

00381



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

43

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**CARACTERIZACIÓN  
BROMATOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA  
DE 7 ESPECIES DE LUPINOS DEL  
OCCIDENTE DE MÉXICO**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)**  
**P R E S E N T A:**  
EL M. en C. MARIO ALBERTO RUIZ LOPEZ

MÉXICO, D.F.

2001

2016747



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**CARACTERIZACIÓN  
BROMATOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA  
DE 7 ESPECIES DE LUPINOS DEL  
OCCIDENTE DE MÉXICO**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)**  
**P R E S E N T A:**  
**EL M. en C. MARIO ALBERTO RUIZ LOPEZ**

**DIRECTORA DE TESIS:**  
**M. en C. ANGELA SOTELO LÓPEZ**

**MÉXICO, D.F.**

**2001**

**Comité tutorial:**

**M. en C. Angela Sotelo López**

**Dra. María Cristina Pérez Amador-Barron**

**Dra. Gloria Davila Ortiz**

**Dra. Evangelina Camacho Frías**

**Jurado asignado:**

**Presidente: Dra. María Cristina Pérez Amador-Barron**

**Primer Vocal: Dr. Federico Alfredo García Jiménez**

**Segundo Vocal: M. en C. Angela Sotelo López**

**Tercer Vocal: Dra. Evangelina Camacho Frías**

**Secretario: Dra. Gloria Davila Ortiz**

**Suplente: Dr. Guillermo Laguna Hernández**

**Suplente: Dra. Alicia Enriqueta Brechu Franco**

**Lugar donde se desarrollo el tema:**

**Laboratorio 111 Edificio E, Facultad de Química, UNAM**

### **Agradecimientos:**

Especialmente a mi familia, que tanto me apoyo en los momentos difíciles.

A mi comité tutorial, por el tiempo invertido, sus consejos y guía para la realización del presente trabajo.

Con todo mi respeto y admiración a la M. en C. Angela Sotelo López, por su comprensión, paciencia y dedicación a la presente tesis.

A todos mis amigos del laboratorio 111, Rosita, Lety, Sra. Vicky, Chela, Bernardo, así como a Lucy y Héctor mis amigos del bioterio, gracias por su ayuda.

A mis ex-compañeros de alegrías y tristezas: Lupita, Luis, Veronica, Arturo, Norberto, Lorena, Bety, Aida, Lulu, Iliana, Liliana, Hayme, Ivonne y todos aquellos que contribuyeron de alguna manera con su amistad.

A mis amigos y compañeros del CUCBA-U. de G. Pancho, Chuy, Pedro, Armando, Sergio, Lucy, Ramon, Jacinto, Carmelita y otra lista muy larga, gracias.

A la UNAM, por abrirme las puertas y darme la oportunidad de formarme en un postgrado.

Al CONACYT, por otorgarme una beca para la obtención del grado.

A los que involuntariamente omití, muchas gracias

## INDICE GENERAL

INDICE DE CUADROS	III
INDICE DE FIGURAS	IV
RESUMEN	V
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	5
▪ Aspectos botánicos y origen del género <i>Lupinus</i>	5
▪ Aspectos agronómicos	9
▪ Cultivo y uso de los lupinos en Europa	10
▪ Cultivo y uso de los lupinos en América	11
▪ Cultivo y uso de los lupinos en otras partes del mundo	13
▪ Composición química y nutricional de los lupinos	14
▪ Alcaloides presentes en los lupinos	16
▪ Estudio de los lupinos en México	25
JUSTIFICACIÓN	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
HIPÓTESIS	29
OBJETIVO GENERAL	30
OBJETIVOS PARTICULARES	30
MATERIAL Y MÉTODOS	31
▪ Colecta del material vegetal	31
▪ Análisis químico proximal	35
▪ Determinación de aminoácidos	34

▪ Análisis de sustancias antinutricionales y tóxicas	35
▪ Destoxificación de semillas de lupinos	36
▪ Prueba de toxicidad aguda	38
▪ Prueba de relación de eficiencia proteica	39
<b>RESULTADOS</b>	42
▪ Análisis químico proximal	44
▪ Aminoácidos	46
▪ Factores antinutricionales y tóxicos	48
▪ Alcaloides	49
▪ Destoxificación de semillas	59
▪ Toxicidad aguda	63
▪ Relación de eficiencia proteica	64
<b>DISCUSIÓN</b>	65
<b>CONCLUSIONES</b>	78
<b>ANEXOS</b>	80
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	100

## Índice de cuadros

1- Composición proximal en semillas de lupinos	14
2- Métodos de destoxificación de lupinos	24
3- Intervalos de toxicidad	38
4- Composición de las dietas experimentales	41
5- Distribución y usos regionales de lupinos de Jalisco	43
6- Composición proximal de especies de Jalisco	45
7- Contenido de aminoácidos en semillas de lupinos	47
8- Factores antinutricionales y tóxicos en lupinos	49
9- Contenido de alcaloides en especies de Jalisco	50
10- Contenido de alcaloides en semillas de lupinos tratadas	60
11- Efecto de la extracción térmica sobre los alcaloides en semillas	61
12- Contenido de alcaloides y proteína en semillas con la destoxificación andina tradicional	63
13- Toxicidad aguda de semilla de lupinos silvestres	64
14- Relación de eficiencia proteica de semillas destoxificadas de lupinos	64

## Índice de figuras

1- Distribución geográfica de las especies de lupinos	8
2- Estructuras de los alcaloides quinolizidínicos	17
3- Dibujo de la planta de <i>Lupinus exaltatus</i>	32
4- Dibujo de la planta de <i>Lupinus rotundiflorus</i>	32
5- Dibujo de la planta de <i>Lupinus splendens</i>	33
6- Cromatograma de los estándares de alcaloides quinolizidínicos	51
7- Cromatograma de los alcaloides quinolizidínicos de <i>L. elegans</i>	52
8- Cromatograma de los alcaloides quinolizidínicos de <i>L. exaltatus</i>	53
9- Cromatograma de los alcaloides quinolizidínicos de <i>L. reflexus</i>	54
10- Cromatograma de los alcaloides quinolizidínicos de <i>L. rotundiflorus</i>	55
11- Cromatograma de los alcaloides quinolizidínicos de <i>L. simulans</i>	56
12- Cromatograma de los alcaloides quinolizidínicos de <i>L. splendens</i>	57
13- Cromatograma de los alcaloides quinolizidínicos de <i>L. spp.</i>	58
14- Contenido de alcaloides con extracciones térmicas	62

## RESUMEN

En el presente estudio se analizó la composición proximal, contenido de aminoácidos, factores antinutricionales y tóxicos incluyendo alcaloides quinolizidínicos en semillas de 7 especies de *Lupinus* mexicanos. Asimismo se evaluaron tres métodos sencillos de destoxificación para disminuir el contenido de alcaloides y se realizó una prueba de toxicidad aguda y otra de relación de eficiencia proteínica (PER), para conocer la toxicidad y valor proteico de las semillas de las especies en estudio. Los resultados revelaron un alto porcentaje de proteína cruda (37-45%) y de proteína verdadera (de 28 a 33 %), correspondiendo los mayores valores a *L. elegans*. No se encontraron glucósidos cianogénicos y los niveles de lectinas, inhibidores de tripsina y taninos fue escaso. La lupanina fue el alcaloide principal en la mayoría de las especies estudiadas, destacando *L. rotundiflorus* con 11.47 mg/g de muestra, mientras que la esparteína fue el alcaloide mayoritario en *L. reflexus* con 26.63 mg/g de muestra. No se encontró citisina en ninguno de los lupinos estudiados. En *L. elegans* y *L. splendens* los alcaloides mayoritarios fueron desconocidos. El perfil de aminoácidos reveló que la metionina fue el aminoácido limitante, pero se observó contenidos aceptables de lisina y triptofano comparables con el patrón de la FAO. El método de destoxificación por extracciones térmicas sucesivas, fue el que dió mejores resultados, con una eliminación de alcaloides cercana al 95%. *L. reflexus* mostró la más alta toxicidad, mientras que *L. elegans* no exhibió toxicidad aguda. La relación de eficiencia proteica de la semilla destoxificada en los lupinos estudiados fue baja (1.06-1.5). Lo anterior sugiere que los lupinos mexicanos estudiados representan una fuente importante de proteína para la alimentación humana o animal, una vez que los alcaloides sean removidos y la proteína suplementada adecuadamente.

## INTRODUCCIÓN

El problema alimentario en México es muy complejo, por lo que se deben plantear diferentes alternativas para su solución. Una de las principales es la búsqueda de nuevas fuentes de alimentos de origen vegetal, lo que implica un estudio de las numerosas especies comestibles.

En México se cuenta con una extensa diversidad florística, en donde muchas especies o parte de ellas son utilizadas como alimento; lo que significa que se podría tener aprovechamiento más amplio de recursos vegetales, utilizando un gran número de especies cultivadas y silvestres. La producción actual de alimentos en México se basa en el cultivo de unas cuantas especies, lo que a largo plazo resulta en una producción alimentaria ineficiente, además de un fuerte deterioro ecológico y una pérdida de importantes recursos vegetales para la solución de esta problemática (Caballero, 1984).

Las Fabaceas (leguminosas) han probado como fuente económica de proteínas y aceites sustituyendo a los de origen animal, que son costosos, por lo que han sido utilizadas como alimento para humanos y animales domésticos durante miles de años y para los pobladores de muchas regiones del mundo constituyen la principal fuente de este nutrimento (Bourdillon, 1998).

Las especies utilizadas para este propósito representan un pequeño porcentaje del total de especies que existen en el mundo. En México, se han realizado estudios nutricionales en leguminosas silvestres, que podrían cubrir las futuras demandas de alimento (Giral *et al.*, 1978; Ruiz y Zamora 1993; Zamora y Ruiz 1993).

Algunos investigadores han considerado el estudio, cultivo y utilización de especies de los géneros *Phaseolus*, *Arachis*, *Centrosema*, *Stylosanthes* y *Lupinus*, entre otros (Martínez, 1991).

Diversas especies del género *Lupinus* han sido cultivadas y utilizadas regionalmente durante siglos en diversos países, como una fuente de alimento para humanos y sus animales domésticos, sin embargo por razones políticas, sociales y económicas su cultivo nunca se ha dado en forma extensiva (Watkin, 1984).

Los lupinos juegan un papel importante en la agricultura de diversos países, ya que son importantes para el mantenimiento de la fertilidad y recuperación de los suelos degradados y pobres (Haq, 1993).

De las aproximadamente 400 especies de lupinos que existen en el mundo, cuatro de ellas se utilizan como cultivos comerciales: *L. albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus*, en la zona del Mediterráneo y *L. mutabilis* (la única de América); recientemente se han domesticado *L. consentinii* y *L. polyphyllus*, pero aún no se utilizan en forma comercial; así mismo *L. pilosus* y *L. nootkatensis* se encuentran en este proceso, todas ellas de Europa (Buirchell y Cowling, 1998; Freyr y Helgadottir 2000). Otras especies del viejo mundo, como *L. pricei* y *L. atlanticus* presentan características asociadas a la domesticación, pero en la actualidad no se conocen cultivos de estas especies (Planchuelo, 1994).

Desde el punto de vista nutritivo, las semillas de los lupinos presentan un buen potencial alimentario, ya que las variedades cultivadas contienen altas concentraciones de proteína (35-45%) y de aceites (6-20%), similares a los de la soya (*Glycine max* (L) Merr), por lo que se sugiere que los lupinos podrían suplirla,

la ventaja de que éstos pueden crecer en suelos y condiciones agro climáticas favorables para la soya, lo que hace que los lupinos sean un recurso valioso para la alimentación de monogástricos y rumiantes en los sistemas productivos intensivos, por lo que podrían ser económicamente competitivos con la soya (Haq, 1993).

*L. albus* (lupino blanco) es la especie mayormente cultivada, sus semilla se destinan principalmente a la alimentación animal, aunque en algunos países se utiliza para consumo humano en productos tanto para niños como para ancianos, panes, galletas y espagueti enriquecidos con proteína y fibra de harina de lupino (Rayas *et al.*, 1996; Egaña *et al.*, 1992; Villegas *et al.*, 1982; Bunge *et al.*, 2000); también se ha utilizado como análogo de leche y yogurt (Camacho, 1986), como en dulces de chocolate hiperproteicos para deportistas a partir de semilla molidada y aislado de proteína de lupino (Wittig *et al.*, 1993).

La única especie utilizada de América es *L. mutabilis* que fue domesticada por los pobladores del periodo pre-inca hace más de 1500 años y ha contribuido significativamente al suministro de proteínas en la región andina de Perú, Bolivia y Ecuador y junto con el maíz, papa y quinoa fue la base de la dieta de estos pobladores (NAS, 1989; Gross y Bear 1977; Manzanares y Estrella, 1985).

Las especies silvestres de lupinos presentan un sabor amargo, debido a su alto contenido de alcaloides quinolizidínicos, principalmente lupanina y esparteina. Si se consumen estos alcaloides en altas dosis pueden provocar condiciones tóxicas e incluso la muerte. Otros componentes antifisiológicos, como lectinas, glucósidos cianogénicos, saponinas e inhibidores de tripsina no se encuentran en

cantidades suficientes para provocar alteraciones, además de que la mayoría de estos compuestos desaparecen con tratamientos térmicos. Los alcaloides son la principal limitante para utilizar a los lupinos como alimento (Muzquiz *et al*, 1989).

De acuerdo con el contenido de alcaloides, los lupinos se agrupan en lupinos dulces, con menos de 0.02%, semidulces de 0.02-0.2 y amargos mayores a 0.2% de alcaloides totales. En el caso de los lupinos silvestres llegan a presentar hasta 4% o más (Haq, 1993). La toxicidad de la planta depende del tipo de alcaloide presente, ya que la lupanina y la esparteína son los más tóxicos y su concentración puede variar de acuerdo a la especie, genotipo, parte de la planta, procedencia y etapa fenológica (Kinghorn *et al.*, 1980; Hatzold *et al*, 1983; Hatfield *et al.*, 1985; Mohamed *et al.*, 1991; Muzquiz *et al*, 1994).

Para evitar el efecto tóxico de los alcaloides, se han desarrollado métodos que permiten eliminarlos o disminuirlos a niveles inocuos, utilizando tratamientos químicos, físicos y biológicos (Lucisano *et al.*, 1984; Rahma y Narasinga, 1984; Agosin *et al*, 1989; Chango *et al*, 1993a; Chango *et al*, 1993b; Santana *et al*, 1999).

Con el mismo propósito se han desarrollado variedades mejoradas genéticamente de las especies cultivadas (Jambrina, 1983). Sin embargo, el desarrollo de estas variedades ha ocasionado que estos cultivos sean más dependientes de pesticidas químicos, representando problemas económicos y ambientales (Vilariño *et al.*, 1999), por lo que diversos autores han realizado estudios para extraer y utilizar los alcaloides como pesticidas biológicos o en farmacología (Peretiatkowics *et al.*, 1994; Wink, 1994).

Por otra parte, en México se han realizado pocos estudios en este género y principalmente no se tienen reportes del uso de los lupinos en la alimentación humana, sólo Martínez (1959) reporta que hojas de *L. elegans* son consumidas como forraje por caballos. Asimismo, se ha reportado que la especie mexicana *L. ehrenbergii*, comercialmente conocida como *L. hartwegii*, tiene uso ornamental (Kart, 1952), esta especie y *L. elegans* fueron parte de un programa de cruzas interespecíficas con *L. mutabilis* (Romer y Deesbach, 1988). Otras especies como *L. alpineus*, *L. campestris* y *L. mexicanus*, son consideradas por Dunn (1979) estrechamente relacionadas con *L. ehrenbergii* quien realizó cruzas entre ellas.

Debido a la poca información generada en México acerca de las especies de este género, tan importante en Europa y Sudamérica, es necesario hacer estudios para evaluar la composición química, nutricional y toxicológica de los lupinos mexicanos así como desarrollar métodos de eliminación (o utilización) de alcaloides para emplearlos como fuente de proteína en la alimentación humana o animal, principalmente donde abundan estas especies, así como generar un conocimiento fitoquímico que pueda ser útil a propósitos quimiotaxonómicos en este género.

## ANTECEDENTES

### ASPECTOS BOTÁNICOS Y ORIGEN DEL GENERO *Lupinus*

Los lupinos son leguminosas que se caracterizan por ser plantas anuales o perennes, herbáceas o arbustivas, rara vez arbóreas, con flores vistosas de color blanco o violáceo.

No se conoce el número exacto de especies de lupinos. Algunos consideran hasta 500 taxones. El número de nombres botánicos para este género es arriba de

Por otra parte, en México se han realizado pocos estudios en este género y generalmente no se tienen reportes del uso de los lupinos en la alimentación humana, sólo Martínez (1959) reporta que hojas de *L. elegans* son consumidas como forraje por caballos. Asimismo, se ha reportado que la especie mexicana *L. ehrenbergii*, comercialmente conocida como *L. hartwegii*, tiene uso ornamental (Kart, 1952), esta especie y *L. elegans* fueron parte de un programa de cruzas interespecíficas con *L. mutabilis* (Romer y Deesbach, 1988). Otras especies como *L. alpineus*, *L. campestris* y *L. mexicanus*, son consideradas por Dunn (1979) estrechamente relacionadas con *L. ehrenbergii* quien realizó cruzas entre ellas.

Debido a la poca información generada en México acerca de las especies de este género, tan importante en Europa y Sudamérica, es necesario hacer estudios para evaluar la composición química, nutricional y toxicológica de los lupinos mexicanos así como desarrollar métodos de eliminación (o utilización) de alcaloides para emplearlos como fuente de proteína en la alimentación humana o animal, principalmente donde abundan estas especies, así como generar un conocimiento fitoquímico que pueda ser útil a propósitos quimiotaxonómicos en este género.

## ANTECEDENTES

### ASPECTOS BOTÁNICOS Y ORIGEN DEL GENERO *Lupinus*

Los lupinos son leguminosas que se caracterizan por ser plantas anuales o perennes, herbáceas o arbustivas, rara vez arbóreas, con flores vistosas de color blanco o violáceo.

No se conoce el número exacto de especies de lupinos. Algunos consideran hasta 500 taxones. El número de nombres botánicos para este género es arriba de

1700; la mayoría de las especies son originarias del continente americano y solo 12 de la costa del mediterráneo. Estas especies son muy dinámicas y ocupan hábitats desde el nivel del mar hasta tundra alpina arriba de los 4000 msnm, (Planchuelo, 1994).

Taxonómicamente, Takhtajam (1987) ubica a *Lupinus* en la siguiente categoría sistemática:

<b>División</b>	Magnoliophyta (Angiospermae)
<b>Clase</b>	Magnoliopsida (Dicotyledone)
<b>Subclase</b>	Rosidae
<b>Superorden</b>	Fabanae
<b>Orden</b>	Fabales
<b>Suborden</b>	Leguminosinae
<b>Familia</b>	Leguminosae (Fabaceae)
<b>Subfamilia</b>	Papilionoideae
<b>Tribu</b>	Genistea
<b>Subtribu</b>	Genistinae
<b>Género</b>	<i>Lupinus</i>

Tournefort uso el nombre *Lupinus* para el género por primera vez en 1694. Este proviene del latín *Lupus*, que significa lobo, ya que estas plantas eran asociadas a los lugares salvajes y bosques donde habitaban lobos. Posteriormente, en 1753 Lineo incluye al género en su obra *Species plantarum* (Planchuelo, 1994).

Las especies del viejo mundo se han agrupado en 5 secciones (Albus, Angustifolius, Luteus, Micranthus y de semilla rugosa), con caracteres taxonómicos y morfológicos distintivos (Gladstone, 1974). Sin embargo, las especies del nuevo mundo presentan una estrecha relación citogenética, por lo que ha sido difícil su clasificación taxonomica. La primera revisión de este género en América fue hecha por Smith en los años de 1938 a 1945 constatada en su obra *Species lupinorum* (Smith, 1938).

De acuerdo con caracteres vegetativos, Planchuelo (1994) ha señalado dos grandes grupos, uno de hojas simples (26 especies) y el otro con hojas generalmente compuestas palmadas (el resto de especies).

Las características morfológicas más relevantes del género, según Dunn (1979)

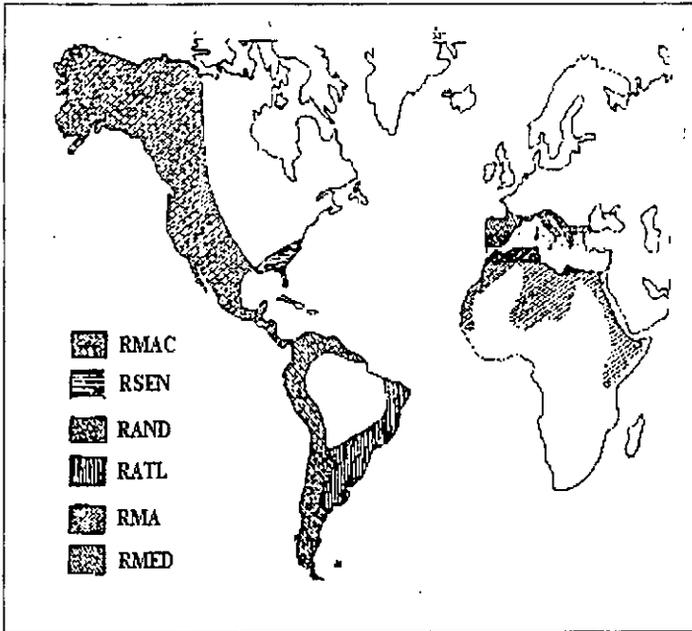
plantas anuales o perennes, pueden ser erectas, postradas o arbustos.

Florales en racimos terminales comúnmente azules o violáceas, raramente blancas o amarillas.

Fruto más o menos compreso, linear-oblongo, dehiscente, generalmente pubescente.

Semillas compresas, mayormente obovoides 4 a 12 por fruto, de tamaño y color variable.

Según Planchuelo (1994), existen tres centros de distribución: Uno es la zona del Norte y Centro de América, otra en Sudamérica y la última en la costa del Pacífico del Atlántico, estos a su vez se dividen en dos regiones cada una, como se puede apreciar en la figura 1.



RMAC = Región Montañosa de Alaska a Centroamérica, RSEN = Región Sur-Este de Norteamérica, RAND = Región Andina, RATL = Región del Atlántico, RMA = Región del Mediterráneo y África, RMED = Región del Mediterráneo.

Figura 1. Regiones de distribución geográfica de las especies de *Lupinus* (según, Planchuelo, 1994)

Según algunos autores, existió un único centro primario de origen para el género *Lupinus* que fue hace 50-165 millones de años en el periodo cretácico y empezaron a tener su diversidad genética con la separación de los continentes. Más tarde, fueron dos centros de origen: en el mediterráneo y el continente americano. Debido a esta hipótesis, los autores proponen una nueva clasificación para el género, con dos subgéneros, uno llamado *Lupinus* (con 12 especies, incluyendo los cultivados *L. angustifolius*, *L. albus* y *L. luteus* del viejo mundo) y el otro *Platycarpus* (con el resto de las especies del norte, centro y sur de América) (Kurlovich, 1989).

Otros estudios señalan a la parte central de México y California como el centro de diversidad de los lupinos del nuevo mundo (Simmonds, 1976; Plitmann, 1981).

### ASPECTOS AGRONÓMICOS

La especie cultivada más antigua es *Lupinus albus* L. (lupino blanco) sus antecesores silvestres son nativos de la península balcánica, el cual era conocido por los antiguos griegos y romanos desde el siglo I. Se tiene conocimiento de haberse encontrado semillas de *L. albus* en tumbas egipcias de la dinastía duodécima (alrededor de 2,000 años antes de Cristo).

La referencia más antigua que se tiene es la de Hipócrates (400-356 antes de Cristo), quien habla de los lupinos en la alimentación humana en relación con lentejas, habas y guisantes. Teofrasto (372-288 antes de Cristo) menciona a los lupinos en su "Historia Natural de las plantas", en relación con su siembra y cosecha.

El cultivo del lupino blanco se llevó a cabo en todo el imperio romano y fue descrito extensamente por tratadistas agrícolas de aquella época; los cuales consideraban de importancia las semillas desamargadas de los lupinos, que eran utilizadas para la alimentación animal y en gran medida para el consumo humano, aunque únicamente por las clases más pobres y en caso de extrema necesidad (Muzquiz, 1988).

## CULTIVO Y USO DE LOS LUPINOS EN EUROPA

*Lupinus albus* era una especie bien conocida en los tratados europeos de botánica de los siglos XVI y XVII. En Europa, la expansión moderna del cultivo del lupino empezó en 1780 con el rey Federico II de Prusia, quien cultivó semillas de *Lupinus albus* importadas de Italia, irregularmente persistió el cultivo en el norte de Alemania durante los siguientes 60 años.

Posteriormente surgió un renovado interés por este cultivo en los años de la posguerra debido a la crítica necesidad de alimentos proteicos en Alemania durante la primera guerra mundial (1914-1918).

En 1928-29 el alemán von Sengbusch seleccionó el primer lupino bajo en alcaloides a partir de *L. luteus* y *L. angustifolius*, y más tarde se obtuvieron cepas dulces de *L. albus* surgiendo de esta manera la mejora moderna del lupino como cosecha en grano y forraje (Gladstone, citado por Muzquiz, 1988).

El mayor cultivo en el norte de Europa ha sido el *L. luteus* debido a su mejor adaptación para las costas ácido-arenosas del Báltico.

En Alemania el cultivo de los lupinos dulces aumentó de 2 Ha en 1931 a 78,000 en 1938. Después de la segunda guerra mundial hubo una transferencia de lupinos de Alemania a Polonia. En este país hubo gran interés tanto por los lupinos dulces como los amargos, de tal manera que en 1964 la superficie de cultivo del lupino en Polonia se estimó en cerca de 400,000 Ha de las cuales 300,000 eran de variedades dulces y el resto amargas. Al igual que Alemania la especie de mayor producción es el *L. luteus*, con pequeñas áreas de cultivo de *L. angustifolius* y *L. albus*.

Así mismo hubo un gran interés de los lupinos dulces en la URSS, ya que el área sembrada subió de 194,000 a 1'150,000 Ha. en 1960. Las especies usadas han sido *L. luteus* en Bielorrusia, Norte de Ucrania y Estados del Báltico, *L. angustifolius* en la parte central y del Norte y *L. albus* esta ganando terreno en Ucrania (Gladstone, citado por Muzquiz, 1988).

Actualmente el cultivo del lupino en la zona del mediterráneo es de solo 15,000 hectáreas. *L. albus* es la especie más cultivada utilizada principalmente para consumo animal, seguida de *L. luteus* destinada principalmente como forraje de borregos. Así mismo se han realizado pruebas para introducir *L. mutabilis*, debido a su característica de crecer en suelos ácidos y poco fértiles, así como en zonas semiáridas, en donde podría ser introducido como cultivo en rotación (Cubero y Bellido 1986).

### CULTIVO Y USO DE LOS LUPINOS EN AMÉRICA

En países con tradición en el uso de lupinos (particularmente Sudamérica), existe un importante suministro de alimento para consumo humano, estos alimentos son preparados siguiendo el tradicional desamargamiento de *L. mutabilis* en Bolivia y Perú (Hinojosa y Torrico, 1990) o utilizando variedades dulces de *L. albus* en Chile (Egaña *et al*, 1992).

*L. albus* fue llevado a Sudamérica por los inmigrantes del sur de Europa en donde fue cultivado, sin llegar a escala comercial, excepto en Chile en donde actualmente es ampliamente cultivado sobre todo en la zona sur de este país y es utilizado en la alimentación humana y animal (Baer, 1990).

En Sudamérica, *L. mutabilis* fue una especie verdaderamente interesante, durante miles de años jugó un papel importante en la alimentación de los pueblos andinos de Perú, Ecuador y Bolivia, ya que se han encontrado representaciones en relieves de la cultura Chavin (500 a. C.- 200 d. C.) (Gross, 1982).

Durante el imperio Inca el tarwi (*L. mutabilis*) fue ampliamente cultivado desde Venezuela hasta el Norte de Argentina y Chile, sin embargo, su cultivo ha ido disminuyendo y actualmente sólo se le puede encontrar cultivado en alturas de 2,500 y hasta más de 4,000 m. o en forma silvestre a orillas de caminos y en los bordes de los campos de maíz, como protección del ganado. Estos cultivos no sobrepasan la media hectárea y se siembra sin abono en la rotación papa-cebada-lupino. En la actualidad es un importante componente de la dieta de muchos campesinos de esa región, quienes todavía quitan el sabor amargo de las semillas como sus antepasados por calentamiento y lavado en agua corriente. El agua de lavado sirve como insecticida o contra ectoparásitos del ganado (Gross, 1982).

Los lupinos primitivos de América, posibles ancestros de *L. mutabilis*, como *L. douglasii* (del este y centro de Norteamérica) y *L. ornatus* (del oeste y centro de Norteamérica), fueron alimento de los pobladores de estas regiones. Estas dos especies, probablemente entraron a Sudamérica como plantas semidomesticadas, con las tribus que emigraron al sur en la época precolombina, por lo que se cree que *L. mutabilis* pudo haberse originado después de una fase de hibridación (Simmonds, 1976).

Por su alto contenido de proteínas y aceite, actualmente se ha incrementado el interés por *L. mutabilis* en diversos países como Alemania,

Portugal, Chile, Inglaterra y España, en donde se han obtenido variedades mejoradas (Cubero y Bellido, 1986).

Otra especie de Norteamérica, como *L. perennis* fue ampliamente consumida en el siglo pasado, aunque actualmente ya no es así.

En los últimos años, se han introducido especies de lupinos del viejo mundo como *L. albus* a Norteamérica en países como USA y Canadá donde se han utilizado principalmente como forraje para ganado en inviernos tardíos. En México se tienen reportes de estudios agronómicos de adaptación con líneas mejoradas de *L. albus* como cultivo de invierno, donde se han obtenido rendimientos superiores a los reportados en Portugal, Italia y España (Zamora *et al*, 2000).

#### CULTIVO DE LOS LUPINOS EN OTRAS PARTES DEL MUNDO

En Sudáfrica se han cultivado lupinos dulces debido a su clima mediterráneo y suelos arenosos, en donde se ha concluido que *L. albus* puede ser una contribución sustancial a la agricultura, debido al valor proteico de su semilla, el uso del cultivo como forraje y mejorador de suelos (Wassermann, 1983).

En 1959 se introdujeron variedades dulces de *L. angustifolius* y *L. luteus*, a Australia pero quedaron en desuso durante muchos años, sin embargo en la década de 1970 *L. angustifolius* (lupino de hoja angosta) fue retomado por el fitomejorador Dr. Gladstone al desarrollar nuevas variedades para Australia y en la actualidad representa uno de los cultivos más importantes de ese país, ya que de las 12,500 ha que se sembraron en esa década actualmente se estima la superficie sembrada en 1.2 millones de ha, además se ha estimado que el

beneficio económico que ha generado es de aproximadamente US D. 198.6 millones anuales (Pannel, 1998).

### COMPOSICIÓN QUÍMICA Y VALOR NUTRITIVO

La semilla de los lupinos es la principal parte de la planta utilizada para la elaboración de alimentos. En el siguiente cuadro se muestra la composición química de las especies cultivadas (Petterson, 1998).

Cuadro 1. Composición química de semilla de cuatro especies de lupinos (g kg<sup>-1</sup>).

Componente	<i>L. albus</i>	<i>L. angustifolius</i>	<i>L. luteus</i>	<i>L. mutabilis</i>
Humedad	85.8	84.4	94.4	62.0
Proteínas	361.0	321.6	413.6	447.4
Cenizas	32.9	27.8	37.0	30.0
Grasa cruda	90.8	58.2	57.4	140.7
Fibra Cruda	102.7	148.9	127.2	70.4
*FDA	142.8	197.3	---	---
*FDN	171.5	226.8	192.0	---
Lignina	6.5	7.0	5.0	---
Calcio	2.0	2.2	2.1	1.8
Fósforo	3.6	3.0	6.1	8.8

\*FDA = Fibra Detergente Ácido

\*FDN = Fibra Detergente Neutro

Fuente: Petterson (1998)

Sin embargo, al igual que la mayoría de las leguminosas, los lupinos son deficientes en aminoácidos azufrados como metionina y cisteína, por lo que llegan

a presentar bajos valores de Relación de Eficiencia Proteica (REP) (0.48-0.99), pero al suplementarla con metionina alcanza valores de 3.05 en comparación con la caseína (3.09) (Schoeneberger *et al*, 1982a; Ballester *et al*, 1980), sin embargo, su proteína es una fuente rica de triptofano y contiene buen balance del resto de aminoácidos esenciales con un alto grado de digestibilidad (Petterson, 1998).

La calidad proteínica de lupinos se ha estudiado ampliamente, en *L. albus* el valor de la digestibilidad aparente del N es cercano al 80% y la Utilización Neta de la Proteína es del 77% con respecto a la proteína del huevo (Egaña *et al*, 1992).

En cuanto a los carbohidratos, se tiene reportado que la cáscara y el cotiledón presentan diferentes tipos, mientras que en la cascarilla predominan principalmente los estructurales (celulosa, hemicelulosa y pectinas), en los cotiledones los de reserva son no estructurales, principalmente galactosa, arabinosa y ácido urónico.

Las semillas de lupinos son ricas en calcio ( $1.5-2.2 \text{ g kg}^{-1}$ ), pero su contenido de fósforo aportado por fitatos es comparable a otras leguminosas (Petterson, 1998).

El principal uso que se les da a los lupinos actualmente es para consumo animal utilizado como fuente de proteínas y energía. Un buen ejemplo es Australia, donde el total de la producción de alimentos balanceados principalmente para cerdos, pollos y bovinos es de 7.85 millones de t de los cuales 1.36 son leguminosas y de estas 1.13 son lupinos, además, se tiene estimado un consumo de 350,000 t anuales de lupinos como forraje para ovinos. En este país *L.*

*angustifolius* principalmente y *L. albus* son las especies más utilizadas para este propósito (Edwards y van Barneveld, 1998).

## ALCALOIDES DE LOS LUPINOS

En la actualidad se han detectado más de 100 alcaloides quinolizidínicos en los lupinos, entre los principales se encuentran lupanina, esparteína, 13-OH-lupanina, lupinina, angustifolina y anagirina. La concentración y presencia de estos varía de acuerdo a la especie, genotipo y etapa fenológica de la planta, así como de las fluctuaciones climáticas de su hábitat (Kinghorn *et al.*, 1980; Hatzol *et al.*, 1983).

La estructura base de éstos alcaloides es su anillo quinolizidínico, que puede ser bicíclico, tricíclico, tetracíclico o alifático (figura 2); según Wink (1993) se agrupan en:

- Tipo lupinina (Lupinina)
- Tipo leontidina (Camoensidina)
- Tipo esparteína/lupanina/multiflorina (esparteína)
- Tipo  $\alpha$ -pyridona (anagirina)
- Tipo matrina (matrina)
- Tipo ormosia (ormosia)
- Tipo piperidina y dipiperidina (amodendrina), no son quinolizidínicos, pero son comunes en algunas especies (sobre todo de Norteamérica) de *Lupinus*.
- Mezcla de estructuras asociadas a los alcaloides.

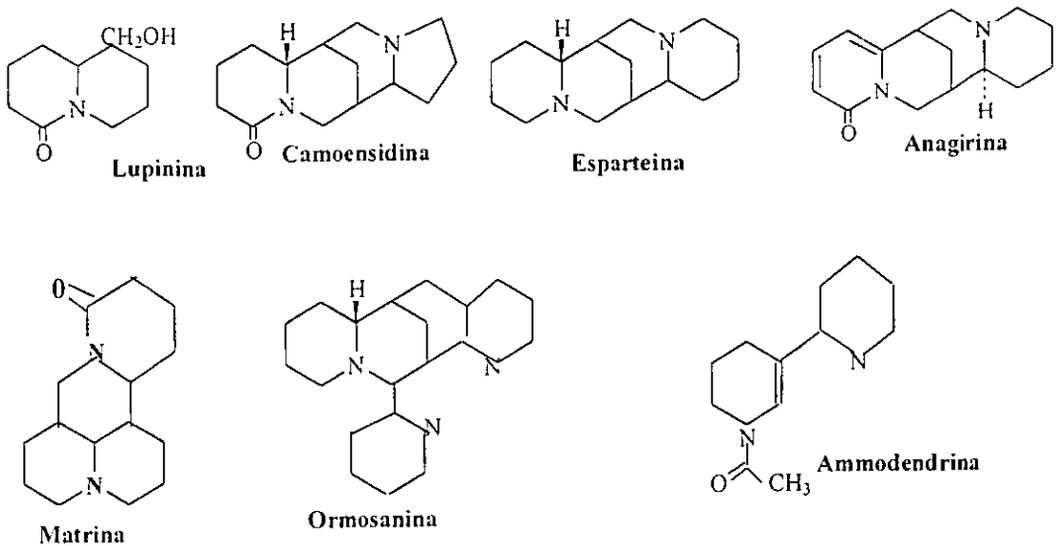


Figura 2. Estructura de los tipos de alcaloides quinolizidínicos.

Estos alcaloides juegan un papel importante en la defensa de la planta contra microorganismos patógenos. En algunos estudios se ha demostrado que el rendimiento de tipos amargos (altos contenidos de alcaloides) de *L. albus* presentan rendimientos promedio de 14.2 semillas / planta mayor que los tipos dulces, debido a que los amargos poseen mayor resistencia a factores ambientales. Por ejemplo el daño ocasionado por el potivirus del mosaico amarillo del frijol es 21.3% menos en tipos amargos que en dulces (Sedletskii y Golovchenko 1991).

Sin embargo, en EUA los lupinos son considerados como tóxicos y son responsables junto con otras plantas de perdidas económicas por intoxicación del ganado que las consume (James *et al*, 1992). Aunque, algunos autores sugieren que no todas las especies americanas de lupinos son tóxicas y la mayoría de ellas son aceptadas como forraje, bajo ciertas condiciones de manejo (Coburn, 1983).

En humanos se han reportado casos de intoxicación accidental por ingerir el agua utilizada para el desamargado de las semillas de lupinos, manifestando el síndrome anticolinérgico por 48 h, desapareciendo espontáneamente estos síntomas (Márquez *et al*, 1991).

En relación con la toxicidad de los alcaloides de los lupinos se ha encontrado en ratones que para la esparteína la máxima dosis no letal (DL<sub>0</sub>), dosis letal media (DL<sub>50</sub>) y dosis mínima letal (DL<sub>100</sub>) por vía intraperitoneal son de 30.7; 36 y 150 mg/kg de peso corporal respectivamente, en tanto que para la lupanina son de 150, 175 y 225 mg/kg de peso corporal respectivamente, mientras que la DL<sub>50</sub> vía oral es de 220 y 410 mg/Kg de peso corporal para esparteína y lupanina respectivamente (Yovo *et al*, 1984).

Se ha propuesto que el mecanismo de acción de los alcaloides quinolizidínicos es el siguiente (Schmeller *et al.*, 1994):

- (a) se unen a receptores acetilcolínicos-nicotínicos (específicamente lupanina)
- (b) se unen a receptores acetilcolínicos-muscarínicos (específicamente esparteína)
- (c) Inhiben los canales de sodio-potasio.

Otro alcaloide quinolizidínico de importancia es la anagirina, debido a que tiene propiedades teratogénicas causantes de malformación o muerte embrionaria (Keeler 1984). En los EUA especies como *Lupinus laxiflorus*, *L. caudatus*, *L. sericeus* y *L. nootkatensis* han sido relacionados con el "síndrome del becerro encorvado"; defecto caracterizado por artrogriposis, espina dorsal curva y paladar hundido. Sin embargo, en pruebas epizootiológicos se creía que la anagirina era el responsable del defecto congénito, posteriormente Keeler y Panter (1989)

propusieron que la anagirina puede ser metabolizada en el rumen del bovino al alcaloide amodendrina, que se sabe teratogénico. Esto es debido a que se ha observado en estudios que un extracto de anagirina de *Lupinus caudatus*, con cantidades teratogenicidad para bovinos no presento este síndrome en ovejas y hámster (Panter y Keeler 1993).

Se cree que la teratogenicidad de los alcaloides es provocada por una inducción química, que reduce el movimiento fetal, actuando como sedativo, bloqueador neuromuscular o anestésico, por estudios de radio-ultrasonidos se sabe que hay una relación directa entre la reducción de la actividad fetal y los defectos de formación ósea (Panter y Keeler 1993).

En un estudio realizado por Wink *et al.* (1995) en 56 especies de lupinos que crecen en EUA, Canadá, Sudamérica y el viejo mundo, se detectaron más de 100 alcaloides quinolizidínicos y piperidínicos. En donde se observo que los tetraciclicos (lupanina, esparteína e hidroxilupanina) se encontraron en todas las especies analizadas; la lupinina, multiflorina y los derivados de ambos, son especialmente abundantes en los lupinos del viejo mundo, lo que hace suponer una estrecha relación genética y probablemente tuvieron un ancestro común. Los bipiperidínicos como la amodendrina y sus derivados son abundantes en las especies del nuevo mundo. Normalmente el perfil de alcaloides es característico para determinados lupinos, mientras que las especies del viejo mundo y Sudamérica tienen perfiles sin mucha variación intraespecífica, las de norteamérica presentan una gran variación intraespecífica.

La generación de estos datos puede ayudar a resolver problemas de tipo taxonómico, sobre todo en los lupinos americanos, ya que presentan una estrecha

relación citogenética aunque que morfológicamente son muy similares (Wink *et al*, 1995).

La significancia taxonómica de los alcaloides en especies silvestres de lupinos de Sudamérica y su relación con las europeas ha sido ampliamente estudiada por Planchuelo (1996).

El empleo de datos de alcaloides para propósitos quimiotaxonómicos es válido sobre todo en niveles inferiores de clasificación, por lo que se pueden agrupar quimiovariedades, quimiotipos, quimiorazas, etc., además, se ha visto en muchas especies una alta correlación entre el contenido de alcaloides y la posición sistemática, sin embargo, existe el problema de que especies sin mucha relación sistemática pueden presentar el mismo tipo de alcaloides (Hughes y Genest 1973; Waller y Nowacki 1978).

Se ha visto que los alcaloides presentes en los lupinos también se distribuyen en otras tribus de leguminosas, tales como Sophoreae, Dalbergieae, Euchresteeae, Thermopsidae, Genisteae, Bossiaeeae, Brongniartieae, Podalyrieae, Liparieae y Crotalarieae, todas estas consideradas como primitivas, sin embargo, también se han encontrado en otras familias no relacionadas con las leguminosas, como Berberidaceae, Solanaceae, Ranunculaceae, Chenopodiaceae y Rubiaceae (Wink, 1993).

También se ha visto que en la tribu Genistae a la que pertenecen los lupinos, el carácter morfológico se refleja de algún modo en el contenido y calidad de los alcaloides (Hughes y Genest 1973).

Debido a la presencia de estos compuestos, existe la necesidad de recurrir a métodos de destoxificación para desamargar las semillas antes de ser

consumidas, ya que los alcaloides son la principal limitante para incorporar a los lupinos en la alimentación humana y animal (Yáñez, 1990; Hill, 1990), lo que limitó durante mucho tiempo la extensión de este cultivo.

En este sentido existen en general, dos líneas de desamargamiento de lupinos (según Tueta y Gross, 1982).

1. Por fitomejoramiento, en donde se han desarrollado variedades con bajos niveles de alcaloides, creando así un cultivo nuevo a partir del viejo tipo amargo (Putnam, 1991), lo que ha permitido un mayor uso de diferentes especies de lupinos, sin embargo, este método presenta las siguientes desventajas:

- a) Después de algunas generaciones de siembra vuelve a aumentar el contenido de alcaloides en las plantas.
  - b) Se pierde la plasticidad genética de las variedades locales y de los ecotipos conocidos.
  - c) Estas variedades tienen menos defensas contra insectos y parásitos, por lo que requieren medidas adicionales de protección, tanto en el cultivo como en el almacenamiento de semillas.
2. Desamargado tradicional, que consiste básicamente en cocer las semillas por 1h y lavado posterior por varios días (2-4).

#### Otros métodos

1) Uso de solventes orgánicos como el hexano para la extracción simultánea de grasa y alcaloides, en donde la harina desgrasada es alcalinizada para convertir los alcaloides en sus bases libres las que son solubles en hexano (Ortiz y Mukherjee, 1982). En *L. mutabilis* se ha probado la extracción con solventes de diferentes polaridades como el hexano y una posterior extracción con etanol previa

alcalinización, obteniendo una eficiencia de desamargado del 87 % (Torres *et al*, 1980).

En otro estudio se observó una mayor extracción de alcaloides (60%) con metanol-isopropanol, este rendimiento se mejoró al aumentar el número de extracciones a 3 (cerca del 90%) (Beirao, 1992).

II) Recientemente se ha reportado el uso de bacterias como *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* E y *Gluconobacter cerinus* (aisladas del suelos donde crecen *Lupinus albus* y *L. luteus*) que son capaces de usar la lupanina, como fuente de carbono y energía. Cepas identificadas como IST20B y IST40D eliminaron el 99% de la lupanina (Santana *et al.*, 1999).

III) Otro método de reducción de alcaloides ha sido por medio de inducción de mutantes químicos como el sulfonato de etilmetano, obteniendo variedades de *L. mutabilis* con sólo el 0.3% de alcaloides totales (Harrison, 1982).

IV) Actualmente se han desarrollado y patentado métodos para extraer y recuperar los alcaloides (Gulewicz, Polish patent 152748) en lugar de eliminarlos, ya que estos extractos presentan actividad biológica: son tóxicos para varias especies de insectos, inhiben la multiplicación viral, el crecimiento de bacterias y hongos patógenos, tienen actividad alelopática, incrementan el rendimiento de otros cultivos y además presentan actividad farmacológica (propiedades amebicidas, antiaritmicos, depresoras del sistema nervioso central, hipotensivas, hipoglicémicas y antiinflamatorias) (Wink, 1994; Peretiatkowics *et al*, 1994; Muzquiz *et al*, 1999), lo que significa que podrían ser utilizados como pesticidas, herbicidas y fertilizantes biológicos o ser útiles en medicina.

Debido a esto, los métodos de separación y extracción de alcaloides de las especies amargas resultan interesantes ya que simultáneamente durante el proceso de extracción se generan fracciones ricas en proteínas, carbohidratos estructurales (fibra dietética), aminoácidos y alcaloides que por sus propiedades farmacológicas y estimulantes del crecimiento vegetal, constituyen subproductos utilizables en la industria alimentaria, farmacéutica y agrícola (Stobiecki *et al.*, 1992).

En el siguiente cuadro, se pueden observar los principales tratamientos dados a las semillas de lupinos para disminuir los alcaloides, con sus desventajas:

Cuadro 2. Métodos de destoxificación en lupinos

Especie	Método	Resultados (% reducción de alcaloides totales)	Desventajas
<sup>1</sup> <i>L. mutabilis</i>	Cuzco: hervir 1h, lavado en agua por 3-4 días	Cerca de 99%	Pérdida de proteínas, Carbohidratos y lípidos
<sup>1</sup> <i>L. mutabilis</i>	Extracción etanol-agua	Mayor al 99.7%	Mediano grado de dificultad tecnológica
<sup>1</sup> <i>L. mutabilis</i>	Gasificación con óxido de etileno	Cerca de 98%	Pérdida de 12% de sólidos totales
<sup>1</sup> <i>L. mutabilis</i>	Hidratación por 24 h	13.71%	Pérdida de 1.5 de proteína y 1% de aceite
<sup>1</sup> <i>L. mutabilis</i>	Hidratación 24 h + cocimiento en olla de presión por 40 min	66.1%	Pérdida de 9.1 de proteína y 1.84% de aceite
<sup>1</sup> <i>L. mutabilis</i>	Hidratación 24 h + 2 cocc de 40 min en olla de presión	83.1%	Pérdida de 13.8 de proteína y 4.98% de aceites
<sup>1</sup> <i>L. mutabilis</i>	Hidratación 24 h + 2 cocc. De 40 min + lavado por agitación 1h	99.9%	Pérdida de 16.7 y 11.8% de proteína y aceites
<sup>2</sup> <i>L. mutabilis</i>	Hidratación 18 h, Cocc. 40-60 min c/1% cal, lavado c/agitación 1-2 h	99%	Pérdida de vitamina C, minerales, carbohidratos y proteínas
<sup>3</sup> <i>L. albus</i>	Degradación microbial	85%	Reducción de 8% de proteína soluble
<sup>4</sup> <i>L. hispanicus</i>	Aislados proteicos	95%	Disminución de aminoácidos azufrados
<sup>5</sup> <i>L. albus</i>	Cocción 100°C 1 h y lavado en agua 12 h	41.3% de lupanina y 55.5% de 13-OH-lupanina	No hay reportes
<sup>6</sup> <i>L. mutabilis</i>	Vía Humedad: Semillas, cocc. 30 min, lavar 72 h., deshidratar y desgrasar	Mayor al 95%	Pérdida de 26.9% de sólidos totales
<sup>6</sup> <i>L. mutabilis</i>	Extracción con hexano y etanol con alcalinización entre extracciones	Cerca del 97%	Pérdida de 13% de sólidos totales
<sup>7</sup> <i>L. mutabilis</i>	Extracción simultánea aceites y alcaloides	90%	Mediano grado de dificultad tecnológica

Fuentes: <sup>1</sup> Tapia (1990), <sup>2</sup> Gross (1982), <sup>3</sup> Santana *et al* (1999), <sup>4</sup> Muzquiz (1988), <sup>5</sup> Mukisira *et al.* (1995), <sup>6</sup> Torres *et al.* (1980), <sup>7</sup> Ortiz y Mukherjee (1982).

Así mismo, se ha investigado que el contenido de alcaloides en los lupinos es un carácter poligénico y su expresión es influida tanto por interacciones alélicas y no alélicas así como por efectos ambientales. En estudios de cruza con variedades amargas y dulces, los alelos dominantes actuaron hacia el incremento del contenido de alcaloides, por lo que la mayoría de los híbridos obtenidos resultaron amargos, sin embargo es posible seleccionar segregantes transgresivos con bajos contenidos de alcaloides en poblaciones de híbridos derivados de variedades dulces (Vladutu *et al.*, 1992).

La domesticación de los lupinos silvestres en el sentido del desarrollo de variedades dulces ha implicado una reducción en la concentración de AQ y por lo tanto de su defensa química natural contra sus depredadores. Así, las variedades dulces de *L. albus* y *L. angustifolius* cultivados extensivamente en Alemania y Australia son muy susceptibles al ataque de *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal de la enfermedad denominada antracnosis y hace necesario el uso de pesticidas químicos para su protección (López-Bellido y Fuentes, 1991), representando problemas económicos y ambientales (Vilariño *et al* 1999).

## ESTUDIO DE LOS LUPINOS EN MÉXICO

Debido a la diversidad biológica, geográfica y climática, en México estas especies crecen en prácticamente todo el territorio nacional, en bosques de regiones superiores a los 1,800 y cerca de los 4000 msnm en donde se ha estimado que crecen alrededor de 90 a 100 especies o más (Ruiz *et al.*, 2000).

En este sentido, la región occidental del país (Jalisco, Michoacán y Colima) por su amplia biodiversidad, es una de las zonas con el mayor número de especies de *Lupinus*, estimada en 15 a 30 ya que existen algunas dudosas por su complejidad morfológica (Mc Vaugh, 1987; Espinosa y Rodríguez, 1996).

En esta región se han realizado estudios, para conocer la distribución, abundancia y localización de las especies existentes. Es así como se ha observado una amplia distribución de la mayoría de éstas, exceptuando a *L. aschenbornii*, *L. stipulatus*, *L. leptocarpus* y *L. simulans* que crecen en pocas localidades y son poco abundantes en ellas. También se ha observado un variado comportamiento fenológico en las especies, ya que en algunas su fructificación es

durante el invierno (nov-ene), mientras que otras es en la época seca (mar-abr) y muy pocas fructifican en otoño (ago-oct), desconociéndose más datos fenológicos y biológicos de estas especies (Ruiz, 1994).

Así mismo, se han realizado algunos estudios parciales nutricionales y toxicológicos en varias especies de *Lupinus* mexicanos en donde se han encontrado valores de proteína de 30 a 45%, así como cantidades mínimas de glucósidos cianogénicos, lectinas, inhibidores de tripsina y saponinas, pero porcentajes altos de alcaloides hasta de 4.2%, así como una digestibilidad " *in situ*" del 80% en promedio, y una deficiencia en aminoácidos azufrados (Ruiz y Zamora 1993; Ruiz, 1994).

El potencial económico que representan estas leguminosas para México es importante, por lo que es necesario realizar estudios de los lupinos nativos sobre la disponibilidad de germoplasma para evaluar su posible utilización como un recurso fitogenético de uso alimentario y/o farmacológico, que puedan ser cultivados o domesticados para aprovecharse en forma industrial.

## JUSTIFICACIÓN

La diferencia en composición de nutrimentos y alcaloides en las especies y variedades de los lupinos de distintas partes del mundo, hace indispensable el estudio de las nativas de México, ya que éstas podrían mostrar una composición diferente a las ya conocidas.

Asimismo es importante contribuir al conocimiento fitoquímico de la flora mexicana así como la de encontrar fuentes alternativas de alimentos de origen vegetal para el hombre o para animales domésticos.

Además, en nuestro país se han realizado algunos estudios de manera aislada o incompleta de los lupinos nativos, por lo que es necesario realizar un estudio integral bromatológico y toxicológico de estas especies y específicamente las de Jalisco, que es una región rica en especies autóctonas. Esto permitirá integrar una fuente de información sobre este género tan estudiado en otros países y plantear la posible utilización de estas especies como alimento.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La creciente demanda de alimento para el hombre y sus animales domésticos hace necesario incrementar su producción, utilizando todo los recursos comestibles posibles, por lo que existe gran interés en las leguminosas.

En diversos países, se tiene como gran necesidad eliminar la actual dependencia de la soya, como base fundamental de la aportación de proteínas en la fabricación de alimentos balanceados. En México, este grano se importa en más de 85%, lo que significa que cualquier situación mundial, como una mala cosecha en los países productores: USA o Brasil, o un incremento del dólar, provoque una situación difícil en la industria pecuaria, por la repercusión en el precio de los alimentos balanceados.

En este sentido los lupinos son considerados una de las leguminosas con futuro potencial debido a que su contenido de proteínas es similar al de la soya, con la ventaja de que los lupinos presentan una mejor adaptación a suelos pobres y diversos climas, sin embargo su utilización depende del desarrollo de técnicas de eliminación de compuestos tóxicos.

En los últimos años la necesidad de nuevos cultivos proteicos en el mundo, ha motivado el interés del mercado europeo y de otros países, para promover esta valiosa leguminosa, pero el desarrollo de este cultivo depende de políticas de promoción para estimular el interés de los campesinos (Cubero y Bellido, 1986).

## **HIPÓTESIS**

Algunos lupinos mexicanos podrían presentar características químico-nutritivas adecuadas y con una disminución de su toxicidad, podrían ser disponibles como una fuente proteica alternativa, accesible principalmente para los pobladores de las regiones del occidente de México, donde crecen estas especies.

## OBJETIVO GENERAL

Estudiar la composición química y contenido de sustancias tóxicas y antinutricionales de especies de lupinos nativos del occidente de México, así como su toxicidad y calidad biológica de la proteína, además, desarrollar un método simple y económico de destoxificación de los lupinos para poder utilizarlos como alimento.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar un estudio sobre la abundancia y distribución, así como de usos regionales de siete especies de *Lupinus* del estado de Jalisco.
2. Efectuar un análisis químico proximal a las semillas de siete especies de lupinos del occidente de México.
3. Analizar y comparar el contenido de lectinas, taninos, glucósidos cianogénicos e inhibidores tripsicos en semillas crudas de siete especies de lupinos.
4. Cuantificar el contenido de lupanina, esparteína, 13-OH-lupanina, 3 OH-lupanina y citisina presentes en semillas de las especies de lupinos.
5. Evaluar la composición de aminoácidos en semillas de cada especie de lupino.
6. Cuantificar la reducción del efecto tóxico mediante procesos simples y baratos utilizados en los lupinos comestibles.
7. Determinar la toxicidad aguda en ratones, con las semillas de las especies seleccionadas.
8. Evaluar la calidad biológica de la proteína en semillas destoxificadas de las especies más abundantes.

## OBJETIVO GENERAL

Estudiar la composición química y contenido de sustancias tóxicas y antinutricionales de especies de lupinos nativos del occidente de México, así como su toxicidad y calidad biológica de la proteína, además, desarrollar un método simple y económico de destoxificación de los lupinos para poder utilizarlos como alimento.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar un estudio sobre la abundancia y distribución, así como de usos regionales de siete especies de *Lupinus* del estado de Jalisco.
2. Efectuar un análisis químico proximal a las semillas de siete especies de lupinos del occidente de México.
3. Analizar y comparar el contenido de lectinas, taninos, glucósidos cianogénicos e inhibidores trópicos en semillas crudas de siete especies de lupinos.
4. Cuantificar el contenido de lupanina, esparteína, 13-OH-lupanina, 3 OH-lupanina y citisina presentes en semillas de las especies de lupinos.
5. Evaluar la composición de aminoácidos en semillas de cada especie de lupino.
6. Cuantificar la reducción del efecto tóxico mediante procesos simples y baratos utilizados en los lupinos comestibles.
7. Determinar la toxicidad aguda en ratones, con las semillas de las especies seleccionadas.
8. Evaluar la calidad biológica de la proteína en semillas destoxificadas de las especies más abundantes.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Colecta de Material vegetal

Para la realización del presente estudio, se colectó 100-200 g de semillas maduras de las especies de *Lupinus* más abundantes en Jalisco, en los lugares donde crecen así como ejemplares para herborización y verificación taxonómica. Al mismo tiempo se reunió información sobre distribución, ubicación geográfica, tiempos de colecta y usos regionales de las especies colectadas. Las especies colectadas, así como su localidad y época de colecta fueron las siguientes:

*L. exaltatus*: colectada durante el mes de junio en las faldas del Nevado de Colima, en el fresnito Mpio. de Cd. Guzmán a 1560 msnm (figura 3).

*L. rotundiflorus*: colectada durante los meses de abril a mayo, en la carretera Chiquilistlán-Talpa, del estado de Jalisco a 1800 msnm (figura 4).

*Lupinus splendens*: El ejemplar se colectó en el Cerro de Tequila, Jalisco, a 2300 msnm, durante el mes de enero (figura 5).

*L. elegans*: El ejemplar para este estudio se colectó en la sierra de Quila, que pertenece a Tecalitlan, Jalisco, a una altitud de 1750 msnm, durante los meses de diciembre y enero.

*L. simulans*: El ejemplar en estudio se colectó en Talpa de Allende, Jalisco a 2700 msnm, en el mes de abril.

*L. reflexus*: Las colectas de esta especie se realizaron en julio y agosto, en la localidad conocida como "Los alpes" en la brecha del fresnito al refugio en el Nevado de Colima, Cd. Guzmán, Jalisco una altitud de 2,790 msnm.

*Lupinus spp.*: para el estudio se colectaron ejemplares en Mascota, Jalisco, a 1800 msnm, durante el mes de abril.

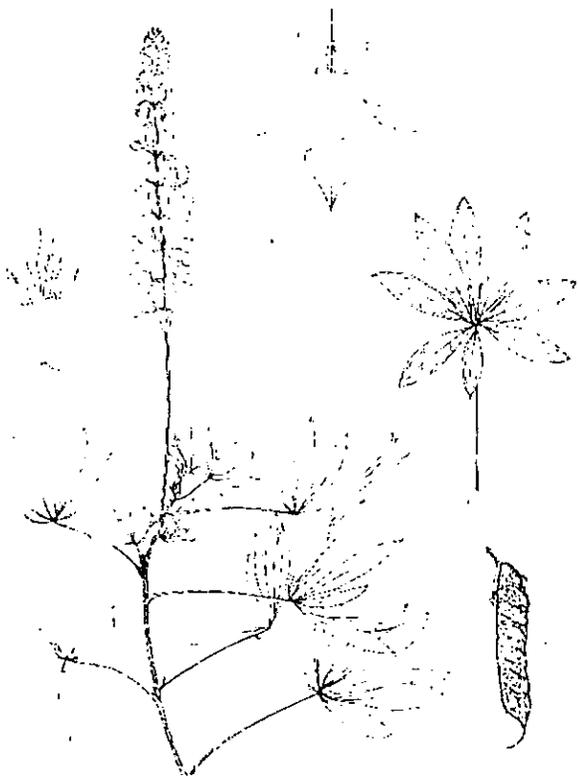


Figura 3. *Lupinus exaltatus* Zucc.



Figura 4 . *Lupinus rotundiflorus* M. E. Jones

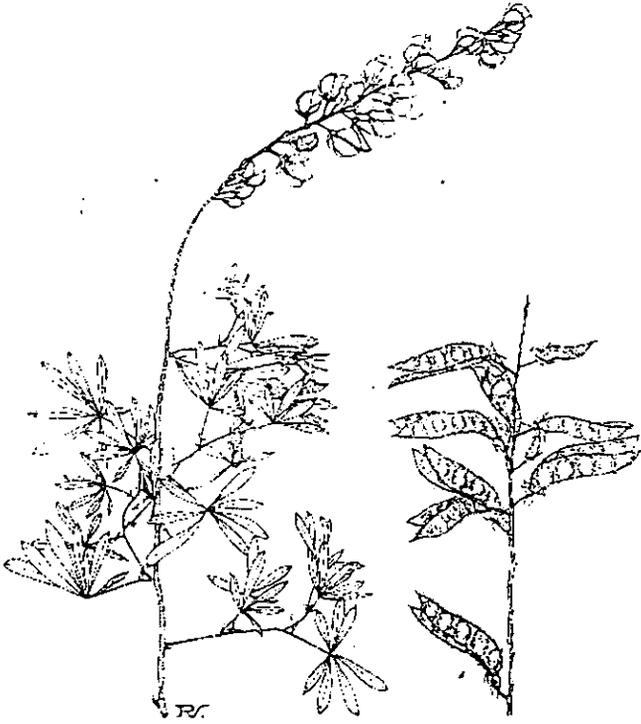


Figura 5. *Lupinus splendens* Rose

La verificación taxonómica de las especies se realizó con base en la morfología de las plantas consultando las claves de dicotómicas, según Mc Vaugh (1987), así como de ejemplares de herbario, para lo cual se contó con la asesoría de taxónomos especialistas del herbario IBUG de la Universidad de Guadalajara. Todos los ejemplares colectados se encuentran depositados en este herbario.

### **Análisis químico proximal**

Las semillas de cada especie de lupino, por separado se molieron en un molino Thomas-Wiley con malla de 1 mm de diámetro, posteriormente se realizó el análisis proximal (humedad, proteína cruda, fibra cruda, extracto etéreo, cenizas y carbohidratos), según las técnicas descritas en la AOAC (1990), así como proteína verdadera y nitrógeno proteico (Lucas *et al.*, 1988).

### **Determinación de aminoácidos**

El análisis de aminoácidos se realizó por cromatografía de intercambio iónico (autoanalizador de aminoácidos), usando una resina de intercambio iónico y determinación colorimétrica de los aminoácidos, que es registrado automáticamente en un aminograma previamente se separan los aminoácidos por hidrólisis ácida de la proteína (Lucas y Sotelo 1982). La determinación del triptofano fue colorimétrica de acuerdo a Ras *et al.* (1974) (anexo I).

## **Análisis de Sustancias Antinutricionales y Tóxicas**

A las semillas crudas de las especies de lupinos se les determinó el contenido de sustancias tóxicas y antinutricionales que fueron:

1. **HEMAGLUTININAS:** Se realizó de forma semicuantitativa de acuerdo al método de Jaffe *et al* (1974), que se basa en la propiedad que tienen las hemaglutininas para aglutinar diferentes tipos de eritrocitos, y se estima en forma visual mediante una serie de diluciones (anexo II). Como control positivo se utilizó semilla cruda de *Canavalia ensiformis*, ya que esta leguminosa presenta gran actividad aglutinante, por su alto contenido de la lectina concanavalina (Liener, 1974).
2. **INHIBIDORES DE LA TRIPSINA:** Se realizó siguiendo la técnica descrita por Kakade *et al* (1974), que consiste en la medición a través de la inhibición de enzimas hidrolíticas por medio del clorhidrato de Benzoil-DL-Arginina-P-nitroanilida- (BAPA), cuya coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores en la muestra (anexo III). Como control positivo se utilizó harina de soya, por su alto contenido de inhibidores de tripsina.
3. **GLUCOSIDOS CIANOGENICOS:** El método cuantifica el ácido cianhídrico (HCN) como indicador de la presencia de glucósidos cianogénicos (Lucas y Sotelo 1984) (anexo IV).
4. **TANINOS:** Se realizó la determinación cuantitativa de taninos de acuerdo a las normas de la Organización Internacional de Estandarización (1988), que es un método universal para la determinación del contenido de taninos. Es un método colorimétrico que se basa en la extracción de los taninos con dimetilformamida y se determina el contenido usando una curva patrón de ácido tánico, en donde los resultados se expresan como % de ácido tánico (anexo V).

5. ALCALOIDES QUINOLIZIDÍNICOS: El método se realizó según Muzquiz (1993), el cual cuantifica alcaloides individuales con estructura quinolizidínica por medio de cromatografía de gases, utilizando cafeína como estándar interno. La extracción de los alcaloides se realizó en forma de bases utilizando diclorometano (anexo VI). En el presente estudio sólo se analizó el contenido de esparteína, lupanina, 13-OH-lupanina, 3-OH-Lupanina y citisina. Debido a que la esparteína es el único alcaloide quinolizidínico que se encuentra disponible en forma comercial, los cuatro restantes fueron amablemente proporcionados por el Dr. Michael Wink del Instituto de Biología Farmacéutica de la Universidad de Heidelberg.

### **Destoxificación de semillas de lupinos**

Se evaluaron algunos métodos de destoxificación en semillas de *Lupinus elegans*, basándose en la literatura para disminuir los alcaloides que consistieron en lo siguiente:

a) Se llevaron a cabo dos métodos comparativos de destoxificación, uno térmico acuoso basado en Mukisira *et al* (1995) y otro térmico acidulado de Szabo y Herold (1993). En ambos tratamientos se cocieron las semillas, en el primero se utilizó únicamente agua y en el segundo agua acidulada (HCL 0.02 N); el tiempo para ambos tratamientos fue de 3 h a presión atmosférica, con cambios continuos de agua cada hora. Enseguida las semillas se deshidrataron a 45-50°C (con vacío) por 24 h y se molieron.

A las harinas de estos dos tratamientos se les cuantificó el contenido de alcaloides (Muzquiz, 1993), así como sólidos totales y proteína cruda.

b) Se realizó otra prueba de destoxificación, basados en el método térmico de Gross (1982) que consistió en 10 extracciones acuosas térmicas sucesivas de 30 minutos cada una a presión atmosférica en semillas de *Lupinus elegans*; las semillas fueron deshidratadas a 50°C (con vacío) para ser molidas. Tanto a la harina cruda como a las harinas de cada extracción se le cuantificó el contenido de proteína cruda, alcaloides cualitativo (Dragendorff), así como la concentración relativa de alcaloides, considerando el área total de picos en el cromatograma en relación a la harina cruda como el 100%.

c) Por último se efectuó una prueba de destoxificación andina tradicional (Gross, 1982) modificada, en semilla de las especies *L. elegans*, *L. exaltatus*, *L. reflexus* y *L. rotundiflorus* que consistió en someter las semillas a remojo toda la noche, ebullición en agua de la llave por 90 minutos a presión atmosférica, en una relación 1:4 p/v y un posterior lavado por 5 veces en agua, posteriormente las semillas se deshidrataron a 50°C (con vacío) y se molieron.

A las harinas crudas de cada especie de lupino como a las harinas de las semillas cocidas y lavadas se le cuantificó por separado el contenido de proteína cruda, alcaloides cualitativo (Dragendorff), así como la concentración relativa de alcaloides.

### Prueba de toxicidad aguda vía oral

Se realizó la prueba de toxicidad aguda en semillas crudas de *L. elegans*, *L. exaltatus*, *L. reflexus*, *L. rotundiflorus*, *L. splendens*, *L. simulans* y *L. mutabilis* (como patrón positivo), el estudio se realizó de acuerdo a Litchfield y Wilcoxon (1949) de la siguiente manera:

La prueba se realizó con ratones machos de 18-22 g de peso de la cepa NIH, de 3 a 4 semanas de edad. Se formaron grupos de 6 ratones cada uno y fueron distribuidos de la siguiente manera: Un grupo fue el control y solo recibió carboximetilcelulosa al 0.2%. A los grupos experimentales se les administró semilla cruda de las distintas especies de lupinos estudiadas, en concentraciones que variaron de 1.5 a 15g/Kg de Peso Corporal (P.C.), las dosis se calcularon de acuerdo a los intervalos de toxicidad del cuadro 3.

Cuadro 3. Intervalos de toxicidad, según Litchfield y Wilcoxon (1949).

Denominación	DL <sub>50</sub> (vía oral)
Extremadamente tóxico	< 1mg/kg de P.C.
Altamente tóxico	1-50 mg/kg de P.C.
Moderadamente tóxico	50-500 mg/kg de P.C.
Ligeramente tóxico	0.5-5 g/kg de P.C.
Prácticamente no tóxico	5-15 g/ Kg de P.C.
Relativamente inocuo	15 g/kg de P.C.

**PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS:** Las muestras se prepararon haciendo una suspensión de las harinas de semillas en carboximetilcelulosa al 0.2% (como vehículo).

Los ratones fueron pesados y marcados, posteriormente se repartieron en los diferentes lotes de acuerdo a su peso.

**DOSIFICACIÓN:** Para la dosificación se debe administrar un volumen, el cual sea lo suficientemente grande para medirlo con facilidad, pero lo menor posible para que no provoque traumatismo al animal (el máximo volumen permitido vía oral, en ratones es de 1.0 ml). En este estudio la dosis administrada del material experimental se calculó de acuerdo a la siguiente formula:

$$\text{Dosis administrada} = \frac{\text{dosis (mg/kg de PC)}}{F \times 1000}$$

Donde  $F = \frac{0.04\text{ml}}{\text{g de P.C.}}$  y P.C.= peso corporal

Antes de la administración de la muestra se suprimió el alimento por 12 h y solamente se dejó el agua. Una vez realizada la administración se restituyó el alimento y se observó a los animales por 72 h y se registró el porcentaje de mortalidad de cada lote.

### **Prueba de Relación de la Eficiencia Proteica**

La relación de eficiencia proteica es definida como la ganancia de peso dividida entre el peso de proteína consumida. El método se basa únicamente en la ganancia de peso y no se tiene en cuenta la cantidad de proteínas utilizadas para el mantenimiento y recambio de las proteínas corporales y asume que toda la proteína ingerida se utiliza para el crecimiento. Generalmente se utiliza un período de

experimentación que oscila entre los 21 a 28 días en los cuales se le suministra de forma libre una dieta que contiene 10% de la proteína en estudio.

La prueba se realizó de acuerdo al método descrito en la AOAC (1990) de la siguiente forma:

Para el presente estudio se utilizaron 35 ratas macho recién destetadas de 21-28 días de edad, con peso de 40-50 g, alojados en jaulas individuales, con ciclo de luz de 12 h y temperatura ambiente controlada. Los animales se repartieron en 5 grupos con 7 individuos cada uno, cuatro grupos recibieron dietas cuya fuente de proteína fue semillas de *L. elegans*, *L. reflexus*, *L. exaltatus* y *L. rotundiflorus* tratadas con el método de destoxificación andina tradicional (Gross, 1982), mencionado anteriormente, un último grupo fue el control que recibió una dieta con caseína como fuente proteica. El cuadro 4 muestra la composición de las dietas. Se registró el peso corporal de los animales al inicio de la evaluación y durante la misma cada 2 días hasta el término del experimento (28 días). A la segunda semana del estudio se recolectaron las heces en forma individual y se les determinó el contenido de nitrógeno para calcular la digestibilidad proteica.

Cuadro 4. Composición de las dietas experimentales (semilla cocida y lavada) y caseína <sup>a</sup>.

Ingredientes	Composición de las dietas (g/100 g)				
	1	2	3	4	5
Caseína (87% proteína) <sup>b</sup>	11.1				
<i>L. elegans</i>		22.9			
<i>L. exaltatus</i>			25.8		
<i>L. reflexus</i>				27.7	
<i>L. rotundiflorus</i>					24.2
Sucrosa	20.0	18.2	18.2	18.2	18.2
Glucosa <sup>b</sup>	20.0	18.2	18.2	18.2	18.2
Dextrina <sup>b</sup>	20.0	18.2	18.2	18.2	18.2
Manteca	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
Aceite de maiz	7.0	6.7	5.9	5.9	6.7
Mezcla de minerales <sup>c</sup>	4.9	4.1	4.1	4.0	4.4
Mezcla de Vitaminas <sup>d</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Fibra tipo celulosa <sup>d</sup>	7.9	0	0	0	0

<sup>a</sup> Nx6.25, 10 g de proteína/100g de la dieta total. Cada dieta fue calculada para obtener 422 kcal/100g de dieta.

<sup>b</sup> Sigma, St Louis, Mo.

<sup>c</sup> Roger Harper mineral mix, ICN Pharmaceutical, Cleveland, OH.

<sup>d</sup> ICN Pharmaceutical

## RESULTADOS

Dos de las especies de lupinos (*L. exaltatus* y *L. reflexus*), se encuentran ampliamente distribuidas y son abundantes, debido a que crecen en muy diversas localidades dentro del estado de Jalisco, dos son de mediana distribución (*L. elegans* y *L. rotundiflorus*) y tres (*L. simulans*, *L. splendens* y *L. spp.*) son de restringida distribución; estas especies presentan una fenología muy variada, como se puede observar en el cuadro 5. Se concentran sobre todo en las zonas montañosas de la Sierra Madre Occidental y Eje Neovolcánico transversal de Jalisco. Constituyen, además un importante componente de los bosques de pino-encino. Estas especies presentan gran diversidad morfológica, con caracteres poco constantes.

*Lupinus exaltatus* Zucc, crece en bosques de pino-encino a 1700 msnm, en espacios abiertos, en ocasiones se extiende a orillas de brechas y carretera, así como en campos cultivados abandonados, es muy abundante y llega a ser maleza. Es una planta anual, bianual o perene, llega a medir hasta 2 m, produce una gran cantidad de vainas y cada vaina produce de 6 a 9 semillas, la fructificación es de septiembre a enero o casi todo el año.

*L. reflexus* Rose. Crece en lugares altos y montañosos de 2,700 a 3,600 msnm, habita en bosques de abetos o pinos; se caracteriza por ser planta de tipo herbáceo o arbustivo y de gran tamaño (2 a 5 m), las vainas poseen de 5 a 8 semillas, su fructificación se da de mayo a octubre.

*L. elegans*. Esta especie crece en valles extremosos y laderas húmedas de bosques de pino a una altura de 1700 a 3000 msnm, es anual, herbácea y mide de 0.6 a 1.4 m de altura.

*L. rotundiflorus*. Especie arbustiva o herbácea muy ramificada en la base, es anual y mide de 0.6 a 1.5 m. Crece en pastizales cerca de los bosques o en laderas de cerros, se encuentra bien adaptada a zonas perturbadas a alturas de 1200 hasta los 2500 msnm.

*L. splendens*. Plantas herbáceas, anual que crecen principalmente en bosques de pino-encino o pino-oyamel, a una altura de 2250 a 3600 msnm (Figura 5). Esta especie generalmente es de porte pequeño (0.3-1.2 m), con pocas vainas/planta y de 2 a 4 semillas por vaina.

*L. simulans*. Planta perenne, de menos de 1 m de altura. Herbácea anual, cuya floración es sucesiva. Fruto de 3 a 4 cm de largo y 9 a 12 mm, de ancho, generalmente 4 semillas. Se le encuentra en la Sierra de Manantlan, en la Sierra Madre del Sur en bosques de pino, entre los 2000 y los 3000 msnm.

*L. sp.* Especie arbustiva ramificada. Crece cerca de los bosques o en laderas de cerros, se encuentra bien adaptada a zonas perturbadas a 1700 msnm. Frutos largos de 5 a 7 semillas, distribuida en las montañas del oeste de Jalisco.

Cuadro 5. Distribución y usos regionales de 7 especies de lupinos de Jalisco.

Especie	Distribución	Usos regionales
<i>L. elegans</i>	Tecolotlan, Autlan, Cuautitlan, Tapalpa	Ninguno
<i>L. exaltatus</i>	Cd. Guzmán, Tonila, San Gabriel, Atemajac de Brizuela, Sayula, Toluca, Autlán y Tecalitlán	Tolerante en campos de cultivo
<i>L. reflexus</i>	Cd. Guzmán, Sn Gabriel, Tonila, Mascota, Mazamitla, Gómez Farías, Ojuelos, Sn. J. de los Lagos, Chiquilistlán y Talpa	Ninguno
<i>L. rotundiflorus</i>	Mascota, Talpa, Chiquilistlan, Tapalpa	Tolerante en campos de cultivo, uso religioso como ofrenda floral
<i>L. simulans</i>	Talpa	Ninguno
<i>L. splendens</i>	Tequila	Ninguno
<i>L. sp.</i>	Mascota	Ninguno

## **Análisis Proximal**

El análisis proximal (cuadro 6) reveló en general altos contenidos de materia seca, proteína cruda y fibra cruda en las especies estudiadas. *L. elegans* presentó el mayor porcentaje de proteína (45.4%) y *L. reflexus* de fibra (16.6%). Los valores de las demás especies estuvieron comprendidos entre 37 y 43 % de proteína y 12.9 y 15.4 % de fibra, así mismo el extracto etéreo fue relativamente bajo en todas las especies (5.5-8.9 %), los contenidos de cenizas y carbohidratos se cuantificaron en 3.3 a 4.2 % y 31.7 a 38.1 %, respectivamente. Así mismo, se puede observar que *L. elegans* reveló el mayor contenido de proteína verdadera (33.1%); mientras que en *L. reflexus* se encontraron los valores más bajos (27.5%).

Cuadro 6. Composición químico proximal y proteína verdadera de 7 especies de *Lupinus* silvestres del occidente de México (g/100g de muestra)<sup>a</sup>

	<i>L. elegans</i>	<i>L. exaltatus</i>	<i>L. reflexus</i>	<i>L. rotundiflorus</i>	<i>L. simulans</i>	<i>L. splendens</i>	<i>L. spp.</i>
Humedad	3.91 ± 0.02	4.20 ± 0.09	3.19 ± 0.07	3.39 ± 0.05	2.89 ± 0.05	10.10 ± 0.35	3.70 ± 0.04
Base seca:							
Cenizas	4.20 ± 0.24	3.59 ± 0.12	3.61 ± 0.29	4.01 ± 0.31	3.59 ± 7.06	3.30 ± 0.23	3.51 ± 0.16
Extracto ctéreo	5.79 ± 0.26	8.50 ± 0.48	7.90 ± 0.36	5.50 ± 0.47	6.29 ± 0.70	8.89 ± 0.35	6.80 ± 0.19
Fibra cruda	12.91 ± 1.25	14.61 ± 1.14	16.58 ± 0.82	15.11 ± 1.69	14.42 ± 1.17	12.70 ± 1.24	15.40 ± 1.37
Proteína cruda	45.41 ± 0.45	40.50 ± 0.27	37.31 ± 0.29	42.82 ± 0.23	40.70 ± 0.37	37.20 ± 0.35	41.50 ± 0.23
CHO <sub>s</sub> <sup>b</sup>	31.69	32.80	34.60	32.56	35.00	38.10	32.80
Proteína verdadera	33.10 ± 3.60	27.60 ± 2.54	27.49 ± 2.39	31.72 ± 3.28	30.23 ± 2.87	31.74 ± 3.45	31.40 ± 2.54
% N de proteína	72.99 ± 6.99	68.13 ± 5.83	73.65 ± 5.84	74.05 ± 7.26	74.24 ± 6.38	85.27 ± 8.48	75.63 ± 5.70

<sup>a</sup> Los valores estan expresados como medias ± desviación estandard (n = 3)

<sup>b</sup> Los carbohidratos fueron calculados por diferencia

## Aminoácidos

En el cuadro 7, se presentan los resultados obtenidos del análisis de aminoácidos, en este se aprecia un buen contenido de lisina, triptofano y valina cuyos valores oscilaron entre 4.7 a 5.7, 1.14 a 1.38 y 3.2 a 4.0 g/16 g de N respectivamente, con relación al patrón de la FAO (1985) para pre-escolares. Así mismo, los aminoácidos azufrados (metionina + cisteína) y aromáticos (fenilalanina + tirosina) estuvieron comprendidos entre 1.74-2.2 y 5.35-6.1 g/16 g de N respectivamente.

La calificación química de la proteína mostró como aminoácido limitante a los azufrados en todas las muestras de lupinos. Todas las especies mostraron una buena calificación química de triptofano, además en *L. elegans* se obtuvo buena calificación química de treonina, lisina, isoleucina, leucina y de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina+tirosina).

El análisis de aminoácidos no esenciales reveló altas cantidades de ácido glutámico de 21.7 (en *L. exaltatus*) a 28.48 g/16 g de N (en *L. elegans*), así como de ácido aspártico y de arginina, cuyos valores oscilaron entre 9.0 a 11.4 y 10.5 a 13.0 g/16 de N, respectivamente, otros aminoácidos como la histidina, prolina y glicina se cuantificaron en bajos niveles de 1.71-3.9, 1.72-3.35 y 2.5-4.19 g/16 de N, respectivamente.

Cuadro 7. Composición de aminoácidos en semillas de *Lupinus silvestres* del occidente de México (g/16 g de N)\*

Aminoácido	<i>L. exaltatus</i>	<i>L. elegans</i>	<i>L. splendens</i>	<i>L. rotundiflorus</i>	<i>L. spp.</i>	<i>L. reflexus</i>	<i>L. simulans</i>	Patrón FAO/ WHO (1985) <sup>b</sup>
Ácido aspártico	9.00 ± 1.02	11.44 ± 0.70	9.07 ± 0.92	10.03 ± 0.85	10.26 ± 0.58	9.89 ± 0.9	10.17 ± 0.87	
Ácido glutámico	21.69 ± 2.48	28.48 ± 2.30	22.65 ± 1.22	24.15 ± 2.07	23.85 ± 1.60	22.37 ± 2.24	24.03 ± 2.25	
Alanina	1.46 ± 0.22	2.57 ± 0.23	3.08 ± 0.46	2.32 ± 0.13	2.32 ± 0.17	2.50 ± 0.22	2.34 ± 0.20	
Arginina	10.51 ± 1.04	12.22 ± 0.78	11.40 ± 0.73	11.15 ± 0.91	11.62 ± 0.66	10.98 ± 0.77	13.02 ± 0.64	
Histidina	1.71 ± 0.20	3.71 ± 0.21	3.26 ± 0.18	3.54 ± 0.24	3.91 ± 0.38	3.37 ± 0.24	3.62 ± 0.24	
Prolina	2.88 ± 0.22	3.10 ± 0.21	1.72 ± 0.20	3.13 ± 0.24	3.35 ± 0.19	2.53 ± 0.18	2.11 ± 0.11	
Glicina	2.50 ± 0.28	4.19 ± 0.35	3.49 ± 0.34	3.41 ± 0.20	3.55 ± 0.30	3.70 ± 0.25	3.38 ± 0.25	
Serina	8.90 ± 1.13	9.10 ± 0.88	4.83 ± 0.50	5.65 ± 0.60	5.07 ± 0.68	5.30 ± 0.42	5.76 ± 0.25	
17 Isoleucina	3.30 ± 0.31	4.48 ± 0.39	3.92 ± 0.37	3.67 ± 0.39	3.86 ± 0.55	3.96 ± 0.29	3.60 ± 0.29	2.8
Leucina	6.01 ± 0.23	7.69 ± 0.72	6.25 ± 0.31	6.58 ± 0.49	6.71 ± 0.24	6.20 ± 0.30	6.64 ± 0.38	6.6
Lisina	5.60 ± 0.41	5.72 ± 0.30	4.77 ± 0.32	4.83 ± 0.33	4.90 ± 0.26	5.31 ± 0.50	5.04 ± 0.35	5.8
AA azufrados <sup>c</sup>	2.10 ± 0.19	1.84 ± 0.22	1.74 ± 0.20	1.90 ± 0.11	2.22 ± 0.18	2.05 ± 0.18	2.13 ± 0.21	2.5
AA aromáticos <sup>d</sup>	6.09 ± 0.57	6.05 ± 0.66	5.35 ± 0.47	5.99 ± 0.57	5.99 ± 0.72	5.62 ± 0.44	5.47 ± 0.52	6.3
Treonina	3.69 ± 0.32	4.07 ± 0.38	3.20 ± 0.25	3.77 ± 0.36	3.70 ± 0.32	3.64 ± 0.39	3.81 ± 0.31	3.4
Triptofano	1.24 ± 0.11	1.14 ± 0.14	1.24 ± 0.15	1.24 ± 0.09	1.38 ± 0.14	1.38 ± 0.08	1.20 ± 0.07	1.1
Valina	3.78 ± 0.23	3.79 ± 0.36	3.16 ± 0.23	4.02 ± 0.33	3.83 ± 0.40	3.34 ± 0.27	3.58 ± 0.28	3.5
Calificación química <sup>e</sup>	84	73	70	76	88	82	85	
AA Limitante	aminoácidos azufrados en todas las especies estudiadas							

\* Los valores están expresados como medias ± Desviación estándar (n = 3)<sup>b</sup> Edad preescolar.<sup>c</sup> Metionina + cisteína. <sup>d</sup> Fenilalanina + tirosina<sup>e</sup> Calificación química =  $\frac{\text{g de aminoácidos en la muestra problema} \times 100}{\text{g de aminoácidos en el patrón FAO}}$

### Factores antinutricionales y tóxicos.

Los resultados de la cuantificación de sustancias tóxicas y antinutricionales se muestran en el cuadro 8, en donde se puede observar que la menor actividad hemaglutinante fueron de las lectinas de *L. exaltatus* y *L. sp.* (título 4) y la mayor de *L. reflexus*, *L. rotundiflorus*, *L. simulans* y *L. splendens* (título 6) a las máximas diluciones realizadas, en cambio las lectinas de *Canavalia ensiformis* dieron un alto título de 18.

En las especies evaluadas, la acción inhibidora de la tripsina se encontró muy baja, los valores oscilaron entre 0.78 (UTI/mg de muestra) para *L. rotundiflorus* y 1.19 (UTI/mg de muestra) en *L. splendens*, mientras que el valor de la soya fue de (113.4 UTI/mg de muestra).

En ninguna de las especies de lupinos analizadas se detectó la presencia del ácido cianhídrico (HCN), es decir, no presentaron glucósidos cianogénicos.

El análisis de taninos, reveló un contenido de ácido tánico comprendido entre 0.023 a 0.26 g/100 g de muestra, el menor valor correspondió a *L. splendens* y el mayor a *L. elegans*.

Cuadro 8. Contenido de factores antinutricionales y tóxicos en semillas de 7 especies de *Lupinus* del occidente de México

Especie	Glucósidos cianogénicos mg de HCN/100 g de muestra	Lectinas <sup>1</sup> Titulo <sup>2</sup>	Inhibidores de tripsina <sup>3</sup> UTI/mg de muestra <sup>4</sup>	Taninos g de ácido tánico/100 g de muestra <sup>4</sup>
<i>L. elegans</i>	---	5	1.086 ± 0.02	0.266 ± 0.0042
<i>L. exaltatus</i>	---	4	0.866 ± 0.015	0.22 ± 0.0049
<i>L. reflexus</i>	---	6	0.931 ± 0.02	0.082 ± 0.0010
<i>L. rotundiflorus</i>	---	6	0.784 ± 0.018	0.075 ± 0.0021
<i>L. simulans</i>	---	6	1.061 ± 0.022	0.08 ± 0.0013
<i>L. splendens</i>	---	6	1.190 ± 0.025	0.023 ± 0.0011
<i>L. sp.</i>	---	4	1.164 ± 0.021	0.16 ± 0.0025

<sup>1</sup> Eritrocitos de hámster, <sup>2</sup> Titulo = Máxima dilución en que presenta aglutinación

<sup>3</sup> UTI = Unidades de Tripsina Inhibidas, <sup>4</sup> medias ± desviación estándar

### Contenido de alcaloides

En el cuadro 9 se puede observar el contenido de alcaloides quinolizidínicos, la presencia de lupanina se aprecia en las siete especies de lupinos estudiados. El mayor contenido de este alcaloide se encontró en *Lupinus rotundiflorus*, *Lupinus spp* y *L. simulans* de 11.5, 10.6 y 8.87 mg/g de muestra respectivamente, mientras que *L. elegans* presentó el nivel más bajo (0.03 mg/g de muestra). La esparteina se encontró en seis de las especies analizadas, la mayor concentración se cuantificó en *L. reflexus* con 26.63 mg/g de muestra, mientras que en *L. elegans* hubo ausencia de este alcaloide. La 3-hidroxlupanina se presentó en todos lo lupinos, en niveles de 0.16 (*L. reflexus*) a 4.2 mg/g de muestra (*L. rotundiflorus*). En *L. exaltatus*, *L. elegans* y *L. rotundiflorus* no se detectó 13-hidroxlupanina, el mayor contenido de este alcaloide se encontró en *L.*

*splendens* con 1.0 mg/g de muestra, mientras que el menor fue para *L. sp.* con 0.03 mg/g de muestra. En ninguna de las especies estudiadas se encontró citisina.

Cuadro 9. Contenido de alcaloides quinolizidínicos en 7 especies silvestres de *Lupinus* del occidente de México (mg de alcaloides/g de muestra, en base seca)

ESPECIE	ESPARTEÍNA	CITISINA	LUPANINA	3-OH LUPANINA	13-OH LUPANINA
<i>L. exaltatus</i>	0.028 ± 0.004	ND	5.83 ± 0.46	1.53 ± 0.19	ND
<i>L. elegans</i>	ND	ND	0.03±0.001	3.73 ± 0.175	ND
<i>L. splendens</i>	0.29 ± 0.048	ND	0.89 ± 0.1	1.05 ± 0.249	1.00 ± 0.133
<i>L. reflexus</i>	26.63 ± 1.136	ND	2.91 ± 0.03	0.16 ± 0.051	0.08 ± 0.018
<i>L. rotundiflorus</i>	0.11 ± 0.005	ND	11.5 ± 0.19	4.19 ± 0.427	ND
<i>L. simulans</i>	0.40± 0.007	ND	8.87 ± 0.183	2.76 ± 0.163	0.09 ± 0.012
<i>L. spp</i>	0.02 ± 0.001	ND	10.63 ± 0.08	2.08 ± 0.113	0.03 ± 0.003

Los valores son medias ± desviación estándar (n = 3)

ND = no detectado

La figura 6 representa el cromatograma de los estándares de los alcaloides utilizados en el análisis (esparteína, citisina, lupanina, 3-OH-Lupanina y 13-OH-Lupanina), las figuras 7 a 13 son los cromatogramas de las siete especies de *Lupinus* estudiadas, bajo las siguientes condiciones de trabajo del cromatógrafo de gases: Detector: FID, con Columna: Capilar SPB-1, 25 m de long x 0.4 mm de diámetro, temperatura del inyector: 240 °C , temperatura detector: 300 °C con programa de temperatura del horno de columna: inicial: 150 °C, 0.5 min, incremento de 20 °C/min y temperatura final: 240 °C, 14 min

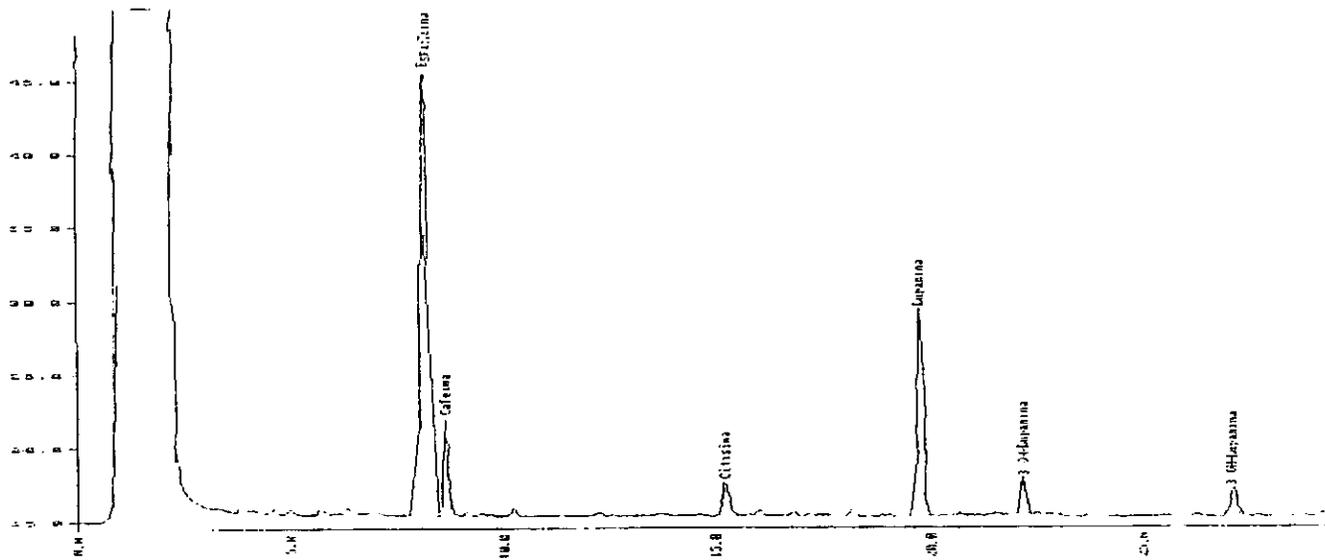


Figura 6. Cromatograma de los estándares de alcaloides quinolizidínicos

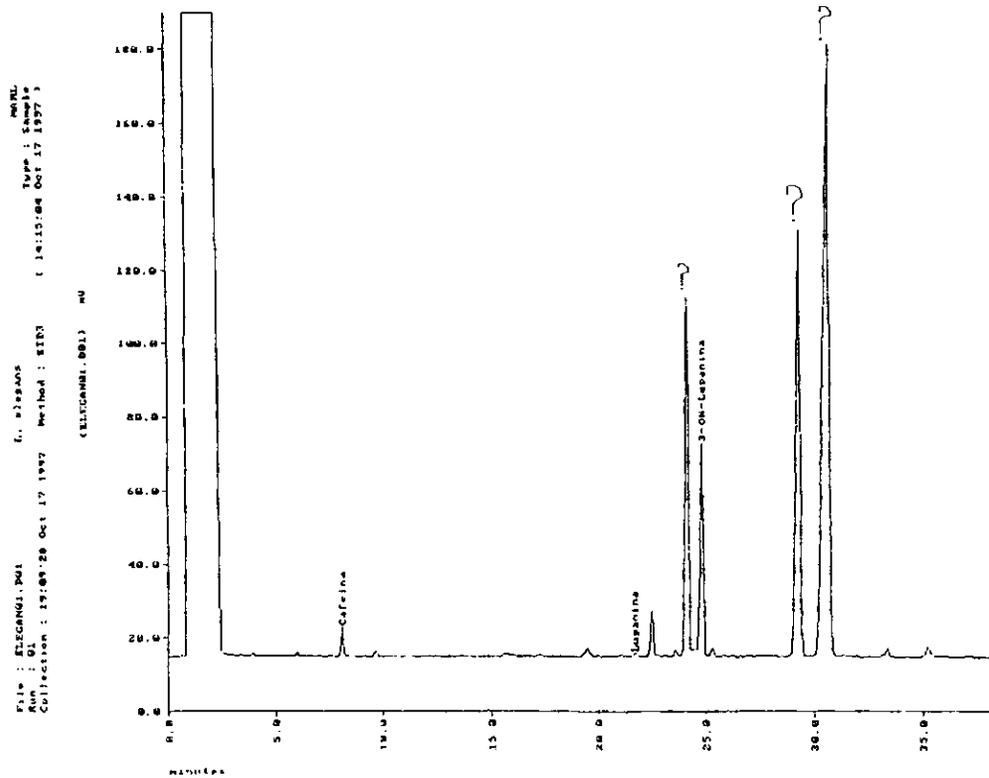


Figura 7. Cromatograma de los alcaloides quinolizidínicos en semilla de *L. elegans*

Run : 01  
Collection : 35.05.00 Oct 17 1997 Method : STD3 Type : Sample  
14:15:04 Oct 17 1997 3

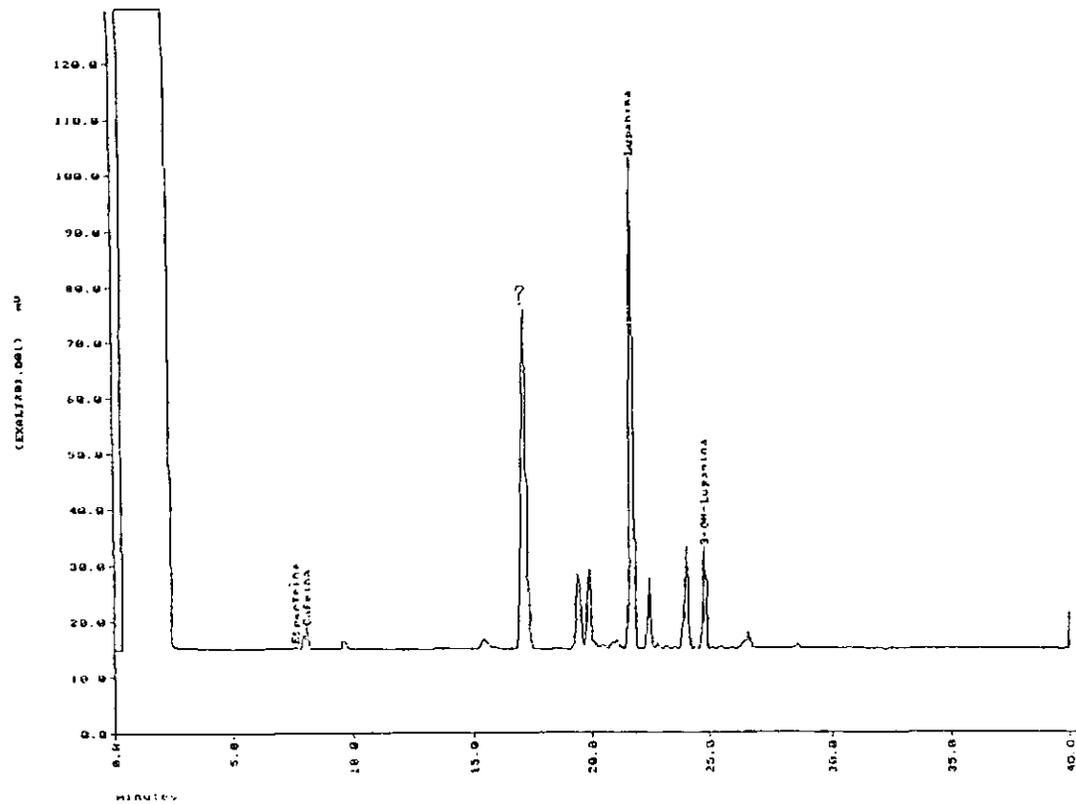


Figura 8. Cromatograma de los alcaloides quinolizidínicos en semilla de *L. exaltans*

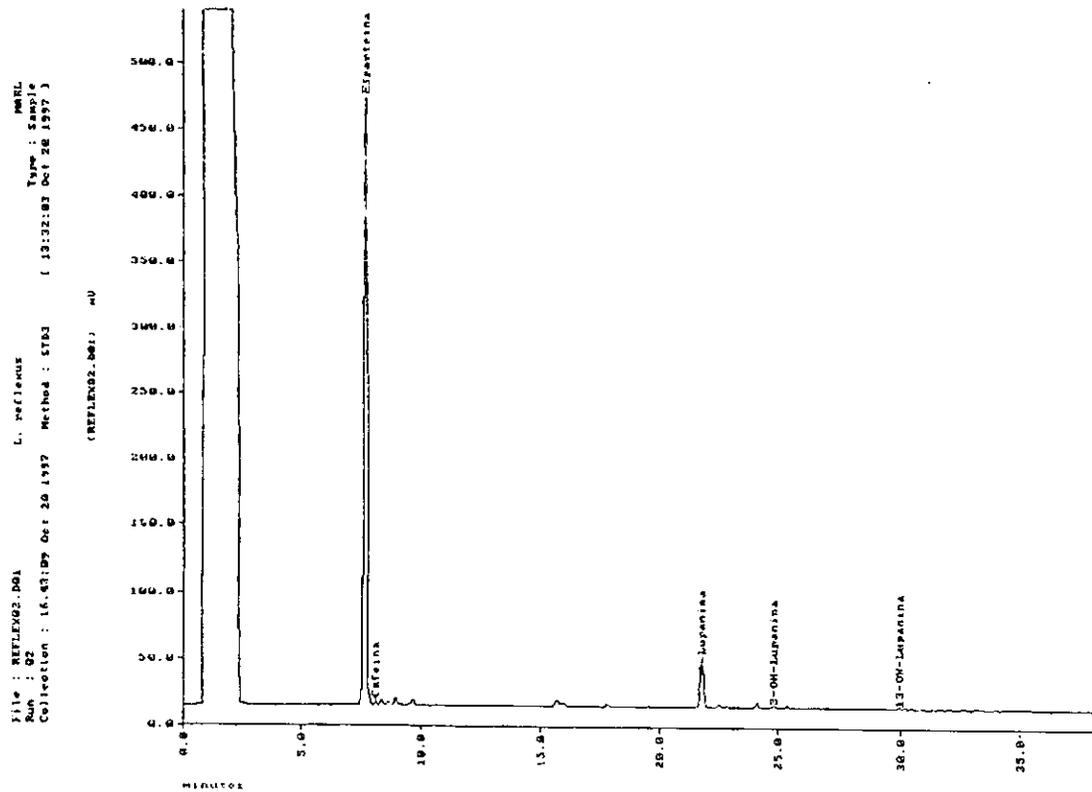


Figura 9. Cromatograma de los alcaloides quinolizidínicos en semilla de *L. reflexus*

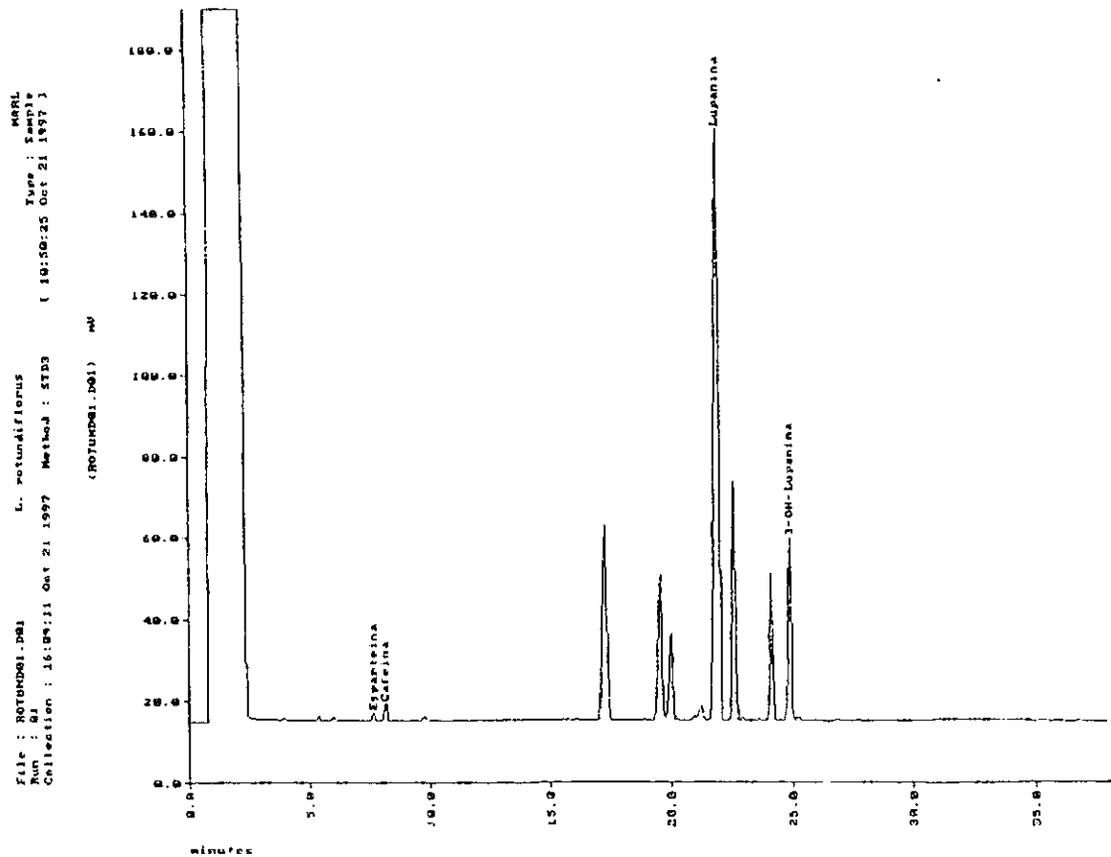


Figura 10. Cromatograma de los alcaloides quinolizidínicos en semilla de *L. rotundiflorus*

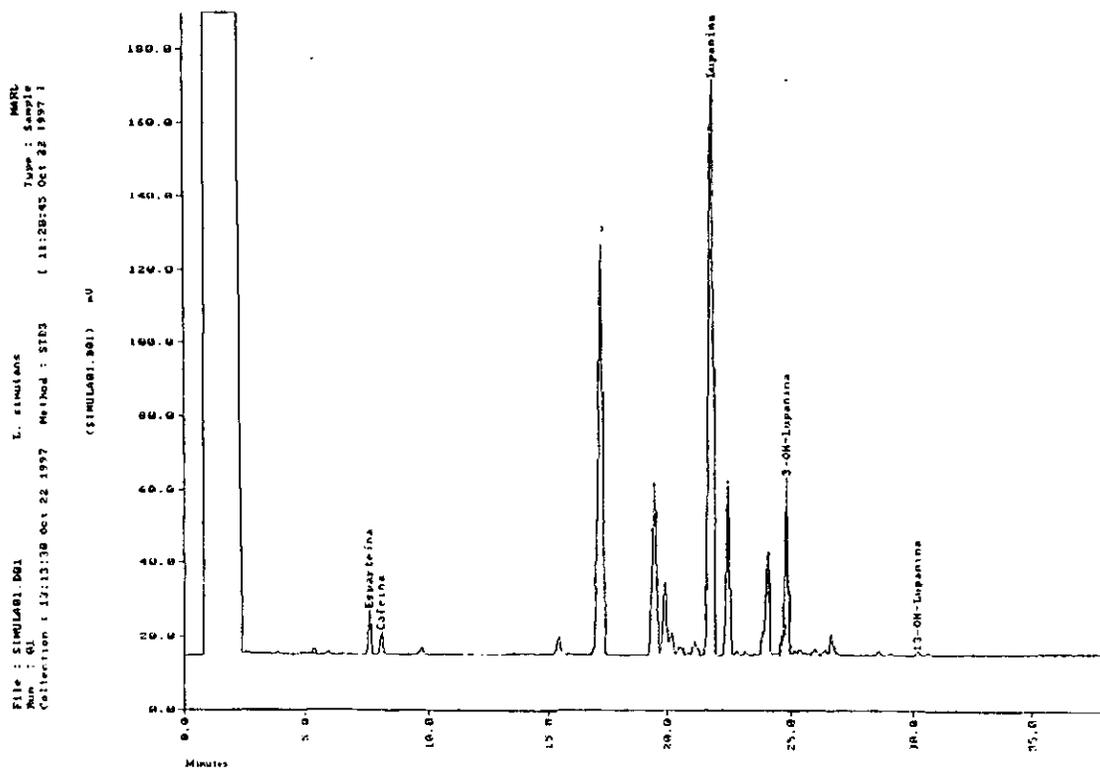


Figura 11. Cromatograma de los alcaloides quinolizidínicos en semilla de *L. simulans*

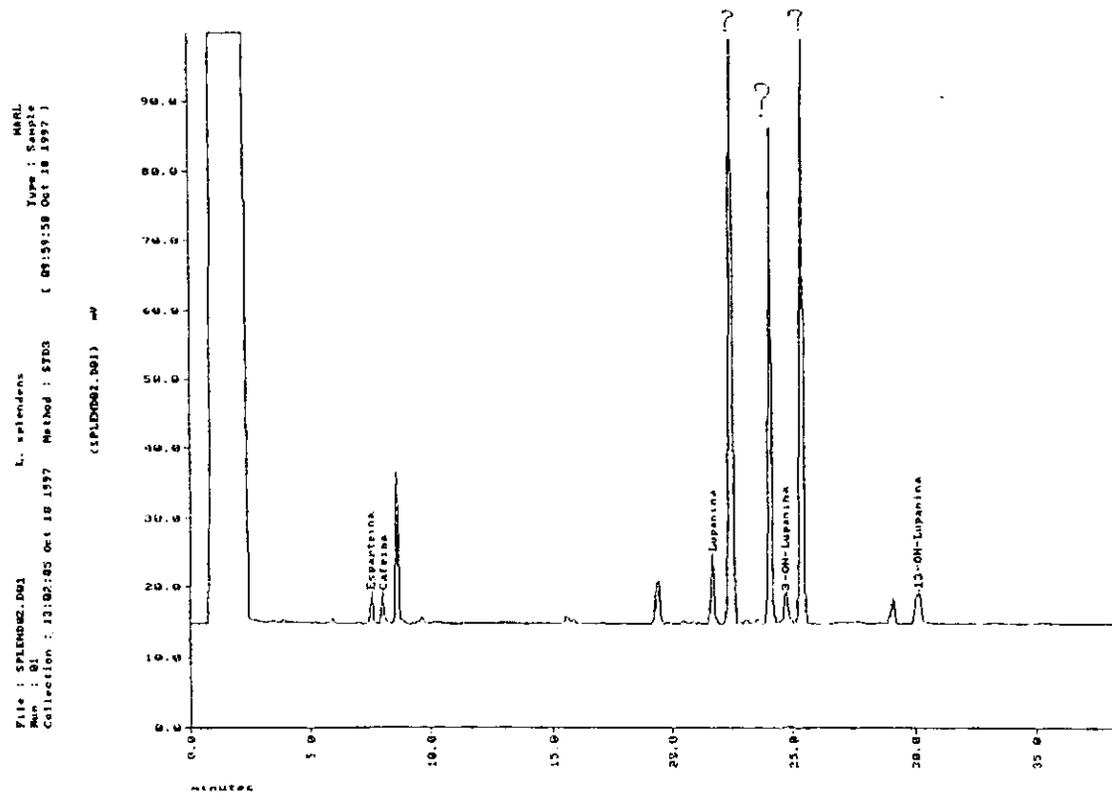


Figura 12. Cromatograma de los alcaloides quinolizidínicos en semilla de *L. splendens*

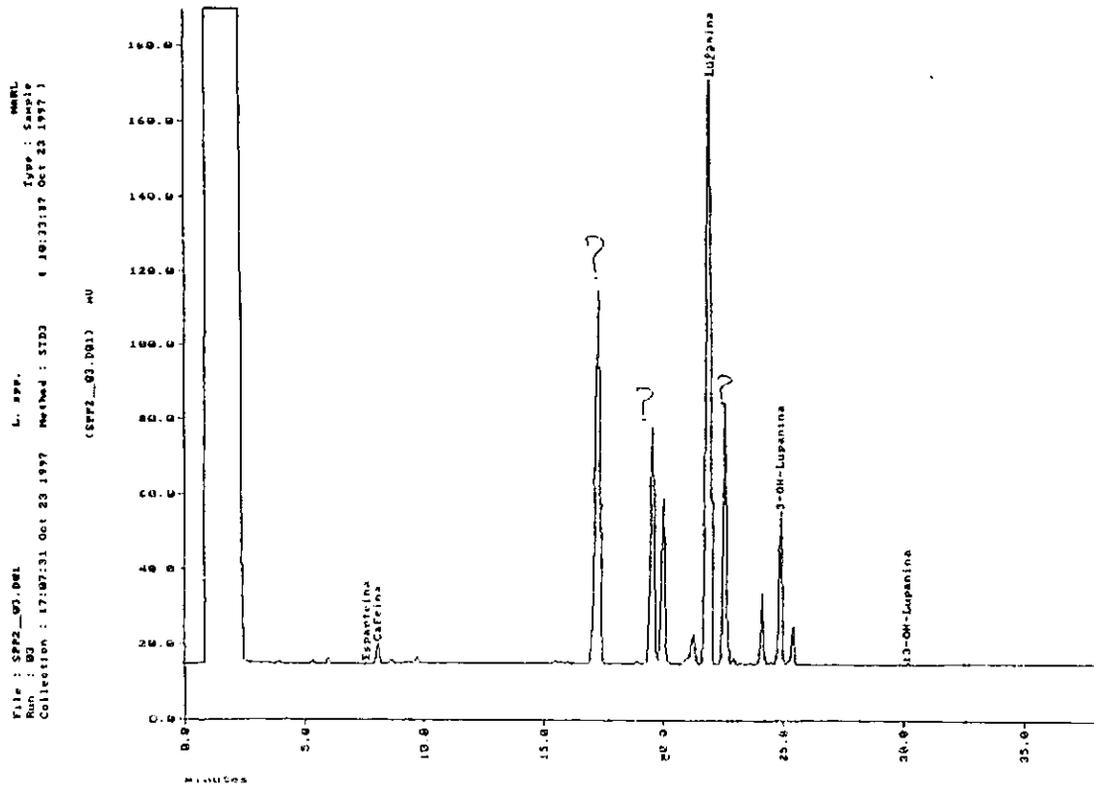


Figura 13. Cromatograma de los alcaloides quinolizidínicos en semilla de *L. spp.*

## Destoxificación de semillas

En el cuadro 10 se comparan los resultados obtenidos en semillas de *L. elegans* sujetas a los métodos de destoxificación térmica acuosa (Mukisira *et al.* 1995) y térmico con agua acidulada (Szabo y Herold, 1993). En estos se aprecia una completa eliminación de la lupanina con los dos tratamientos empleados, los niveles de 3-OH-Lupanina disminuyeron de 10 a 8.9 y 8.8 mg/100 g de muestra respectivamente. Al realizar el análisis de la concentración relativa de alcaloides, considerando su contenido en semillas crudas como el 100% (la suma de todas las áreas de los picos del cromatograma, exceptuando el metanol y el estándar interno), el porcentaje en las semillas con el tratamiento térmico acuoso fue de 38.6%, eliminándose por lo tanto un 61.4 %. Así mismo, en las semillas sometidas al tratamiento acuoso acidulado se cuantificó 21.56 % con relación al total en semillas crudas, eliminándose el 78.44 %.

Por otra parte, la pérdida de sólidos totales fue mayor con el tratamiento térmico acuoso (17.4 %) que utilizando el tratamiento acidulado (14.8%). Mientras tanto hubo un incremento en la concentración de la proteína de 39.0 a 42.5% con el tratamiento térmico acuoso y a 45.6 % con el tratamiento térmico acidulado.

Cuadro 10. Contenido de alcaloides, sólidos totales y proteína en semillas de *L. elegans* crudas sometidas a dos métodos de destoxificación.

<i>L. elegans</i>	Semilla cruda	Destoxificación térmica acuosa	Destoxificación térmica acuosa acidulada
*Esparteína	---	---	---
*Citosina	---	---	---
*Lupanina	1.2	---	---
*3-OH-Lupanina	10	8.9	8.8
*13-OH-Lupanina	---	---	---
**Perdida de sólidos		17.4	14.8
**Proteínas	39.0	42.5	45.6
Concentración relativa de Alcaloides (%)	100	17.5	11.0
% de eliminación	0.0	82.5	89.0

\* mg/100g de muestra, \*\* g/100 g de muestra

Los resultados de la prueba de destoxificación con extracciones térmicas continuas (Gross, 1982), se presentan en el cuadro 11, en donde se puede observar que conforme aumenta el número de extracciones térmicas disminuye la presencia y contenido de alcaloides llegando a eliminarse hasta cerca del 95% en la 10° cocción, asimismo la concentración de la proteína se incrementa hasta la 4° extracción de 40 a 45 %, sin embargo, después de la 5° cocción disminuye, llegando a una concentración de 36.2 % en la última extracción. En la figura 14 se presenta el contenido de alcaloides en forma gráfica.

Cuadro 11. Efecto de 10 extracciones térmicas de 30 min. c/u sobre el contenido de alcaloides y proteína en semillas de *L. elegans*.

Muestra	Proteína cruda (%)	Alcaloides cualitativo (Dragendorff)	<sup>1</sup> Concentración relativa de alcaloides	% de eliminación
Semilla cruda	40.0	+++	100	0
1º cocimiento	42.5	+++	71.65	28.35
2º cocimiento	43.75	+++	62.23	37.77
3º cocimiento	44.4	+++	49.13	50.87
4º cocimiento	45.0	+++	44.1	56.0
5º cocimiento	44.4	+++	38.83	61.17
6º cocimiento	43.75	++	34.68	66.32
7º cocimiento	43.4	++	23.0	77
8º cocimiento	42.2	+	10.82	89.18
9º cocimiento	40.0	+	7.7	92.3
10º cocimiento	36.2	---	5.1	94.9

--- Reacción negativa

+ Reacción positiva solución turbia

++ Reacción positiva, formación del precipitado

+++ Reacción positiva, formación del precipitado

<sup>1</sup>Concentración relativa de alcaloide = área total del cromatograma.

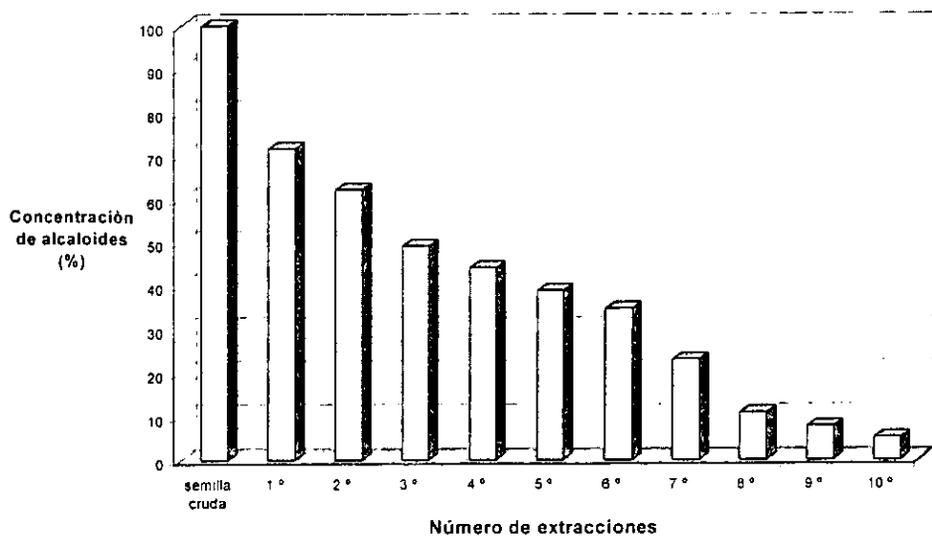


Figura 14. Contenido relativo de alcaloides en semillas de *L. elegans* sometida a diferentes extracciones (de 30 min).

Los resultados de la prueba de destoxificación andina tradicional (Gros, 1982) se presentan en el cuadro 12, en donde se observa que en todas las especies tratadas disminuye el contenido de alcaloides y de proteína con la cocción y sucesivo lavado. En *L. elegans* hubo mayor eliminación de alcaloides con el 95%, mientras que en *L. rotundiflorus*, la eliminación fue menor con 90%.

Cuadro 12. Contenido de alcaloides y proteína por efecto de destoxificación andina tradicional (Gross, 1982) en semillas de cuatro especies de *Lupinus*.

Muestra	<i>L. elegans</i>			<i>L. exaltatus</i>			<i>L. reflexus</i>			<i>L. rotundiflorus</i>		
	Sc	Scs	Scl	Sc	Scs	Scl	Sc	Scs	Scl	Sc	Sc	Scl
Proteína (%)	40.0	38.5	36.0	38.9	37.0	35.4	41.4	39.2	37.1	39.8	38.1	35.3
Alcaloides cualitativo (Dragendorff)	+++	++	--	+++	++	--	+++	++	--	+++	++	--
<sup>1</sup> Concentración relativa de alcaloides	100	18.2	4.9	100	19.4	5.3	100	19.8	7.7	100	22.0	9.8
% de eliminación	0	81.8	95.1	0	80.6	94.7	0	80.2	92.7	0	78	90.2

--- Reacción negativa.

++ Reacción positiva, formación del precipitado.

+++ Reacción positiva, formación del precipitado.

<sup>1</sup>Concentración relativa de alcaloide = área total del cromatograma.

Sc = Semilla cruda, Scs = Semilla cocida, Scl = semilla cocida + lavada.

### Prueba de Toxicidad aguda

Los resultados de la prueba toxicológica se aprecian en el cuadro 13 en donde se observa que con *L. exaltatus* y *L. elegans* se obtuvo 0% de mortalidad en todas las concentraciones evaluadas. Con semilla de *L. rotundiflorus* se observó 50% de mortalidad a la concentración mas alta de 15 g/kg de peso corporal (P.C.) a esta misma concentración *L. splendens* y *L. simulans* manifestaron sólo el 33.3% de mortalidad; en cambio con *L. reflexus* y *L. mutabilis* se obtuvo 100% de mortalidad con las concentración de 15 y 12 g/kg de P.C. respectivamente.

Cuadro 13. Toxicidad aguda (vía oral) de harina de semillas crudas de seis especies de Lupinos mexicanos y *L. mutabilis*<sup>1</sup>

Dosis Administrada (gramos/Kg PC)	<i>L. elegans</i> % mortalidad	<i>L. exaltatus</i> % mortalidad	<i>L. rotundiflorus</i> % mortalidad	<i>L. splendens</i> % mortalidad	<i>L. simulans</i> % mortalidad	<i>L. reflexus</i> % mortalidad	<i>L. mutabilis</i> <sup>2</sup> % mortalidad
15.0	0	0	50	33.3	33.3	100	0
12.0	0	0	33.3	0	0	33.3	100
6.0	0	0	0	0	0	33.3	33.3
3.0	0	0	0	0	0	0	0
1.5	0	0	0	0	0	0	0

<sup>1</sup> Control positivo

### Prueba de Relación de Eficiencia Proteica

Los resultados de la prueba de la Relación de Eficiencia Proteica (REP) y de digestibilidad proteica de las especies de lupinos seleccionados se presentan en el cuadro 14. Los valores más altos REP y de digestibilidad se observaron en *L. rotundiflorus* y *L. elegans* con 1.5 y 62 y 65.5% respectivamente, seguido de *L. exaltatus* con 1.1 y 58%, mientras que los más bajos en *L. reflexus* con 1.06 y 57.7%. Los valores del REP y digestibilidad proteica de la caseína fueron de 2.34 y 87.5% respectivamente.

Cuadro 14. Relación de eficiencia proteica de semilla destoxificada con el método andino tradicional (Gross, 1982) de cuatro lupinos silvestres<sup>1</sup>

Dietas	REP	% de digestibilidad
Caseína	2.34 ± 0.12	87.5 ± 0.85
<i>L. elegans</i>	1.5 ± 0.069	65.5 ± 1.14
<i>L. exaltatus</i>	1.1 ± 0.024	58.0 ± 0.87
<i>L. rotundiflorus</i>	1.5 ± 0.089	62.04 ± 1.27
<i>L. reflexus</i>	1.06 ± 0.07	57.7 ± 1.84

<sup>1</sup> valores promedio ± D.E. (n = 7)

## DISCUSIÓN

En el presente estudio se observó que en general la mayoría de los lupinos silvestres estudiados se distribuyen en diversas localidades con abundancia, pero no se les da prácticamente ninguna utilidad y por el contrario, cuando llegan a invadir los terrenos de cultivo se les elimina como malezas.

El análisis proximal realizado, revela que todas las especies de lupinos presentaron altas cantidades de proteína en base seca. *L. splendens* registró el más bajo contenido (36.7%), mientras que *L. elegans* el más alto con 45 %. Cantidades similares al de la soya (38-42%) y aproximadamente el doble de leguminosas utilizadas comunmente para consumo humano; así mismo estos valores son superiores al encontrado en otras leguminosas silvestres (con valores entre 10.6 a 37.8 %) (Sotelo *et al.*, 1980). Al comparar los niveles de proteína obtenidos en los lupinos estudiados aquí con otros lupinos descritos en la literatura, se encuentra que las especies mexicanas presentan valores similares a las especies domesticadas (*Lupinus luteus*, *L. angustifolius*, *L. albus* y *L. mutabilis*) cuyo contenido de proteína se ha establecido en 30-44.7% (Petterson, 1998; Petterson *et al.*, 1986). Sin embargo el contenido de este nutriente en otras especie silvestres del viejo mundo (*L. ornatus*, *L. hybridus*, *L. varius* y *L. hispanicus*) es ligeramente superior (40.12 a 48.09%) (Shumilin *et al.*, 1989; Muzquiz *et al.*, 1989).

El contenido de extracto etéreo (5.5-8.9 %) es bajo en comparación con la soya (18%) y el cacahuete (40%) (Aykroyd y Doughy 1964), pero similar al compararlo con otras leguminosas silvestres, cuyos valores se han reportado entre 0.7 a 6.3% (Sotelo *et al.*, 1980); aunque se tienen reportes de algunas leguminosas

silvestres con concentración de 8.5 hasta 24.4%, y entran en el intervalo de los valores para los lupinos cultivados de 5.7 a 14% (Petterson, 1998) así mismo es superior a otros lupinos como *L. hispanicus* (3.0 %) (Muzquiz *et al*, 1989). Los niveles de materia seca, fibra cruda, cenizas y carbohidratos, son similares entre las distintas especies de lupinos estudiados y otras leguminosas cultivadas y silvestres reportadas por diversos autores (Aykroyd y .Doughthy 1964; De la Vega y Sotelo 1986; Giral *et al*, 1978; Sotelo *et al*, 1980). Además, en general coinciden con los valores reportados para las especies de lupinos cultivadas, cuyos intervalos se han establecido en 7-16% de fibra, 2.8 a 3.7 de cenizas y 25 a 36 % de carbohidratos (Petterson, 1998; Petterson *et al*, 1986).

La valoración del contenido de proteína total en las leguminosas es importante, ya que estas presentan concentraciones altas de nitrógeno no proteico (en forma de aminoácidos libres, HCN, péptidos, alcaloides, etc.), los cuales contribuyen significativamente a la cuantificación del nitrógeno por el método kjeldahl, y en leguminosas silvestres estudiadas se ha encontrado hasta el 33% del total del nitrógeno como nitrógeno no proteico (Lucas *et al*, 1988).

Sin embargo, el resultado de proteína verdadera en los lupinos analizados indica que éstos presentan grandes cantidades de nitrógeno proteico debido a que del 68.2 al 85.3% del contenido de nitrógeno total corresponde a proteínas. Estos valores pueden ser debido a la presencia de nitrógeno procedente de aminoácidos no proteicos y alcaloides (que se presentan en grandes cantidades en los lupinos silvestres).

En cuanto a la fracción aminoacídicas de las proteínas, todas las muestras evaluadas mostraron un perfil interesante de aminoácidos, ya que el aminograma

reveló altos contenidos de lisina y triptofano, comparable al de otras leguminosas (soya, frijol, chícharo), pero menor contenido de triptofano al informado en *Lupinus hispanicus* de 1.5-2.0 g/16 g de N (Muzquiz *et al.* 1989a), y coincide con los datos encontrados en otros lupinos silvestres como *L. ornatus*, *L. elegans* and *L. varius* de 0.8-2.3 g/16 g de N (Shumilin *et al.*, 1989). Los aminoácidos limitantes en todos los lupinos, al igual que en la soya y otras leguminosas fueron los azufrados, principalmente metionina con una calificación química entre 73 en *L. elegans* y 88 en *Lupinus* spp. y un contenido de azufrados entre 1.74 (en *L. splendens*) a 2.2 g /16 g de N (en *L.spp.*), comparables a *L. albus* (1.95 g /16 g de N) y *L. angustifolius* (2.2 g/16 g de N) e inferior a *L. mutabilis* (2.4) y *L. luteus* (3.06 g/16 g de N) (Petterson y Mackintosh, 1994; Schoeneberger, 1982a).

### **Factores antinutricionales y tóxicos**

El análisis de los factores antinutricionales y tóxicos, no reveló la presencia de glucósidos cianogénicos en ninguno de los lupinos analizados, al comparar este resultado con otras especies de lupinos, Contreras *et al* (1973) informan 0.46 y 0.42 mg de HCN/100 g de muestra en *L. albus* var. *Astra* y *L. luteus* var. *Áurea* respectivamente. Se tiene reportado una variación del contenido de estas sustancias de acuerdo a las condiciones climáticas y geográficas de donde proceden las muestras, ya que en ecotipos de *L. mutabilis* se encontraron valores que fluctuaron entre 0.53 a 2.89 mg de HCN/100 g de muestra (Shoeneberger *et al.*, 1982b).

Para este estudio se evaluó la actividad aglutinante del extracto de los lupinos en eritrocitos de hámster debido a su inespecificidad; ya que en informes

previos con eritrocitos de borrego no se detectó actividad en *L. exaltatus* ni *L. reflexus* y en *L. mexicanus* fue de título 6 (Ruiz, 1994), en este estudio se encontró un título de 4 y 6 en *L. exaltatus* y *L. reflexus* respectivamente.

En otra especie como *L. mutabilis*, *L. albus* y *L. hispanicus* se informa ausencia de hemaglutininas utilizando eritrocitos de conejo (Muzquiz *et al.*, 1989b). Sin embargo, Shoeneberger *et al* (1982b) encontraron para *L. albus* y *L. mutabilis* valores de 8 y 0, y 4 y 3 con eritrocitos de conejo y bovino respectivamente.

Entre las muestra analizadas no se observaron diferencias en el contenido de inhibidores de tripsina; los valores estuvieron entre 0.87 (*L. exaltatus*) a 1.19 UTI/mg de muestra (*L. splendens*), muy por debajo del valor reportado para la soya (30-40 UTI/mg de muestra) y similar al de *L. albus*, *L. termis* y *L. mutabilis*, con niveles de 1.29, 2.2 y 1.16 UTI/mg de muestra, respectivamente (Shoeneberger *et al.*, 1982b), pero menor al encontrado en *L. angustifolius* de 5.47 UTI/mg de muestra (Shick y Madhusudhan, 1988).

El contenido de taninos, también resultó bajo de 0.023 en *L. splendens* a 0.266 g de ácido tánico/100 g de muestra en *L. elegans*, estos valores son similares a los encontrados en chícharo (0.25 g de taninos totales/100 g de muestra) y al de las especies domesticadas de *L. albus* (0.16-0.49), *L. angustifolius* (0.17-0.37) y *L. luteus* (0.17-0.32) (DuPont *et al*, 1994; Allen, 1998).

En general estos compuestos se presentaron en bajas cantidades, y se encuentran muy por debajo de contenido de otras leguminosas de consumo humano (Ali y Muzquiz, 1998).

## Alcaloides

El contenido de alcaloides en las semillas de los lupinos es el principal componente antinutricional, y debido a estos compuestos los lupinos son considerados tóxicos (James *et al.*, 1992; Keller, 1989). Más de 100 alcaloides, principalmente quinolizidínicos han sido reportados en la literatura en el género *Lupinus* (Wink, *et al.*, 1995).

Todas las semillas estudiadas presentaron altos contenidos de alcaloides, la lupanina fue el mayoritario en casi todas las especies, lo que coincide con reportes previamente realizados en otras especies, como *L. albus*, *L. angustifolius* y *L. mutabilis* (Muzquiz *et al.*, 1994; Wink, 1998). El contenido de este alcaloide fluctuó entre 0.03 (*L. elegans*) y 11.5 (*L. rotundiflorus*) mg/g de muestra. Estos valores son inferiores al presentado por *L. mutabilis*, cuyos límites de concentración son de 9.83-27.45 mg/g de muestra (Hatzold *et al.*, 1983). Sin embargo, en *L. reflexus* el alcaloide mayoritario fue la esparteína, que mostró un alto nivel de 26.6 mg/g de muestra, al igual que en *Lupinus arcticus*, especie silvestre de Canadá, solo que el contenido de esparteína en esta especie es menor con 0.25 a 10.23 mg/g de muestra (Majak *et al.*, 1994) y superior a los valores en *L. mutabilis*, de 0.9-4.99 mg/g de muestra (Hatzold *et al.*, 1983). Asimismo *L. elegans* fue la única especie estudiada que no presentó esparteína, al igual que las especies europeas *L. albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus* y *L. hispanicus* (DuPont *et al.*, 1994). El contenido de 13-OH lupanina varió de 0.03 mg/g de muestra en *L. spp* hasta 1.0 mg/g de muestra en *L. splendens*, estos valores son menores a los encontrados en *L. mutabilis* (0.97-6.62 mg/g de muestra) y a *L. angustifolius* (2.0 mg/g de muestra) pero similares a los de *L. albus* amargos

(0.4 mg/g de muestra). No se encontró 13-OH lupanina en *L. exaltatus*, *L. elegans* y *L. rotundiflorus*, al igual que en *L. luteus* y *L. hispanicus* (DuPont *et al.*, 1994).

En ninguna de las especies estudiadas se encontró citisina que es de los alcaloides más tóxicos, coincidiendo con Wink (1993), quien informó que este alcaloide generalmente se encuentra ausente en los lupinos, sin embargo, en especies como *L. microcarpus*, *L. densiflorus*, *L. ruber*, *L. arbustus*, *L. argenteus*, *L. bicolor*, *L. caudatus*, y *L. nanus* se puede presentar como traza. La citisina es más común en especies de los géneros *Genista*, *Baptisia* y *Thermopsis*.

Los cromatogramas de los extractos de *L. elegans* y *L. splendens* revelaron que los alcaloides mayoritarios no fueron ninguno de los analizados, sin embargo, estos podrían ser aflina o aflidina, principales alcaloides en algunas especies silvestres de Norteamérica, (Wink *et al.*, 1995) o multiflorina y albina mayoritarios en *L. albescens*, especie Sudamericana (Planchuelo y Wink 1993).

Por lo que se recomienda realizar estudios en estas especies de lupinos utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, para ayudar a elucidar las estructuras o por Resonancia magnética nuclear (RMN), etc. de los picos desconocidos en este estudio.

Asimismo es recomendable analizar el posible contenido de anagirina, considerado por algunos autores como teratogénico en bovinos, y reportado sobre todo en algunas especies de Norteamérica. Ya que en un estudio realizado por Keeler y Gross (1980), en las especies Europeas *L. albus*, *L. luteus*, *L. angustifolius* y de Sudamérica *L. mutabilis*, tanto en variedades dulces como

amargas, no encontraron anagrina en ninguna muestra analizada, por lo que sugieren que estas especies pueden ser consumidas sin riesgo de provocar teratogenicidad.

Por otra parte se ha visto variación en la composición de alcaloides en diferentes órganos de la planta de lupinos especialmente existen cambio cuantitativos en raíz por influencia de factores bióticos y abióticos (Stobiecki *et al.*, 1996). Asimismo hay relación entre el contenido de alcaloides en *L. mutabilis* y la concentración de fósforo y aluminio en el suelo donde crece la planta (Blasco *et al.*, 1978), pero en general la composición y contenido de alcaloides individuales en esta especie esta dado genéticamente (Gross y Hatzold 1986). En otro estudio con *L. argenteus* se observó que el patrón de alcaloides varió considerablemente en muestras procedentes de diferentes localidades, sin embargo se concluyó que las diferencias quimiotípicas son probablemente genéticas (Wink y Carey 1994).

### **Destoxificación de semillas**

En el presente estudio se evaluaron métodos sencillos y económicos para eliminar o disminuir alcaloides, dos de ellos consistieron en tratamientos térmicos acuosos, uno se realizó con agua acidulada, utilizando HCL, debido a que los alcaloides con carga (la mayoría son moléculas con carga, bajo condiciones ácidas) en sal, son más solubles en agua. En ambos tratamientos hubo una eliminación del 100% de lupanina. Esta reducción fue mayor a la encontrada por Mukisira *et al.* (1995) en *L. albus* del 41.3 %, sin embargo, el tiempo de cocción fue menor (1 h) y continuo (sin cambio de agua) con un lavado de 12 h. En cuanto a la 3-OH-

Lupanina, el decremento fue muy similar con los dos métodos evaluados del 11 y 12% para el tratamiento acuoso y acidulado respectivamente.

Así mismo, hubo una mayor pérdida de sólidos totales con el tratamiento térmico acuoso (17.4 %) que con el acidulado (14.8%), se observó un incremento de la proteína del 8.2% con el tratamiento acuoso y del 14.5% con el tratamiento acidulado. Lo que supone que los sólidos perdidos fueron carbohidratos principalmente, minerales vitaminas y otros compuestos hidrosolubles.

Para calcular la proporción de la disminución de alcaloides por efecto de los tratamientos, se realizaron análisis a la semilla cruda a la que se consideró su contenido de alcaloides como 100% (suma total de las áreas de los picos del cromatograma), así también a las semillas cocidas con y sin acidificar. Así se tiene que el cromatograma de semillas cocidas con agua sin acidificar reveló un 17.5% del área de los picos en relación de las semillas crudas, eliminándose, por consiguiente, el 82.5 %. El cromatograma de las semillas cocidas con agua acidulada mostró 11.0 % de alcaloides en relación con el total de las semillas crudas eliminándose, por consiguiente, el 89.0 %.

En el tratamiento con extracciones térmicas continuas (según Gross, 1982) hubo un incremento de la proteína inicialmente de 40 a cerca de 45 % hasta la quinta extracción, esto es debido principalmente a que los carbohidratos solubles en agua se removieron, sin embargo, disminuyó la proteína posteriormente, en la última extracción los niveles de alcaloides disminuyeron hasta cerca del 95 %, siendo negativa la prueba de Dragendorff estos resultados fueron similares a las extracciones con agua caliente realizados por Tapia (1990), pero menores a los de Gross (1982), que informa una reducción del 99%.

La eficiencia de desamargado de este método resultó buena, sin embargo, las semillas en la última extracción prácticamente se deshicieron, por lo que no se puede recuperar mucha semilla al final.

En la prueba de destoxificación andina tradicional (Gross, 1982) se observa una disminución en el contenido de alcaloides con la cocción y lavado en todas las especies tratadas, así como de proteína. El efecto fue mayor en *L. elegans* (con 95% de eliminación, seguido de *L. exaltatus* (94.7%), *L. reflexus* (92.7%) y por último *L. rotundiflorus* (con 90%); estos porcentajes son mayores a los encontrados en *L. mutabilis* con un tratamiento de remojo pero cocimiento de 40 min, ya que se redujo en un 72.6 % los alcaloides totales (Tapia, 1982).

El mayor porcentaje de eliminación de alcaloides encontrado en *L. elegans* es debido a que la testa de las semillas de esta especie es menos dura y de mayor tamaño que las de los otros tres lupinos y, por consiguiente, fueron mejor hidratadas y cocidas lo que permitió una mayor extracción de alcaloides con el lavado; según Tapia (1990) las semillas pequeñas y de testa dura, necesitan mayor tiempo de hidratación, cocido y lavado para eficientar la extracción de alcaloides.

De acuerdo con los resultados observados en los diferentes métodos de destoxificación estudiados, el remojo de semillas es importante en el desamargado, por lo que es importante encontrar una adecuada hidratación de las semillas para una óptima extracción de alcaloides; en un estudio de Tapia (1982) señala que las semillas de *L. mutabilis* inician su hidratación a partir de las 3 a 4 h de remojo y llegan al máximo a las 21-24 h, aunque algunas semillas no llegan a hidratarse hasta después de 48 h de remojo.

Si se quiere emplear el último tratamiento en los lupinos mexicanos sería conveniente conocer el tiempo óptimo de hidratación de semillas y a la vez es necesario seleccionar especies o variedades con semillas de testa más permeable.

A pesar de que con el método de extracción térmica continua (Gross, 1982) se tuvo mayor eficiencia de eliminación de alcaloides, en comparación con los demás métodos evaluados no resulto práctico debido a la pérdida de material (semilla). Por lo que el método tradicional andino, fue seleccionado para preparar las harinas desamargadas en la prueba de relación de eficiencia biológica (REP), además de una buena eficiencia de extracción de los alcaloides y a lo práctico del tratamiento.

### **Prueba toxicológica**

En la prueba de toxicidad aguda se observó que la semilla de *L. elegans* no resultó tóxica a ninguna dosis evaluada ya que su mortalidad fue de 0%. Este resultado es debido a que *L. elegans* no contiene esparteína que es el alcaloide quinolizidínico más tóxico, ni 13-OH-lupanina, además, la cantidad de lupanina administrada fue muy baja, ya que esta varió entre 0.000045 y 0.45 mg de lupanina/kg de P.C. en las distintas dosis administradas, valores muy por debajo de la DL<sub>50</sub> de este alcaloide (410 mg/kg de P.C. vía oral) (Yovo *et al*, 1984).

Así mismo *Lupinus exaltatus*, también presentó 0% de mortalidad con todas las dosis evaluadas, ya que las cantidades de esparteína (0.000042 a 0.42 mg /kg de P.C.) y lupanina (0.008745 a 87.45 / kg de PC) administrados fueron muy

inferiores al DL<sub>50</sub> (220 y 410 mg/kg PC de esparteína y lupanina respectivamente) reportado para estos alcaloides (Yovo *et al.*, 1984).

Por otra parte las semillas de *L. reflexus* y *L. mutabilis* fueron los que presentaron la mayor toxicidad (100% de mortalidad) con las dosis más altas de 15 y 12 g de muestra/kg de PC respectivamente, este resultado es debido principalmente a la alta cantidad de esparteína administrada aportada por *L. reflexus* (que es de las especies estudiadas con el mayor contenido de esparteína) de 399.45 mg/kg, alcanzando la DL<sub>50</sub>, mientras que la lupanina fue de 43.65 mg/kg de PC. *L. mutabilis* se utilizó para confirmar la toxicidad causada por estos alcaloides ya que las cantidades administradas de esta especie fueron de 358.8 y 668.8 mg/kg de P.C de esparteína y lupanina, respectivamente.

Asimismo se encontró una ligera mortalidad con semillas de *L. rotundiflorus*, *L. splendens* y *L. simulans* a la más alta concentración de 15 g/kg de P.C. debido a la baja cantidad de esparteína (1.65, 4.35 y 6 mg/kg de P.C respectivamente) y lupanina (172.5, 13.35 y 133.05 mg/kg de PC respectivamente) administrada.

Debido a esto es necesario realizar estudios de toxicidad subaguda o crónica con sus análisis histológicos, por efecto del consumo prolongado de estas semillas, ya que en un estudio realizado en ratas alimentadas con semilla de *Lupinus angustifolius* por 90-98 días, con 50, 250, 1050 o 5050 mg de alcaloides de lupinos/kg de dieta, se observó una relación de la dosis con la reducción de eritrocitos, hematocritos, volumen celular y los niveles de hemoglobina, así como en el peso relativo de hígado, además se observó alteración de hepatocitos con las dosis de 5050 1050 y 250 mg/kg (Butler *et al.*, 1996).

## Relación de Eficiencia Proteica (REP)

En el ensayo del REP todos los lupinos estudiados, con semillas cocidas y lavadas, se obtuvo un incremento en la eficiencia proteica y por consiguiente de la digestibilidad, el mayor valor se observó en *L. rotundiflorus* y *L. elegans* (1.5), así como de digestibilidad proteica (62 y 65.5% respectivamente) mientras que los más bajos en *L. reflexus* (1.06 y 57.7% de REP y digestibilidad respectivamente). Sin embargo estos valores son bajos en comparación a los de la caseína (2.34 y 87.5% de REP y digestibilidad respectivamente). Los bajos valores del REP y de digestibilidad en las harinas de los lupinos, se debieron posiblemente a la deficiencia de metionina, registrada en semilla cruda y por alcaloides residuales en cantidades mínimas, por lo que se sugiere un lavado más prolongado, ya que debido a la cubierta dura impide una extracción total de alcaloides.

Al comparar el valor del REP con las especies de lupinos utilizadas para consumo humano y animal, se puede apreciar que el valor de las especies mexicanas estudiadas son superiores a los encontrados en variedades dulces de *L. albus* y *L. luteus*, cuyos valores se han reportado en 0.48 y 1.0 de REP respectivamente (Ballester *et al*, 1980) y son similares a los encontrados en *L. mutabilis* variedad semidulce (1.34) y semilla cocida y lavada (1.24 y 1.53) (Schoeneberger *et al*, 1982b y Schoeneberger *et al*, 1982c). Estos autores concluyen que los bajos valores del REP en semillas desamargadas son debido a la deficiencia en metionina ya que al suplir con este aminoácido se pueden alcanzar valores de hasta 2.69, similares a la caseína. Otra alternativa es mezclar lupinos con diversas fuentes proteicas vegetales ricas en metionina, como Lupino-trigo (REP de 2,02), Lupino-cebada cocida (2,0), Lupino-avena cocida (2,16),

Lupino-maíz cocido (2,12), Lupino-arroz cocido (2,08), Lupino-quinua cocida (2,38), Lupino-maíz-quinua (2,42), Lupino-cebada-quinua (2,52), Lupino-arroz-quinua (2,51), Lupino-avena-quinua (2,39), Lupino-maíz-avena (2,23) (Schoeneberger *et al.*, 1982c).

En general no existían en México datos en especies nativas de lupinos acerca del contenido de factores antinutricionales, aminoácidos, alcaloides (lupanina, esparteína 3-hidroxilupanina, 13 hidroxilupanina y citisina), toxicidad aguda y relación de eficiencia proteica. Los datos aportados en esta investigación permitirán ampliar y detallar el estudio de estas especies, que son de importancia económica en diversos países de Europa y Sudamérica y sobre todo en Australia, en donde son ampliamente cultivados; por lo que en nuestro país podría inducirse el cultivo de algunos lupinos silvestres para aprovecharlos en forma de alimento o fármaco de una forma racional.

## CONCLUSIONES

1. Las especies de lupinos estudiadas presentan una fenología muy variada con gran diversidad morfológica y caracteres poco constantes. Son abundantes y de amplia distribución, se encuentran principalmente en zonas montañosas de la Sierra Madre Occidental y Eje Neovolcánico Transversal de Jalisco, son parte importante de los bosques de pino-encino.
2. Los contenidos de proteína cruda y total en las semillas enteras de las especies estudiadas en general fue alto, sobresaliendo en *L. elegans*.
3. El contenido de aminoácidos fue aceptable ya que se cuantificaron cantidades apreciables de lisina y triptofano, comparables con el patrón de la FAO, sin embargo, la calificación química señala a la metionina como aminoácido limitante en todas las especies.
4. La presencia de los factores antinutricionales lectinas, taninos, glucósidos cianogénicos e inhibidores tripsicos en semillas crudas fue baja o ausente, por lo que son limitantes para el consumo de estas semillas.
5. La mayoría de los lupinos estudiados presentó como alcaloide mayoritario a la lupanina, a excepción de *L. reflexus* en donde la esparteína fue el alcaloide mayoritario, en *L. elegans* y *L. splendens* los alcaloides mayoritarios fueron desconocidos, asimismo *L. elegans* fue la única especie que no presentó esparteína.
6. En general los lupinos presentaron altos contenidos de lupanina y *L. reflexus* de esparteína, además los cromatogramas revelaron la presencia de otros alcaloides no identificados; en ninguna especie se observó la presencia de citisina.

7. De los tratamientos empleados para eliminar los alcaloides, el de extracciones térmicas sucesivas fue el que dio mejor resultado, con una eliminación del 95%.

8. La prueba de toxicidad aguda reveló a *L. reflexus* como la más toxica de las especies silvestres evaluadas, sin embargo, resultó menos que *L. mutabilis*, que es la especie consumida en Sudamerica, mientras que en *L. elegans* no se observó toxicidad aguda.

9. La calidad biológica de la proteína de la semilla destoxificadas de los lupinos fue baja debido posiblemente a su deficiencia en metionina.

10. Los lupinos mexicanos estudiados son una buena fuente de proteína de aceptable calidad, excepto por su contenido en metionina y una vez que se eliminen o disminuyan los alcaloides pudieran ser utilizados como ingrediente en la alimentación humana o animal, suplementados con metionina o mezcladas con cereales.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

## ANEXO 1

### Determinación de aminoácidos

La hidrólisis de las proteínas se realizó siguiendo la técnica de Lucas y Sotelo (1982), para lo cual las harinas de los lupinos se colocaron dentro del tubo de hidrólisis, se pesó la cantidad de muestra de acuerdo al contenido de proteína contenida, a la que se adicionó HCL 6 N (cantidad previamente calculada), se insufló nitrógeno por 30 segundos, se cerró perfectamente el tubo y se sometieron a condiciones de hidrólisis  $145^{\circ} \text{C} \pm 1$  durante 4 h. Posteriormente el hidrolizado se filtró y se le agregaron 5 ml del estándar interno (norleucina), se evaporó en rotovapor a  $75^{\circ} \text{C}$  a sequedad, se recuperó con solución lavadora y neutralizó con NaOH 5 N, se ajustó el pH a  $6.8 \pm 0.2$ , y aforó a 25 ml. De aquí se tomaron alícuotas que se filtraron para ser inyectadas en el autoanalizador de aminoácidos.

La determinación del triptofano fue colorimétricamente de acuerdo a Ras *et al.* (1974), de la siguiente forma:

Debido a que la hidrólisis ácida destruye el triptofano, se tiene que recurrir a la hidrólisis alcalina o enzimática. En este caso se realizó una hidrólisis enzimática con pancreática al 0.4% y pepsina al 0.3%.

1 g de muestra desengrasada se le adicionó 10 ml de pepsina, se incubó a  $37^{\circ} \text{C}$  durante 3 h con agitación ocasional. Enseguida se le adicionó 10 ml de pancreatina, la que se incubó a  $37^{\circ} \text{C}$  por 24 h con agitación ocasional. Al terminar la incubación se aforó a 50 ml y se filtró, se tomaron 3 alícuotas de 2 ml cada una, a una se le añadió 7.5 ml de HCL y a los otros dos 7.5 ml de p-dimetilbenzaldehído (DMBA). se agitaron y reposaron 15 min. en la oscuridad, se agregó 0.5 ml de nitrito de sodio, se agitó y nuevamente se dejó reposar 15 min.

en la oscuridad. Leer la absorbancia a 590 nm. para realizar los cálculos, reportando en g de triptofano por cada 100 g de proteína.

## ANEXO II

### HEMAGLUTININAS

#### DETERMINACION SEMICUANTITATIVA

Fundamento: La determinación se basa en el poder aglutinante que tienen ciertos componentes de naturaleza proteica hacia los eritrocitos. Se emplea la técnica de microtitulación basada en una serie de diluciones donde el punto final de aglutinación se determina mediante una estimación visual, para ello se requiere que los eritrocitos sean sensibilizados mediante una proteasa. En el presente estudio se llevó a cabo la determinación semicuantitativa de hemaglutininas con eritrocitos de hámster.

Preparación de reactivos:

a) Cuando la sangre se use de inmediato, se puede usar como anticoagulantes la heparina o citrato en las siguientes concentraciones:

15-20 UI de heparina por mililitro de sangre

0.1 ml de solución de citrato por ml de sangre

Si la sangre no se va a usar de inmediato y se desea conservar en refrigeración por unos días, lo más conveniente es emplear la solución ALSEVER como anticoagulante en proporción 1:1.

b) En términos generales se usa tripsina (de páncreas de porcino SIGMA T-8128) al 0.1% en solución salina, para el proceso de sensibilización; sin embargo, cuando se emplea sangre de cualquier roedor (hámster, ratón, rata, etc.) se recomienda sensibilizar con pronasa (de *S. griseus* SIGMA P-5005) al 0.2% en solución salina.

Procedimiento:

#### PREPARACION DEL EXTRACTO DE LA MUESTRA:

1. Suspender 1 g de muestra finamente molida y desengrasada (cuando sea necesario) en 10 ml de solución salina al 1%.
2. Extraer por agitación mecánica durante 2 horas a 300 r.p.m. a temperatura ambiente.
3. Centrifugar el extracto a 1,400 r.p.m. durante 15 minutos para eliminar el residuo insoluble.
4. Filtrar el sobrenadante a través del filtro de vidrio de poro grueso, si es necesario se lava el residuo con solución salina al 1%.
5. Aforar el filtrado a 10 ml con solución salina al 1%.

#### PREPARACION DE LA SANGRE:

1. Una vez sangrado el animal, añadir a la sangre la solución anticoagulante, homogenizar suavemente.
2. Lavar con centrifugar a 1,500 r.p.m. durante 10 minutos, 3 veces con solución salina al 0.9%. La relación sangre:solución salina es 1:5 aproximadamente. Si la sangre no está muy hemolizada es suficiente realizar dos lavados (el sobrenadante debe ser incoloro).
3. Después del último lavado, medir la cantidad de paquete de eritrocitos y diluirlos al 4%, para lo cual se deben agregar 24 ml de solución salina al 0.9% por cada 1.0 ml de glóbulos rojos.

### SENSIBILIZACION DE LOS GLOBULOS ROJOS:

1. Por cada 10 ml de suspensión de glóbulos rojos al 4% agregar 1 ml de solución de proteasa (para sangre de hámster se emplea pronasa al 0.2% y colocarlos en la incubadora a 37 °C durante 1 hora.
2. Centrifugar para eliminar la enzima sobrenadante y dar 3 lavados con solución salina al 0.9% centrifugando a 1,500 r.p.m. durante 10 minutos.
3. Después del último lavado resuspender el paquete de eritrocitos; por cada 1.0 ml de paquete de eritrocitos sensibilizados se agregan 19 ml de solución salina al 0.9% (la suspensión queda al 5%). Cuando se observa que la sangre tiene algunos coágulos, es necesario filtrar a través de gasa en un embudo de tallo corto.

### AJUSTE DE LA SUSPENSION DE ERITROCITOS:

1. Tomar 1 ml de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizados y agregar 4 ml de solución salina al 0.9%. mezclar. Se lee en el espectrofotómetro a 620 nm; se ajusta a 100% de transmitancia usando solución salina al 0.9% como blanco.
2. Diluir la suspensión hasta que la lectura sea de  $25\% \pm 1$  de transmitancia. Al final la suspensión debe quedar al 4% y dar dicha lectura de transmitancia en el espectrofotómetro a 620 nm.

### PREPARACION DE LAS PLACAS.

1. Con ayuda de la pipeta automática de 12 canales depositar 50 ml de solución salina al 0.9% en cada pozo de las placas tipo V del microtiter, evitando tocar las paredes de los pozos.

2. Con un microdilutor tomar 50 ml del extracto de la muestra, se introduce en el pozo sin tocar las paredes y se gira, se saca del pozo y se introduce en el pozo siguiente de tal forma que se van llevando a cabo las diluciones del extracto.
3. Con el pipeteador de gota se adicionan 50 ml (una gota) de eritrocitos sensibilizados en cada pozo, se rota la placa en forma circular y se incuba a 37°C durante 1 hora.

## LECTURA

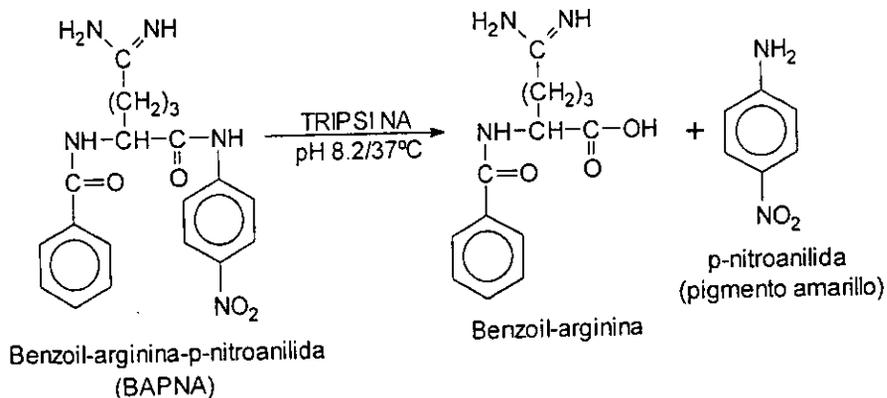
Transcurrido el tiempo, colocar la placa en el dispositivo de lectura. Se observa a través del espejo el fondo de los pozos de cada hilera de prueba. Se considera positivo aquel pozo que presente una difusión de eritrocitos en todo el pozo (aglutinación) y negativo aquel pozo donde se observe sedimentación de eritrocitos en el centro. Se reporta la máxima dilución donde se presenta aglutinación (título).

## ANEXO III

### INHIBIDORES DE TRIPSINA.

Fundamento: La técnica se basa en poner en contacto el extracto acuoso directo o diluido de una muestra con una solución estándar de Tripsina (40 mg/10 ml) posteriormente se determina la actividad proteolítica remanente usando un sustrato sintético cromógeno (Benzoil-arginina-p-nitroanilida [BAPNA], el cual producirá coloración que es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de Tripsina.

La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



Preparación de reactivos:

a. Solución amortiguadora Tris (hidroximetil-amino-metano): pesar 6.05 g de tris y 2.94 g CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, disolverlos en 900 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8.2 y aforar a 1 litro.

b. Solución de benzoil-arginina-p-nitroanilida (BAPNA): disolver 100 mg de BAPNA en 2.5 ml de dimetil-sulfóxido, la disolución es más rápida si se calienta en baño de agua a 37 °C, se afora a 250 ml con amortiguador Tris previamente calentado a 37 °C. Esta solución se prepara el mismo día de su uso y se mantiene a 37 °C.

c. Solución estándar de Tripsina: pesar con mucha exactitud 4 mg de tripsina bovina (SIGMA T-8253) y se disuelven en 200 ml de HCl 0.001N. Esta solución contiene 20 mg de tripsina/ml y debe ser almacenada en refrigeración donde puede durar de 2 a 3 semanas sin pérdida apreciable de actividad.

Procedimiento:

#### PREPARACION DEL EXTRACTO:

1. A un gramo de muestra finamente molida y desengrasada (cuando el contenido de grasa sea superior al 5%) se le adicionan 45 ml de NaOH 0.01N, ajustar el pH de la suspensión a  $9.6 \pm 0.2$  y aforar a 50 ml con NaOH 0.01N.
2. Agitar mecánicamente durante 2 h y 30 min a 300 r.p.m. Después de este tiempo dejar reposar el extracto durante 30 min.
3. Decantar el sobrenadante y eliminar el residuo insoluble. El sobrenadante debe ser diluido de tal manera que 1 ml del extracto produzca una inhibición entre 40 y 60%, esto ayuda a reducir la desviación estándar.

#### DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD:

1. En tubos de ensayo añadir el extracto en volúmenes crecientes de: 0, 0.6, 1.0, 1.4, y 1.8 ml por duplicado y ajustar el volumen final de cada tubo a 2.0 ml con agua destilada.
2. Adicionar a todos los tubos 2 ml de tripsina a 37 °C agitando cada tubo con el vortex. A los blancos se les adiciona además 1 ml de ácido acético para detener la reacción.
3. Colocar todos los tubos en el baño de agua a 37 °C y dejar incubar durante 5 min para que entren en contacto inhibidor y enzima.
4. Adicionar a cada tubo 5 ml de solución de BAPNA a 37 °C y volver a colocar los tubos en el baño de agua para incubarlos durante 10 min. (con cronómetro).
5. Detener la reacción enzimática añadiendo 1 ml de ácido acético a cada tubo a excepción de los blancos a los cuales ya se les había adicionado.

6. Es frecuente la formación de precipitado o el enturbiamiento de la mezcla de reacción por lo que se deja reposar durante 15 min y después se filtra primero el sobrenadante y posteriormente la porción residual. El filtrado deberá estar translúcido.

En el siguiente cuadro se observa en forma esquemática la serie de tubos para la determinación de actividad inhibitoria.

Tubo	ml Ext.	ml H <sub>2</sub> O	ml Tripsina	<u>5 min</u> >	ml BAPNA 37°C	<u>10 min</u> >	ácido acético 30% (Aac)
B1	1.8	0.2	2.0+1.0 ml Aac*		5.0		0.0
1	1.8	0.2	2.0		5.0		1.0
B2	1.4	0.6	2.0+1.0 ml Aac*		5.0		0.0
2	1.4	0.6	2.0		5.0		1.0
B3	1.0	1.0	2.0+1.0 ml Aac*		5.0		0.0
3	1.0	1.0	2.0		5.0		1.0
B4	0.6	1.4	2.0+1.0 ml Aac*		5.0		0.0
4	0.6	1.4	2.0		5.0		1.0
BR	0.0	2.0	2.0+1.0 ml Aac*		5.0		0.0
R	0.0	2.0	2.0		5.0		1.0

\* A los blancos les adiciona seguidamente 1 ml de ácido acético 30%.

7. La lectura de cada tubo se realiza en el espectrofotómetro a 410 nm en el espectro visible. Previamente se debe ir ajustando a 100% de transmitancia con el respectivo blanco de cada dilución. Es importante remarcar que el tubo que contiene 0.0 ml de extracto (40 mg tripsina/10 ml) es nuestra referencia y sobre este tubo se basarán los cálculos.

NOTA: Es importante trabajar cada tubo con su blanco porque en ocasiones se arrastran coloraciones del extracto directo provocando interferencias en el momento de leer en el espectrofotómetro, de este modo mediante el blanco se hace una corrección.

Cálculos:

Una unidad de tripsina (U.T.) es arbitrariamente definida como un incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm por 10 ml de mezcla de reacción descritas por Kakade y colaboradores. La actividad de los inhibidores de Tripsina se expresa en términos de Unidades de Tripsina Inhibida (U.T.I.). La lectura de absorbancia (A), puede ser transformada directamente en unidades de tripsina:

$$U.T. = A \times 100$$

Ya que se tiene una serie de alícuotas, se tendrán a su vez una serie de valores de U.T., es conveniente determinar el % de inhibición para lo cual se toma como referencia el tubo 3 que es el que contiene 1 ml de extracto. Si el % de inhibición no cae dentro del rango de 40 al 60% de inhibición es necesario hacer un ajuste del extracto para que cumpla este requisito

$$\% \text{Inhibición} = \frac{R - A_3}{m}$$

Donde:

R = U.T. de la referencia

A<sub>3</sub> = U.T. del tubo 3

m = peso de la muestra en gramos

Para obtener los valores correspondientes de U.T.I. se restan los valores de U.T. al dato de referencia y posteriormente se puede calcular el valor de U.T.I./ml de cada una de las alícuotas.

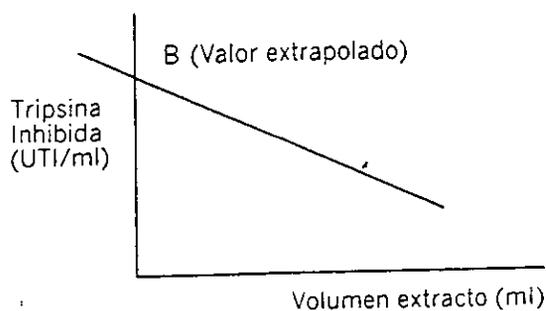
$$U.T.I. = R - U.T.$$

Donde:

R = Valor de unidades de tripsina de la referencia

Cuando se grafica la actividad enzimática inhibitoria (U.T.I./ml) vs. ml de extracto de prueba, se observa una correlación lineal negativa de donde se puede obtener el valor extrapolado que corresponde al valor cero de la solución inhibitoria.

Gráfica U.T.I./ml vs. ml de extracto



Este valor extrapolado, es el valor más cercano a la actividad inhibitoria real o verdadera (si se refiere uno al inhibidor de soya del tipo Kunitz).

Si la correlación lineal no es satisfactoria ( $r < 0.9$ ), se puede trabajar con un valor promedio de la serie de alícuotas y reportar en U.T.I./ml.

$$U.T.I./ml = UTI / \text{ml de extracto}$$

Es conveniente reportar en unidades de tripsina inhibida con respecto a 1 mg de muestra:

$$\text{U.T.I./mg muestra} = B \times F \times \frac{50}{1000}$$

Donde:

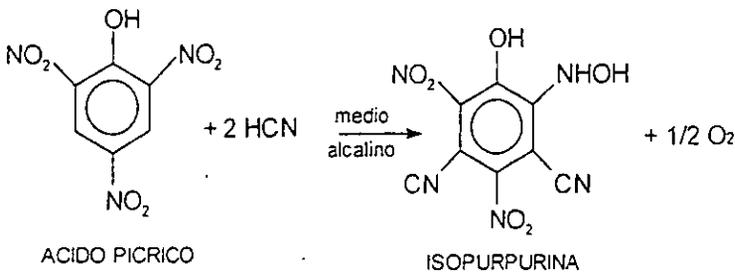
B = valor extrapolado o promedio en U.T.I./ ml

F = Factor de dilución, el cual depende de la(s) dilucion(es) realizada(s). Cuando se tiene el extracto directo  $F=1$ .

#### ANEXO IV

#### GLUCOSIDOS CIANOGENICOS

Fundamento: El presente método aprovecha la reacción sensible y específica de Guignard, la cual es ampliamente utilizada en pruebas cualitativas para la detección tanto de glucósidos cianogénicos como del propio HCN. Para cuantificar el HCN total que potencialmente puede ser liberado se hace uso de una hidrólisis enzimática (por medio de una  $\beta$ -glucosidasa) del correspondiente glucósido cianogénico, el HCN liberado reacciona con el ácido picrico formando la isopurpurina de color café rojizo, el color es directamente proporcional al contenido de glucósidos cianogénicos en la muestra.



Preparación de reactivos:

a. Solución de  $\beta$ -glucosidasa (SIGMA G-8625): pesar 0.25 g de  $\beta$ -glucosidasa y disolverlos en buffer de fosfatos pH=7.0, agitando con cuidado para evitar la formación de espuma. Una vez disuelta la enzima se agregan 1.7 g de  $\text{NaNO}_3$  que actúa como activador de dicha enzima, aforar a 250 ml con buffer pH 7.0. La concentración final es de 1 mg de  $\beta$ -glucosidasa /ml y 0.08 M de  $\text{NaNO}_3$ .

b. Solución de picrato de sodio alcalinizada: pesar 2.5 g de ácido pícrico y disolverlos en agua destilada, agregar 12.5 g de carbonato de sodio, agitar hasta su disolución, aforar a 500 ml con agua destilada.

c. Papel indicador de HCN: sumergir papel Whatman No. 2 en una solución de picrato de sodio alcalinizada, escurrir y secar en estufa a una temperatura de 55-60°C durante 30 minutos. Cuando esté seco, cortar tiras de 2x10 cm.

d. Amortiguador de fosfatos pH=7.0: se preparan dos soluciones como se indica a continuación:

A: Solución de fosfato de sodio monobásico 0.2 M (27.8 g en 1 l)

B: Solución de fosfato de sodio dibásico 0.2 M (53.65 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ó 71.7 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  en 1 l)

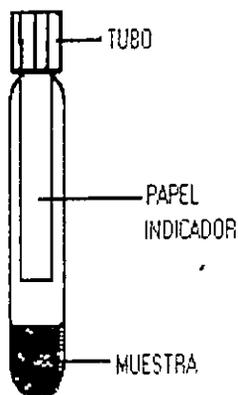
Mezclar 39 ml de A y 61 ml de B y aforarlo a 200 ml. Finalmente se ajusta el pH a 7.0 empleando el potenciómetro.

e. Solución estándar de HCN equivalente a 100 mg de HCN/ml (24.1 mg KCN/100 ml)

Procedimiento:

#### LIBERACION DEL HCN DE LA MUESTRA

1. Pesar de 20 a 500 mg de muestra finamente molida en un tubo de cultivo Pyrex. Si no se tiene información sobre el contenido de glucósidos cianogénicos en la muestra se pesan 500 mg.
2. Adicionar 5 ml de solución de  $\beta$ -glucosidasa (fría) procurando humedecer toda la muestra. Homogenizar.
3. Colocar la tira de papel indicador humedecida (aproximadamente con 8 gotas de agua) en la boca del tubo sin tocar las paredes y cerrar herméticamente con tapón de rosca.



4. Colocar los tubos en el baño de agua que ya debe estar a una temperatura de 40 °C y con el control de velocidad de agitación ajustado a 3.5 por espacio de 4 horas.
5. Transcurrido el tiempo, colocar los tubos en el congelador durante 30 minutos.
6. Sacar los tubos del congelador y destapar para adicionar 1 ml de HCl 0.5N (frío). Volver a tapar los tubos. Homogenizar teniendo la precaución de que el líquido no toque el papel

indicador. Si se usan los tapones adecuados, la tira de papel quedará adherida al tapón y no se presentarán problemas de manipulación.

7. Colocar los tubos en la incubadora por 30 minutos a 60 °C. Transcurrido el tiempo sacarlos y en ese momento se puede realizar visualmente la detección cualitativa. Aquellos tubos que presenten una coloración café-rojiza se consideran positivos y se procederá a realizar la cuantificación. Los tubos que no presenten coloración se consideran negativos. De manera simultánea se corre un blanco (todos los reactivos sin la muestra) y una curva estándar.

#### PREPARACION DE LA CURVA ESTANDAR

1. Para simular la interacción muestra-HCN liberado se emplea fécula de maíz; se pesa en cada tubo 500 mg de fécula de maíz.
2. Se adiciona a cada tubo los ml correspondientes de solución estándar de KCN y en seguida 5 ml de amortiguador de pH 7.0, procurando humedecer la fécula.
3. Se colocan las tiras de papel indicador como se describió anteriormente y se trabajan en la misma forma que para la liberación de HCN de la muestra.

A continuación se muestra en forma esquematizada la forma de preparar los tubos. La curva estándar va de 5 a 60 mg de HCN, ya que fue el rango óptimo encontrado en la respuesta concentración de HCN vs. D.O. ( $r=0.99$ ) en donde se cumple la ley de Lambert-Beer.

### PREARACION DE LA CURVA ESTANDAR

ml de solución estándar	Fécula de maíz (mg)	ml buffer pH 7.0	4 hrs → 40 °C →	HCl 0.5N (frio)	[HCN] mg
0.0	500	5.0		1.0	0
0.05	500	5.0		1.0	5.0
0.10	500	5.0		1.0	10.0
0.20	500	5.0		1.0	20.0
0.40	500	5.0		1.0	40.0
0.60	500	5.0		1.0	60.0

#### DETERMINACION CUANTITATIVA.

1. Extraer con cuidado la tira de papel indicador y colocarla en otro tubo de cultivo con tapón de rosca, adicionar 20 ml de agua destilada (medidos con bureta), tapar y agitar vigorosamente para extraer el pigmento del papel (isopurpurina).
2. Filtrar el contenido del tubo para separar los residuos de papel. En caso de que éstos presenten aún coloración se puede hacer otra extracción con 20 ml de agua destilada, filtrando y reuniendo el filtrado con el de la primera extracción.
3. El filtrado se transfiere a una celda para su lectura en el espectrofotómetro previamente ajustado a 100% T con el blanco a 520 nm. La curva estándar se lee de igual forma solo que en este caso el blanco corresponde al tubo que tiene 0.0 ml de solución estándar de KCN.

#### Cálculos

Transformar las lecturas de % de Transmitancia a % de Absorbancia:

$$A = \log \frac{1}{\%T/100}$$

Trazar la gráfica de A vs. mg de HCN con los datos de la curva estándar e interpolar los valores de % A de las muestras para obtener los respectivos mg de HCN o de acuerdo a la ecuación de la regresión lineal el correspondiente contenido de HCN puede ser calculado.

$$\text{mg HCN} / 100 \text{ g de muestra} = \frac{X \times D \times 100}{m}$$

Donde:

X= mg de HCN

D=número de veces que se adicionaron 20 ml de agua (dilución)

m= mg de muestra

## ANEXO V

### TANINOS

Se realizó la determinación cuantitativa de taninos de acuerdo a las normas de la Organización Internacional de Estandarización (ISO 9648, 1988), que es un método universal para la determinación del contenido de taninos en granos de sorgo.

Preparación de reactivos:

- a) Ácido Tánico: solución estándar de referencia de ácido tánico que contenga 0.2 g/100 ml de agua.
- b) Amoniaco: Solución de 0.232 g / 100 ml de  $\text{NH}_3$  (hidróxido de amonio).
- c) Dimetilformamida: Solución al 75% (V/V).
- d) Citrato Férrico de amonio (Sigma F-5879): Solución de 0.35 g/ 100 ml de agua, prepararse 24 h antes de usarse.

## Procedimiento

### PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRÓN

1. En 7 matraces volumétricos se añaden 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 ml respectivamente de solución estándar de ácido tánico (0.2 g/100 ml), aforando a 25 ml con la solución de dimetilformamida (obteniendo así 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 mg de ácido tánico respectivamente).
2. En 8 tubos de ensayo, al no 1 solo se le añade 1 ml de la solución de dimetilformamida (blanco de la curva). A los restantes 7 tubos se añade 1 ml de las soluciones de ácido tánico preparadas anteriormente (2-14 mg). El intervalo obtenido es de 80 a 560  $\mu\text{g}$  de ácido tánico.
3. A cada tubo se le añade 5 ml de agua, 1 ml de la solución de citrato férrico amoniacal (0.35 g/100 ml) y 1 ml de la solución de amoníaco (0.232 g/100 ml) (agitar cada vez). En el siguiente cuadro se muestra en forma esquematizada el procedimiento.
4. Se introducen a baño María a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1$  por  $10 \text{ min} \pm 1$ , para permitir el desarrollo óptimo del color.
5. Por último se leen en el espectrofotómetro a 525 nm.
6. Se trazan gráficas de absorbancia vs concentración de ácido tánico expresada como  $\mu\text{g}$  de ácido tánico.

Tubo	Sol. Acido tánico (ml)	H <sub>2</sub> O (mL)	Sol. Citrato férrico Amoniacal (ml)	Sol. Amoniaco (ml)
1 (Bco)	1 ml dimetilformamida	5	1	1
2	1	5	1	1
3	1	5	1	1
4	1	5	1	1
5	1	5	1	1
6	1	5	1	1
7	1	5	1	1
8	1	5	1	1

#### OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

1. Pesar de 0.3 a 1 g de muestra molida y deshidratada.
2. Disolver con 20 ml de Dimetilformamida (al 75%) y agitar durante  $60 \pm 3$  min.
3. Aforar a 25 ml (con dimetilformamida), homogeneizar, y centrifugar a 2,700 rpm (100 U) por  $10 \pm 1$  min.
4. Decantar el sobrenadante y homogeneizar.

Tubo	Sol. Acido tánico (ml)	H <sub>2</sub> O (mL)	Sol. Citrato férico Amoniacal (ml)	Sol. Amoniaco (ml)
1 (Bco)	1 ml dimetilformamida	5	1	1
2	1	5	1	1
3	1	5	1	1
4	1	5	1	1
5	1	5	1	1
6	1	5	1	1
7	1	5	1	1
8	1	5	1	1

#### OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

1. Pesar de 0.3 a 1 g de muestra molida y deshidratada.
2. Disolver con 20 ml de Dimetilformamida (al 75%) y agitar durante  $60 \pm 3$  min.
3. Aforar a 25 ml (con dimetilformamida), homogeneizar, y centrifugar a 2,700 rpm (100 U) por  $10 \pm 1$  min.
4. Decantar el sobrenadante y homogeneizar,

## DETERMINACIÓN

1. Una vez obtenido el extracto, colocar en tubos de ensayo alícuotas de 1 ml ( $n=2$ ) y a otro el blanco.
2. Adicionar 1 ml de citrato férrico amoniacal (0.35g/100 ml) y 1 ml de la solución de amoniaco (0.232g/100 ml) y 5 ml de agua desionizada, agitando después de cada adición (ver el siguiente cuadro).
3. Posteriormente calentar a baño María a  $30^{\circ} \pm 1$  por 10 min, y agitar
4. Por último leer en el espectrofotómetro a 525 nm.
5. Mediante la ecuación de la línea recta obtenida con los datos de la curva patrón, determinar el contenido de taninos y reportar como % de ácido tánico

Tubo	Muestra (ml)	H <sub>2</sub> O (mL)	Sol. Citrato férrico Amoniacal (ml)	Sol. Amoniaco (ml)
1 (Bco)	1	6	1	---
2	1	5	1	1
3	1	5	1	1

## ANEXO VI

## ALCALOIDES QUINOLIZIDÍNICOS

El método se realizó según Muzquiz (1993), el cual cuantifica alcaloides individuales con estructura quinolizidínica por medio de cromatografía de gases. La extracción de los alcaloides quinolizidínicos se basa en la propiedad que presentan los alcaloides libres o basificados de no disolverse en agua, pero sí en solventes orgánicos poco polares como el diclorometano, en cambio los alcaloides con carga (la mayoría son moléculas con carga, bajo condiciones ácidas) son solubles en agua, pero insolubles en solventes apolares.

Se pesó 0.5-1 g de muestra finamente molida homogenizada con 5 ml de ácido tricloroacético al 5%, se homogenizó 1 min. y centrifugó 5 min. (a 700 G), se recuperó el sobrenadante en un matraz de separación, se repite la operación otras 2 veces (3 en total), el sobrenadante se alcalinizó con 1 ml de NaOH 10 M y el extracto alcaloideo se extrajo con 5 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3X), el cual fue evaporado (25-28 °C) a sequedad en un rotovapor, posteriormente se recuperó con 5 ml de MeOH. Se le añadió 200  $\mu\text{l}$  del estándar interno (cafeína), se filtró y se tomaron alícuotas de 1  $\mu\text{l}$  para inyectar al cromatógrafo de gases.

Las curvas de calibración fueron preparadas para lupanina y esparteína. La respuesta fue lineal sobre un rango de 0.030-1.0  $\text{mg ml}^{-1}$  y de 0.0303-15.14  $\text{mg}^{-1}$  para lupanina y esparteína respectivamente.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agosin E., Díaz D., Aravena R. and Yáñez E. 1989. Chemical and nutritional characterization of lupine tempeh. *J. Food Sci.* 54:102-107.
- Ali, R. and Muzquiz, M. 1998. ANFs in: tropical legume seeds for human nutrition. In: *Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds and rapeseed*. Proceedings of the third international workshop on "Antinutritional factors in legume seeds and rapeseed". Jansman, A.J.M.; G. Hill, D.; J. Huisman; A.F.B. van der Poel editors. Wageningen the Netherlands. July 8-10 1998.
- Allen J.G. 1998. Toxins and lupinosis. Chap. 14. *Lupins as crop plants. Biology, production and utilization*. Edited by Gladstones J.S., C. Atkins and J. Hamblin. CAB International. UK.
- A.O.A.C. 1990. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry*. Vol. I. 15th ed. Washington, U.S.A.
- Aykroyd W.R. y Doughty J. 1964. *Las leguminosas en la alimentación humana*. Ed. Organización de las Naciones Unidas Para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Roma, Italia
- Baer V.E. 1990. *Lupino. Guía de producción y utilización*. Editada por: Asociación Chilena del lupino. Chile.
- Ballester D., Yáñez E., Garcia R., Erazo S., Lopez F., Haardt E., Cornejo S., Lopez A., Pokniak J. and Clinton O.Ch. 1980. Chemical composition, nutritive value and toxicological evaluation of two species of sweet lupine (*Lupinus albus* and *Lupinus luteus*). *J. Agric. Food Chem.* 28:402-405.
- Beirao C. M.L., 1992. Lupins as raw material for alternative products in human nutrition. In: *Lupinus mutabilis: its adaptation and production under European pedoclimatic conditions*. Proceedings of a workshop held in Cascais, Portugal 26-27 april 1991. Edited by: Commission of the European Communities.
- Blasco-Lamenca, M; Muzquiz, M; Aser, C.G; Guillen, A.M; Marin, A.M. 1978. Relationships between elements and chemical components of lupin (*Lupinus mutabilis*) in Peru, with emphasis on proteins, oils and alkaloids. *Rev. Cien. Agric.* 8: 1/14, 146-157).
- Bourdillon, A. 1998. Advantages and constraints of grain legumes for the feed market. In: *Proc. 3<sup>rd</sup> European Conf. Grain Legumes*. June 1-3. Angers, France 1998.

- Buirchell B.J. and Cowling W.A. 1998. Genetic resources in lupins. Chap. 2. Lupins as crop plants. Biology, production and utilization. Edited by Gladstones J.S., C. Atkins and J. Hamblin. CAB International. UK.
- Bunger A., Soto D., Wittig E., Cariaga L. and Hernandez N. 2000 Development of food products containing lupin fiber and their effects in elderly people. In: Proc. IX<sup>th</sup> International Lupin Conference, Klink/Müritz. Germany 20-24 June 1999.
- Burkart, A. 1952. Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas. 2 ed. Acme Agency, Buenos Aires, 539 pp.
- Butler W.H, Ford G.P. and Creasy D.M. 1996. A 90 day feeding study of lupin (*Lupinus angustifolius*) flour spiked with lupin alkaloids in the rat. Food and Chemical Toxicology 34 (6): 531-536.
- Caballero J. 1984. Recursos comestibles potenciales. Seminario sobre la alimentación en México. Instituto de Geografía de México. México.
- Camacho L. 1986. Fermentation characteristics of a yoghurt simulated prepared with lupin milk. In: Proc. IV Inter. Lupin Conf. Geraldton, Western Australia. 15-22 Aug 1986.
- Chango A., Bau H.M., Villaume C., Mejean L. and Nicolas J.P. 1993a. Effects de la fermentation par *Rhizopus oligosporus* sur la composition chimique des lupins blanc doux, jaune doux et jaune amer. Sciences des Aliments. 13:285-295.
- Chango A., Villaume C., Bau H.M., Nicolas J.P. and Mejean L. 1993b. Debittering of lupin (*Lupinus luteus* L.) protein by calcium alginate and nutritional evaluation. J. Sci. Food Agric. 63:195-200.
- Coburn W. M. 1983. Poisonous Plants. Part III. Poisonous alkaloid in plants. Weeds today 14: 6-7.
- Contreras S, Araya H. Pak N. y Tagle A.M. 1973. Factores tóxicos de leguminosas cultivadas en Chile. I. Glucósidos cianogenéticos. Arch. Latinoamer. Nutr. 23: 251-259.
- Cubero, J.I. and Bellido, L.L. 1986 The potential of lupins in agriculture of the Mediterranean basin. In: Proc. IV Inter. Lupin Conf. Geraldton, Western Australia. 15-22 Aug 1986.
- De la Vega A. and Sotelo A. 1986. The nutritional quality and toxin content of wild and cultivated lima bean (*Phaseolus lunatus*). Qual. Plant. Foods Hum. Nutr.
- Dunn D.B. 1979. *Lupinus*. In Rzedowski. Flora fanerogámica del Valle de México. pp. 326-338. ENCB-IPN. Mex.

- DuPont M.S., Muzquiz M., Estrella I., Fenwick G.R. and Price K.R. 1994. Relationship between the sensory properties of lupin seed with alkaloid and tannin content. *J. Sci. Food Agric.* 65: 95-100.
- Edwards A.C. and van Barneveld R.J. 1998. Lupins for livestock and fish. Chap 13. Lupins as crop plants. Biology, production and utilization. Edited by Gladstones J.S., C. Atkins and J. Hamblin. CAB International. UK.
- Egaña J.I.; Uauy R.; Cassorla.X; Barrera. G; Yanez.E. 1992 Sweet lupin protein quality in young men. *J. Nutr.* 122: 12, 2341-2347
- Espinosa G. J. y Rodríguez J. S. 1996. Listado florístico del estado de Michoacán. Sección IV (Angiospermae: Fagaceae, Gramineae, Krameriaceae, Leguminosae). Editores: J. Rzedowski y G. Calderon. Instituto de Ecología.
- FAO/WHO. 1985. Food and Agricultural Organization of the United Nations/ World Health Organization. Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO/UNU. Expert consultation. Technical report series 724, WHO, Geneva
- Freyr and Helgadottir 2000. Domestication of perennial lupins for northern regions. In: *Proc. IX<sup>th</sup> Inter. Lupin Conf.* Klink/Müritz. Germany 20-24 June.1999.
- Giral F., A. Sotelo, B. Lucas and A. de la Vega. 1978. Chemical composition and toxic factors content in fifteen leguminous seeds. *Quart. J. Crude Drug. Res.* 16: 143-149
- Gladstone J.S., 1974. Lupins of Mediterranean region and Africa. West Aust. Dept. Agr. Tech. Bull. 26
- Gross R. y Baer U.E. 1977. Posibilidades del *Lupinus mutabilis* y *Lupinus albus* en los países andinos. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 27:451-474.
- Gross, R.1982. El cultivo y la utilización del tarwi. Estudio FAO: Producción y Protección vegetal No 36. FAO. Rome.
- Haq N. 1993. Lupins (*Lupinus* species) In: underutilized crops. Pulses and vegetables edited by Williams, J. T. Published by Chapman & Hall, London, U.K.
- Harrison J.M 1982. The reduction in alkaloid levels in *Lupinus mutabilis*. In: *Proc. II Inter. Lupin Conf.* Torremolinos, España 3-6 de mayo 1982.
- Hatfield G.M., Yang J.D., Ferguson P.W. and Keller W.J. 1985. Identification of toxic alkaloids from the calcaratus subspecies of *Lupinus arbotus*. *J. Agric. Food Chem.* 33:909-912.

- Hatzold T., Elmadfa I., Gross R., Wink M., Hartmann T. and Witte L. 1983. Quinolizidine alkaloids in seeds of *Lupinus mutabilis*. J. Agric. Food Chem 31:934-938.
- Hill G.D. 1990. The utilization of lupin in animal nutrition. In: Proceedings of the 6<sup>th</sup> Inter Lupin Conf. Temuco, Pucon, Chile. November 1990.
- Hinojosa G. and Torrico A. 1990. Utilization and commercialization of "Tarhi". In: Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Lupin Conference, Temuco, Pucon, Chile. November 1990.
- Hughes D.W. and Genest K. 1973. Phytochemistry. Chap. 4 Alkaloids. Edited by Miller L.P.
- International for Standardization Organization. 1988. Sorghum. Determination of tannin content (ISO 9648) First edition. Reference number 1988 (E). ISO Switzerland.
- Jaffe, W.G., Levy, A.; Gonzalez, D.I. 1974. Isolation and partial characterization of bean phytohemagglutinins. Phytochem. 13: 2685-2693.
- Jambrina A.J.L. 1983. La genética de los alcaloides en el género *Lupinus*. Comunicaciones I.N.I.A. No. 51. Madrid, España.
- James L.F., Nielsen D.B., Panter K.E. 1992. Impact of poisonous plants on the livestock industry. J. Range Management. 45: 1, 3-8.
- Kakade, M.L.; Rackis, J.J.; McGhee, J.E.; Puski, G. 1974. Determination of trypsin Inhibitor activity of soy products. A collaborative analysis of an improved procedure. Cereal Chem. 51, 376-382.
- Keeler R.F. 1984. Teratogens in plants. J. Anim. Sci. 58: 1029
- Keeler R.F. 1989. Quinolizidine alkaloids in range and grain lupin. In Toxicants of Plant Origin. P.R. Cheeke (Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL., 1. 134-159.
- Keeler R.F. and Gross R. 1980. The total alkaloid and anagryne contents of some bitter and sweet selection of lupin species used as food. J. Environment. Path. Toxic. 3: 333-340.
- Keeler R.F. and Panter K.E. 1989. The piperidine alkaloid composition and relation to crooked calf disease-inducing potential of *Lupinus formosus*. Teratol. 40: 423.
- Kinghorn D.A., Selim M.A. and Smolenski S.J. 1980. Alkaloid distribution in some new world *Lupinus* species. Phytochem. 19:1705-1710.

- Kurlovich B.S. 1989. Centers of speciation in the genus *Lupinus* L. Nauchno-Tekhnicheskii-Byulleten' No. 193, 20-24
- Liener I.E. 1974. Phytohemagglutinins: their nutritional significance. J. Agric. Food Chem. 22 (1): 17-22.
- Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Pharmacol. Exptl. Therp. 96: 99-113.
- Lopez-Bellido, L. y M. Fuentes. 1991. El altramuz. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. P. 48-49, 78. Córdoba, España.
- Lucas, B. and Sotelo, A. 1982. Aminoacids determination in pure protein, foods and feeds using two different acid hydrolysis methods. Anal Biochem. 123: 349-356
- Lucas, B and Sotelo, A. 1984. A simplified test for the quantitative of cyanogenic glucosides in wild and cultivated seeds. Nutr. Rep. Int. 29 (3): 711-719.
- Lucas B., A. Guerrero, L. Sigales and A. Sotelo. 1988. True protein content and non-protein aminoacids presents in legumes seeds. Nutr. Rep. Int. 3: 345-353.
- Lucisano M., Pompei C. and Rossi M. 1984. Oil and alkaloid removal from (*Lupinus termis*) by extraction with hexane. Lebens. Wiss. Tech. 17:324-327.
- Majak W., Keller W.J., Duan Z., Munro D., Smith R.A., Davis A.M. and Ogilvie R.T. 1994. Alkaloid distribution in two species of *Lupinus* in central British Columbia. Phytochem. 36 (4): 883-885.
- Manzanares A.T. y Estrella P.A. 1985. Programas de cultivos potenciales alimentarios prehispánicos, mesoamérica y andina. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México.
- Marquez R.L., Gutierrez R.M., Miranda F.I. 1991. Acute [human] poisoning by lupin [*Lupinus*] seed debittering water. Vet. Hum Toxicol. 33: 3, 265-267.
- Martínez M. 1959. Plantas útiles de la flora mexicana. 3 edición, De. Botas, México, pp. 621.
- Martínez A. M. A. 1991. Cinco familias de plantas con potencial económico y genético para México. Avances en el estudio de los recursos fitogenéticos de México. Publicado por: Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C.
- Mc Vaugh, R. 1987. Flora novogaliciana. V. Leguminosae. A descriptive account of the vascular plants of western Mexico. Ann Arbor the University of Michigan Press. U.S.A.

- Mohamed M.H., Saito K., Kadry H. A., Khalifa T.I., Ammar H.A. and Murakoshi I. 1991. Lupine alkaloids from the seeds of *Lupinus termis*. *Phytochem.* 30:3111-3115.
- Mukisira E.A., Phillip L.E. and Mitaru B.N. 1995. The effect of feeding diets containing intact or partially detoxified lupin on voluntary intake and milk production by fresian dairy cows. *Anim. Sci.* 60: 169-173.
- Muzquiz E. M., 1988. Factores antinutritivos y tóxicos que afectan a la utilización de las semillas del *Lupinus hispanicus* Boiss et Reut para su uso alimentario. Tesis Doctoral. Universidad Complutense. Editada por Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España.
- Muzquiz M., Burbano C., Rey C. and Cassinello M. A. 1989a. Chemical study of *Lupinus hispanicus* seed-nutritional components. *J. Sci. Food Agric.* 47:197-204.
- Muzquiz M., Burbano C., Gorospe M.J. and Rodenas I. 1989b. A Chemical study of *Lupinus hispanicus* seed-toxic and antinutritional components. *J. Sci. Food Agric.* 47:205-213.
- Muzquiz, M., Burbano, C., Cuadrado, C. and de la Cuadra, C. 1993. Determination of thermoresistant antinutritional factors in legumes. I. Alkaloids. *Inves. Agrar. Prod.Veg.* 8:351-361.
- Muzquiz M., Cuadrado C., Ayet G., De la Cuadra C., Burbano C. and Osagie A. 1994. Variation of alkaloid components of lupin seeds in 49 genotypes of *Lupinus albus* L. from different countries and locations. *J. Agric. Food Chem.* 42:1447-1450.
- Muzquiz M., de la Vega R, Gutierrez M.P., Calvo R. Robredo L.M. and de la Cuadra C. 1999. Bactericide effect of alkaloids present in the lupin species. In: *Proc. VIII Inter. Lupine Conf. California, USA May 11-16 1996.*
- National Academic Press. 1989. Lost crops of the incas. National Academic Press. Washington, USA. p. 181-189
- Ortiz J.G.F. and Mukherjee K.D. 1982. Extraction of alkaloids and oil from bitter lupin seed. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 59 (5): 241-244.
- Pannel D.J. 1998. Economic assessment of the role and value of lupins in the farming system. Chap 11. Lupins as crop plants. Biology, production and utilization. Edited by Gladstones J.S., C. Atkins and J. Hamblin. CAB International. UK.

- Panter K.E. and Keeler R.F. 1993. Quinolizidine and piperidine alkaloid teratogens from poisonous plants and their mechanism of action in animals. *Vet. Clin. North Amer.* 9: 33-40.
- Peretiatkowics M., Ciesiolka D., Stobiecki M. and Gulewics M. 1994. Biological activity of extract from bitter lupin seeds. In: *Advances in Lupin Research. Proc. VII Inter Lupin Conf.* 197-200. Evora, Portugal 18-23 april 1993.
- Petterson, D. S. 1998. Composition and food uses of *Lupinus*. Chap.12 In: *Lupin as crop plants. Biology, production and utilization.* Edited by Gladstones J.S., C. Atkins and J. Hamblin. CAB International. UK.
- Petterson, D.S; Allen, D.G; Greirson, B.N; Hancock, G.R; Harris, D.J; Legge, F.M. 1986. The suitability of *Lupinus angustifolius* seed for human consumption. *Proc. Nutrition-Society of Australia.* 11, 118. West Australia, Aus.
- Petterson, D. S. and Mackintosh, J.B. 1994. The chemical composition and nutritive value of Australian grain legumes. Ed. *Grain Research and Development Corporation, Canberra.* Aus.
- Planchuelo A.M. 1994. Wild lupins distribution and its implication as germoplasm resources. In: *Advances in Lupin Research. Proc. VII<sup>th</sup> Inter. Lupin Conf.* Evora, Portugal 18-23 april 1993.
- Planchuelo A.M. 1996. Relationship between South American and European species of *Lupinus*. In: *Advances in legume systematic 8: Legumes of economic importance,* Edited by: Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 109-116
- Planchuelo-Ravelo A.M and Wink M. 1993. Alkaloid composition of *Lupinus albus* (Fabaceae) from South America. *Zeitschrift-fur-Naturforschung.-Section-C,-Biosciences.* 48: 5-6
- Plitmann U. 1981. Evolutionary history of the old world lupines. *Taxon* 30 (2): 430-437.
- Putnam, D.H. 1991. An interdisciplinary approach to the development of Lupin as an alternative crop. In: *Proc. Second National Symposium of New Crops, exploration, research and commercialization.* Edited by: Janick J. and Simon J.E. Purdue University.
- Rahma E.H. and Narasinga R.M.S. 1984. Effect of debittering treatment on the composition and protein components of lupin seeds (*Lupinus termis*) Fluor. *J. Agric. Food Chem.* 32: 1026-1030.
- Ras, R. M. V.; Tara, M.R.; Krishnan, C. K. 1974. Colorimetric estimation of tryptophan content of pulses. *J. Food Sci Tech.,* 11, 213-216.

- Rayas D. P; Mock C. M.; Satterlee L. D. 1996. Quality of spaghetti containing buckwheat, amaranth, and lupin flours. *Cereal Chemistry* 73(3): 381-387.
- Ruiz L. M.A. y Zamora N. J.F. 1993. Potencial nutricional de las leguminosas silvestres de Jalisco. En: Memorias del XII Congreso Mexicano de Botánica. Mer, Yuc. 3 a 8 de oct.
- Ruiz, L.M.A. 1994. Disponibilidad nutricional de tres especies silvestres de *Lupinus* (Leguminosae) del Estado de Jalisco. Tesis de Maestría en Nutrición Animal. U. de G.
- Ruiz, Moreno J.J., Ruiz Lopez M.A. and Zamora Natera J.F. 2000. The genus *Lupinus*: taxonomy and distribution in Jalisco, Mexico. In: Proc. IX<sup>th</sup> International Lupin Conf. Klink/Müritz. Germany 20-24 June 1999.
- Santana F.M.C., Fialho A.M., Sa-Correia Y. and Empis J.M.A. 1999. Towards microbial degradation of quinolizidine alkaloids in lupin. In: Proc. VIII Inter. Lupin Conf., California, USA 11-16 May 1996.
- Schmeller T., Sauerwein M., Sporer F., Muller W.E. and Wink M. 1994. Binding of quinolizidine alkaloids to nicotinic and muscarinic receptor J. Nat. Prod. 57: 1316-1319.
- Schoeneberger H., Gross, R., Cremer H. D. and Elmadfa Y. 1982a. Composition and protein quality of *Lupinus mutabilis*. *J. Nutr.* 112:70-76.
- Schoeneberger H., Idefonso C., Cremer H. D., Gross, R., and Elmadfa I. 1982b. Some antinutritive substances in lupines compared with other legumes In: Proc. I Inter. Lupine Workshop. Lima-Cuzco, Perú 12-21 Abril. 1980.
- Schoeneberger H., Gross R., Cremer H.D. and Elmadfa. 1982c. Protein quality of the *L. mutabilis* debittered by water in mixtures other proteins sources. In: Proc. II Int. Lupin Conf. Torremolinos, España 3-6 de mayo 1982.
- Sedletskii M.A. and Golovchenko V.I. 1991. Study of the effect of quantitative alkaloid content on yield and disease resistance in mutant analogues of white lupin. *Khimicheskii-mutagenez-i-problemy-selektzii*. 206-208.
- Shick K.C. and Madhusudhan K.T. 1988. Haemagglutinating and trypsin inhibitor activities of lupin seed (*Lupinus angustifolius*). *J. Food Sci.* 53: 1234-1235.
- Shumilin, P.I., Chernen'kaya R.F. and Shumilina L.F. 1989. Evaluation of some lupin species and varieties for protein content and amino acid composition. *Selektsiya-i-Semenovodstvo-Moskva*. No. 3, 17-20.
- Simmonds N.W. 1976. Evolution of crop plants. Published by Longman Inc. New York. USA.

- Smith C.P. Species Lupinorum "Signatures". 1938-52. Privately Published.
- Sotelo L.A., B. Lucas, A. Uvalle and F. Giral. 1980. Chemical composition and toxic factors content of sixteen leguminous seeds (II). *Quart. J. Crude Drug Res.* 18: 9-16.
- Stobiecki, M., Markiewicz, M., Michalski, Z., Gulewicks, K. 1992. New concept of the bitter lupin seeds utilization. *Proc. 1<sup>st</sup> European Conf. on Grain Legumes.* Angers, France. June 1-3 1992.
- Stobiecki M; Wojtaszek P; Bednarek P; Gulewicz K. 1996 Changes in quinolizidine alkaloids composition in lupin (*Lupinus albus* L.) seedlings elicited with CuCl<sub>2</sub> and cell wall extract from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Acta Physiologiae Plantarum* 18 (4): 313-319
- Szabo P. and Herold I. 1993. The nutritive value for weaned calves of bitter lupin treated by aqueous-acidic warm extraction to reduce alkaloids. *Allattenyesztes es Takkarmanyozaaban.* 42: 361-374.
- Takhtajan A. 1987. *Systema magnoliophytorum.* Officina editora <<Nauka>>. Sectio Leninopolitana. Lenninopoli, Russia.
- Tapia N. M. 1982. Industrial processing of tarwi. In: *Proc. II Inter. Lupin Conf.* Torremolinos, España 3-6 de mayo 1982
- Tapia N M. 1990. Cultivos andinos subexplotados. Pp. 164-171. FAO/ONU. Roma
- Torres T. F., Nagata A. y Dreifuss S. W. 1980. Método de eliminación de alcaloides en la semilla de *Lupinus mutabilis*, Sweet. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 30 (2): 201-209.
- Tueta and Gross, 1982. Debittering of lupin. In: *Proc. II Inter. Lupin Conf.* Torremolinos, Spain. May 3-6, 1982.
- Vilariño P., Leicach S. and Caballero G. 1999. Quinolizidine alkaloids from sweet and bitter *Lupinus albus* and *L. angustifolius* varieties. In: *Proc. VIII Inter. Lupine Conf.* California, USA. May 11-16, 1996
- Villegas C.R., Vega M and Sifri H. 1982. The uses of lupin flour in the making of biscuits for school food programmes in Chile. In: *Proc. II Inter. Lupin Conf.* Torremolinos, España 3-6 de mayo 1982.
- Vladutu C., Botez. C. and Fritea M. 1992. Studies on the genetic control of alkaloid content in white lupin (*Lupinus albus* L.). *Buletinul-Universitatii-de-Stiinte-Agricole-Cluj-Napoca.-Seria-Agricultura-si-Horticultura.* 46: 1, 33-39

- Waller R.G. and Nowacki K.E. 1978. Alkaloid biology and metabolism in plants. Ed. Plenum Press. USA.
- Wassermann V.D. 1983. Sweet lupin (*Lupinus albus*): possibilities and cultural practices. Tech. Common. Depart. Agricul. South-Africa. No.184, 8pp
- Watkin W. 1984. Lupin in crop production. Outlook on Agriculture, 13 (2): 69-76
- Wink M. 1993. Quinolizidine alkaloids. Methods in plant biochem. Vol 8. 197-239
- Wink M. 1994. Biological activities and potential applications of lupin alkaloids. In: Advances in Lupin Research. Proc. VII Inter Lupin Conf. 161-178 Evora, Portugal 18-23 april 1993.
- Wink M. and Carey D.B. 1994. Variability of quinolizidine alkaloid profiles of *Lupinus argenteus* (Fabaceae) from North America. Biochem. System. Ecol. 22: (7): 663-669.
- Wink M., Meißner C. and Witte L. 1995. Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. Phytochem. 1 (38): 139-153
- Wink M. 1998. Modes of action of alkaloids. Chap 12. In: Alkaloids. Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications. Edited by Roberts M.F. and Wink M. Plenum Press, New York.
- Wittig de Penna E; Bungler A; Sansur M; Lopez L y Santana R. 1993. Desarrollo de un confite hiperproteico a base de lupino para deportistas. Rev. Chilena Nutr. 21: 1, 53-61.
- Yañez, E. 1990. Lupin as a source of protein in human nutrition. In: Proceeding of the 6<sup>th</sup> International Lupin Conference, Temuco, Pucon, Chile. November 1990.
- Yovo K., Huguet F., Pothier J., Duran M., Breteau M and Narcisse G. 1984. Comparative Pharmacological study of sparteine and its ketonic derivative lupanine from seeds of *Lupinus albus*. Plan. Med. 5: 420-424.
- Zamora N.J.F. y Ruiz L. M.A. 1993 Las leguminosas, su importancia en la alimentación humana y animal. Agroc. 21: 8.
- Zamora, N. F., García L. P., Ruiz M. J. and Ruiz L. M. 2000. Agricultural experiments with cultivars of *L. albus* in Mexico. In: Proc. IX<sup>th</sup> Inter. Lupin Conf. Klink/Müriz. Germany 20-24 june 1999.