

00528
47



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACION TOXICOLOGICA DE LA FRACCION
PROTEINICA DE LA SEMILLA DE CACAHUANANO
(*Gliricidia sepium*)

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
CELINA DE LA HIDALGA YBARRA



MEXICO, D. F.

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. BERNARDO LUCAS FLORENTINO
Vocal	Prof. LUCÍA GABRIELA BASCUÑAN TERMINI
Secretario	Prof. MARIA DE LOURDES FLORES TÉLLEZ
1er. Suplente	Prof. LUCIA CORNEJO BARRERA
2o. Suplente	Prof. ROSA MARIA ARGOTE ESPINOSA

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 111, Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química,
UNAM



M. en C. Bernardo Lucas Florentino
Asesor



Q.F.B. Leticia Gil Vieyra
Asesor Técnico



Celina De La Hidalgo
Sustentante

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a "Mi querido profesor", Bernardo Lucas, por todo su apoyo, por comprender mi ritmo de trabajo y por su forma de ser siempre tan concreta.

A Leticia Gil, porque tu colaboración fue indispensable para realizar mi tesis, porque siempre logras que el trabajo sea más agradable, por las pláticas en el bioterio, por sacarle la sangre a los ratones, etc., etc.

A Victorina Platas por el cariño con que nos ayuda siempre.

A Gaby, Noriko, Carlos, Ily, Argelia, Vero y Helga por ayudarme tanto en las etapas más pesadas y laboriosas y por los momentos agradables que pasamos dentro y fuera del laboratorio.

A la Dra. Isabel Aguilar por sus conocimientos y su interés en mi trabajo.

A la M. en C. Adriana Ruiz de Chávez por su colaboración y disposición.

A las maestras Angela Sotelo y Rosita Argote por su experiencia y sus aportaciones de todo tipo.

A Rocio Madrid, Ana Wegler y Eduardo Vega por su ayuda, sus conocimientos y comentarios.

A toda la gente que me apoyó durante la carrera, les agradezco muchísimo, tendría que escribir otra tesis para mencionarlos a todos, sin embargo no por eso son menos importantes.

DEDICATORIAS

Esta tesis te la dedico a ti Papá, a ti antes que a nadie, no sólo porque te quiero sino por lo mucho que te admiro y por tu maravillosa actitud ante la vida.

A ti abuelita Elvia por estar siempre conmigo, por tenerme paciencia y por todo todo todo lo que me das.

A Bárbara por supuesto y a mis hermanos Rafaela y Luis, por la simple razón de quererlos con todo mi corazón.

A mis amigas María Pía, Vero, Susana, Rocío y Ana porque las adoro a cada una, los momentos que vivo con ustedes son invaluable y porque las quiero conservar hasta el último día de mi vida.

A mi Mamá Cecilia, a Ana María, a Esther y a Ceci que siempre están en mis pensamientos.

A todos los miembros de las familias De La Hidalga y Vial, los que están y los que llevamos en nuestro corazón, porque cada uno me ha hecho sonreír genuinamente en algún momento de mi vida.

A

INDICE	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos particulares	3
3. ANTECEDENTES	4
3.1 Cacahuanano (<i>Gilricidia sepium</i>)	4
3.2 Toxicología	8
3.2.1 Estudios de toxicidad con respecto al tiempo	8
3.2.1.1 Toxicidad aguda	9
3.2.1.2 Toxicidad subcrónica	10
3.2.1.3 Toxicidad crónica	11
3.2.2 Dosis-respuesta	11
3.2.3 Nivel de efecto nulo (<i>NEN</i>)	12
3.2.4 Factores tóxicos y antinutricionales intrínsecos	12
3.4 Proteínas	13
3.4.1 Funciones de las proteínas	13
3.4.2 Necesidad de proteínas	13
3.4.3 Fuentes proteicas no convencionales	14
3.4.3.1 Separación y purificación de proteínas en vegetales	14
3.4.4 Aminoácidos	15
3.4.4.1 Aminoácidos esenciales	16
4. METODOLOGÍA	18
4.1 Desengrasado de la semilla	19
4.2 Obtención del concentrado proteínico de la semilla de cacahuanano	19
4.3 Determinación de proteína cruda en el concentrado proteínico	21
4.4 Ensayo de toxicidad subcrónica en concentrado proteínico 1	23
4.5 Determinación de factores tóxicos y antinutricionales en concentrado proteínico 1	26
4.5.1 Canavanina	26
4.5.2 Compuestos cumarínicos	28
4.5.3 Ácido fítico	30
4.6 Proceso de destoxificación (obtención del concentrado proteínico 2)	33
4.7 Cuantificación de aminoácidos, determinación de Triptófano y calificación química	34
4.7.1 Cuantificación de aminoácidos	34
4.7.2 Determinación de Triptófano	40
4.7.3 Calificación química	42
4.8 Ensayo de toxicidad aguda en concentrado proteínico 2	43
4.9 Ensayo de toxicidad subcrónica en concentrado proteínico 2	46

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
5.1 Obtención del concentrado proteínico 1	47
5.2 Ensayo de toxicidad subcrónica en concentrado proteínico 1	48
5.3 Determinación de factores tóxicos y antinutricionales en concentrado proteínico 1	56
5.3.1 Canavanina	57
5.3.2 Compuestos cumarínicos	58
5.3.3 Ácido fítico	59
5.4 Proceso de detoxificación (obtención del concentrado proteínico 2)	59
5.5 Contenido de aminoácidos en concentrado proteínico 2 y calificación química	60
5.6 Determinación de factores tóxicos y antinutricionales en concentrado proteínico 2	61
5.6.1 Canavanina	62
5.6.2 Ácido fítico	62
5.7 Ensayo de toxicidad aguda en concentrado proteínico 2	63
5.8 Ensayo de toxicidad subcrónica en concentrado proteínico 2	63
6. CONCLUSIONES	70
7. BIBLIOGRAFÍA	71
ANEXOS	75

1. INTRODUCCIÓN

La desnutrición energético-proteínica es uno de los problemas nutricionales más importantes en los países en desarrollo. Las familias que no disponen de suficientes alimentos durante todo el año para el consumo familiar, ya sea por una insuficiente producción de alimentos (áreas rurales) o por tener muy bajos ingresos (áreas urbanas), son las más susceptibles a este tipo de desnutrición, siendo principalmente vulnerables los niños (lactantes y preescolares), mujeres embarazadas y en período de lactancia y ancianos (FAO, 2000; Martínez, 2001). Las cifras de desnutrición escolar en México son del orden del 32% para niños y 38.3% para niñas, lo que se traduce en una alta tasa de mortalidad infantil (INEGI, 1999; INEGI, 2000).

Para combatir este problema, se ha recomendado el consumo de leguminosas como fuente de proteína ya que tienen un contenido relativamente alto de ésta (17%-30%), el doble del que poseen los cereales y similar al de la carne (Contreras, 1992). No obstante, es sorprendente que no exista una explotación más amplia de esta familia botánica de alto valor nutritivo, siendo la principal limitación, la biosíntesis de una amplia variedad de compuestos tóxicos y/o antinutricionales dañinos para el hombre, los animales y otros organismos.

Las leguminosas silvestres son muy abundantes en México y podrían ser utilizadas tanto para la alimentación animal como humana; sin embargo, estos recursos están infrutilizados. Tal es el caso del cacahuanano (*Gliricidia sepium*), ya que el aprovechamiento de sus semillas como fuente potencial de proteína y grasa no ha sido realmente considerado a pesar de su alto contenido en éstas (Sotelo et al, 1986; Martínez, 2001). Por otro lado, la semilla ha mostrado efectos tóxicos en experimentación animal, no obstante, en un trabajo previo se pudo obtener un concentrado proteínico que no mostró efectos tóxicos a corto plazo (Martínez, 2001). En el presente trabajo se continuó

con la evaluación toxicológica de dicho material. En primera instancia se obtuvo el concentrado proteínico a partir de harina desengrasada de la semilla de cacahuanano, donde se obtuvo un rendimiento de 33% y porcentaje de 77.75 de proteína (concentrado proteínico 1). El concentrado se probó en ratones de laboratorio en un ensayo de toxicidad subcrónica a 3 diferentes dosis, observándose un efecto dosis-dependiente.

Tomando en cuenta las sustancias presentes en la planta, se realizó la búsqueda del factor responsable de la toxicidad, encontrando a la canavanina (aminoácido no proteínico tóxico) en una concentración considerable (3.9%) como el principal responsable de tales efectos. A continuación se realizó un nuevo proceso de destoxificación, obteniendo el concentrado proteínico 2 (rendimiento de 26.59% y 77.94 % de proteína), que aunque tuvo un contenido de canavanina casi nulo y no mostró efectos tóxicos a corto plazo, en el ensayo de toxicidad subcrónica se observaron efectos adversos sin haber una clara relación dosis-respuesta. Es importante la realización de otro bioensayo o la consideración de otros parámetros para poder continuar con la evaluación toxicológica a largo plazo y después posiblemente poder considerar al concentrado proteínico de la semilla de cacahuanano como una fuente alternativa de proteína después de los respectivas evaluaciones nutritivas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Realizar la evaluación de toxicidad subcrónica del concentrado proteínico de la semilla de cacahuanano (*Gilricidia sepium*).

2.2 Objetivos particulares

- Obtener suficiente cantidad de concentrado proteínico de la semilla de cacahuanano para la realización del bioensayo.
- Realizar el bioensayo de toxicidad subcrónica en ratones a diferentes niveles de ingesta.
- En caso de no obtener resultados satisfactorios, realizar la determinación de factores tóxicos y antinutricionales para la posterior destoxificación del concentrado proteínico y proceder con la evaluación de toxicidad aguda y subcrónica.

3. ANTECEDENTES

3.1 Cacahuanano (*Gliricidia sepium*)

Sinónimos botánicos: *Gliricidia maculata*, *Robinia sepium*

Nombres comunes: esta planta es conocida en nuestro país como cacahuanano, cacahuananche, cocohuite, jelelte, multi, madre de cacao, lengua de perico, mata ratón, cocuite entre otros (Del Amo y Mendieta, 1981).

Descripción: es un árbol de tamaño mediano (10 m aprox.) perteneciente a la familia de las leguminosas (Centurión et al, 2000).

Distribución en el país: se encuentra tanto en la vertiente del Golfo de México, desde Tamaulipas a San Luis Potosí, Norte de Puebla y Veracruz hasta Yucatán; así como en la vertiente del Pacífico, donde se distribuye desde Sinaloa hasta Chiapas; incluso se menciona que esta especie es originaria del Sur de México y Centro América, creciendo en selvas tropicales sobre laderas y cañadas a una altura de 0 a 1600 msnm (Lucas, 1985; Martínez, 1987).

Usos: en nuestro país, como su nombre lo indica, esta planta se utiliza para dar sombra a cultivos delicados como cacao, café, vainilla y té, como cerca viva y en la elaboración de mangos y utensillos para herramienta. Se menciona además que la corteza, tallos tiernos y las hojas constituyen un excelente roenticida (Martínez, 1959; Little y Wadsworth, 1964). Así mismo, cobra un interés significativo la presencia de canavanina en la semilla del cacahuanano ya que parece que este aminoácido no proteínico tiene propiedades pesticidas especialmente hacia microorganismos, insectos y malezas, así como también se le atribuyen propiedades citotóxicas hacia ciertas células neoplásicas (Lucas, 1985; Lucas et al 1988; Swaffar et al, 1994; Rosenthal et al, 1995).

No obstante lo anterior, la planta puede usarse con fines benéficos, atribuyéndosele amplias propiedades medicinales, ya que al parecer tiene un alto contenido de taninos, flavonoides y otros compuestos de interés terapéutico (Soto y Souza, 1995; Herath et al, 1997).

Por otro lado, a este árbol se le tiene en alta estima para la elaboración de forrajes o piensos para animales, pero a pesar de esto el aprovechamiento de las semillas como fuente potencial de proteína y grasa ha sido poco estudiada (Chadhokar, 1982; Nochebuena y O'Donovan, 1986).

Perspectivas: Estudios realizados a la semilla de cacahuanano revelan que tiene un alto contenido de proteína y grasa por lo que podría considerarse a esta planta como una auténtica oleaginosa y fuente de proteína (Lucas, 1985; Sotelo et al, 1986; Martínez, 2001). Sin embargo, cuando se pretende proponer una especie vegetal no convencional o poco conocida como fuente de nutrimentos, es necesario contemplar la presencia de factores tóxicos y antinutricionales, ya que algunos de ellos son muy comunes en los alimentos de origen vegetal. En el caso del cacahuanano, la semilla ha mostrado efectos tóxicos en experimentación animal, ya que tiene un alto contenido de canavanina y posiblemente otros factores tóxicos; sin embargo, en un trabajo previo se pudo obtener un concentrado proteínico, que no mostró efectos tóxicos a corto plazo, por lo que es necesario continuar con la evaluación toxicológica del material (Lucas, 1985; Martínez, 2001).

Algunas sustancias naturales nocivas presentes en el cacahuanano:

- **Canavanina:**

La canavanina, ácido 2-amino-4-guanidoxi butírico, es un aminoácido básico no proteínico análogo de la arginina y potencialmente tóxico, se encuentra presente al menos en 1500 especies de la familia Leguminosae, almacenado de forma libre en la fracción no proteínica de las semillas, siendo en éstas donde se ha encontrado en el cacahuanano. La canavanina es un compuesto tóxico porque compite en su incorporación dentro de las vías biosintéticas de formación de proteínas, síntesis de macromoléculas, glucoproteínas, ARN y ADN; su incorporación equivocada en las proteínas la convierte en un potente inhibidor del crecimiento para muchos sistemas microbianos, pudiendo ser letal debido al mal funcionamiento de su metabolismo (Gálvez, 1999; Martínez, 2001). En cuanto a organismos superiores, se realizó un estudio con monos (primates no humanos) donde se sugiere que la canavanina es el principal causante de anomalías en el riñón, además de otros efectos adversos (Mallinow et al, 1982).

- **Cumarinas:**

Con el nombre de cumarinas se conoce a un grupo muy amplio de principios activos fenólicos que se encuentran en plantas medicinales y tienen en común una estructura química de 2H-1-benzopirán-2-ona (ver Figura 1), denominada cumarina (Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos):

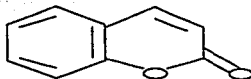


Figura 1. Estructura básica de los compuestos cumarínicos

Dentro de los efectos tóxicos de exposición a corto plazo, se sabe que la sustancia puede causar efectos en la sangre, dando lugar a hemorragias si es absorbido en grandes dosis (International Chemical Safety Cards). Por otro lado, la cumarina se utiliza como rodenticida ya que tiene un efecto tóxico en roedores actuando lentamente después de varias dosis (Elias, 1984). En las hojas del cacahuanano se han detectado grandes cantidades de compuestos cumarínicos (Griffiths, 1961).

- **Ácido fítico:**

El ácido fítico (ácido inositol hexafosfórico) se encuentra en concentraciones de 0.4 a 6.4 % en las semillas de cereales, leguminosas y oleaginosas; es una estructura altamente reactiva, debido a que la molécula posee múltiples grupos fosfato capaces de formar complejos con cationes. Su acción fundamental es disminuir la absorción o biodisponibilidad de minerales divalentes como Ca, Co, Cu, Mg, Mn, Mo, Fe y Zn (por formar sales insoluble con éstos); y también es una fuente inadecuada de fósforo no bioasimilable por el hombre, ya que el organismo humano no produce la enzima fitasa necesaria para hidrolizar el ácido fítico y liberar el fósforo de este compuesto. Además forma complejos insolubles fitato-mineral-proteína, provocando la disminución de la solubilidad y digestibilidad de las proteínas en el organismo, así como la inhibición de enzimas digestivas como la pepsina, tripsina y alfa-amilasa, bajo condiciones fisiológicas.

En las semillas de cacahuanano se ha encontrado este compuesto en una concentración de alrededor de 1.8 % (Shahidi, 1997; Martínez, 2001).

3.2 Toxicología

De modo genérico, la Toxicología puede definirse como el estudio de los efectos adversos de las sustancias químicas en los organismos vivos. Sus orígenes históricos deben datarse en el momento en el que nuestros antecesores prehistóricos intentaron comer una serie de productos para obtener alimentos convenientes. Al observar que los recursos vegetales y animales podían satisfacer al hombre sin producirle enfermedades o la muerte, los pueblos primitivos desarrollaron hábitos alimentarios que permitieron la supervivencia y el desarrollo de la especie. En su contexto moderno, la toxicología se basa fundamentalmente en conocimientos químicos y biológicos y trata de encontrar explicaciones detalladas de los efectos tóxicos. Gran parte de la toxicología actual implica estudiar los efectos tóxicos de sustancias específicas en mecanismos biológicos y químicos específicos (Shibamoto y Bjeldanes, 1993).

3.2.1 Estudios de toxicidad con respecto al tiempo

Las exigencias actuales de seguridad obligan, en todos los campos, que se evalúen los niveles de riesgo que puede presentar un determinado producto para el hombre y para el medio ambiente. En el campo de la seguridad en la alimentación, el hombre ha sido el principal centro de interés. Durante décadas la información toxicológica provenían mayoritariamente de observaciones aisladas de los efectos tóxicos originados por exposiciones accidentales, de algunas informaciones clínicas o de un número limitado de estudios epidemiológicos. Actualmente, dada la similitud de algunas especies con el hombre, la experimentación en animales se ha desarrollado considerablemente para evaluar el riesgo tóxico de las sustancias (Roberts, 1986; Derache, 1990).

Tomando en cuenta los efectos asociados con los diversos tiempos de exposición, los estudios toxicológicos se dividen por lo general, en tres categorías (Derache, 1990; Repetto, 1988; Shibamoto y Bjeldanes,1993):

3.2.1.1 Toxicidad aguda:

La primera prueba de toxicidad a que se somete una sustancia es, generalmente, la de toxicidad aguda, en la cual se suministra dicha sustancia a ratas o ratones en una dosis única. Se anotan los efectos tóxicos o síntomas clínicos que tienen lugar durante las 24 horas siguientes al suministro, los cuales pueden ser:

- **Lordosis:** deformación de la columna vertebral, caracterizada por un movimiento ondulante en el lomo.
- **Xifosis:** curvatura dorsal de la columna vertebral caracterizado por un movimiento ondulante en la cadera.
- **Ataxia:** irregularidad, perturbación de las funciones del sistema nervioso, trastornos de la coordinación de los movimientos.
- **Piloerección:** se caracteriza por la erección del pelo.
- **Erección caudal:** se caracteriza por la erección (rigidez) de la cola.
- **Agresividad:** hostilidad, carácter agresivo.
- **Aletargamiento:** disminución de la actividad del animal.
- **Excitación:** actividad anormal del organismo.
- **Disnea:** dificultad para respirar.
- **Cianosis:** coloración azul violácea de la piel, principalmente acentuada en las extremidades.
- **Hipotermia:** disminución de la temperatura normal.

El objetivo fundamental de este ensayo es determinar la dosis o concentración letal 50, que por definición es "la expresión estadística de la dosis única o de la concentración única de una sustancia que provocaría la muerte al 50% de los animales de experimentación", conocida también como dosis letal media (DL₅₀).

La información conseguida con las pruebas de toxicidad aguda, se utiliza como base para establecer la dosis y vía de administración en los subsiguientes ensayos de toxicidad de larga duración, tomando en cuenta el Cuadro 1 (Repetto, 1988):

Cuadro 1. Grado de toxicidad de las sustancias xenobióticas (Dosis oral única)

Rango de toxicidad	Denominación usual	DL ₅₀ (mg / kg p.c.)
1	Extremadamente tóxico	< 1
2	Altamente tóxico	1 - 50
3	Moderadamente tóxico	50 - 500
4	Ligeramente tóxico	500 - 5000
5	Prácticamente no tóxico	5000 - 15,000
6	Relativamente inocuo	> 15,000

3.2.1.2 Toxicidad subcrónica:

La toxicidad subcrónica es el conjunto de efectos observados después de una administración cotidiana repetida o frecuente de una o varias dosis de la sustancia estudiada. Estos ensayos se realizan en un periodo de aproximadamente 10% de la vida del animal o tratamientos más cortos de 14 a 28 días para roedores pequeños como el ratón. Su principal objetivo es determinar los posibles efectos acumulativos en los tejidos y sistemas metabólicos. Entre las observaciones a realizar se incluyen la inspección diaria del aspecto físico de los animales del ensayo y su comportamiento. Se registran periódicamente el peso corporal y el consumo de alimento y agua. También se realizan estudios hematológicos (Citometría hemática) y al terminar el experimento se practica la

autopsia en todos los animales, prestando atención a los cambios patológicos macroscópicos, incluidos los cambios de peso en los principales órganos y glándulas.

3.2.1.3 Toxicidad crónica:

El objetivo general de los ensayos de toxicidad crónica es evaluar los resultados de la toxicidad resultante de la exposición durante un periodo significativo de tiempo a diferentes dosis, datos que no pudieron evaluarse en las pruebas subcrónicas. Estos ensayos requieren la administración de la sustancia problema por una ruta apropiada y durante la mayor parte de la vida del animal en experimentación. Los estudios deben permitir la manifestación de los efectos tóxicos que requieren un largo tiempo de latencia o que son acumulativos. Por ello, son los únicos experimentos que permiten evidenciar determinadas afecciones cardiacas o renales, de aparición a menudo ligada a la edad de los animales estudiados. Las pruebas de toxicidad crónica proporcionan la pieza final de la información biológica en la que debe basarse la decisión de aceptar o rechazar una sustancia que pretenda utilizarse en los alimentos.

3.2.2 Dosis-respuesta

Paracelso (alquimista y médico, siglo XVI) dijo: "Ninguna sustancia es un veneno por sí sola. Es la dosis la que hace que una sustancia sea nociva" y la "dosis correcta hace la diferencia entre un veneno y un remedio". Estos postulados sentaron las bases del concepto de la relación dosis-respuesta y el índice terapéutico. Se dice entonces, que la intensidad de la respuesta biológica es proporcional a la dosis del compuesto al que está expuesto el organismo; así, a medida que la dosis de una sustancia se aproxima al nivel tóxico, no se alcanza un punto o nivel al que todos los organismos desarrollan de pronto los síntomas tóxicos, sino que hay un rango o intervalo de dosis al cual los individuos del grupo experimental responden de forma similar (Lu, 1985; Shibamoto y Bjeldanes, 1993).

3.2.3 Nivel de efecto nulo (*NEN*)

El nivel de efecto nulo o de inocuidad es el nivel de dosis máxima que no induce ningún signo de toxicidad en las especies de animales que se han analizado. En general, este nivel se selecciona a partir de un estudio a largo plazo. Sin embargo, ciertos signos de toxicidad patógena se pueden demostrar en estudios a corto plazo.

El *NEN* no es necesariamente un nivel absolutamente inocuo; sino uno de efectos "no observados".

Por otra parte, ciertos efectos suelen considerarse como fisiológicos, adaptativos o en su defecto, "no tóxicos". Por lo tanto estos efectos se excluyen al establecer el *NEN*. Por ejemplo, una disminución del peso corporal puede ser la consecuencia de la reducción del consumo de alimentos, que a su vez puede ser el resultado del sabor desagradable del producto químico. Sin embargo, antes de despreciar estos efectos en la evaluación de la toxicidad de un producto químico, debe tenerse cuidado de asegurar que éstas no sean manifestaciones de toxicidad (Lu, 1992).

3.2.4 Factores tóxicos y antinutricionales intrínsecos

Por su modo de acción, las sustancias nocivas de los alimentos pueden clasificarse en 2 grandes grupos:

Las sustancias antinutritivas, las cuales tienen un efecto tóxico que disminuye la disponibilidad o provocan una pérdida de los nutrientes esenciales, los cuales pueden compensarse en un inicio con suplementación nutritiva. Estas sustancias provocan un desequilibrio que a la larga determinan la aparición de una patología particular.

Los tóxicos de los alimentos, que son compuestos que tienen un efecto tóxico sobre el organismo que no se compensa por un aporte suplementario de nutrientes. Su modo de acción puede explicarse, sea por su particular reactividad, por un mimetismo molecular de

las hormonas, aminoácidos, o en ciertos casos, por la existencia de una información genética que favorezca la aparición de una determinada patología (Derache, 1990).

3.4 Proteínas

Las proteínas son macromoléculas complejas que forman más del 50 % del peso seco de las células, en cuya estructura y función juegan un papel fundamental (Fennema 1993). Éstas están compuestas por cadenas lineales de aminoácidos, unidos por la condensación del grupo carboxilo de uno con el grupo amino de otro para formar lo que se conoce como "enlace peptídico". Las cadenas de aminoácidos unidos de esta forma se conocen como polipéptidos (Bender, 1993).

3.4.1 Funciones de las proteínas

Las funciones de las proteínas en el organismo son (Kerschner, 1983):

1. Construir y reparar los tejidos corporales (ningún otro nutriente puede hacer esto).
2. Ayudar al organismo a resistir las enfermedades.
3. Proporcionar calor y energía.
4. Contribuir a la producción y secreción de líquidos corporales.

3.4.2 Necesidad de proteínas

Un gramo de proteína produce 4 calorías. Un adulto requiere aproximadamente 0.8 gramos de proteína por kilogramo de peso corporal al día. Esto es aproximadamente 10% del requerimiento calórico diario. Durante los periodos de crecimiento, la necesidad es mayor. Un niño requiere de 2 a 3 gramos de proteína por kilogramo de peso corporal y un adolescente necesita de 1 a 2 gramos. Numerosas autoridades en la materia consideran que el anciano necesita requerimientos proteicos mayores debido a que su organismo no

siempre utiliza el nutriente de manera eficiente. Muchas condiciones como el embarazo, la fiebre, el hipertiroidismo y las quemaduras extensas, también exigen ingestión proteica adicional. Por otro lado, se ha demostrado que la cantidad de proteína que requiere un individuo al día depende de la calidad de ésta.

La pérdida o la deficiencia de proteínas es grave. Una pérdida repentina de proteínas como sucede en hemorragias, cirugía o quemaduras, produce un estado de choque. La pérdida gradual, ocasionada por lo general por deficiencia alimentaria, puede causar los siguientes síntomas: pérdida de peso, edema, piel seca y escamosa, retardo en la curación de las heridas y baja resistencia a las infecciones (Kerschner, 1983).

3.4.3 Fuentes proteicas no convencionales

Los procedimientos generales más significativos de entre los encaminados a ampliar la disponibilidad de las proteínas, tanto para el consumo humano, como para el de los animales, consisten en incrementar la utilización de las leguminosas y otros vegetales ricos en proteínas. Las semillas de las leguminosas han sido tradicionalmente consumidas por el hombre y constituyen un importante complemento proteico de los cereales y de los alimentos feculentos (Fennema, 1993).

3.4.3.1 Separación y purificación de proteínas en vegetales

En el caso de los granos de soya destinadas al consumo humano, éstas son primero molidas y tratadas posteriormente con un disolvente orgánico (n-hexano) para desengrasarlas, bajo condiciones térmicas moderadas, para conservar las propiedades funcionales de las proteínas. La harina resultante tiene una riqueza proteica de alrededor de 45%, la cual se trata como se muestra a continuación para obtener un producto aún más rico en proteína (Fennema, 1993):

- a) Se extraen los carbohidratos solubles (oligosacáridos) y los minerales con agua acidificada, con una mezcla etanol-agua o con agua caliente. La mayor parte de la proteína de soya permanece insoluble en estas condiciones. El uso de agua acidificada al pH correspondiente al punto isoeléctrico de las proteínas constituye, sin duda, el procedimiento más adecuado para minimizar el desplegamiento, la asociación y las pérdidas de propiedades funcionales. El resultado es un concentrado proteico que contiene, tras su deshidratación, alrededor de un 65 a 75 % de proteína, de un 15 a un 25 % de polisacáridos insolubles, un 4 a 6 % de minerales y un 0.3 a 1.2 % de lípidos aproximadamente.
- b) Alternativamente, las proteínas de la harina desengrasada se solubilizan en agua alcalinizada; la disolución se filtra y se centrifuga luego para eliminar los polisacáridos insolubles (incluyendo la fibra). Los carbohidratos solubles y las sales se eliminan después por reprecipitación al punto isoeléctrico (4.5) seguida de la centrifugación y lavado de la cuajada proteica. Tras la deshidratación, generalmente por atomización, se obtiene un purificado proteico que contiene no menos de un 90 % de proteína. Estos purificados son más caros que los concentrados, incluso en términos de "por gramo de proteína", dado el procesado adicional sufrido y los productos químicos empleados y porque la recuperación de la proteína inicialmente presente en la harina rara vez pasa del 75 %.

3.4.4 Aminoácidos

Son 20 los aminoácidos que están implicados en la formación de proteínas y varios más los que participan en reacciones metabólicas, pero no son componentes de las proteínas. Químicamente todos los aminoácidos tienen la misma estructura básica: un grupo amino (-NH₂) y un grupo ácido carboxilo (-COOH) unido al mismo átomo de carbono (el carbono α). Lo que difiere entre los aminoácidos es la naturaleza del otro

grupo que está unido al carbono α . En el aminoácido más simple, glicina, hay dos átomos de hidrógeno, mientras que en todos los demás aminoácidos hay un átomo de hidrógeno y una cadena lateral, que varía en complejidad química desde el simple grupo metilo (-CH₃) de la alanina a las estructuras de anillo aromático de la fenilalanina, tirosina y triptófano (Bender, 1993).

3.4.4.1 Aminoácidos esenciales

De los aminoácidos que componen las proteínas, hay ocho que se consideran indispensables y que es necesario ingerir en la dieta, ya que el cuerpo es incapaz de biosintetizarlos. Tales aminoácidos esenciales son: leucina, isoleucina, lisina, treonina, triptófano, valina, metionina (en ocasiones, sustituible por cistina) y fenilalanina (a veces sustituible por tirosina). En el niño a veces hay que considerar a la histidina y también a la arginina (García, 1990).

A continuación se presentan en el Cuadro 2 las necesidades de aminoácidos esenciales sugeridas por la FAO/OMS/ONU (1985):

Cuadro 2. Necesidades de aminoácidos sugeridas por la FAO/OMS/ONU

Aminoácidos	Necesidades requeridas (g/16 g de Nitrógeno)			
	Lactantes	Preescolares (2-5 años)	Edad escolar	Adultos
Histidina	2.6	1.9	1.9	1.6
Isoleucina	4.6	2.8	2.8	1.3
Leucina	9.3	6.6	4.4	1.9
Lisina	6.6	5.8	4.4	1.6
Metionina+cistina	4.2	2.5	2.2	1.7
Fenilalanina+tirosina	7.2	6.3	2.2	1.9
Treonina	4.3	3.4	2.8	0.9
Triptófano	1.7	1.1	0.9	0.5
Valina	5.5	3.5	2.5	1.3
Total incluyendo histidina	46.0	33.9	24.1	12.7
Total sin incluir histidina	43.4	32.0	22.2	11.1

En cuanto a la calidad de una proteína, se comprende que la proteína de un alimento que contenga todos los aminoácidos esenciales tendrá más valor que otra que no contenga todos. Por otro lado, es importante conocer la cantidad de cada aminoácido, pues cuando el organismo fabrica sus propias proteínas sólo podrá fabricarlas mientras disponga simultáneamente de todos los aminoácidos necesarios, la fabricación cesará en cuanto se acaba aquel del que hay menos. Dicho aminoácido esencial que se encuentra en menor concentración en un alimento, se llama aminoácido limitante, esta relación se define como calificación química y está determinada por la siguiente expresión (García, 1990; Martínez, 2001):

$$CQ = \frac{\text{mg de aminoácido en 1g de proteína de prueba}}{\text{mg de aminoácido en 1g de proteína de referencia}}$$

El aminoácido limitante de las proteínas de la leche, productos lácteos, carnes, pescados y legumbres suele ser la metionina, y el de las proteínas de los cereales, la lisina (García,1990).

4. METODOLOGÍA

La materia prima para el presente trabajo fue la semilla de cacahuanano (*Giricidia sepium*) recolectada en el estado de Guerrero, a la cual se le realizó una inspección visual para verificar que no se encontrara dañada física o biológicamente. A continuación se presenta en la Figura 2, un diagrama de bloques que ilustra de manera global el diseño experimental:

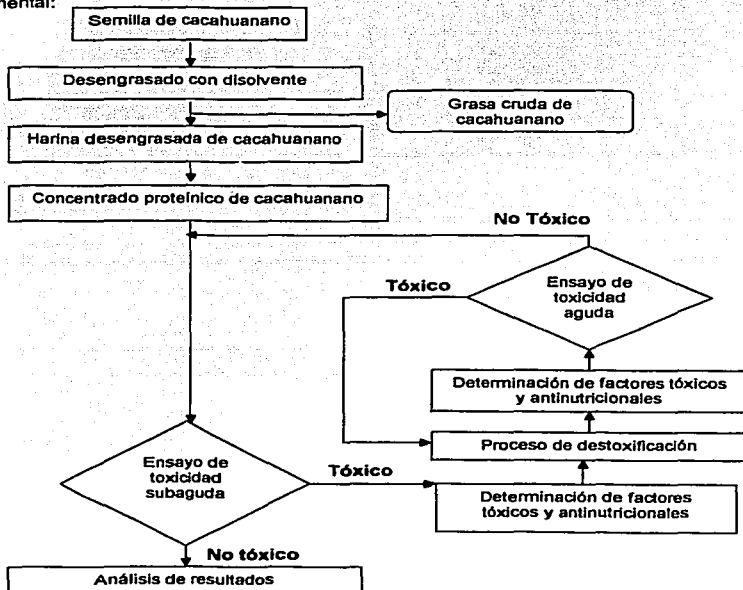


Figura 2. Diagrama de bloques que muestra un panorama global del desarrollo experimental del presente trabajo

4.1 Desengrasado de la semilla:

En un molino Thomas Wiley mod. 4 se fraccionaron alrededor de 3 kg de semilla en una malla de 2 mm a 3 mm de tamaño de partícula. Posteriormente, se desengrasó la harina en un dispositivo tipo Soxhlet que procesa como mínimo 1 kg de material, para lo que se utilizó hexano grado QP como disolvente. A la harina desengrasada se le eliminó en su totalidad el disolvente, obteniendo un material con un contenido aproximado de 59 % de proteína y 0.5 % de grasa (Martínez, 2001).

4.2 Obtención del concentrado proteínico de la semilla de cacahuanano:

A partir de la harina desengrasada de la semilla de cacahuanano, se realizó la obtención del concentrado proteínico de acuerdo al esquema mostrado en la Figura 3. Para fines prácticos, a éste se le llamará concentrado proteínico 1.

El procedimiento que aquí se presenta, fue llevado a cabo de acuerdo a un trabajo previo donde dicho concentrado (según el ensayo de toxicidad aguda por vía oral en ratones), se pudo clasificar como un material relativamente inocuo (Martínez, 2001).

Para obtener suficiente cantidad de concentrado proteínico se procesaron alrededor de 700 gramos de harina desengrasada de la semilla de cacahuanano, procesando de 100 en 100 gramos cada vez.

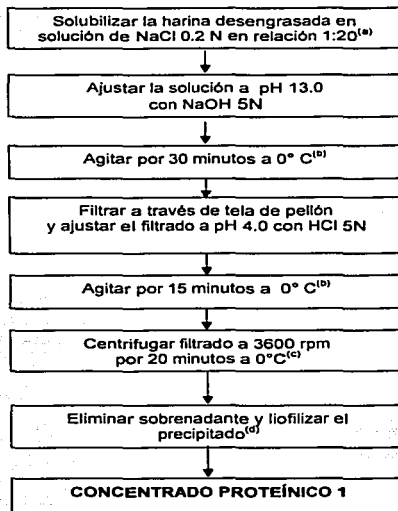


Figura 3. Obtención del concentrado proteínico 1, donde (a) = Relación harina / agua; (b) = Se utilizó un homogeneizador CAFRAMO mod.RZR1; (c) = Se utilizó una centrifuga BECKMAN mod. J2-21; (d) = Se utilizó una liofilizadora LABCONCO mod. 4.5.

4.1 Determinación de proteína cruda en concentrado proteínico:

- Fundamento:

El método más utilizado para la determinación de proteína en un alimento, es el método de Micro Kjeldhal, al cual se le han hecho una serie de modificaciones a fin de reducir el tiempo de análisis y mejorar su precisión. El proceso consta de 3 pasos: a) La digestión, que es la oxidación de la materia orgánica por acción del ácido sulfúrico y la liberación de nitrógeno como sulfato de amonio; b) La destilación del nitrógeno amoniacal y c) La titulación de éste con un ácido. A continuación se muestran en la Figura 4 las reacciones llevadas a cabo en cada paso:

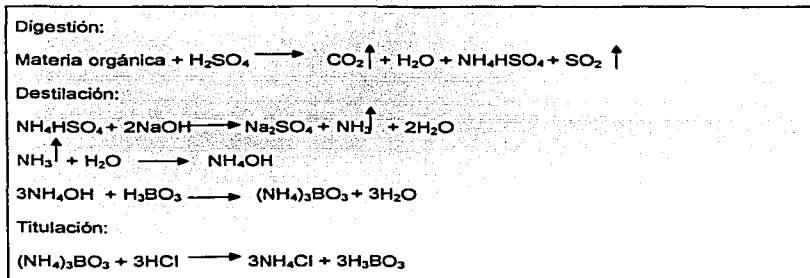


Figura 4. Reacciones que se llevan a cabo en el proceso global del método de Micro Kjeldhal

- **Material y reactivos:**

Digestor TECATOR mod. Ab 20/40

Microdestilador TECATOR AUTO KJELTEC No.1030

Tubos de digestión especiales TECATOR

HCl 2N

K₂SO₄ (RA)

Solución de H₂O₂ al 30%

Mezcla digestiva (mezclar por 30 minutos 3g de CuSO₄·5H₂O, 300 mL de H₂SO₄ concentrado y 100 mL de H₃PO₄)

Solución de ácido bórico al 1% con indicadores (disolver 20 g de ácido bórico en 2 L de agua destilada, agregar 20 mL de verde bromocresol –100mg en 100 mL de metanol- y agregar 14 mL de rojo de metilo –100 mg en 100 mL de metanol-)

- **Procedimiento:**

Se pesan de 20 a 30 mg de muestra envueltos en un papel, se agregan 0.5g de K₂SO₄, 5 mL de mezcla digestiva y se digieren a 370 ° C por 15 minutos. Después se retira del digestor y se espera a que se enfríe para añadir 3mL de H₂O₂ al 30% y se sigue calentando hasta que la digestión se complete. Posteriormente se dejan enfriar los tubos de nuevo y se les agregan 25 mL de agua destilada, se coloca el tubo en el microdestilador para que la digestión y la titulación se efectúen automáticamente.

Además de introducir los tubos conteniendo la muestra, se debe preparar de igual manera un control de caseína (20 mg) y un blanco de dextrosa (50 mg), que deben ser tratados del mismo modo.

- **Cálculos:**

% Nitrógeno = $\frac{(\text{mL muestra} - \text{mL blanco}) \times N_{\text{HC}} (\text{meg/mL}) \times 0.014 (\text{gN/megN})}{\text{g muestra}} \times 100$

% Proteína = %Nitrógeno x 6.25

4.4 Ensayo de toxicidad subcrónica en concentrado proteínico 1:

- **Fundamento:**

Los seres humanos están expuestos con mayor frecuencia a productos químicos en niveles mucho más bajos de los que realmente son tóxicos en una sola exposición o dosis única, sin embargo están expuestos a éstos durante periodos o tiempos más largos; por lo que para evaluar la naturaleza de los efectos tóxicos en estas situaciones se realizan estudios de toxicidad a mediano y largo plazo (Derache, 1990).

- **Materiales y reactivos:**

Pellet (alimento para roedores)

Concentrado proteínico de cacahuanano

24 ratones machos de 20 g aprox. de peso

Rack para ratones con jaulas individuales de acero inoxidable con bebederos y comederos

Balanza granataria para animales de laboratorio

Balanza para pesar el alimento

- **Procedimiento:**

1. **Selección de los ratones:**

Para los estudios de toxicidad generalmente se eligen ratones, por su fácil manipulación, porque son económicos y se consiguen con facilidad. Para el estudio se ocuparon ratones machos de 3 a 4 semanas de edad de la cepa ICR, con un peso corporal alrededor de 20 gramos para poder observar su crecimiento durante el bioensayo.

2. Distribución de los animales:

Se pesaron los ratones aleatoriamente y se repartieron en jaulas individuales en lotes de 6 ratones cada uno siguiendo la distribución de la "culebra japonesa" (ANEXO 1).

3. Preparación de las dietas a probar:

El concentrado proteínico se incorporó a una harina de pellet cuyo análisis con base en materia seca es el siguiente:

Proteína mínima.....	18.0%
Grasa mínima.....	5.0%
Fibra máxima.....	5.0%

(Alimento para roedores elaborado por Harlan Teklad 2018S)

Considerando que un ratón de 20 g de peso corporal consume en promedio 5 g de alimento por día y teniendo una dosis media de 15,000 mg/ kg p.c. se hizo el siguiente cálculo:

$$\frac{15 \text{ g concentrado proteínico}}{1000 \text{ g ratón}} \times 20 \text{ g ratón} = 0.3 \text{ g concentrado proteínico}$$

$$\frac{0.3 \text{ g concentrado proteínico}}{\text{día}} \times \frac{1 \text{ día}}{5 \text{ g de alimento}} = 0.3 \text{ g concentrado prot/ 5 g de alimento}$$

Por lo tanto se incorporaron 0.3 g concentrado en 4.7 g de harina de pellet, lo que equivale a 6.0 % concentrado proteínico en la dieta.

De esta manera se prepararon las 3 dietas con las siguientes dosis de concentrado proteínico:

1. 7,500 mg/ kg peso corporal
2. 15,000 mg/ kg peso corporal
3. 22,500 mg/ kg peso corporal

De igual manera se preparó una dieta control con proteína de soya incorporada al pellet en una dosis de 15,000 mg/ kg p.c., dado que cuando se está probando una proteína de origen vegetal como la del cacahuanano es importante utilizar un control que sea del mismo origen.

En todos los casos, después de incorporar el concentrado proteínico o la proteína de soya a la harina de pellet, se mezcló perfectamente y se adicionó la cantidad de agua necesaria para formar una pasta que permitiera elaborar pequeñas croquetas (o pellets) que fueron secadas a una temperatura de 50 a 60 ° C para almacenarlas a temperatura ambiente durante el bioensayo.

4. Administración de las dietas y observaciones:

La administración se realizó durante 32 días, llevando el control del agua, el alimento consumido y el peso del animal, aproximadamente cada 2 ó 3 días, con lo cual se observó el incremento en peso y se calculó la eficiencia alimentaria (ANEXO 2). Finalmente se determinaron los parámetros hematológicos y la relación porcentual de algunos órganos al término del bioensayo (Gay, 1965; Conca, 1995; Derelanks and Hollinger, 1995; Paredes, 2001).

Igualmente, se evaluaron los síntomas clínicos que generalmente se observan en un ensayo de toxicidad aguda: lordosis, xifosis, ataxia, piloerección, erección caudal, agresividad, aletargamiento, excitación, disnea, cianosis e hipotermia.

• Análisis estadístico:

Al término del bioensayo se realizó el análisis estadístico con los resultados arrojados durante el experimento. Se realizó el análisis de varianza al 95 % de confianza y las pruebas de rango múltiple (Prueba de Duncan) correspondientes (Montgomery, 1991).

4.5 Determinación de factores tóxicos y antinutricionales en concentrado proteínico

1:

Se determinaron los factores tóxicos y antinutricionales que pudiera contener el concentrado proteínico de acuerdo a algunos estudios realizados anteriormente al cacahuanano: canavanina, cumarina (tóxicos) y ácido fítico (antinutricional) (Griffiths, 1961; Martínez, 2001).

4.5.1 Canavanina:

- **Fundamento:**

La metodología empleada fue la propuesta por Fearon y Bell (Fearon and Bell, 1955) con algunas modificaciones (Rosenthal, 1977). Ésta se basa en que los compuestos que tienen el grupo "guanidoxi" como la canavanina, reaccionan con el reactivo específico de pentacianoaminoferrato, produciendo un color rojo magenta al trabajar en un rango bien definido de pH (6.5-7.0). La coloración obtenida se lee en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm.

- **Material y reactivos:**

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

Potenciómetro CORNING mod. 430

Baño de temperatura controlada GRANT mod. LR-22493

Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER mod. 340

Agitador mecánico tipo Vortex LAB-LINE mod. 1192

HCl 0.1N

NaOH 1N

Sal sulfatada de canavanina (SIGMA C-9758)

Solución estándar de canavanina (100µg/mL)

Amortiguador de fosfatos pH 7.0

NaOH 5N

Pentacianoaminoferrato al 1% (PCAF)

- Procedimiento:

A 100-150 mg de muestra finamente molida y desengrasada, se le agregan 20 mL de HCl 0.1N para realizar la extracción durante toda una noche a 200 r.p.m.

Al día siguiente, se filtra el extracto sobre papel filtro doble (Whatman #4 o equivalente) con ayuda de vacío. El filtrado se ajusta a un pH cerca de la neutralidad (6.5-7.0) con NaOH 1N. En caso de que se forme un precipitado o se enturbie la solución, conviene filtrar nuevamente y el filtrado ajustado se lleva a un volumen de 25 mL.

De esta solución se toman 3 alícuotas de 0.5 mL c/u, a las cuales se le adicionan 9.1 mL de buffer pH 7.0 y 0.4 mL de PCAF, se llevan a un baño de 30°C por espacio de 25 minutos. Después de dicho tiempo se procede a leer la coloración obtenida en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm.

- Cálculos:

Para la realización de los cálculos es necesario correr un curva patrón que tenga una concentración de 0-300 µg de canavanina, como se muestra en el Cuadro 3:

Cuadro 3. Curva patrón para la determinación colorimétrica de canavanina.

Concentración de canavanina	Solución estándar	Amortiguador pH 7.0 (ml)	PCAF (mL)		
0 (blanco)	0.0	9.6	0.4	Incubación 30°C 25 min.	Lectura a 550 nm
20	0.2	9.4	0.4		
50	0.5	9.1	0.4		
100	1.0	8.6	0.4		
150	1.5	8.1	0.4		
200	2.0	7.6	0.4		
300	3.0	6.6	0.4		

Mediante la ecuación de la línea recta obtenida con los datos de la curva patrón, se determina el contenido de canavanina y se reporta como porcentaje de canavanina.

4.5.2 Compuestos cumarínicos:

- **Fundamento:**

De acuerdo a la estructura base de las cumarinas (Kang et al, 2001) se toma en cuenta su solubilidad en una mezcla de cloroformo/metanol para su extracción y una vez obtenido el extracto se realizan las pruebas respectivas de cromatografía en placa, IR, RMN y cromatografía de gases para su identificación.

- **Material y reactivos:**

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

Rotavapor Büchi RE 111

Cromatofolios MERCK Macherey-NAGEL de placa fina con indicador de fluorescencia

Cámara de elución

Lámpara UV Electroline Modelo CM10

Espectrofotómetro IR Perkin-Elmer 283-B

Espectrofotómetro RMN Analítico Variant XR-300 de 300 MHz

Disolvente: CDCl_3

Referencia interna: TMS

Cromatógrafo de gases Hewlett Packard Modelo 5890 Serie II

Columna capilar (de uso normal) HP-5MS (5 % Metil fenil sílicona)

Gas acarreador: Helio de alta pureza (30cm/seg)

Mezcla cloroformo/metanol (80% cloroformo / 20%metanol)

Mezcla hexano/AcOEt (hexano 80% / AcOEt 20%)

- **Procedimiento:**

A 5 g de muestra finamente molida y desengrasada se le agregan 50 mL de una mezcla de cloroformo/ metanol (4:1) y se somete a una agitación de 300 r.p.m durante 2 horas. Esta mezcla es filtrada descartando el sólido, el líquido es tratado en el rotavapor para evaporar la mezcla de disolventes a una temperatura de 50°C, a la sustancia sólida obtenida se le hace una cromatografía en placa (Eluyente: mezcla hexano 80% / AcOEt 20%), se obtiene su espectro de IR, RMN y Cromatografía de gases.

4.5.3 Ácido fítico:

- **Fundamento:**

La metodología empleada es la propuesta por Haug y Lantzsch, la cual se basa en la determinación colorimétrica indirecta del fósforo del fitato presente en la muestra. El extracto de la muestra es calentado con una solución acidificada de concentración conocida de Fe(III) en exceso, el cual forma un complejo con el fitato. Se cuantifica el Fe(III) residual que el ácido fítico no alcanza a complejar mediante una reacción colorida con la 2, 2-bipiridina, fácilmente medible espectrofotométricamente (Haug and Lantzsch, 1983).

- **Material y reactivos:**

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

Centrífuga CLAY-ADAMS, DINAC™

Tubos para centrífuga con tapón

Vórtex LAB-LINE mod. 1192

Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER mod. 340

HCl 0.2N

Sulfato férrico de amonio*12H₂O

Ácido tioglicólico

Fitato de sodio

Solución férrica (pesar 0.2 g de sulfato férrico de amonio*12H₂O, disolver en 100 mL de HCl 0.2N y aforar a 1L con agua desionizada)

Solución de 2,2-bipiridina (pesar 1g de 2,2-bipiridina, medir 1mL de ácido tioglicólico y aforar a 100 mL con agua desionizada)

Solución estándar de fitatos 1.5 mg/ mL (se utiliza la sal sódica del ácido fítico, la cual tiene una pureza de 94% y una humedad de 8.3%, por lo que hay que pesar 0.1714 g de fitato de sodio y aforar a 100 mL con agua desionizada)

- Procedimiento:

Se pesan de 0.04 a 0.12 g de muestra finamente molida y desengrasada y se le adicionan 20 mL de HCl 0.2N, para someter a una agitación mecánica a temperatura ambiente durante 20 minutos (300 r.p.m).

Una vez transcurrido el tiempo, el extracto se centrifuga a 3000 r.p.m durante 15 minutos a temperatura ambiente y se colecta el sobrenadante.

Obtenido el extracto de la muestra, se toma una alícuota de 1mL que se coloca en un tubo de ensayo, se adiciona 1mL de solución férrica y se tapa con una canica.

A partir de este paso para la corrida de un blanco y de los estándares, se toma 1mL de agua (para el blanco) y de cada uno de los estándares (3-30 $\mu\text{g P/ mL}$) y se sigue con el análisis desde el punto anterior.

Los tubos se ponen en un baño de agua a ebullición por 30 minutos cuidando que el agua cubra totalmente el nivel del líquido dentro de los tubos.

Transcurridos los 30 minutos hay que esperar que los tubos se enfríen. Una vez que han alcanzado la temperatura ambiente, se les agregan 2 mL de solución de 2,2-bipiridina y se mezcla perfectamente el contenido.

Se mide la absorbancia a 519 nm a los 30 segundos exactos después de haber agregado la 2,2-bipiridina a cada tubo. Se utiliza una celda con agua desionizada para calibrar el espectrofotómetro en cero y después se lee la absorbancia del blanco, la de las muestras problema y los estándares. A cada una de éstas se le resta por separado el blanco para así obtener la absorbancia corregida respectiva.

- Cálculos:

Las soluciones de la curva patrón se preparan diluyendo la solución de referencia de fitato con HCl 0.2N en un rango de 3-30 μg fósforo fitico/ mL.

El fitato de sodio y/o ácido fitico contienen 6 átomos de fósforo (peso molecular=30.97 g/mol), por lo que $6 \times 30.97 = 185.82$ g de P/ mol. El peso molecular del ácido fitico es de 660 g/ mol y el peso molecular del fitato de sodio es de 923.8 g/ mol. La solución patrón contiene 1.5 mg de fitato/ mL, o sea:

$$\frac{1500 \mu\text{g fitato de sodio}}{\text{mL}} \times \frac{185.82 \mu\text{g P}}{923.8 \mu\text{g fitato de sodio}} = 301.72 \mu\text{g P/ mL}$$

Se realiza la curva patrón de acuerdo al Cuadro 4, con la regresión lineal se interpolan los datos y se obtiene la concentración del analito presente en la muestra como porcentaje de ácido fitico o fitato.

Cuadro 4. Curva patrón para la determinación colorimétrica de ácido fitico.

<u>Tubo</u>	<u>mL de solución estándar</u> <u>(301.72 $\mu\text{g P/ mL}$)</u>	<u>Afora a (mL)</u>	<u>Concentración</u> <u>final $\mu\text{g P/ mL}$</u>
1	1	100	3.0172
2	2	100	6.0344
3	4	100	12.0688
4	6	100	18.1032
5	8	100	24.1376
6	10	100	30.1720

4.6 Proceso de destoxificación (obtención del concentrado proteínico 2):

Para la destoxificación de la fracción proteínica de cacahuanano se utilizó otro procedimiento para la obtención de un nuevo concentrado, el cual se muestra en la Figura 5 y se llamará concentrado proteínico 2 (Ordóñez et al, 2001):

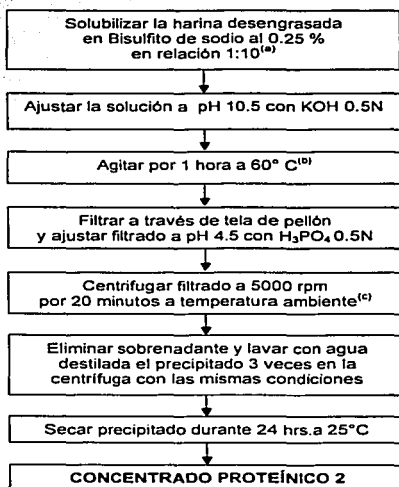


Figura 5. Obtención del concentrado proteínico 2, donde (a) = Relación harina / agua; (b) = Se utilizó una parrilla de calentamiento y agitación múltiple THERMOLYNE mod. SP-13025; (c) = Se utilizó una centrifuga BECKMAN mod. J2-21; (d) = Se utilizó un horno LAB-LINE Imperial III.

Posterior a la destoxificación del concentrado proteínico, se procedió igual que en el caso anterior, con la determinación de proteína y la verificación de la inocuidad del material, para ello se realizó la determinación de factores tóxicos y antinutricionales según la metodología ya expuesta en los puntos 4.3 y 4.5.

4.7 Cuantificación de aminoácidos, determinación de Triptófano y calificación química:

A continuación se presenta de manera breve la metodología que se utilizó para la cuantificación de aminoácidos, la determinación de Triptófano y el cálculo que se realizó para obtener la calificación química.

4.7.1 Cuantificación de aminoácidos:

La cuantificación de aminoácidos se hizo por cromatografía de líquidos de alta resolución-fase reversa (HPLC-RP).

- **Fundamento:**

La cuantificación de aminoácidos se ha llevado a cabo tradicionalmente utilizando resinas de intercambio iónico, previa hidrólisis de la proteína. Después de la separación cromatográfica los aminoácidos se hacen reaccionar con ninhidrina para poder detectarlos colorimétricamente (derivatización post-columna) (Lucas y Sotelo, 1982; Nollet, 1992). En la actualidad, las características de los métodos basados en HPLC (High Performance Liquid Chromatography) han permitido que éstos se impongan dada su mayor rapidez y sensibilidad (Alegria et al, 1998). Debido a la polaridad de los aminoácidos y a la ausencia de un cromóforo en la mayoría de ellos, la formación de un derivado antes del análisis por

HPLC de fase reversa es necesaria (derivatización pre-columna). Los derivados formados con 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato son estables y permiten incrementar la precisión y sensibilidad del análisis (Díaz et al, 1996).

- **Material y reactivos:**

Hidrólisis

Estación de trabajo Pico Tag, Waters

Viales de reacción de la estación de trabajo Pico Tag

Bomba de alto vacío RV8, Edwards

Refrigerante tipo dedo frío

Tubos de ensayo de 4 X 50 mm, Corning

Cortador de vidrio o marcador indeleble

Micropipeta y puntas (200-1000 μ L), Finnipipette

Vórtex Super Mixer modelo 1290, Lab-line

Agua destilada y desionizada

Hielo seco

Metanol grado Q.P.

Nitrógeno de alta pureza Infra

HCl 6N, 0.1 % de fenol

Preparación de la muestra

Micropipeta y puntas (50-200 μ L), Finnipipette

Pipeta Pasteur

Vórtex Super Mixer modelo 1290, Lab-line

Matraz aforado 5 mL

Jeringas 10 mL

Acrodisco de Nylon, 0.22 μ m de tamaño de poro y 13 mm de diámetro, Gelman

Tubos de ensayo de 10 x 70 mm, Pyrex

Cartucho Sep Pack C₁₈ Classic, Waters

Norleucina 5mM-HCM 10 mM

Acetonitrilo: Agua 20:80

Acetonitrilo grado HPLC, JT-Baker

Agua destilada y desionizada

Derivatización

Tubos de ensayo de 4 x 50 mm, Corning

Parrilla de calentamiento, Stirrer/Hot Plate Corning, con baño de agua a 55 ° C

Micropipeta y puntas (50-200 µL), Finnipipette

Micropipeta y puntas (100-1000 µL), Finnipipette

Vórtex Super Mixer modelo 1290, Lab-line

Parafilm

Estándar de aminoácidos H 2.5 mM, excepto Cistina: 1.25 mM, Pierce

Acetonitrilo (AccQ Fluor reagent diluent, vial 2B), 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AccQ Fluor reagent, vial 2A) y buffer de boratos (AccQ Fluor Borate Buffer, reactivo 1), Waters

Análisis cromatográfico

Sistema de entrega de disolventes, modelo 510, Waters

inyector Rheodyne con loop de 20 µL

Jeringa para HPLC 25 µL, Hamilton

Detector UV-Vis Waters 486, Waters

Horno y unidad de control de temperatura modelo III, Waters

Controlador automático de gradiente modelo 680, Waters

Adquisición e integración de datos Chromjet, modelo 54076, Waters

Sistema de filtración a vacío, Millipore

Filtro de tamaño de poro 0.45µm tipo HA, Millipore

Filtro de tamaño de poro 0.22 µm tipo GV, Millipore

Filtro pre-columna en línea, Waters

Columna AccQ-Tag Nova Pak C₁₈, tamaño de partícula 4µm, de 3.9 mm x 150 mm, Waters

AccQ Tag concentrado A (buffer acuoso de acetatos y fosfatos), Waters

Acetonitrilo grado HPLC, JT Baker

Agua destilada y desionizada

- Procedimiento (para muestras con más de 20% de proteína):

1. Hidrólisis de la muestra

Inicialmente, se prepara la estación de trabajo depositando hielo seco en el recipiente del refrigerante tipo dedo frío y metanol suficiente para cubrir el hielo. Se verifica que los controles de vacío y Nitrógeno se encuentren bien cerrados. Se enciende la bomba de vacío hasta que la presión sea de 50 a 70 miliTorr. La presión de salida del Nitrógeno no debe exceder de 0.3 kg / cm^2 . Para preparar la muestra, se pesan 10 mg de muestra seca y desengrasada en un tubo de 4 x 50 mm, se agrega una gota de agua y se agita por unos segundos para hidratar por completo la muestra y distribuirla en las paredes del tubo. La muestra debe ser preparada (Nitrógeno y vacío) y después se realiza la hidrólisis con 200 μL de HCl 6N, 0.1% fenol en fase de vapor, a 145°C durante 4 horas. Posterior a esto, se deja enfriar y se elimina el exceso de HCl con ayuda de vacío.

2. Cuantificación de aminoácidos por HPLC de fase reversa

- Rehidratación del hidrolizado y preparación de la muestra (purificación y filtración)

Para llevar a cabo este paso es necesario rehidratar el hidrolizado agregando 100 μL de norleucina 5mM-HCl 10 mM (el primero como estándar interno y el HCl para rehidratar), aforar a 5 mL después de lavar con acetonitrilo al 20 %, purificar con la ayuda de un cartucho Sep Pak C_{18} (activado) y filtrar a través de un acrodisco de nylon, desechando las 3 ó 5 primeras gotas y recuperando el resto del cual será tomada la alícuota para derivatizar los aminoácidos.

- Derivatización:

a) Reconstitución de AQC: Se enjuaga la punta de una micropipeta de 1000 μL tomando 1000 μL del reactivo de dilución AQC (vial 2B) y desechándolos para después transferir 1000 μL del mismo reactivo (vial 2B) para reconstituir el reactivo de derivatización (vial

2A). Se cierra, se agita y se calienta el vial 2A en la parrilla con baño a 55 ° C hasta la disolución del reactivo de derivatización.

b) Preparación de un estándar de aminoácidos: se mezclan 80 µL de la solución stock de aminoácidos (2.5 mM) con 20 µL de norleucina 5mM-HCl 10mM y 900 µL de agua purificada para obtener un estándar de 16 aminoácidos de concentración 0.2 mM (cistina 0.1 mM) con 0.1mM de norleucina como estándar interno.

c) Derivatización de aminoácidos: Se depositan 10 µL del estándar de aminoácidos o de la muestra purificada y filtrada en un tubo, se agregan 70 µL de buffer de boratos (reactivo 1) y se agita el tubo 10 segundos. Se agregan 20 µL del reactivo de derivatización ya reconstituido (vial 2A) y finalmente se agita por un minuto para después introducirlo en el baño a 55 ° C durante 10 minutos. Se deja enfriar para proseguir con el procedimiento.

• Análisis cromatográfico:

a) Preparación de fase móvil (A y B)

Buffer acetatos-ácido fosfórico (fase A): Se diluyen 100 mL de concentrado A hasta 1000 mL con agua purificada y se filtra a vacío (filtro 0.45 µm tipo HA), manteniendo el vacío 5 minutos después para desgasificar.

Acetonitrilo: agua 60:40 (fase B): en una probeta de 1000 mL se vierten 600 mL de acetonitrilo grado HPLC, se añaden 450 mL de agua purificada y después de que ha salido el aire se ajusta a 1000 mL con agua purificada. Se filtra y desgasifica de la misma manera que la fase A (filtro 0.22 µm tipo GV).

b) Instalación del HPLC

El sistema de análisis cromatográfico debe instalarse cuidando que las conexiones de la tubería sean adecuadas para no deformar los picos de los aminogramas por la formación de volúmenes muertos. La columna debe de conectarse en la dirección que indique su etiqueta de identificación.

c) Acondicionamiento del equipo

Se enciende el equipo después de asegurar que hay fase móvil suficiente (A y B) en cada una de las 2 bombas. Se acondiciona el equipo de acuerdo al Cuadro 5:

Cuadro 5. Acondicionamiento del equipo

Tiempo (minutos)	% fase A	% fase B	Flujo (mL / minuto)
Inicio	0	100	0
5	0	100	1
40	0	100	1
45	100	0	1
60	100	0	1

Cuando transcurran 10 minutos, se enciende el controlador de temperatura (37 ° C) y el detector de UV-Vis ($\lambda=254$ nm, filtro 0.5 y sensibilidad 0.05) para después ajustar a cero.

d) Gradiente de separación y cuantificación de aminoácidos

Listo el acondicionamiento, se inicia el gradiente con el cual se efectuará la separación y cuantificación de los derivados de los aminoácidos y se enciende el registrador estableciendo las condiciones adecuadas (velocidad del papel: 0.5 cm por minuto; ancho de pico: PW 3; atenuación: atten 128 o 256). Se inyectan de 5 a 20 μ L de muestra o 5 μ L de estándar de aminoácidos (0.2 mM), el tiempo de corrida será de 55 minutos.

e) Cálculo del contenido de aminoácidos en g/16 g N

Se calcula el contenido de cada uno de los 17 aminoácidos (g aminoácido/ 16 g N) con la siguiente ecuación:

$$1.6 \times [(A \text{ aa} / A \text{ n-leu}) \text{ mtra} \times (A \text{ n-leu} / A \text{ aa}) \text{ std} \times \text{Cstd} \times a \times \text{P.M.}] / [\text{mg mtra} \times \% \text{N}]$$

donde A aa= área del aminoácido dado; A n-leu=área de norleucina; mtra= en la muestra; std= en el estándar; Cstd=concentración del aminoácido dado en el estándar; a= aforo del hidrolizado;P.M.=peso molecular del aminoácido dado; mg mtra= cantidad de muestra en mg; %N= porcentaje de nitrógeno en la muestra seca desengrasada

4.7.2 Determinación de Triptófano:

- **Fundamento:**

El Triptófano es el único aminoácido que no se puede determinar conjuntamente en HPLC, ya que la hidrólisis ácida destruye este aminoácido; por lo que se recurre a una hidrólisis alcalina con LiOH 4N a una temperatura de 145°C en un digestor TECATOR mod. ab 20/40. El hidrolizado ajustado a un pH de 6.8 ± 0.2 , se lleva a un volumen final de 25 mL y se cuantifica el aminoácido por medio de una técnica colorimétrica en donde se aprovecha que el anillo de indol de los residuos de Triptófano dan un compuesto colorido con p-dimetilamino benzaldehído (Lucas and Sotelo, 1982; Rao et al, 1974).

- **Material y reactivos:**

Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER mod. 340

Vortex LAB-LINE mod. 1192

HCl concentrado

Solución estándar de Triptófano 0.05 % mg / mL

Solución de p-dimetilamino benzaldehído al 0.5 % en HCl concentrado (DMAB)

Nitrato de sodio al 0.2 %

- **Procedimiento:**

Se toman del hidrolizado 3 alícuotas de 2 mL cada una. A uno de los tubos se le adicionan 7.5 mL de HCl concentrado (blanco de la muestra), en tanto que a los otros dos se les agregan 7.5 mL de DMAB, se agitan y se dejan 15 minutos en reposo en la oscuridad.

Después de este tiempo a los tres tubos se les pone 0.5 mL de nitrito de sodio a cada uno, se agitan y se dejan otros 15 minutos en reposo. Finalmente se lee a 590 nm contra el blanco.

- **Cálculos:**

Se hace una curva estándar de 0 a 100 µg tomando 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 2 mL de la solución estándar, se aforan los tubos con agua destilada a 2 mL y se adicionan 7.5 mL de DMAB, se agitan y se dejan 15 minutos en la oscuridad.

Posterior a esto, se agregan 0.5 mL de nitrito de sodio, se agitan y se dejan nuevamente 15 minutos en reposo. Se lee a 590 nm contra el blanco.

Finalmente se en g Triptófano / 100 g N (16 g N), tomando en cuenta el aforo y la dilución usada, así como el porcentaje de proteína en la muestra.

4.7.3 Calificación química:

- Fundamento:

Se basa en señalar la cantidad del aminoácido indispensable que está en mayor deficiencia en la proteína estudiada al compararla con el nivel presente en una proteína de referencia. En este caso se toma como referencia las necesidades de aminoácidos sugeridas por la FAO. El aminoácido que se encuentra en menor cantidad con respecto al estándar, es el aminoácido limitante, puesto que determina la utilidad de la proteína (Alvarado, 1999).

- Cálculos:

La calificación química para cada aminoácido se calcula mediante la siguiente relación, donde el porcentaje de aminoácidos se expresa como g aminoácido/100 g de proteína:

$$CQ = \frac{\% \text{ aminoácido problema}}{\% \text{ aminoácido estándar}} \times 100$$

4.8 Ensayo de toxicidad aguda con concentrado proteínico 2:

Este ensayo se realiza como procedimiento en la determinación de la inocuidad del material, es necesario realizarlo antes de volver a evaluar la toxicidad subcrónica.

- **Fundamento:**

Los estudios de toxicidad aguda implican una sola administración de la sustancia química y la observación de los efectos tóxicos adversos en un periodo de 24 horas (Derache, 1990). Cuando una sustancia es tóxica, después de la penetración al organismo a dosis relativamente elevadas, provoca trastornos de una o varias funciones que pueden llegar hasta la muerte.

- **Material y reactivos:**

Ratones machos cepa ICR de 15 a 17 g de peso
Jaulas de acrílico para ratones con comederos y bebederos
Jeringas hipodérmicas de 1.0 mL
Agujas especiales para la administración oral
Balanza granataria para animales de laboratorio
Marcadores indelebles
Concentrado proteínico 2
Goma guar al 0.2%

- Procedimiento:

1. Distribución de los animales:

Se suprimió el alimento a los animales una noche anterior al comienzo del bioensayo y solamente se les proporcionó agua "ad libitum", ya que la administración se debe realizar con 12 horas de ayuno. Una vez pasado el ayuno, los ratones fueron pesados y marcados, para después repartirlos en diferentes lotes de acuerdo a la distribución de "culebra japonesa" (ANEXO 1).

2. Preparación de la muestra:

Para la administración por vía oral se requiere de un medio portador o vehículo para disolver o suspender el tóxico (dicho medio no debe interferir en la prueba). En este caso se utilizó goma guar al 0.2 %, ya que en ésta se suspendió adecuadamente el concentrado proteínico de cacahuanano (la suspensión debe prepararse al momento de la administración).

3. Dosificación:

Para la dosificación se debe administrar un volumen que sea lo suficientemente grande para medirlo con facilidad pero a su vez no demasiado para que no produzca traumatismo al animal. El volumen máximo permitido en administración por vía oral en ratones es de 1.0 mL, por lo que si se define 1D como la dosificación de 0.01 mL/ g de peso corporal, entonces se puede administrar hasta una dosificación de 5D ($5 \times 0.01 \times 20$ g p.c. = 1mL). En este estudio se realizó la administración de una dosis de 15,000 mg/ kg p.c., la cual se encuentra entre los límites de una sustancia que se considera como prácticamente no tóxica y relativamente inocua. Como referencia se utilizó un control sin concentrado proteínico (se administró únicamente el vehículo, que fue goma guar al 0.2%).

La dosificación seleccionada fue de 5D (0.05 mL/ 1g p.c.), por lo que se preparó una suspensión de la siguiente manera:

$$\frac{15,000 \text{ mg concentrado}}{1 \text{ kg p.c. animal}} = \frac{15,000 \text{ mg concentrado}}{1000 \text{ g p.c. animal}} = \frac{15 \text{ mg concentrado}}{1 \text{ g p.c. animal}}$$

$$\frac{15 \text{ mg concentrado}}{1 \text{ g p.c. animal}} \times \frac{1 \text{ g p.c. animal}}{0.05 \text{ mL}} = \frac{300 \text{ mg concentrado}}{\text{mL}}$$

Así mismo, se realizó otro lote con una dosificación más alta de 22,500 mg / kg p.c., para la cual también se utilizó la dosis 5D:

$$\frac{22,500 \text{ mg concentrado}}{1 \text{ kg p.c. animal}} = \frac{22,500 \text{ mg concentrado}}{1000 \text{ g p.c. animal}} = \frac{22.5 \text{ mg concentrado}}{1 \text{ g p.c. animal}}$$

$$\frac{22.5 \text{ mg concentrado}}{1 \text{ g p.c. animal}} \times \frac{1 \text{ g p.c. animal}}{0.05 \text{ mL}} = \frac{450 \text{ mg concentrado}}{\text{mL}}$$

4. Observaciones:

Una vez administrado el concentrado, se restituyó el alimento y se observó el comportamiento de los animales cada hora durante las 10 primeras horas, después a las 24 horas y finalmente a las 48 horas. Durante el bioensayo, es importante anotar la mortalidad de cada lote y evaluar las características clínicas como lordosis, xifosis, ataxia, piloerección, erección caudal, agresividad, aletargamiento, excitación, disnea, cianosis e hipotermia, las cuales han sido descritas anteriormente (ANEXO 3).

4.9 Ensayo de toxicidad subcrónica con concentrado proteínico 2:

Se realizó el bioensayo en las mismas condiciones que en el caso anterior, con dietas del concentrado proteínico 2 al mismo nivel que con el concentrado proteínico 1, el mismo número de ratones en cada lote y un control con proteína de soya, con la única diferencia que la duración de este bioensayo se disminuyó de 32 a 28 días*.

*El bioensayo de toxicidad subcrónica con concentrado proteínico 2, a diferencia del anterior, se realizó en 28 días ya que se disponía de poco material. Ambos tiempos de duración se encuentran dentro de lo establecido para bioensayos de toxicidad subaguda (Repetto, 1991).

5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Obtención de concentrado proteínico 1:

A continuación se muestra en el Cuadro 6 el porcentaje de proteína en el concentrado proteínico y el rendimiento en la obtención de éste. La determinación de proteína se realizó por cuadruplicado dando un 77.75 % de proteína, lo que quiere decir que alrededor del 22% corresponde a compuestos diferentes a proteína, en las cuales bien podrían encontrarse factores tóxicos y/o antinutricionales. Aún así 77.75% de pureza se consideró adecuado para proceder con el bioensayo, asumiendo que el resto pudiera ser principalmente polisacáridos insolubles (Fennema, 1993).

En cuanto al rendimiento, éste se considera aceptable ya que es muy similar al reportado en trabajos previos para la obtención de concentrados proteínicos (Alvarado, 1999; Paredes, 2001).

Cuadro 6. Obtención de concentrado proteínico 1

Muestra	% Proteína promedio (%N x 6.25)	Rendimiento (%)
Concentrado proteínico 1	77.75 ± 0.57*	33.00

* Resultado de la determinación por cuadruplicado

5.2 Ensayo de toxicidad subcrónica con concentrado proteínico 1:

En este apartado se presentan los resultados obtenidos durante el bioensayo de toxicidad subaguda del concentrado proteínico 1.

- Porcentaje de mortalidad

En la Figuras 6 se observa el porcentaje de mortalidad de los animales en el bioensayo, lo que puede considerarse como el principal parámetro de toxicidad.

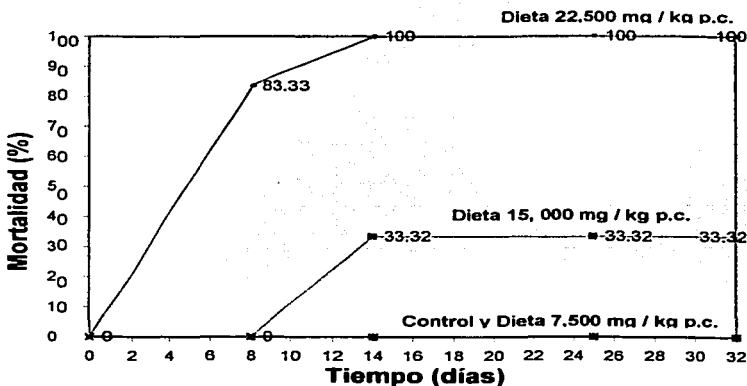


Figura 6. Gráfica de mortalidad de los animales de los diferentes lotes en el bioensayo de toxicidad subcrónica para el concentrado proteínico 1. Se puede ver que ya en la primera semana había muerto más del 80% de los ratones que consumieron la dieta con mayor dosificación, es decir, 22,500 mg concentrado proteínico/ kg p.c.; a la mitad del bioensayo se tuvo en dicha dosis el 100% de mortalidad. Por otro lado, para tal fecha en la dosis intermedia (15,000mg concentrado proteínico/ kg p.c.), se tenía un 33.32% de mortalidad. Estos resultados muestran que tanto en la dosis de 22,500 como la de 15,000 mg/ kg p.c. se presentaron efectos tóxicos drásticos.

De acuerdo a lo anterior se obtuvo la dosis tóxica media (DT₅₀) para el concentrado proteínico 1.

A continuación se muestra en el Cuadro 7 las mortalidad a los 14 días según las respectivas dosis (7,500, 15,000 y 22,500 mg/ kg peso corporal), así como su valor corregido.

Cuadro 7. Mortalidad a los 14 días

n	Dosis (mg/ kg p.c.)	Mortalidad a los 14 días <u>animales muertos</u> <u>animales tratados</u>	Respuesta % observado	Respuesta % corregido ^(a)
6	7,500	0/6	0	4.17
6	15,000	2/6	33.32	33.32
6	22,500	6/6	100	95.83

Donde n= número de animales tratados, (a) = los valores se corrigen con las fórmulas: $[(0.25/n) \times 100]$ para el 0 % de mortalidad y $[(n-0.25) / n] \times 100$ para el 100 % de mortalidad.

Con los datos mostrados en el Cuadro 7 se graficó sobre papel logarítmico la dosis contra el porcentaje de mortalidad obteniéndose una línea recta en la que se interpoló la dosis tóxica media (DT₅₀) con un valor de 15, 000 mg/ kg peso corporal, la cual nos indica la mortalidad que se presentó al decimocuarto día de experimentación.

- **Control de peso corporal, agua y alimento consumidos durante el bioensayo**

Dado que a la mitad del bioensayo se encontraba muerto ya el 100% de los ratones en la dieta de 22,500 mg concentrado proteínico / kg p.c., no se consideró esta dieta para la elaboración de las Figuras 7,8 y 9. Así mismo, en el caso de la dieta de 15,000 mg / kg p.c. sólo se consideró el promedio de los ratones que sobrevivieron al bioensayo.

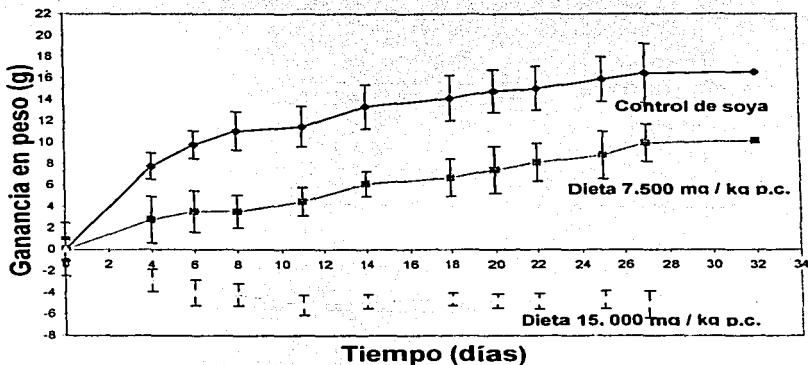


Figura 7. Incremento acumulado en peso corporal. Se observa la tendencia del crecimiento de los ratones relacionado con la cantidad de alimento consumido, pudiendo ver que la mayor ganancia en peso se tuvo siempre en el control de soya, seguida de la dieta de menor dosificación, 7,500 mg/ kg p.c. con una diferencia alrededor de 5 a 6 g. Finalmente se corrobora el efecto nocivo a una dosis de 15,000 mg/ kg p.c. al observarse una disminución en peso muy pronunciada.

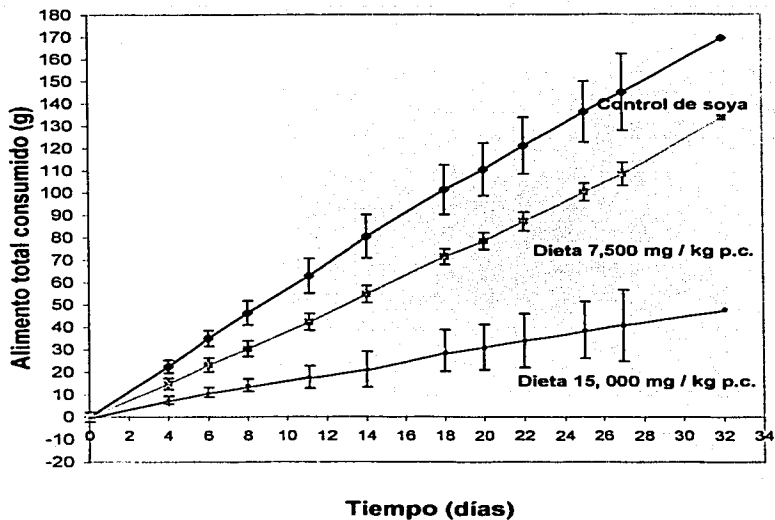


Figura 8. Alimento total consumido Por medio de la gráfica es posible observar la cantidad total de alimento consumido durante el bioensayo, observándose que el consumo de éste fue mayor en la dieta control, posteriormente en la dieta con menor contenido de concentrado y finalmente en la dieta de 15,000 mg/ kg peso corporal.

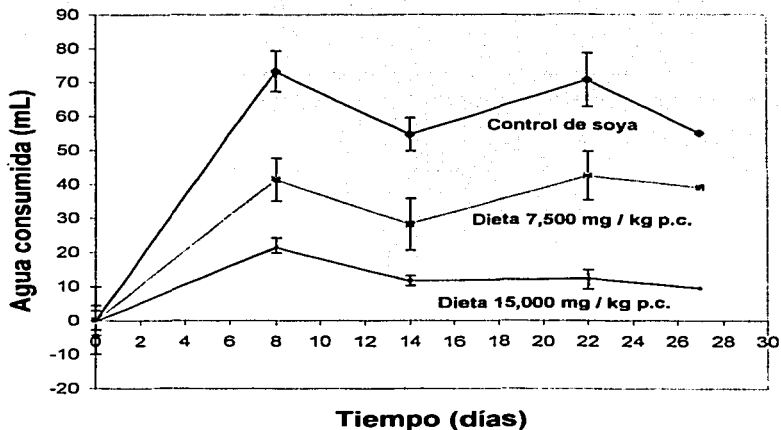


Figura 9. Gráfica que nos muestra la tendencia del consumo de agua de los diferentes lotes alimentados con concentrado proteínico 1 (de cacahuanano) y aislado de proteína de soya (control). En el consumo de agua medido semanalmente, puede observarse la misma tendencia que en el consumo de alimento, siendo siempre mayor para el control de soya, seguido por la dosis menor y finalmente la dosis de 15,000 mg/ kg p.c. Tanto esta gráfica como la anterior dejan en claro la igualdad de condiciones durante la experimentación, ya que la tendencia de consumo es la misma aunque sea en diferentes proporciones para cada dieta.

En las Figuras 7 y 8 se puede ver que aunque no hubo mortalidad en la dieta de menor dosificación (7,500 mg/ kg p.c.), los resultados no fueron tan buenos como para la dieta control, donde se utilizó proteína de soya (15,000 mg/ kg p.c.). Esto puede corroborarse con el cálculo de la eficiencia alimentaria.

Al igual que en el caso anterior, no se consideró a la dieta de 22,500 mg/ kg p.c. para la elaboración de los cuadros 7, 8 y 9 dada la mortalidad de los ratones a la mitad del bioensayo.

• Eficiencia alimentaria

El hecho de que un ratón consuma más alimento o tenga mayor ganancia en peso no significa que dicho alimento sea más eficiente como tal. Es importante considerar ambos factores (el alimento consumido y la ganancia en peso), ya que puede ser que aunque un animal haya consumido poco alimento tenga una ganancia en peso considerable, es por eso que es necesario hacer el siguiente cálculo:

Eficiencia Alimentaria = (Incremento total en peso / Alimento total consumido) x 100

Cuadro 8. Eficiencia alimentaria del concentrado proteínico 1

Dieta	Eficiencia alimentaria (%)
Control de soya	9.75 ± 1.07
7,500 mg/ kg p.c.	7.63 ± 1.48
15,000 mg/ kg p.c.	-10.99 ± 5.22*

* Presenta diferencia significativa con respecto al control

En el Cuadro 8, se observa que efectivamente la mayor eficiencia alimentaria se dio en la dieta control, obteniendo también un buen resultado a la menor dosificación de concentrado proteínico (7,500 mg/ kg p.c.), la cual no presenta una diferencia significativa con éste y por lo tanto puede considerarse que la proteína del concentrado proteínico 1 a

esa dosis, es tan eficiente como la proteína de soya. Así mismo, se puede observar que dada la disminución en peso de los animales durante el bioensayo, se obtuvo un valor negativo de eficiencia alimentaria en el caso de la dieta de 15,000 mg/ kg p.c.

Síntomas clínicos observados

La lordosis fue uno de los síntomas más frecuentes durante el bioensayo, presentándose alrededor del quinto día en los ratones que consumieron la dieta de 15,000 mg/ kg p.c. y de 22,500 mg/ kg p.c. A la par, se presentó ataxia y piloerección en el caso de la dosis más alta, siendo que en la dieta de 15,000 la piloerección se presentó en algunos casos desde el día 8 aprox. y en otros alrededor del día 20. En todos los casos donde se presentó la muerte de los animales, antes de ésta se presentó aletargamiento.

En el caso de la dieta de 15,000 mg/ kg peso corporal fue muy notoria una hiperactividad desde la mitad del bioensayo (en los casos donde no hubo muerte).

En la dieta de menor dosis, 7,500 mg/ kg p.c., no se presentaron dichos síntomas clínicos y como era de esperarse, tampoco en la dieta control.

Relación porcentual promedio de algunos órganos con respecto al peso del animal al final del bioensayo

En el Cuadro 9, se presenta la relación porcentual del hígado, el riñón, el corazón y el pulmón, viéndose mayores diferencias en el riñón y pulmón de los animales que consumieron la dieta de 15, 000 mg/ kg p.c. con respecto al control de soya.

Cuadro 9. Relación porcentual de algunos órganos al final del bioensayo en concentrado protéinico 1

	Hígado	Riñón	Corazón	Pulmón
Dieta control de soya	4.79 ± 0.34	1.65 ± 0.11	0.59 ± 0.08	0.79 ± 0.11
Dieta 7,500 mg/ kg p.c.	5.26 ± 0.65	1.59 ± 0.13	0.61 ± 0.09	0.91 ± 0.07
Dieta 15,000 mg/ kg p.c.	5.06 ± 0.86	1.95 ± 0.32*	0.79 ± 0.33	1.11 ± 0.24*

* Presentan diferencias significativas con respecto al control

Con estos resultados se puede ver que hay una variación mayor con respecto al control en el caso de la dieta de 15,000 mg/ kg p.c. en la cual se observa que hay una diferencia significativa con el control en los pesos del riñón y el pulmón, lo que denota que éstos órganos fueron afectados al consumirse el concentrado a tal dosis. Por otro lado, al comparar el control con la dieta de 7,500 mg/ kg p.c. no se encuentra una diferencia, por lo que puede decirse que no hubo efectos tóxicos a tal dosis a nivel macroscópico.

Parámetros hematológicos al final del bioensayo

En el Cuadro 10 se presentan los parámetros hematológicos obtenidos al final del bioensayo, presentándose algunas diferencias de la dieta de 15,000 mg/ kg p.c. con el control.

Cuadro 10. Parámetros hematológicos al final del bioensayo en concentrado proteinico 1

	Control de soya	Dieta 7,500 mg/ kg p.c.	Dieta 15,000 mg/ kg p.c.
Leu (10^3 / μ L)	1.17 \pm 0.69	1.19 \pm 0.46	0.94 \pm 0.38
Eri (10^6 / μ L)	10.98 \pm 0.20	10.87 \pm 0.71	11.15 \pm 0.94
HB (g/dL)	16.58 \pm 0.61	15.67 \pm 1.05	15.40 \pm 1.08
HTC (%)	98.05 \pm 2.98	95.12 \pm 5. 48	90.65 \pm 8.26
VCM (fL)	89.42 \pm 2.63	87.58 \pm 2.74	81.28 \pm 2.62*
HCM (pg)	15.10 \pm 0.54	14.40 \pm 0.56	13.82 \pm 0.48*
CCHM (g/dL)	16.88 \pm 0.36	16.43 \pm 0.32	17.00 \pm 0.62
PLT (10^3 / μ L)	1051.83 \pm 87.46	1024.17 \pm 132.18	794.25 \pm 471.38

* Presentan diferencias significativas con respecto al control

donde Leu = glóbulos blancos en miles por microlitro, Eri = glóbulos rojos en millones por microlitro, HB = hemoglobina en gramos por decilitro, HTC = hematocrito en porcentaje, VCM = vol. corpuscular medio en femtolitros, HCM = hemoglobina corpuscular media en picogramos, CCHM = concentración de hemoglobina corpuscular media en gramos por decilitro, PLT = plaquetas en miles por microlitro

Se observa que en el caso de la dieta de 7,500 no hubo diferencia con el control en ninguno de los casos, sin embargo en el caso de la dieta de 15,000 mg/ kg p.c., se denota una alteración en el volumen corpuscular medio y en la hemoglobina corpuscular media, se ve que hay una disminución en estos dos parámetros. La asociación de un valor subnormal (por debajo de lo esperado) de HCM (hipocromía) con un valor subnormal de VCM (microcitosis) establece la entidad microcitosis e hipocromía, que puede acompañarse o no de anemia. En la República Mexicana, la causa más frecuente de anemia microcítica hipocrómica es la deficiencia de hierro, lo cual indica la posible existencia de un factor antinutricional en el concentrado que no permita la utilización del hierro en el organismo, de tal manera que provoque anemia al consumir dicho material en grandes dosis (Ruiz, 1994; Martínez, 2001).

Observando los resultados presentados en los Cuadros 8, 9 y 10 se puede considerar a la dosis de 7,500 mg/ kg p.c. como *NEN* (nivel de efecto nulo), ya que a dicha dosis no se observaron efectos adversos ni clínicos ni subclínicos; sin embargo, este nivel sólo permite clasificar al producto como prácticamente no tóxico y su nivel de uso muy limitado.

5.3 Determinación de factores tóxicos y antinutricionales en concentrado proteínico 1:

De acuerdo a estudios realizados anteriormente se hizo la determinación de canavanina y cumarina como principales factores tóxicos sospechosos de haber causado la muerte de los ratones durante el bioensayo y como factor antinutricional se consideró principalmente al ácido fítico (Griffiths, 1961; Martínez, 2001).

5.3.1 Canavanina:

Esta determinación se realizó por triplicado, presentándose en el Cuadro 11 el resultado obtenido:

Cuadro 11. Contenido de canavanina en concentrado proteínico 1

Muestra	% Canavanina promedio
Concentrado proteínico 1	3.94 ± 0.11

El contenido de canavanina en el concentrado proteínico 1 es significativo, ya que aunque no se ha establecido un máximo permitido, su contenido es similar al de la semilla "Jack Bean" (*Canavalia ensiformis*) que es la materia prima de la cual se extrae este aminoácido, donde su concentración varía entre 2.02 y 4.86 %. Por otro lado, en un trabajo realizado previamente se encontró en la semilla de cacahuanano alrededor de un 10% de canavanina, por lo que en la obtención del concentrado proteínico 1, no se logró disminuir de modo más eficaz la cantidad de aminoácido no proteínico (Martínez, 2001). Considerando la baja ingesta de agua y las afecciones al riñón presentadas en el cuadro 3 y los daños a éste que se han encontrado por efecto de la canavanina, se considera entonces a ésta como la principal causa de los efectos tóxicos durante el bioensayo (Malinow et al, 1982).

5.3.2 Compuestos cumarínicos:

Después de la extracción del extracto en cloroforno/metanol, se realizaron las determinaciones correspondientes, las cuales se muestran en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Determinación de compuestos cumarínicos en concentrado proteínico

1

Determinación	Resultado
Cromatografía en placa	Negativo
Infrarrojo	Probable presencia de cumarinas
Resonancia magnética	Negativo
Cromatografía de gases	Negativo

De acuerdo a los resultados obtenidos en el Cuadro 12, se puede decir que no hay compuestos cumarínicos en la muestra.

Debido a los grupos cromofóricos presentes en las cumarinas, se esperaría una absorción en el ultravioleta muy intensa y característica de estas estructuras, misma que no se observó en la cromatopla. En el infrarrojo se vieron bandas características del grupo carbonilo que hubieran podido pertenecer a estos compuestos, sin embargo tanto la resonancia magnética como la cromatografía de gases son más específicas, de tal manera que al no observarse cumarinas en estos análisis, se puede asegurar su ausencia en el concentrado proteínico 1, es decir, se corroboró de modo confiable el resultado obtenido en la cromatografía en placa.

5.3.3 Acido fitico:

Considerando los resultados hematológicos obtenidos durante el bioensayo (cuadro 4), se consideró al ácido fitico como principal factor antinutricional. La determinación se realizó por cuadruplicado obteniendo el resultado en el Cuadro 13:

Cuadro 13. Contenido de ácido fitico en concentrado proteínico 1

Muestra	% Ac. fitico promedio
Concentrado proteínico 1	0.98 ± 0.07

Tener 0.98 % de ácido fitico equivale a 980 mg/ 100 g de concentrado proteínico 1. Los alimentos con un contenido de 400 mg/ 100 g son considerados alimentos desmineralizantes, sin embargo al haberse incorporado el concentrado a la dieta (cualquiera de las 3), el contenido final de ácido fitico en el alimento es mucho menor a 400 mg/ 100 g, por lo que no puede considerarse éste como una causa de efectos adversos (López,2000).

5.4 Proceso de destoxificación (obtención de concentrado proteínico 2):

Después de la destoxificación del concentrado proteínico, se obtuvieron los resultados presentados en el Cuadro 14:

Cuadro 14. Obtención de concentrado proteínico 2 (Destoxificación)

Muestra	% Proteína promedio (%N x 6.25)	Rendimiento (%)
Concentrado proteínico 2	77.94 ± 1.01*	26.58

* Resultado de la determinación por cuadruplicado

Se observa que disminuyó el rendimiento en la obtención del concentrado proteínico 2; sin embargo, el contenido de proteína fue muy similar al del concentrado proteínico 1, por lo que estos resultados se consideraron adecuados de acuerdo al objetivo de este trabajo.

5.4 Contenido de aminoácidos en concentrado proteínico 2 y calificación química:

En los Cuadros 15 y 16 se presentan los resultados obtenidos de la cuantificación de aminoácidos, en los cuales se tiene la composición de éstos en el concentrado proteínico 2 y de acuerdo a esto, su calificación química.

Cuadro 15. Composición de aminoácidos del concentrado proteínico 2

Aminoácido	(g aminoácido/16 g N)^(a)
Acido aspártico	5.3768
Serina	4.0597
Acido glutámico	21.7118
Glicina	4.2132
Histidina	3.0782
Arginina	10.4444
Treonina	2.2844
Alanina	3.8858
Prolina	4.0288
Cistina	0.3026
Tirosina	1.8544
Valina	3.9179
Metionina	1.2948
Lisina	4.4600
Isoleucina	3.9370
Leucina	7.3387
Fenilalanina	8.2860
Triptófano	0.4643
Total aminoácidos	90.9388

(a) Promedio de la determinación por duplicado

Cuadro 16. Disponibilidad de aminoácidos del concentrado proteínico de acuerdo a las necesidades requeridas para adultos sugeridas por la FAO/OMS/ONU

Aminoácido	Relación porcentual con respecto a la referencia
Histidina	68.83
Treonina	90.55
Valina	>100
Lisina	99.67
Isoleucina	>100
Leucina	>100
Triptófano	15.11
Fenilalanina + Tirosina ^(a)	>100
Metionina + Cistina ^(b)	33.41

(a) Total de aromáticos

(b) Total de azufrados

Se puede ver que la calificación química del concentrado 2 es bastante baja para el caso del Triptófano, siendo éste el aminoácido limitante. Así mismo, el contenido del total azufrados fue muy bajo en relación a los requerimientos establecidos; lo cual era de esperarse dado que la metionina es generalmente el aminoácido limitante en las leguminosas (García, 1990). Por otro lado, al compararse con el estudio realizado previamente al concentrado proteínico 1, se observa que en ambos concentrados el aminoácido limitante fue el Triptófano (Martínez, 2001).

5.5 Determinación de factores tóxicos y antinutricionales en concentrado proteínico 2:

Como se observó que la canavanina pudo haber sido la causa del problema en el caso del concentrado proteínico 1, ésta fue la que se consideró en la determinación de factores tóxicos del concentrado proteínico 2, como se observa en el Cuadro 17.

5.6.1 Canavanina:

Esta determinación se realizó por triplicado, presentándose a continuación el resultado obtenido:

Cuadro 17. Contenido de canavanina en concentrado proteínico 2

Muestra	% Canavanina promedio
Concentrado proteínico 2	0.29 ± 0.02

En el Cuadro 17 se muestra que el contenido de canavanina es mínimo, casi nulo, por lo que se consideró adecuado para la realización de un nuevo bioensayo.

5.6.2 Ácido fítico:

Esta determinación se realizó por cuadruplicado obteniendo el siguiente resultado:

Cuadro 18. Contenido de ácido fítico en concentrado proteínico 2

Muestra	% Ac. fítico promedio
Concentrado proteínico 2	No se detectó

En el concentrado proteínico 2 no se detectó ácido fítico, la destoxificación del material fue realizada eficazmente para los posibles compuestos indeseables en el concentrado proteínico de cacahuanano.

5.6 Ensayo de toxicidad aguda con concentrado proteínico 2:

Durante el bioensayo no se observó muerte o algún efecto tóxico a ninguna de las dos dosis probadas, 15,000 mg/ kg p.c. y 22,500 mg/ kg p.c., por lo que este aislado proteínico puede considerarse un material relativamente inocuo a corto plazo (Repetto, 1988). A partir de este resultado se pudo continuar con el estudio a mediano plazo como se presenta a continuación.

5.7 Ensayo de toxicidad subcrónica con concentrado proteínico 2:

- **Porcentaje de mortalidad**

Durante este bioensayo no hubo mortalidad en ninguna de las distintas dosis probadas: 7,500 , 15,000 y 22,500 mg concentrado proteínico 2/ kg p.c.

- **Control de peso corporal, agua y alimento consumidos durante el bioensayo**

En las gráficas de las Figuras 10, 11 y 12 se observa el desarrollo de los ratones durante el bioensayo de toxicidad subcrónica con el concentrado proteínico 2.

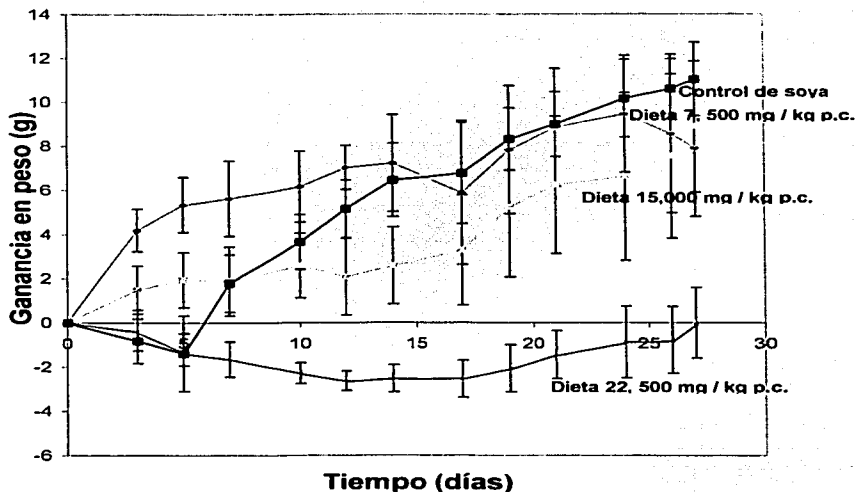


Figura 10. Gráfica del incremento acumulado en peso corporal. Se observa que en el caso del control de soya hubo un crecimiento muy lento al inicio del bioensayo, inclusive una disminución en peso, sin embargo conforme avanza el tiempo se dió un crecimiento mucho más acelerado que en los demás casos. Los ratones que consumieron la dieta de 7,500 mg/ kg p.c. crecieron más que los de las otras dietas, sin embargo se observan recaídas entre el día 15 y 20 y al final del bioensayo, donde los ratones de la dieta de 15,000 mg/ kg p.c. empezaron a crecer más. A pesar de esto, es importante notar que en esta última etapa se superponen las barras de variación de éstas tres dietas, es decir, los datos tienen una similitud considerable. En el caso de la dieta de 22,500 mg/ kg p.c. hubo una disminución en peso con una ligera recuperación al término del bioensayo.

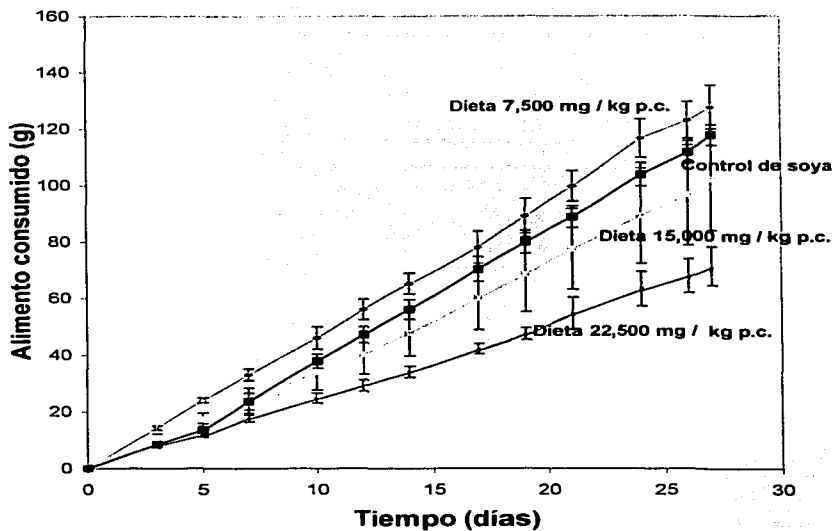


Figura 11. Gráfica del alimento total consumido. Se observa que los ratones en la dieta de 7,500 mg/ kg p.c. consumieron más alimento que los del control, seguidos por los que consumieron la dieta de 15, 000 mg/ kg p.c. y finalmente por la de 22, 500 mg/ kg p.c.

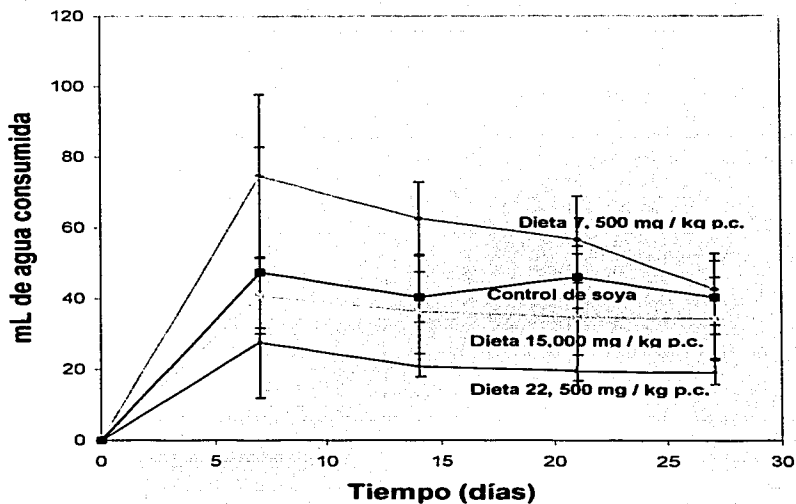


Figura 12. Gráfica del consumo de agua. Se observa que el consumo de agua fue mayor en la dieta de 7,500 mg/ kg p.c., seguida por el control de soya, la dieta de 15,000 mg/ kg p.c. y finalmente la dieta de 22,500 mg/ kg p.c. El consumo de agua denota la igualdad de condiciones entre los lotes, ya que se sigue la misma tendencia aunque en diferentes proporciones.

- **Eficiencia alimentaria**

A continuación, se presenta en el Cuadro 18 la eficiencia alimentaria del concentrado proteínico 2:

Cuadro 19. Eficiencia alimentaria del concentrado proteínico 2

Dieta	Eficiencia alimentaria (%)
Control de soya	9.35 ± 1.31
7,500 mg/ kg p.c.	6.15 ± 2.16*
15,000 mg/ kg p.c.	8.53 ± 1.69
22,500 mg/ kg p.c.	0.08 ± 2.34*

* Presentan diferencia significativa con respecto al control

En el Cuadro 19, se puede ver que la dieta de 15,000 mg/ kg p.c. es tan eficiente como el control de soya. A una dosis mayor, de 22, 500 mg/ kg p.c. se tiene una eficiencia alimentaria nula, presentándose una gran diferencia contra el control, sin embargo en el caso de la menor dosis también hay una diferencia significativa, siendo menor la eficiencia. Es decir, no se observa claramente un efecto dosis-respuesta como era de esperarse, lo que se verá a continuación en el cuadro 21.

- **Síntomas clínicos observados**

Durante todo el bioensayo no se observaron síntomas clínicos en ningún ratón de las dietas de 7, 500 mg/ kg p.c. y de 15, 000 mg/ kg p.c., sin embargo en la mitad de los ratones que consumieron la dieta de mayor dosificación, 22,500 mg/ kg p.c. se observó una ligerísima piloerección y un poco de agresividad alrededor de los días 17 a 22. Se observa un efecto dosis-respuesta.

- **Relación porcentual promedio de algunos órganos con respecto al peso del animal al final del bioensayo**

A continuación se muestra en el Cuadro 20 la relación porcentual de los órganos con respecto al peso corporal, puede verse que no hubo diferencia significativa con el control en ninguna de las 3 dosis: 7,500 , 15,000 y 22,500 mg/ kg p.c.

Cuadro 20. Relación porcentual de algunos órganos al final del bioensayo en el concentrado proteínico 2

	Hígado	Riñón	Corazón	Pulmón
Dieta control de soya	4.94 ± 0.79	1.68 ± 0.29	0.58 ± 0.05	0.80 ± 0.15
Dieta 7,500 mg/ kg p.c.	5.51 ± 0.80	1.68 ± 0.22	0.63 ± 0.07	0.82 ± 0.10
Dieta 15,000 mg/ kg p.c.	5.81 ± 0.75	1.60 ± 0.16	0.57 ± 0.04	0.85 ± 0.10
Dieta 22,500 mg/ kg p.c	5.50 ± 0.62	1.66 ± 0.09	0.56 ± 0.10	0.93 ± 0.11

- **Parámetros hematológicos al final del bioensayo**

Al obtenerse los parámetros hematológicos al final del bioensayo con el concentrado proteínico 2, puede verse que tampoco existe una clara relación dosis-respuesta. En la dieta de mayor dosificación (22,500 mg/ kg p.c.) se observaron más diferencias con el control, habiendo una disminución significativa en 5 parámetros; en la dieta de menor dosis (7,500 mg/ kg p.c.) se observó un aumento significativo en dos de esos parámetros y en la dieta de 15,000 mg/ kg p.c. la disminución de uno de ellos con respecto al control. No es posible elucidar fácilmente la forma en que la dosis de concentrado proteínico 2 afecta estos parámetros.

Cuadro 21. Parámetros hematológicos al final del bioensayo en concentrado proteinico 2

	Control de soya	Dieta 7,500 mg/ kg p.c.	Dieta 15,000 mg/ kg p.c.	Dieta 22,500 mg/ kg p.c.
Leu (10^3 / μ L)	3.23 \pm 0.78	2.98 \pm 0.82	3.68 \pm 1.28	1.75 + 0.60*
Eri (10^6 / μ L)	9.75 \pm 0.64	10.58 \pm 1.12	9.07 \pm 0.91	9.45 + 0.49
HB (g/dL)	16.28 \pm 0.94	17.56 \pm 1.17*	15.32 \pm 0.60*	14.87 + 0.70*
HTC (%)	51.20 \pm 3.40	56.72 \pm 5. 15*	47.58 \pm 2.94	46.60 + 2.24*
VCM (fL)	52.67 \pm 0.82	53.40 \pm 1.14	52.67 \pm 2.42	49.67 + 1.37*
HCM (pg)	16.75 \pm 0.61	16.64 \pm 0.72	16.97 \pm 1.05	15.75 + 0.32*
CCMH (g/dL)	31.85 \pm 1.10	31.06 + 0.72	32.23 \pm 0.87	31.88 + 0.36
PLT (10^3 / μ L)	759.20 \pm 86.81	760.00 \pm 180.03	734.00 \pm 101.14	710.83 + 89.28

* Presentan diferencia significativa con respecto al control

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

6. CONCLUSIONES

- El concentrado proteínico del trabajo previo mostró efectos tóxicos a mediano plazo, considerando a la dosis de 7,500 mg/ kg p.c. como el nivel de efecto nulo (*NEN*).
- El contenido de canavanina en dicho concentrado proteínico es significativo (3.9%) y al parecer es el responsable tanto de los efectos tóxicos como de la muerte de los ratones durante el bioensayo a mediano plazo.
- En la destoxificación del material, se obtuvo el concentrado proteínico del presente trabajo con un rendimiento de 27 % y una pureza alrededor de 78 %; el cual tiene un alto contenido de aminoácidos esenciales pero es deficiente en aminoácidos azufrados y tiene como aminoácido limitante al Triptófano.
- El contenido de canavanina de este concentrado es casi nulo (0.29 % aprox.) y no presentó efectos tóxicos a corto plazo.
- En el bioensayo de toxicidad subcrónica se probó este concentrado proteínico a 3 diferentes dosis, presentando efectos adversos únicamente en la dosis media de 15,000 mg/ kg p.c., lo que no se observó para las dosis de 7,500 y 22,500 mg/ kg p.c., es decir que no hubo una relación dosis-dependiente.

RECOMENDACIÓN

Se recomienda volver a realizar el bioensayo de toxicidad subcrónica con el concentrado proteínico del presente trabajo, siendo necesario considerar otros parámetros para obtener una relación dosis-dependiente más clara y poder ser más concluyentes para la posterior realización de un bioensayo a largo plazo.

7. BIBLIOGRAFIA

- Alegria, A., Baberá, R., Lagarda, M. y López, J. Determinación de aminoácidos en formula para lactantes por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa. *Alimentaria* 295: 103-110, 1998
- Alvarado, H.E., Evaluación toxicológica de la fracción proteínica de la almendra de capulín (*Prunus serotina*). Tesis Licenciatura, UNAM, México, D.F., pag. 42,43, 1999.
- Bender, D.A. Introducción a la Nutrición y el Metabolismo. Editorial Acribia, 1a edición, Zaragoza, pag. 4, 92-95, 1993.
- Chadhokar, A. *Gilicidia maculata* una leguminosa forrajera prometedora. *Revista Mundial de Zootecnia*, 44 (Oct-Dic):36-43, 1982.
- Centurión, D., Espinosa J. y Cázares J.G. Catálogo de Plantas de Uso Alimentario Tradicional en la Región Sierra del Estado de Tabasco. Fundación Produce Tabasco, A.C., Tabasco, pag. 10, 2000.
- Conca, A. Evaluación química y biológica de la grasa cruda y destoxificada de dos semillas de *Erythrina* mexicanas. Tesis Licenciatura, UNAM, México, D.F., pag. 50-51, 81-84, 1995.
- Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Plantas Medicinales, Compuestos Fenólicos: Sikimatos (II). *Panorama Actual del Medicamento*, Vol.24, nº233, 2000.
- Contreras, E. Valor nutritivo de leguminosas silvestres de la Península de Yucatán. Tesis Licenciatura, UNAM, México, D.F., pag. 4, 1992.
- Del Amo, R.S. y Mendieta, R.M. Plantas medicinales del estado de Yucatán. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos (INIREB), Xalapa, Ver., pag 158, 1981.
- Derache, R. *Toxicología y seguridad de los alimentos*. Ediciones Omega, Barcelona, pag. 1-8, 57-64,109-111, 1990.
- Derebanks, M. and Hollinger, M. *Handbook of Toxicology*. CRC Press, Boca Raton, pag. 518, 519, 530,531, 805, 1995.
- Díaz, J., Lliberia, J., Comellas, L. and Broto, F. Amino acid and amino sugar determination by derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate followed by high performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Journal of Chromatography*, 719: 171-179, 1996.
- Elias, D.J. *Roedores como plagas de productos almacenados; control y manejo*. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile, 1984 (<http://www.fao.org/inpho/vlibrary/x0052s>) Consultado el 27 de Octubre del 2002 a las 3:30 p.m.

FAO. Mejorando la nutrición a través de huertos y granjas familiares. Manual de capacitación para trabajadores de campo en América Latina y el Caribe". Publicación de la FAO, Roma, pág. 25-27, 2000.

FAO/OMS/ONU. Energy and protein requirement. Report of a Joint, 1985.

Fearon, W.R. and Bell, E.A. Canavanine: detection and occurrence in *Colutea arborencas*. *Biochemical Journal*, 59:221-224, 1955.

Fennema, R.O. *Química de los Alimentos*. Editorial Acribia, Zaragoza, pág. 385-371, 1993.

Gálvez, R.J. Análisis fitoquímico y toxicológico de la semilla de cacahuanano (*Girlicidia seplum*). Tesis Licenciatura, UNAM, México, D.F., pág. 15-18, 1999.

García, M. *Alimentación Humana. Errores y sus consecuencias*. Ediciones Mundi-Prensa, 1a edición, Madrid, pág. 201-215, 1990.

Gay, W. *Methods of animal experimentation*. Vol. I, Academic Press, NY, pp. 104, 109-111, 1965.

Griffiths, L.A. On the co-occurrence of coumarin, o-coumaric acid, and melilotic acid in *Girlicidia seplum* and *Dipleryx odorata*. *Journal of Experimental Botany*, 13 (38): 169-173, 1961.

Haug, W. and Lantzsch, H.J. Sensitive method for the rapid determination of pitate in cereal and products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 34:1423-1426, 1983.

Herath, H., Dassanayake, R., Priyadarshani, A., De Silva, S., Wannigama, G. and Jamie, J. Isoflavonoids and pterocarpin from *Girlicidia seplum*. *Phytochemistry* 47, 1537-1540, 1997.

INEGI. Anuario estadístico de los Estados Unidos Mexicanos 1998. Publicación del INEGI, México, D.F., pág. 115-117, 1999.

INEGI. Estadísticas del sector salud y seguridad social. Cuaderno No. 16, México, D. F., pág. 47-52, 2000.

International Chemical Safety Cards, ICSC: 1105, CCE, iPCS, 1994 (<http://www.telecable.es/personales/ea1aha/quimicos/nspn1105.htm>) Consultado el 27 de Octubre del 2002 a las 3:00 p.m.

Kerschner, V.L. *Nutrición y Terapéutica Dietética*. Editorial El Manual Moderno, 3ª edición, México, D.F., pág. 85-88, 1983.

Little, E. and Wadsworth, F. *Common trees of Puerto Rico and the Virgin Islands*. United States Department of Agriculture, Washington, pp. 196, 197, 1964.

López, E.M. Determinación de factores tóxicos en varias almendras no tradicionales con potencial aporte de proteína y grasa dietética. Tesis Licenciatura, UNAM, México, D.F., pág 34-39, 73, 77, 2000.

- Lu, F. Toxicología básica. Editorial Harfa, 1a edición en español, México, D.F., pág. 3, 4, 1992.
- Lucas, B. Estudio químico y toxicológico de la semilla de cacahuanano (*Gliricidia sepium*). Tesis de maestría del IPN, México, D.F., pág. 62, 79-123, 1985.
- Lucas, B., Guerro, A. Sigales, L. and Sotelo, A. True protein content and non-protein amino acid in legume seeds. Nutr. Rept. Int. 37, 545-553, 1988.
- Lucas, B. and Sotelo, A. Amino acid determination in pure proteins, foods and feeds using two different acid hydrolysis methods. Analytical Biochemistry 123: 349-356, 1982.
- Malinow, M.R., Bardana, E.J., McLaughlin, P. Systemic Lupus Erythematosus-Like Syndrome in Monkeys Fed Alfalfa Sprouts: Role of a Nonprotein Amino Acid. Science 216: 415-417, 1982.
- Martínez, M. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Editorial Fondo de Cultura Económica, México, D.F., pág. 193, 1122, 1987.
- Martínez, A. Evaluación bromatológica y toxicológica de la fracción proteínica de la semilla de cacahuanano (*Gliricidia sepium*). Tesis Licenciatura, UNAM, México, D.F., pág. 1, 6, 8, 34, 60, 61, 68, 72, 80-82, 2001.
- Martínez, M. Plantas útiles de la flora mexicana. Editorial Botas, México, D. F., pág. 499, 500, 1959.
- Montgomery, D.C. Diseño y Análisis de Experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica S.A. de C.V., 1ª edición en español, México, D.F., pág. 67-69, 1991.
- Nochebuena, G. y O'Donovan, B. Valor nutritivo del forraje rico en proteínas de *Gliricidia sepium*. Revista Mundial de Zootecnia, 57, 48-49, 1986.
- Nollet, L. Food análisis by HPLC. Marcel Dekker, 1ª edición, E.U.A, pág. 73-83, 1992.
- Ordóñez, C., Asenjo, M.G., Benitez, C. and González, J.L. Obtaining a protein concentrate from integral defatted sunflower flour. Biosource Technology 78, 187-190, 2001.
- Paredes, M. Evaluación de toxicidad aguda y subaguda de la fracción proteínica de la semilla de calabaza (*Cucurbita pepo*). Tesis Licenciatura, UNAM, México, D.F., pág. 59-72, 2001.
- Rao, R., Tara, M. and Krishnan, C. Colorimetric estimation of tryptophan content of pulses. Journal of Food Science and Technology, 2:213-216, 1974.
- Repetto, M. Toxicología fundamental. Científico-Médica, 2ª edición, Barcelona, pág. 19-21, 26-29, 1988.
- Roberts, H.R. Sanidad Alimentaria. Editorial Acribia, 1ª edición en español, Zaragoza, pág. 239, 1986.

Rosenthal, G., Dahlman, L., Crooks, P., Na Phuket, S. and Trifonov, L. Insecticidal properties of some derivatives of L-canavanine. *Journal Agricultural of Food Chemistry*, 43, 2728-2734, 1995.

Rosenthal, G., Preparation and colorimetric analysis of L-canavanine. *Analytical Biochemistry*, 77(1):147-151, 1977.

Ruiz, G.J. *Fundamentos de hematología*. Editorial Médica Iberoamericana, 1a edición, México, D.F., pág. 26,27, 1994.

Shahidi, F. *Antinutrients and Phytochemicals in Food*. American Chemical Society, Washington, DC, pág. 294, 1997.

Shibamoto, T. y Bjeldanes, L.F., *Introducción a la Toxicología de los alimentos*. Editorial Acribia, 1a edición en español, Zaragoza , pág.1,2,17-30, 1996.

Sotelo, A., Lucas, B., Blanc, F. and Giral, F. Chemical composition of seeds of *Gliricidia sepium*. *Nutr. Rept. Int.* 34, 315-322, 1986.

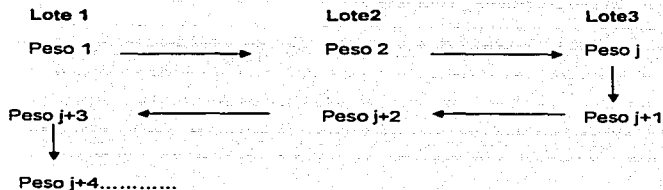
Soto, J.C y Souza M., *Plantas medicinales de la cuenca del río Balsas*, Cuaderno del Instituto de Biología No. 25, México, D.F., pág. 41, 52, 96, 119, 1995.

Swaffar, D., Ang, G., Desai, P. and Rosenthal, G. Inhibition of the growth of human pancreatic cancer cells by the arginine antimetabolite L-canavanine. *Cancer Research* 54(23): 6045-6048, 1994.

ANEXO 1

Distribución de los animales de acuerdo al método "culebra japonesa" (Conca, 1995).

El método de la "culebra japonesa" se aplica con el objeto de distribuir un conjunto de animales en un determinado número de grupos o lotes de tal forma que se tenga la menor variabilidad posible en los mismos. En este método, los animales se pesan y posteriormente se ordenan en forma ascendente o descendente (dependiendo de las condiciones del experimento) en base a su peso corporal. Finalmente los animales se distribuyen en lotes de acuerdo al siguiente esquema:



ANEXO 2

Hoja de registro de consumo de alimento e incremento en peso en el ensayo de toxicidad subaguda

Clave:	Sexo:	Peso inicial:			Fecha inicio:			Dieta:		
Fecha										
No. Días										
Peso animal (g)										
Incremento en peso (g)										
Alimento inicial (Ai) (g)										
Alimento final (Af) (g)										
Alimento ingerido (AI=Ai-Af)										
Alimento acumulado (ΣAI)										
Observaciones										

ANEXO 3

Hoja de observaciones de ensayo de toxicidad aguda

TOXICIDAD AGUDA											Fecha:
Cepa:		Peso inicial:			Peso final:			Edad:			
Descripción:											
Vehículo:											
Via:		Administración:				Dosis:					
Hora	Lordosis	Xifosis	Ataxia	Piloerección	Erección caudal	Agresividad	Aletargamiento	Excitación	Disnea	Cianosis	Hipotermia
Inicia											
1h											
2h											
3h											
4h											
5h											
6h											
7h											
8h											
9h											
10h											
24h											
48h											
72h											

X= Si se observa