

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE TOXICIDAD SUBCRÓNICA DE LOS
DIFERENTES PREPARADOS DEL ACEITE DE
ALMENDRA DE CAPULÍN (*Prunus serotina*)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

JENNIFER ESQUIVEL LÓPEZ



MÉXICO, D.F.

2010



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: **Profesor:** BERNARDO LUCAS FLORENTINO

VOCAL: **Profesor:** LUCIA CORNEJO BARRERA

SECRETARIO: **Profesor:** INOCENCIA MARÍA DE LOURDES FLORES TÉLLEZ

1er. SUPLENTE: **Profesor:** LETICIA GIL VIEYRA

2° SUPLENTE: **Profesor:** ARGELIA SÁNCHEZ CHINCHILLAS

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 111 DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y CUARTO 520 DE LA UNIDAD
EXPERIMENTAL DE ANIMALES (UNEXA), DEL CONJUNTO E DE LA FACULTAD DE QUÍMICA,
UNAM.

ASESOR DEL TEMA:



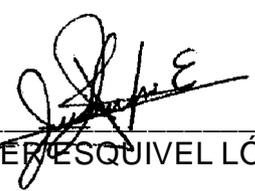
M en C. BERNARDO LUCAS FLORENTINO

SUPERVISOR TÉCNICO:



Q.F.B LETICIA GIL VIEYRA

SUSTENTANTE:



JENNIFER ESQUIVEL LÓPEZ

Agradecimientos

“De la misma forma, un discípulo nunca puede imitar los pasos de su guía, porque cada uno tiene su manera de ver su vida, de convivir con las dificultades y con las conquistas. Enseñar es mostrar que es posible. Aprender es volverse posible a sí mismo”

Paulo Coelho

A Dios, porque Él ha sido mi amigo y guía a lo largo de mi vida, porque sé que en diversas formas me ha mostrado mi camino ya sea colocado a personas o situaciones que me han ayudado a decidir que es lo mejor para mí. Sé que sin Él muchas cosas no las hubiera logrado, ni estaría logrando.

A mis padres Clementina Rosalía López Zamora y Leonardo Esquivel Nieves por haberme permitido existir, por el apoyo que siempre me han brindado, por su compañía y por darme el mejor ejemplo: siempre seguir adelante a pesar de las dificultades que puedan presentarse, porque sé que sin ellos muchas cosas no las hubiera logrado, por lo que mi esfuerzo y dedicación se los debo a ellos.

A mi hermana Monserrat Esquivel López por ser un ejemplo a seguir de dedicación y entrega, además de ser una amiga a la cual recurrir, sé que no siempre, pero sé que en los momentos en los que más necesito de alguien ahí ha estado.

Al profesor Bernardo Lucas Florentino por darme la oportunidad de trabajar con él, por todas aquellas enseñanzas que me dejó en el aula y durante mi estancia en el laboratorio y por su apoyo durante el inicio y culminación de este proyecto.

A las profesoras Leticia Gil Vyera, Lucía Cornejo y María de Lourdes Téllez por su apoyo, sus consejos y por la participación en este proyecto.

A la Doctora Adriana Ruiz por haberme permitido compartir un poco de su tiempo, por el apoyo que me brindó y por haberme permitido dejarme ver más allá de un laboratorio de Hematología, porque a pesar de que mi estadía fue corta, me dejó una gran enseñanza y experiencia.

A la señora Vicky por todo su apoyo, comprensión y sobre todo por su compañía y el cariño que me brindó durante mi estancia en el laboratorio y mientras me encontraba realizando este proyecto, porque sé que sin ella mi estadía en el laboratorio no hubiera sido lo mismo.

A mis amigos Clemente Villagómez Ríos, Myrna Aguilar Estévez, Carlos Poucel Ferraez, Haide Lozano Becerril, Verónica Lemus Flores, María José Gutiérrez Martínez, Berenice Silva Navarro, Antonio Montiel Ramírez, Gerardo Salinas Sánchez y a todos aquellos que quizá no mencioné, pero no por ello dejan de ser importantes, porque cada uno de ustedes ocupa un lugar en mi corazón y sé que sin ustedes mi vida no sería la misma, ya que a pesar de las distancias o bien adversidades he sentido su apoyo, cariño y comprensión, además de cada uno de ustedes aprendo algo nuevo.

ÍNDICE

	Página	
1	Introducción	1
2	Objetivos	
2.1	Objetivo General	3
2.2	Objetivos Particulares	3
3	Antecedentes	
3.1.	Capulín (<u>Prunus serotina</u>)	4
3.1.1.	Generalidades	4
3.1.2	Características Botánicas	6
3.2.	Composición Química de la Almendra de Almendra de Capulín.	7
3.3	Importancia de las Grasas y Aceite en la Nutrición	9
3.4	Grasas y Aceites	10
3.4.1	Triglicéridos	11
3.4.2	Ácidos Grasos	12
3.4.2.1	Ácidos Grasos Saturados	12
3.4.2.2.	Ácidos Grasos Insaturados	12
3.4.2.3	Isomería de los Ácidos Grasos Insaturados	13
3.4.3	Monoglicéridos y Diglicéridos	13
3.4.4	Otros compuestos lipofílicos	14
3.4.4.1	Ácidos Grasos Libres	14
3.4.4.2.	Fosfátidos	14
3.4.4.3	Esteroles	14
3.4.4.4.	Tocoferoles	14
3.4.4.5	Carotenoides y Clorofila	14
3.4.5	Proceso de Obtención de un Aceite Comestible	15
3.4.5.1	Desgomado	16
3.4.5.2.	Neutralizado	17
3.4.5.3.	Decoloración o Blanqueo	18
3.4.5.4	Hidrogenación	18
3.4.5.4.1	Ácidos Grasos Trans	23
3.5	Factores Tóxicos y Antinutricionales Intrínsecos	24
3.5.1	Factores Antinutricionales y Tóxicos de la Fracción Proteína de la Almendra de Capulín (<u>Prunus serotina</u>)	25
3.5.2	Factores Antinutricionales y Tóxicos de la Fracción Lipídica de la Almendra de Capulín (<u>Prunus serotina</u>)	27
3.6	Estudio Toxicológico In Vivo	33
3.6.1	Variables Generales	34
3.6.1.1	Elección del Modelo Biológico	35
3.6.1.2	Elección de la Vía de Administración	35
3.6.1.3	Duración del Tratamiento	36
3.7	Toxicidad Aguda	37

3.8	Toxicidad Subaguda (Subcrónica)	39
3.9	Análisis de Laboratorio Durante los Estudios Toxicológicos	41
3.9.1	Citometría Hemática. Índices y Parámetros	41
3.9.1.1	Serie Roja	42
3.9.1.2	Serie Blanca	44
3.9.1.3	Serie Trombocítica	45
3.9.2	Energía Digerible	46
4	Metodología	
4.1	Diagrama General de Investigación	48
4.2	Descripción de la Metodología	49
4.2.1	Origen de la Semilla	49
4.2.2	Descascarado y Molienda	49
4.2.3	Método de Extracción de la Grasa (Desengrasado de la Almendra)	50
4.2.4	Refinación del Aceite	51
4.2.4.1	Filtración	52
4.2.4.2	Desgomado	53
4.2.4.3	Neutralizado	55
4.2.4.4	Blanqueo	56
4.2.5	Hidrogenación	58
4.2.6	Evaluación Biológica	62
4.2.6.1	Prueba de Toxicidad Subcrónica o Subaguda	62
4.2.6.2	Citometría Hemática	69
4.2.6.3	Evaluación de los Órganos	70
4.2.6.4	Medición de la Energía Digerible del Aceite de la Almendra de Capulín en sus diferentes preparados (crudo, refinado e hidrogenado)	71
5	Resultados	
5.1	Rendimientos	77
5.2	Toxicidad Subcrónica	79
5.2.1	Resultados de los Análisis de Laboratorio durante los Estudios Toxicológicos	86
5.2.1.1	Citometría Hemática	86
5.2.1.2	Relación Porcentual de Órganos	91
5.2.1.3	Energía Digerible	96
6	Conclusiones	102
7	Apéndice	105
8	Bibliografía	107



1. INTRODUCCIÓN

Dentro de la gran diversidad de la flora mexicana, existen especies cuyo potencial alimenticio es alto; sin embargo, estos recursos están subutilizados, en algunas ocasiones justificado por la presencia de sustancias dañinas que se presentan de forma natural, como es el caso del Capulín (***Prunus serotina***), el cual es una especie de gran adaptabilidad, tanto al suelo como a las condiciones climáticas adversas (heladas y sequías) y cuya distribución en el país es amplia.

De estudios previos se conoce que la almendra de capulín (***Prunus serotina***) es una fuente importante de proteína (>30%) y de grasa (>40%); no obstante de estos mismos estudios se destacó la presencia de algunas sustancias tóxicas como son los glucósidos cianogénicos (que liberan ácido cianhídrico) encontrándose en concentraciones elevadas (>200 mg HCN/100g) en la fracción polar de dicha almendra (fracción proteínica), así como también en la fracción lipídica (no polar) en donde se encontró la presencia de ácido erúcido en concentraciones mayores al 5% el cual puede causar daño a nivel del hígado, corazón y riñones. De esta última fracción se ha reportado que la grasa cruda de la almendra de capulín y el aceite refinado de la misma no son aptas para consumo humano debido a la alta cantidad de ácido erúcido el cual sobrepasa el límite establecido (>5%). Sin embargo, se sabe que al ser hidrogenado un aceite vegetal, se ven disminuidos los ácidos grasos insaturados como es el caso de dicho ácido.

Por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar toxicológicamente la fracción grasa sometida a diferentes procesos físicos como son el refinamiento y la hidrogenación para conocer cual es el efecto o bien la inocuidad que tiene el ácido erúcido presente en los diferentes preparados del aceite de la almendra de capulín (***Prunus serotina***).



Esta caracterización toxicológica de la fracción grasa o lipídica de la almendra de capulín (***Prunus serotina***) se llevó a cabo por medio de un estudio de toxicidad subcrónica utilizando como modelo biológico ratones de laboratorio, a los cuales se les proporcionó pellets que contenían aceite de la almendra de capulín (***Prunus serotina***) en sus diferentes preparados; dándoles el material a evaluar en administraciones repetidas durante un periodo de 28 días, llevando a cabo un control en el incremento de peso de los ratones y del alimento consumido.

Además, al final del experimento se tomaron muestras de sangre del modelo biológico (ratones) para realizarles la citometría hemática, así como también se realizó una necropsia para observar si se presentaba algún daño morfológico por medio de la obtención de la relación porcentual de los siguientes órganos: corazón, hígado riñones y pulmones.

De esta manera contar con un valor de referencia que nos permita conocer más sobre la toxicidad de este tipo de almendra (principalmente en la fracción no polar) y tener más elementos para predecir su posible riesgo toxicológico.



2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar la evaluación toxicológica subcrónica de los diferentes preparados del aceite de la almendra de Capulín (***Prunus serotina***) utilizando como medio biológico ratones de la cepa CD1.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Obtener suficiente fracción lipídica (aceite crudo) de la almendra de capulín para llevar a cabo su refinamiento y efectuar los bioensayos de toxicidad.
- Realizar la prueba de toxicidad subcrónica por vía oral en ratones, del aceite crudo y de los diferentes preparados.
- Evaluar el efecto del nivel del ácido erúxico presente en los diferentes preparados, sobre el hígado, riñones, pulmones y corazón, al obtener su relación porcentual.
- Realizar la prueba de citometría hemática al plasma sanguíneo de los ratones para observar si el ácido erúxico tiene algún efecto tóxico a nivel de la sangre.
- Complementar los resultados de la evaluación toxicológica al obtener el parámetro nutritivo de balance de energético o energía digerible, de los diferentes preparados del aceite de la almendra de Capulín (***Prunus serotina***)



3. ANTECEDENTES

El hambre y la desnutrición se siguen acrecentando en ciertas regiones de la población mundial y el país no queda excluido de esta situación. En México el hambre y la desnutrición son un problema ancestral y no obstante el aumento de la disponibilidad de los alimentos representa aún un alto porcentaje de desnutrición proteico-calórico, particularmente en las zonas rurales marginales.

Paradójicamente a lo anterior, el mal planeado desarrollo agropecuario en muchas comunidades rurales, pone en peligro la conservación de plantas silvestres o de cultivo incipiente, no importando que algunas de ellas tengan un alto potencial alimenticio y que sean apreciadas y utilizadas de manera sustentable en dichas comunidades.

3.1 CAPULÍN (Prunus serotina)

3.1.1 GENERALIDADES

La búsqueda de material biológico con potencial proteínico calórico, no es algo nuevo, ni difícil de implementar como un recurso agropecuario, ya que el territorio mexicano cuenta con una gran biodiversidad, por su amplio mosaico de ecosistemas (Villela y Gerez, 1994; Granados y López, 1996).

Dentro de la gran diversidad de la flora mexicana, existen especies cuyo potencial productivo es alto y pueden llegar a ser fuentes de nutrimentos para la alimentación humana o animal; sin embargo estos recursos están infrautilizados. Tal es el caso del capulín (*Prunus serotina*) perteneciente a la familia **Rosaceae** subfamilia **Prunoidea**. El género **Prunus** es un amplio grupo de árboles y arbustos, que son apreciados por sus frutos deliciosos, los cuales se dan principalmente en primavera. Algunas variedades son decorativas, otras desarrollan frutos silvestres y algunas otras tienen una alta producción. Se incluyen en este género árboles y arbustos de almendro, albaricoque, cerezo y durazno.



El capulín, conocido así por su nombre común, también es conocido como Capulín blanco en la zona de la República Mexicana y en la meseta central, pero también se conoce por diversos nombres dentro del mismo país o de acuerdo a la etnia indígena, como es el caso de Michoacán donde es conocido como Cerezo: Shencua, Shegua, Xengua (l. Tarasca Michoacán); en otros estados se llama Cusabi (l. Tarahumara, Chih.); Detze, Ghohto (l. Otomi) (McVaugh, 1951), de tal manera que esta es una especie de amplio rango de adaptabilidad, tanto al suelo como a las condiciones climáticas adversas (heladas y secas). Su distribución es amplia y se extiende desde Canadá hasta la región andina de Ecuador y Bolivia. Referente a su distribución en el país, es tan amplia que se localiza desde las regiones montañosas de zonas templadas hasta las regiones bajas de clima tropical (2200-3100m); así se pueden localizar árboles en Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Durango, Distrito Federal, Estado de México, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas, Tlaxcala y Veracruz. (Aguilar y Zolla, 1982; Martínez, 1987; Prior, 2004).

En el país, el árbol del capulín ha sido de gran importancia desde los tiempos precolombinos, debido a que su fruta se consume desde esa época, porque su sabor y apariencia hacen recordar a la cereza, incluso en España se le conoce como **Picota** y en E.U.A se le conoce como **American cherry** o **Black Cherry**

A pesar de la amplia difusión en Sudamérica, es reconocido por algunos investigadores que el origen de este árbol es mexicano, ya que el nombre de "Capulín" proviene de la palabra azteca "**Capuli**".



3.1.2 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS

El capulín es el primo de la cereza negra grande. Este fruto proviene de un árbol o arbusto monopódico perennifolio o caducifolio de 5 a 15 m de altura con un diámetro a la altura del pecho de hasta 1.2 m. La copa es ancha de forma ovoide; sus hojas son estipuladas, simples, alternas, cortamente pecioladas, ovadas a lanceoladas de 5 a 16 cm de largo por 2 a 5 cm de ancho, margen aserrado, haz oscuro y brillante.

El tronco es largo y recto en el bosque, pero en los claro es corto y ancho. De ramas alternas, erguido-extendidas, lampiñas, escabrosas por la presencia de muchas lenticelas esparcidas. La corteza es café o grisácea casi lisa y glabra, exceptuando las ramas tiernas que a veces son pubescentes. Tiene numerosas flores pequeñas y blancas, agrupadas en racimos axilares colgantes y largos, de 10 a 15 cm con pedicelos de 5 a 10 mm de largo. La raíz es un sistema radical superficial, extendido y medianamente profundo, de crecimiento rápido. La mayoría de las raíces ocupan los primero 60 cm del suelo.

El capulín (fruto) es una drupa globosa, de color negro rojizo o púrpura en la madurez, de 12 a 20 mm de diámetro, de sabor agridulce y algo astringente. Su pulpa es verde, carnosas y jugosa. La piel es delgada, pero lo suficientemente fuerte para evitar que el fruto se rompa; presenta una sola semilla la cual es esférica, rodeada por un endocarpio o hueso leñoso, que contiene una almendra de sabor amargo.

En algunos lugares el capulín se consume crudo, en conserva como mermelada, en bebidas frescas, licores y se puede usar en la elaboración de tamales. En algunos otros lugares también se consume la almendra asada, después de quitar la cáscara que la protege (semilla).

Los usos que se le da al árbol son: como madera para fabricar muebles, guitarras, ataúdes y otros productos. Otros usos son como combustible, con fin decorativo u ornamento, así como insecticida debido a que las hojas tiernas y las semillas se consideran tóxicas. Las hojas, ramitas, corteza y semillas son venenosas para el ganado, debido a la presencia de glucósidos cianogénicos (sustancias que liberan HCN).



La semilla contiene del 30 al 40% de aceite semisecante apropiado para la fabricación de jabones y pinturas. También se ha encontrado un uso medicinal, la corteza y las hojas (en infusión) se usan como expectorante, estimulante, antiespasmódico, tónico, sedante y para combatir las diarreas y disentería. El polvo de la corteza aplicado en los ojos desvanece las nubes, aclara la vista y cura las inflamaciones.

El fruto en jarabe se usa contra la tos. Los extractos, infusiones y jarabes preparados con las ramas, corteza y raíces se usan como tónico y sedante en el tratamiento de la tisis pulmonar (tuberculosis pulmonar progresiva que se disemina por vía broncogena) y en la debilidad nerviosa.



Figura 1: Capulín (*Prunus serotina*)

3.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA ALMENDRA DE CAPULÍN

Se menciona en trabajos recientes que la almendra de capulín (*Prunus serotina*) se puede considerar una fuente rica en proteína (su porcentaje es mayor al 30% (Ver Análisis Proximal (Anexo 1)), pero deficiente en aminoácidos azufrados (Alvarado, 1999, Castillo, 1997). Mientras que su fracción lipídica (<40% Ver Análisis Proximal (Anexo 1)) tiene un contenido elevado de vitamina E. Otra característica importante de la almendra de Capulín es el contenido de algunos micronutrientes como la vitamina C y una buena fuente de hierro y zinc (Bostid, 1989; Castillo, 1997; Ruiz, 2000).



La almendra de capulín es buena fuente de β -glucosidasa, enzima de amplia importancia en ciertas aplicaciones enzimáticas (Ayllón, 1995; Li et al 1992; Lara, 2003).

Es común en las semillas del género ***Prunus*** la presencia de glucósidos cianogénicos (aprox. 200mg HCN/100g), a los cuales se ha responsabilizado de envenenamiento en el hombre y animales tanto domésticos como salvajes (Tunçel et al, 1998; Swain and Poulton, 1994; Kamel y Kakuda 1992.). Así como también la presencia de factores antinutricionales y tóxicos como fitatos, inhibidores de tripsina y taninos en el preparado proteínico de la almendra.

En la grasa de la almendra de capulín (***Prunus serotina***), se pudo detectar la presencia de un ácido graso, que se pensó en un principio correspondía al ácido eleosteárico, ya que éste se presenta en la grasa de la almendra de la cereza, pariente muy cercano al capulín. (Castillo 1997; Lara 2003), sin embargo en estudios más recientes sobre la fracción grasa de la almendra de capulín, se observó la presencia de varios ácidos grasos no comunes y del **ácido erúcico** (Tabla 1), presentándose este último en una concentración arriba del 5%, lo cual hace que se considere el consumo de dicha grasa vegetal como de alto riesgo, debido a que se sabe puede causar daño en el miocardio por la deposición de grasa en el músculo cardíaco o bien porque puede provocar cirrosis en el hígado . (Barbosa, 2003).



Tabla 1: Perfil de ácidos grasos en el aceite crudo de la almendra de capulín (Prunus serotina) obtenido de un estudio previo, por cromatografía de gases. (Prior, 2004)

Ácidos Grasos	# Carbonos e Insaturaciones	Aceite Crudo(% de ácidos grasos)
Ác. Palmítico	C16:0	4.003
Ác. Palmitoleico	C16:1	---- ^a
Ác. Esteárico	C18:0	3.705
Ác. Oleico	C18:1 (n-9)	33.587
Ác. Vaccénico	C18:2 (n-7)	1.105
Ác. Linoleico	C18:2 (n-6)	29.277
Ác. Linolénico	C18:3 (n-6)	0.284
Ác. Eicosanoico	C20:1 (n-9)	0.965
Ác. Erúcico ^b	C22:1 (n-9)	6.552
Ác. Eicosatrienoico	C20:3 (n-9)	5.773
Ác. Araquidónico	C20:4 (n-6)	4.666

a. Por debajo del límite de cuantificación del método.

b. El nivel máximo permitido es de 5% (Kirk y Sawyer, 1996).

n: Indica si el ácido graso es omega-6, 7 y 9

3.3 IMPORTANCIA DE LAS GRASAS Y ACEITES EN LA NUTRICIÓN

Las grasas y aceites han sido una de las fuentes principales de alimento para el hombre desde la época en que era cazador. Ya sea de fuentes vegetales, animales o de origen marino, las grasas y aceites representan la fuente de energía más alta por unidad de peso que el hombre puede consumir. (Desrosier, 1997).

En los alimentos, las grasas y aceites pueden estar presentes en cantidades variable como por ejemplo en la mantequilla, tocino, grasas de repostería, o aceites de ensaladas o bien ser constituyentes de alimentos básicos como la leche, queso, pollo, pescado o carne. Las principales fuentes de aceites vegetales son las semillas de soya, algodón y cacahuate, así como los frutos oleaginosos de la palma, el coco y la oliva.



Los aceites y las grasas han sido reconocidos como nutrientes esenciales tanto en las dietas animales como en la humana, teniendo como funciones:

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

Pero a pesar de estas funciones, las grasas y aceites han sufrido de controversias, en relación a problemas de toxicidad o sobre su papel en el origen de ciertas enfermedades. (Fennema, 1993; Ziller, 1996; Álvarez, 2002).

3.4 GRASAS Y ACEITES

Son sustancias de origen vegetal o animal que consisten en mezclas de triésteres de ácidos grasos y glicerol, llamados comúnmente triglicéridos. Su estructura molecular está conformada casi exclusivamente de carbono, hidrógeno y oxígeno, aunque existen formas más complejas (Cervera, 1993).

Las grasas y aceites son insolubles en agua y solubles en la mayoría de los solventes orgánicos. Son menos densos que el agua y a temperatura ambiente varían de consistencia desde líquidos a sólidos. Cuando aparecen sólidos se les denomina “Grasas” y cuando son líquidos “Aceites”.

Además de triglicéridos, las grasas y aceites incluyen a los monoglicéridos, diglicéridos, fosfátidos, cerebrósidos, esteroides, terpenos, alcoholes grasos, vitaminas liposolubles y otras sustancias. (Belitz, 1997; Ziller, 1996).

El metabolismo de los aceites y de las grasas se lleva a cabo por la acción de la bilis con la ayuda de enzimas en el tracto intestinal; los triglicéridos se hidrolizan para dar dos monoglicéridos y ácidos grasos libres. Estos productos de la digestión junto con las sales biliares, forman después una estructura micelar que se desplaza hacia la membrana de la célula epitelial intestinal.



Allí los ácidos grasos y los monoglicéridos se absorben en el interior de la célula y los ácidos biliares quedan retenidos en la luz intestinal. En la pared intestinal, los monoglicéridos y los ácidos grasos libres son reconvertidos en triglicéridos.

Si los ácidos grasos tienen una longitud de 10 o menos átomos de carbono, estos son transportados vía portal hasta el hígado donde son metabolizados rápidamente. Los triglicéridos con ácidos grasos de cadena larga de más de 10 átomos de carbono son transportados vía linfática. Estos triglicéridos procedentes de la dieta se transportan en la sangre en forma de lipoproteínas. Los triglicéridos se almacenan en el tejido adiposo hasta que son requeridos como fuente de energía. La grasa se moviliza del tejido adiposo a la sangre como ácidos grasos libres, éstos forman complejos con proteínas sanguíneas y se distribuyen por todo el organismo. La oxidación de los ácidos grasos libres es una fuente de energía de primer orden para el organismo. (Liener, 1989; Álvarez, 2002).

3.4.1 TRIGLICÉRIDOS

Tanto en los alimentos que los contienen, como en el cuerpo humano, el 95% o más de las grasas están en forma de triglicéridos. Los triglicéridos constituyen la forma principal de almacenamiento de las grasas.

Se componen fundamentalmente de tres ácidos grasos unidos por enlaces éster a una molécula de glicerol (Fig. 2). Cuando todos los ácidos grasos en un triglicérido son idénticos se les denomina “simple”, sin embargo los triglicéridos más comunes son los “compuestos”, en los que dos o tres residuos diferentes de ácidos grasos están presentes en la molécula. Las propiedades físicas y químicas de las grasas dependen en gran medida de los tipos y proporciones de los ácidos grasos que los constituyen, así como el modo en que se distribuyen en el esqueleto del glicerol.



Los ácidos grasos predominantes pueden ser cadenas alifáticas saturadas o no, con un número par de átomos de carbono y un radical carboxilo; y solo un número reducido de estos están presentes en los aceites comestibles ya que tienen cantidades pequeñas de ácidos grasos de cadena ramificada, cíclica o con un número impar de átomos de carbono. (Ziller, 1996).

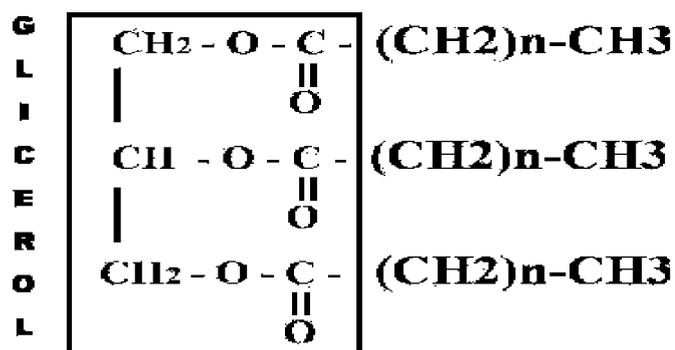


Figura 2: Ejemplo de un triglicérido

3.4.2 ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos se clasifican por su grado de saturación en:

3.4.2.1 ÁCIDOS GRASOS SATURADOS

Contienen solamente enlaces carbono-carbono simple (C-C), y son los menos reactivos químicamente. Están constituidos principalmente por ácidos grasos de 4 a 24 átomos de carbono; su temperatura y punto de fusión aumenta con la longitud de la cadena ya que los de C₄ a C₈ son líquidos a 25°C, mientras que los de C₁₀ en adelante son sólidos. (Badui, 1999; Ziller, 1996).

3.4.2.2 ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS

Si un ácido graso contiene uno o más enlaces dobles carbono-carbono (C=C) se le denomina “insaturado”. Cuando un ácido graso presenta un único doble enlace se le denomina “monoinsaturado”, si contiene más de uno se le denomina “poliinsaturado”. Los ácidos grasos insaturados son más reactivos químicamente que los saturados, ya que están propensos a transformaciones oxidativas y de isomerización. Esta reactividad aumenta con el número de dobles enlaces del ácido graso. (Ziller, 1996).



Son muy abundantes en los aceites vegetales y marinos. Su temperatura de fusión disminuye con el aumento de los dobles ligaduras y ésta es siempre menor que la de los saturados. De todos los ácidos grasos insaturados, los más importantes son el ácido linoleico, linolénico, araquidónico, eicosapentenoico (EPA) y docasahecanoico (DHA), que contienen respectivamente 2,3,4,5 y 6 dobles enlaces. (Govinid, 1981; Badui, 1999;).

3.4.2.3 ISOMERIA DE LOS ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS

La configuración geométrica del doble enlace se designa generalmente con los prefijos *Cis* (del latín, en el mismo lado) y *Trans* (del latín, enfrente) (Fig. 3), que indican si los grupos alquil están en el mismo o en distinto lado de la molécula.

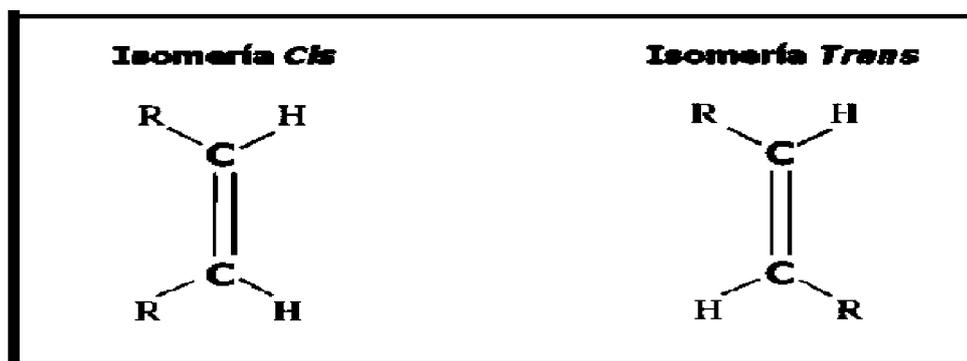


Figura 3: Ejemplo de isomería geométrica

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

3.4.3 MONOGLICÉRIDOS Y DIGLICÉRIDOS

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



3.4.4 OTROS COMPUESTOS LIPOFÍLICOS

3.4.4.1 ÁCIDOS GRASOS LIBRES

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

3.4.4.2. FOSFÁTIDOS

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

3.4.4.3 ESTEROLES

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

3.4.4.4 TOCOFEROLES

Son los componentes minoritarios importantes de la mayoría de las grasas de origen vegetal. Sirven como agentes antioxidantes pues retardan el enranciamiento y además son precursores de la vitamina E. (Álvarez, 2002).

3.4.4.5 CAROTENOIDES Y CLOROFILAS

Los carotenoides son sustancias coloreadas presentes naturalmente en grasas y aceites. Su coloración varía desde el amarillo al rojo intenso.

La clorofila es el pigmento verde de las plantas, el cual desempeña un papel esencial en el proceso fotosintético. El nivel de clorofila naturalmente presente en un aceite vegetal puede ser suficiente para darle una coloración verdosa. (Álvarez, 2002).



3.4.5 PROCESO GENERAL DE OBTENCIÓN DE UN ACEITE COMESTIBLE

Los aceites de oleaginosas pueden ser extraídos de semillas, seguido de un proceso de refinación para eliminar la materia indeseable y modificar sus propiedades. A pesar de que las grasas provienen de diversas fuentes (animal o vegetal), en general son procesadas para su refinamiento y estandarización y así ser consumidas más fácilmente. Para que un aceite comestible sea considerado de buena calidad no deberá tener olor, ni sabor, además deberá estar exento de impurezas y ser estable a la oxidación. El procesamiento de los aceites está diseñado en parte para eliminar o destruir productos de la oxidación o factores como ácidos grasos libres y contaminantes metálicos que pueden iniciar o propiciar reacciones oxidativas. (Álvarez, 2002).

Las grasas vegetales se obtienen extrayendo el aceite con solventes, los cuales deben de cumplir ciertos requisitos (Anónimo, 1998):

- Ser productos de características químicas bien definidas, sin que exista la posibilidad de que contengan impurezas que sean nocivas para el organismo.
- Ser fácilmente separables, por destilación con o sin arrastre de vapor, de la mezcla grasa-disolvente, sin someter al aceite a calentamiento excesivos.
- No contendrá residuos metálicos especialmente el plomo, que puedan quedar retenidos en el aceite.

En éste proceso el aceite se extrae de la semilla principalmente con hexano que después se separa del aceite y se reutilizará. Las desventajas de este solvente es que es muy flamable, pero debido a su alta volatilidad no queda resto alguno de hexano en el aceite final. Los aceites y grasas obtenidos tras la extracción se denominan aceites y grasas "Crudos".

Este término se aplica al aceite no procesado después de haberlo extraído de la materia prima, que contiene aún pequeñas cantidades de compuestos naturales que no son glicéridos y que serán eliminados a lo largo de una serie de fases del proceso llamado refinación. (Álvarez, 2002; Barbosa, 2003).



Durante la refinación, sustancias que afectan la calidad del aceite son removidas o reducidas en su concentración, es por esto que el término refinación se refiere a cualquier tratamiento purificador, destinado a eliminar los ácidos grasos libres, los hidratos de carbono, fosfátidos o productos mucilaginosos, esteroides, pigmentos (principalmente los carotenos y la clorofila) y otras impurezas presentes en el aceite “crudo”. (Álvarez,2002 ; Prior 2004).

Los procesos que se llevan a cabo **comúnmente** en la refinación son:

- Desgomado
- Neutralización
- Blanqueo

La filtración e hidrogenación del aceite también pueden ser considerados como parte del proceso de refinación en algunos casos. (Watson, 1987, Prior, 2004).

3.4.5.1 DESGOMADO

El aceite crudo contiene una gran cantidad de **compuestos de naturaleza grasa** o no, diferente a los triglicéridos, como pueden ser las gomas, resinas, proteínas y fosfolípidos, los cuales se eliminan por el procedimiento llamado desgomado. Esta operación se puede realizar por dos sistemas: uno que consiste en flocular el aislamiento de la goma para una recuperación y obtención de un subproducto con valor comercial y el desgomado por tratamiento generalizado sin separación específica de la goma.

Se asume que las grasas crudas tienen un alto nivel de fosfátidos como la lecitina o la cefalina (1.5-2.5 %), los cuales **son solubles en el aceite** solo en su forma anhidra, por lo cual pueden precipitar por simple hidratación, la cual se efectúa al agregar de 2 a 3 % de agua.

El desgomado se puede mejorar por adición de ácido cítrico o fosfórico, que al llevar a cabo una centrifugación se consigue separar las gomas. Al agregar alguno de estos ácidos y calentar la mezcla a unos 60-70°C, las gomas son hidratadas y floculadas formando un mucílago que es **insoluble en el aceite** e inmediatamente son eliminadas por sedimentación o centrifugación.



En algunos casos los fosfolípidos pueden reaccionar en la semilla o en el aceite formando sales cálcicas u otras posibles sustancias que no se hidratan fácilmente y que permanecen disueltas en el aceite, por lo que si no se eliminan, interfieren con los siguientes pasos del proceso de refinación. Una de las ventajas del desgomado con ácido fosfórico o cítrico es que tales sales no hidratables se vuelven hidratables, y entonces pueden eliminarse junto con los demás fosfolípidos. (Ziller, 1996; Álvarez, 2002; Prior, 2004).

3.4.5.2 NEUTRALIZACIÓN

La neutralización consiste en la eliminación de los ácidos grasos libres, los cuales indican el grado de acidez de un aceite. El aumento de la acidez se debe de evitar, ya que un nivel alto de los ácidos grasos libres causa graves pérdidas en el proceso de refinación, debido a que los ácidos grasos libres son sustancias que imparten olor y producen irritación en la lengua y garganta, provocando que el aceite sea indeseable al consumidor. Esta operación se realiza con el uso de bases, tales como la sosa cáustica (Hidróxido de sodio 12-15%) o lechada de cal.

El método más común de la neutralización consiste en el empleo de un álcali de concentración conocida, el cual se mezcla con el aceite que se calienta a una temperatura entre 75 a 95 °C. Posteriormente se deja sedimentar la fase acuosa, para separar la fase jabonosa por centrifugación y proceder a lavar el aceite varias veces con agua caliente y someterlo nuevamente a una centrifugación intensa.

Con la neutralización alcalina se obtiene una completa eliminación de los ácidos grasos libres que se transforman en jabones insolubles en el aceite. Del mismo modo se combinan con el álcali otras sustancias ácidas y se eliminan algunas impurezas del aceite por adsorción en el jabón formado durante el proceso. (Álvarez, 2002; Prior, 2004).



3.4.5.3 DECOLORACIÓN O BLANQUEO

Este tratamiento se les da a los aceites después de haberlos neutralizado para eliminar las sustancias coloridas y remover algunos compuestos traza de metales, jabones y productos de oxidación. Es por esto que el término blanqueado se refiere al proceso de eliminación de sustancias coloreadas para purificar aún más la grasa o el aceite.

El proceso de blanqueo es un proceso físico, el cual consiste en añadir al aceite neutro y lavado una tierra adsorbente y someter esta mezcla a un calentamiento (aproximadamente 85°C) para mejorar la actividad del adsorbente. Posteriormente se realiza una filtración del aceite para eliminar el material adsorbente con los pigmentos removidos.

Las tierras adsorbentes o decolorantes suelen ser arcillas naturales adsorbentes, trituradas y tamizadas, o bien arcillas activadas por un tratamiento con ácido clorhídrico o sulfúrico diluido, seguido de un lavado con agua (para eliminar el ácido), secado y triturado. Las tierras activadas son las más efectivas para la eliminación de la clorofila y de otros colorantes básicos.

La cantidad de tierra decolorante necesaria depende de la cantidad de color del aceite y del grado de decoloración que se quiere obtener. Una cantidad normal es del 5%. Cuando se desea eliminar mucho color se añade, además carbón decolorante en cantidades del orden del 0.3%. Durante el tratamiento en caliente debe evitarse la acción del oxígeno, que produce pardeamiento. En muchas instalaciones la operación se hace al vacío. (Primo, 1979; Belitz, 1991; Ziller, 1996; Álvarez, 2002; Prior, 2004).

3.4.5.4. HIDROGENACIÓN

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



La hidrogenación es la adición de hidrógeno a los dobles enlaces de las cadenas de los ácidos grasos de los triglicéridos, por la reacción de hidrógeno en la presencia de un metal que actúa como catalizador (como el níquel) (Fig. 4), lo cual da a lugar a la elevación del punto de fusión (endurecimiento de las grasas) y naturalmente a la disminución del índice de yodo.

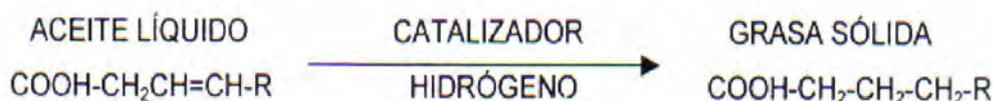


Figura 4: Reacción de hidrogenación

Los objetivos principales de la hidrogenación son tres:

- Permite la conversión de los aceites líquidos en grasas semisólidas o plásticas más adecuadas para aplicaciones específicas, como en la elaboración de las grasas para repostería o shoterings
- Reducir el grado de insaturación y la velocidad de oxidación aumentando la estabilidad
- Modificar las características físicas especialmente el comportamiento de fusión y cristalización de un aceite, así como el grado de isomerización *cis-trans*.

Por otro lado el color de los aceites disminuye considerablemente durante la hidrogenación, debido a la desaparición de grupos cromóforos, por la reducción de dobles enlaces conjugados, por ejemplo, en los carotenoides.

La composición y las características físicas y químicas de los productos hidrogenados, varía de acuerdo a las posiciones de los dobles enlaces, es decir, la reacción de hidrogenación es selectiva y los ácidos grasos más insaturados tienden a reaccionar primero; además de que también varía con la isomerización que acompaña la reacción, la cual es provocada por el contacto con el catalizador y que es altamente dependiente de las condiciones de hidrogenación, así como de la intensidad con que se presentan las reacciones que dan lugar a las transformaciones. (Primo, 1979; Swern 1982; Badui, 1993; Prior, 2004).



El término “selectividad” se refiere a la velocidad de hidrogenación relativa de los ácidos grasos más insaturados con respecto a los menos insaturados. La selectividad se favorece cuando: a) la concentración de hidrógeno se mantiene baja en la superficie del catalizador, b) se utilizan temperaturas de 160 a 200°C, c) se emplea una mayor cantidad de catalizador, d) se agita lentamente, e) la presión es entre 0.5 a 1 atm y f) se emplean catalizadores muy específicos. (Belitz, 1997; Badui, 1993; Fennema, 1993).

Los 4 principales parámetros de reacción en la hidrogenación son: la temperatura, la presión, la agitación y la concentración del catalizador. Además del tipo de aceite y el tipo de catalizador.

- ↳ **Temperatura:** a temperaturas altas se aumenta la selectividad, el efecto de la isomerización, la reacción en la superficie del catalizador, así como la solubilidad del hidrógeno en el aceite y la formación de enlaces *trans*.
- ↳ **Presión:** a bajas presiones el hidrógeno disuelto en el aceite no cubre completamente la superficie del catalizador, lo que permite saturar los dobles enlaces.
- ↳ **Agitación:** Ayuda a disolver el hidrógeno, al conseguir una mezcla uniforme entre el catalizador y el aceite, así como disipar el calor de la reacción.
- ↳ **Catalizador:** la consideración económica es la que dictamina el uso de un catalizador y se diferencian en el grado de selectividad que ofrecen. El níquel es el catalizador más utilizado, sin embargo también existen otros catalizadores como el cobre, el platino, paladio, rodio, etc. (Fennema, 1993; Hernández, 1998; Prior, 2004).



Durante la hidrogenación los dobles enlaces presentes en el aceite, pueden ser saturados o isomerizados. En el caso de ser isomerizados pueden ocurrir dos tipos de isómeros: posicionales y/o geométricos, los cuales se forman en la superficie del catalizador, es decir, se puede producir una cierta isomerización de los dobles enlaces, cambiando de configuración *cis* a *trans* (isomerización geométrica) o cambiar de posición dentro de la cadena de átomos de carbono (isomerización posicional).

Los ácidos grasos en *trans* son ácidos grasos insaturados que tienen al menos un doble enlace en configuración *trans*. Los ácidos grasos en *trans* más frecuentes son los monoinsaturados. Este tipo de ácidos se encuentra en las margarinas

≈ Mecanismo:

La hidrogenación puede llevarse a cabo siempre y cuando todos los reactivos estén juntos: el aceite insaturado, el catalizador (que es sólido) y el gas hidrógeno. La pureza del hidrógeno es de gran importancia y se requiere que tenga una pureza del 99.8 %, debido a que las impurezas pueden disminuir el rendimiento en la hidrogenación. Por otro lado en el aceite empleado se desea que el contenido de agua no sea mayor al 0.05%, ya que si es superior en las condiciones de operación puede inducir la hidrólisis de los triglicéridos y la liberación de ácidos grasos, que además de envenenar el catalizador, se concentran en el espacio superior del reactor e impiden la circulación del hidrógeno. (Barbosa,2003; Prior, 2004).

El aceite se mezcla con el catalizador y se introduce en el reactor, el cual se calienta con agitación y cuando ha alcanzado una temperatura adecuada se inicia la introducción del hidrógeno a presión. El hidrógeno debe ser disuelto en la fase líquido-sólido antes de que la reacción ocurra, ya que este tiene que estar disponible para la reacción. En una operación normal, empleando un catalizador activo, el contenido del catalizador (níquel) de la mezcla final en el reactor, puede estar presente entre un 0.10 al 0.25%.



El aceite, el gas y el catalizador deben entrar en contacto íntimo, para lo cual se necesita una agitación enérgica. La temperatura del proceso varía según el aceite a utilizar y del grado de hidrogenación que se desea obtener y oscila entre 100 a 225°C, y la presión de 1 a 4 atm.

La hidrogenación es un proceso exotérmico y por ello la temperatura del aceite irá aumentando, a medida que la reacción avanza. Para mantener la temperatura deseada, se hace circular agua a través de unos serpentines de refrigeración.

Para seguir el curso de la reacción se extraen muestras periódicamente y se mide su índice de refracción (valor que varía según el número de enlaces dobles presentes). Cuando se ha alcanzado el grado de hidrogenación deseado, se cierra la entrada de gas, se enfría la mezcla, sin bajar del punto de fusión y se filtra, para recuperar el catalizador y obtener grasa limpia, que se deja solidificar. (Primo, 1979).

Los aspectos químicos de la hidrogenación están lejos de conocerse aún con precisión; pero pueden estar implicadas las siguientes etapas (Figura 5 A) :

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

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

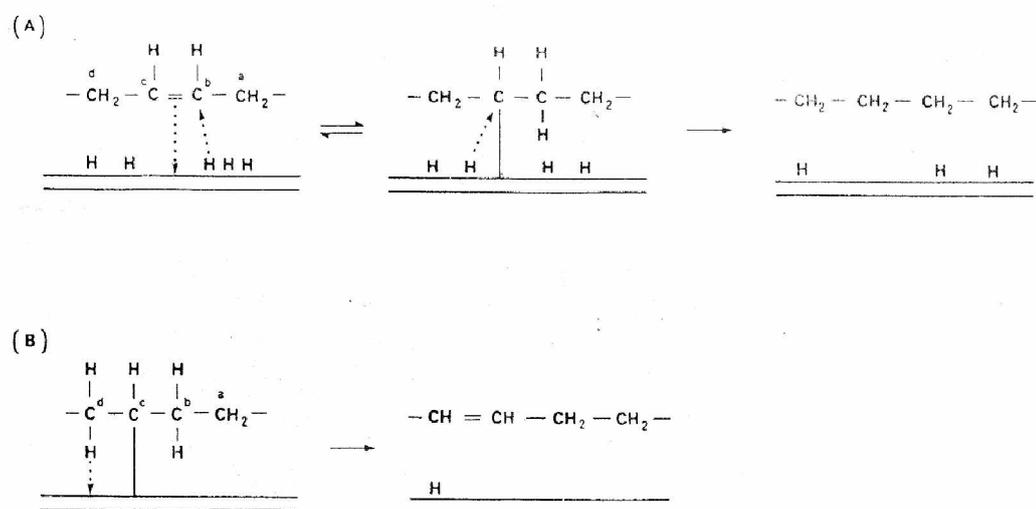


Figura 5: Mecanismo de Hidrogenación. (Wong, 1995)

3.4.5.4.1 ÁCIDOS GRASOS TRANS

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

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

Los ácidos grasos *trans* son ácidos grasos insaturados que tienen al menos un doble enlace en configuración *trans*. Los ácidos grasos en *trans* más frecuentes son los monoinsaturados. Este tipo de ácidos se encuentran en las margarinas y grasas de repostería (shoterings) que contienen aceites de pescado o vegetales parcialmente hidrogenados.



Estudios clínicos y epidemiológicos sugieren que los mayores consumos de ácidos grasos *trans* se relacionan con aumento en el riesgo de cardiopatía coronaria, cáncer y otros padecimientos crónicos. Está demostrado que los ácidos grasos *trans* inhiben la desaturación y elongación del ácido linoleico y el linolénico alfa para formar ácidos grasos esenciales de cadena larga. Por otro lado pueden elevar los niveles de las LDL (lipoproteínas de baja densidad) y pueden reducir los de las HDL (lipoproteínas de alta densidad) aumentando el riesgo de arterioesclerosis y de enfermedades coronarias del corazón. (Prior, 2004).

3.5 FACTORES TÓXICOS Y ANTINUTRICIONALES INTRÍNSECOS

Por su modo de acción, las sustancias nocivas en los alimentos pueden clasificarse en dos grandes grupos (López,2000):

- a. Sustancias antinutritivas: su efecto tóxico se basa en disminuir la disponibilidad o provocar una pérdida suplementaria de los nutrientes esenciales. Estas sustancias provocan un desequilibrio, que se complementa con un aporte suplementario de los nutrientes implicados y a la larga determinan la aparición de una patología particular. Pertenecen a este grupo antivitaminas, antienzimas y secuestrantes de minerales. Los efectos nocivos pueden pasar desapercibidos con una alimentación abundante.
- b. Sustancias tóxicas: son sustancias que tienen un efecto tóxico directo sobre el organismo. Su modo de acción puede explicarse, ya sea por su reactividad, por un mimetismo molecular de las hormonas, aminoácidos o en ciertos casos por la existencia de una información genética que favorezca la aparición de una determinada patología, provocando una intoxicación aguda en ocasiones con una sola dosis.



3.5.1. FACTORES ANTINUTRICIONALES Y TÓXICOS DE LA FRACCIÓN PROTEÍICA EN LA ALMENDRA DE CAPULÍN (*Prunus serotina*)

Como se mencionó en párrafos anteriores, las semillas del género ***Prunus*** tienen presente en la fracción proteínica factores antinutricionales y tóxicos; como son los glucósidos cianogénicos, fitatos; inhibidores de tripsina y taninos

Los **inhibidores de tripsina** son llamados así por su habilidad para inhibir la actividad de la tripsina que es una enzima proteolítica, la cual se libera del páncreas al tracto digestivo en el hombre y los animales. Existen evidencias para indicar que la tripsina en el intestino suprime la secreción de la enzima pancreática y que los inhibidores de tripsina provocan un incremento en la secreción de enzima impidiendo la supresión de la tripsina. Por lo que se les atribuye la hipertrofia del páncreas (crecimiento anormal). La mayoría de los inhibidores de proteasas son destruidos por calentamiento, con lo cual se logra mejorar el valor nutricional de las leguminosas. (Nava y Rodríguez 1988; Lara, 2003).

Los **fitatos** se encuentran naturalmente en semillas, leguminosas, cereales y oleaginosas en forma de sal de potasio, calcio o magnesio o formando complejos con proteínas y minerales. (Dintzis et al, 1992). Su acción fundamental es disminuir la absorción o biodisponibilidad de minerales di y trivalentes, como el calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre o molibdeno, para formar sales insolubles. Sin embargo los efectos antinutricionales de los fitatos vienen ligados a su estructura y a los valores de pH que normalmente se encuentran en los alimentos, lo que determina que estas sustancias se encuentran en forma de anión, con un potencial para formar complejos uniéndose a moléculas de carga positiva tales como cationes o proteínas.

Muchos de estos complejos son de naturaleza insoluble, lo que hace que la presencia de los fitatos en un alimento se considere como un factor limitante de su valor nutricional. A pH normales los fitatos son fuertes quelantes de cationes, causando una precipitación con cationes polivalentes y proteínas. El fenómeno de precipitación provoca una reducción de la biodisponibilidad de minerales traza esenciales y reducción en la digestibilidad de las proteínas. (Mendoza, 2001; Álvarez, 2002).



Los **glucósidos cianogénicos** constituyen un grupo de sustancias naturales ampliamente distribuidas, que originan por hidrólisis una cetona o un aldehído, un azúcar y el ácido cianhídrico (HCN). La toxicidad de estos glucósidos se debe a la liberación de cianuro (tóxico); el cual ha sido encontrado en concentraciones relativamente altas en algunas gramíneas, leguminosas, raíces feculentas y almendra de frutas. (Linner, 1980; Shibamoto 1996; Lara, 2003). La liberación del HCN, a partir de los glucósidos cianogénicos, al masticar o triturar las plantas que los contienen, se debe a un proceso enzimático en el que intervienen dos enzimas.

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

En vista de que la liberación del HCN ocurre solamente cuando se daña el tejido celular, se ha sugerido que la función de estos compuestos es la de proteger a las plantas del ataque de sus depredadores y de acuerdo a estudios más recientes parece que tienen una función muy importante en la biosíntesis de ciertos aminoácidos. Las características clínicas por envenenamiento agudo con cianuro son: confusión mental, parálisis muscular generalizada y paro respiratorio. La dosis letal mínima por vía oral se ha estimado en 0.5-3.5 mg/kg de p.c (peso corporal). El cianuro ingerido es rápidamente absorbido por la parte superior del tracto gastrointestinal, pasa rápidamente a través de la piel y el gas es rápidamente absorbido por los pulmones. El HCN ejerce su acción tóxica al unirse al ion férrico de la citocromo oxidasa de las mitocondrias, impidiendo con ello la respiración celular. (Conn, 1973; Liener, 1980; Shibamoto T., 1996; Alvarado, 1999).



Una vez dada la explicación de cada uno de los factores antinutricionales y tóxicos que se encuentran en la fracción proteínica en la almendra de capulín (***Prunus serotina***), se ha observado en estudios recientes que el material obtenido después de la extracción con hexano (harina desengrasada) se considera un auténtico concentrado de proteína, ya que el contenido de la misma es mayor al 50%, pero inaccesible para el consumo humano y/o animal, debido a que su alto contenido de glucósidos cianogénicos es muy elevado y lo hace sumamente tóxico.

Pero al realizar el estudio de toxicidad en un aislado de proteína a partir de la purificación del concentrado proteínico, se observa que se puede eliminar casi en su totalidad a los glucósidos cianogénicos y no detectarse toxicidad aguda, debido a que no se observaron alteraciones en el comportamiento de los ratones, comparado con el control respectivo.

Por otro lado al realizar las pruebas de toxicidad subaguda (niveles de 5% al 10% del aislado proteínico), establecen que este aislado es inocuo porque no se presenta una diferencia significativa en el incremento en peso de los ratones, ni en los parámetros sanguíneos, donde este último indica que el aislado proteínico en sus diferentes niveles no induce signos de enfermedad. Por último se encontró que la absorción de las proteínas no se ve afectada por la adición del aislado proteínico en sus diferentes niveles, porque la digestibilidad *in vivo* no presentó diferencia significativa entre las dietas administradas.

3.5.2 FACTORES ANTINUTRICIONALES Y TÓXICOS DE LA FRACCIÓN LÍPIDICA EN LA ALMENDRA DE CAPULÍN (*Prunus serotina*)

En la fracción lipídica de la almendra de capulín (***Prunus serotina***), se ha observado, en estudios recientes, la presencia de varios ácidos grasos no comunes, pero principalmente se encontró la presencia del **ácido erúcico** cuya concentración es mayor al 5%, haciendo que se considere de alto riesgo el consumo del aceite de esta almendra. (Barbosa, 2003).



El **ácido erúcico** (cis-13-docosenoico; $C_{22}H_{42}O_2$; $C_{22:1n-9}$ (omega 9)) es el único y más abundante ácido mono-insaturado en el reino vegetal, el cual tiene un gran peso molecular y es el principal componente en la larga e importante familia de las crucíferas. (Hildich, 1956; Prior, 2004). Se notificó su presencia por primera vez en las semillas oleaginosas de la mostaza en 1849 y constituye un importante ácido graso vegetal. Tiene un punto de fusión de 33.5 °C y un índice de yodo* de 74.7. (*Peso del yodo (en gramos) absorbido por 100 g de aceite o grasa.)

Es soluble en éter y alcohol etílico. Como resultado de su isomerización da lugar al ácido Brassidico y al trans-13-docosenoico, donde este último tiene un punto de fusión de 60°C. Ambos ácidos son productos de la síntesis de una extensión de la cadena de los ácidos oleico y eleáidico. (Hildich, 1956; Prior, 2004).

El consumo de este tipo de aceites por los humanos tiene una larga historia, pero solo hasta los años setenta se empezó a llevar una investigación biológica controlada (Mattson, 1973; Prior, 2004). Se han observado numerosos efectos histopatológicos en varias especies animales. (Johnson, 1989; Prior, 2004). Algunos de los daños, ocasionados por el consumo de aceites con alto contenido en ácido erúcico son los siguientes:

- ✎ La principal lesión es daño al miocardio, empezando por depósitos de grasa en el músculo cardíaco. Estos estudios se realizaron principalmente en ratas, que por ser un modelo biológico más parecido al hombre se puede esperar que los daños causados sean similares en el humano, pero no se sabe todavía hasta que extremo aparece esta acción en él. La deposición de grasa en el músculo cardíaco va acompañada por disminución de glucógeno, que actúa como sustituto de fuente de energía para el corazón. La acumulación de grasa en el músculo cardíaco se presenta desde el primer día y aumenta la deposición con el paso de los días, llegando a aumentar su contenido de lípidos 3 o 4 veces más que lo normal. Más adelante aparece necrosis del miocardio con inmigración de linfocitos, eosinófilos, células plasmáticas y macrófagos. Posteriormente hay una proliferación de fibroblastos y cicatrización.



El contenido de grasa en el corazón de la rata alcanza su máximo al cabo de una semana de iniciarse la alimentación con contenido de ácido erúcico y después desciende debido a la adaptación de las enzimas que degradan las grasas (Mattson, 1973; Johnson, 1989; Linder, 1995; Prior, 2004).

- κ Se ha observado una disminución del crecimiento en animales como cerdos, ratones, hamsters, patos, pavos y en pollos, donde se ha incluido en su dieta aceite con contenido de ácido erúcico, como por ejemplo el aceite de nabo y colza como aporte de calorías alrededor de un 10-20% para observar un efecto mínimo, (Johnson, 1989; Prior, 2004).
- κ Después de la absorción intestinal, el ácido erúcico desaparece rápidamente del hígado y del riñón, pero no del bazo y de los suprarrenales. (Johnson, 1989).
- κ Se ha observado cirrosis en el hígado, daño en riñones, bazo y suprarrenales, degeneración testicular en ratas y anemia hemolítica en las especies estudiadas. (Mattson, 1973; Johnson, 1989; Prior 2004).

El origen de esta deposición de grasa en el organismo muy probablemente se deba a una mayor dificultad de las enzimas para degradar el ácido erúcico en comparación, por ejemplo con el ácido palmítico. Por otro lado el ácido erúcico desacopla el sistema enzimático responsable de la oxidación de ácidos grasos de cadena larga en la mitocondria y posiblemente a nivel de la Acil-CoA-deshidrogenasa, así como también la triglicérido lipasa es muy poco activa frente al este ácido graso.

El ácido erúcico o sus metabolitos se incorporan de preferencia en los fosfolípidos de las células del músculo cardíaco, alterando la formación y función de la membrana celular, especialmente porque estas células destruyen a este ácido graso, lo que puede tener consecuencias para la función de la membrana. (Linder, 1995; Prior, 2004).



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

Si el contenido de ácidos grasos saturados del alimento se eleva manteniendo constante el 5% de ácido erúcico las lesiones al miocardio disminuyen.

Con el conocimiento de los factores que causa la presencia del ácido erúcico en los alimentos, en trabajos anteriores con aceite extraído a partir de la almendra de capulín (***Prunus serotina***), se observó que el perfil de ácidos grasos del aceite mostró elevadas concentraciones de ácido oleico, linoleico y del ácido erúcico que sobrepasa el límite establecido para consumo humano (Tabla 2).

Pero, si el aceite de la almendra de capulín es sometido a un proceso de purificación (refinación e hidrogenación) se puede observar que la concentración del ácido erúcico se ve disminuida (principalmente con el proceso de hidrogenación). Con respecto a la toxicidad que el aceite de capulín puede provocar debido a la presencia del ácido erúcico, se concluyó que al realizar el estudio de toxicidad aguda, el aceite crudo de la almendra de capulín, refinado, hidrogenado 5 minutos e hidrogenado 10 minutos no mostró signos de toxicidad, considerándolo no tóxico a la concentración de prueba (15 g/ kg de p.c.) (p.c.= peso corporal).



Tabla 2: Perfil de ácidos grasos en el aceite crudo de la almendra de capulín (Prunus serotina) y del aceite procesado (refinado e hidrogenado) obtenido de un estudio previo, por cromatografía de gases. (Prior, 2004).

Ácidos Grasos	# Carbonos e Insaturaciones	Aceite Crudo (% de ácidos grasos)	Aceite Refinado (% de ácidos grasos)	Aceite Hidrogenado 5 min (% de ácidos grasos)	Aceite Hidrogenado 10 min (% de ácidos grasos)
Ác. Palmítico	C16:0	4.0033	4.9616	8.233	6.610
Ác. Palmitoleico	C16:1	---- ^a	0.4981	---- ^a	---- ^a
Ác. Esteárico	C18:0	3.705	3.8352	25.486	26.595
Ác. Oleico	C18:1 (n-9)	33.587	33.045	31.243	45.381
Ác. Vaccénico	C18:2 (n-7)	1.105	1.2817	---- ^a	---- ^a
Ác. Linoleico	C18:2 (n-6)	29.277	32.284	9.940	6.280
Ác. Linolénico	C18:3 (n-6)	0.284	0.196	---- ^a	---- ^a
Ác. Eicosanoico	C20:1 (n-9)	0.965	5.1673	---- ^a	---- ^a
Ác. Erúcico ^b	C22:1 (n-9)	6.552	6.8446	2.134	0.846
Ác. Eicosatrienoico	C20:3 (n-9)	5.773	4.068	---- ^a	---- ^a
Ác. Araquidónico	C20:4 (n-6)	4.666	7.1459	---- ^a	---- ^a

a. Por debajo del límite de cuantificación del método.

b. El nivel máximo permitido es de 5% (Kirk y Sawyer, 1996).

n: Indica si el ácido graso es omega-6, 7 y 9

A pesar de los daños que puede causar el ácido erúcico en los diferentes órganos antes descritos, en estudios más recientes se ha encontrado que puede contribuir en la disminución de los síntomas de la enfermedad conocida como Adrenoleucodistrofia (ALD), antiguamente denominada enfermedad de Schilder, la cual se trata de un grupo de desórdenes neurológicos degenerativos, caracterizada por una desmielinización nerviosa y una acumulación de ácidos grasos de cadena muy larga en los tejidos y fluidos del organismo, que afecta principalmente a los varones.



La terapia más utilizada en la actualidad para el tratamiento de estas patologías es el aceite de Lorenzo, una mezcla de cuatro partes de glicerol trioleato y una de glicerol trieruciato (triglicérido sintético del **ácido erúcico**, derivado del aceite de colza, purificado y libre de ácidos grasos de cadena larga), que proporciona un producto con 20 por ciento en ácido erúcico (C22:1) y un 80 por 100 en ácido oleico (C18:1), el cual, combinado con una dieta que restringe la ingesta de ácidos grasos de cadena muy larga, reduce e incluso normaliza los niveles de estos ácidos en el plasma de los pacientes afectados por la ALD.

La anomalía metabólica primaria de la ALD consiste en una acumulación de los ácidos grasos de cadena muy larga denominados como VLCFAs debido a la incapacidad, de origen genético, de degradarlos a través de la beta oxidación. Esta ruta degradativa, debido a la larga longitud de estos ácidos grasos, se localiza en unos organelos subcelulares denominados peroxisomas. La ALD está asociada a una deficiencia de la enzima «CoA ligasa peroxisomal de ácidos grasos de cadena muy larga», enzima que convierte a los ácidos grasos libres a ésteres de acil-CoA antes de la degradación oxidativa. Estudios más recientes sugieren que el defecto genético de la ALD no radica en la enzima en sí misma, sino más bien en una proteína de la membrana peroxisomal, denominada proteína-ALD, la cual es necesaria para introducir a la enzima dentro del peroxisoma.

Por ello, en ausencia de una oxidación peroxisomal normal, los VLCFAs se acumulan, siendo ésta la causa que conlleva a la aparición de los síntomas clínicos. Esta proteína defectuosa está codificada por un gen situado en una zona del brazo largo del cromosoma X, por lo que la ALD es una enfermedad ligada al sexo, de modo que esta enfermedad es transmitida por las mujeres, aunque es en los hombres donde se desarrolla.



Por otro lado, como ya se mencionó en párrafos anteriores, el ácido erúcico solo contribuye en la disminución de los síntomas de la enfermedad, porque se ha observado que en terapias en donde se trata la ALD con aceite de Lorenzo los VLCFAs se ven disminuidos en plasma, tejido adiposo e hígado, aunque no ocurre lo mismo en el cerebro, sugiriendo que es por el ácido erúcico, el cual es incapaz de penetrar en el cerebro, la posible causa del aparente fracaso del tratamiento con el aceite de Lorenzo. Ante la ineficacia mostrada por el aceite de Lorenzo en la remisión de los síntomas de la enfermedad, en la actualidad los estudios se centran en su capacidad para prevenir el desarrollo de manifestaciones neurológicas en pacientes que aún no las hayan desarrollado. (García et al, 1995).

3.6 ESTUDIO TOXICOLÓGICO IN VIVO

La toxicología es la ciencia que estudia los venenos. Etimológicamente procede del griego *toxicon*, que significa “vida de amor”. En su contexto moderno, la toxicología se basa fundamentalmente en conocimientos químicos y biológicos, tratando de encontrar explicaciones detalladas de los efectos tóxicos. Gran parte de la toxicología actual implica estudiar los efectos tóxicos de sustancias específicas en mecanismos biológicos y químicos específicos. (Shibamoto, 1996 ; De la Hidalga, 2003).

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; Ortiz, 2005).

De modo genérico se puede definir la toxicidad de una sustancia como su capacidad de producir efectos nocivos a un organismo vivo. De este modo habrá sustancias altamente tóxicas que producirán efectos nocivos a bajas dosis y sustancias débilmente tóxicas que acarrearán efectos nocivos sólo si se utilizan o administran en dosis elevadas. Por lo tanto, la toxicidad de cualquier sustancia, debe considerarse siempre en relación a la dosis, no hay grupo de sustancias tóxicas y otra de sustancias no tóxicas, sino únicamente diferencias en el grado de toxicidad. (Prior, 2004). Vemos pues, que los conceptos:



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

son indispensables para determinar el nivel de toxicidad de un producto.

Actualmente las exigencias de seguridad obligan, en todos los campos, que se evalúen los niveles de riesgo que pueden presentar un determinado producto para el hombre y para el medio ambiente. (Derache, 1990; Alvarado, 1999; Prior, 2004).

3.6.1 VARIABLES GENERALES

Antes de iniciar un estudio toxicológico, es necesario disponer del máximo de datos que den información sobre las características fisicoquímicas de la sustancia estudiada. Estos datos permiten: (Derache, 1990; Prior, 2004).

- κ Definir las condiciones de manipulación y almacenamiento de dicha sustancia
- κ Definir ciertos modelos experimentales, especialmente con relación a la vía de administración.
- κ Contribuir a aportar una explicación para la aparición de algunos fenómenos tóxicos
- κ Comprobar que la sustancia estudiada tenga siempre las mismas características.



3.6.1 1 ELECCIÓN DEL MODELO BIOLÓGICO

A pesar de que existen especies que presentan similitudes con el hombre, ninguna de ellas permite una extrapolación directa de los efectos encontrados en el animal al caso humano. La elección de una especie depende de los siguientes elementos: modelos biológicos más adecuados (toxicología comparativa), la disponibilidad en un determinado momento, la facilidad de manipulación del animal, las condiciones de manutención que requieren, un periodo de crecimiento corto, etc... Por lo que, dependiendo del tipo de efecto toxicológico estudiado se tendrá que el ratón, la rata, el conejo, el perro y el mono u otras especies serán las que más se acerquen a la especie humana. (Derache, 1990; Prior, 2004).

3.6.1 2 ELECCIÓN DE LA VÍA DE ADMINISTRACIÓN

La mayoría de los estudios realizados dentro del campo de 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 con la comida o en el agua bebida por los animales. El primer método (sonda esofágica) es el más utilizado para los estudios cortos, el segundo (sonda estomacal) para los estudios de largos periodos.

Por lo general los tóxicos deben administrarse por la misma vía por la cual los seres humanos quedarían expuestos. Usualmente se requiere de un medio portador para disolver o suspender el tóxico a fin de facilitar su administración. Aun cuando el tóxico sea líquido, puede necesitar un diluyente. El medio *per se* debe tener poco o ningún efecto de toxicidad y no debe reaccionar con el tóxico. Los medios portadores (vehículos) comunes son disolventes como: agua, solución salina, gomas vegetales y derivados de celulosa. (Derache, 1990; Lu, 1995; Prior, 2004).

Por otro lado el volumen del tóxico en solución o suspensión puede afectar la toxicidad; por ejemplo, volúmenes excesivamente grandes de un líquido pueden causar efectos desfavorables para el animal. Por consiguiente cuando se ha de administrar una dosis alta de un tóxico, puede ser recomendable utilizar dosis divididas. (Lu, 1992; Ortiz, 2005).



3.6.1.3 DURACIÓN DEL TRATAMIENTO

Los efectos de las sustancias tóxicas están relacionados con la duración o tiempo de exposición. En función de un cierto número de criterios los efectos esperados pueden aparecer rápidamente o después de un periodo de latencia, dependiendo de la especie elegida y su longevidad. Por ello la duración de los estudios toxicológicos es muy variable.

Los estudios toxicológicos se dividen por lo general en tres categorías de acuerdo al tiempo de interacción del agente tóxico con el organismo de prueba, los cuales son: (Derache; 1990; Prior, 2004).

- κ **Estudios de toxicidad aguda:** implican una sola administración de la sustancia química bajo el control de una prueba o varias administraciones dentro de un periodo de 24 horas. La mayor parte de los estudios se diseñan para determinar la dosis letal media (DL₅₀) de una sustancia tóxica.
- κ **Estudios de toxicidad a corto plazo (subagudos o subcrónicos):** en los cuales intervienen administraciones repetidas, sobre una base diaria o de 5 veces por semana en un periodo de alrededor del 10% de la esperanza de vida del organismo usado, por ejemplo, de 14 a 28 días en ratones.
- κ **Estudios de toxicidad a largo plazo (crónicos):** implica administraciones repetidas en un periodo de toda la vida de los animales de prueba o cuando menos en una fracción importante de ella por ejemplo 18 meses en ratones.



3.7 TOXICIDAD AGUDA

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”.

La evaluación de la toxicidad aguda se efectúa administrando la sustancia o las sustancias problema una sola vez, con el fin de establecer la dosis que provoca la muerte del 50% de los animales o causa un efecto no deseado. (Derache, 1990; Prior, 2004).

La toxicidad aguda de una sustancia se expresa como los mg/Kg de peso corporal (p.c) necesaria para matar al 50% de la población de animales de estudio, lo cual ha sido definido como la dosis letal media (DL_{50}) (Tabla 3). La elección de este porcentaje de mortalidad se basa en el hecho de que el animal, como sistema de ensayo se caracteriza ante todo por su variabilidad. Además es necesario indicar que en la parte media del trazado de la respuesta “dosis-efecto”, el 50% es en donde a la menor variación de la dosis se presenta una mayor variación en el efecto. Por esta razón, la llamada dosis letal media puede determinarse con mayor precisión, por lo que se adopta este valor como el más representativo para expresar la toxicidad aguda de una sustancia. (Miller, 1944; Lichtfield, 1949; Lu, 1992).

Tabla 3: Clasificación de productos tóxicos (por vía oral)

Categoría	DL_{50} (dosis única) en ratón
Supertóxico	5 mg/kg de pc
Extremadamente tóxico	5-50 mg/kg de pc
Altamente tóxico	50-500 mg/kg de pc
Moderadamente tóxico	0.5-5 g/kg de pc
Ligeramente tóxico	5-15 g/kg de pc
Prácticamente no tóxico	>15 g/kg de pc



El estudio de la toxicidad aguda permite:

- a. Calcular la dosis letal media (DL_{50}) que es por definición la expresión estadística de la dosis o de la concentración única de una sustancia.
- b. Definir la naturaleza de los efectos tóxicos observados, estableciendo una relación directa entre su intensidad y la dosis o concentración administrada.
- c. Prever o como mínimo tener información sobre los riesgos a los que se expone el hombre después de una administración o exposición a dosis especialmente elevadas (accidente, intento de suicidio, etc...).
- d. Ofrecer recomendaciones sobre como llevar a cabo los estudios toxicológicos de larga duración.

Este tipo de estudios se debe de realizar en grupos homogéneos de animales que reciban la sustancia a estudiar en concentraciones crecientes, de modo que se pueda calcular por medio de una fórmula matemática la dosis que provoca la muerte del 50% de los animales de estudio. Este valor o dosis de concentración letal 50 (DL_{50}), calculado por un procedimiento estadístico debe acompañarse siempre por límites de confianza, indicando la estimación del error en el valor obtenido.

La vía de administración preferencial es la oral. La vía percutánea (aplicación sobre la piel) y la vía respiratoria (inhalación) pueden también utilizarse. La duración del periodo de observación de los animales puede durar 24 a 48 horas, hasta 14 días.

Las especies con las que se realizan los estudios de toxicología aguda son el ratón y ocasionalmente el conejo. Después de administrar la sustancia tóxica a los animales, éstos deben ser examinados no solo para conocer los síntomas de intoxicación, la mortalidad o las posibles lesiones de los órganos mediante un examen macroscópico realizando una necropsia de los animales que no sobrevivieron durante el periodo de observación y de los animales sobrevivientes, sino también para conocer los efectos autónomos, centrales y de conducta. (Derache, 1990, Repetto, 1991; Shibamoto, 1996; Alvarado, 1999).



Por ejemplo, algunas de las observaciones que deben hacerse y que señalan toxicidad son las siguientes:

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

Los ensayos de toxicidad aguda aportan mucha información, especialmente al observador, el cual debe de identificar los síntomas de intoxicación. Pero estos ensayos tienen limitaciones, no es aconsejable dar excesiva importancia al cálculo de la DL_{50} , con el fin de observar un valor de extrema precisión, es solo una variable aleatoria que puede calcularse sin necesidad de sacrificar un número excesivo de animales, conservando así una ética científica. Por otro lado, los resultados obtenidos (efectos tóxicos) no indican los posibles efectos que se obtendrían después de una administración reiterada de la sustancia a estudiar. (Cheftel, 1989; Derache, 1990; Lu, 1995; Prior, 2004).

3.8 TOXICIDAD SUBAGUDA (SUBCRÓNICA)

La toxicidad subaguda o subcrónica es el conjunto de efectos observados después de una administración cotidiana, repetida o frecuente de una o varias dosis de la sustancia estudiada en un periodo alrededor del 10% del ciclo de vida del animal de experimentación. Las especies elegidas son generalmente ratas o ratones, pero también se utilizan otros animales como el perro o el mono.



La duración de los estudios no excede los 90 días, por lo general tienen una duración de 14 días hasta 3 meses. La dosis suele seleccionarse con base a la información obtenida de los estudios de toxicidad aguda. Por otro lado, en este tipo de estudio, además de los animales de experimentación, se ocupan animales control, los cuales no reciben el producto químico sometido a prueba, sino que únicamente se les proporciona el vehículo o excipiente en el cual se encontrará la sustancia a estudiar.

Su principal objetivo es determinar los posibles efectos acumulativos en los tejidos y sistemas metabólicos, proporcionando:

- κ Información sobre los efectos tóxicos principales de una sustancia y los órganos diana implicados.
- κ Indicaciones sobre la reversibilidad o irreversibilidad de los efectos, precisando si estos son acumulativos o retardados.
- κ Orientación para la elección de dosis que puedan utilizarse para los estudios a largo plazo o término.

Entre las observaciones a realizar, para evidenciar los efectos tóxicos potenciales de la sustancia en cuestión, se encuentran:

- a. Observaciones clínicas: incluyen el aspecto, la conducta o comportamiento y cualquier anomalía.
- b. Peso corporal y consumo de alimento: estos aspectos deben determinarse en base semanal. La pérdida de peso corporal es un índice simple aunque un indicador útil. Además una disminución marcada en el consumo de alimentos puede inducir efectos que limiten o empeoren las manifestaciones tóxicas del producto químico.
- c. Examen hematológico: suelen incluir el hematocrito, la hemoglobina, la cuenta de eritrocitos y la cuenta de leucocitos diferenciales.



En circunstancias especiales se hacen pruebas de funcionamiento hepático, renal y gastrointestinal, así como mediciones de la presión sanguínea y de la temperatura corporal. Al terminar el experimento en todos los animales se les práctica la autopsia, prestando atención a los cambios patológicos macroscópicos, incluyendo los cambios de peso de los principales órganos y glándulas (relación porcentual). (Alvarado, 1999; Álvarez, 2002; De la Hidalga, 2003; Lara, 2003; Ortiz, 2005).

3.9 ANÁLISIS DE LABORATORIO DURANTE LOS ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS

Se agrupan en este apartado el conjunto de análisis de laboratorio que pueden realizarse en la sangre y/o orina y/o en las heces en el transcurso de un estudio, independientemente de su duración. El número de parámetros medidos puede variar en función del tipo de estudio realizado, de su duración y de la especie utilizada. (Álvarez, 2002).

3.9.1 CITOMETRÍA HEMÁTICA. INDICES Y PARÁMETROS

El término citometría hemática (CH) se refiere a la medición de las células de la sangre (citos=célula, metros= medida, haematos= sangre), que es el estudio de laboratorio destinado a informar sobre el número y características de las células de la sangre. (Robinson, 1991; Alvarado, 1999; Álvarez, 2002).

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

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



La sangre es conducida a través de una densa red de arterias y venas a todas las partes del cuerpo, a excepción de los cabellos, uñas, cartílagos y córneas. Los eritrocitos contienen la proteína vital hemoglobina que se encarga del transporte de oxígeno y bióxido de carbono, los leucocitos se ocupan de la defensa contra antígenos extraños y las plaquetas son necesarias para la hemostasia o coagulación. (Alvarado, 1999; Lara, 2003).

La interpretación correcta de la CH supone el análisis detallado de cada uno de los datos que informa, los cuales pueden dividirse en tres grandes grupos: los correspondientes a la serie roja, la serie blanca y la serie trombocítica. (Shirlyn, 1991; Alvarado, 1999).

3.9.1.1 SERIE ROJA

La serie roja comprende los siguientes parámetros:

Hemoglobina (Hb) y definición de Anemia: la Hb se cuantifica en gramos por decilitro (g/dL) y representa la concentración de esta proteína por unidad de volumen. Este parámetro debe ser el único a emplear para definir si hay o no anemia, es decir, solo si las cifras de hemoglobina son inferiores a los valores normales puede asegurarse que existe anemia. Las cifras “normales” o de “referencia” de la hemoglobina son variables y depende de la edad, sexo, altura del sitio de residencia, etc. A la altura de la Ciudad de México (2240 metros sobre el nivel del mar), las cifras inferiores normales de hemoglobina en adultos sanos de 12.5 g/dL para mujeres y de 15.5 g/dL para varones.

Cualquier disminución en el número de eritrocitos o en su contenido hemoglobínico, más allá de los límites normales, se designa con el nombre de **Anemia**. Las anemias no complicadas que se observan con mayor frecuencia son 1) anemia por deficiencia de hierro, 2) anemia por hemorragia crónica, 3) anemia hemolítica debida a la destrucción interna de la sangre y 4) anemia hipoplástica o aplástica consecutiva a infecciones y otras causas.



La anemia por deficiencia de hierro se debe a la ingestión insuficiente de dicho elemento o bien a su utilización defectuosa, a pesar de que el aporte extrínseco sea adecuado. La anemia hemolítica obedece a la destrucción de eritrocitos en el interior de los vasos sanguíneos, puede ser causada por tóxicos o bien por infecciones de microorganismos. La anemia hipoplástica y aplástica son ocasionadas por depresión parcial o total del tejido hematopoyético de la médula ósea. (Coffin, 1986; Alvarado 1999; Álvarez, 2002).

Hematocrito (Hto): se mide en porcentaje (%) y representa la proporción de eritrocitos en el total de la sangre. Los valores normales del hematocrito dependen del sexo, de la edad y la altura del sitio de residencia. A nivel de la Ciudad de México, el hematocrito de referencia oscila entre 46 y 56% para varones y entre 39 y 50% para mujeres. Se calcula a partir de la medición del número de eritrocitos y del volumen globular medio.

Número de glóbulos rojos (Eri o GR): se mide en millones por microlitro ($10^6/\mu\text{L}$). Su valor normal depende de los factores señalados por otros parámetros eritrocíticos (Hb y Hto). Para la altura del altiplano mexicano los valores de referencia en adultos son: varones de 5 a $6.3 \times 10^6/\mu\text{L}$ y en mujeres de 4.1 a $5.1 \times 10^6/\mu\text{L}$.

Volumen globular medio (VGM): se mide en femtolitros (fL). Este índice eritrocítico, medido directamente en la citometría de flujo, es de gran valor en el esclarecimiento de la causa de una anemia. Los valores del VGM permiten saber si una anemia es macrocítica (VGM mayor a los límites normales) o microcítica (VGM menor a los límites normales que a la altura del altiplano mexicano es 83-98 fL para varones y de 78 a 103 fL para mujeres). Se encuentra en relación directa con la hemoglobina corpuscular media. Se le omite con frecuencia a causa de que requiere investigación adicional de laboratorio.

Hemoglobina corpuscular media (HCM): se expresa en picogramos (pg) y representa la cantidad promedio de hemoglobina en cada eritrocito. Mide la cantidad de hemoglobina existente en el eritrocito individual. A la altura de la Ciudad de México, los valores de referencia de la HCM son de 27 a 34 pg. Este índice debe ser el único que se emplee para referirse a la cantidad de hemoglobina contenida en cada eritrocito.



Concentración media de hemoglobina corpuscular (CCMH): este índice eritrocítico, medido como porcentaje (%), se determina dividiendo la hemoglobina (Hb) multiplicada por 100 entre el hematocrito (Hto). Es un dato de referencia menos útil e inexacto. Los valores de referencia de CCMH son de 32 a 34% para varones y de 30 a 34% para mujeres. La CCMH se halla generalmente reducida en las anemias consecutivas por pérdidas crónicas de sangre o deficiencia de hierro. (Ruiz, 1995; Alvarado 1999; Álvarez, 2002).

3.9.1.2 SERIE BLANCA

Los datos que la citometría hemática (CH) proporciona son:

Número de glóbulos blancos (GB o Leu): se mide en miles por microlitro ($10^3/\mu\text{L}$). El número de leucocitos depende de factores como la edad, peso, consumo de hormonas anticonceptivas, etc. Cuando los GB o Leu se encuentran por arriba del rango normal de referencia se habla de leucocitosis y cuando se encuentran por debajo se habla de leucopenia; hay muchas causas de leucocitosis, como infecciones agudas (neumonía, meningitis, apendicitis, amigdalitis), intoxicaciones metabólicas (acidosis) o envenenamiento por químicos o venenos, hemorragia aguda, entre otras. Dentro de las causas de leucopenia, pueden señalarse las infecciones bacterianas (septicemia, tuberculosis, tifoidea, etc.), infecciones virales y otras infecciones. Para adultos los valores de referencia oscilan entre 4 y $12 \times 10^3/\mu\text{L}$ (4000 a $12000/\mu\text{L}$).

La cuenta diferencial de las variedades de glóbulos blancos es de gran importancia en la CH. En sangre periférica pueden encontrarse los siguientes tipos de leucocitos: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos, monocitos y granulocitos.

Todo el sistema de leucocitos está diseñado para defender contra cuerpos extraños; sin embargo, cada uno de estos tipos de células, tienen diferentes funciones y pruebas actuales sugieren que cada una se comporta como un sistema relacionado por separado. (Shirlyn, 1991; Alvarado 1999; Álvarez, 2002).



3.9.1.3 SERIE TROMBOCÍTICA

Número de plaquetas (Plt): mide el número de plaquetas por microlitro de sangre. Las plaquetas también conocidas como trombocitos, son células pequeñas, anucleadas, de forma discoidal, que miden normalmente entre 2 a 4 μm de diámetro y cuya función es intervenir en la coagulación sanguínea. Las cifras de referencia de la cuenta plaquetaria se hallan entre 150 y $500 \times 10^3/\mu\text{L}$ (150000 a 500000/ μL).

Cuando la cuenta plaquetaria se encuentra por arriba de los rangos de referencia, se habla de trombocitosis, cuyas causas pueden ser: padecimientos malignos, anemia por deficiencia de hierro, infecciones agudas, etc. y cuando los valores se encuentran por debajo del rango normal se habla de trombocitopenia y sus causas pueden ser debido a anemias, leucemia aguda, transfusiones sanguíneas, medicamentos citotóxicos, etc. (Ruiz,1998; Alvarado 1999; Lara 2003).

La información de los valores de hematología que se han hecho con animales es esencial para la evaluación de su estado de salud. Los valores normales han sido determinados por investigadores en diferentes laboratorios y estos valores pueden variar significativamente. En la Tabla 4 se muestran los valores de citometría hemática promedio para algunos animales domésticos.



Tabla 4: Promedios normales de elementos celulares de la sangre en animales domésticos (Coffin, 1986; Álvarez 2002).

Parámetro	Ratón	Rata	Perro	Gato	Conejo	Mono
Eri ($10^6/\mu\text{L}$)	8-11	5-10	6.4-8	6.2-8	4.5-7	4.8-6.2
Hemoglobina (Hb) (g/dL)	12-16	15.6	12-17.8	8-13.8	10.4-15.6	11-14
Hemtocrito (Hto) (%)	35-48	50*	40-55	34-46	33-44	36-44
HCM (pg)	15-18	18-22	19-23	13-17	19.4-22.6	23-27
VGM (fL)	46-51	57-65	64-72	51-63	60-68	73-91
CCMH (%)	33-37	31.7-35.3	29.4-32.6	32-34	31.3-34.7	30-34
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	0.16-0.62	0.2-0.8	0.15-0.25	0.15-0.25	0.54*	---
Leucocitos (Leu) ($10^3/\mu\text{L}$)	7-14	8-15	6-20	8-35	4-13	8-25
Linfocitos (%)	55-80	50-80	10-30	20-40	30-50	44-74
Monocitos (%)	1-15	2-7	2-12	1-15	2-16	1-12

* Sólo se dispone de los valores promedio.

3.9.2 ENERGÍA DIGERIBLE

La estimación del contenido calórico en los alimentos o dietas es indispensable para estudios de metabolismo y balance de energía. Los nutrimentos se requieren en primera instancia para aportar la energía necesaria en el mantenimiento normal de las funciones vitales y deben de suministrar la energía para la actividad física diaria. Esta última es particular de cada individuo, es la más variable pues depende del trabajo y esfuerzo que desempeña el individuo diariamente y es la más difícil de estimar.



El valor energético o densidad calórica de los componentes de los alimentos se determina midiendo la energía liberada cuando la sustancia en cuestión se quema, en presencia de oxígeno, en la bomba calorimétrica, sin embargo, no toda la energía así estimada es fisiológicamente disponible, debido a que este dispositivo determina la energía liberada por la completa oxidación del alimento, mientras que en el cuerpo humano se realiza la oxidación en forma incompleta y por lo tanto deben de hacerse correcciones para compensar las pérdidas durante la digestión y por la oxidación incompleta. Por ejemplo, la proteína se quema en la bomba calorimétrica originando óxidos de nitrógeno, agua y dióxido de carbono, pero en el organismo el nitrógeno se elimina por la orina en forma de urea, que todavía contiene energía combustible.

Por lo tanto se puede asumir que la energía determinada en la bomba calorimétrica, da el máximo potencial energético de un alimento (calor de combustión), que por convención se conoce como "Energía Gruesa (EG) o bruta". El principio en el cual se basa la determinación del contenido calórico en la bomba calorimétrica es en la primera Ley de la Termodinámica, la cual se fundamenta en el siguiente enunciado: " La energía en cualquier proceso físico o químico no se crea ni se destruye". Con base en el principio anterior, la energía en un sistema se puede transformar; por lo tanto la energía total será la suma de las energías parciales. En el caso de la bomba calorimétrica, hay una conversión de la energía química en energía térmica, la cual se detecta por el cambio de temperatura. (Miller, 1959 ; Southgate, 1981; Álvarez, 2002).

Generalmente las grasas se digieren un 90% aproximadamente y los hidratos de carbono y proteínas un 95%. Una vez que se han establecido estos factores para la proteína, grasas e hidratos de carbonos, se admite que pueden aplicarse a alimentos complejos, pero existen pruebas de que ello no siempre es así y de que el análisis químico de los alimentos, junto con el cálculo apropiado de conversión calórico, proporcionan una estimación aproximada del valor energético del alimento. (Álvarez, 2002).



4. Metodología

4.1. Diagrama General de Investigación

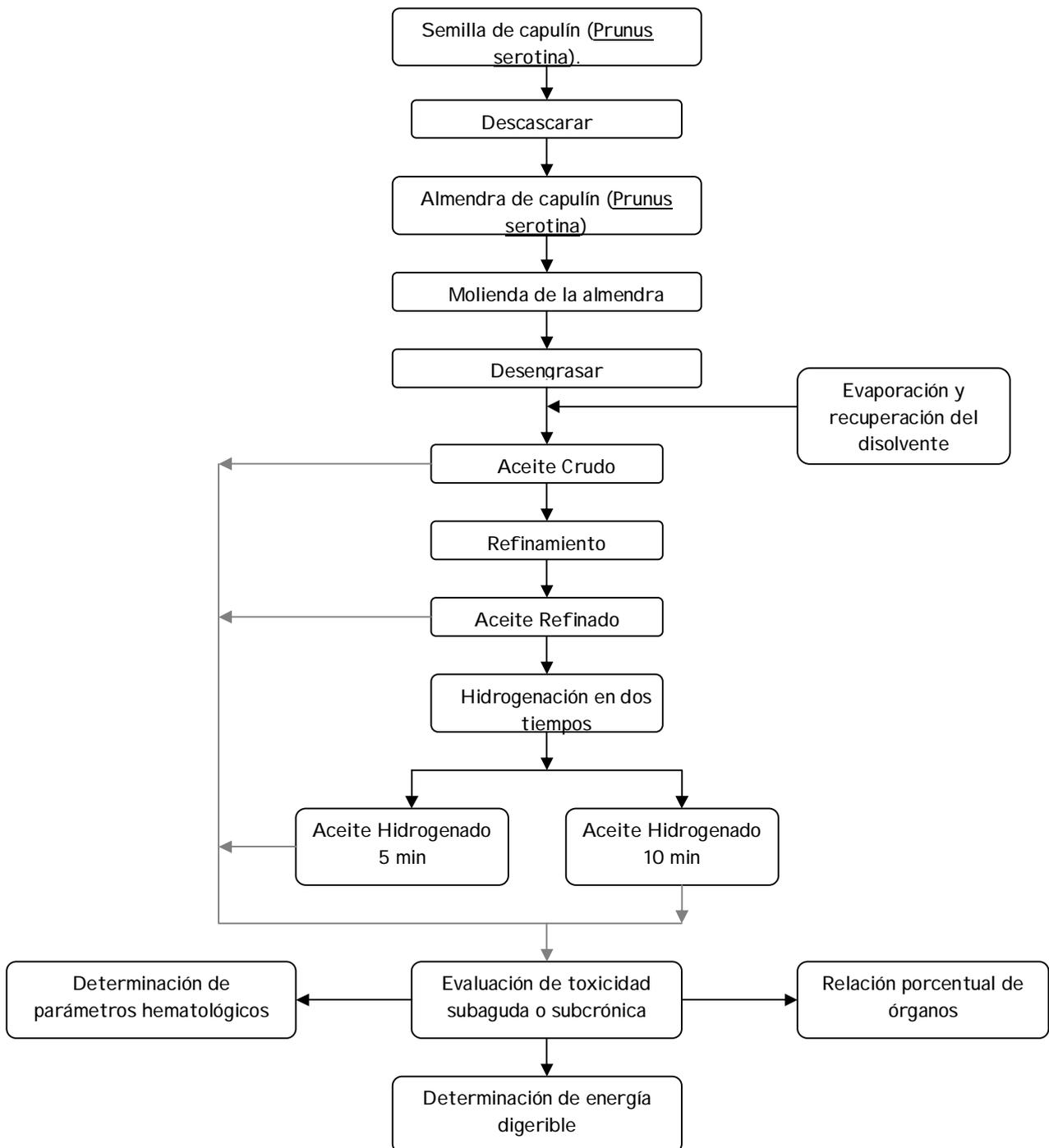


Figura 6: Diagrama general de trabajo



4.2 DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA

A continuación se describen cada uno de los bloques del diagrama de trabajo.

4.2.1 ORIGEN DE LA SEMILLA

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

Contando con suficiente semilla de capulín, se procedió a seleccionar la semilla para eliminar cualquier material extraño, así como aquellas semillas dañadas física y biológicamente. Las semillas seleccionadas se almacenaron en un recipiente debidamente identificado.

4.2.2 DESCASCARADO Y MOLIENDA

Fundamento:

Obtener la almendra por un método manual y mecánico, con el fin de tener la mayor cantidad de materia prima (almendra) necesarias para efectuar la extracción.

Equipo:

- * Molino Thomas Wiley mod. 4

Material:

- * Pistilo o Martillo
- * Franela

Procedimiento:

Se colocaron un par de puños de las semillas sobre una franela, para después golpearlas suavemente sobre una base fija con el pistilo o el martillo con el fin de romper la cáscara y obtener la almendra entera. Posteriormente se recolectó la almendra y la cáscara fue desechada.

La almendra entera obtenida fue molida en un molino mecánico, hasta obtener la almendra fraccionada, utilizando una malla con tamaño de partícula de 3 mm.



4.2.3 MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE LA GRASA (Desengrasado de la almendra)

Fundamento:

Las grasas vegetales se obtienen extrayendo el aceite con solventes. En este proceso el aceite se extrae con hexano que después se separará del aceite y será reutilizado. Debido a su alta volatilidad, en el aceite final no queda resto alguno de hexano. (Ziller, 1996; Prior 2004).

Equipo:

- * Dispositivo de extracción Soxhlet

Material:

- * Almendra fraccionada (aprox. 1 kg)
- * Hexano grado Q.P (2 galones aprox.)

Procedimiento:

Se montó un dispositivo (Fig.7) que permitió trabajar con 1 kg de almendras fraccionadas aproximadamente, extrayendo el aceite con hexano Q.P.

Las almendras fraccionadas y pesadas fueron colocadas en un cartucho de tela y posteriormente éste fue colocado en el extractor.

Se conectó un matraz de bola con piedras de ebullición al extractor y éste a un refrigerante. Se agregó hexano por el refrigerante hasta llegar un poco más de la mitad del matraz bola. Posteriormente se calentó el matraz bola el cual contenía el hexano, por medio de una canastilla de calentamiento, controlando la temperatura por medio de un termostato (60-70°C). El dispositivo se dejó en reflujo durante 15 horas por tres días, con la temperatura antes mencionada. Para verificar que se había extraído todo el aceite, se dejó caer una gota de la descarga sobre un papel filtro, al evaporarse el hexano no debía aparecer residuo del aceite.

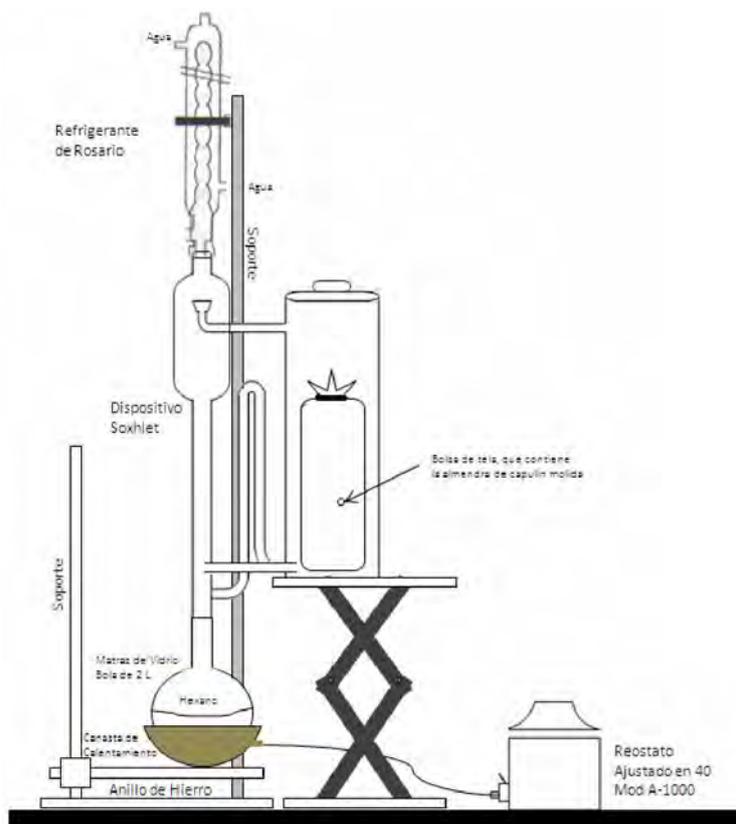


Figura 7 : Dispositivo de extracción (Soxhlet)

4.2.4 REFINACIÓN DEL ACEITE

Fundamento:

Los aceites y grasas crudas contienen cantidades variables de sustancias, que pueden proporcionarles 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 (carotenos y clorofila), los productos de oxidación de las grasas, etc. Los aceites y grasas crudas se someten a procesos comerciales de refinado diseñados para eliminar sustancias y ser adecuados organolépticamente. (Ziller, 1996; Álvarez 2002).

En el proceso de refinación se **siguen principalmente 3 pasos**: desgomado, neutralización y blanqueo. Se puede tener como paso **adicional** en el proceso de refinación el filtrado, el cual se realiza antes del proceso de desgomado y posterior a la extracción del aceite.



4.2.4.1 FILTRACIÓN

Fundamento:

La filtración puede definirse como la separación de uno o más elementos sólidos de un elemento fluido (líquido o gas), mediante el paso de la mezcla a través de un elemento poroso filtrante, llamado filtro; o bien es un proceso en el cual un fluido pasa sobre un material (medio filtrante o filtro) que permite la separación de los contaminantes de éste, obteniendo así una solución más limpia y fácil de reutilizar.

El medio filtrante actúa como una barrera que permitirá dejar pasar al fluido, mientras que retiene los sólidos suspendidos. Este medio realiza una separación selectiva, ya que ciertas sustancias pueden atravesarla, mientras que otras quedan atrapadas en ella. La filtración se lleva a cabo a menudo por medio de un embudo Buchner, siendo el líquido succionado a través de la fina capa de partículas mediante una fuente de vacío; en casos aún más sencillos, la suspensión es vertida en un embudo cónico provisto de un papel de filtro.

Equipos

- * Rotavapor (Büchi RE 111 Con Water Batch 461)
- * Estufa con corriente de aire

Material y Reactivos:

- * Aceite crudo extraído de la almendra de capulín
- * Embudo de vidrio
- * Papel filtro Whatman # 40
- * Soporte Universal con anillo metálico



Procedimiento:

Este paso adicional en el proceso de refinación, se realizó después de haberse extraído el aceite de la almendra de capulín (dejándolo enfriar a temperatura ambiente), el cual se encontraba en el matraz bola del dispositivo Soxhlet (Fig. 7). Este aceite es filtrado (usando papel filtro localizado en el embudo de vidrio y este a su vez en el anillo metálico) para la eliminación de material extraño que se pudiera encontrar en él y colocado en un nuevo matraz bola.

Subsecuentemente este aceite se colocó en el rotavapor para la eliminación del hexano a una temperatura aproximadamente de 77.79°C/presión reducida. Por último el aceite se colocó en una estufa con circulación de aire aproximadamente a una temperatura de 55-60°C e inmediatamente se le insufló nitrógeno y fue almacenado en congelación, para evitar su oxidación.

Este aceite el cual fue filtrado y al cual se le ha eliminado el hexano, corresponderá al “aceite crudo” del material biológico de estudio.

4.2.4.2 DESGOMADO

Fundamento:

Consiste en la eliminación de diversos compuestos que son solubles en el aceite (ver Antecedentes apartado Desgomado) como proteínas, fosfolípidos, hidratos de carbono, gomas o sustancias mucilaginosas y que se eliminan por precipitación por medio de una simple hidratación con adición de un ácido (cítrico o fosfórico), calor y agitación. Al agitar las sustancias se hidratan y flocculan formando una goma mucilaginosa insoluble en el aceite. Estas se dejan sedimentar y después se separan del aceite por centrifugación. La cantidad de los reactivos que se utilizan, está en relación a la cantidad de aceite que se somete a este proceso. (Álvarez, 2002; Prior, 2004



Material y Reactivos:

- * Balanza analítica
- * Centrífuga (Eppendorf Centrifuge 5702)
- * H_3PO_4 al 1% (v/v)
- * Matraz Erlenmeyer
- * Parrilla de calentamiento y agitación múltiple THERMOLYNE mod. SP-13025
- * Pipetas Pasteur

Procedimiento:

- κ Determinar previamente el volumen del aceite a refinar, el cual será el volumen de referencia (100%). Esto se realiza al pesar un matraz Erlenmeyer en la balanza analítica y posteriormente tabularlo, una vez tabulado se coloca una porción del aceite y se tabula nuevamente. Finalmente se determina el peso del aceite.
- κ Mezclar en el matraz Erlenmeyer el aceite con H_3PO_4 al 1% (v/v) en una proporción del 3% con respecto al volumen de referencia (100%) del aceite a refinar.
- κ Calentar la mezcla en la parrilla de calentamiento a 60°C durante 5 minutos con agitación.
- κ Centrifugar a 2400 r.p.m a temperatura ambiente (el aceite se deja enfriar hasta alcanzar esta temperatura antes de llevar a cabo la centrifugación) durante 15 minutos para precipitar los residuos del desgomado. Esta operación se realiza cuantas veces sea necesario, hasta que ya no observar residuos.
- κ Recuperar el aceite por decantación o bien colectando el aceite con pipetas Pasteur.



4.2.4.3 NEUTRALIZADO

Fundamento:

Se efectúa básicamente para neutralizar los ácidos grasos libres que contienen los aceites, pero también neutraliza los monoglicéridos, los fosfolípidos y los agentes quelantes que pudieran quedar del desgomado, así como los hidratos de carbono, resinas, metales y proteínas. El aceite se mezcla con sosa cáustica y calentamiento, convirtiendo los ácidos grasos en jabones solubles en agua. La solución jabonosa se separa entonces del aceite por sedimentación o por centrifugación. El jabón acumulado es removido por medio de los lavados de agua caliente. El agua de lavado se separa del aceite también por sedimentación o centrifugación. (Ziller 1996, Álvarez, 2002, Prior, 2004).

Material y Reactivos:

- * Agitador de vidrio
- * Agua destilada
- * Balanza analítica
- * Centrífuga (Eppendorf Centrifuge 5702)
- * Matraz Erlenmeyer
- * NaOH al 15%
- * Potenciómetro (CORNING mod 430)
- * Parrilla de calentamiento y agitación (THERMOLYNE mod SP-1305)
- * Pipeta Pasteur

Procedimiento:

- κ Colocar el aceite previamente desgomado en un matraz Erlenmeyer
- κ Colocar el matraz con el aceite en una parrilla de agitación
- κ Calibrar previamente el potenciómetro
- κ Realizar la lectura del pH del aceite
- κ Con una pipeta Pasteur añadir NaOH al 15% hasta obtener un pH neutro ($\text{pH} \approx 7$). Se recomienda realizar este paso lentamente, gota por gota para evitar un aumento de pH.



-
- κ Colocar el matraz con el aceite neutro en una parrilla de calentamiento y calentar la mezcla a 50°C durante 5 minutos.
 - κ Centrifugar a 2400 r.p.m a temperatura ambiente (el aceite se deja enfriar hasta alcanzar esta temperatura antes de llevar a cabo la centrifugación) durante 20 minutos. Repetir este paso cuantas veces sea necesario hasta ya no observar residuos.
 - κ Determinar previamente el volumen del aceite, el cual será ahora el nuevo volumen de referencia (100%) para el siguiente paso de la neutralización . Esto se realiza al pesar un matraz Erlenmeyer en la balanza analítica y posteriormente tabularlo, una vez tabulado se coloca una porción del aceite y se tabula nuevamente. Finalmente se determina el peso del aceite.
 - κ Mezclar el aceite con agua destilada en una proporción del 10% con respecto al volumen de referencia (100%) del aceite que ha sido previamente neutralizado y centrifugado. Calentar la mezcla a 80°C durante 5 minutos por medio de una parrilla de calentamiento.
 - κ Centrifugar a 2400 r.p.m a temperatura ambiente (el aceite se deja enfriar hasta alcanzar esta temperatura antes de llevar a cabo la centrifugación) por 25 minutos. Repetir esta operación hasta observar residuos de agua.

4.2.4.4 BLANQUEO

Fundamento:

El blanqueo se realiza después de la neutralización de los aceites para eliminar las sustancias que le imparten un determinado color tales como la clorofila, pero también sirve para remover trazas de metales, jabones y productos de la oxidación. La eliminación completa de los colorantes puede llevarse a cabo calentando el aceite y tratándolo con absorbentes, como el carbón activado y tierras diatomeas. (Ziller, 1996; Álvarez, 2002; Prior, 2004).



Material y reactivos:

- * Carbón activado
- * Embudo de filtración STM por medio "M"
- * Matraz Erlenmeyer
- * Matraz Kitasato y embudo Buchner
- * Rotavapor (Büchi RE 111 Con Water Batch 461)
- * Papel filtro Whatman #40
- * Tierras activadas o de blanqueo pesadas

Procedimiento:

- κ Mezclar el aceite con las tierras de blanqueo pesadas en una proporción del 5% con respecto al volumen de referencia (100%) y posteriormente agregar carbón activado en una proporción del 0.3% con respecto al volumen de referencia (100%) (volumen del aceite que se obtiene después de la neutralización).
- κ Calentar a una temperatura de 90°C en rotavapor durante 15 minutos. Este paso se realiza al vacío debido a que debe evitarse la acción de O₂ que produce pardeamientos.
- κ Filtrar al vacío con doble papel Whatman #40 con el embudo Buchner y matraz Kitasato.
- κ Una vez filtrado volver a filtrar al vacío con el embudo de filtración STM poro "M" y matraz Kitasato.
- κ Repetir el proceso de decoloración en caso de que permanezca color en el aceite.
- κ Filtrar las veces que sean necesarias hasta ya no tener partículas de carbón activado en el aceite.



4.2.5 HIDROGENACIÓN

Fundamento:

La hidrogenación consiste en convertir aceites líquidos en grasas sólidas o semifluidas; sin embargo, también con este proceso se logran otros propósitos, dentro de los cuales se incluye asegurar la estabilidad del producto, así como el mejoramiento del color de la grasa; además, para el caso de la grasa de la almendra de capulín, tendrá el propósito de eliminar o disminuir la cantidad significativa de ácido erúxico que contiene. (Keilensy Hendrix, 1996; Barbosa, 2003; Prior, 2004).

En el presente trabajo no se realizó este proceso en el aceite refinado obtenido, debido a que había cantidad suficiente de aceite hidrogenado en dos tiempos, aceite hidrogenado de 5 minutos y aceite hidrogenado de 10 minutos, generado en un trabajo anterior. Pero el proceso de hidrogenación que se realizó en este trabajo anterior, utilizó el mismo lote de semillas de capulín que se utilizaron durante la realización de la presente determinación de toxicidad subcrónica. La hidrogenación realizada en el trabajo anterior será descrita en los siguientes párrafos.

Material y reactivos:

- * Acetato de etilo (R.A) (1 Galón)
- * Catalizador Pd/C al 5% (Aldrich No. 596)
- * Embudo Buchner de diámetro mediano
- * Embudo de vidrio de filtración de poro fino "F"
- * Hidrogenador Parr mod. 391
- * Matraces Erlenmeyer 500 mL
- * Matraces de bola
- * Papel filtro (Whatman #40 y 44)
- * Reactor (Botellas de reacción de vidrio grueso 250 mL)
- * Rotavapor (Büchi RE 111 Con Water Batch 461)
- * Tanque de nitrógeno comprimido
- * Tanque de hidrógeno purificado 99.99%



Procedimiento:

La hidrogenación se realizó dividiendo en lotes el aceite refinado de acuerdo a la cantidad que se obtuvo, para que así el catalizador Pd/C actuara de manera más eficiente en la superficie de contacto. Se colocaron 25 g de aceite refinado por cada lote, los cuales se pesaron directamente en el vaso de reacción, el cual tenía que estar limpio y seco. Se adicionaron 200 mL de acetato de etilo bajo atmósfera de nitrógeno y con el mayor cuidado posible, se colocó el 5% del catalizador Pd/C de acuerdo a la cantidad de aceite pesado. El catalizador se pesó sobre papel cera y una vez vertido el catalizador en el vaso de reacción, se enjuagó el papel utilizado en la tarja con agua corriente para evitar una posible reacción (se debe tener cuidado de no tirar el catalizador al pesarlo y al colocarlo en el vaso de reacción debido a que es muy flamable; en caso de que esto sucediera, se contaba con un trapo húmedo para limpiar el catalizador e inmediatamente poner en contacto con el agua para evitar la reacción; evitar de igual manera el contacto sobre la piel, en caso de tener contacto lavar inmediatamente).

Se cubrió la boca del vaso de reacción para impedir la entrada de oxígeno; posteriormente se colocó el vaso de reacción en el soporte del hidrogenador después de haberlo tapado herméticamente con el tapón de hule que contiene el tubo que suministra el hidrógeno, se colocó la chaqueta de protección, sujetándola con 2 bandas de contacto al tubo del columpio para evitar cualquier inestabilidad del reactor.

Una vez montado el equipo se abrió el tanque de hidrógeno hasta que el primer manómetro llegó a una presión de 90 lb/in², manteniéndose esta presión, se abrió la primera llave de paso (la cual está conectada con el vaso de reacción) hasta alcanzar una presión de 60lb/in² (esta lectura se verificó en un segundo manómetro) manteniéndolo constante, después de abrir la segunda llave de paso, se dejó pasar el hidrógeno al vaso de reacción hasta que la presión del segundo manómetro disminuyera a 40lb/in², en este momento se cerró la segunda llave de paso y se abrió de nuevo la primera llave con el fin de alcanzar de nuevo la presión de 60 lb/in².



Este procedimiento se llevó a cabo dos veces más, para asegurar que el vaso de reacción contenía suficiente hidrógeno para comenzar con la hidrogenación.

Teniendo todo listo, el manómetro de la primera llave debía marcar 60 lb/in² y abierta la segunda llave de paso en el momento de la hidrogenación, se encendió el equipo, tomando el tiempo en que se inició la hidrogenación y registrando el consumo de hidrógeno, por medio de la lectura de la presión que marcaba el manómetro en contacto con el vaso de reacción, efectuando la hidrogenación a diferentes tiempos. La hidrogenación total se presentó cuando ya no se observó disminución de la presión en el manómetro, lo cual indicaba que no había más consumo de hidrógeno. Terminando los tiempos seleccionados para la hidrogenación (5 y 10 minutos) se apagó el equipo, se abrió la llave de vacío para eliminar el hidrogeno que no se consumió dentro del vaso de reacción y se cerró el tanque de hidrógeno quitando las tiras de contacto junto con la chaqueta de protección y finalmente se retiró el tapón de hule del frasco.

En caso de que estuviera muy caliente el vaso de reacción, este se deja enfriar (no demasiado). El aceite que se obtuvo se filtró al vacío casi inmediatamente para eliminar el catalizador con un embudo Buchner de diámetro mediano utilizando hasta 3 o 4 capas de papel filtro del número 40 y 44, en caso de que no se cuente con estos números de papel filtro, se utiliza un embudo de poro fino.

Los residuos que se encontraban dentro del vaso de reacción se enjuagaron con acetato de etilo.

Es necesario realizar aunque sea la primera filtración de manera rápida y en caliente, pero recuperando todo el aceite y enjuagando perfectamente el vaso de reacción para poder continuar con los siguientes lotes.



Si el aceite se enfría demasiado (esto puede ocurrir a temperatura ambiente) es muy probable que este se vuelva una grasa sólida y quede retenido en el papel filtro, en el vaso de reacción o en su caso en el matraz Erlenmeyer después de filtrar, representando una pérdida de grasa, por lo que es necesario calentar el recipiente en baño María a 70°C hasta que este de nuevo líquido o se puede colocar acetato de etilo previamente calentado cada vez que sea necesario para enjuagar los residuos de grasa sólidos y el catalizador de las paredes del vaso o matraz después de cada filtración, de esta manera se evita pérdida de grasa. También puede realizarse el calentamiento directamente en la parilla pero con mucho cuidado e inmediatamente filtrar.

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

Para evitar pérdidas de grasa durante la filtración al vacío se recomienda utilizar solo dos matraces Erlenmeyer y enjuagar como lo indica el párrafo anterior. Repetir las filtraciones que sean necesarias hasta observar que ya no hay residuos del catalizador, aunque se observen estos muy pequeños; las filtraciones se realizaron al vacío con un embudo de vidrio de poro fino "F", adaptando el embudo al matraz utilizando a su vez papel filtro del mismo número, utilizado para las filtraciones anteriores, para así eliminar completamente los residuos del catalizador o alguna otra impureza presente. Una vez que no hay presencia del catalizador, se recuperó el disolvente en un rotavapor a una temperatura de 70°C a presión reducida de acuerdo a la temperatura del acetato de etilo (56.9°C).

Se recomienda considerar la grasa que se sometió a la hidrogenación para elegir el tamaño del matraz bola, así como también hacerlo por pequeñas fracciones de volumen total para poder eliminar completamente el disolvente.



Una vez eliminado el disolvente se deja el matraz bola aproximadamente 2 horas en la campana para eliminar el resto del disolvente. El volumen final del disolvente no afecta a la cantidad de grasa, además de que se debe de considerar la cantidad de disolvente adecuada para todo el proceso.

Para evitar las pérdidas por trasvasar la grasa, se recomienda dejar la grasa en el mismo matraz bola en donde se recuperó y si este no se utiliza de inmediato se le puede insuflar nitrógeno y mantenerlo en congelación hasta su uso. (Prior, 2004).

4.2.6 EVALUACIÓN BIOLÓGICA

4.2.6.1. PRUEBA DE TOXICIDAD SUBCRÓNICA O SUBAGUDA

Fundamento:

La toxicidad subaguda es el conjunto de efectos observados después de una administración cotidiana repetida o frecuente de una o varias dosis de la sustancia estudiada. (Derache, 1990, Shibamoto, 1996; Álvarez 2002).

Con los diferentes preparados de la grasa cruda, refinada e hidrogenada de la almendra de capulín se realizó el bioensayos de toxicidad subcrónica, para lo cual se utilizaron ratones macho de aproximadamente 18-20 g de peso corporal y se les administró por vía oral una dosis relativamente alta que permitiera determinar, que de no presentarse efectos adversos, que el material de ensayo se considere como prácticamente no tóxico o relativamente inocuo. (Lansdown, 1993; Klassen et al 1995; Prior 2004).

Materiales y reactivos:

- * Aceite de girasol (marca Patrona)
- * Balanza granataria (OHAU) para animales de laboratorio
- * Balanza analítica (OHAU) para pesar el alimento
- * Desecador con atmósfera de éter etílico para anestesiarse
- * Estuche de disección de acero inoxidable (para realizar la necropsia)
- * Equipo automatizado (Micros 60 Horiba ABX Diagnostic) para citometría hemática.



-
- * Horno LAB-LINE Imperial III Radiant Heat Oven
 - * Microtainer brand tubes con EDTA (Becton Dickinson Vacutainer No. 365973).
 - * Pellet (alimento para roedores de la marca Harlan (Ver Anexo 1))
 - * Rack de jaulas de acero inoxidable con comederos y bebederos
 - * Ratones machos de la cepa CD-1 de 3-4 semanas de edad de 18-20 g
 - * Tubos capilares heparinizados.

Procedimiento:

⌘ Condiciones:

Dosis: 15g/Kg de peso corporal (p.c)

Duración del bioensayo: 28 días

Lote control: Aceite de girasol como fuente de lípidos

a. Selección de la especie:

Para los estudios de toxicidad generalmente se eligen ratones por su fácil manipulación, además de que son económicos y se consiguen con facilidad. Para el estudio se ocuparon ratones macho de la cepa CD-1 de 3-4 semanas de edad de 18-20 g de peso corporal (p.c), a fin de observar su crecimiento durante el bioensayo.

b. Dosificación:

En este estudio se realizó la administración de una dosis de 15g/kg de p.c la cual se encuentra entre los límites de una sustancia que se considera como prácticamente no tóxica, pero a la vez se encuentra entre los límites de una sustancia que se considera como ligeramente tóxica (ver Tabla 3).

Además de que en un estudio previo, se utilizó esta dosis para la determinación de la toxicidad aguda del ácido erúico presente en el aceite de la almendra de capulín en sus diferentes preparados, resultando que no producía toxicidad alguna; por lo que para comprobar este hecho por medio de la toxicidad subcrónica se utilizó esta misma dosis.



Como ya se mencionó para la dosificación se utilizó una dosis de 15 g/kg de p.c y se sabe de estudios previos (De la Hidalga, 2003; Ortiz 2005) que ratones con características similares consumen aproximadamente 5.52g de alimento/día, por lo que tomando en cuenta la dosis a emplear y las consideraciones de estudios previos se realizaron los siguientes cálculos:

∞ Determinación del consumo del animal: (Ortiz, 2005)

Peso Promedio del Ratón: 21.6 g

Tabla 5: Promedio del consumo del alimento del ratón por semana mostrando su peso promedio

Semana	Alimento Ingerido (g)	Peso (g)
1	6.25	25.37
2	5.53	28.25
3	5.27	28.1
4	5.03	29.42

Por lo tanto si obtenemos el promedio del alimento ingerido por semana podemos decir que se consume aproximadamente 5.52 g de alimento/día.

Ahora bien sabemos que la dosis a estudiar es de 15g/kg de p.c y tomando en cuenta el peso promedio del ratón, así como el alimento ingerido en la primera semana que se muestra en la tabla 5 se tiene que:

$$\left(\frac{15 \text{ g de concentrado de aceite}}{1000 \text{ g ratón}} \right) \times 25.37 \text{ g ratón} = 0.3805 \text{ g de concentrado de aceite}$$
$$\left(\frac{0.3805 \text{ g de concentrado de aceite}}{6.25 \text{ g de alimento ingerido}} \right) = 0.3805 \text{ g de concentrado de aceite} / 6.25 \text{ g alimento ingerido}$$

Este último resultado equivale al 6% de concentrado de aceite en la primera semana del bioensayo del estudio previo, por lo tanto si realizamos el cálculo anterior para los siguientes datos se tiene que:



Tabla 6: Promedio del concentrado del aceite en las semanas en las que se realizó el bioensayo tomando en cuenta el alimento ingerido y el peso de cada ratón

Semana	Alimento Ingerido (g)	Peso (g)	Concentrado del aceite (%)
1	6.25	25.37	6
2	5.53	28.25	7.66
3	5.27	28.1	7.99
4	5.03	29.42	8.77

Con el resultado de los concentrados de aceite que se tenía en el alimento ingerido por el ratón, se observó que si se obtiene el promedio de este concentrado se encuentra que se tiene un porcentaje del 7.6 % del concentrado del aceite.

Por lo tanto se incorporaron 76 g del concentrado del aceite de la almendra de capulín en sus diferentes preparados (crudo, refinado e hidrogenado) en 924 g de la harina de pellets que se utilizó como medio de administración. De esta manera se prepararon las muestras para cada uno de los preparados del aceite de la almendra de capulín (crudo, refinado e hidrogenado).

Pero se tomó en cuenta otra consideración; se sabe que el consumo del alimento por el animal es de 5.52 g por día y el experimentó duró 28 días entonces: por lo tanto se necesitan 927.36 g de alimento por cada 6 ratón (que es la cantidad de ratones que se tiene por lote); este valor se obtiene de la siguiente forma:

$$\left(\frac{5.52g \text{ alimento ingerido}}{\text{día}} \right) \times 28 \text{ días} = 154.56g \text{ alimento ingerido}$$

$$154.56g \text{ alimento ingerido} \times 6 \text{ ratones por lote} = 927.36g \text{ de alimento ingerido de 6 ratones}$$

Pero además se supone que hay un desperdicio del 15%, por lo tanto para conocer cuánto se necesita de la harina de pellet, se realiza el siguiente cálculo:



$(927.36 \text{ g de alimento ingerido de 6 ratones}) (15\% \text{ desperdicio}) = 139.10 \text{ g de alimento desperdicio}$

$927.36 \text{ g alimento ingerido de 6 ratones} + 139.10 \text{ g alimento de desperdicio} = 1066.46 \text{ g de alimento ingerido / 6 ratones}$

Al tomar en cuenta esta última consideración se incorporan 81g de concentrado del aceite de la almendra de capulín en sus diferentes preparados (crudo, refinado e hidrogenado) en 985.46 g de la harina de pellet, que como ya se mencionó es el medio de dilución o vehículo para la ingesta de dichos preparados.

c. Preparación de la muestra:

En la administración oral se utiliza comúnmente una sonda esofágica, pero para periodos largos resulta ser estresante para el animal, por lo que la administración se dio por vía oral pero utilizando pellets (alimento para ratones utilizado en el bioterio.)

Para la elaboración de la muestra se utilizaron pellets de composición conocida (Anexo 2), los cuales se molieron finamente y se mezclaron con el aceite de la almendra de capulín en sus diferentes preparados (crudo, refinado e hidrogenado) según la dosis a emplear y de acuerdo a los cálculos antes mencionados, adicionando la cantidad de agua necesaria para formar una pasta y de este modo volver a elaborar los pellets.

En el caso de los aceites hidrogenados los cuales están en estado sólido, fue necesario atemperarlos (baño María) a una temperatura de 50°C, para posteriormente realizar el proceso de elaboración de los pellets antes descrito.

Posteriormente los pellets se secan a una temperatura de 50-60°C durante toda la noche o hasta que se observara que estaban completamente secos (consistencia dura), dejándolos enfriar, para después guardarlos en un frasco.

De igual manera se prepararon pellets control con aceite de girasol en una dosis de 15 g/Kg de p.c (p.c=peso corporal), dado que cuando se esta probando un aceite o cualquier otra sustancia, es importante utilizar un control que sea parecida a la sustancia de estudio.



d. Distribución de los animales:

- κ Los ratones se pesan de forma individual, lo que equivale al peso inicial (P_i).
- κ Se distribuyen de manera adecuada para que entre los lotes el peso de los ratones sea lo más uniforme posible, haciendo uso de la distribución de la “culebra japonesa” (Figura 8). Colocando como mínimo 6 ratones por lote de preparado de aceite (control, crudo, refinado e hidrogenado) en su respectiva jaula.

	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5
	18.0	18.2	18.2	18.5	18.5
	18.5	18.5	18.5	18.5	18.5
	18.5	18.6	18.8	18.8	18.9
	19.5	19.5	19.3	19.3	19.1

Figura 9: Ejemplo de distribución de animales conforme a su peso de acuerdo al método de la “Culebra japonesa”.

e. Administración de las muestras de estudio y observaciones:

- κ Se pesa y se suministra la ración de pellets a cada animal. Ya que estos animales tienden a desperdiciar alimento, se colocó una charola de papel Manila debajo de su respectiva jaula con el fin de recuperar el alimento.
- κ Se administra agua *ad libitum* y se cambia cada semana el agua de los bebederos.
- κ Se pesa el alimento y los ratones 3 veces por semana durante los 28 días del bioensayo. Para llevar un control adecuado de los datos se utiliza una hoja de control (Fig. 10).
- κ El último día del ensayo se pesan los ratones, lo cual corresponde en la hoja de control al peso final (P_f).



κ Por medio de las hojas control (Fig. 10) se puede obtener la ganancia en peso y el alimento consumido, los cuales nos indicarán la influencia que tiene la muestra de estudio sobre estos parámetros, al realizar las siguientes ecuaciones:

$$\text{Ganancia en peso} = \text{Peso final} (P_f) (g) - \text{Peso inicial} (P_i) (g)$$

$$\text{Alimento consumido} = \text{Alimento consumido en todo el experimento}$$

Rata:	Sexo:	Peso Inicial:	Dieta:	Fecha:				
Tiempo (días)	2	4	6	8	10	12	14	Final
Peso Animal ($P_{\text{día}}$)								Pf=
Incremento Acumulativo ($P_{\text{día}}-P_i$)								Pi-Pf=
Alimento Inicial (I)								
Alimento Final (F)								
Alimento Ingerido ($AI=I-F$)								ΣAI=
Alimento Acumulativo								
Observaciones:								

Figura 10 : Hoja control para el seguimiento de toxicidad subcrónica

Los animales y el alimento se pesaron tres veces por semana y se llevó el registro de los datos obtenidos en la hoja control durante todo el estudio. Al finalizar el estudio se elaboraron gráficas de incremento acumulativo y consumo de alimento, así como también se realizó un análisis estadístico entre los lotes para determinar si existía diferencia significativa. Este análisis estadístico se realizó por medio de un programa de computo llamado SPSS 10 for Windows (Production Facility).



4.2.6.2. CITOMETRÍA HEMÁTICA:

Fundamento:

La citometría hemática es el estudio de laboratorio destinado a informar sobre el número y las características de las células de la sangre. La interpretación de la citometría hemática supone el análisis detallado de cada uno de los datos que informa, los cuales pueden dividirse en tres grupos: datos de la serie roja, de la serie blanca y de la serie trombocítica. (Ruiz, 1995; Álvarez 2002).

Procedimiento:

Al final del ensayo se realizó la citometría hemática a cada animal de experimentación. La sangre se obtuvo mediante un sangrado ocular; para lo cual se anestesió al animal introduciéndolo en un desecador en cuyo interior se colocó algodón impregnado de éter etílico. Una vez anestesiado, se sujetó con una mano y con la otra se le introdujo un tubo capilar heparinizado en la parte posterior del ojo del ratón, se comenzó hacer una ligera presión y se giró suavemente el capilar, colectando la sangre en un tubo Microtiner el cual contenía EDTA (se requieren alrededor de 250 -500 μ L de sangre). Es importante que al recolectar la sangre se gire el tubo suavemente para evitar la formación de coágulos. Las muestras recolectadas fueron procesadas en un equipo automatizado marca Micros 60 Horiba ABX, obteniendo así los parámetros hematológicos.

Las muestras colectadas fueron analizadas con el apoyo de la Dra. Adriana Ruiz (Jefa de Sección del área de Hematología del Hospital Gabriel Mancera del IMSS), la cual nos proporcionó algunos parámetros en los que se basan en el laboratorio, es decir, para el caso de la serie blanca, de la serie trombocítica, así como también algunos parámetros de la serie roja (Eri y Hto), no se debe observar una diferencia mayor al 10% con respecto al control, mientras que principalmente para la Hemoglobina (Hb) utilizan un parámetro denominado PIV (Medida de Laboratorio Central) el cual no debe ser menor al 0.2% con respecto al control, de lo contrario nos indicaría una posible presencia de anemia.



4.2.6.3. EVALUACIÓN DE LOS ÓRGANOS:

Fundamento:

Los factores antinutricionales y tóxicos pueden influir en el decremento en peso de algunos órganos, como pueden ser el hígado, músculo intestinal, etc. Comúnmente al finalizar el experimento para la determinación de la toxicidad subcrónica, en todos los animales se les práctica la autopsia o necropsia, prestando atención a los cambios patológicos macroscópicos, incluyendo los cambios de peso de los principales órganos y glándulas. (Lara, 2003).

Procedimiento:

Al finalizar el bioensayo, los ratones se sacrificaron y se les realizó una necropsia para obtener los siguientes órganos: riñones, hígado, pulmones y el corazón, que son los órganos que pueden estar relacionados con posibles daños por la presencia del ácido erúxico. Se registró su peso y se observó la existencia de posibles anomalías como la coloración, tamaño y forma, esto con respecto a los órganos del lote que se tenía como control.

Con el peso de los órganos se calculó la relación porcentual de peso del órgano con respecto al peso corporal del ratón, por medio de la siguiente ecuación:

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

Una vez obtenidos estos datos se realizó un análisis de varianza para determinar la diferencia significativa entre los pesos de los órganos analizados con relación al tipo de aceite utilizado en el presente bioensayo de toxicidad subcrónica. Este análisis como ya se mencionó fue realizado mediante un programa estadístico llamado SPSS 10 for Windows (Production Facility)



4.2.6.4. MEDICIÓN DE LA ENERGÍA DIGERIBLE DEL ACEITE DE CAPULÍN EN SUS DIFERENTES PREPARADOS (CRUDO, REFINADO E HIDROGENADO).

Fundamento:

Los organismos vivos y específicamente el hombre necesitan energía para desempeñar sus actividades diarias aún estando en reposo absoluto, así los requerimientos energéticos deben cubrir las necesidades para mantener al individuo sano para realizar su vida activa en forma normal. Una forma práctica de obtener el contenido energético o densidad calórica de un alimento o dieta es utilizando una bomba calorimétrica; sin embargo este tipo de dispositivo solo determina la energía liberada por la completa oxidación del alimento, mientras que por ejemplo el cuerpo humano realiza la oxidación de forma incompleta.

Por lo tanto se puede asumir que la energía determinada en la bomba calorimétrica da el máximo potencial energético de un alimento (calor de combustión), que por convención se conoce como "Energía Gruesa (EG) o bruta". En el caso de la bomba calorimétrica, hay una conversión de la energía química en energía térmica, la cual se detecta por el cambio de temperatura. (Miller, 1959; Southgate, 1981; Álvarez, 2002).

Material y Reactivos:

- * Ácido benzoico (valor calórico certificado)
- * Balanza analítica (OHAU)
- * Bomba calorimétrica Gallenkamp
- * Cisoles de acero inoxidable
- * Desecador de vidrio
- * Estufa de secado
- * Galvanómetro GAM METRIC LTD
- * Mango metálico prensador
- * Mechas de algodón de 8 cm de longitud
- * Mortero grande con pistilo
- * Tamiz para separar heces del alimentos o material extraño



Procedimiento:

En la determinación del porcentaje de energía gruesa o digerible, se utilizaron tanto las muestras de estudio (aceite de la almendra de capulín en sus diferentes preparados) así como las heces de cada uno de los ratones que se utilizaron durante el bioensayo, para así poder tener un valor más preciso del porcentaje de la energía digerible o gruesa.

Las heces fueron tamizadas y recolectadas durante la última semana del ensayo toxicológico (días 26 y 28 de la hoja control (Fig. 10)), guardándolas en frascos debidamente rotulados. Además de que en esta última semana también se registra en las hojas de control (Fig. 10) el alimento ingerido. Las heces de cada ratón, así como las muestras de estudio se molieron en un mortero.

En la determinación de la energía digerible se recomienda moler finamente las muestra a fin de obtener una muestra lo más homogénea posible. La cantidad de muestra depende del contenido calórico esperado, recomendándose pesar una cantidad libre aproximadamente de 16 KJ (4 Kcal) para que entre en el intervalo de detección del dispositivo (Bomba calorimétrica). Así se tiene que para materiales con alta densidad calórica como grasas y aceites con 0.4 g de muestra será suficiente; mientras que para muestras con bajo valor energético se requerirá pesar hasta 1g de material o muestra.

En el caso del presente experimento se pesaron aproximadamente 0.7 g de las muestra de estudio (harina de pellet con los diferentes aceites, control, crudo, refinado e hidrogenados), mientras que para el caso de las heces se pesaron aproximadamente 0.6 g.

- κ La muestra en forma de harina se coloca en un crisol (el cual debe estar a peso constante) previamente tarado junto con una mecha de algodón, de tal manera que un extremo del hilo quede introducido dentro de la muestra.
- κ Se procede a pesar en una balanza analítica lo que corresponde al peso preliminar (Pp), recomendándose pesar un exceso aproximado del 10% del peso deseado.



-
- κ Se compacta la muestra con el mango metálico de tal forma que quede lo más uniforme posible y un extremo de la mecha permanezca introducida dentro de la muestra. El crisol con la muestra compactada se pesa nuevamente para tener el peso final (Pf).
 - κ El crisol se coloca en la base superior del pilar central de la bomba y con mucho cuidado se introduce la punta suelta de la mecha de algodón en el alambre de ignición.
 - κ Se procede a cerrar el cilindro con el capuchón, teniendo un cierre hermético y se coloca el sensor del termopar en el orificio del capuchón.

Nota: Se debe contar con un cilindro de oxígeno a presión, el cual se abre para dejar pasar el gas hacia el manómetro principal, indicando como mínimo una presión de 50 bars.

- κ Se abre la válvula del cilindro de oxígeno y se debe de alcanzar una presión dentro de la bomba calorimétrica de 25 bars en aproximadamente 20 a 30 segundos. Una vez alcanzada la presión se cierra la válvula y se ajusta el indicador del galvanómetro a cero.
- κ Se oprime el botón de ignición y en 10 a 15 segundos se lleva a cabo la combustión, notándose por un aumento en la presión del manómetro de la bomba, que a su vez se traduce en una señal en la escala galvanométrica. La lectura máxima obtenida en el galvanómetro, es directamente proporcional al calor liberado en la combustión.
- κ Tomada la lectura del galvanómetro, se abre la válvula de salida de los gases de combustión, la cual se localiza en la base de la bomba, se desconecta el sensor del termopar y una vez liberado por completo los gases de combustión, se quita el capuchón de la bomba.



- κ Se cierra la válvula de liberación de los gases y se atempera el capuchón de la bomba en un baño de agua fría hasta temperatura ambiente para realizar una nueva determinación.

Esta determinación se realizó tanto para el caso de las muestras del aceite en sus diferentes preparado como para las heces de cada ratón por triplicado.

Recomendaciones:

1. Al compactar la muestra dentro del crisol, un extremo de la mecha de algodón debe quedar inmersa en la muestra.
2. Una vez que se alcanza la presión del gas (oxígeno) esta debe mantenerse al cerrar la válvula de paso, ya que el decaimiento de la presión es signo de fuga en el sistema.

En la siguiente figura (Fig. 11) se ilustra la forma esquemática del diseño del cuerpo principal de la bomba calorimétrica.

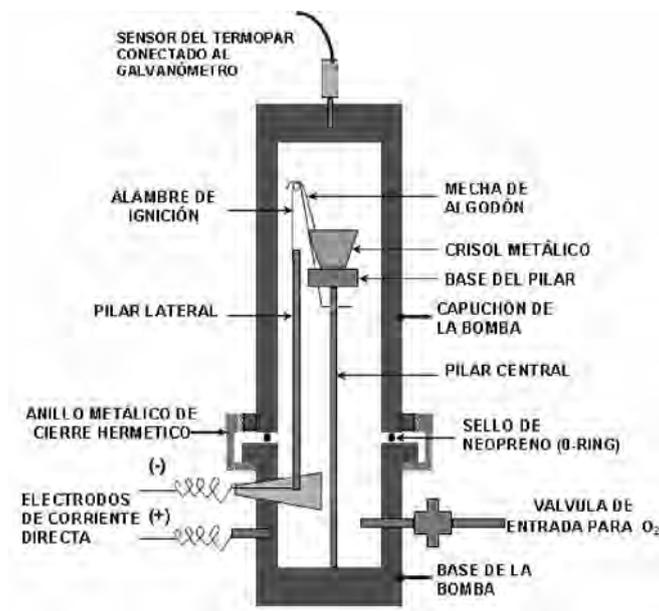


Figura 11: Diagrama esquemático de la bomba calorimétrica.



Para calcular la densidad calórica de las muestras, es necesario contar con una curva de calibración, por lo tanto se debe de realizar la combustión de diferentes pesos de ácido benzoico y anotar la respectiva lectura obtenida en la escala del galvanómetro. Se recomienda pesar entre 0.1 -0.8 g de ácido benzoico, además de que es necesario llevar a cabo la combustión exclusiva de la mecha de algodón, ya que el valor obtenido de esta combustión se deberá restar a las lecturas de cada una de las muestra de estudio (aceite de la almendra de capulín en sus diferentes preparados y las heces de cada uno de los lotes de ratones).

Una vez obtenidas las lecturas, se deben convertir los gramos de ácido benzoico en kJ o Kcal por medio de las siguientes conversiones:

$$1g \text{ de ácido benzoico} = 26454.3 \text{ Joules} = 26.45 \text{ kJ}$$

$$4.1868 \text{ kJ} = 1 \text{ kcal}$$

Posteriormente, una vez que se han convertido los gramos en kJ de las lecturas obtenidas, se traza la curva de calibración (Figura 12) de contenido calórico en kJ contra la lectura del galvanómetro, obteniéndose por interpolación la densidad calórica de la muestra en el crisol.

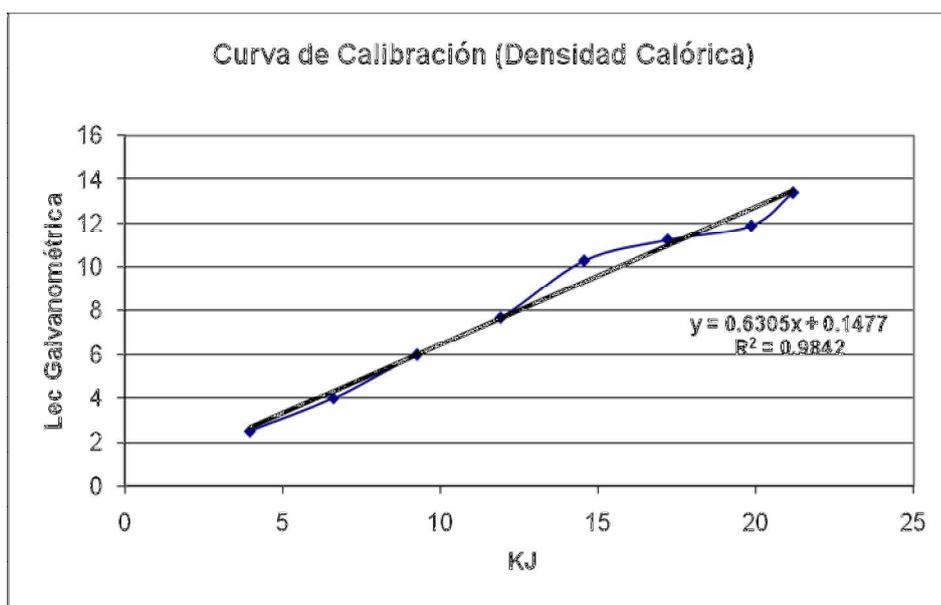


Figura 12: Curva de calibración del ácido benzoico para interpolar los valores de las lecturas galvanométricas de las muestras de estudio.



La densidad calórica de la muestra se calcula con la fórmula siguiente:

$$KJ / 100g \text{ de muestra} = \frac{\text{Lectura}(KJ) \times 100}{\text{Peso muestra}(g)}$$

Este cálculo se realiza tanto para las dietas (control, crudo, refinado e hidrogenado del aceite de la almendra de capulín), así como para las heces de cada uno de los ratones recolectadas. Una vez que se obtiene la densidad calórica tanto del alimento ingerido como de las heces, se determina la energía ingerida (EI) y la energía fecal (EF) por medio de las siguientes ecuaciones:

$$EI(KJ) = \left(\frac{KJ}{g \text{ alimento}} \right) \times \text{Peso del alimento ingerido}(g) *$$

*Obtenido de la hoja de control (Fig.10)

$$EF(KJ) = \left(\frac{KJ}{g \text{ heces}} \right) \times \text{Peso heces}(g)$$

Determinados estos parámetros, el porcentaje de energía digerible se obtiene de la siguiente forma:

$$\%ED = \frac{(EI - EF)}{EI} \times 100$$

Finalmente se realiza un análisis estadístico de los resultados del porcentaje de energía digerible, por medio de un programa de computo llamado SPSS 10 for Windows (Production Facility), para determinar si existía diferencia significativa entre los diferentes preparados del aceite de la almendra de capulín con respecto al aceite control y de esta manera observar si el ácido erúico afecta en la absorción de los nutrientes (principalmente las grasas, proteínas e hidratos de carbono).



5. Resultados:

5.1 RENDIMIENTOS

Tabla 7. Resultados Obtenidos de la Extracción del Aceite de la Almendra de Capulín (Aceite Crudo) y su Refinamiento de un estudio previo (Prior 2004)

Descripción	Peso (g)	Volumen (.mL)	% de Rendimiento
		-----	-----
Almendra de Capulín fraccionada	1047	-----	-----
Volumen del Aceite de Capulín extraído	-----	440	-----
Peso del Aceite de Capulín extraído	415.75*	-----	-----
Rendimiento	-----	-----	39.71
		-----	-----
Volumen de Aceite Crudo que se Refinó	-----	210	-----
Volumen de Aceite Refinado recuperado	-----	111	-----
Rendimiento	-----	-----	52.86

*Para obtener este resultado se utilizó la densidad del Aceite de la Almendra de Capulín (0.9449 g/mL) reportado en un estudio previo de toxicidad aguda (Prior 2004).

En esta tabla se observa que el rendimiento (39.71%) obtenido **en la extracción del aceite de la almendra de capulín** (Aceite crudo), es casi lo esperado, debido a que como se ha mencionado en los antecedentes, este tipo de almendra tiene un contenido del 40% de grasa y el rendimiento está muy cercano a este valor, mostrando así, que el volumen del aceite extraído fue el adecuado para contar con suficiente material para la realización del presente estudio. Se menciona que este rendimiento es adecuado debido a que como se trata de un aceite, mucho de este material se queda impregnado en las paredes del equipo que se utiliza durante la extracción y por lo tanto no se llega a recuperar del todo.



En el caso del rendimiento que se obtiene de la refinación (Tabla 7) el cual consta de cuatro pasos (filtración, desgomado, neutralización y blanqueo, donde los tres últimos son los más comunes), se observa que este es relativamente adecuado (52.86%), si se considera que el 100% representa un buen rendimiento, debido a que es en este proceso donde el aceite pasa por múltiples manipulaciones, quedándose impregnado en los equipos o instrumentos utilizados, en los cuales es difícil de recuperar. Por lo que se recomienda disolver el aceite impregnado con hexano y refinarlo nuevamente para así recuperar parte del aceite que queda fijado o impregnado y de esta manera mejorar el rendimiento del aceite que es sometido al proceso de refinación. (Belitz, 1997; Prior, 2004).

Como ya se mencionó en la metodología, el proceso de hidrogenación no se realizó en esta experimentación ya que se contaba con suficiente cantidad de este material obtenido de un estudio previo de toxicidad aguda con el mismo lote de la semilla de capulín, teniendo del aceite hidrogenado por 5 minutos una cantidad de 109mL (100.09g), mientras que del aceite hidrogenado por 10 minutos se contó con 103mL (91.979g), suficiente para el desarrollo del presente estudio. Sin embargo, en el caso de la hidrogenación se sabe que las mayores pérdidas se dan durante la filtración del aceite para eliminar el catalizador y puesto que una vez que es sometido el aceite a este tipo de proceso, las características físicas y químicas del aceite cambian tendiendo a convertirse en grasa a temperatura ambiente, sobre todo a mayor tiempo de hidrogenación, por lo que se deben de tener los cuidados necesarios para no perder el producto durante la elaboración de los pellets (vía de administración).

Por otro lado, como se observa en la tabla 2 con la hidrogenación es posible disminuir el contenido de ácido erúico a niveles por debajo del 5% (máximo valor permitido); debido a que al aumentar el tiempo de hidrogenación de 5 a 10 minutos, se disminuye el nivel de ácido erúico a menos del 1%. (Prior, 2004).



5.2 TOXICIDAD SUBCRÓNICA:

Este estudio se realizó durante 28 días, utilizando la dosis de 15g/kg de p.c (peso corporal), incorporando el aceite control (aceite de girasol) y el aceite de la almendra de capulín en sus diferentes preparados (crudo, refinado e hidrogenado) en la dosis antes señalada en pellets, para evitar estresar al animal, porque la vía de administración utilizada fue la oral, evitando así el uso de una sonda esofágica.

Los animales fueron distribuidos en 5 lotes de 6 ratones cada uno por medio del método de "Culebra Japonesa" (Fig. 8), con un peso promedio de 18-20g.

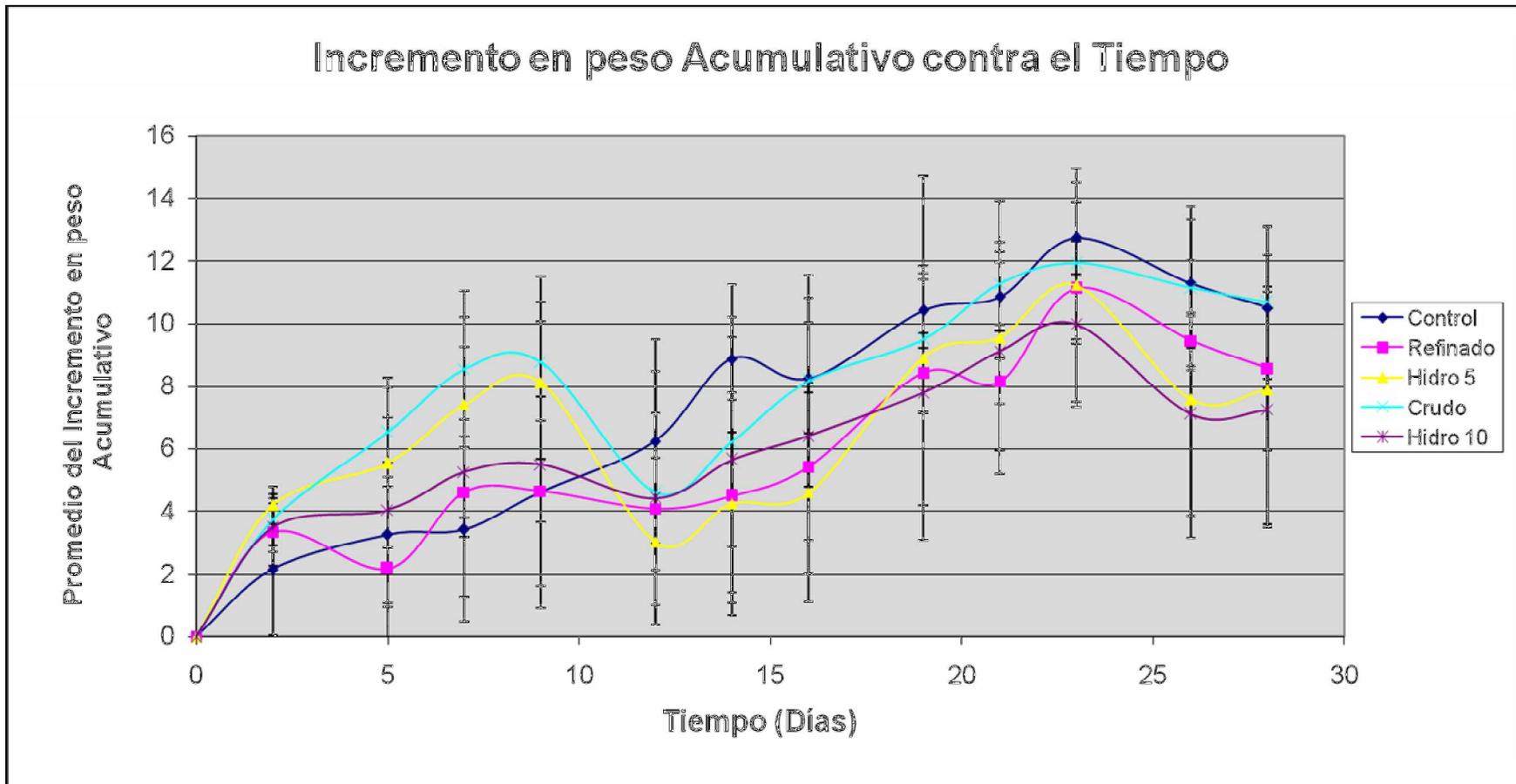
Para fines prácticos se utilizaron abreviaciones para indicar el lote del cual se trataba, en donde el lote control estaba representado por Co, el lote del aceite crudo estaba representado por Cr, el lote para el aceite refinado estaba representado por Re, el lote del aceite hidrogenado por 5 minutos estaba representado por Hd-5, mientras que el lote del aceite hidrogenado por 10 minutos estaba representado por Hd-10. Estas abreviaciones fueron también utilizadas durante la citometría hemática, la relación porcentual de los órganos y la energía digerible, a fin de identificar a los ratones con relación al lote al cual representaban, evitando así posibles confusiones.

Durante este estudio se llevó a cabo una evaluación del incremento en peso acumulativo y consumo de alimento acumulativo con el fin de observar si la administración de los aceites en estudio tenían alguna influencia sobre los animales, principalmente en los parámetros mencionados. Los resultados de estos parámetros se colocaron como el promedio de los seis ratones de cada uno de los lotes (Tablas 8 y 9). Posteriormente se desarrolló un gráfico para los parámetros de incremento en peso y consumo de alimento con respecto al tiempo, para observar de una manera más clara la diferencia del aceite de capulín en sus diferentes preparados (crudo, refinado e hidrogenados) con respecto al control. (Gráfica 1 y 2).



Tabla 8: Promedio del incremento en peso acumulativo de los animales de ensayo durante el estudio de toxicidad subcrónica de los diferentes preparados de la almendra de capulín (Prunus serotina)

Día	2	5	7	9	12	14	16	19	21	23	26	28
Ratón												
	Unidades (g)											
Control	2.16	3.26	3.42	4.64	6.24	8.88	8.26	10.42	10.86	12.74	11.3	10.5
<i>Des. Esta.</i>	2.1078	2.3082	2.9558	3.0213	3.2439	2.3711	1.7615	1.1946	1.1014	1.1459	2.0603	2.5739
<i>Cv</i>	0.9759	0.7081	0.8643	0.6511	0.5199	0.2670	0.2133	0.1146	0.1014	0.0899	0.1823	0.2451
Refinado	3.34	2.18	4.62	4.66	4.08	4.5	5.44	8.44	8.16	11.12	9.46	8.58
<i>Des. Est.</i>	1.0807	2.6329	1.4307	1.0040	3.0475	3.0651	2.3671	1.2720	0.7162	1.6115	0.7925	2.6129
<i>Cv</i>	0.3236	1.2077	0.3097	0.2154	0.7469	0.6811	0.4351	0.1507	0.0878	0.1449	0.0838	0.3045
Hidro 5	4.2	5.55	7.42	8.13	3.03	4.25	4.62	8.92	9.55	11.23	7.58	7.9
<i>Des. Esta</i>	0.6164	2.7164	3.6296	3.3857	2.6673	3.5557	3.4828	5.8253	4.3569	3.7425	4.4346	4.3081
<i>Cv</i>	0.1468	0.4894	0.4894	0.4163	0.8793	0.8366	0.7544	0.6533	0.4562	0.3332	0.5848	0.5453
Crudo	3.73	6.53	8.57	8.78	4.63	6.22	8.18	9.50	11.28	11.95	11.13	10.68
<i>Des. Est</i>	0.8287	1.4376	1.6379	1.8946	2.4833	3.3511	3.3808	2.3537	1.3182	2.5774	2.6220	2.4293
<i>Cv</i>	0.2220	0.2200	0.1912	0.2157	0.5360	0.5390	0.4131	0.2478	0.1168	0.2157	0.2355	0.2274
Hidro 10	3.5	4.05	5.2667	5.5	4.4333	5.65	6.41667	7.8	9.1167	9.9833	7.1	7.25
<i>Des. Est</i>	0.7746	2.9535	3.9768	4.5730	4.0431	4.5487	4.3797	3.6039	3.1720	2.6438	3.2472	3.7495
<i>Cv</i>	0.2213	0.7293	0.7551	0.8314	0.9120	0.8051	0.6825	0.4620	0.3479	0.2648	0.4573	0.5172

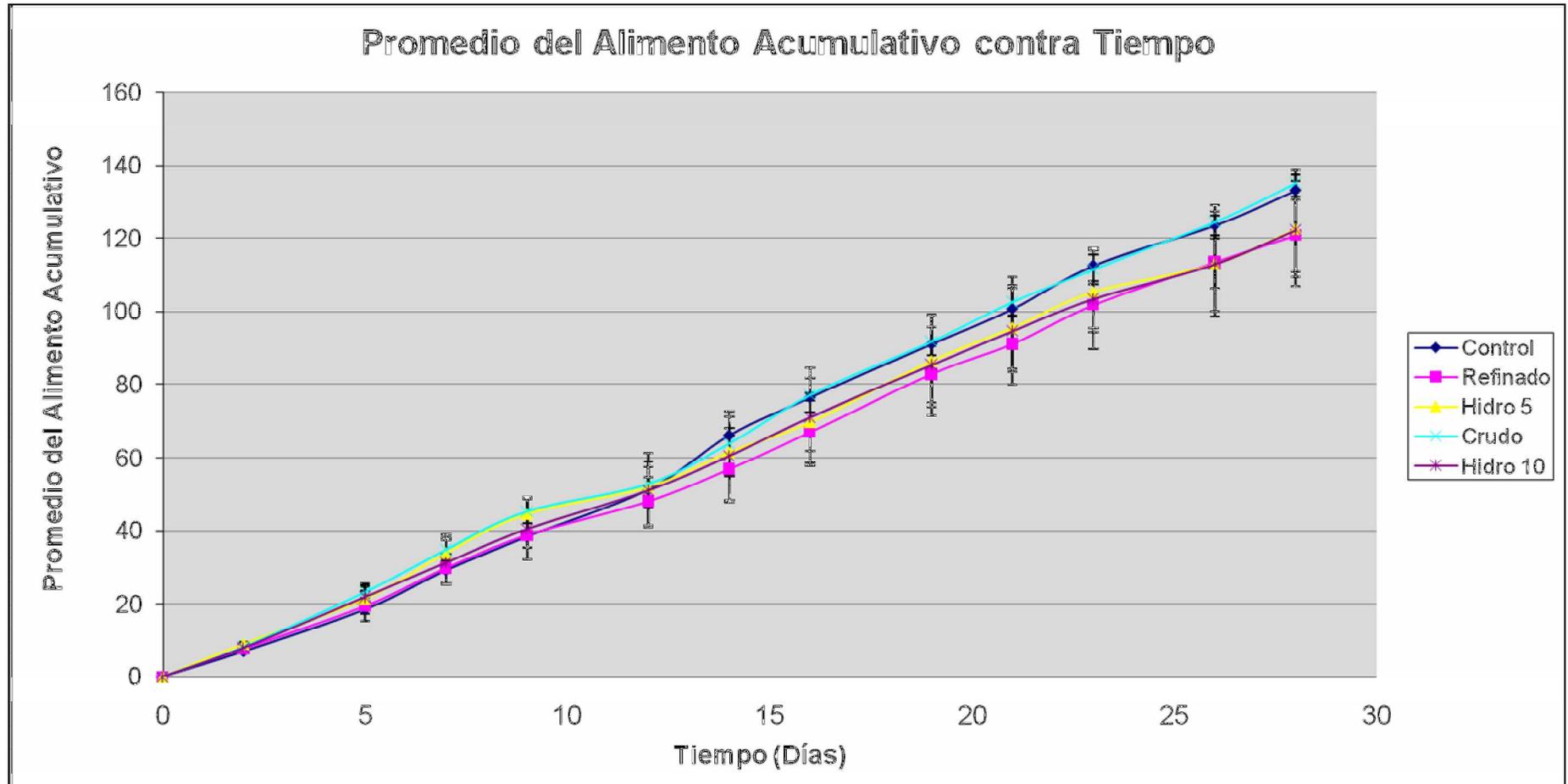


Gráfica 1: Promedio del Incremento de peso acumulativo con respecto al tiempo (28 días) del estudio de toxicidad subcrónica del aceite de la almendra de capulín (*Prunus serotina*)



Tabla 9: Promedio del alimento acumulativo consumido por los animales de ensayo durante el estudio de toxicidad subcrónica de los diferentes preparados de la almendra de capulín (*Prunus serotina*)

Día	2	5	7	9	12	14	16	19	21	23	26	28
Lote												
	Unidades (g)											
Control	6.98	18.54	29.3	38.4	51.34	66.26	76.54	91.14	100.82	112.7	123.6	133.22
<i>Desv. Esta</i>	4.4285	5.2228	5.6138	5.0334	5.8308	5.5053	7.2875	5.8423	4.9927	3.9256	6.5169	3.6928
<i>CV</i>	0.6345	0.2817	0.1916	0.1311	0.1136	0.0831	0.0952	0.0641	0.0495	0.0348	0.0527	0.0277
Refinado	7.68	19.42	29.92	38.76	48.06	56.94	67.1	82.86	91.16	101.86	113.56	120.8
<i>Desv Esta</i>	0.795	4.1686	3.8499	3.3702	6.6387	9.1413	8.5012	7.779	7.6022	6.4933	7.2012	9.757
<i>CV</i>	0.1035	0.2147	0.1287	0.0870	0.1381	0.1605	0.1267	0.0939	0.0834	0.0637	0.0634	0.0808
Hidro 5	8.98	21.43	34.02	44.6	52.02	61.63	69.87	86.5	95.67	105.5	113.17	122.58
<i>Desv Esta</i>	0.5231	4.163	4.7914	4.5725	5.5858	6.6539	7.8559	12.4142	11.4737	11.1348	13.1786	13.0852
<i>CV</i>	0.0583	0.1943	0.1408	0.1025	0.1074	0.1080	0.1124	0.1435	0.1199	0.1055	0.1164	0.1067
Crudo	8.18	23.3	34.9	45.3	52.87	64.02	77.2	91.87	102.7	111.65	124.53	135.2
<i>Desv Esta</i>	0.9968	1.5697	2.992	3.3841	6.2224	7.2739	4.6243	3.8035	3.8492	3.9501	4.7098	3.811
<i>CV</i>	0.1219	0.0674	0.0857	0.0747	0.1177	0.1136	0.0599	0.0414	0.0375	0.0354	0.0378	0.0282
Hidro 10	7.95	21.95	31.42	40.43	51.08	60.57	71.2	85.37	94.7	103.53	113.07	122.25
<i>Desv Esta</i>	0.501	3.2581	5.9995	8.2226	10.1637	12.3051	13.313	13.8298	14.8142	13.7979	14.2758	15.2064
<i>CV</i>	0.0630	0.1484	0.1909	0.2034	0.1990	0.2032	0.1870	0.1620	0.1564	0.1333	0.1263	0.1244



Gráfica 2: Promedio del Alimento Acumulativo con respecto al tiempo (28 días) del estudio de toxicidad subcrónica del aceite de la almendra de capulín (Prunus serotina)



Tabla 10: Análisis de Varianza de los datos del incremento en peso acumulativo

ANOVA								
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Comparación	F crítica	Dif Signi	Sig.
Between Groups	54.677	4	13.699	1.276	<	2.795	No	0.308
Within Groups	246.411	23	10.714					
Total	301.089	27						

Tabla 11: Análisis de Varianza del Alimento Acumulativo

ANOVA								
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Comparación	F crítica	Dif Signi	Sig.
Between Groups	1040.338	4	260.084577	2.373	<	2.795	No	0.082
Within Groups	2520.251	23	109.576145					
Total	3560.589	27						



En la **Gráfica 1** la cual representa el incremento en peso acumulativo con respecto al tiempo de los lotes estudiados del aceite de la almendra de capulín en sus diferentes preparados, se observa que no hay diferencia con respecto al control, debido a que los incrementos en peso de las muestras del aceite de la almendra de capulín y sus preparados (crudo, refinado e hidrogenados) son muy parecidos al incremento en peso que presenta el control (líneas muy cercanas a la recta que respresenta el control). Esto se confirmó al realizar una análisis de varianza de una vía de estos datos, concluyendo que no existe diferencia significativa entre ellos. (Tabla 10).

Con respecto a al parámetro del alimento acumulativo de los diferentes preparados del aceite de la almendra de capulín, esquematizado en la **Gráfica 2**, se observa la misma tendencia que se observa con el parámetro del incremento en peso, es decir, los datos se encuentran muy cercanos a la recta que representa el control y además al realizar el análisis de varianza de estos datos, se muestra en la Tabla 11 que no hay una diferencia significativa de estos preparados con respecto al control.

Por otro lado y tomando en consideración que si la sustancia de estudio tuviera una toxicidad alta para causar la muerte del modelo biológico, durante este bioensayo no hubo mortalidad en ninguno de los ratones de cada uno de los lote del aceite de la almendra de capulín en sus diferentes preparados, usando como única dosis 15g/kg de p.c. Únicamente lo que se presentó en este bioensayo fue el sacrificio de un ratón del lote del aceite control debido a que se escapó el segundo día del bioensayo, así como la muerte de un ratón del lote del aceite refinado al cuarto día del bioensayo, al cual no se le pudo realizar la necropsia, porque se supone murió por la noche y no se piensa que fuera por la muestra de ensayo (aceite de capulín refinado), porque además no se presentó la muerte de otro ratón del mismo lote.



Por lo tanto, de lo anterior se puede decir que el ácido erúxico que se encuentra **presente en cada una de las muestras del aceite de la almendra de capulín** en sus diferentes preparados no influye ni en la mortalidad, ni principalmente en el crecimiento de los animales y en el consumo del alimento, debido a que se sabe que cuando hay problemas de toxicidad hay un decremento en el peso de los animales.

La pérdida de peso corporal es un índice simple aunque sensible de la presencia de efectos tóxicos, así como una disminución marcada en el consumo de alimento puede inducir efectos que empeoren las manifestaciones tóxicas del producto químico. (Álvarez, 2002).

5.2 1 RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE LABORATORIO DURANTE LOS ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS.

5.2.1.1 CITOMETRÍA HEMÁTICA

Considerando los parámetros hematológicos como **valores predictivos de la salud de los animales del bioensayo**, así como la determinación de efectos subclínicos causados por el ácido erúxico presentes en las muestras de estudio (aceite de la almendra de capulín en sus diferentes preparados), se les realizó la citometría hemática a cada uno de los ratones de cada lote al término de los días de la experimentación por medio de un sangrado vía ocular.

Los resultados obtenidos de cada parámetro para cada uno de ratones de cada lote se encuentran en la **Tabla 12**, divididos en la denominada serie blanca, serie roja y trombocítica o plaquetaria, cada una de estas series se encuentra a su vez dividida en otros parámetros (obteniendo así 16 parámetros), de los cuales para el análisis del posible daño a nivel subclínico o de la sangre que puede ocasionar el ácido erúxico presente en las muestras de estudio, se tomaron en cuenta como los parámetros más importantes, de acuerdo al análisis propuesto por la Dra. Adriana Ruiz, los siguientes:



κ **Serie blanca**

- * Número de glóbulos blancos (GB o Leu).

κ **Serie roja:**

- * Número de glóbulos rojos (Eri)
- * Hemoglobina (Hb):
- * Hematocrito (Hto)

κ **Serie Trombocítica o plaquetaria**

- * Número de plaquetas (Plt):

Para el análisis de los parámetros antes mencionados, realizado con el apoyo de la Dra. Adriana Ruiz, se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones: para el caso del número de glóbulos blancos, del número de plaquetas, así como los parámetros de Hematocrito (Hto) y el número de glóbulos rojos (Eri), no se debía observar una diferencia o variación mayor al 10% con respecto al control, porque de lo contrario esto estaría indicando algún efecto sobre la salud de los animales de estudio, posiblemente causado por el ácido erúxico presente en las muestras de estudio. Mientras que para el parámetro de Hemoglobina (Hb) se utilizó un parámetro denominado PIV, el cual indicaba que la Hemoglobina no debía de presentar una variación menor al 0.2% con respecto al control, de lo contrario podría revelar una posible presencia de anemia.



Tabla 12: Parámetros hematológicos realizados durante el estudio de toxicidad subcrónica del aceite de la almendra de capulín (*Prunus serotina*) en sus diferentes preparados.

Ratón	Serie Blanca				Serie Roja								Serie Trombocítica			
	Leu	LIN%	MON%	GRA%	Eri	Hb	Hto	VGM	HCM	CCMH	ADE	Plt	Ptc	VMP	IDP	
Co2	6.1	92.5	3.6	3.9	8.94	15.4	45	50	17.3	34.3	14.1	711	0.409	5.8	3.4	
Co3	7.4	88.6	7.2	4.2	8.74	16.3	46.4	53	18.6	35.1	12.7	768	0.605	7.9	4.7	
Co4	3.6	85.9	7.8	6.3	9.57	16.6	48.6	51	17.3	34.1	12.7	803	0.707	8.8	2	
Co5	1.5	85.4	9.4	5.2	9.95	17.5	51.6	52	17.6	34	13.4	828	0.431	5.2	6.1	
Co6	5	87.4	7.5	5.1	9.48	16.7	49.6	52	17.7	33.7	14.5	804	0.668	8.3	3.5	
PROM	4.7	88	7.1	4.94	9.34	16.5	48.2	51.6	17.7	34.24	13.5	783	0.564	7.2	3.9	
DS	2.3	2.83	2.13	0.945	0.49	0.76	2.61	1.14	0.53	0.527	0.81	45	0.137	1.6	1.5	
CV	48	3.22	30.04	19.12	5.26	4.6	5.4	2.21	3.02	1.54	6.04	5.8	24.22	22.2	39	
VAR	4.23				8.406	16.47	43.38					704.7				
Re1	1.2	81.5	10.6	7.9	8.82	15.3	45.1	51	17.3	33.9	14.8	728	0.432	5.9	4.4	
Re2	3.1	87	7.3	5.7	8.63	15.2	45.9	53	17.7	33.2	13.7	918	0.634	6.9	4.8	
Re3	2.2	84.2	8.5	7.3	9.35	16.1	48.5	52	17.2	33.3	13.5	839	0.647	7.7	3.7	
Re5	0.8	85.2	9.7	5.1	9.64	17.3	50.8	53	17.9	34	14.1	782	0.457	5.9	5.4	
Re6	3	87.4	8.5	4.1	9.39	15.4	46.7	50	16.4	33	13.7	651	0.333	5.1	2.9	
PROM	2.1	85.1	8.92	6.02	9.17	15.9	47.4	51.8	17.3	33.48	14	784	0.501	6.3	4.2	
DS	1	2.38	1.2657	1.5659	0.42	0.88	2.28	1.3	0.58	0.444	0.52	102	0.136	1.01	1	
CV	50	2.8	14.19	26.01	4.61	5.54	4.81	2.52	3.35	1.326	3.71	13	27.16	16	23	
HD5-1	1.6	75.4	15.5	9.1	9.84	16.1	49.7	50	16.4	32.4	13.8	739	0.465	6.3	2.5	
HD5-2	3.6	88.5	6.4	5.1	10.1	16.7	50.8	50	16.5	32.9	13.9	689	0.384	5.6	3.3	
HD5-3	0.8				10.2	16.9	54	53	16.6	31.4	16.1	524	0.303	5.8	2.4	
HD5-4	2.4	81.9	9.4	8.7	10.8	17.1	54	50	15.8	31.6	12.8	731	0.462	6.3	1.9	
HD5-5	1.6	81.4	11.8	6.8	9.56	15.2	49.4	52	16.3	31.5	14.7	802	0.42	5.2	5.7	
HD5-6	0.8	80.7	14	5.3	10	16.5	52	52	16.5	31.8	14.2	561	0.278	5	3.5	
PROM	1.8	81.6	11.42	7	10.1	16.4	51.7	51.2	16.4	31.93	14.3	674	0.385	5.7	3.2	
DS	1.1	4.66	3.6307	1.8601	0.42	0.7	2.04	1.33	0.29	0.592	1.1	109	0.08	0.54	1.4	
CV	59	5.72	31.792	26.573	4.19	4.28	3.94	2.6	1.76	1.854	7.72	16	20.67	9.54	42	
Cr1	2.2	91.5	5.4	3.1	8.95	15.6	46.9	52	17.4	33.2	13.4	895	0.735	8.2	4.2	
Cr2	2.9	86.9	8.1	5	9.31	16.3	47.9	51	17.5	34.1	13.4	856	0.454	5.3	6.1	
Cr3	2.1	92.2	4.2	3.6	9.76	16.7	50.8	52	17.1	32.9	13.4	895	0.698	7.8	6.9	
Cr4	2	86.5	7.4	6.1	9.35	16.4	48.8	52	17.5	33.5	13.7	803	0.609	7.6	3.8	
Cr5	3.4	90.2	6.9	2.9	7.85	14	40.5	52	17.8	34.6	14.1	622	0.308	4.9	6.5	
Cr6	1.1	77.9	11.6	10.5	9.49	16.2	49.6	52	17.1	32.7	13.7	626	0.328	5.2	4.5	
PROM	2.3	87.5	7.2667	5.2	9.12	15.9	47.4	51.8	17.4	33.5	13.6	783	0.522	6.5	5.3	
DS	0.8	5.27	2.55	2.8705	0.67	0.98	3.65	0.41	0.27	0.729	0.28	128	0.185	1.52	1.3	
CV	35	6.02	35.092	55.203	7.4	6.2	7.69	0.79	1.54	2.177	2.05	16	35.53	23.3	25	
HD10-1	2.6	89.7	6.2	4.1	10.5	17.1	55.1	52	16.3	31.1	13.9	651	0.392	6	2.9	
HD10-2	2.5	86.8	6.9	6.3	10.3	17.1	53.2	52	16.6	32.2	12.5	638	0.582	9.1	1.1	
HD10-3	1	72.8	13.8	13.4	9.89	16.6	51.3	52	16.8	32.4	13.8	799	0.653	8.2	2.4	
HD10-4	2.9	87.5	7.6	4.9	9.26	15.9	48	52	17.2	33.2	13.4	694	0.348	5	6.1	
HD10-5	2.4	79.1	9.9	11	9.41	16.2	49.6	53	17.2	32.7	14.2	713	0.366	5.1	6.4	
HD10-6	1.4	72.4	11.3	16.3	9.52	16.6	52.4	55	17.4	31.6	15.3	867	0.48	5.5	6.3	
PROM	2.1	81.4	9.2833	9.3333	9.82	16.6	51.6	52.7	16.9	32.2	13.9	727	0.47	6.48	4.2	
DS	0.8	7.69	2.9281	4.9818	0.52	0.48	2.55	1.21	0.42	0.756	0.92	89	0.125	1.74	2.3	
CV	35	9.45	31.541	53.377	5.28	2.89	4.94	2.3	2.49	2.349	6.66	12	26.55	26.8	56	

Nota: Los parámetros que se encuentran en negritas y cursiva son los parámetros que se consideraron como los más importantes, así como también se marca la variación que deben de presentar cada una de las muestras de estudio con respecto al control. Las unidades de los parámetros hematológicos se encuentran expresadas en la tabla 4.



En la tabla 12 se puede observar, que en el caso del parámetro del número de glóbulos blancos (Leu), todas las muestra de aceite de la almendra de capulín en sus diferentes preparados están por debajo de la variación del 10% con respecto al control, lo cual indica que el mecanismo de defensa puede verse afectado por la presencia del ácido erúxico, pero esto en un bajo nivel, debido a que como ya se indicó no se presentó mortalidad en los animales de ensayo durante la experimentación, porque de haber sido lo contrario se hubiera presentado la muerte de los animales por alguna infección.

En el caso de los parámetros de la serie roja, como son el número de eritrocitos (Eri) y el Hematocrito (Hto) se observa que las muestras de estudio (aceite de la almendra de capulín en sus diferentes preparados) no presentan una variación mayor del 10% de estos parámetros con respecto al control, indicando que el ácido erúxico no los afecta.

Por otro lado en el caso del parámetro Hemoglobina (Hb), se observa que hay una variación mayor del 0.2% en el aceite de la almendra de capulín crudo y el aceite de la almendra de capulín refinado, con respecto al aceite control, indicando que es en estos aceites donde el ácido erúxico, el cual se encuentra por arriba del 5% (nivel máximo permitido, tabla 2), puede llegar a afectar este parámetro, causando una posible anemia, pero en bajo nivel, porque si se observan las gráficas 1 y 2 las cuales se refieren al incremento en peso acumulativo y el alimento acumulativo de los lotes de estos aceites no se encuentra diferencia significativa con respecto al control, es decir se observa un crecimiento normal de los ratones a pesar de la posible anemia, en bajo nivel, causada por el ácido erúxico.

En el caso de la serie trombocítica, principalmente el parámetro del número de plaquetas (Plt), se observa que es en el aceite de la almendra de capulín hidrogenado por 5 minutos donde se presenta una variación del 10% con respecto al aceite control, indicando una posible trombocitopenia, la cual no se puede sospechar sea causada por la presencia del ácido erúxico, porque de acuerdo a la **tabla 2** (perfil de ácidos grasos obtenido de un estudio previo (Prior, 2004)) es en este aceite donde el porcentaje de ácido erúxico se observa disminuido (menor al 5% que es el máximo valor permitido); por lo tanto se supone que la causa de la trombocitopenia es causada por la disminución del



porcentaje de los ácidos grasos esenciales (ácido linoleico, ácido linolénico y el ácido araquidónico), los cuales deben de obtenerse de la dieta o de la ingesta de algunos alimentos (verduras, frutas, frutos secos, cereales y semillas) y principalmente el ácido linoleico y el ácido linolénico son importantes porque sirven para mantener las membranas de todas las células y para producir las prostaglandinas que regulan muchos procesos corporales, como son las inflamaciones o bien para la coagulación de la sangre, en donde tienen un papel fundamental las plaquetas. Además como se muestra en la **tabla 2** es en el aceite de la almendra de capulín hidrogenado por 5 minutos donde el ácido araquidónico y el ácido linolénico no son detectados por el método utilizado (cromatografía de gases) en un estudio previo; mientras que el porcentaje del ácido linoleico disminuye en comparación con el aceite crudo de la almendra de capulín, corroborando que esta trombocitopenia es posiblemente causada por la disminución de los ácidos grasos esenciales.

Por otro lado si es estricto en el análisis de este parámetro (número de plaquetas (Plt)), se puede decir que es también en el aceite de la almendra de capulín hidrogenado 10 minutos donde se observa una variación, quizá no del 10%, pero si cercana con respecto al aceite control, indicando una posible trombocitopenia pero en bajo nivel causada por la disminución de los ácidos grasos esenciales (**tabla 2**), como ocurre en el aceite de capulín hidrogenado por 5 minutos.

Se dice que el efecto causado por la disminución de los ácidos grasos en el número de plaquetas (Plt) es bajo, porque como se indica en los antecedentes, la trombocitopenia se produce por la presencia de anemia y de acuerdo a los resultados obtenidos de la citometría hemática en ninguno de estos aceites hidrogenados se observa una baja en el parámetro de Hemoglobina, el cual es indicativo de anemia, además de acuerdo a la gráfica 1 donde se muestra el crecimiento acumulativo, no hay variaciones de crecimiento de los animales de estos aceites hidrogenados con respecto al aceite control, es decir, hay un buen crecimiento de los ratones, confirmando así que no hay presencia de anemia.



Se puede concluir, que a pesar de algunas variaciones presentadas en cada uno de los parámetros hematológicos estudiados antes mencionados, el ácido erúxico presente en cada una de las muestras (aceite de la almendra de capulín en sus diferentes preparados y principalmente en aquellos aceite donde el porcentaje de ácido erúxico es alto (tabla 2)), parece afectar levemente el nivel de hemoglobina, del número de leucocitos y del número de eritrocitos, porque en todos los casos se mencionó que su efecto es bajo, por lo tanto no representa un factor de riesgo en la sangre y por consiguiente para la cardiopatía coronaria, lo que es indicativo de la baja toxicidad del material evaluado con una dosis de 15g/Kg de p.c.

5.2.1.2 RELACIÓN PORCENTUAL DE ÓRGANOS

Al terminar el ensayo biológico, se les realizó una necropsia a los animales empleados en el bioensayo de toxicidad subcrónica del aceite de la almendra de capulín (***Prunus serotina***) y sus diferentes preparados con una dosis de 15g/kg de p.c, con la finalidad de observar posibles anomalías en los órganos, los cuales pueden verse afectados por la presencia del ácido erúxico como son: el hígado, los pulmones, los riñones y el corazón. En la tablas 13, 14, 15, 16 y 17 se muestran los valores de la relación porcentual de los órganos antes mencionados y cuyos cálculos se encuentran explicados en la metodología.

Tabla 13: Relación porcentual de los órganos del aceite control (Aceite de girasol) del estudio de toxicidad subcrónica del aceite de la almendra de capulín (***Prunus serotina***).

Aceite de Girasol (Control)					
Ratón	Hígado	Riñones	Corazón	Pulmones	Observaciones
1					
2	5.382	1.872	0.781	0.863	
3	5.528	1.558	0.735	0.799	
4	3.767	1.623	0.718	0.646	
5	4.5	1.464	0.669	0.787	
6	4.479	1.725	0.878	0.896	
Promedio	4.731	1.648	0.756	0.798	
Desv Esta.	0.725	0.157	0.079	0.096	
Cv	15.3315	9.5347	10.4656	12.0666	



Tabla 14: Relación porcentual de los órganos del aceite refinado del estudio de toxicidad subcrónica del aceite de la almendra de capulín (Prunus serotina).

Aceite Refinado					
Ratón	Hígado	Riñones	Corazón	Pulmones	Observaciones
1	4.792	1.750	0.730	0.914	
2	4.541	1.441	0.709	0.666	Hemorragia interna del tórax
3	4.917	1.761	0.843	0.843	Peso igual del corazón y pulmones
4					
5	5.559	1.752	0.810	0.888	
6	5.421	1.539	0.610	0.672	
Promedio	5.046	1.649	0.740	0.797	
Des Est	0.098	0.151	0.141	0.153	
CV	1.933	9.155	19.088	19.156	

Tabla 15: Relación porcentual de los órganos del aceite hidrogenado 5 minutos del estudio de toxicidad subcrónica del aceite de la almendra de capulín (Prunus serotina).

Aceite Hidrogenado 5 min					
Ratón	Hígado	Riñones	Corazón	Pulmones	Observaciones
1	6.175	1.644	0.880	0.801	
2	4.851	1.754	0.720	0.686	
3	5.094	1.653	0.627	0.984	Vesícula biliar grande
4	4.923	1.270	0.538	0.800	Vesícula biliar grande
5	6.923	1.653	0.524	0.837	Vesícula biliar grande
6	5.578	1.817	0.567	0.831	
Promedio	5.591	1.632	0.643	0.823	
Des. Esta	0.820	0.190	0.137	0.096	
CV	14.6600	11.6645	21.2538	11.6623	



Tabla 16: Relación porcentual de los órganos del aceite crudo del estudio de toxicidad subcrónica del aceite de la almendra de capulín (Prunus serotina).

Aceite Crudo					
Ratón	Hígado	Riñones	Corazón	Pulmones	Observaciones
1	5.672	1.946	0.952	0.902	
2	5.542	1.550	0.742	0.834	
3	4.794	1.792	0.576	0.723	
4	4.789	1.670	0.783	0.856	
5	4.687	1.644	0.571	0.606	
6	6.232	1.949	0.627	0.821	
Promedio	5.286	1.759	0.709	0.790	
Desv. Esta.	0.626	0.166	0.148	0.108	
Cv	11.8372	9.4168	20.8463	13.6330	

Tabla 17: Relación porcentual de los órganos del aceite hidrogenado 10 minutos del estudio de toxicidad subcrónica del aceite de la almendra de capulín (Prunus serotina).

Aceite Hidrogenado 10 min					
Ratón	Hígado	Riñones	Corazón	Pulmones	Observaciones
1	5.497	1.782	0.516	0.708	
2	5.625	1.713	0.614	0.885	
3	4.780	1.606	0.675	0.854	
4	6.225	1.803	0.513	0.789	
5	5.761	1.819	0.565	0.756	
6	6.036	1.892	0.572	0.898	
Promedio	5.654	1.769	0.576	0.815	
Desv. Esta	0.505	0.099	0.062	0.076	
CV	8.9263	5.5859	10.6883	9.3408	

A los promedios de los pesos porcentuales de cada una de los órganos extraídos, se les realizó un análisis de varianza de una vía (tabla 18, 19, 20, 21 y 22) para observar si existía diferencia significativa entre los órganos de los lotes del aceite de la almendra de capulín en sus diferentes preparados con respecto al control, para así predecir el posible daño que causaba el ácido erúico sobre estos órganos.



Tabla 18: Análisis de varianza de una vía para el Hígado durante el estudio de toxicidad subcrónica del aceite de la almendra de capulín (Prunus serotina) y sus diferentes preparados.

ANOVA								
HIGADO								
	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F	Comparativo	F crítica	Diferencia Significativa	Sig.
Entre Grupos	3.196	4	0.799	1.949	<	2.795	No	0.136
Dentro de los Grupos	9.432	23	0.41					
Total	12.628	27						

F: Relación de variación
Sig: Nivel de Significancia

Tabla 19: Análisis de varianza de una vía para los Riñones durante el estudio de toxicidad subcrónica del aceite de la almendra de capulín (Prunus serotina) y sus diferentes preparados

ANOVA								
RIÑONES								
	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F	Comparativo	F crítica	Diferencia Significativa	Sig.
Entre Grupos	0.103	4	0.02569	1.066	<	2.795	No	0.396
Dentro de los Grupos	0.554	23	0.0241					
Total	0.657	27						

F: Relación de variación
Sig: Nivel de Significancia

Tabla 20: Análisis de varianza de una vía para los Pulmones durante el estudio de toxicidad subcrónica del aceite de la almendra de capulín (Prunus serotina) y sus diferentes preparados

ANOVA								
PULMONES								
	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F	Comparativo	F crítica	Diferencia Significativa	Sig.
Entre Grupos	0.0044	4	0.001113	0.113	<	2.795	No	0.977
Dentro de los Grupos	0.227	23	0.009867					
Total	0.231	27						

F: Relación de variación
Sig: Nivel de Significancia



Tabla 21: Análisis de varianza de una vía para el Corazón durante el estudio de toxicidad subcrónica del aceite de la almendra de capulín (Prunus serotina) y sus diferentes preparados

ANOVA								
CORAZÓN								
	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F	Comparativo	F crítica	Diferencia Significativa	Sig.
Entre Grupos	0.126	4	0.0314	2.582	<	2.795	No	0.064
Dentro de los Grupos	0.28	23	0.121					
Total	0.405	27						

F: Relación de variación

Sig: Nivel de Significancia

Al obtener los resultados de la relación porcentual de los órganos como fueron el corazón, el hígado, los riñones y los pulmones con su respectivo análisis de varianza, se observa que no hay una diferencia significativa de los órganos extraídos con respecto al control, lo cual nos indica que a pesar de que en la literatura se menciona que principalmente los órganos que se ven afectados por el ácido erúxico son el corazón, el hígado y los riñones, en este estudio no se presenta una anomalía de estos órganos por la presencia de esta sustancia, la cual se encuentra presente en el aceite de la almendra de capulín (**Prunus serotina**). Además si se observan las tablas 13, 14, 15, 16 y 17, los valores de la relación porcentual de cada órgano de los diferentes preparados del aceite de la almendra de capulín son muy parecidos a la relación porcentual de los órganos del aceite control, lo cual concuerda con los resultados obtenidos al realizar el análisis de varianza.

Físicamente, el hígado, los riñones, los pulmones y el corazón no presentan ninguna anomalía, como diferente tonalidad de color, presencia de manchas, etc. Únicamente se observa que en el lote del aceite refinado uno de los ratones presenta un peso del corazón igual que el de los pulmones, lo cual no indica que sea por la presencia del ácido erúxico, sino quizás sea debido a la complejión del mismo ratón.

Por otro lado en el caso del aceite hidrogenado en tres de los ratones se observa la presencia de vesícula biliar grande (tabla 15), lo cual hace suponer, que al igual que el caso anterior, se deba a la complejión de los animales y no al



ácido erúxico, porque este no es un órgano que se vea afectado por este tipo de sustancia.

Estos resultados pueden venir a reafirmar las conclusiones que se obtuvieron en los parámetros hematológicos, indicando que el ácido erúxico que se encuentra presente en la parte lipídica de la semilla de capulín (**Prunus serotina**) es prácticamente “no tóxico” y no causa algún efecto adverso en el organismo.

5.2.1.3 ENERGÍA DIGERIBLE:

Al igual que en la relación porcentual de los órganos, esta parte del bioensayo se realizó en las últimas etapas del mismo. En el cual como se encuentra explicado en la metodología, en la determinación de este parámetro, se utilizaron tanto las muestras de estudio (aceite control y el aceite de capulín en sus diferentes preparados), como las heces (recolectadas los días 26 y 28 del bioensayo) de cada uno de los ratones que se utilizaron durante el bioensayo y que consumieron las muestras. Obteniendo los siguientes resultados (Tablas 22, 23, 24, 25 y 26).

Para la obtención de los resultados se hizo uso de los cálculos que se encuentran explicados en la metodología, así como de la curva de calibración del ácido benzoico (Fig 12) para la determinación del porcentaje de energía digerible.

Tabla 22: Energía digerible del aceite control (aceite de girasol) durante el estudio de toxicidad subcrónica del aceite de la almendra de capulín (**Prunus serotina**)

Clave	<i>kJ/g Heces</i>	<i>kJ/g Dieta</i>	<i>Total de Heces</i>	<i>Total de Alim Ing</i>	<i>EF(kJ)f</i>	<i>EI (kJ)i</i>	<i>% ED</i>
Co2	18.778	18.682	6.667	30.5	125.196	569.814	78.029
Co3	19.250		6.854	36.4	131.948	680.041	80.597
Co4	18.882		5.910	30.7	111.594	573.551	80.543
Co5	19.129		4.723	30.3	90.347	566.078	84.040
Co6	19.173		6.201	34.1	118.890	637.071	81.338
Promedio							80.909
Des Est							2.151
CV							2.659

EF(kJ): Energía fecal

EI (kJ): Energía ingerida

ED (kJ):Energía digerible



Tabla 23: Energía digerible del aceite refinado de la almendra de capulín durante el estudio de toxicidad subcrónica del aceite de la almendra de capulín (Prunus serotina)

Clave	<i>kJ/g Heces</i>	<i>kJ/g Dieta</i>	<i>Total de Heces</i>	<i>Total de Alim Ing</i>	<i>EF(kJ)f</i>	<i>EI (KJ)i</i>	<i>% ED</i>
Re1	18.670	18.510	5.617	30.3	105.066	560.870	81.267
Re2	16.520		6.156	30.0	101.699	555.316	81.686
Re3	19.169		5.386	30.5	103.242	564.572	81.713
Re5	19.041		4.220	25.0	80.352	462.764	82.636
Re6	18.859		6.629	32.4	125.011	599.742	79.156
Promedio							81.292
Des Est							1.295
CV							1.593

EF(kJ): Energía fecal

EI (kJ): Energía ingerida

ED (kJ):Energía digerible

Tabla 24: Energía digerible del aceite hidrogenado 5 min. de la almendra de capulín durante el estudio de toxicidad subcrónica del aceite de la almendra de capulín (Prunus serotina)

Clave	<i>kJ/g Mues</i>	<i>kJ/g Dieta</i>	<i>Total de Heces</i>	<i>Total de Alim Ing</i>	<i>EF(kJ)f</i>	<i>EI (kJ)i</i>	<i>% ED</i>
Hd5-1	19.413	21.350	5.880	30.2	114.154	644.761	82.295
Hd5-2	18.762		4.597	26.9	86.249	574.307	84.982
Hd5-3	16.923		4.905	24.7	83.002	527.337	84.260
Hd-54	19.274		5.429	26.6	104.630	567.902	81.576
Hd5-5	19.817		5.399	28	106.982	597.791	82.104
Hd5-6	19.281		5.519	25.1	106.413	535.877	80.142
Promedio							82.560
Des. Esta							1.780
CV							2.156

EF(kJ): Energía fecal

EI (kJ): Energía ingerida

ED (kJ):Energía digerible



Tabla 25: Energía digerible del aceite crudo de la almendra de capulín durante el estudio de toxicidad subcrónica del aceite de la almendra de capulín (Prunus serotina)

Clave	<i>kJ/g Mues</i>	<i>kJ/g Dieta</i>	<i>Total de Heces</i>	<i>Total de Alim Ing</i>	<i>EF(kJ)f</i>	<i>EI (kJ)i</i>	<i>% ED</i>
Cr1	18.689	21.873	6.453	34.1	120.594	745.872	83.832
Cr2	18.615		6.456	32.4	120.175	708.688	83.043
Cr3	18.367		6.230	32.9	114.428	719.625	84.099
Cr4	15.134		6.371	33.4	96.410	730.561	86.803
Cr5	17.901		7.132	32.1	127.662	702.126	81.818
Cr6	19.203		6.052	30.1	116.207	658.380	82.350
Promedio							83.657
Des. Esta							1.766
CV							2.111

EF(kJ): Energía fecal
 EI (kJ): Energía ingerida
 ED (kJ):Energía digerible

Tabla 26: Energía digerible del aceite hidrogenado 10 min. de la almendra de capulín durante el estudio de toxicidad subcrónica del aceite de la almendra de capulín (Prunus serotina)

Clave	<i>kJ/g Mues</i>	<i>kJ/g Dieta</i>	<i>Total de Heces</i>	<i>Total de Alim Ing</i>	<i>EF(kJ)f</i>	<i>EI (kJ)i</i>	<i>% ED</i>
Hd5-1	19.413	21.350	5.880	30.2	114.154	644.761	82.295
Hd5-2	18.762		4.597	26.9	86.249	574.307	84.982
Hd5-3	16.923		4.905	24.7	83.002	527.337	84.260
Hd-54	19.274		5.429	26.6	104.630	567.902	81.576
Hd5-5	19.817		5.399	28	106.982	597.791	82.104
Hd5-6	19.281		5.519	25.1	106.413	535.877	80.142
Promedio							82.560
Des. Esta							1.780
CV							2.156

EF(kJ): Energía fecal
 EI (kJ): Energía ingerida
 ED (kJ):Energía digerible



Tabla 27: Análisis de varianza de una vía de la energía digeribles de los diferentes preparados del aceite de la almendra de capulín (*Prunus serotina*) y del aceite control.

ANOVA ED (Energía Digerible)								
	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F	Comparación	Fcrit	Dif Sig	Sig.
Entre Grupos	37.387	4	9.347	2.198	<	2.796	No	0.101
Dentro de los Grupos	97.820	23	4.253					
Total	135.206	27						

F: Relación de variación

Dif. Signi: Diferencia Significativa

Sig: Nivel de Significancia

Como se puede observar en las tablas 22, 23, 24 , 25 y 26, los porcentajes de energía digerible de los preparados del aceite de la almendra de capulín (crudo, refinado e hidrogenados) son levemente mayores con respecto al control, pero a pesar de esto, al realizar el análisis de varianza de una vía para encontrar entre que preparados del aceite de la almendra de capulín existía diferencia significativa con respecto al control, se observa en la tabla 27 que no hay diferencia significativa entre estos preparados con respecto al control.

Por medio del resultado que se presenta en la Tabla 27, se puede deducir que la absorción de los nutrimentos que se transforman en energía no se ven afectado por la presencia del ácido erúxico que se encuentra en diferentes niveles en los preparados del aceite de la almendra de capulín, es decir, los nutrimentos se absorben por igual aun con la presencia del ácido erúxico o esta absorción de nutrimentos es muy similar a la que se observa con el aceite control (aceite de girasol).



Estos resultados pueden hacer suponer que a pesar de la presencia del ácido erúxico, que se encuentra en los diferentes preparados del aceite de la almendra de capulín (***Prunus serotina***), no afecta en la absorción de los nutrientes (como proteínas, carbohidratos, grasas, vitaminas etc.), los cuales posteriormente serán transformados en energía para la realización de diferentes actividades.

Este último resultado viene a confirmar los resultados obtenidos en la citometría hemática así como los de la relación porcentual de los órganos, indicando que el ácido erúxico que se encuentra en el aceite de la almendra de capulín se puede considerar como una sustancia relativamente “inocua”, la cual no produce ningún daño en el organismo o lo produce en muy bajo nivel. De esta manera es posible obtener el valor denominado Noel el cual nos indica la dosis más alta en donde no se manifiesta efecto tóxico y así contar con otro valor que nos indique la relativa inocuidad que presenta el ácido erúxico en el aceite de la almendra de capulín (***Prunus serotina***) en sus diferentes preparados.

La obtención del parámetro denominado Noel se obtiene tomando en cuenta las siguientes cuestiones:

- De la tabla 9 se puede obtener el peso final de cada uno de los animales de estudio, cuyo promedio es de 28.151 g (0.028152 kg) y de esta misma tabla se puede obtener el promedio del alimento ingerido el cual es de 9.225 g/día.
- Se colocó un 7.64% del concentrado lipídico de cada uno de los preparados del aceite de la almendra de capulín (***Prunus serotina***) en los pellets que funcionaron como el vehículo de administración por vía oral.
- De un estudio previo se obtuvo el perfil lipídico, observando que es en el aceite refinado de la almendra de capulín en donde se presenta un mayor porcentaje del ácido erúxico (6.8446%).



Es así que con los datos anteriores es posible obtener el parámetro denominado Noel para el ácido erúcido presente en el aceite de la almendra de capulín (*Prunus serotina*), que al ser de **1713.617 mg/día kg p.c**, indica cual sería la dosis más alta en donde no se observaría efecto tóxico, es decir de la relativa inocuidad de esta sustancia.

Este parámetro se obtiene de la siguiente manera:

$$(7.60\% \text{ concentrado lipídico}) \times \left(\frac{9.225 \text{ g / día}}{100\% \text{ concentrado lipídico}} \right) = 0.70110 \text{ g / día}$$

$$(6.8446\% \text{ de ácido erúcido}) \times \left(\frac{0.7110 \text{ g / día}}{100\% \text{ ácido erúcido}} \right) = 0.04799 \text{ g ácido erúcido / día}$$

$$\frac{0.04799 \text{ g ácido erúcido}}{0.02815 \text{ kg p.c}} = 1.7138 \text{ g ácido erúcido / día kg de p.c}$$

$$\left(\frac{1.7138 \text{ g ácido erúcido}}{\text{día kg de p.c}} \right) \times \left(\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \right) = 1713.83 \text{ mg ácido erúcido / día kg de p.c}$$



6. Conclusiones:

- * La extracción del aceite de la almendra de Capulín (**Prunus serotina**) en un dispositivo tipo Soxhlet y utilizado como disolvente hexano, fue relativamente adecuado, porque se obtiene un rendimiento o bien un porcentaje de aceite muy cercano (39.71%) al reportado por la literatura (40%).
- * Es en el proceso de refinación (filtración, desgomado, neutralizado y blanqueo) del aceite de la almendra de Capulín (**Prunus serotina**) donde observamos que el rendimiento es adecuado (52.85%, si consideramos que el 100% representa un buen rendimiento) esto debido a que es en este proceso de purificación en donde el aceite presenta más manipulaciones, haciendo que el aceite quede impregnado en el material utilizado. Por lo que se recomienda el uso del disolvente empleado durante la extracción (hexano) con el fin de poder extraer el aceite impregnado, refinarlo nuevamente y de esta manera aumentar el rendimiento.

La prueba de toxicidad subcrónica realizada con la dosis de 15g/kg de p.c del aceite de la almendra de Capulín (**Prunus serotina**) en sus diferentes preparados (crudo, refinado e hidrogenados), administrados por vía oral en ratones por medio de pellets, permite concluir que el material biológico evaluado, en particular a nivel del ácido erúxico, es relativamente “no tóxico”, debido a que:

- * No influye en el crecimiento de los animales, ni en el consumo del alimento, porque no se observa diferencia significativa de los diferentes preparados del aceite de la almendra de Capulín (crudo, refinado e hidrogenados) con respecto al control (aceite de girasol).



-
-
- * A pesar de las variaciones presentadas en cada uno de los parámetros considerados de importancia en la citometría hemática, el ácido erúxico presenta una ligera disminución a nivel de hemoglobina, del número de leucocitos y del número de eritrocitos, pero no provoca la muerte de los animales de estudio y además permite el crecimiento de los mismos, por lo tanto no representa un factor de riesgo en la sangre y por consiguiente para la cardiopatía coronaria, lo que es indicativo de la baja toxicidad del material evaluado.
 - * En la relación porcentual de los órganos como fueron el corazón, los pulmones, los riñones y el hígado, los cuales pueden verse afectados por la presencia de ácido erúxico, se observa que estos órganos extraídos de los ratones que fueron alimentados con el aceite de la almendra de Capulín (***Prunus serotina***) en sus diferentes preparados (crudo, refinado e hidrogenado) no presentan una diferencia significativa con respecto al control (aceite de girasol), comprobando de esta manera que los preparados estudiados son relativamente inocuos.
 - * En la obtención de la energía digerible, se observa que a pesar de la presencia del ácido erúxico, que se encuentra en los diferentes preparados del aceite de la almendra de Capulín (***Prunus serotina***), no afecta la absorción de los nutrientes que son aportados por los pellets (proteínas, carbohidratos, grasas, etc.), los cuales posteriormente serán transformados en energía por la ejecución de diferentes actividades en el organismo.



Este estudio de toxicidad subcrónica del aceite de la almendra de Capulín (***Prunus serotina***) en sus diferentes preparados, viene a confirmar el resultado de la toxicidad aguda de la relativa inocuidad del nivel del ácido erúxico en el aceite de la almendra de capulín (***Prunus serotina***) crudo, refinado, hidrogenado 5 minutos e hidrogenado 10 minutos, ya que no se mostraron signos de toxicidad, considerándolos relativamente inocuo por vía oral tanto a corto como mediano plazo.

Nota: La medición del ácido erúxico se realizó en un estudio previo (Prior, 2004) en el cual se determinó la toxicidad aguda del ácido erúxico presente en la almendra de Capulín y en sus diferentes preparados, así como la determinación de la cantidad de este ácido por medio de la obtención de un perfil de ácido grasos haciendo uso de la cromatografía de gases.



7. APÉNDICE

Apéndice 1

Análisis Proximal

Análisis Proximal de la Almendra Integral de Capulín obtenida de un estudio previo (Alvarado, 1999)

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

*Para proteína se uso el factor de 6.25

Análisis Proximal de la Harina Integral y Desengrasada de la Almendra de Capulín (g/100 muestra) (Lara, 2003)

Muestra	Humedad	Proteína	Grasa	Cenizas	Fibra	Carbohidratos
Harina Integral	3.03	27.96	44.99	2.52	6.59	14.91
Harina Desengrasada	4.03	85.81	6.32	3.95	7.05	29.84



Apéndice 2

Composición e Información de los pellets utilizados durante el presente estudio

Composición de los pellets*

Determinación	Porcentaje (%)
Humedad	12.00
Proteína	18.80
Grasa	6.00
Fibra	3.80

*Elaborado por Harlan Laboratories Inc. (Alimento Teklad Global para roedores. Esterilizable. (Código: 2018S)).

INGREDIENTES: Trigo molido, maíz molido, aceite de trigo, harina de soya descascarillada, harina de gluten de maíz, aceite de soya, carbonato de calcio, levadura de cerveza deshidratada, fosfato dicálcico, sal yodada, L-lisina, DL-metionina, cloruro de colina, mononitrato de tiamina, biotina, niacina, acetato de vitamina A, clorhidrato de piridoxina, suplemento de vitamina D3, ácido fólico, complejo de bisulfito sódico de menadiona (fuente de vitamina K funcional), pantotenato de calcio, suplemento de vitamina E, suplemento de vitamina B12, riboflavina, sulfato ferroso, óxido de magnesio, óxido de manganeso, óxido de zinc, sulfato de cobre, yodato de calcio, carbonato de cobalto, sulfato crómico de potasio, caolín.

INDICACIONES: Alimento completo y balanceado para ratas, ratones y hámsteres. La cantidad de alimento que comerá el roedor depende de la cepa y tamaño; siempre deberá tener disponible agua limpia y fresca.

Nota: La información que es descrita en párrafos anteriores se obtuvo del empaque del producto (pellets) y de la página web de Harlan.





8. BIBLIOGRAFÍA:

- Anónimo. *Producción, análisis y control de calidad de los aceites y grasas comestibles*. Ed Madrid Vicente. Madrid, p.p 19-20, 284-292 (1988).
- Aguilar, A.A y Zolla, C. *Plantas tóxicas de México*. División de Información Etnobotánica del IMSS. México, D.F, p.p 173-175 (1982).
- Alvarado. Hernández. E.L *Evaluación toxicológica de la fracción proteínica de la almendra de Capulín (**Prunus serotina**)*. Tesis de la Facultad de Química de la UNAM, México D.F (1999).
- Álvarez. M.A. *Evaluación bromatológica y toxicológica del aceite de la semilla de Cacahuanano (**Gliricidia sepium**)*. Tesis de la Facultad de Química de la UNAM, México D.F. (2002).
- Ayllón M.F *Obtención de un extracto enzimático con actividad B-glucosidasa a partir de la semilla de capulín (**Prunus serotina**)*. Tesis de la Facultad de Química de la UNAM, México, D.F (1995).
- Badui. D *Química de Alimentos*. Ed. Pearson. Educación. 3ª Edición. México D.F., p.p 233-244 (1999).
- Barbosa. A.L. *Perfil de ácidos grasos del aceite de la almendra de Capulín (**Prunus serotina**)*. Tesis de la Facultad de Química de la UNAM, México, D.F. (2003).
- Belitz, H.D. *Química De Alimentos*. Ed Acribia, 2ª Edición. Zaragoza, p.p 132-206, 691-723. (1997).
- Bostid. F.R *The crops of incas*. National Academy Press. Washington D.C, p.p 162-189 (1989).
- Castillo C.J *Caracterización bromatológica de varias semillas de frutos con potencial aporte de proteína y grasa dietética*. Tesis de la Facultad de Química de la UNAM, México, D.F. (1997).
- Cervera, P. *Alimentación y dieta terapia*. Ed Mc Graw Hill, 2ª Edición, p.p 3-16 (1993).
- Coffin, L.D. *Laboratorio clínico en medicina veterinaria*. Edit. La prensa medica mexicana. 4ª Edición. México. D.F., p.p 232-233 (1986).
- Conn E.E. *Cianogenic glucosides in: Toxicants occurring naturally in food*. National Academic of Science. 2ª Edición. Washington D.C, p.p 290-308 (1973).
- De la Hidalga. C. *Evaluación toxicológica de la fracción proteínica de la semilla de Cacahuanano (**Gliricidia sepium**)*. Tesis de la Facultad de Química de la UNAM, México, D.F (2003).
- Derache, R. *Toxicología y seguridad de los alimentos*. Ed. Omega. Barcelona, p.p 1-6, 57-72 (1990).
- Desrosier N. *Elementos de Tecnología de Alimentos*. CECSA. México, D.F, p.p 523 y 531. (1997).



-
-
- Dintzis F.R, Lehrferld, J, Nelsen, T, Finney P. *Phyate content of soft wheat brans as related to kernel size, cultivar, localitation and milling and flour quality parameters*. Cereal Chem, 69,5, p.p. 577-581 (1992).
 - Fennema. O. *Química De Alimentos*. Ed Acribia. Zaragoza, p.p 158-161, 221-261. (1993).
 - Granados, D y López G. *Agroecología*. U.A de Chapingo, Texcoco, p.p 37-166. (1996).
 - Govind, A.D. *Naturally occurring food toxicant: Toxic lipids. Progress lipids research*. Vol 19. Ed. Lewis publishers, p.p 107-118 (1981).
 - Hernández. E. *Aspectos nutricionales de los ácidos grasos "trans"*. Rev. Assoc. Nal. Ind. Aceites y Mantecas, 37, p.p 4-16. (1998).
 - Hilditch. T.P. *The Chemical Constitution of Natural Fats*. Ed. Chapman and Hall. 3ª Edición. Londres, p.p 223-227, 511-512. (1956).
 - Johnson R. and Fritz E. *Fatty Acids in Industry*. Ed. Macel Dekker. N.Y., p.p 17-19, 635-640 (1989).
 - Kamel B y Kakuda Y. *Characterization of seed oil and meal from apricot, cherry, nectarinen, peach and plum*. JAOCS 69(5), 492-494 (1992).
 - Klaseen C., Amdur, M and Doull J. *Casarett and Doull's toxicology (the basic science of poisons)*. Ed. MacGraw-Hill, 5ª Edición. N.Y , p.p 3-32 (1995)
 - Keilens. M y Hendrix M. *Desarrollo en la modificación de grasas características y beneficios de la hidrogenación, interestificación-fraccionamiento*. México, D.F. p.p 1-25 (1996)
 - Kirk, S y Sawyre R. *Composición y análisis de los alimentos*. Ed. Pearson Continental, 2ª Edición. Barcelona, p.p 25-27, 65-69, 685-708 (1996).
 - Lara. A. *Evaluación nutritiva de la fracción proteínica de la almendra de Capulín (*Prunus serotina*)*. Tesis de la Facultad de Química de la UNAM, México D.F (2003).
 - Lansdown A. *Animal husbandry. In Experimental toxicology (the Basic issues)*. Ed. Anderson D and Conning, 2ª Edición. Cambridge, p.p 82-106 (1993).
 - Li Chun P, Swain E y Poulton, J. *Prunus serotina amygdalin hydrolase and prunasin hydrolase*. Plant Physiol, 100 (1), 282-290. (1992).
 - Liener. I.L. *In Legumes chemistry (chemistry, technology and human nutrition)*. Ed. Board. p.p 339-370 (1989).
 - Liener. I.E. *Toxics constituents of Plants Foodstuffs*. Academic Press. N.Y, p.1-5 (1980).
 - Linder, E. *Toxicología de Alimentos*. Ed. Acribia. 2ª Edición. Zaragoza, p.p 1-103 (1995).
 - Linner E. *Toxicología de Alimentos*. Ed. Acribia. 2ª Edición. Zaragoza, p.p 14-90 (1980).



-
-
- Litchfield J.T., Wilcoxon F, *A simplified method of evaluating dose-effect experiments*. Pharmacol. Exp. Therap, 99-113 (1949).
 - López E.N *Determinación de factores tóxicos en varias almendras no tradicionales con potencial aporte de proteína y grasa dietética*. Tesis de la Facultad de Química de la UNAM, México D.F (2000).
 - Lu F.C., *Toxicología Básica. Riesgos por exposición a sustancias tóxicas*. Ed. Harla, México D.F., p.p. 1-7, 55-62. (1995)
 - Martínez M. *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. Fondo de Cultura Económica. México D.F, p.p 626, 1232 (1987).
 - Mattson. F. H. *Toxicants occurring naturally in foods*. Ed. National Academy of Science, 2ª Edición. Washington D.C, p.p 189-191. (1973).
 - Mendoza B. *Validación de una metodología para la determinación de ácido fítico en alimentos*. Tesis de la Facultad de Química de la UNAM, México, D.F. (2001).
 - Miller D.S, Payne P.R. *A Ballistic bomb calorimeter*. Br. J. Nutr. 13 (501). (1959).
 - Miller L.C. and Tainter M.L. *Estimation of the DL₅₀ and error by means of logarithmic probit graph paper*. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med, 57, p. 261-264 (1944).
 - Nava. R y Rodríguez R. *Composición química y contenido de compuestos tóxicos termolábiles en dos variedades de frijol*. Tesis de la Facultad de Química de la UNAM, México, D.F. (1988).
 - Ortiz. V.A. *Evaluación toxicológica y bioensayo nutritivo preliminar de la almendra de Calabaza (**Curcubita argyrosperma**) consumida en Cuetzalan Puebla*. Tesis de la Facultad de Química de la UNAM, México, D.F (2005).
 - Primo Yúfera E. *Química Agrícola III Alimentos*. Ed. Alhambra. Zaragoza., p.p 189-190. (1979)
 - Prior Crespo. C. *Destoxificación del Aceite crudo de la almendra de Capulín (**Prunus serotina**) y su evaluación toxicológica aguda*. Tesis de la Facultad de Química de la UNAM, México, D.F (2004)
 - Repetto M. *Toxicología fundamental*. Ed. Científico-Médica. Barcelona España, p.p 21-32 (1991).
 - Robinson, S. *Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos*. Ed. Acribia. Zaragoza, p.p 107-141, (1991)
 - Ruiz. A.G. *Fundamentos de Hematología*. Ed. Medicina panamericana. 1ª Edición. México, D.F, p.p 25-35. (1995).
 - Ruiz C.A. *Evaluación Bromatológica y toxicológica de la fracción lipídica de la almendra de Capulín (**Prunus serotina**)*. Tesis de la Facultad de Química de la UNAM, México, D.F (2000).
 - Shibamoto, T y Bjeldanes F. L. *Introducción a la toxicología de los alimentos*. Ed. Acribia. Zaragoza, p.p 1-2, 22-26, 28-31 (1996).



-
-
- Shirlyn, B. *Hematología clínica*. Ed. Manual Moderno. Colombia. p.p 1-3 (1991)
 - Shouthgate D.A.T *The relationship between food composition and available energy*. Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation on Energy and Protein Requirements. Rome, p.p 1-11 (1981).
 - Swain E and Poulton J. *Utilization of amygdalin during seedling development of **Prunus serotina***. Plant Physiol, 106, p. 437-445. (1994).
 - Tunçel G, Nout M, and Brimer L. *Degradation of cyanogenic glucosides of bitter apricot seeds (**Prunus armeniaca**) by endogenous and added enzymes as affected by heat treatments and particle size*. Food Chem, 63, p. 65-69 (1998).
 - Villela, O y Gerez P. *Biodiversidad y conservación en México*. Ed. Técnico Científicas SA DE CV UNAM. 2ª Edición. México, D.F, p.p 7-34, 269-276. (1994).
 - Watson, S y Ramstad P. *Corn Chemistry and Technology*. American Association of Cereal Chemist, Minnesota p.p 539-543(1987).
 - Wong, W.S. *Química de Alimentos, Mecanismos y Teoría*. Ed. Acribia. Zaragoza, p.p 18-22. (1995).
 - Ziller S. *Grasas y aceites alimentarios*. Ed. Acribia. Zaragoza, p.p 1-11, 35-47. (1996).

Sitios Consultados

- www.victusinc.com/Coferencias/L%C3%ADpidos.html. **Muñoz. N. Lípidos. (2009). (3 de Febrero del 2009) (Buscado Google)**
- www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-7518200800... **Valenzuela B. Alfonso. Ácidos Grasos con Isomería Trans I, su origen y los efectos en la Salud Humana. Revista Chilena de Nutrición. V. 35 N. 3. Santiago (2008) (4 de Febrero del 2009) (Buscador Google)**
- www.botanical-online/medicinalesacidosgrasosesenciales.. **Ácidos grasos esenciales (30 Abril 2009) (Buscador Google)**
- www.sefh.es/revistas/vol20/n1/1-7.PDF. **García J. et al. Aceite de Lorenzo en el tratamiento de la Adenoleucodistrofia ¿Esperanza o Realidad?. Farm. Hosp. 20 (1). p. 1-7 (1996). (26 de Abril del 2009) (Buscador Google).**
- www.solamantenimiento.com/articulos/tecnicas-filtración.htm. **Filtración. Técnicas de Filtración. Filtros y sistemas de filtrado (27 de Abril del 2009) (Buscador Google).**
- http://www.harlan.com/research_models_and_services/laboratory_animal_diets/teklad_global_diets/global_rodent_diets/Teklad_global_18_rodent_diet_sterilizable_2018s.hl. **2018S Teklad Global 18% Protein Roedent Diet (Sterilizable) (29 de Abril del 2009) (Buscador Google).**