experimentos de corta duración. La vía de administración se determina según el tipo de exposición en el hombre a esta sustancia (Derache, 1990; Shibamoto, 1996).

En relación a las observaciones y los exámenes, éstos deben incluir peso corporal, consumo de los alimentos, observaciones generales, pruebas de laboratorio y exámenes *postmortem*, según se describen en los estudios a mediano plazo (Lu, 1992).

Este estudio permite determinar más variables que en un experimento de duración igual o inferior de 90 días. Los resultados de estos experimentos permiten determinar las siguientes variables de respuesta: (Derache, 1990):

- El tipo y la naturaleza de los efectos tóxicos, funciones dañadas y órganos diana).
- Una dosis sin efectos tóxicos, designada como dosis umbral.
- Una dosis con efectos tóxicos.
- El tiempo de aparición de los efectos tóxicos, en función de la dosis o de la concentración.
- La reversibilidad eventual de los efectos observados.

### 3.6.4 Rangos de toxicidad.

Dado que algunas sustancias químicas producen la muerte en dosis de microgramos, en general se considera que en este caso se trata de sustancias extremadamente tóxicas. Otras sustancias pueden ser relativamente inocuas, incluso después de dosis de más de varios gramos, tal como se presenta en la tabla No. 2. Por lo tanto se han establecido categorías de toxicidad en función de la cantidad necesaria para producir un efecto nocivo en el individuo. En la siguiente tabla se muestran los rangos de toxicidad (Herrera, 1970; Loomis, 1986):

Tabla No. 2. Rangos de toxicidad.

Denominación	DL <sub>50</sub> (en rata, dosis oral única)	Sustancia representativa
Extremadamente tóxico	< 1 mg / kg peso corporal	Toxina botulínica
Altamente tóxico	1-50 mg / kg peso corporal	Picrotoxina
Moderadamente tóxico	50-500 mg / kg peso corporal	DDT
Ligeramente tóxico	500-5000 mg / kg peso corporal	Morfina
Prácticamente no tóxico	5000-15000 mg / kg peso corporal	Alcohol etílico
Relativamente tóxico	15000 mg / kg peso corporal	Esencia de limón

Herrera. Biblioteca de autores españoles 1970; Loomis . T. Fundamentos de toxicología. 1986



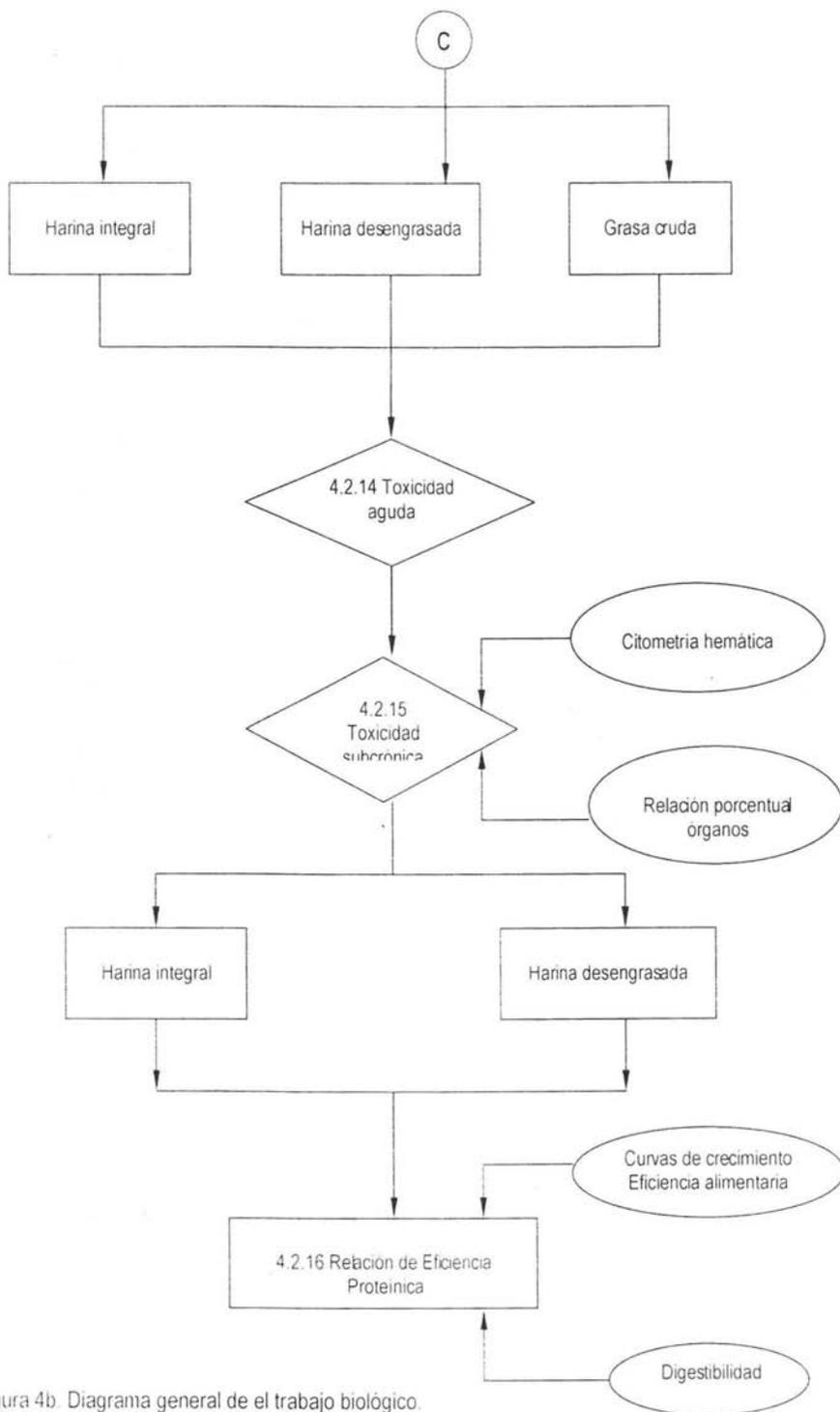


Figura 4b). Diagrama general de el trabajo biológico.

## 4.2 Metodología.

### Metodología del trabajo fisicoquímico.

#### Semilla entera.

La materia prima que se utilizó fue la semilla de calabaza (*Cucurbita argyrosperma*), la cual fue adquirida en el municipio de Cuetzalan, Puebla.

#### 4.2.1 Descascarado.

Esta operación se realizó manualmente, obteniendo de ésta manera por separado la cáscara y la almendra, con ésta última se desarrolló el presente trabajo.

#### 4.2.2 Parámetros físicos.

- Dimensiones.

Se midió el ancho y largo tanto de la semilla entera como de la almendra de calabaza mediante un vernier, la determinación se realizó con 20 unidades de cada una (semilla y almendra)

- Peso volumétrico.

Se realizó con ayuda de una probeta KIMAX con capacidad de 100 mL No. 20024 tolerancia  $\pm 0.60$  mL. La probeta se llenó con el material (semilla o almendra) hasta la marca de 100 mL, tratando de acomodar la muestra con ligeros golpes de la probeta sobre la mesa. La determinación se realizó cuatro veces. El peso volumétrico corresponde al peso en gramos de las semillas contenidas en la probeta en 100 mL.

#### 4.2.3 Fraccionamiento.

Se llevó a cabo a través de un molino Thomas Wiley Modelo 4, usando una malla con aberturas de 3mm de diámetro. A la harina obtenida en este paso se le denominó harina integral.

#### 4.2.4 Humedad (Pérdida al secado)

- Fundamento

En esta determinación la pérdida de peso es debida a la evaporación de agua en el punto de ebullición o a temperaturas cercanas a él. La pérdida del peso depende de algunos factores como el tamaño de la partícula y el peso de la muestra, el tipo de la cápsula y las variaciones de temperatura entre una y otra charola del horno (Kirk 1996).

- Materiales y reactivos

Charolas de aluminio a peso constante

Estufa de vacío Lab-Line Instruments (temperatura 60°C)

Balanza analítica SARTORIUS A210P

- Procedimiento

Sobre las charolas de aluminio a peso constante se pesaron 2 gramos de muestra finamente molida. Mismas que se introdujeron en la estufa de vacío hasta obtener un peso constante, es decir, hasta que el peso de la charola con la muestra seca no variara hasta la cuarta cifra decimal.

- Cálculos.

$$\% \text{ Humedad} = (P_f / P_i) * 100$$

Donde:

P<sub>f</sub> = peso en gramos de la muestra seca

P<sub>i</sub> = peso en gramos de la muestra húmeda

#### 4.2.5 Grasa cruda.

- Fundamento

El contenido de grasa, algunas veces llamado extracto etéreo, grasa neutra o grasa cruda, el cual puede ser considerado como formado de constituyentes lípidos libres, que básicamente consiste de grasas neutras (triglicéridos) y otros componentes lipídicos minoritarios, se determina en los alimentos por extracción del material seco y molido con una fracción ligera de petróleo o con éter etílico en un aparato de extracción continua (Kirk 1996).

- Material y reactivos

Aparato de extracción Golfish, LABCONCO.

Balanza analítica SARTORIUS A210P

Estufa de vacío Lab-Line Instruments (temperatura 60°C)

Cartuchos de celulosa

Vasos de borde esmerilado LABCONCO a peso constante

Éter de petróleo anhidro (R.A.)

- Procedimiento

Se emplearon las muestras a las cuales se determinó previamente el contenido de humedad.

Dentro de un cartucho de celulosa se colocó la muestra se tapó con un pedazo de algodón y se colocaron en el portadetal. Se adicionó aproximadamente 50 mL de disolvente sobre el vaso esmerilado y fue asegurado con ayuda del anillo metálico. El periodo de extracción duró aproximadamente cinco horas.

Una vez transcurrido el tiempo de extracción se recuperó el disolvente y se dejaron los vasos en la estufa de vacío hasta peso constante.

- Cálculos

$$\% \text{ Grasa} = (P_1 - P_0) / m \times 100$$

Donde:

$P_1$  = peso del recipiente después de la extracción (g)

$P_0$  = peso del recipiente antes de la extracción (g)

$m$  = peso de la muestra (g)

#### 4.2.6 Proteína cruda.

- Fundamento

El método empleado usualmente para la determinación de nitrógeno en los alimentos es el método Kjeldahl y varias modificaciones se han desarrollado en la actualidad. El método se basa en la combustión en húmedo de la muestra por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado en presencia de catalizadores metálicos y agua oxigenada para reducir el nitrógeno orgánico de la muestra hasta amoníaco. El digerido, una vez alcalinizado, se destila directamente o por arrastre con vapor para destilar el amoníaco, el cual es atrapado en una solución ácida y luego se titula (Kirk 1996).

- Materiales y reactivos

Balanza analítica SARTORIUS A210P

Digestor marca TECATOR modelo ab

Destilador KJELTEC Auto 1030 Autoanalyzer

Tubos de digestión

Mezcla digestiva. Fueron disueltos 3 g de sulfato de cobre pentahidratado en 20 mL de agua destilada, se agregaron 50 mL de ácido ortofosfórico, una vez que estuvo totalmente disuelta la sal, se adicionó lentamente y resbalando por la pared del recipiente 430 mL de ácido sulfúrico concentrado.

Disolución de ácido bórico 1% con indicadores. Se disolvieron 100g de ácido bórico en 9.5 L de agua destilada. Se agregaron 100 mL de verde de bromo cresol (100 mg en 100 mL de metanol) y 70 mL de rojo de metilo (100mg en 100 mL en metano). Todo esto se aforó a 10 L y se mezcló vigorosamente.

Peróxido de hidrógeno al 30 %

Sulfato de potasio (R.A.)

NaOH al 40 %

HCl 0.01 N valorada.

- Procedimiento

Se pesó de 20 a 70 mg de muestra y se colocó en el tubo de digestión, fueron agregados aproximadamente 0.5 g de sulfato de potasio y 3 mL de mezcla digestiva; se colocaron los tubos en el digestor por espacio de 15 minutos y después de ello se sacaron del digestor, se enfriaron un poco y se adicionó 1.5 mL de peróxido de hidrógeno al 30% y nuevamente se colocaron en el digestor que se encontraba a 370 °C. Se consideró que la digestión estaba realizada cuando el líquido del tubo no mostraba manchas y puntos negros y estaba traslúcida.

Una vez efectuada la digestión se enfrió y destiló en el microdestilador.

- Cálculos

$$\% \text{ Nitrógeno} = [(G_m - G_b) \times \text{meq} \times N \times 100] / m$$

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Nitrógeno} \times F$$

Donde:

$G_m$  = mL gastados de ácido clorhídrico para la muestra

$G_b$  = mL gastados de ácido clorhídrico para el blanco

meq = miliequivalente de nitrógeno (0.014)

N = normalidad del ácido clorhídrico

$m$  = peso de la muestra (g)

$F$  = factor de conversión; cuando se considera que la proteína contiene un 16 % de nitrógeno  $F = 6.25$

#### 4.2.7 Desengrasado

La harina obtenida en el paso del fraccionamiento se desengrasó en un dispositivo tipo Soxhlet con capacidad de 100 g. El disolvente utilizado fue hexano grado Q.P. y el tiempo de extracción fue aproximadamente de 18 horas.

El disolvente fue eliminado de la fracción lipídica mediante un rotavapor, posteriormente se eliminó el disolvente residual del aceite mediante una estufa con circulación de aire a una temperatura de 55 °C.

A la materia grasa obtenida se denominó grasa cruda. Después del proceso de desengrasado se le insulfó nitrógeno y se guardó en congelador para su conservación y posterior uso. A la harina resultante después del desengrasado se le llamó harina desengrasada.

#### 4.2.8 Refinamiento de la fracción lipídica.

- Fundamento.

Las grasas crudas contienen cantidades variables de sustancias, que pueden proporcionar aromas, colores, o cualidades indeseables. Entre ellas están los ácidos grasos libres, los fosfolípidos, los hidratos de carbono, las proteínas y sus productos de degradación, agua, los pigmentos (principalmente carotenos y clorofila), los productos de oxidación de las grasas. Las grasas crudas se someten a procesos comerciales de refinado diseñados para eliminar sustancias y además puedan ser agradables a los consumidores (Ziller, 1996).

En el método de refinado se siguen principalmente 3 operaciones: desgomado, neutralización, blanqueado.

##### 4.2.8.1 Desgomado.

- Fundamento

Los aceites que poseen niveles relativamente altos de fosfátidos, lecitina, cefalina, proteínas o sus productos de degradación, complejos metálicos y sustancias gomosas o mucilaginosas, que son solubles en el

aceite solo en su forma anhidra. se pueden eliminar por precipitación con una simple hidratación, calor y agitación. Al agitar, las sustancias se hidratan y floculan formando una goma mucilagosa insoluble en el aceite (Ziller, 1996).

- Material y reactivos.

Matraz Erlenmeyer

Balanza analítica SARTORIUS A210P

Parrilla de calentamiento y agitación múltiple THERMOLYNE MOD. SP-13025

Centrifuga CLAY-ADAMS, DINAC™

Ácido fosfórico al 0.1 %

- Procedimiento.

Se determinó previamente el volumen del aceite a refinar, cuyo valor fue el de referencia para los porcentajes. Se mezcló en un matraz Erlenmeyer con el ácido fosfórico al 0.1 %, en una proporción del 3% con respecto al volumen de referencia del aceite a refinar. La mezcla se sometió a calentamiento a 60 °C durante 5 minutos con agitación. Posteriormente se centrifugó a 2400 rpm a temperatura ambiente durante 15 minutos para precipitar los residuos del desgomado. Finalmente se decantó el aceite.

#### 4.2.8.2 Neutralizado.

- Fundamento.

El aceite desgomado es tratado con un álcali para eliminar los ácidos grasos libres, glicerol, hidratos de carbono, resinas, metales. El aceite se mezcla con sosa cáustica y calentamiento, convirtiendo los ácidos grasos en jabones solubles en el 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 (Ziller, 1996).

- Material y reactivos.

Matraz Erlenmeyer

Potenciómetro CORNING mod. 430

Parrilla de calentamiento y agitación THERMOLYNE mod. SP-13025

Centrífuga CLAY-ADAMS, DINAC™

Mechero Bunsen

NaOH al 15 %

Agua destilada

Tripié, tela de asbesto.

- Procedimiento.

El aceite previamente desgomado fue colocado en un matraz Erlenmeyer. El matraz se colocó en una parrilla con agitación y con el potenciómetro se determinó el pH del aceite. Con una pipeta Pasteur se añadió NaOH al 15% hasta que se obtuvo un pH neutro (aproximadamente 7). Inmediatamente se colocó el matraz con el aceite neutro en el tripié con la tela de asbesto, y se calentó la mezcla a 50 °C durante 5 minutos. Se centrifugó a 2400 rpm a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después se mezcló el aceite con agua destilada en una proporción del 10 % con respecto al volumen de referencia del aceite a refinar, y se calentó la mezcla a 80 °C durante 5 minutos. Se centrifugó a 2400 rpm a temperatura ambiente por 25 minutos.

#### 4.2.8.3 Blanqueo.

- Fundamento.

Durante el proceso de blanqueo, trazas de metales, partículas coloridas, tales como la clorofila, jabones y productos de la oxidación son removidos. La eliminación completa de los colorantes puede llevarse a cabo calentando el aceite y tratándolo con adsorbentes, como son las tierras de diatomeas o el carbón activado (Ziller, 1996).

- Material y reactivos.

Matraz Erlenmeyer

Matraz Kitasato y embudo Buchner

Embudo de filtración STM poro "M"

Parrilla de calentamiento y agitación THERMOLYNE mod. SP-13025

Papel filtro Whatman # 541

Silicato de aluminio

Carbón activado

- Procedimiento.

El aceite se mezcló con carbón activado en un porcentaje del 10 % con respecto al volumen de referencia. Se adicionó silicato de aluminio, en un porcentaje del 2 % con respecto al volumen de referencia. Se calentó la mezcla en la parrilla de agitación a 90 °C durante 5 minutos. Se filtró al vacío con el papel Whatman # 541 y después con el embudo STM de poro "M", igualmente con ayuda de vacío. No fue necesario repetir el proceso de blanqueo ya que no permaneció el color en el aceite

#### 4.2.9 Perfil de ácidos grasos

- Fundamento

El perfil de ácidos grasos de los aceites y las grasas mediante la técnica de cromatografía de gases, se obtienen generalmente tras efectuar la conversión de los ésteres de triglicéridos en ésteres metílicos, que son más volátiles (Kirk, 1996).

- Materiales y reactivos

Balanza analítica SARTORIUS A210P

Tubos KIMAX con tapón de rosca y teflón

Matraces aforados de 5 mL

Baño de temperatura controlada GRANT mod. SE10

Vortex Lab-Line instruments, serie 1290

Cromatógrafo de gases marca PERKIN ELMER Autosystem.

Columna AT™ SILAR, 30 m X 0.32 mm ID X 0.25  $\mu$ m

Micropipeta 100  $\mu$ L

Solución KOH metanólica 5%

Solución de HCl metanólica 10%

Mezcla de disolventes (grado reactivo) tolueno: hexano 80:20

Trifluoruro de boro (R.A.)

Acetona (R.A.)

Metanol (R.A.)

Tolueno (R.A.)

- Condiciones del cromatógrafo

Gas portador: helio      Presión gas acarreador: 10 psi

Presión del aire: 40 psi      Presión del hidrógeno: 30 psi

Temperatura del inyector: 250 °C      Temperatura del detector: 300 °C

Temperatura inicial del horno: 50°C      Temperatura final del horno: 240 °C

Cinta de teflón.

- Procedimiento.

Antes de empezar a trabajar se limpió todo el material empleado de la siguiente manera haciendo uso de vacío: primero con tolueno, seguido de acetona, posteriormente metanol y finalmente con acetona.

Se pesó 20 mg de aceite en un tubo con tapón de rosca. Se adicionaron 2 mL de solución de KOH metanólica al 5%, se tapó primeramente el tubo con cinta de teflón y después con el tapón de rosca. Se colocó en el baño a  $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. Se sacaron a atemperar y se agregaron 2 mL de solución de HCl metanólica al 10% y 100  $\mu\text{L}$  de trifloruro en metanol. Se calentó nuevamente a  $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. Se enfriaron y se agregaron 4 mL de agua destilada y 2 mL de mezcla de disolvente y se agitó en el vortex, entonces se extrajo la fase orgánica (fase superior) y se colocó en el matraz aforado de 5 mL. Se realizó esta operación una vez más y se aforó con mezcla de disolventes. Se inyectó 1  $\mu\text{L}$  en el cromatógrafo.

- Cálculos.

$$\%Acido.Graso = \frac{\Delta_i}{\sum_{i=1}^n \Delta_i} \times 100$$

Donde:

$$\sum_{i=1}^n \Delta_i = \text{Suma de las áreas de todos los ácidos grasos}$$

$\Delta_i$  = Área de un ácido graso en particular

#### 4.2.10 Evaluación química.

##### 4.2.10.1 Punto de fusión.

- Materiales y reactivos.

Tubos capilares de vidrio de 1 mm de diámetro interno y 2 mm de diámetro externo y de 50 a 80 mm de largo.

Termómetro con un rango de  $-20$  a  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$

Vaso de precipitados de 600 mL

Plato de calentamiento con reóstato y agitador magnético.

- Procedimiento.

Se fundió la muestra, se filtró a través de papel filtro para remover algunas impurezas y algunas trazas de humedad. Es esencial que la muestra esté absolutamente seca. Se prepararon los capilares, poniéndolos en contacto con la muestra preparada para que ésta subiera por capilaridad y alcanzara una altura aproximadamente de 10 mm. Se fundió la punta del capilar (donde la muestra estaba localizada) con una flama pequeña, teniendo cuidado para no quemar la muestra. Se guardaron los capilares en un vaso de precipitados y se almacenaron a una temperatura de 4 a 10 °C por 16 horas.

Transcurrido este tiempo se removieron los capilares del refrigerador y fueron sujetos al final del termómetro, es decir junto al bulbo de mercurio. Entonces se suspendió el termómetro en un vaso de precipitados de 600 mL, el cual contenía agua destilada. El termómetro fue sumergido hasta la marca de inmersión. La temperatura de inicio se ajustó de 8 a 10 grados por debajo de el punto de fusión de la muestra. El baño del agua estuvo en agitación magnética para remover el aire. Se incrementó la temperatura del baño en un rango de 0.5 °C por minuto.

Nota: Las grasas usualmente pasan por un estado opalescente antes de fundirse completamente. El calentamiento es continuado hasta que los tubos están completamente claros. Observar la temperatura a la cual cada tubo comienza a aclararse. Los resultados no deben de diferenciar mayor a 0.5 °C.

#### 4.2.10.2 Gravedad específica.

- Materiales y reactivos.

Picnómetro de 10 mL Duran

Baño de temperatura controlada GRANT mod. SE10

Balanza analítica SARTORIUS A210P

Éter etílico grado Q.P.

Etolol grado Q.P.

Dicromato de sodio R.A.

Ácido sulfúrico R.A.

Mezcla crómica. Se disolvieron seis gramos de dicromato de sodio en la mínima cantidad de agua, se calentó hasta completa disolución. Entonces se diluyó a 200 mL con ácido sulfúrico grado reactivo.

- Procedimiento.

Se limpió cuidadosamente el picnómetro con mezcla crómica. Se secó con acetona y después con etanol. Se llenó el picnómetro con agua destilada recientemente hervida y enfriada a 20 °C y se colocó en el baño de temperatura controlada a 25 °C. Después de 30 minutos se ajustó el nivel de agua en el picnómetro y se incorporó su capilar. Se retiró del baño y se secó cuidadosamente. Por último se pesó. Después se enjuagó repetidamente con etanol y luego con éter, y por último con acetona para dejar secar. Se determinó por diferencia el peso del agua contenida en el picnómetro a 25 °C.

Fue llenado el picnómetro con la muestra de aceite a 20 °C y se colocó en el baño a 25 °C. Después de 30 minutos se ajustó el nivel de aceite en el picnómetro y su capilar, se retiró del baño y se secó cuidadosamente. Por último se pesó el picnómetro con la muestra. Se obtuvo el peso de la muestra por diferencia entre el peso del picnómetro lleno con la muestra y el picnómetro vacío.

La gravedad específica aparente fue obtenida al dividir el peso del aceite entre el peso del agua (ambos medidos en el mismo picnómetro).

#### 4.2.10.3 Índice de refracción.

- Materiales y reactivos.

Agua destilada

Refractómetro ABBE marca Leica Mark II, Modelo 10480

- Procedimiento.

Se ajustó la temperatura del refractómetro al hacerle pasar una corriente de agua hasta que se llegó a la deseada. Se verificó el instrumento utilizando agua como solución de referencia. El índice de refracción del agua a 20°C es de  $1.3333 \pm 0.0003$  (los errores pueden corregirse por medio del tornillo de ajuste).

Entonces fue colocada una gota de la muestra sobre el prisma inferior y se presionó con el superior hasta que ambos quedaron juntos. Se observó a través del ocular y se ajustó el botón de ajuste cromático hasta que apareció una línea fina, entonces se ajustó el campo hasta que la parte baja estaba oscura y la superior iluminada, con ayuda del prisma, es decir hasta que la línea de separación se encontrara en la intersección del retículo. La separación estaba perfectamente definida. Se tomaron varias lecturas del índice de refracción del aceite a 20 °C.

#### 4.2.10.4 Índice de acidez.

- Materiales y reactivos.

Matraces Erlenmeyer de 250 mL

Bureta graduada de 10 mL

Balanza analítica SARTORIUS A210P

Etanol (R. A.)

Solución alcohólica de fenolftaleína al 1 %

Hidróxido de sodio 0.1 N valorada

- Procedimiento.

Fueron neutralizados 50 mL de etanol con NaOH 0.1 N, usando fenolftaleína como indicador, hasta que se observó una coloración levemente rosada. Se pesó aproximadamente 1 gramo de aceite fundida en el matraz Erlenmeyer, se disolvió con el etanol neutralizado y se adicionaron unas gotas de fenolftaleína. Se tituló con NaOH 0.1 N agitando constantemente hasta que el color rosa permaneció durante 15 segundos.

- Cálculos.

$$\% \text{ Ac. Oleico} = (\text{mL}_{\text{NaOH}} \times N_{\text{NaOH}} \times 0.282 \times 100) / \text{g muestra}$$

miliequivalentes del ácido oleico = 0.282

#### 4.2.10.5 Índice de yodo (Método de Hanus)

- Fundamento.

Los acilglicerolos de los ácidos grasos insaturados presentes en la grasa (principalmente los de la serie de 18 carbonos) se unen mediante sus dobles enlaces a una cantidad definida de monobromuro de yodo (reactivo de Hanus), el cual es añadido en exceso. La cantidad de halógeno restante es titulada con solución valorada de tiosulfato de sodio y por diferencia con un blanco se obtiene la cantidad de monobromuro de yodo absorbido por la muestra (Kirk, 1996).

- Materiales y reactivos.

Matraces yodometricos de 250 mL

Bureta graduada de 50 mL

Balanza analitica SARTORIUS A210P

Reactivo de Hanus marca Hycel de México, No de catálogo 1356

Acido acético glacial R. A.

Dicromato de potasio R. A.

Acido clorhídrico 1 N

Solución de yoduro de potasio al 15% p/v

Solución de almidón al 1% p/v. Se pesó aproximadamente un gramo de almidón y fue disuelto en un poco de agua destilada hasta que se formó una pasta. entonces se adicionó 100 ml de agua destilada caliente y se hirvió por un minuto.

Tiosulfato de sodio 0.1 N. Fueron disueltos 25 gramos de tiosulfato de sodio pentahidratado en un litro de agua destilada. Se llevó a ebullición moderada y se mantuvo durante 5 minutos. Se transfirió en caliente a un frasco contenedor (de color ámbar), el cual fue previamente limpiado con mezcla crómica y enjuagado con agua destilada hervida. Durante su almacenaje fue guardado en la oscuridad en un lugar templado. *Titulación.* Se pesó en balanza analítica 0.2000 a 0.2300 g de dicromato de potasio, secado previamente (100°C durante

2 horas) en matraz Erlenmeyer. Se disolvieron en 80 mL de agua destilada junto con 2 g de KI. Se añadió 20 mL de HCl 1 N y se guardó en la oscuridad durante 10 minutos. Se titula con la disolución de tiosulfato de sodio, añadiendo unas gotas de solución indicadora de almidón al 1% hacia el final de la valoración, es decir, cuando se observó un color ligeramente amarillo. El punto final de la valoración fue cuando se observó un color azul. La normalidad de la solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  se calculó mediante la siguiente ecuación:

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

- Procedimiento.

Se pesó 0.25 g de aceite en un matraz yodometrico y se disolvió en 10 mL de diclorometano. Con la bureta graduada se añadió 25 mL de la solución de Hanus y se dejó reposar en la oscuridad durante 30 minutos, con agitación ocasional.

Transcurrido este tiempo se añadieron 10 mL de solución de KI al 15 %, se agitó vigorosamente y se añadieron 100 mL de agua destilada recientemente hervida y enfriada, cuidando de lavar cualquier residuo que pudo haber quedado en el tapón de vidrio. Se tituló inmediatamente, con ayuda de un agitador magnético, con la solución de tiosulfato de sodio 0.1 N hasta que apareció un color amarillo, entonces se añadieron unas gotas de solución de almidón al 1% y se continuó la titulación hasta que la coloración azul desapareció, es decir se obtuvo una solución incolora en el matraz. Hacia el final de la titulación, se tapó el matraz y se agitó vigorosamente para que el yodo remanente en disolución en diclorometano fuera también titulado.

Se llevó a cabo un blanco bajo las mismas condiciones.

- Cálculos.

$$\text{Índice de yodo} = ((B - M) \times N \times 12.69) / \text{g mtra} = [\text{g I} / 100\text{g aceite}]$$

Donde:

B = mL de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0.1 N gastados en el blanco

M = mL de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0.1 N gastados en la muestra

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

#### 4.2.10.6 Índice de saponificación.

- Fundamento.

Los ácidos grasos de los acilglicérols de la grasa son liberados con una solución de hidróxido de potasio en etanol (la cual se añade en exceso), obteniéndose glicerol y las sales respectivas de los ácidos grasos. El hidróxido de potasio sin reaccionar se titula con ácido clorhídrico 0.5 N y por diferencia con un blanco se determina la cantidad de hidróxido de potasio empleado para saponificar la muestra (Kirk, 1996).

- Materiales y reactivos.

Balanza analítica SARTORIUS A210P

Matraces de bola de fondo plano de 250 mL

Refrigerante

Bureta graduada de 50 mL

Canastilla de calentamiento

Óxido de calcio granulado R.A

Etanol anhidro R.A

Ácido clorhídrico 0.5 N valorado

Solución etanólica de fenolftaleína 1% p/v

Solución alcohólica de hidróxido de potasio. Se trituraron 40 g de KOH en un mortero junto con 45 g de óxido de calcio granulado. De un litro de etanol, se añadió 100 mL a la mezcla del mortero y se transfirió a un matraz con cuello largo. Se transfirió cuantitativamente la mezcla con ayuda de varias porciones de etanol. El etanol restante fue añadido al matraz, se agitó vigorosamente durante 5 minutos y se invirtió el matraz, dejando reposar la solución durante toda la noche. Se repitió la agitación varias veces durante el día. Por último se filtró para eliminar el óxido de calcio y se guardó en un frasco con un tapón de vidrio.

- Procedimiento.

Se pesaron en balanza analítica de 2 a 2.5 g de la grasa en un matraz de bola de fondo plano. Se adicionaron con bureta 50 mL de solución de KOH. Fue conectado el matraz al refrigerante y se llevó hasta ebullición, manteniéndolo hasta que la muestra estuviera totalmente saponificada (aproximadamente 30 minutos). Se enfrió y se tituló con HCl 0.5 N, usando fenolftaleína al 1% como indicador.

Se llevó a cabo un blanco bajo las mismas condiciones que la muestra.

- Cálculos.

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

Donde:

B = mL de HCl gastados en el blanco

S = mL de HCl 0.5 N gastados en la muestra

### Harina desengrasada

La fracción proteínica, obtenida después del desengrasado, se colocó en una campana de extracción para eliminar el disolvente residual. A ésta fracción se le realizaron tres determinaciones: proteína cruda, proteína verdadera y oligosacáridos. Para la cuantificación de proteína verdadera se siguió la misma metodología que para la harina integral (obtenida después del fraccionamiento).

#### 4.2.11 Proteína verdadera.

- Fundamento

La técnica se basa en la solubilización del nitrógeno no proteínico así como de la proteína soluble (de ahí que la muestra deba estar finamente molida) y la posterior precipitación de dicha proteína con tungstato de sodio; con el fin de eliminar el nitrógeno no proteínico que pueda interferir en la determinación del nitrógeno por medio de un micro-Kjeldahl.

Con éste método la proteína no-soluble también es tomada en cuenta ya que la etapa de filtración es incluida junto con la proteína soluble precipitada.

- Material y reactivos

Balanza analítica

Digestor marca TECATOR modelo ab

Destilador KJELTEC Auto 1030 Autoanalyzer

Tubos de digestión

Agitador magnético marca CORNING, con agitadores pequeños

Papel Whatman # 50 ó # 542

Peróxido de hidrógeno al 30 %

Sulfato de potasio R.A.

HCl 0.01N valorado

NaOH al 40 %

Mezcla digestiva. Se mezclaron por 30 minutos aproximadamente los siguientes reactivos en la siguiente proporción: 3 g de sulfato de cobre pentahidratado, 300 mL de ácido sulfúrico concentrado y 100 mL de ácido fosfórico.

Disolución de ácido bórico 1% con indicadores. Se disolvieron 100g de ácido bórico en 9.5 L de agua destilada. Se agregaron 100 mL de verde de bromo cresol (100 mg en 100 mL de metanol) y 70 mL de rojo de metilo (100mg en 100 mL en metano). Todo esto se aforó a 10 L y se mezcló vigorosamente.

Solución precipitante. Se disolvieron 5 g de tungstato de sodio y 1.51 de fosfato ácido de sodio dodecahidratado, en 20 mL de agua. se añadieron 22 mL de HCl 2N y se mezcló. Por último se aforó a 50 mL con agua destilada.

- Procedimiento

Proceso de precipitación.

Se pesaron de 50 a 100 mg de muestra finamente molida y se colocaron en un vaso de precipitado de 50 mL. Se adicionaron 5 mL de agua caliente y se colocó en agitación mecánicamente durante 15 minutos, transcurrido este tiempo se agregaron 2 mL de solución precipitante y se dejó reposar por 10 minutos; después se transfirió cuantitativamente para su posterior filtración en el papel Whatman, se utilizaron 25 mL de agua destilada caliente aplicando ligera succión.

Proceso de digestión.

Se colocó el papel filtro con el precipitado en un tubo de digestión, al cual se le agregaron 0.5 g de sulfato de potasio, 5 mL de mezcla digestiva y se colocó en el digestor y se calentó aproximadamente 15 minutos, transcurrido este tiempo se retiró el tubo del digestor y esperó algunos minutos para que se enfriara y entonces se añadieron 3 mL de peróxido de hidrógeno al 30%, después fueron introducidos nuevamente al digestor y se calentaron hasta que la digestión estaba completa.

Destilación y titulación.

Una vez efectuada la digestión se dejó enfriar el tubo digestor y se procedió a la destilación y titulación.

- Cálculos

$$\% \text{ Nitrógeno} = [(G_m - G_b) \times \text{meq} \times N \times 100] / m$$

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Nitrógeno} \times F$$

Donde:

$G_m$  = mL gastados de ácido clorhídrico para la muestra

$G_b$  = mL gastados de ácido clorhídrico para el blanco

meq = miliequivalente de nitrógeno (0.014)

N = normalidad de ácido clorhídrico

m = peso de la muestra (g)

F = factor de conversión; cuando se considera que la proteína contiene un 16 % de nitrógeno F = 6.25

#### 4.2.12 Oligosacáridos.

- Materiales y reactivos

Disolución acuosa de etanol al 50%

Metanol grado reactivo

Estándar de rafinosa marca Sigma lote R-0250

Estándar de estaquiosa marca Sigma lote S-4001

Papel Whatman # 5

Cartucho Sep-pack C<sub>18</sub> marca Waters

Acrodisco con tamaño de poro de 0.2 $\mu$ m

Centrifuga CLAY-ADAMS, DINAC™

Rotavapor marca BÜCHI modelo 461

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca Perkin Elmer

Bomba Perkin Elmer Binary LC 250

Detector infrarrojo Perkin Elmer serie 200 Índice de refracción

Columna de sílica aminada

Fase móvil acetonitrilo: agua 75:25

Flujo de la fase móvil: 1.5 mL / min

Tiempo de la corrida: 10 minutos

- Procedimiento

Extracción.

Se pesaron 3 gramos de muestra finamente molida y se añadieron 30 mL de etanol acuoso al 50% y se puso en agitación constantemente a 55-60 °C por una hora. Después se centrifugó el extracto por 30 minutos a 3000 rpm y se filtró el sobrenadante a través de papel filtro Whatman # 5, se lavó cuantitativamente. El volumen del filtrado se redujo en el rotavapor a 50 °C, se tomó un volumen de 10 mL con agua destilada. Entonces 2 mL de éste último volumen se pasaron a través de un cartucho Sep-pack C<sub>18</sub>, activado previamente con 3 mL de metanol seguido de 3 mL de agua desionizada, con el propósito de eliminar interferencias de compuestos no polares. Antes de la inyección, se filtró el extracto a través de un acrodisco de 0.2 µm de tamaño del poro.

Separación y cuantificación por HPLC.

Para realizar la cuantificación de rafinosa y estaquiosa se prepararon estándares de rafinosa y estaquiosa en concentraciones desde 0.009 a 0.020 M, y se hizo el análisis por triplicado de cada dilución y un análisis de correlación lineal entre la concentración de la dilución y la altura de los picos. Para la muestra se inyectó a la columna 20 µL del extracto obtenido bajo las mismas condiciones que los estándares. La concentración de los oligosacáridos se obtuvo a partir de los datos de la curva de calibración por interpolación.

#### 4.2.13 Determinación de ácido fítico.

##### 4.2.13.1 Método de Haug & Lantzsh (1983)

- Fundamento.

Este método se basa en la determinación colorimétrica indirecta del fósforo del fitato en la muestra. El extracto de la muestra es calentado con una solución acidificada de concentración conocida de Fe (III) en exceso, el cual forma un complejo con el fitato. Se cuantifica espectrofotométricamente el hierro residual que el ácido fítico no alcanza a acomplejar mediante la reacción colorida que se produce con la 2,2-bipiridina.

- Materiales y reactivos.

Balanza analítica SARTORIUS A210P

Espectrofotómetro UV/VIS marca SEQUOIA-TURNER modelo 340

Parrilla de calentamiento y agitación múltiple THERMOLYNE MOD. SP-13025

Centrífuga CLAY-ADAMS, DINACTM

Vasos de precipitados de 50 mL

Sulfato férrico de amonio. 12 H<sub>2</sub>O

2,2-bipiridina R. A.

Ácido tioglicólico R.A.

Ácido fítico R.A.

Ácido clorhídrico 0.2 N

Solución férrica. Se pesaron 0.2 g de sulfato férrico de amonio .12 H<sub>2</sub>O, se disolvieron en 100 mL de HCl 0.2 N y se aforó a 1 L con agua desionizada.

Solución de 2,2-bipiridina. Se pesó 1 g de 2,2-bipiridina, y se añadió 1 mL de ácido tioglicólico y se llevó a un volumen de 100 mL con agua desionizada.

Solución estándar de fitatos. Se preparó de tal manera que contenía 1.5 mg/mL de ácido fítico en agua desionizada, es decir:

$$1500 \mu\text{g fitato de sodio/mL} * (185.82 \mu\text{g P}/923.8 \mu\text{g fitato de sodio}) = 307.72 \mu\text{g P/mL}$$

Curva de calibración. Esta se preparó de acuerdo a la siguiente tabla, a partir de la solución estándar de fitatos.

Tabla No. 3 Curva de calibración para la determinación de ácido fítico  
por el método de Haug & Lantzsh

Tubo	mL solución estándar	Aforo (mL)	Concentración final ( $\mu\text{g P/mL}$ )
1	1	100	3.017
2	2	100	6.034
3	4	100	12.069
4	6	100	18.102
5	8	100	24.1376
6	10	100	30.172

- Procedimiento.

Se pesó de 0.04-0.120 g de muestra (dependiendo del contenido esperado de ácido fitico presente en la muestra) y se colocaron en un vaso de precipitados de 50 mL, fueron adicionados 20 mL de HCl 0.2 N y se sometió a agitación mecánica a temperatura ambiente durante 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se centrifugó el extracto a 1200 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente y se colectó el sobrenadante. Se tomó una alícuota de 0.5 mL de la muestra, agua destilada, o estándar, según correspondiera. Esta alícuota se colocó en un tubo de ensaye, se añadió 1 mL de la solución férrica y el tubo fue tapado con una canica, a fin de evitar evaporación. Los tubos fueron colocados en una gradilla y en un baño de agua a ebullición por 30 minutos, cuidando que el agua cubriera el líquido dentro de los tubos. Transcurrido este tiempo se esperó a que se enfriaran, una vez alcanzada la temperatura ambiente se agregaron 2 mL de solución de 2,2-bipiridina y se mezcló. Se midió la absorbancia a 519 nm a los 30 segundos exactos después de haber agregado el reactivo a cada tubo. Se utilizó una celda con agua desionizada para calibrar el espectrofotómetro en cero. A cada una de las absorbancias obtenidas se les restó el valor obtenido por el blanco para obtener de esta manera la absorbancia corregida respectiva.

Comentario [P1]:

- Cálculos.

Con los datos de absorbancia de la curva de calibración se calculó la regresión lineal colocando los datos de las absorbancias en el eje "y" y la concentración de fósforo fitico [ $\mu\text{g/mL}$ ] en el eje "x". Teniendo en cuenta que seis moles de fósforo están contenidas en una mol de ácido fitico y relacionarlos con su peso molecular para obtener el resultado en gramos de ácido fitico por 100 g de muestra.

#### 4.2.13.2 Método Fruhbeck, G. (1995)

- Fundamento.

Este método emplea una columna de intercambio iónico con el fin de purificar los extractos del ácido fitico eliminando las fracciones menores de fosfatos de inositol que comúnmente se incluyen en otros métodos, permitiendo una cuantificación real del ácido fitico. La determinación espectrofotométrica se basa en la medida de la disminución de la absorbancia del complejo  $\text{FeCl}_3$ -Ácido sulfosalicílico (Reactivo de Wade) debido al enlace del Fe (III) con el ácido fitico.

- Materiales y reactivos.

Balanza analítica SARTORIUS A210P

Espectrofotómetro UV/VIS marca SEQUOIA-TURNER modelo 340

Parrilla de calentamiento y agitación múltiple THERMOLYNE MOD. SP-13025

Centrífuga CLAY-ADAMS, DINAC™

Vasos de precipitados de 50 mL

Micropipetas con capacidad de 500  $\mu$ L y 1000  $\mu$ L

Cloruro de hierro (III) hexahidratado

Fitato de sodio (Sigma Chemical Co. P-3168)

Resina de intercambio aniónico Dowex AG1X8 (200-400 mesh)

Ácido clorhídrico 2.4% (0.65 N)

Hidróxido de sodio 1 N

Cloruro de sodio 0.1 N

Cloruro de sodio 0.7N

Reactivo de Wade. Se pesó 0.3 g Cloruro de hierro (III) hexahidratado y se disolvió en agua desionizada hasta un volumen de 100 mL.

Nota: El reactivo debe ser preparado en el momento de hacer la determinación, y una vez adicionado a las muestras debe leerse en menos de 30 minutos.

Preparación de los estándares: se preparó una solución concentrada de ácido fitico que contenía 1000  $\mu$ g de ácido fitico/mL. Para ello se pesó exactamente 0.080 g de la sal de fitato de sodio y se aforó con agua desionizada hasta un volumen de 50 mL.

Curva de calibración. A partir de la solución de ácido fitico con concentración 1000  $\mu$ g de ácido fitico/mL se prepararon las soluciones de los estándares de 5, 10, 20, 30, 40 y 50  $\mu$ g/mL de la siguiente manera:

Tabla No. 4 Curva de calibración para la cuantificación de ácido fitico por el método Fruhbeck, G.

Tubo	mL solución estándar	Aforo (mL)	Concentración final ( $\mu$ g ácido fitico / L)
1	0.125	25	5
2	0.250	25	10
3	0.500	25	20
4	0.750	125	30
5	1.000	25	40
6	1.250	25	50

- Procedimiento.

#### Preparación de columnas de intercambio iónico.

Se pesó aproximadamente 0.5 g de resina de intercambio aniónico Dowex y se hidrató con 0.6 mL de agua desionizada. al mismo tiempo se prepararon las "columnas" utilizando jeringas de 3 mL y se les introdujo en el fondo un pequeño tapón de fibra de vidrio (cuidando de no poner en exceso) y colocarlas sobre una gradilla.

Se agregó a la columna la resina hidratada, cuidando de que quedara asentada uniformemente. Una vez que la resina estuvo bien empacada se adicionó 15 mL de NaCl 0.7 N y posteriormente se lavó con 30 mL de agua desionizada, cuidando de dejar líquido suficiente para que no se seque la resina (aproximadamente 0.5 cm de altura arriba de la resina empacada) para que no se seque y estuviera lista para usarse.

#### Extracción del ácido fitico.

Se pesó 1 g de la muestra (< 5 % Grasa), y se colocó dentro de un vaso de precipitados de 50 mL se adicionó 20 mL de HCl 2.4%, el pH de la mezcla debe estar entre 0 y 1, lo cual fue necesario para disociar el fitato de complejos de minerales y proteínas. Se sometió a agitación vigorosa (200 rpm) durante 2 horas a temperatura ambiente, el extracto obtenido se centrifugó a 1200 rpm a temperatura ambiente por 30 minutos y se colectó el sobrenadante.

#### Purificación de la muestra por columna de intercambio iónico.

Se tomó una alícuota del sobrenadante colectado y fue diluido con agua desionizada para disminuir la concentración total del anión (Nota: Se recomienda la dilución de 1:25 para alimentos que contenga 1% o más de ácido fitico, la dilución de 5:25 en caso de contener menos). Para obtener mejores recuperaciones el pH de la alícuota diluida se ajustó a 6 (superior al punto isoeléctrico de las proteínas) con NaOH 1 N. Posteriormente se tomó 10 mL de la alícuota diluida y se transfirió cuantitativamente a la columna previamente preparada. Se lavó la columna con 15 mL de NaCl 1N (para eliminar fosfato inorgánico y fracciones menores de inositol) y se desechó el agua de lavado. Se eluyó el fitato con 15 mL de NaCl 0.7 N y se colectó el extracto purificado.

#### Determinación espectrofotométrica.

Se tomaron 3 mL de agua desionizada (usada como blanco), ó 3 mL de los estándares, o de los extractos purificados a través de la columna, los cuales fueron previamente ajustados a pH 3 y se adicionó 1 mL de Reactivo de Wade, se sometió a agitación en un vortex por 5 segundos y se leyó la absorbancia a 500 nm.

Se utilizó una celda con agua desionizada para calibrar el espectrofotómetro en cero, se leyó la absorbancia del blanco, las muestras problema y los estándares, cada una de estas se les restó por separado el blanco para así obtener la absorbancia corregida respectiva.

- Cálculos.

Realizar la regresión lineal de la curva patrón con las absorbancias corregidas, para obtener la concentración del ácido fitico presente en las muestras interpolar las absorbancias y tomar en cuenta las diluciones empleadas.

#### Metodología del trabajo biológico.

##### 4.2.14 Toxicidad aguda.

- Fundamento.

La toxicidad aguda de una sustancia se define como "los efectos tóxicos adversos que aparecen en un periodo corto después de la administración de una dosis única o de múltiples dosis repetidas en un intervalo de 24 horas" (Derache R, 1990).

- Material y reactivos.

Harina integral de almendra de calabaza.

Harina desengrasada de almendra de calabaza.

Aceite crudo de almendra de calabaza.

Harina de soya marca Food Protein

Aceite de maiz marca comercial.

Goma guar 0.2% p/v

Seis ratones macho por cada lote de la cepa ICR de  $20 \pm 1$  g para la muestra de aceite,  $25 \pm 1$  g para las muestras de harina integral y de harina desengrasada.

Jeringa hipodérmica de 3 mL

Agujas especiales para administración oral

Jaulas de acrílico.

Bebederos.

Balanza granataria para animales de laboratorio con canastilla OHAUS mod. 700.

- Procedimiento.

Condiciones:

Vehículo utilizado (harinas): goma guar al 0.2%

Vehículo utilizado (aceites): aceite de maíz

Lote control (harinas): harina de soya

Lote control (aceites): aceite de maíz

Dosis: 15000 mg / kg peso corporal

Administración: 5D.

Distribución de los animales.

Los ratones fueron marcados en la cola para su identificación. Se dejaron en ayuno por 12 horas, retirándoles el alimento y dejándoles solamente el agua. El día del experimento se pesaron. Se repartieron 6 ratones en cinco lotes de acuerdo a la distribución de "culebra japonesa", es decir, se ordenaron con respecto a su peso en orden ascendente y se distribuyeron en los lotes según el siguiente esquema:

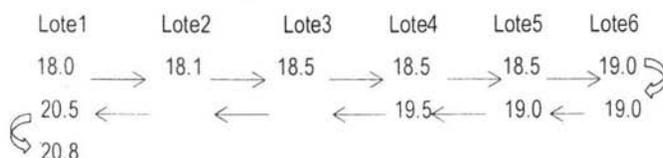


Figura No.5

Distribución de animales de laboratorio de acuerdo a su peso

Según la "Culebra japonesa"

Administración de las muestras.

Dada la naturaleza de las muestras de harina se decidió administrar la dosis en tres tomas en un lapso de 24 horas, y la muestra de aceite se administró en una sola dosis. Después de las administraciones de las muestras a los ratones se les proporcionó agua *ad libitum*.

Observaciones.

En las próximas 24 horas a la administración de las muestras se hicieron observaciones de síntomas clínicos, descritos en el anexo 2, así como las muertes que se presentaran. Después se hicieron las mismas observaciones a las 36 y 48 horas y en este lapso se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*, después de las 48 h se pesaron los animales y se sacrificaron.

#### 4.2.15 Toxicidad subcrónica.

- Fundamento.

La toxicidad subcrónica es el conjunto de efectos observados después de una administración cotidiana repetida o frecuente de una o varias dosis de la sustancia empleada. La duración de esta prueba no excede los 90 días. (Derache R, 1990; Shibamoto T, 1996).

- Material y reactivos.

Harina integral de almendra de calabaza.

Harina desengrasada de almendra de calabaza.

Aceite crudo de almendra de calabaza.

Harina de soya marca Food Protein

Aceite de maíz marca comercial.

Seis ratones macho por cada lote de la cepa ICR de 20-23 g.

Estante metálico con jaulas individuales de acero inoxidable.

Ebenederos.

Comederos

Balanza granataria para animales de laboratorio con canastilla OHAUS mod. 700.

Pellets para ratones

Molino Thomas Wiley Modelo 4  
Horno LAB-LINE Imperial III

- Procedimiento.

Condiciones.

Dosis 15000 mg / kg de peso corporal.

Duración 28 días

Lote control harinas: harina de soya

Lote control aceite: aceite de maíz

Elaboración de pellets.

Se molieron los pellets a través del molino a fin de obtener una harina y se mezclaron con las muestras. Estudios previos han reportado que ratones con características similares consumen aproximadamente 5 g de alimento / día, por lo que tomando en cuenta la dosis a emplear se tiene lo siguiente:

$$(15 \text{ g muestra} / 1000 \text{ g peso corporal}) \times (20 \text{ g peso corporal} / 5 \text{ g dieta}) = 0.06 \text{ g muestra} / \text{g alimento}$$

Se incorporó manualmente la muestra respectiva a la harina de los pellets, se adicionó agua potable hasta obtener una pasta. Se moldearon los pellets con la mano y se colocaron en el horno para su secado.

Distribución de los animales.

Los ratones se dejaron en ayuno por 12 horas, retirándoles el alimento y dejándoles solamente el agua. El día del experimento se pesaron los ratones, este peso corresponde al peso inicial. Se repartieron en cinco lotes de seis ratones cada uno de acuerdo a la distribución de "culebra japonesa" (página 50) y se colocaron individualmente en su respectiva jaula. Se eligieron al azar 10 ratones y se realizó una sangría ocular, la cual se llevó a cabo colocando un capilar en la parte posterior del ojo del ratón y se hizo presión girándolo levemente, de tal manera que la sangre fluyera fuera del ojo para recibirla en un microtainer que contenía EDTA. Posteriormente se procesaron las muestras en un equipo automatizado marca SYSMEX NE-15000 de industrias Hitachi, en donde se obtuvieron los parámetros hematológicos.

Administración de las muestras.

Se pesaron y suministraron la ración de pellets a cada animal. Ya que estos animales tienden a desperdiciar el alimento, se colocó una charola de papel manila debajo de su respectiva jaula con el fin de recuperar el alimento. Se administró agua *ad libitum* y se cambiaron cada semana el agua de los bebederos.

Observaciones.

Se pesó el alimento y los ratones tres veces por semana durante todo el ensayo. Para llevar un control adecuado de los datos se utilizó una hoja de control como la que se muestra en el anexo No 3.

El día en que terminó el experimento se pesaron los ratones (peso final). A todos los ratones se les realizó la sangría ocular para posteriormente procesar las muestras como al inicio del experimento.

Se calculó la eficiencia alimentaria de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$E.A. = \frac{\text{Ganancia en peso (g)}}{\text{Alimento consumido (g)}} \times 100$$

Donde.

Ganancia en peso = Peso final (g) – Peso inicial (g)

Alimento consumido = Alimento consumido en todo el transcurso del experimento.

Finalmente se sacrificaron todos los ratones para obtener el intestino, riñón, pulmón e hígado de cada uno y obtener la relación porcentual de cada uno en base a la siguiente ecuación:

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

#### 4.2.16 Relación de eficiencia proteínica (Osborne & Mendel).

- Fundamento.

La relación de la eficiencia proteínica (REP), más conocido como PER (protein efficiency ratio), es el peso en gramos ganado por las ratas por cada gramo de proteína consumida (Fennema O. 1993).

- Material y reactivos.

Harina integral de almendra de calabaza (*C. argyrosperma*).

Harina desengrasada de almendra de calabaza (*C. argyrosperma*).

Caseína

Glucosa

Sacarosa

Dextrina comercial (marca Maicena).

Aceite vegetal.

Manteca vegetal.

Mezcla de sales.

Mezcla de vitaminas.

Celulosa

Ratas macho de la cepa WINSTAR de  $47g \pm 5$

Estante metálico con jaulas individuales de acero inoxidable.

Bebedores.

Balanza granataria para animales de laboratorio con canastilla OHAUS mod. 700.

- Procedimiento.

Preparación de las dietas.

Se prepararon con un nivel de proteína del 10%. Las dietas son isocalóricas e isoproteínicas con respecto a la dieta de referencia (caseína):

Tabla No 5. Fórmula base utilizada para la elaboración de las dietas.

Componente.	%
Caseína (95.2% proteína)	10.5
Glucosa	19.0
Sacarosa	22.0
Dextrina	25.0
Aceite vegetal	6.0
Manteca vegetal	8.0
Mezcla de sales	2.0
Mezcla de vitaminas	1.0
Colina (sol. Al 50%)	0.4
Celulosa	6.1

Para formular las dietas de las muestras a ensayar es necesario contar con el análisis proximal de la fuente de proteína. En la tabla No. 6 se presenta el análisis proximal de las muestras a ensayar.

Tabla No 6. Análisis proximal de la harina integral y harina desengrasada de la almendra de calabaza (*C. argyrosperma*).

%	Harina integral	Harina desengrasada
Humedad	3.54	6.70
Grasa	45.88	3.00
Proteína	31.49	60.00
Cenizas	6.85	11.68
Fibra cruda	8.71	14.85
Hidratos de carbono	3.53	3.77

En base al análisis proximal, en la tabla No. 7 se presentan las formulaciones de las muestras a ensayar las que son isoproteínicas e isocalóricas con respecto a la dieta de referencia (caseína).

Tabla No 7. Formulación de las dietas.

Ingrediente	%	
	Harina integral	Harina desengrasada
Harina	31.76	16.67
Sacarosa	21.62	2.79
Dextrosa	18.68	18.82
Dextrina	24.58	24.76
Manteca vegetal	---	7.71
Aceite de maíz	---	5.79
Mezcla de sales	1.96*	2.00
Mezcla de vitaminas	1.00	1.00
Sol. ce colina	0.40	0.40
Celulosa	---	1.06

\* Se ajustó al 100% con este nutrimento.

--- No fue necesario agregar este nutrimento.

#### Distribución de los animales.

Se utilizaron 6 ratas macho por lote en jaulas individuales. El primer día las ratas se pesaron en forma individual y para tener una adecuada distribución de animales por lote se repartieron de acuerdo a la distribución de "culebra japonesa" de acuerdo a la figura No. 4 (Pág. 50).

#### Desarrollo de la prueba.

Una vez que se tuvieron los diferentes lotes y se le colocó a cada animal su respectivo alimento y agua *ad libitum*. Ya que las ratas al comer tienden a desperdiciar el alimento se colocó debajo de la jaula una charola de papel para recuperar este material. Cada tercer día se registraron el peso de cada rata y el alimento ingerido, esto se hizo durante los 21 días que duró el experimento.

Para llevar a cabo el control de los datos del alimento ingerido y la ganancia en peso del alimento se utilizó el formato del anexo 3.

- Cálculos.

Se calculó la REP para cada una de las ratas empleando la siguiente ecuación:

$$REP = \Delta P / \Sigma AI * F$$

Donde:

$\Delta P$  = incremento en peso de las ratas (en gramos)

$\Sigma AI$  = alimento ingerido total (en gramos)

F = % de proteína en la dieta / 100

$$RPE = \frac{\sum_{i=1}^n REP_i}{n}$$

REP ajustada = REP experimental X (REP caseína ref / REP caseína exp)

REP caseína ref = 2.5

#### 4.2.16.1 Digestibilidad *in vivo*.

- Materiales y reactivos

Balanza analítica SARTORIUS A210P

Digestor marca TECATOR modelo ab

Destilador KJELTEC auto 1030 Autoanalyzer

Tubos de digestión TECATOR

Mezcla digestiva.

Disolución de ácido bórico con indicadores.

Peróxido de hidrógeno al 30 %

Sulfato de potasio (R.A.)

NaOH al 40 %

HCl 0.01 N valorada.

- Procedimiento

Se recolectaron las heces de las ratas del bioensayo de la REP del día 15 al 22 y se pesaron. Fueron molidas finamente. Se pesaron aproximadamente 800 mg. Se determinó la cantidad de nitrógeno de acuerdo al método Kjeldahl que está descrito en la determinación de proteínas. Para los cálculos se tomó en cuenta el peso del alimento ingerido de los días 18 al 22 del bioensayo y se cuantificó su contenido de proteína.

- Cálculos

$$\% \text{ Nitrógeno heces} = [(G_h - G_b) \times \text{meq} \times N \times 100] / m$$

Donde;

$G_h$  = mL gastados de ácido clorhídrico para la muestra

$G_b$  = mL gastados de ácido clorhídrico para el blanco

meq = miliequivalente de nitrógeno (0.014)

N = normalidad de ácido clorhídrico

m = peso de heces (g)

$$\text{Nitrógeno Ingerido} = (\% \text{ Nitrógeno dieta} \times \text{Dieta ingerida}) / 100$$

$$\text{Nitrógeno Fecal} = (\% \text{ Nitrógeno heces} \times \text{Total de heces}) / 100$$

$$\text{Digestibilidad aparente} = (\text{Nitrógeno absorbido} / \text{Nitrógeno ingerido}) \times 100$$

$$\text{Digestibilidad aparente} = ((\text{Nitrógeno ingerido} - \text{Nitrógeno fecal}) / \text{Nitrógeno ingerido}) \times 100$$

## 5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

### 5.1 Parámetros físicos

En la tabla No. 8 se muestran los resultados de la determinación de los parámetros físicos de la almendra y semilla de calabaza.

Tabla No 8. Parámetros físicos para la almendra y la semilla de calabaza (*C. argyrosperma*)

PARÁMETRO	SEMILLA	ALMENDRA
Largo (mm)	2.713 ± 0.160	2.302 ± 0.117
Ancho (mm)	1.494 ± 0.166	0.873 ± 0.103
Peso hectolitrico (g / 100 mL)	20.10 ± 0.80	41.73 ± 1.31
Número volumétrico (a)	73 ± 2.4	235 ± 1.8
Peso unitario (g)	0.29 ± 0.00	0.19 ± 0.00

Valor promedio ± desviación estándar

a = número de unidades en 100 mL

Los parámetros físicos se realizaron para contar con una rápida caracterización para la posible adquisición de nuevos lotes de la materia prima.

Físicamente la semilla presenta un aspecto ovalado de color aperlado blanquecino con borde verdoso y la almendra un color verde seco.

### 5.2 Descascarado.

Después de la operación de descascarado se obtuvo la almendra y la cáscara y la relación porcentual entre ellas:

Almendra = 61.39 % ± 4.96

Cáscara = 34.77 % ± 1.18

El rendimiento de la operación del descascarado se puede considerar como favorable para la almendra, ya que fue mayor al 50%, obteniendo un valor promedio de 61.39 %, y de 34.77% para la cáscara.

### 5.3 Análisis bromatológico de la harina integral y desengrasada

En la siguiente tabla se presentan los valores de humedad, grasa y proteína cruda de la harina integral y de proteína cruda y verdadera de la harina desengrasada.

**Tabla No 9.** Análisis bromatológico de la almendra de calabaza (*C. argyrosperma*), expresada en gramos por cien gramos de muestra.

DETERMINACIÓN (%)	HARINA INTEGRAL	HARINA DESENGRASADA
Humedad	4.80 ± 0.21	---*
Grasa cruda	47.38 ± 0.19	---*
Proteína cruda	33.24 ± 1.04	62.75 ± 0.68
Proteína verdadera	---*	56.26 ± 1.62

\* Determinación no realizada.

Valor promedio ± desviación estándar (n=3)

Del análisis bromatológico pueden observarse cantidades considerables de grasa y proteína cruda para la harina integral, 47.38% y 33.24% respectivamente, motivo por el cual se le puede considerar como un alimento energético, digno de un estudio más completo para proponer el aumento en su ingesta. En la misma tabla también se observa que en el caso de la harina desengrasada, se le puede considerar como un concentrado proteico, ya que en el se encuentra un contenido mayor al 50% de proteína, el contenido de proteína verdadera es de 56.26%.

#### 5.4 Determinación de ácido fítico.

En la tabla No. 10 se presentan los valores de ácido fítico en la harina desengrasada cuantificado por dos métodos. Cabe señalar la diferencia importante de los resultados entre ambos métodos.

**Tabla No 10.** Contenido de ácido fítico conforme a los métodos de Haug-Lantzsch y Fruhbeck en la almendra de calabaza *C. argyrosperma*.

MÉTODO	ÁCIDO FÍTICO %
Haug-Lantzsch	8.46 ± 0.25
Fruhbeck	5.69 ± 0.20

Valor promedio ± desviación estándar (n=3)

El valor obtenido de ácido fítico según el método de Fruhbeck se encuentra dentro de lo reportado en la literatura para semillas dicotiledóneas y oleaginosas (0.4 a 6.4%) en comparación con el método de Haug-Lantzsch, así que la almendra de calabaza *C. argyrosperma* además de tener ácido fítico tiene otras fracciones de inositol que también pueden quelar proteínas, minerales y almidones.

Según lo reportado en la literatura, 300 mg de ácido fitico disminuyen la absorción de hierro y en este material se encuentran 5 690 mg de ácido fitico / 100 g muestra, por lo que se le puede considerar como agente desmineralizante; sin embargo no se tiene la relación molar ácido fitico/minerales ya que para un valor de 20 para la relación ácido fitico/zinc se reporta una reducción en la retención de zinc y una reducción del crecimiento.

### 5.5 Determinación de oligosacáridos.

En la siguiente tabla se muestra que los valores de la rafinosa y la estaquiosa se encontraron por debajo del límite de detección, es decir, no hay presencia significativa de este factor antinutricional.

Tabla No 11. Concentración de rafinosa y estaquiosa en la harina desengrasada de la almendra de calabaza (*C. argyrosperma*)

OLIGOSACÁRIDO	RAFINOSA	ESTAQUIOSA
Concentración	< 205.5 µg / mL	< 375.5 µg / mL

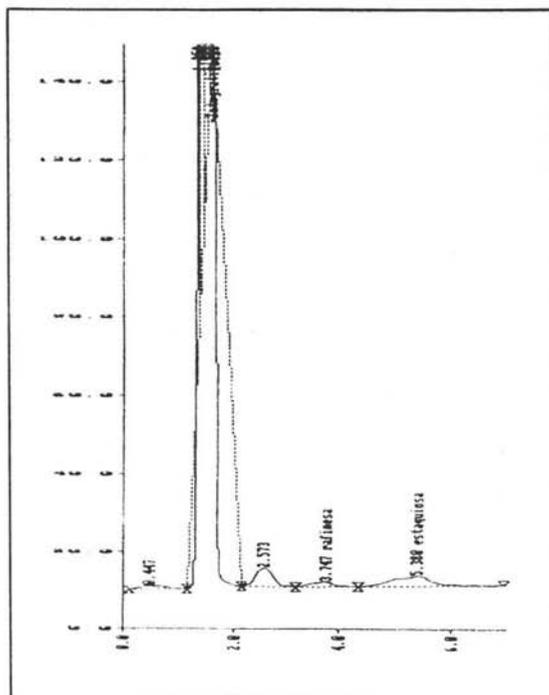


Figura No. 4.

Cromatograma de los oligosacáridos (rafinosa y estaquiosa) en la harina desengrasada de la almendra de calabaza (*C. argyrosperma*) mediante la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

## 5.6 Evaluación química del aceite refinado.

En la siguiente tabla se muestran los valores de los parámetros fisicoquímicos tanto del aceite crudo como del refinado, todos estos parámetros entran en los valores del grupo oleico-linoléico, es decir se consideran como aceites comestibles.

**Tabla No 12.** Parámetros fisicoquímicos del aceite refinado de la almendra de calabaza (*C. argyrosperma*).

PARÁMETRO	ACEITO CRUDO	ACEITE REFINADO	GRUPO OLEICO-LINOLÉICO
Punto de fusión [°C]	0 a 5	0 a 5	-5 a 29
Gravedad específica (25 / 25 °C) [g / mL]	0.8855 ± 0.00	0.9163 ± 0.16	0.909 – 0.920
Índice de refracción (20 °C)	1.466 ± 0.0	1.470 ± 0.00	1.436 –1.474
% de acidez [% ácido oleico]	0.54 ± 0.02	0.11 ± 0.00	< 0.50
Índice de yodo (Hanus) [g I / 100 g aceite]	91.09 ± 1.08	93.44 ± 0.42	77-117
Índice de saponificación [mg KOH / g aceite]	180.22 ± 4.38	182.59 ± 0.05	187 - 200

Valor promedio ± desviación estándar (n=3)

El aceite crudo es un aceite de color verde oscuro, fluido a temperatura ambiente (de acuerdo con su punto de fusión, de 0 a 5 °C), sin presencia de olores extraños y el aceite refinado es un aceite de color amarillo característico de los aceites vegetales comestibles, fluido a temperatura ambiente (de acuerdo con su punto de fusión, de 0 a 5 °C), sin presencia de olores extraños.

El valor de acidez en el aceite crudo es ligeramente superior al límite máximo establecido por un aceite comestible (0.54%), pero después del proceso de refinación disminuye significativamente, a fin de darle mayor estabilidad al aceite de sufrir reacciones de rancidez que disminuirían su vida útil.

### Perfil de ácidos grasos

En la tabla No. 13 se muestran los ácidos grasos encontrados, y sus valores en porcentaje, en el aceite crudo y refinado, en la misma tabla se muestran los valores del grupo oleico-linoléico.

**Tabla No 13.** Relación porcentual de los ácidos grasos del aceite crudo y refinado de la almendra de calabaza (*C. argyrosperma*).

ÁCIDO GRASO	NOMBRE	ACEITE CRUDO (%)	ACEITE REFINADO (%)	GRUPO OLEICO-LINOLÉICO (%)
16:0	Palmitico	17.98	16.31	6-45
18:0	Esteárico	9.76	8.85	2.0-6.0
18:1	Oleico	22.60	31.18	13-71
18:2	Linoléico	49.65	43.66	34-79

Valor promedio  $\pm$  desviación estándar (n=2)

En la figura No. 5 y 6 se muestran los cromatogramas obtenidos en la determinación realizada, tanto al aceite crudo como al refinado, mediante la técnica de cromatografía de gases.

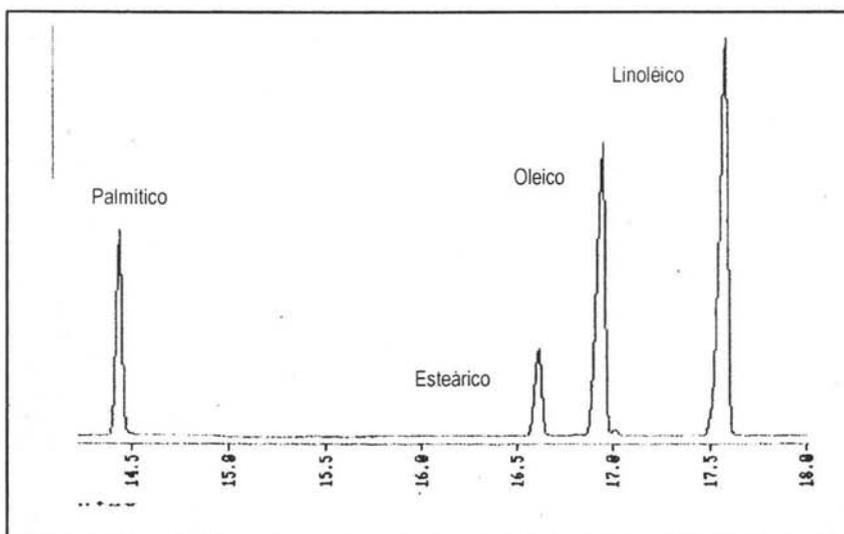


Figura No 6. Cromatograma del perfil de ácidos grasos del aceite crudo de la almendra de calabaza *C. argyrosperma*.

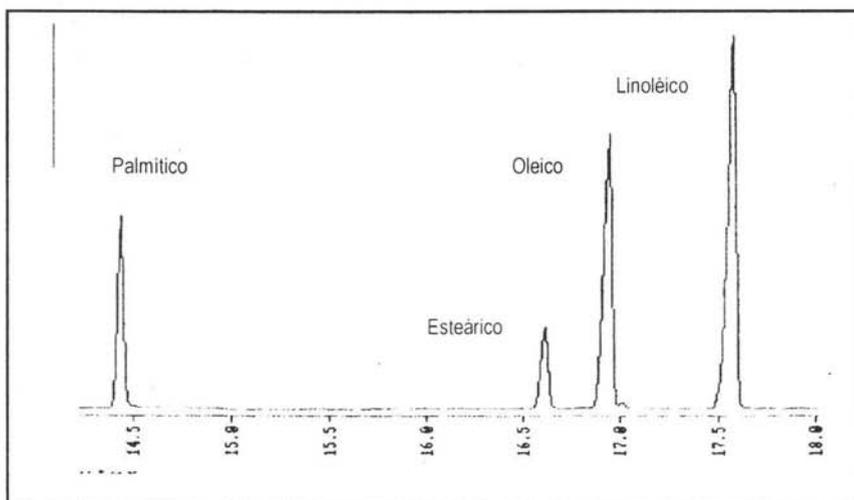


Figura No 7. Cromatograma del perfil de ácidos grasos del aceite refinado de la almendra de calabaza *C. argyrosperma*.

El perfil de ácidos grasos, tanto del aceite crudo como del refinado, no presenta ninguna característica relevante, ya que solo se observan cuatro ácidos grasos principalmente: palmítico, esteárico, oleico y linoléico, característicos de los aceites comestibles. Debido a este perfil de ácidos grasos en el aceite crudo, la refinación del aceite ha servido para mejorar, además del nivel de acidez, las propiedades sensoriales del mismo, ya que se obtuvo un aceite de color amarillo característico al de un aceite vegetal y el olor, como en caso del aceite crudo, es neutro. Como se observa en las figuras anteriores, no se modificó sustancialmente el perfil de ácidos grasos del aceite refinado en relación al aceite crudo, por lo tanto, el segundo aceite tiene pocas impurezas y ácidos grasos libres.

### 5.7 Toxicidad aguda.

Durante el periodo de observación de síntomas clínicos no se presentaron anomalías y en consecuencia tampoco muertes en ninguno de los lotes.

Como las observaciones clínicas pudieran ser subjetivas se utilizó el incremento en peso y no se observó diferencia significativa al realizar un análisis de varianza al comparar contra el control respectivo.

**Tabla No 14.** Incremento en peso de los animales en el estudio de toxicidad aguda para las muestras de la almendra de calabaza (*C argyrosperma*)

DIETA	INCREMENTO EN PESO (g)
Harina integral	3.25 ± 0.45 <sup>a</sup>
Harina desengrasada	2.97 ± 0.39 <sup>a</sup>
Harina de soya (control)	3.46 ± 1.32 <sup>a</sup>
Aceite crudo	11.94 ± 1.22 <sup>a</sup>
Aceite de maíz (control)	13.84 ± 1.27 <sup>a</sup>

Valor promedio ± desviación estándar

Diferentes letras denotan diferencia estadística significativa.

En base a este estudio se considera que el aceite crudo, aceite refinado y la fracción proteica de la almendra de calabaza *C argyrosperma* se pueden considerar prácticamente no tóxicos ya que no manifestaron ningún síntoma de toxicidad hasta una dosis de 15 000 mg/kg de peso corporal por vía oral.

Debido a los resultados obtenidos en este estudio de toxicidad se procedió a realizar el estudio de toxicidad subcrónica.

### 5.8 Toxicidad subcrónica.

- Eficiencia alimentaria.

En la tabla No. 15 se muestran los valores de la eficiencia alimentaria, en donde no se observa diferencia estadística significativa entre las dietas estudiadas y su respectivo control. La eficiencia alimentaria es una relación de la ganancia en peso y el alimento consumido y también es un indicador simple pero sensible de los efectos tóxicos de una sustancia; por lo tanto al no observar diferencias se deduce que no se presentaron efectos tóxicos en las dietas estudiadas.

**Tabla No 15.** Eficiencia alimentaria en la toxicidad subcrónica de la almendra de calabaza (*C argyrosperma*).

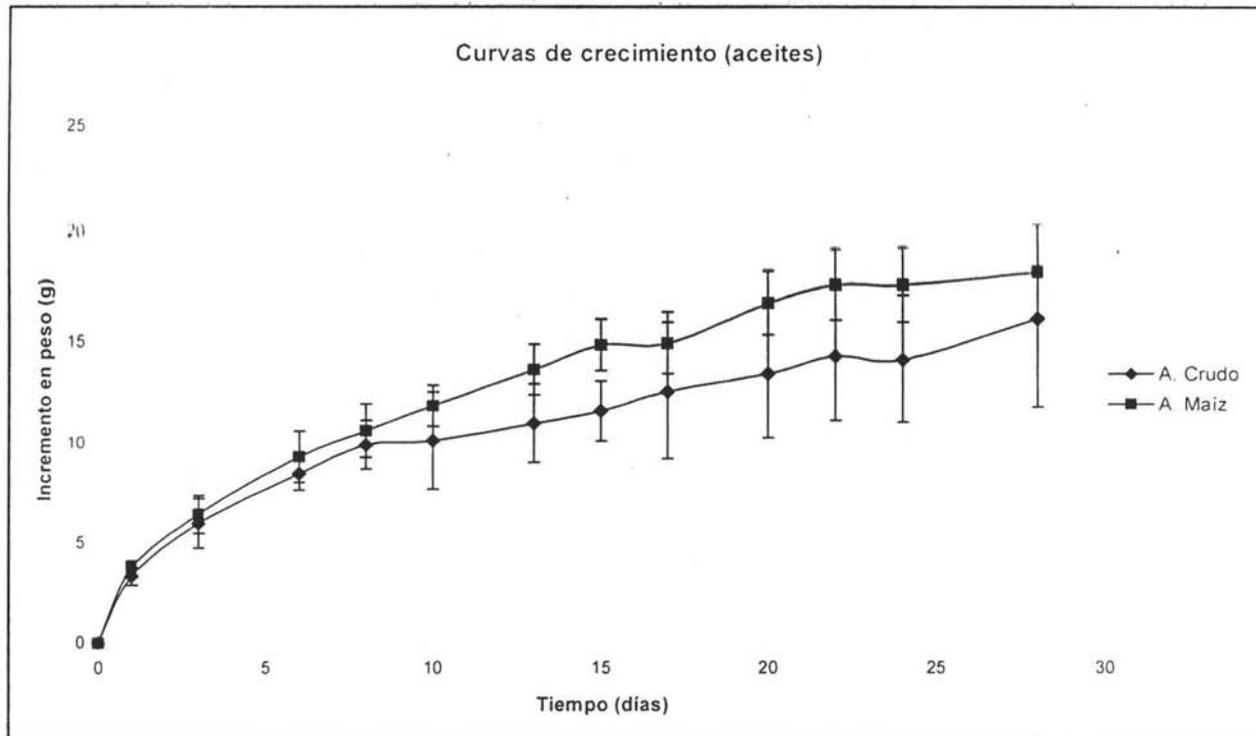
DIETA	EFICIENCIA ALIMENTARIA
Harina integral	12.23 ± 0.62 <sup>a</sup>
Harina desengrasada	10.92 ± 1.79 <sup>a</sup>
Harina de soya (control)	11.31 ± 1.30 <sup>a</sup>
Aceite crudo	11.94 ± 1.22 <sup>a</sup>
Aceite de maíz (control)	13.84 ± 1.27 <sup>a</sup>

Valor promedio ± desviación estándar

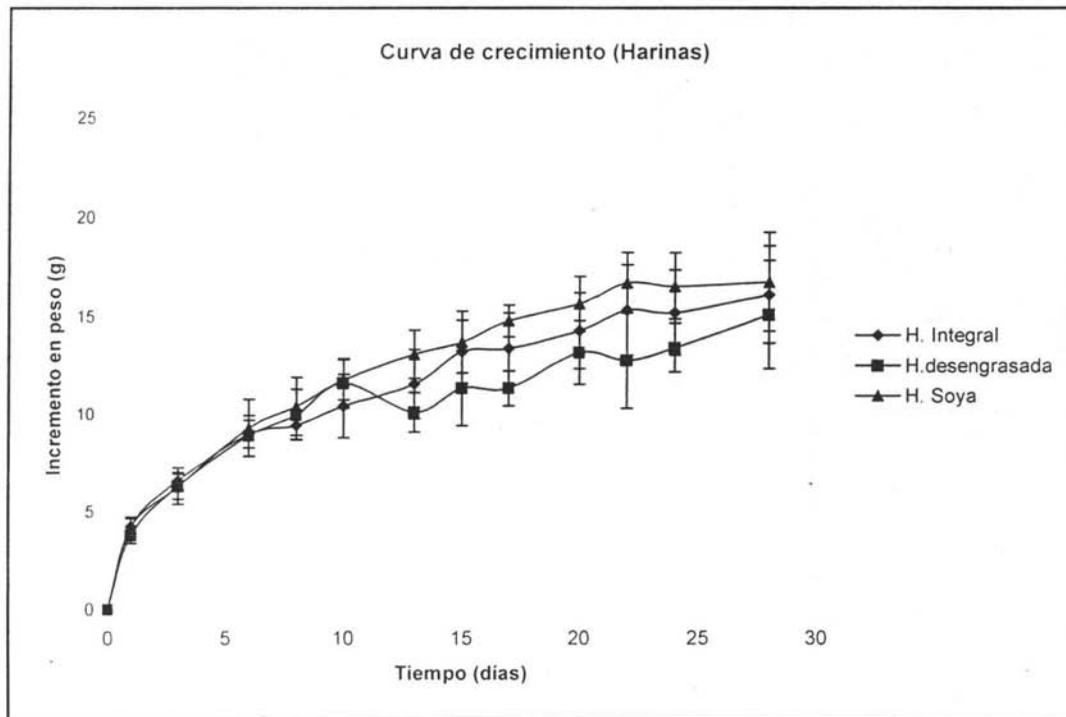
Diferentes letras denotan diferencia estadística significativa.

Como ya se mencionó, durante el transcurso del bioensayo no se presentaron anomalías clínicas en el lote de animales alimentados con el aceite crudo y harina integral, pero si se observó agresividad ocasional cuando se manipulaban los ratones del lote de harina desengrasada, quizá sea debido al alto contenido de ácido fitico. Sin embargo, en ninguno de los lotes se observó muerte alguna.

De acuerdo a las curvas de crecimiento, y en base a la desviación estándar, no se observó diferencia en el crecimiento entre las muestras de harina integral y desengrasada con respecto al control de harina de soya. así como para el aceite crudo en donde tampoco se observó diferencia con respecto al control de aceite de maíz.



**Figura No.8** Curvas de crecimiento en la toxicidad subcrónica del lote alimentado con el aceite crudo De la almendra de calabaza (*C argyrosperma*) comparado con el lote control (aceite de maiz) en el ensayo de toxicidad subcrónica.



**Figura No. 9.** Curvas de crecimiento de los lotes de animales alimentados con harina integral y desengrasada de la almendra de calabaza (*C argyrosperma*) comparados con el lote control (harina de soya), en el ensayo de toxicidad subcrónica.

- Relación porcentual de órganos.

De acuerdo con la siguiente tabla, solo se observa diferencia estadística en el lote de harina desengrasada con respecto al control en la relación porcentual del intestino, sin embargo al no notar diferencia en las curvas de crecimiento de este lote con respecto al control esta diferencia se puede considerar debido a un error de manipulación del tejido en cuestión. En el caso del lote de aceite crudo, en ninguno de los órganos evaluados se observa diferencia estadística significativa con respecto a su control.

**Tabla No 16.** Relación porcentual de órganos evaluados en la toxicidad subcrónica de la almendra de calabaza (*C argyrosperma*).

DIETA	INTESTINO	RIÑÓN	PULMÓN	HÍGADO
Harina integral	3.58 ± 0.18 <sup>b</sup>	1.52 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.81 ± 0.18 <sup>a</sup>	4.60 ± 0.34 <sup>a</sup>
Harina desengrasada	4.06 ± 0.45 <sup>ab</sup>	1.45 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.86 ± 0.11 <sup>a</sup>	4.28 ± 0.41 <sup>a</sup>
Harina de soya (control)	4.49 ± 0.30 <sup>a</sup>	1.40 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.72 ± 0.04 <sup>a</sup>	4.90 ± 0.38 <sup>a</sup>
Aceite crudo	3.41 ± 0.18 <sup>a</sup>	1.44 ± 0.22 <sup>a</sup>	0.72 ± 0.12 <sup>a</sup>	3.97 ± 0.52 <sup>a</sup>
Aceite de maíz	3.46 ± 0.35 <sup>a</sup>	1.50 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.76 ± 0.14 <sup>a</sup>	4.57 ± 0.32 <sup>a</sup>

Valor promedio ± desviación estándar

Diferentes letras denotan diferencia estadística significativa.

- Resultados hematológicos

De acuerdo con los estudios hematológicos mostrados en la tabla No. 17, no se observa diferencia estadística de los lotes alimentados con harina integral y harina desengrasada comparados con el control de harina de soya; y de el aceite crudo con el lote de aceite de maíz. En este estudio, uno de los parámetros más importante es la hemoglobina, ya que en el caso de la harina desengrasada se encontraron niveles importantes de ácido fítico, agente desmineralizante capaz de quelar el hierro, pudiendo provocar una deficiencia de este mineral en el individuo que lo consuma; sin embargo no se observaron diferencias de el lote de la harina desengrasada con respecto el lote control. Sin embargo cabe recordar que intervienen muchos factores como la relación ácido fítico/minerales; la concentración de ácido ascórbico, entre otros.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

**Tabla No 17.** Resultados hematológicos en la toxicidad subcrónica de la almendra de calabaza  
(*C argyrosperma*).

DIETA	GB	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT
Harina integral	2.97 ± 0.41 <sup>a</sup>	11.13 ± 0.51 <sup>a</sup>	17.1 ± 0.78 <sup>a</sup>	103.1 ± 4.6 <sup>a</sup>	92.53 ± 0.53 <sup>a</sup>	15.38 ± 0.17 <sup>a</sup>	16.63 ± 0.21	1100 ± 56.7 <sup>a</sup>
Harina desengrasada	3.14 ± 0.63 <sup>a</sup>	11.00 ± 0.43 <sup>a</sup>	16.84 ± 0.69 <sup>a</sup>	100.9 ± 2.49 <sup>a</sup>	91.55 ± 3.1 <sup>a</sup>	15.83 ± 1.40 <sup>a</sup>	17.32 ± 1.58 <sup>a</sup>	1077 ± 84.42 <sup>a</sup>
Harina de soya	3.75 ± 1.58 <sup>a</sup>	11.05 ± 0.52 <sup>a</sup>	17.37 ± 0.53 <sup>a</sup>	100.97 ± 3.85 <sup>a</sup>	91.3 ± 2.35 <sup>a</sup>	15.7 ± 0.33 <sup>a</sup>	17.20 ± 0.4 <sup>a</sup>	1151 ± 62.54 <sup>a</sup>
Aceite crudo	3.25 ± 1.34 <sup>a</sup>	11.07 ± 0.74 <sup>a</sup>	16.9 ± 1.12 <sup>a</sup>	100.97 ± 6.51 <sup>a</sup>	91.2 ± 3.17 <sup>a</sup>	15.48 ± 0.41 <sup>a</sup>	16.75 ± 0.42 <sup>a</sup>	1095 ± 76.18 <sup>a</sup>
Aceite de maíz	3.77 ± 0.61 <sup>a</sup>	10.66 ± 0.67 <sup>a</sup>	16.72 ± 0.74 <sup>a</sup>	97.73 ± 3.81 <sup>a</sup>	91.8 ± 3.18 <sup>a</sup>	15.7 ± 0.46 <sup>a</sup>	17.12 ± 0.32 <sup>a</sup>	1030 ± 49.23 <sup>a</sup>

Valor promedio ± desviación estándar

Diferentes letras denotan diferencia estadística significativa.

GB. Glóbulos blancos.

RBC. Glóbulos rojos.

HGB. Hemoglobina

HCT. Hematocrito.

MCV. Volumen corpuscular medio.

MCH. Hemoglobina corpuscular media.

MCHC. Hemoglobina corpuscular media celular.

PLT. Plaquetas.

### 5.9 Bioensayo nutritivo.

En la tabla No. 18 se muestran los valores de ganancia en peso, alimento ingerido, proteína ingerida y % de proteína real en la dieta. En esta tabla se observa la relación directa del alimento ingerido y la ganancia en peso y la relación directa de alimento ingerido y proteína ingerida.

**Tabla No 18.** Datos obtenidos en el bioensayo para el calculo de la REP

DIETA	GANANCIA EN PESO [g]	ALIMENTO INGERIDO [g]	% PROTEÍNA <sup>b</sup>	PROTEÍNA INGERIDA [g]
Harina integral	33.30 ± 18.22	189.07 ± 54.82	10.55	19.94 ± 5.78
Harina desengrasada	40.1 ± 7.22	198.12 ± 15.13	9.67	19.16 ± 1.47
Caseína (control)	72.55 ± 23.24	232.97 ± 55.0	9.32	21.71 ± 5.12

Valor promedio ± desviación estándar

b. Concentración real de proteína en la dieta.

En la siguiente tabla se encuentran los valores del alimento ingerido, la cantidad de heces, el % de nitrógeno en heces y % de nitrógeno ingerido del día 15 al 22 del ensayo. En esta tabla se observa la relación directa del alimento ingerido y al cantidad de heces. En esta tabla resalta el bajo valor del % de nitrógeno en heces con respecto a las otras dos dietas estudiadas.

**Tabla No 19.** Datos obtenidos en el bioensayo para el calculo de la digestibilidad.

DIETA	ALIMENTO INGERIDO (g)	TOTAL DE HECES (g)	% NITRÓGENO HECES	% NITRÓGENO DIETA
Harina integral	59.2 ± 35.69	1.55 ± 0.72	4.67 ± 0.22	1.55
Harina desengrasada	145.63 ± 10.17	3.32 ± 0.94	4.59 ± 0.50	1.69
Caseína (control)	204.70 ± 68.12	15.22 ± 4.81	1.67 ± 0.19	1.46

Valor promedio ± desviación estándar

En la tabla No. 20 se encuentran resumidos los valores de la REP y la digestibilidad aparente.

**Tabla No 20.** Relación de eficiencia proteica y digestibilidad de la harina desengrasada y de la harina integral de la semilla de calabaza (*C. argyrosperma*).

DIETA	REP EXPERIMENTAL	REP AJUSTADO	DIGESTIBILIDAD APARENTE
Harina integral	1.67 ± 0.43	1.28 ± 0.43 <sup>A</sup>	92.76 ± 2.91 <sup>A</sup>
Harina desengrasada	2.09 ± 0.24	1.59 ± 0.24 <sup>A</sup>	93.26 ± 1.51 <sup>A</sup>
Caseína (control)	3.28 ± 0.43	2.50 ± 0.43 <sup>B</sup>	91.67 ± 0.93 <sup>A</sup>

Valor promedio ± desviación estándar

Diferentes letras denotan diferencia estadística significativa.

La calidad de la proteína de la almendra de calabaza (*C. argyrosperma*) es inferior con respecto a la caseína, ya que se trata de una proteína de origen vegetal. Zduneyk Z. (1999), reportó valor de REP de 1.01 para *C. pepo*, el cual lo consideró bajo en relación al valor de la soya (1.50). después de suplementar la dieta con lisina el valor de REP se incrementó a 1.43, por otra parte, al suplementar la dieta con soya en proporción 1:1 se observó un incremento a 1.98, cuyo valor contrasta con el de una dieta que incluye únicamente proteína de soya (1.50). Entre los lotes de harina integral y de harina desengrasada no se encontró diferencia significativa en los valores de REP a pesar de que se observaron valores importantes de ácido fitico, sin embargo cabe mencionar el proceso digestivo de las ratas tiene actividad fitasa, motivo por el cual el efecto de este factor antinutricional pudo no presentarse. Es importante comparar el valor de REP de los lotes de harina integral (1.67) y de los lotes de harina desengrasada (2.09), ya que ambos se encuentran por arriba del valor de la soya (1.50), especialmente el lote de harina desengrasada. Lo cual resulta de interés, ya que la soya es utilizada como referencia entre las proteínas de origen vegetal.

Con respecto a la digestibilidad, no se observó diferencia significativa de las muestras de *C. argyrosperma* con respecto a los lotes de caseína, por lo que el nitrógeno de las fuentes de proteína se encuentra disponible de manera adecuada.

Curvas de crecimiento (REP)

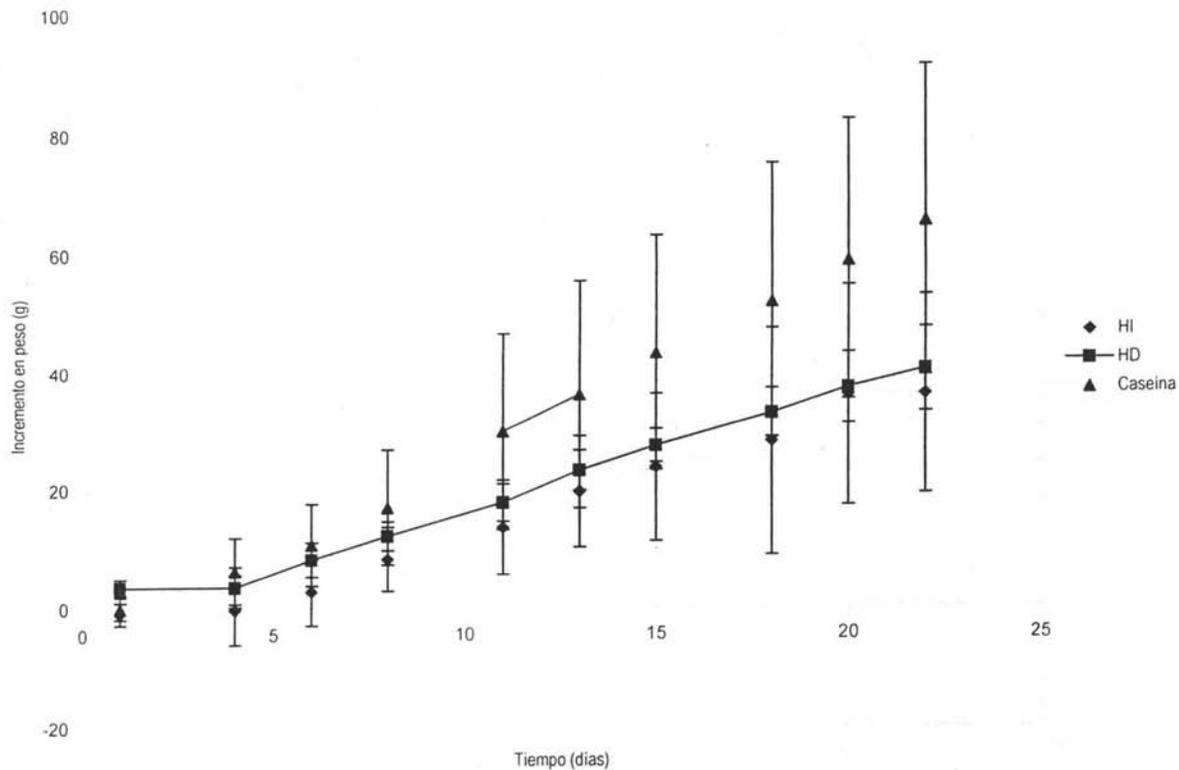


Figura No. 8 . Curvas de crecimiento en la prueba de Relación de Eficiencia Proteica de los lotes alimentados con la almendra de calabaza (*C argyrosperma*), comparados contra el lote control (caseína).

## 6. CONCLUSIONES

- Se corroboró que la almendra de calabaza (*C. argyrosperma*) es un recurso vegetal alto en grasa (>40%) y proteína (>30%)
- La harina desengrasada se puede considerar como un concentrado proteínico (proteína cruda > 60% y proteína verdadera > 50%).
- Como complemento de los factores tóxicos, tampoco se encontraron cantidades significativas de oligosacáridos productores de flatulencia.
- Los parámetros fisicoquímicos y el perfil de ácidos grasos indican que el aceite, tanto crudo como refinado se pueden considerar como un aceite comestible.
- El efecto antinutricional del alto contenido de ácido fítico en la harina desengrasada no se vio reflejado en los bioensayos de toxicidad a pesar de su alto contenido; sin embargo, cabe mencionar que son muchos los factores que influyen para que este factor antinutricional lleve a cabo la quelación de minerales, proteínas y almidones. Además los resultados hematológicos no mostraron deficiencia de hierro en los animales, ni tampoco se observó una disminución del crecimiento durante el transcurso del bioensayo.
- De acuerdo con los ensayos de toxicidad aguda y subcrónica de la la harina integral, la harina desengrasada y el aceite crudo de la almendra de calabaza (*C. argyrosperma*), se consideran prácticamente no tóxicos.
- La R.E.P. tanto de la harina integral y desengrasada (1.28 y 1.59 respectivamente) de la almendra de calabaza (*C. argyrosperma*), no se considera bajo, ya que se trata de una proteína de origen vegetal.
- El valor de la digestibilidad *in vivo* de la proteína de la fracción proteica, tanto de la harina integral como de la desengrasada de la almendra de calabaza (*C. argyrosperma*), se considera alto, > 90% en ambos casos, incluso, no mostró diferencia estadística con respecto al lote control de caseína.

## 7. RECOMENDACIONES.

- Hacer un estudio en la harina desengrasada de ácido fitico con la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución, a fin de saber cuales son las fracciones de inositol presentes, ya que solo el inositol hexa, penta y tetra fosfato tienen actividad antinutricional.
- Buscar un método para desfitizar la harina desengrasada a fin de reducir el efecto antinutricional debido al ácido fitico.
- Buscar otro modelo biológico que no tenga actividad de fitasa, a fin de que esta particularidad de las ratas, no interfiera o sobreestime la eficiencia proteínica de la harina de la semilla de calabaza *C. argyrosperma*.
- Promover un mayor consumo de la almendra de calabaza (*C. argyrosperma*) como tal o incluida en diferentes guisos, en especial en la población con deficiencia calórica-proteínica.

## 8. ANEXOS.

### 8.1 ANEXO 1. Glosario empleado en las observaciones de los signos clínicos de los bioensayos.

- **Agresividad.** Individuo cuyo patrón conductual se caracteriza por irritabilidad, accesos de ira y actitudes o actos destructivos.
- **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 usadas en actividades como caminar o alcanzar un objeto debido a alguna interferencia como las vías del sistema nervioso central o periférico implicados en el equilibrio de los movimientos musculares.
- **Cifosis.** Curvatura angular de la columna vertebral; la convexidad de la curva es posterior, suele estar en la región torácica y abarca algunas vértebras.
- **Cianosis.** Coloración azul purpúrea de las mucosas y de la piel debido a la falta de oxigenación.
- **Disnea.** Frecuencia acelerada de la respiración.
- **Erección caudal.** Estado turgente de la cola.
- **Excitación.** 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

8.2 Anexo 2. Cuadro empleado para el seguimiento del estudio de toxicidad aguda.

Fecha: \_\_\_\_\_

Especie:		Cepa:			Clave:			Peso inicial:		Peso final:	
Vehículo:					Concentración:						
Vía:					Dosis:			Hora de inicio:			
Signos clínicos											
Tiempo (h)	Lordosis	Cifosis	Ataxia	Piloerección	Erección caudal	Agresividad	Aletargamiento	Excitación	Disnea	Cianosis	Hipotermia
0											
1											
2											
3											
4											
5											
6											
7											
8											
9											
10											
11											
12											
24											
36											
48											
Observaciones											

8.3 Anexo 3. Cuadro empleado para el seguimiento del estudio de toxicidad subcrónica  
y la Relación de Eficiencia Proteica.

Dieta:														
Especie	Clave			Sexo				Peso inicial				Fecha		
Tiempo (días)	0	1	3	6	8	10	13	15	17	20	22	24	28	Final:
Peso animal (P día)														Pf =
Incremento acumulado (P día-P inicial)														Pf-Pi=
Alimento inicial ( I )														
Alimento final ( F )														
Alimento ingerido (AI = I-F)														Σ AI=
Alimento acumulado (Σ AI) día														
Observaciones														

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Al-Khalifa, A. S. **Physicochemical characteristics, fatty acid composition, and lipoxygenase activity of crude pumpkin and melon seed oil.** *Journal. Agriculture Food Chemical.* 44, 964-966, 1996.
2. Alonso, C. **Enciclopedia Barsa.** Publishers Inc., México, D.F., pp. 4,523,525. 1986.
3. Bermejo, J. E., León J. **Cultivos marginados (Otra perspectiva de 1942).** FAO, Colección de producción y protección vegetal., ( 26),. Roma. pp. 61,69,70. 1992.
4. Bion, F., Pessoa, D., Lapa, M., Campos, F., Antunes, N., Lopez, S. **The use of a multimix as a dietary suplement: study in rats.** *Archivo Latinoamericano de Nutrición.* 47(3):242-7. 1997
5. Bourges H., **Desnutrición infantil del 46 por ciento a nivel nacional.** *Boletín UNAM-2000 /460:* México, Cd. Universitaria. 2000.
6. Brune, M., Rossander-Hultén, L., Hallberg, L., Gleeurp, A., Sandberg, A. **Iron absorption from bread in humans: inhibiting effects of cereal fiber, phytate and inositol phosphates with different numbers of phosphate groups.** *American Institute of Nutrition. Human and clinical nutrition.* 122, 442-449. 1992.
7. Casanueva, E., Kaufer-Horwitz, M., Pérez-Lizaur, A., Arrogo, P. **Nutriología médica.** Editorial Médica Panamericana. Segunda edición. México, D.F., pp. 23-32, 37-38. 2001.
8. Cervera, P., Clapes, J., Rigolfas, R. **Alimentación y dietoterapia. Nutrición aplicada a la salud y la enfermedad.** Editorial Interamericana-Mc Graw-Hill, Nueva York, pp. 24-25, 28-34, 37, 357-359. 1993.
9. Curtis, H. W., Joseph, S. C., James, B. W., **Antinutritional factors in Cucurbita seed meals.** *Journal Agriculture Food Chemical.* 34,434-436. 1986.
10. Derache, R. **Toxicología y seguridad de los alimentos.** Ediciones Omega, Barcelona, pp. 57-63, 70-71. 1990.
11. Fennema, O. **Química de los alimentos.** Editorial Acribia. España. pp. 98-99, 358- 370. 1993.
12. Heaney, R., Weaver, C., Fitzsimmons, M. **Soybean phytate content: effect on calcium absorption.** *American Journal Clinical Nutricion.* 53:745-747. 1991.
13. Herrera, A. **Biblioteca de autores españoles,** Atlas, 2ª Edición, Madrid, pp. 229-230.1970.
14. Hurrel, R., Juillerant, M., Reddy, M., Lynch, S., Dassenko, S., Cook, J. **Soy protein, phytate, and iron absorption in humans.** *American Journal Clinical Nutrition.* 56, 573-578. 1992.
15. Kirk, R., Sawyer, R., Egan, H. **Composición y análisis de alimentos.** Compañía Editorial Continental, Segunda edición. México, D.F., pp. 10-11,19,25-24,680,684,695, 1999.
16. Lawson, H. **Aceites y grasas alimentarios. Tecnología, utilización y nutrición,** Editorial Acribia, Zaragoza, pp. 49-54, 123. 1999.

17. Lönnerdal, B., Sandberg, A., Sandstrom, B., Kunz, C. Inhibitory effects of phytic acid and other inositol phosphates on zinc and calcium absorption in suckling rats. *Journal Nutrition*. 119, 211-214. 1989.
18. Loomis, T. *Fundamentos de toxicología*, Editorial Acribia, 1ª Edición, Zaragoza, pp. 229-230, 1986.
19. Lu, F. *Toxicología básica. Riesgo por exposición de sustancias tóxicas*. Editorial Harla. México, D.F., pp. 68-69, 99-101, 105-111. 1992.
20. \_\_\_\_\_ Madrid Vicente Ediciones, *Producción, análisis y control de calidad de los aceites y grasas comestibles*. Madrid. pp. 19-20, 284-292. 1988.
21. Martínez, F. R. *Evaluación del potencial aceitero de la semilla de calabaza (C. pepo L.)*. Tesis de Licenciatura, Facultad de ciencias U.N.A.M., México, D.F., pp. 1,4,1618,53. 1996.
22. Matons, A. *Diccionario de agricultura, zootecnia y veterinaria*, Editorial Hispanoamericana, Segunda edición, Barcelona. pp. 842-483. 1947.
23. Messiaen, C. M. *Las hortalizas*. Editorial Blume, 1ª Edición, México, D.F., pp. 206-214. 1979.
24. Murkovic, M., Hillebrand, A., Winkler, J., Leitner, E., Pfannhauser, W. *Variability of fatty acid content in pumpkin seeds (Cucurbita pepo L.)*. *Z Lebensm Unters Forsch*, (203(3):216-9. 1996.
25. Naczki, M., Amarowicz, R., Shahidi, F.  $\alpha$ -Galactosides of sucrose in foods: Composition, flatulence-causing effects, and removal. In *Antinutrient and phytochemical in food*. Editor Shahidi, S, Washigton D.C., pp 294-300, 305-306. 1995.
26. Paredes, C. P. *Evaluación toxicológica aguda y subaguda de la fracción proteica de la semilla de calabaza (Cucurbita argyrosperma)*. Tesis Licenciatura, Facultad de Química UNAM., México, D.F., pp. 7, 8. 2001.
27. Pascoe, H. *Evaluación bromatológica y determinación de tóxicos naturales en la almendra de calabaza (Cucurbita argyrosperma) consumida en Cuetzalan Puebla*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química UNAM. México, D.F., 2003.
28. Queiroz-Neto, A., Mataqueiro, M. *Toxicologic evaluation of acute and subacute oral administration of Cucurbita maxima seed extracts to rats and swine*. Elsevier Science Ireland Ltd. v. 43(1), 45-51. 1994.
29. Reddy, M., Hurrell, R., Juillerat, M., Cook, J. *The influence of different protein sources on phytate inhibition of nonheme-iron absorption in humans*. *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol 63, 203-207. 1996
30. Reddy, M., Sathe, S., Salunnnkhe, D. *Phytates in legumes and cereals*. Vol. 28. Pág. 7, 12, 23-30. 1982.
31. Rickard, S., Thompson L. *Interactions and biological effects of phytic acid*. In *Antinutrient and phytochemical in food*. Editor Shahidi, S, Washigton D.C., pp 294-300, 305-306. 1995.

32. Shibamoto, T., Bjeldemes, L. **Introducción a la toxicología de los alimentos**. Editorial Acribia, Zaragoza, pp. 1-2, 22-26, 28-31. 1996.
33. Salgado, J., Takashima, M. **Chemical an biological characterization of meal and protein isolates from pumpkin seed (*Cucurbita moschata*)**. *Archivo Latinoamericano de Nutrición*, 42(4):443-50. 1992.
34. Siegenberg, D., Baynes, R., Bothwell, T., Macfarlane, B., Lamparelli, R., MacPhail, P., Tal, A., Mayet, F. **Ascorbic acid prevents the dose-depended inhibitory effects of polyphenols and phytates on nonheme-iron absorption**. *American Journal Clinical Nutrition*. 53, 537-541. 1991,
35. Sotelo, A., Rodríguez, A. **Validation of the chromatography meted for rarrinose and stachyosse determination in legumes an cereals**. Departamento de farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
36. Takaguki, S., Leonard, F. **Introducción a la toxicología de los alimentos**. Editorial Acribia. España. pp. 1, 22-26, 28. 1996.
37. Téllez, G. R. **Evaluación de la toxicidad aguda y subaguda de la fracción lipídica de la almendra de calabaza (*Cucurbita pepo*)**. Tesis Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, pp. 4, 5, 100. México, D.F., 1999.
38. Yoon, H. S., Oh, M. J., Choi, Ch. **Studies on the development of food resources from waste seeds**. Vol. 26, No 3, pp. 163-168. 1983.
39. Zdunezyk, Z., Minakowski, D., Frejnagel, S., Flis, M. **Comparative study of the chemical composition and nutritional value of pumpkin seed cake, soybean meal and casein**. *Nahrung*, 43 (6),392-5. 1999
40. Ziller, S. et-al. **Grasas y aceites alimentarios**, Editorial Acribia, Zaragoza, pp. 35-39. 1996.
41. Zhou, J., Fordyce, E., Raboy, V., Dickinson, D., Wong, M., Burns, R. **Reduction of phytic acid in soybean products improves zinc bioavailability in rats**. *Journal Nutrition*. 122: 2466-2473. 1992.