



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN BROMATOLÓGICA DE LA VAINA DE
CACAHUANANO (*Gliricidia sepium*) Y SU USO POTENCIAL EN
ALIMENTACIÓN ANIMAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

SERRANO CUERO SUSANA EUGENIA



México, D.F.



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

2004.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Susana Eugenia

Serrano Cuero

FECHA: 12-marzo-04

Jurado asignado:

Presidente Prof. Bernardo Lucas Florentino A. Serrano

Vocal Prof. Francisca Iturbe Chiñas

Secretario Prof. Rosa María Argote Espinosa

1er. Suplente Prof. María Teresa Plata Jiménez

2º. Suplente Prof. Iliana Elvira González Hernández

Sitio donde se desarrolló el tema

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

Conjunto E. Departamento de Farmacia. Laboratorio 111.

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

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

Sustentante: Susana Eugenia Serrano Cuero





INDICE

	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
III. OBJETIVOS	
3.1 Objetivo general	3
3.2 Objetivos específicos	3
IV. ANTECEDENTES	
4.1 Cacahuanano	4
4.2 Rumiantes	9
4.3 Alimentos para rumiantes	11
4.4 Factores tóxicos	14
4.4.1 Alcaloides	15
4.4.2 Canavanina	15
4.4.3 Glucósidos cianogénicos	16
4.4.4 Lectinas	16
4.4.5 Nitratos	17
4.5 Factores antinutricionales	18
4.5.1 Inhibidores de proteasas	18
4.5.2 Fitatos	19
4.5.3 Taninos	19
V. METOLOGÍA	
5.1 Material biológico	21
5.2 Diagrama general	22

5.3	Métodos	
5.3.1	Análisis proximal	25
5.3.2	Lignina	29
5.3.3	Contenido energético	29
5.3.4	Glucósidos cianogénicos	30
5.3.5	Inhibidores de tripsina	31
5.3.6	Taninos	31
5.3.7	Lectinas	32
5.3.8	Fitatos	33
5.3.9	Nitratos	33
5.3.10	Canavanina	34
5.3.11	Determinación semi-cuantitativa de alcaloides	34
5.3.12	Digestibilidad <i>in vitro</i> para rumiantes	35
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		
6.1	Parámetros físicos	37
6.2	Análisis proximal	39
6.3	Contenido energético	41
6.4	Toxicología analítica	43
6.5	Lignina	46
6.6	Digestibilidad <i>in vitro</i> para rumiantes	49
VII. CONCLUSIONES		51
VIII. RECOMENDACIONES		52
IX. BIBLIOGRAFÍA		53
ANEXOS		61

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Por ser una de las mejores instituciones del país que me ha dado la oportunidad de recibir una educación y formación profesional.

Al profesor Bernardo Lucas Florentino

Por haber confiado en mí para realizar de este trabajo y por todo el tiempo y la atención que me ha brindado. Gracias por todas las aportaciones y enseñanzas que deja en cada uno de nosotros.

A la profesora Leticia Gil Vieyra

Porque detrás de ese carácter dominante se encuentra una mujer sencilla y accesible que ha sido para mí un gran apoyo en la parte experimental de este trabajo. Gracias por tu tiempo, tu constancia y por la precisión de tus palabras.

A la M. en C. Magdalena Crosby de la Universidad Autónoma Chapingo

Por el apoyo brindado en la determinación de la digestibilidad *in vitro* para rumiantes y por su asesoría en la elaboración de este trabajo de tesis.

DEDICATORIAS

A DIOS

Por ser la luz en mi camino y mi guía para alcanzar este sueño tan anhelado. A ti dedico este enorme esfuerzo y todos mis sacrificios, tal como algún día tu lo hiciste por nosotros.

A mi mamá

Por todos los cuidados que me ha dado, su amor, su paciencia y por compartir conmigo tantas noches de desvelo, pero sobre todo por ser una amiga en quien confiar. Gracias por todo lo que has hecho por mí.

A mi papá

Por el apoyo que me ha dado.

A Toño, Carla y Karime

Por enseñarme a ver la vida con alegría.

A mi abuelita Dolores Serrano †

Por ser un ejemplo a seguir, por la educación y los valores que me dio y por ser una de las personas que mas hubiese deseado presenciar la culminación de mis estudios de Licenciatura.

A Rosita Argote

Por su amistad, apoyo y orientación, pero sobre todo por la sonrisa y alegría me brindó todos los días, motivando así mi estancia en el laboratorio.

A la Sra. Vicky

Por sus consejos siempre tan acertados y sus agradables pláticas. Gracias por esa simpatía y esos regaños llenos de cariño.

A Rosalba y Anita

Por compartir conmigo y hacerme placenteras tantas horas de trabajo durante la realización de mi servicio social y por permitirme colaborar en sus proyectos de investigación.

Al profesor Sigfrido Escalante Tovar

Por darme la bienvenida a la Facultad de Química con los brazos abiertos y por haberme dado la motivación que tanto necesitaba durante cierto momento de mi vida.

A todos mis compañeros

Por los momentos que hemos compartido juntos a lo largo de la carrera, por su apoyo y la amistad que nos une.

A todos mis profesores

Por su dedicación y esmero en transmitirnos sus conocimientos y a todas las personas que de alguna manera han contribuido en mi formación como profesional.

A Carlos Álvarez Maciel

Porque siempre ha estado a mi lado en los triunfos y fracasos motivándome, comprendiéndome y entregándome su amor incondicional. Gracias mi amor por tu paciencia, tus oídos y por ser una de las partes fundamentales en mi vida.

Al profesor Luis Palos Macias

En especial le dedico este trabajo de tesis porque a pesar de que no ha estado conmigo durante todo este tiempo siempre me ha dado el valor y la fortaleza para seguir adelante. Gracias por brindarme su amistad, su confianza, su cariño y porque de alguna manera su esencia siempre ha estado a mi lado.

I. RESUMEN

El cacahuanano es una leguminosa cuyas semillas poseen alta concentración de proteína y grasa; sin embargo, solo sus flores se emplean como fuente de alimentación, y no se han efectuado estudios sobre sus vainas.

En esta investigación se realizó el análisis proximal de las vainas de cacahuanano encontrándose un alto porcentaje de fibra, en la cual fue necesario identificar los compuestos que la conforman para determinar si esta es apta para rumiantes, ya que los compuestos lignificados son altamente resistentes a la degradación.

También se efectuó el análisis sobre los compuestos tóxicos y antinutrientales intrínsecos que podrían estar presentes en las vainas, mediante técnicas cualitativas y cuantitativas. Entre los resultados destaca un alto contenido de taninos, así como de inhibidores de tripsina, que por ser considerados como factores antinutrientales podrían impedir el empleo directo de las vainas de cacahuanano como fuente potencial en alimentación ruminal.

Finalmente se llevó a cabo una digestibilidad ruminal *in vitro* para determinar el aprovechamiento de las vainas, y a pesar de que los resultados encontrados no favorecieron su utilidad como alimento para estos animales, se abre una nueva perspectiva en la utilización integral de esta leguminosa.

II. INTRODUCCIÓN

Debido a la necesidad de buscar fuentes alternativas de alimentos de buena calidad que resulten accesibles tanto física como económicamente, es necesario realizar investigaciones sobre la amplia biodiversidad vegetal que existe en nuestro país, la cual está infrautilizada. Una de las especies vegetales que aún no ha sido explotada completamente es el cacahuanano (*Gliricidia sepium*), leguminosa cuyo fruto tiene semillas con un alto contenido de proteína y grasa, que la hace fuente potencial de estos nutrimentos en la alimentación humana o animal; sin embargo, la vaina aún no se ha caracterizado químicamente y a pesar de que debe tener un alto contenido de fibra, podría emplearse en la alimentación animal, sobre todo en el caso de los rumiantes que requieren de una buena fuente de nitrógeno y que pueden digerir altas concentraciones de fibra dentro de su dieta, debido a que son capaces de llevar a cabo una digestión fibrolítica mediante enzimas de bacterias celulolíticas, protozoarios y hongos anaerobios presentes en el rumen capaces de degradar este compuesto (Church, 1993).

Este trabajo de investigación pretende caracterizar la vaina de cacahuanano tanto química como toxicológicamente, así como determinar su digestibilidad ruminal *in vitro*, con la finalidad de emplearla como fuente potencial de alimentación animal, aprovechando en forma integral el fruto de esta leguminosa.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Determinar la composición bromatológica y los factores tóxicos intrínsecos más frecuentes en las plantas superiores sobre la vaina de cacahuanano (*Gliricidia sepium*) con el fin de su evaluación como potencial alternativa de alimento para animales.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar el contenido de nutrimentos incluyendo la fibra en la vaina de cacahuanano.
- Cuantificar el contenido de glucósidos cianogénicos, alcaloides, inhibidores de tripsina, taninos, lectinas, fitatos, nitratos y canavanina.
- Evaluar el contenido energético de la vaina de cacahuanano.
- Determinar la digestibilidad ruminal de la vaina de cacahuanano por medio de un ensayo *in vitro*.

IV. ANTECEDENTES

4.1 CACAHUANANO

Las leguminosas constituyen una de las familias botánicas más amplias del reino vegetal, comprenden aproximadamente 650 géneros que incluyen alrededor de 18,000 especies distribuidas en todo el mundo, en especial en las regiones tropicales y semitropicales. El origen de las leguminosas como alimento del hombre es ancestral ya que se han encontrado restos de chícharos y lentejas de más de 7,000 años de antigüedad; sin embargo, su selección debió haber sido muy difícil, ya que este tipo de plantas contienen en su forma natural, cierto tipo de sustancias dañinas hacia sus depredadores (Leopold and Andrey, 1974; Harlan, 1976; Ferrando, 1980).

El fruto de las leguminosas es muy característico, siendo una vaina generalmente alargada, seca en su madurez con cavidades donde puede alojar de una a varias hileras de semillas; si la vaina se abre espontáneamente se denomina dehiscente en tanto que si no se abre es indehiscente (Harborne et al, 1971; Smartt, 1990). Una característica propia de las semillas de las leguminosas es su alto contenido de proteína; por lo tanto, no es sorprendente que algunas semillas sean utilizadas como fuente de proteína en la alimentación de muchos países en vías de desarrollo. Hoy en día unas cuantas leguminosas (aproximadamente 20) son de importancia comercial como fuente de alimento humano, las cuales son consumidas en estado seco, cocidas y en estado

inmaduro (Sinha, 1978; Kay, 1991). Sin embargo, estas plantas se hallan bien protegidas contra la depredación del hombre y otros organismos, por la biosíntesis de una amplia variedad de compuestos tóxicos y antinutricionales tales como lectinas, inhibidores de proteasas, alcaloides, aminoácidos no proteínicos, glucósidos cianogénicos, entre otros (Ferrando, 1980; Lucas et al, 1988; Leontowics et al, 1998).

Las leguminosas silvestres son relativamente abundantes en nuestro país y algunas de ellas podrían ser utilizadas tanto para la alimentación humana como animal; sin embargo, estos recursos naturales renovables están infrautilizados, tal es el caso de la planta conocida como cacahuanano (*Gliricidia sepium*), la cual es un árbol que pertenece a esta familia botánica. El cacahuanano, también conocido como matarratón, madre del cacao o cacahuananche, entre otros, es un árbol de amplia distribución ya que lo podemos encontrar tanto en la vertiente del Golfo de México como en la vertiente del Océano Pacífico desarrollándose a altitudes de 0 a 1,600 metros sobre el nivel del mar y se cree que es originaria del Sur de México y América Central (Martínez, 1959, 1987; Lucas, 1985). No obstante, se ha propagado a varias partes del mundo, como son África occidental, las Antillas, el Sur de Asia y las regiones tropicales de América (Nochebuena and O'Donovan, 1986; Ramamoorthy and Paliwal, 1993).

Botánicamente se clasifica de la siguiente manera:

Reino	Vegetal
Subreino	<i>Embryophyta</i>
División	<i>Tracheophyta</i>
Subdivisión	Pteropsida
Clase	Angiosperma
Subclase	Dicotiledónea
Orden	Leguminosa
Familia	Papilionaceae
Genero	<i>Gliricidia</i>
Especie	<i>Gliricidia</i> <i>Sepium</i>

El cacahuanano es un árbol que posee raíces profundas y crece de 10 a 15 metros de altura con un diámetro que va de 25 a 60 cm. Su copa es irregular y extendida, sus hojas son compuestas, alternas e imparipinnadas. Las vainas son lineares y deshiscentes a lo largo de 2 suturas, son aplanadas y miden de 10 a 20 cm de largo por aproximadamente 3 cm. de ancho, son agudas, péndulas, con nervadura fina de color verde limón o pardo claras cuando aun son jóvenes y oscuras al madurar; cada vaina posee de 3 a 10 semillas. Las semillas son pardo-amarillentas, casi redondas, aplanadas, de superficie lisa; miden de 7.9 a 18 mm de largo por 12 a 15 mm de ancho. El tronco es poco torcido, de ramas ascendentes y horizontales. Las flores son rosadas y se agrupan en racimos densos de 10 a 20 cm de largo. Cada racimo tiene de 15 a 50 flores zigomorfas de 2 a 3 cm de largo (Gómez, 1955). En la figura 1 se muestran algunas partes de esta planta.

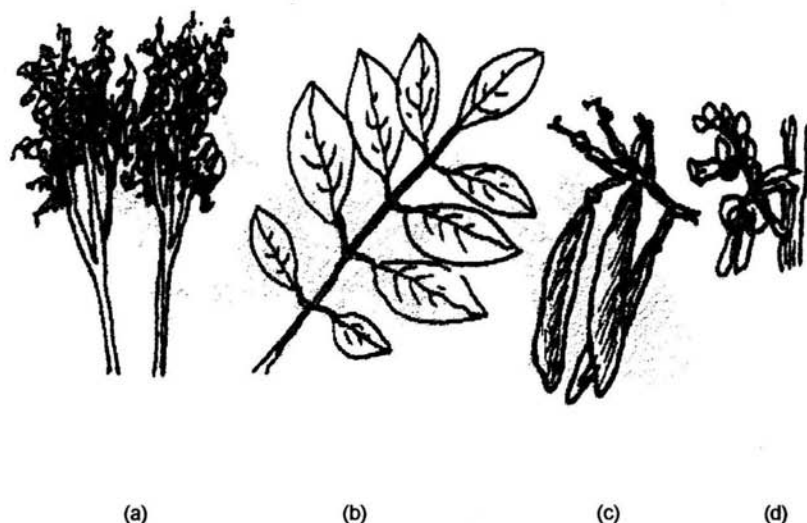


Fig. 1. Esquema de las partes del cacahuanano; a) arbusto; b) hojas; c) fruto; d) flor (Gómez, 1955).

El ciclo caducifolio del cacahuanano es el siguiente:

Caída del follaje	Diciembre-enero	Junio-julio
Brote de follaje	Enero-febrero	Julio-agosto
Floración	Enero-febrero	Junio-agosto
Fructificación	Febrero-marzo-abril	Septiembre-octubre

Entre los usos que se le dan se encuentran el de cercas vivas, rodenticida, medicinal (para enfermedades de la piel y como expectorante), combustible

(madera), forraje, insecticida, melífera, artesanal y hasta el momento sólo las flores son utilizadas como alimento en ciertas regiones de nuestro país. (Smith, 1996; Centurión et al, 2000; Repertorium Botanicis Systematicae, 1842).

Esta leguminosa es muy interesante desde la perspectiva de contener compuestos con propiedades aleloquímicas protectoras, así como medicinales (expectorante, sedativo, antihistamínico, antipirético y diurético) (Ramamoorthy and Paliwal, 1993; Rosenthal et al, 1995; Soto y Souza, 1995). También, a este árbol se le tiene en alta estima para la elaboración de forrajes o piensos para animales; pero el aprovechamiento de las semillas como fuente potencial de proteína y grasa ha sido poco estudiada (Chadhokar, 1982; Nochebuena y O'Donovan, 1986; Smith, 1996).

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; Álvarez, 2002). 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 (Lucas, 1985; Martínez, 2001).

4.2 RUMIANTES

Los rumiantes son mamíferos que se caracterizan por poseer pezuñas, dedos pares y molares cuya corona presenta crestas en forma de media luna, no presentan dientes incisivos superiores y solo algunas especies tiene dientes caninos; los molares de los rumiantes tienen tal forma y están tan separados que el animal puede masticar en un solo lado de la mandíbula a la vez. La producción de saliva en los rumiantes es muy abundante, posee una gran capacidad amortiguadora y ayuda a mantener un pH apropiado en el rumen (Church and Pond, 1976; Church, 1987; Church, 1993).

Poseen un estómago compuesto de cuatro compartimentos: retículo, rumen, omaso y abomaso. En la figura 2 se observa la distribución física y el volumen relativo de las distintas partes del estómago de los rumiantes.

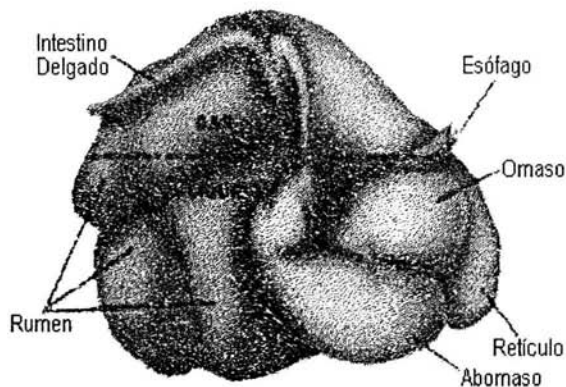


Fig. 2. Compartimentos del estómago de un rumiante (Church and Pond, 1976).

El retículo en movimiento manda el alimento ingerido hacia el rumen o hacia el omaso. El rumen contiene del 70% al 75% del volumen total del aparato digestivo y actúa como una cámara de fermentación en la cual los microorganismos ruminales atacan a ciertos nutrientes para desdoblarlos. El omaso permite reducir el tamaño de partícula del alimento ingerido y absorber algunos elementos. El abomaso efectúa la secreción de pepsina y ácido clorhídrico para el desdoblamiento de proteínas (Lewis, 1962).

Un fenómeno característico de los rumiantes es la rumia, una forma controlada de vómito que logra que los materiales semilíquidos sean regurgitados al esófago, los líquidos sean deglutidos y además permite la remasticación e ingestión del bolo alimenticio que se forma en el proceso. Los rumiantes pueden pasar rumiando hasta 8 horas o más, lo que depende de la naturaleza del alimento (Church, 1987).

La fermentación microbiana en el rumen da como resultado la producción de una gran cantidad de gas en cuya composición se encuentran: dióxido de carbono, metano, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, los cuales deben ser eliminados. Esto se lleva a cabo por medio de contracciones de los sacos superiores del rumen que empujan el gas hacia delante y hacia abajo; el esófago se dilata y permite que el gas escape ocasionando el eructo del animal. (Church, 1987; McDonald, et al, 1993).

Aproximadamente dos terceras partes de la sustancia orgánica digerible y de la energía se absorbe en el estómago anterior (retículo, rumen y omaso); el resto se digiere en los intestinos (Church, 1987). Sin embargo, la digestibilidad de un alimento puede verse afectada por trastornos digestivos, deficiencias de nutrientes, frecuencia de las comidas y tratamientos previos que se le han dado a los alimentos (Church y Pond, 1977).

4.3 ALIMENTOS PARA RUMIANTES

La alimentación es una actividad compleja que incluye actividades como la búsqueda de alimentos, el reconocimiento de los mismos y los movimientos necesarios para alcanzarlos, la valoración sensorial, la iniciación del consumo y la deglución (McDonald, et al, 1993). La alimentación de los rumiantes se basa principalmente en forrajes (henos, pastos, pajas, cáscaras) y en menor medida en ensilados (maíz, sorgo) y concentrados (melazas, raíces, frutos) (Church and Pond, 1977).

Las requerimientos de nutrientes varían dependiendo del tipo de animal y de las funciones que estos desempeñan, sin embargo, existen estimaciones que recomiendan un porcentaje de proteína bruta de 9 a 12% y un nivel de grasa mínimo del 2% (Church, 1974).

En términos nutricionales generales, los forrajes pueden variar desde fuentes nutrimentales muy buenas (alfalfa, pasto joven, leguminosas) hasta alimentos de baja calidad (paja, cascarillas). El valor nutrimental de los alimentos de baja calidad puede mejorarse con frecuencia en forma considerable con un complemento adecuado o por medio de algunos métodos para mejorar la preparación de los nutrientes. Sin embargo, es necesario seleccionar el forraje apropiado para una clase y especie dada de animal. (Church and Pond, 1977).

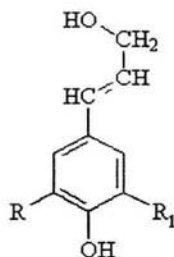
En condiciones normales los rumiantes consumen forrajes que poseen una porción importante de fibra, cuya digestión es un proceso complejo en el que participan varias enzimas de bacterias, protozoarios y hongos que se desarrollan en un ambiente anaerobio y la población de estos varía en función de diversos factores como son la cantidad y tipo de alimento consumido y las características fisicoquímicas del ambiente intrarruminal, como son pH, temperatura y gases disueltos, entre otros. Actualmente se han identificado 23 géneros y 70 especies de bacterias ruminales, encontrándose bacterias celulolíticas, hemicelulolíticas, pectinolíticas, amilolíticas, ureolíticas y proteolíticas. Las principales bacterias ruminales que degradan la fibra son: ***Fibrobacter succionogenes***, ***Ruminococcus flavefaciens*** y ***Ruminococcus albus***, con la característica de ser adherentes dado que las enzimas celulasas se encuentran en la superficie de sus células.

Con base en su morfología celular, existen en el rumen dos tipos principales de protozoarios, los ciliados y los flagelados, cuya presencia en el rumen contribuye de un 30% a un 50% en la digestión ruminal de la fibra.

Los hongos presentes en el rumen, *Piromyces communis* y *Orpinomyces bovis*, entre otros, tienen una participación importante en la digestión de las paredes celulares y son capaces de producir hemicelulasas, enzimas necesarias para llevar a cabo la digestión de la hemicelulosa presente en la fibra (Martínez, 1993).

A pesar de lo que se ha mencionado anteriormente es importante señalar que dentro del contenido de fibra presente en un alimento es necesario considerar la presencia de lignina, compuesto que reduce el valor nutritivo de los vegetales al impedir la degradación de la celulosa por parte de los microorganismos del rumen, ya que la incrustación física de las fibras vegetales en la lignina las hace inaccesibles a las enzimas que podrían digerirlas (Church 1993; McDonald, et al, 1993).

En la figura 3 se observa la estructura química de la lignina, polímero formado a partir de tres derivados del fenilpropano: alcohol cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico; la molécula esta constituida por numerosas unidades de fenilpropano agrupadas en una compleja estructura entrecruzada (McDonald, et al, 1993).



- (1) Alcohol *p*-cumárfico, en el que $R = R_1 = H$
- (2) Alcohol coniferflico, en el que $R = H, R_1 = OCH_3$
- (3) Alcohol sinapflico, en el que $R = R_1 = OCH_3$

Fig. 3. Estructura química de la lignina
(McDonald, et al, 1993).

El contenido de lignina así como de factores tóxicos y antinutricionales intrínsecos en las plantas contribuyen en gran medida a determinar su aprovechamiento y calidad como posibles alimentos.

4.4 FACTORES TÓXICOS

Los factores tóxicos son sustancias capaces de producir una anomalía fisiológica a corto plazo, que no puede ser atenuada por una suplementación de nutrientes del alimento que lo contiene (Derache, 1990).

Los factores tóxicos más comunes en los vegetales son los siguientes:

4.4.1 Alcaloides

Los alcaloides son sustancias orgánicas que contienen nitrógeno en su molécula y se comportan como álcali químico. Estructuralmente son poco similares y se identifican por reacciones generales muy variadas. Bioquímicamente siguen un complejo ciclo del metabolismo nitrogenado, con actividades biológicas importantes, por su mimetismo hormonal y su intervención en las reacciones principales del metabolismo celular. (Derache, 1990)

El contenido de alcaloides en las plantas puede ser muy variado pero se considera que un consumo de 1% a 5 % de alcaloides con respecto al peso corporal del animal durante uno a dos días puede causar una intoxicación aguda en el organismo (Roder, 2001).

4.4.2 Canavanina

La canavanina o ácido 2-amino-4-guanidoxi butírico es un aminoácido básico no proteico potencialmente tóxico análogo de la arginina. Se considera 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 lo convierte en un potente inhibidor del crecimiento para muchos sistemas microbianos, pudiendo ser letal debido al mal funcionamiento de su metabolismo. La canavanina se ha encontrado en las semillas del cacahuanano (Martínez, 2001). Existen pocos reportes de sus efectos en células de organismos superiores.

4.4.3 Glucósidos cianogénicos

Los glucósidos cianogénicos se encuentran distribuidos en una amplia gama de vegetales, entre los que se encuentran algunas leguminosas. El efecto tóxico se presenta cuando la enzima β -glucosidasa hidroliza el enlace glucosídico y la hidroxinitrilasa libera el ácido cianhídrico. En condiciones normales no tiene lugar la hidrólisis de los glucósidos cianogénicos, esta es resultado de la pérdida de integridad en las células vegetales (plantas marchitas, congeladas o mal desarrolladas). En el caso de los rumiantes las lesiones pueden presentarse durante la masticación del vegetal o en el rumen, que presenta un ambiente favorable para la hidrólisis (Buck and Osweiler, 1981, Roder, 2001).

Se considera que un contenido de cianuro de 500 a 750 partes por millón en el alimento representa un riesgo moderado de intoxicación en el animal. Alimentos con valores superiores a las 1000 partes por millón no son aptos para su consumo. (Roder, 2001).

4.4.4 Lectinas

Las lectinas o hemaglutininas son un grupo de proteínas o glicoproteínas tóxicas presentes en la mayoría de las leguminosas comestibles, que se caracterizan por tener una gran afinidad con los residuos glucídicos presentes en la superficie de los glóbulos rojos sanguíneos ocasionando aglutinación. Además pueden unirse con las proteínas de células epiteliales de la pared del intestino, ocasionando con esto una mala absorción de nutrientes. Sin embargo, es importante mencionar que la presencia de hidratos de carbono en la molécula de

las lectinas les da especificidad hacia las células, lo que repercute de manera importante en su acción, ya que de no ser específicas no pueden unirse a las células y causar daño. Por otra parte, para que se lleve a cabo un efecto por la vía oral es necesario que las lectinas resistan el ataque de las proteasas a lo largo del tracto digestivo; posible motivo por el cual no existen reportes de su efecto tóxico en rumiantes (Lindner, 1995; Valle, 1991).

Los lectinas pueden destruirse por métodos de calentamiento como son el secado y la cocción.

4.4.5 Nitratos

La acción tóxica de los nitratos se presenta cuando el animal ingiere cantidades importantes de hierba con alto contenido en nitratos, ya que estos llegan al estómago y allí son transformados en nitritos, los cuales se absorben a través de las paredes del tubo digestivo y llegan a la sangre, produciendo en ella un bloqueo de la hemoglobina. Este bloqueo ocasiona trastornos importantes en el transporte del oxígeno desde los pulmones a todos los tejidos del organismo y, como consecuencia de ello, origina alteraciones graves en el sistema nervioso central del animal intoxicado. (Hernández, 1980).

Se puede esperar una intoxicación aguda del animal cuando el forraje contiene más del 1% de nitratos con respecto al producto seco. Se ha señalado que la dosis tóxica de nitratos para bóvidos en crecimiento es de 0.9 a 1.8 %, pero pueden ingerir raciones de hasta 3% de nitratos en el heno si la ración es

equilibrada, ya que se ha demostrado que los rumiantes toleran mayores niveles de nitratos cuando la dosis se reparte durante todo el período de consumo o se mezcla con la dieta total (Buck and Osweiler, 1981; Lorgue, 1997).

4.5 FACTORES ANTINUTRICIONALES

Las sustancias antinutricionales disminuyen la disponibilidad o provocan una pérdida suplementaria de los nutrientes esenciales. Estas sustancias provocan un desequilibrio que se compensa por un aporte suplementario de los nutrientes implicados y a la larga determinan la aparición de una patología particular (Derache, 1990).

4.5.1 Inhibidores de proteasas

Los inhibidores de proteasas son sustancias antinutritivas de naturaleza proteínica presentes en la mayoría de las leguminosas y cereales; se caracterizan por inhibir la actividad de las proteasas que son enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos de las proteínas y péptidos permitiendo su asimilación.

El inhibidor de tripsina es uno de los más abundantes y dada su naturaleza proteínica existen numerosos métodos usados comúnmente para desnaturalizar o inactivar este tipo de sustancias, el más utilizado consiste en brindar un calentamiento adecuado al alimento que permita destruir o bien disminuir el efecto de los principales inhibidores de proteasas (Martínez, 1997).

4.5.2 Fitatos

En el pericarpio de los productos vegetales existe fósforo en forma de fitatos, que son sales del ácido fítico, derivado del ácido fosfórico. En especies de animales monogástricos aumentan la pérdida fecal de calcio y contribuyen a la descalcificación del organismo; además se consideran una fuente de fósforo no bioasimilable debido a la ausencia de la enzima fitasa, sin embargo, se ha comprobado que en el rumen del ganado ovino se produce la hidrólisis de los fitatos por las fitasas bacterianas. Por consiguiente, parece que los rumiantes utilizan el fósforo de los fitatos del mismo modo que otras fuentes de fósforo (Derache, 1990; McDonald, et al, 1993).

4.5.3 Taninos

Los taninos son compuestos polifenólicos solubles en agua que se encuentran presentes en algunas leguminosas; se clasifican como condensados e hidrolizables en base a su tipo estructural y su reactividad contra agentes hidrolíticos, particularmente ácidos. Los taninos son considerados nutricionalmente indeseables, ya que son capaces de formar un complejo tanino-proteína que tiene lugar cuando los grupos fenólicos de los taninos se oxidan a quinonas, pudiendo formar enlaces covalentes entre los grupos amino-épsilon de las lisinas y de las argininas en las cadenas peptídicas precipitándolas y reduciendo el valor nutricional del alimento (Lindner, 1995). En la figura 4 se muestra la estructura química de un tanino, cuya molécula se encuentra constituida principalmente de polifenoles.

Los taninos son hidrolizados al llegar al rumen generando un sin número de compuestos fenólicos, donde se consideran como posibles inhibidores de las celulasas, ya que se ha observado una disminución de la digestibilidad ruminal de diversos forrajes (Van Soest, 1982; Roder, 2001).

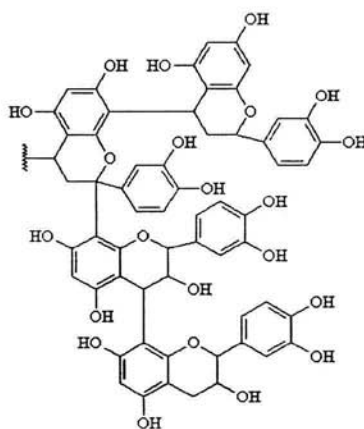


Fig. 4. Estructura química de un tanino condensado (Van Soest, 1982).

Por otra parte es importante mencionar que el nivel de astringencia de las raciones parece tener una función importante en la elección alimentaria manifestándose en una reducida ingestión de los alimentos demasiado ricos en taninos (Derache, 1990).

Se ha observado que alimentos que poseen un porcentaje del 3 a 9% de taninos en su composición pueden causar desorden fisiológico en los animales que los consumen (Roder, 2001).

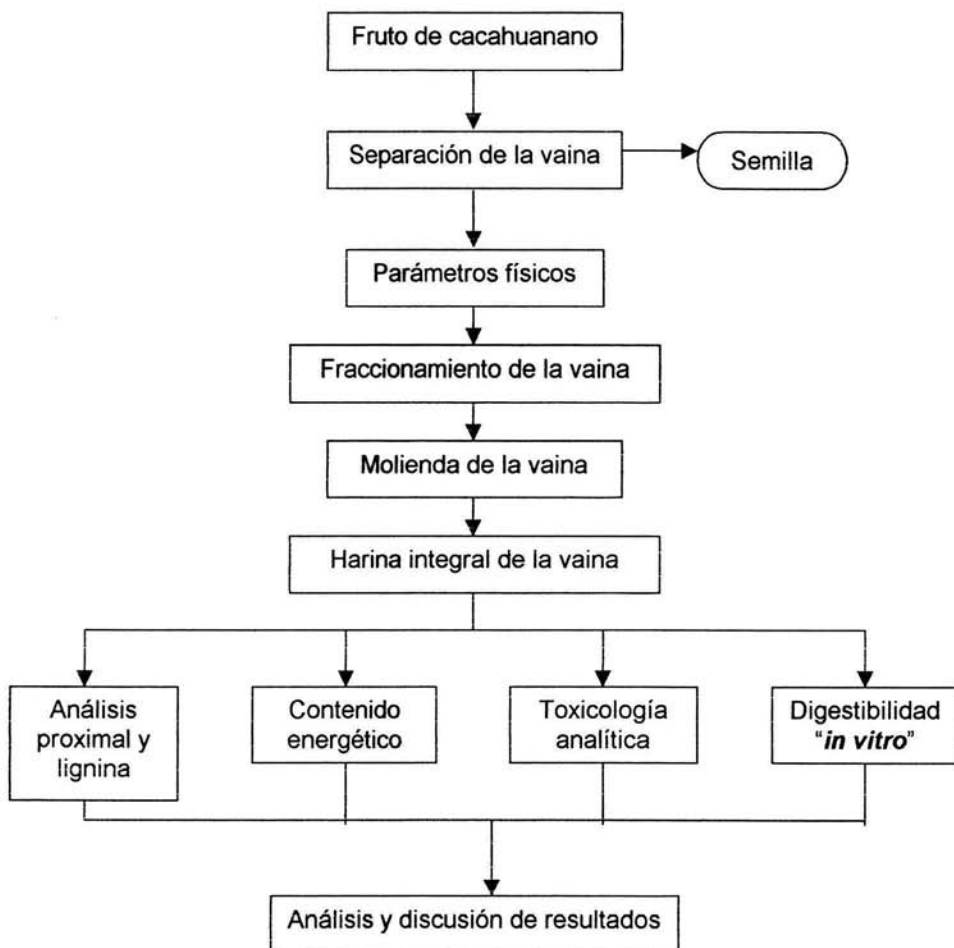
V. METODOLOGÍA

5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico consistió del fruto del cacahuanano, el cual se recolectó de la zona costera del estado de Guerrero en su fase de madurez fisiológica (con alto contenido de humedad), ya que esta leguminosa conserva su característica silvestre de ser un fruto dehiscente al ir secándose. Una vez recolectada la cantidad suficiente de material biológico, se procedió a secar la muestra en una estufa de circulación forzada a una temperatura de $55^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ por espacio de 18 a 48 horas. En este proceso la propia vaina se abrió espontáneamente dejando libres y accesibles las semillas.

5.2 DIAGRAMA GENERAL DE INVESTIGACIÓN

A continuación se presenta un diagrama de trabajo general y en seguida se detallan los aspectos más relevantes de cada uno de los bloques.



SEPARACIÓN DE LA VAINA: Como ya se mencionó, las vainas se abren al secarse y en forma manual se procedió a separar las semillas, tratando de eliminar material extraño y aquel que estaba dañado física y biológicamente.

PARÁMETROS FÍSICOS: Se determinaron algunos parámetros físicos correspondientes al peso y longitud de las vainas, número de semillas contenidas en cada vaina y en especial la proporción correspondiente a la vaina en el fruto integro (Moreno, 1984).

FRACCIONAMIENTO DE LA VAINA: La vaina libre de semillas se fracciono en un molino Thomas Wiley con una abertura de malla de 4 mm de diámetro y se guardo en un lugar protegido de la humedad.

HARINA INTEGRAL DE LA VAINA: Las vainas de cacahuanano fraccionadas se pasaron a través de un micromolino Cyclotec mod. 1093, para obtener una harina finamente molida con un tamaño de partícula de 1 mm de diámetro (Adrián et al, 2000).

ANÁLISIS PROXIMAL: A la harina integral se le realizó el análisis proximal que consta de las siguientes determinaciones: humedad, proteína cruda, extracto etéreo, fibra cruda y cenizas las cuales se realizaron de acuerdo a los métodos del AOAC con ligeras modificaciones (Bateman, 1970; Herlich, 1990). Los hidratos de carbono asimilables se calcularon por diferencia.

FIBRA DETERGENTE ÁCIDO Y LIGNINA: Debido a que se encontró un alto contenido de fibra fue necesario hacer un análisis de este componente, ya que la denominación de esta fracción en el análisis proximal, comprende sustancias que no son aprovechables ni por los rumiantes como es el caso de la lignina. Para ello se empleo la técnica de Van Soest que permite separar uno a uno los componentes de la fibra (Church and Pond 1976; Aguilar, 1978; Adrián et al, 2000, Van Soest, 1982).

CONTENIDO ENERGÉTICO: Para conocer el valor energético de la vaina, se procedió a determinar su densidad calórica por medio de una bomba calorimétrica y además, se calculo tanto la energía digerible como la energía metabolizable (Molinar, 1988; Muller y Tobin , 1986; Church and Pond, 1976).

TOXICOLOGÍA ANALÍTICA: se aplicaron métodos químicos e incluso ensayos *in vitro* para la cuantificación de los factores tóxicos y antinutricionales que se presentan con mayor frecuencia en los alimentos de origen vegetal como son: inhibidores de tripsina, fitohemaglutininas, fitatos, taninos y nitratos (Kakade et al, 1974; Lucas and Sotelo, 1993; Herrera, 1998; Hidalgo, 1999); así como otros de menor frecuencia como glucósidos cianogénicos y alcaloides (Lucas and Sotelo, 1984; Hultin and Tursell, 1964). Además, para el caso particular de la vaina de cacahuanano, es necesario la determinación de canavanina, ya que se reporta la presencia de este aminoácido no proteínico en alta concentración en las semillas de esta leguminosa (Lucas et al, 1988; Roseenthal, 1977).

DIGESTIBILIDAD *IN VITRO*: Con el fin de confirmar el posible uso potencial de la vaina como alimento para rumiantes, fue necesario realizar la determinación de la biodisponibilidad de esta material biológico, por medio del ensayo *in vitro*, haciendo uso de líquido ruminal bajo condiciones ya establecidas (Aguilar, 1978; Tejada, 1985; Church, 1987).

5.3 MÉTODOS

5.3.1 Análisis proximal

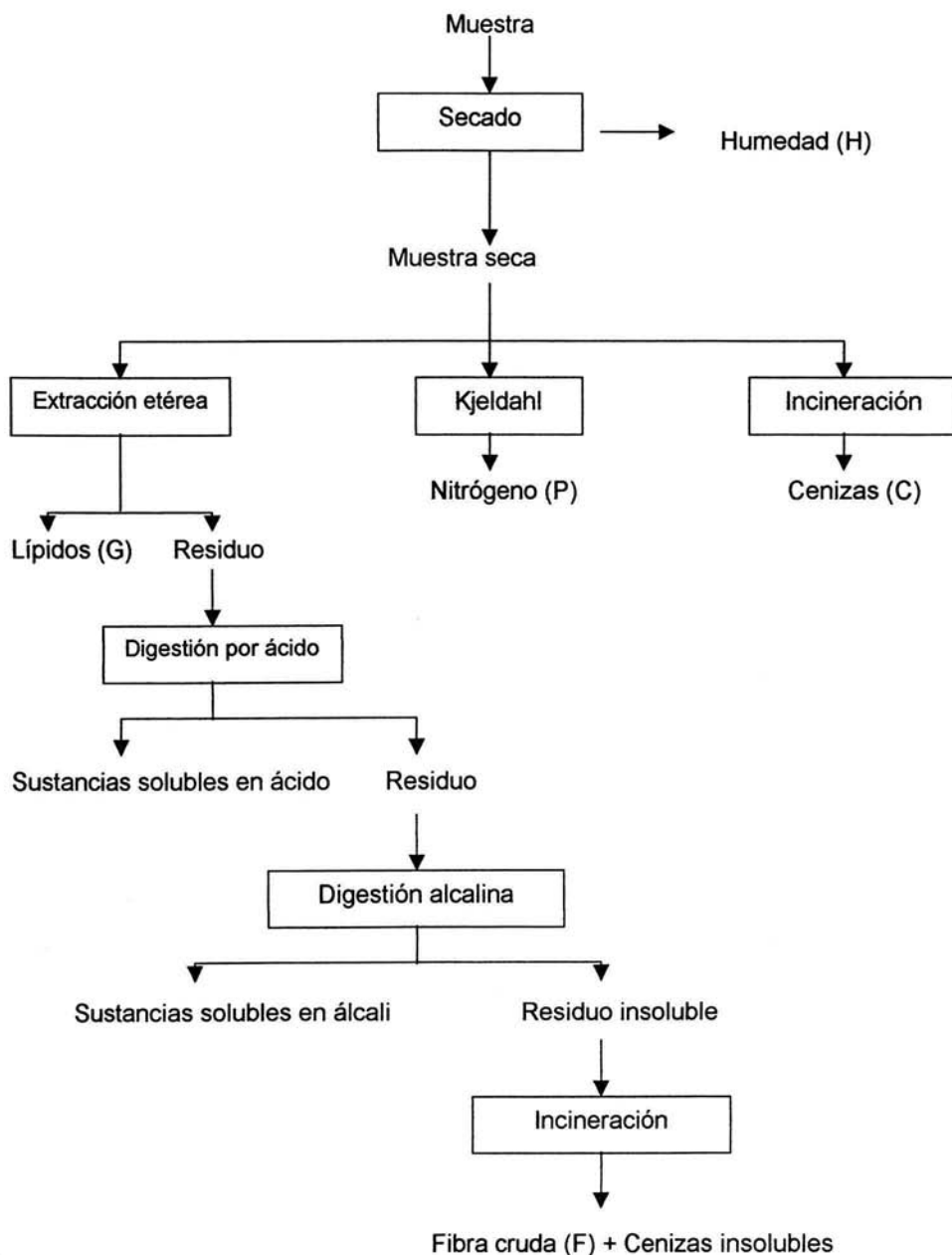
Se llevo a cabo de acuerdo al esquema de Weende y aplicando las técnicas del AOAC con ligeras modificaciones (Bateman, 1970; Herlich, 1990).

Las determinaciones efectuadas fueron:

- Humedad (H)
- Cenizas (C)
- Proteína cruda (P)
- Grasa cruda (G)
- Fibra cruda (F)
- Hidratos de carbono digeribles (HC)

En la figura 5 se muestra el esquema de Weende de acuerdo al cual fue llevado a cabo el análisis proximal.

Fig. 5 Diagrama ilustrativo del esquema Weende para obtener el análisis proximal de un alimento (Bateman, 1970).



Las condiciones en las que se llevo a cabo el análisis proximal son las siguientes:

- **HUMEDAD:** Se llevo a cabo un secado al vacío a 60°C en una estufa de presión reducida.
- **CENIZAS:** La muestra fue carbonizada a la flama de un mechero y bajo una campana. Posteriormente fue colocada en una mufla a 550°C hasta obtener un peso constante.
- **PROTEÍNA CRUDA:** Fue determinada por el método de Kjeldahl empleando un digestor de proteína (Tecator 1030). Para llevar a cabo la digestión de la muestra se utilizo una mezcla digestiva (ácido sulfúrico, catalizadores) y K_2SO_4 para aumentar el punto de ebullición de la mezcla de digestión. Se efectuó la digestión durante 15 minutos y fue detenida; se dejo enfriar la mezcla en estudio y se le adiciono H_2O_2 para acelerar la digestión y reducir la formación de espuma. Nuevamente se mantuvo en digestión a 370°C hasta obtener un residuo translucido. Para efectuar la destilación se adiciono NaOH al 40%. El destilado se recibió en ácido bórico al 1% con indicadores y se titulo con HCl 0.01N. Para conocer el contenido de proteína se multiplico el contenido de nitrógeno orgánico por el factor 6.25.

$$\text{Proteína} = N \times 6.25$$

-
-
- **GRASA CRUDA:** Se determino por el método de Goldfisch utilizando una muestra libre de humedad. Se llevo a cabo una extracción durante 8 horas con calentamiento bajo, utilizando como solvente de extracción éter etílico.
 - **FIBRA CRUDA:** Para esta determinación se utilizo una muestra desengrasada que fue sometida a una hidrólisis ácida, empleando ácido sulfúrico al 1.25% p/v, seguida de una hidrólisis alcalina con hidróxido de sodio al 1.25% p/v. En cada caso la muestra se dejo digerir por un espacio de 30 minutos exactos y se efectúo un lavado del residuo obtenido después de cada digestión con 500mL de agua caliente.
Posteriormente el residuo fue secado en una estufa de vacío durante 6 horas y finalmente fue carbonizado a la flama de un mechero y bajo una campana e incinerado a 550°C.
 - **HIDRATOS DE CARBONO DIGERIBLES:** Fueron calculados por diferencia de 100 con el contenido en porcentaje de los otros componentes:

$$\% \text{ HC} = 100 - [\% \text{ H} + \% \text{ C} + \% \text{ P} + \% \text{ G} + \% \text{ F}]$$

5.3.2 Determinación de lignina

FUNDAMENTO

Se llevo a cabo por el método de Van Soest, el cual permite extraer los diferentes componentes de la fibra mediante el empleo de detergentes de sales cuaternarias de amonio.

Se efectúa la determinación de Fibra Detergente Ácido (FDA) empleando bromuro de cetil trimetil amonio, disolviendo así la hemicelulosa presente, obteniéndose como residuo celulosa, lignina, cutina y silica. Posteriormente se lleva a cabo la oxidación de la lignina con permanganato de potasio dejando como residuo celulosa, cutina y silica. El contenido de lignina se obtiene por diferencia gravimétrica (Tecator, 1979, Van Soest, 1982). El procedimiento completo se describe en el *Anexo I*.

5.3.3 Contenido energético

FUNDAMENTO

El contenido energético, también denominado densidad calórica, se determina empleando una bomba calorimétrica balística cuyo dispositivo determina la energía liberada por la completa oxidación del alimento (Bateman, 1970, Church and Pond, 1976). El procedimiento completo se describe en el *Anexo II*.

Adicionalmente se calculo el total de nutrimentos digeribles (TND) y la energía digerible (ED) de la vaina de cacahuanano de la siguiente manera:

$$\text{TND} = \text{CPD} + \text{CCHOD} + 2.25 \text{ CEE} + \text{CFD}$$

$$\text{ED} = \text{TND} \times 18.42$$

Donde:

TND: Total de nutrimentos digeribles expresado en g. de ND / g. de alimento

CPD: Contenido de proteína expresado como g. de proteína / g. de alimento

CCHOD: Contenido de carbohidratos digeribles expresado en g. de carbohidratos / g. de alimento.

CEE: Contenido de grasa expresado en g. de grasa / g. de alimento

CFD: Contenido de fibra digerible expresado en g. de fibra / g. de alimento.

ED: Energía digerible expresada en KJ/g

5.3.4 Glucósidos cianogénicos

FUNDAMENTO

En este método se emplea la reacción de Guignard como prueba cualitativa en la detección de glucósidos cianogénicos y de HCN, con la finalidad de cuantificar el HCN total liberado mediante una hidrólisis enzimática por medio de la enzima β -glucosidasa, del correspondiente glucósido cianogénico. El HCN liberado reacciona con el ácido pícrico contenido en una tira de papel produciendo

una coloración visible café-rojiza debido a la isopurpurina formada. Mediante este método es posible detectar cantidades del orden de 5 µg de HCN (Lucas and Sotelo, 1984). El procedimiento completo se describe en el *Anexo III*.

5.3.5 Inhibidores de tripsina

FUNDAMENTO

La técnica empleada es la propuesta por Kakade y col. la cual se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso de la muestra sobre una solución estándar de tripsina. La actividad proteolítica remanente se determina por medio de un sustrato sintético: Benzoil-arginina-p-nitroanilida (BAPNA), el cual produce una coloración debida a la producción de p-nitroanilida la cual se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm. Esta coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de tripsina de la muestra (Kakade et al, 1974). El procedimiento completo se describe en el *Anexo IV*.

5.3.6 Taninos

La determinación de taninos se llevo a cabo por dos métodos; uno consistió en el método ISO 9648 y el otro fue el método de la vainillina, debido a que en el primero de ellos se encontró un valor muy elevado de estos compuestos, y fue necesario aplicar un método más específico para confirmar el valor obtenido. Ambos procedimientos se describen en el *Anexo V*.

5.3.6.1 Método ISO 9648

FUNDAMENTO

Este método se basa en la extracción de taninos por agitación con dimetilformamida y la determinación espectrofotométrica a 525 nm después de la centrifugación y adición de citrato férrico de amonio y amoniaco al líquido sobrenadante. El contenido de taninos es obtenido mediante la realización de una curva patrón elaborada a partir de ácido tánico (Hidalgo, 1999).

5.3.6.2 Método de la vainillina

FUNDAMENTO

El método empleado está basado en el trabajo de Bates-Smith y Lerner, es un método espectrofotométrico simple, sensible y específico para leuco-antocianinas y catequinas, compuestos responsables de la astringencia en las plantas. Consiste en efectuar una extracción empleando un reactivo a base de vainillina, el contenido de taninos se obtiene a partir de una curva patrón elaborada con catequina (Bate-Smith and Lerner, 1964).

5.3.7 Lectinas

FUNDAMENTO

La determinación de lectinas, también denominadas hemaglutininas, se basa en la detección del poder aglutinante que poseen las lectinas hacia eritrocitos

sensibilizados provenientes de hamster, lavados y activados con una solución de proteasa; debido a que los glóbulos rojos de esta especie son altamente sensibles a la acción de estas glicoproteínas. Se lleva a cabo la técnica de microtitulación que consiste en realizar una serie de diluciones donde el punto final de aglutinación es determinado por medio de una estimación visual (Jaffe, et al, 1974; Lucas and Sotelo, 1993). El procedimiento completo se describe en el *Anexo VI*.

5.3.8 Fitatos

FUNDAMENTO

La técnica empleada es una determinación colorimétrica propuesta por Haug y Lantzsch. Consiste en calentar el extracto de la muestra con una solución acidificada de concentración conocida de Fe (III) en exceso, el cual es capaz de formar un complejo con el fitato. Se realiza la cuantificación del Fe (III) residual que el ácido fítico no alcanza a complejar mediante una reacción colorida con la 2,2-bipiridina, la cual se mide en el espectrofotómetro a 519 nm (Haug and Lantzsch, 1983). El procedimiento completo se describe en el *Anexo VII*.

5.3.9 Nitratos

FUNDAMENTO

La técnica empleada es la propuesta por Cataldo y col. en la cual se realiza una extracción con agua de nitratos en tejidos vegetales, seguida de una

centrifugación y desarrollo de color en el sobrenadante, por la formación de un complejo debido a la nitración del ácido salicílico, cuyo máximo de absorción se encuentra en 410 nm, en solución alcalina. El valor de absorbancia del cromóforo está relacionado en forma directamente proporcional a la cantidad de nitratos presentes en la muestra (Cataldo 1975). El procedimiento completo se describe en el *Anexo VIII*.

5.3.10 Canavanina

FUNDAMENTO

La técnica empleada es la propuesta por Fearon y Bell, que se basa en el hecho de que los compuestos que tienen un grupo guanidoxi como la canavanina, reaccionan con el reactivo específico de pentacianoaminoferrato, dando como resultado una coloración rojo-magenta al trabajar en un rango de pH de 6.5 a 7. Dicha coloración se lee espectrofotométricamente a 550 nm (Fearon and Bell, 1995). El procedimiento completo se describe en el *Anexo IX*.

5.3.11 Determinación semi-cuantitativa de alcaloides

FUNDAMENTO

El método está basado en la comparación de la cantidad de precipitado obtenido con 7 diferentes reactivos para alcaloides. El material seco y desengrasado se extrae con metanol, se alcaliniza y se efectúa una extracción

diferencial con cloroformo-etanol. Los extractos así obtenidos son ensayados con 7 reactivos para alcaloides (Abisch, 1960). El procedimiento completo se describe en el *Anexo X*.

- Reactivo de MAYER (Cloruro de mercurio y yoduro de potasio).
- Reactivo de WAGNER (Triyoduro de potasio).
- Reactivo de DRAGENDORFF (Nitrato de bismuto y yoduro de potasio).
- Reactivo de SONNENSCHNEIN (Ácido fosfomolibdénico).
- Reactivo de HAGER (Ácido pícrico).
- Reactivo de SCHEIBLER (Ácido fosfotúngstico).
- Reactivo de ÁCIDO SILICOTUGSTENICO.

5.3.12 Digestibilidad *in vitro* para rumiantes

FUNDAMENTO

Esta determinación esta basada en la simulación del proceso de digestión de los rumiantes y consiste en poner en contacto una muestra con líquido ruminal en condiciones anaerobias, se efectúa una digestión bacteriana y después se adiciona pepsina en medio ácido para permitir el desarrollo de una digestión enzimática.

Posteriormente se lleva a cabo una determinación gravimétrica de los constituyentes no digeridos de las paredes celulares para obtener finalmente la

digestibilidad de la muestra, tomando en cuenta el peso final de la misma (Bateman, 1970). El procedimiento completo se describe en el *Anexo XI*.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Parámetros físicos

Se llevó a cabo la determinación de los parámetros físicos de la vaina de cacahuanano proveniente del estado de Guerrero, en la tabla 1 se muestran los resultados.

Tabla 1

Parámetros físicos de la vaina de cacahuanano

PARÁMETRO	VALOR ^a
Peso de la vaina (g)	6.67 ± 0.30
Longitud de la vaina (cm)	18.49 ± 2.38
No. semillas en cada vaina	8 ± 2
Proporción de vaina en el fruto (%)	79.58 ± 0.59

^a Valor promedio de la determinación ± desviación estándar

Los parámetros reportados corresponden a vainas previamente secadas a 55°C durante aproximadamente 4 horas.

Los valores correspondientes al peso y longitud de la vaina, así como el número de semillas que contienen entran dentro de los rangos reportados en la literatura para esta leguminosa. (Gómez, 1955).

El porcentaje que representa la vaina en el fruto (casi el 80%) es el valor más significativo, ya que indica que hasta el momento solo se ha encontrado una utilidad para el 20% del fruto, de modo que resulta necesario efectuar estudios para aprovecharlo de forma integral.

6.2 Análisis proximal

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos del análisis proximal de las vainas de cacahuanano entre los cuales destaca un elevado porcentaje de fibra.

Tabla 2

Análisis proximal de la vaina de cacahuanano		
(g/100g. muestra)^a		
COMPONENTE	BASE HÚMEDA	BASE SECA
Humedad	5.05 ± 0.24	---
Cenizas	3.00 ± 0.05	3.15 ± 0.06
Proteína cruda (N x 6.25)	6.15 ± 0.51	6.45 ± 0.52
Grasa cruda	1.56 ± 0.32	1.64 ± 0.34
Fibra cruda	59.65 ± 0.54	62.81 ± 0.56
Carbohidratos (por diferencia)	24.56	25.86

^a Valor promedio de la determinación efectuada por triplicado ± desviación estándar

La muestra presenta bajo contenido de grasa y proteína en comparación con otras partes de la planta como son las semillas, que poseen un contenido de grasa y proteína de 21 y 44 g / 100 g de muestra respectivamente. Además ambos valores se encuentran por debajo de los requerimientos mínimos estimados para los rumiantes (9% de proteína y 2% de grasa) (Church, 1974); sin embargo, es

común obtener estos resultados en este tipo de tejido vegetal, ya que es para sostén y protección de las semillas.

El contenido de cenizas nos indica que la muestra puede contener varios minerales necesarios para la alimentación animal como son calcio, fósforo y potasio.

Debido a la alta cantidad de fibra que posee la vaina de cacahuanano se considera poco recomendable como alimento para animales monogástricos ya que podría llegar a provocar una baja asimilación de nutrientes, sin embargo, se podría considerar su uso en la alimentación de animales rumiantes, los cuales soportan grandes cantidades de fibra dentro de su dieta, que van desde un 30 hasta un 60% de fibra dependiendo del tipo de alimento y de los componentes de esta, ya que los materiales con alto grado de lignificación presentan dificultades para ser digeridos. Mas adelante se muestran resultados al respecto.

Finalmente el contenido relativamente elevado de hidratos de carbono resulta importante como posible fuente de energía, sin embargo es importante mencionar que en el caso de los rumiantes, fuentes elevadas de almidón pueden interferir en la digestión de los alimentos. (Mc Donald, et al, 1993).

6.3 Contenido energético

En la tabla 3 se muestra el valor energético de la vaina de cacahuanano determinado experimentalmente con una bomba calorimétrica, así como la energía digerible (ED) y el total de nutrientes digeribles (TND), que son términos energéticos biológicos determinados teóricamente. También se muestra la comparación con otros alimentos para rumiantes empleados comúnmente.

Tabla 3

Contenido energético, ED y TND de la vaina de cacahuanano

ALIMENTO	CONTENIDO ENERGÉTICO (KJ/g)	ENERGÍA DIGERIBLE ^b (KJ/g)	TOTAL DE NUTRIENTOS DIGERIBLES ^b (%)
Vaina de cacahuanano	19.70 ± 1.26 ^a	17.29	93
Heno de alfalfa	17.95	11.63	63
Cebada	19.21	15.31	83

^a Valor promedio de la determinación efectuada por triplicado ± desviación estándar.

^b Términos energéticos biológicos calculados teóricamente (Church and Pond, 1976)

Es importante mencionar que la cantidad de energía que obtiene el cuerpo del alimento es menor que la energía producida cuando se quema el alimento en la bomba calorimétrica. Por lo anterior fue necesario calcular otros términos

energéticos como lo es la ED, que es una medida de la energía bruta de los alimentos ingeridos menos la energía fecal, ya que el aparato digestivo de un animal es un lugar muy activo donde se excretan varios productos que se eliminan en las heces. También se determinó el TND, que nos indica el valor potencial del alimento como fuente de energía basándonos en su composición nutrimental.

La vaina de cacahuanano tiene un valor alto de EB, ED y TND en comparación con otros alimentos, también tiene un alto contenido de fibra cruda y una porción considerable de carbohidratos digeribles, principales componentes que aportan la energía bruta de la vaina, ya que el aporte otorgado por la grasa y proteína es reducido debido a los bajos niveles de estos componentes. La muestra en estudio podría ser considerada como un buen componente energético para alimentación animal.

6.4 Toxicología analítica

En la tabla 4 se presentan los resultados obtenidos al efectuar las determinaciones de los factores tóxicos y antinutricionales en las vainas de cacahuanano.

Tabla 4

Toxicología analítica de la vaina de cacahuanano^a		
FACTOR	TIPO DE COMPUESTO	CONTENIDO
Inhibidores de tripsina	Antinutricional	71.28 ± 1.52 ^b
Taninos (Adaptación al método ISO 9648)	Antinutricional	31.68 ± 0.47 ^c
Taninos (Método de la vainillina)	Antinutricional	8.16 ± 0.54 ^c
Nitratos	Tóxico	0.003 ± 0.001 ^c
Alcaloides	Tóxico	Negativo
Glucósidos cianogénicos	Tóxico	Negativo
Lectinas	Enterotoxinas	Negativo
Fitatos	Antinutricional	Negativo
Canavanina	Tóxico	Negativo

^a Valor promedio de la determinación efectuada por triplicado ± desviación estándar

^b Unidades de Tripsina Inhibida / mg. de muestra

^c g. compuesto / 100g. de muestra

De acuerdo al límite de detección de las técnicas empleadas para la determinación de glucósidos cianogénicos, lectinas, fitatos y canavanina, no se encontró una cantidad detectable de estos factores en la vaina de cacahuanano, lo que indica que su concentración no es significativa.

Existe un alto contenido de inhibidores de tripsina, de acuerdo a la técnica de Kakade y colaboradores, que podrían ser eliminados relativamente con cierta facilidad mediante un tratamiento a base de calor.

El porcentaje de nitratos detectados en la muestra es muy pequeño, de modo que no representaría problemas de toxicidad con respecto a este factor, pues solo aquellos alimentos con niveles superiores al 1% de nitratos ocasionan una intoxicación aguda en el animal (Buck and Osweiler, 1981).

El contenido de taninos presente en las vainas (superior a 30 g. de compuesto / 100 g. de muestra) resultó excesivamente alto al efectuar su determinación a través del método ISO 9648, motivo por el cual se consideró la existencia de diversos compuestos con estructura polifenólica formando parte de la muestra, de modo que fue necesario confirmar este nivel de taninos empleando un método alternativo (método de la vainillina), en el cual se determinaron los niveles de leuco-antocianinas y catequina presentes en las vainas de cacahuanano, compuestos que se consideran responsables del sabor astringente en plantas. Los resultados obtenidos por esta metodología fueron muy inferiores en comparación con la primera determinación efectuada pues el valor se redujo a

una cuarta parte, lo cual se debe a la especificidad del método, sin embargo, aún así la vaina se encuentra en los límites de aceptabilidad de este factor, considerando que alimentos que presentan un rango de taninos del 2 al 9% causan problemas fisiológicos en el animal (Roder, 2001).

Un porcentaje tan alto de taninos como el encontrado en estas vainas impediría su empleo como alimento debido a sus efectos antinutrimientales y al rechazo por parte del animal debido al sabor astringente que proporciona este tipo de compuestos.

6.5 Lignina

Debido a que se encontró un porcentaje de fibra cruda muy alto en la vaina de cacahuanano (62.81%) al efectuar el análisis proximal, fue necesario determinar el porcentaje correspondiente a lignina, ya que este se considera un material no asimilable por los rumiantes.

Se empleo el método de Van Soest, el cual se caracteriza porque permite extraer uno a uno los componentes mayoritarios de la fibra, para ello fue necesario determinar previamente la fibra detergente ácido (FDA) que representa las fracciones correspondientes a celulosa, lignina, cutina y silica, y posteriormente fue cuantificado el contenido de lignina presente en la muestra obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla 5

FDA y lignina en la vaina de cacahuanano^a (Expresado en %)	
Fibra detergente ácido (FDA)	47.50 ± 0.31
Lignina	14.84 ± 1.02

^a Valor promedio de la determinación efectuada por triplicado ± desviación estándar.

El contenido de FDA en la vaina (47.5%), es alto en comparación con alimentos como maíz, trigo y cebada que presentan valores de FDA que van de 2.2 a 5%; sin embargo, este valor puede estar justificado por el alto porcentaje de fibra presente en la muestra ya que otros alimentos como la paja contienen hasta 52.2% de FDA, de modo que se puede considerar que la vaina de cacahuanano presenta un valor promedio de FDA de acuerdo a su composición (Wiseman, 1990).

Generalmente se espera encontrar un porcentaje de FDA superior al de fibra cruda por la eficiencia del método de Van Soest con respecto al método de Weende, sin embargo, en este caso se encontró lo contrario, lo cual se debe probablemente al alto contenido de lignina en la muestra (14.84%), ya que existen reportes que indican que la digestibilidad de la pared celular (hemicelulosa principalmente) depende del grado de lignificación del material, ya que la presencia de grupos fenólicos permite la formación de enlaces con la hemicelulosa dificultando su digestión (Van Soest, 1982).

El porcentaje de lignina es muy alto en comparación con alimentos como la alfalfa y los pastos que presentan valores de 0.8 y 1.9% de lignina respectivamente. Sin embargo, existen reportes de cáscaras de cacahuate que eventualmente se utilizan en la alimentación de rumiantes con un porcentaje de lignina de hasta 28% (Ensminger, 1980), de manera que de emplearse la vaina de cacahuanano como alimento tendría que reducirse su contenido de polifenoles, tanto taninos como lignina, con algún ingrediente adecuado por simple dilución.

Es importante mencionar que al efectuar el análisis toxicológico de la vaina se encontró un contenido elevado de taninos, cuya estructura química esta formada fundamentalmente de polifenoles; por otro lado, la estructura de la lignina también esta constituida de compuestos fenólicos, de modo que existe la posibilidad de que al efectuar la cuantificación de la lignina una parte de esta corresponda a taninos por la semejanza que existe en su estructura; además existen reportes que indican que algunos taninos se precipitan durante la determinación de FDA (Van Soest, 1982). En cualquier caso, ambos compuestos afectan la digestibilidad y aprovechamiento del material.

Por otra parte, a pesar de que existen métodos que permiten llevar a cabo la deslignificación de la muestra, como son: tratamientos con alcali, extrusión o exposición a la radiación gama (Van Soest, 1982), resultaría costoso y poco práctico el empleo de la vaina de cacahuanano como alimento para rumiantes en forma directa.

6.6 Digestibilidad ruminal *in vitro*

En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos después de haber llevado a cabo la digestión *in vitro* de la vaina de cacahuanano empleando líquido ruminal de un animal fistulado. También se efectuó la digestión de alfalfa como muestra de referencia para asegurarnos que las condiciones del medio de reacción fueran las adecuadas.

Tabla 6

Digestibilidad ruminal	
MUESTRA	% DIGESTIBILIDAD ^a
Vaina de cacahuanano	42.10 ± 0.13
Alfalfa	80.49 ± 4.03

^a Valor promedio de la determinación efectuada por triplicado ± desviación estándar.

El porcentaje de digestibilidad de la vaina de cacahuanano es muy bajo en comparación con otro tipo de alimento ampliamente utilizado en alimentación animal como es el caso de la alfalfa, cuyo valor de digestibilidad fue determinado bajo las mismas condiciones de experimentación.

El bajo nivel de aprovechamiento de la muestra en estudio puede deberse a distintos factores como lo es el alto contenido de lignina presente en la vaina, ya

que se considera un material no asimilable aún por animales que presentan un sistema digestivo muy desarrollado como es el caso de los rumiantes, ya que la lignina resiste el ataque de las bacterias anaerobias presentes en el rumen; además la incrustación física de las fibras vegetales en la lignina las hace inaccesibles a las enzimas que podrían digerirlas. (McDonald, et al, 1993).

Por otra parte, es necesario considerar el valor elevado de taninos encontrados en la muestra ya que estos reducen el valor nutricional de la muestra y además impiden la libre acción de las enzimas digestivas reduciendo la absorción de los nutrientes. (Lindner, 1995).

Otro factor que podría contribuir a obtener un valor más preciso sobre la digestibilidad de la vaina sería el empleo de otras técnicas existentes como lo es la digestibilidad *in situ*, en la cual se emplea una bolsa de nylon (Church, 1977) para efectuar la digestibilidad del material en el interior de un animal fistulado, de modo que las condiciones del medio son mas estables y se reflejan en un resultado más exacto.

También puede considerarse la determinación de una digestibilidad *in vivo* de la muestra en estudio.

VII. CONCLUSIONES

- Se encontró un alto contenido de fibra cruda en la vaina de cacahuanano, (62.81%) constituida en un porcentaje considerable por lignina (14.84%).
- Se determinó un alto contenido energético debido a la alta concentración de fibra y carbohidratos, con poco aporte por la proteína y grasa.
- La concentración de proteína (6.45 %) se encuentra por debajo de los niveles registrados en otros alimentos para rumiantes (9% mínimo), lo que implica la necesidad de suplementación.
- Las vainas de cacahuanano se encuentran libres de factores tóxicos y antinutrientales intrínsecos como son alcaloides, glucósidos cianogénicos, lectinas, fitatos y canavanina, sin embargo poseen alto contenido de taninos, que dificultarían el proceso digestivo de los rumiantes.
- La alta concentración de taninos y lignina impiden el aprovechamiento de la vaina de cacahuanano en forma directa como la única fuente de alimento.
- Es necesario efectuar estudios posteriores de la vaina de cacahuanano para que pueda ser considerada como alimento para rumiantes, o bien que permitan encaminar su empleo para otros fines.

VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar una digestibilidad ruminal *in situ* y posteriormente *in vivo* de la vaina de cacahuanano.
- Mezclar la vaina de cacahuanano con otra leguminosa o cereal para aumentar su valor nutritivo y disminuir el efecto de los polifenoles.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abisch, E. and Reichstein, T. Alkaloid screening (micromethod). *Helvetica Chemica Acta*, 43, 1861-1884, (1960).
- Adrian, J., Potus, J., Poiffait, A. y Dauvillier, P. Análisis nutricional de los alimentos. Ed. Acribia, S. A., pág. 19-30, 85-87, Zaragoza (2000).
- Aguilar, R. M. Evaluación química y biológica de nuevas fuentes de alimentos para rumiantes. Tesis Fac. de Química, UNAM, México, D.F. (1978).
- Álvarez, M. Evaluación bromatológica y toxicológica de la fracción lipídica de la semilla de cacahuanano (*Gliricidia sepium*). Tesis Fac. de Química, UNAM, México, D.F. (2002).
- Bateman, J. Nutrición animal (manual de métodos analíticos). Ed. Herrero hermanos, pág 110-112, 122-131, 170-172, 269-282, México, D.F. (1970).
- Bate-Smith, E.C. and Lerner, N.H. Leuco-anthocyanins. A systematic distribution of leuco-anthocyanins in leaves. *Biochemical Journal*, 58, 32-126, (1964).
- Buck, W.B., Osweiler, G.D. Toxicología veterinaria clínica y diagnóstica. Ed. Acribia, pág. 127-141, Zaragoza (1981).
- Cataldo, D.A., Haroón, M., Schrader, L.E. and Youngs, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 6, 71-80, (1975).

-
-
- Centurion, D., Espinoza, M. y Cázares, G. Catálogo de plantas de uso alimentario tradicional en la región sierra del estado de Tabasco. SIGOLFO, pág. 7-10, Villahermosa (2000).
 - Church, D. and Pond, W. Basic animal nutrition and feeding. O & B Books, pp 14-26, 84-97, 346-355, Portland (1976).
 - Church, D. y Pond, W. Bases científicas para la nutrición y alimentación de los animales domésticos. Ed. Acribia, pág. 24-28, 57, Zaragoza (1977).
 - Church, D. Basic animal nutrition and feeding. Jonh Wiley and Sons, Inc. Vo. 1, 2 th edition, pp. 15, 31-47, 279-294, Portland (1987).
 - Church, D. El rumiante (Fisiología digestiva y nutrición). Ed. Acribia, pág. 137, 321, 322, Zaragoza (1993).
 - Church, D. Fisiología digestiva y nutrición de los rumiantes. Ed. Acribia, Vo. 3, pág. 379-386, Zaragoza (1974).
 - Chadhokar, A. *Gliricidia maculata* una leguminosa prometedor. Revista Mundial de Zootecnia 44, 36-43 (1982).
 - Derache, R. Toxicología y Seguridad de los Alimentos. Ediciones Omega, p. 109-132, 233-247, Barcelona (1990).
 - Ensminger, M.E. Manual del ganadero. Ed. El Ateneo, pág. 225-248, Argentina (1980).
 - Fearon, W.R. and Bell, E.A. Canavanine: Detection and occurrence in Colutea arborencs. Journal Biochemical, 59, 221-223, (1995).
 - Ferrando, F. Alimentos tradicionales y no tradicionales. FAO: Colección de alimentos y nutrición No. 2, pág. IX-XI, 83-130, Roma (1980).

-
- *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp. Repertorium Botanices Systematicae, 4, 679 (1942).
 - Gómez, M. E. Arbustos forrajeros utilizados en alimentación animal como fuente proteica. CIPAV, pag. 13-20, Colombia (1955).
 - Harborne, J., Boutler, D. and Turner, B. (Eds.) Chemotaxonomy of the **Leguminosae**. Academic Press, pp. 1-23, New York (1971).
 - Harlan, J.R. Las plantas y animales que alimentan al hombre. Investigación y Ciencia No. 2, 64-75 (1976).
 - Haug, W. and Lantzsch, H.J. Sensitive method for the rapid determination of phytate 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 pterocarpan from ***Gliricidia sepium***. Phytochemistry 47, 1537-1540 (1999).
 - Herlich, K. (Ed) Official methods of analysis of AOAC, 15th edition, AOAC Press, págs. 17-18, 40-62, 69-83, Harlington (1990).
 - Hernández, J.M. Manual de nutrición y alimentación del ganado, Ed. Ministerio de Agricultura, págs. 335-338, Zaragoza (1980).
 - Herrera, B.A. Desarrollo de métodos para determinar fitatos, oxalatos y su aplicación en semillas silvestres, Tesis Facultad de Química, UNAM, México. D.F. (1998).
 - Hidalgo, G.A. Adaptación y validación de métodos cuantitativos para determinar nitratos y taninos en muestras vegetales. Tesis Facultad de

-
-
- Química, UNAM, México, D.F. (1999).
- Hultin, E. and Tursell, K. alkaloid-screening of swedish plants. *Phytochemistry*, 4, 176-195 (1962).
 - Jaffe, W.G., Levy, A., González, D.I. Isolation and partial characterization of bean phytohemagglutinins. *Phytochemistry*, 13, 2685-2693, (1974).
 - Kakade, M., Rackis, J., McGhee, J. and Pusku, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. A colabotarive analysis of on improved procedure. *Cereal Chemistry*, 51, 376-382 (1974).
 - Kay, D. Legumbres alimenticias. Ed. Acribia, pág. 233, 234, 243, Zaragoza (1991).
 - Leontowics, H., Kostyra, H., Leontowics, M. and Kulash, G. The Inactivation of legume seed haemagglutinin and trypsin inhibitors by boiling. 3th. International Workshop on ANFs. In legume seeds and rapeseed. EAAP Publication No. 93, pág. 429-432, Wageningen (1998).
 - Leopold, A. and Andrey, R. Toxic substances in plant and the food habits of early man. *Sciences* 176, 512-514 (1994).
 - Lewis, D. Fisiología digestiva y nutrición de los rumiantes. Ed. Acribia, pág. 25-27, Zaragoza (1962).
 - Lindner, E. Toxicología de los Alimentos. Ed. Acribia, 2ª edición, pág. 15-19, 82-95, Zaragoza (1995).
 - Lorgue, G., Lechenet, J., Rivière, A. Toxicología Clínica Veterinaria. Ed. Acribia, pág. 169-171, Zaragoza (1997).

-
- Lucas, B., Guerrero, A., Sigales, L. and Sotelo, A. True protein content and non-protein amino acid in legume seeds. *Nutrition Reports International*, 37, 545-553 (1988).
 - Lucas, B. Estudio químico y toxicológico de la semilla de cacahuanano (*Gliricidia sepium*). Tesis de maestría, E.N.C.B. del IPN, pág. 62, 79-123, México, D.F. (1985).
 - Lucas, B. and Sotelo, A. A simplified test for the quantitation of cyanogenic glucosides in wild and cultivated seeds. *Nutrition Reports International*, 29, 711-719, (1984).
 - Martínez, B. y Rincón, F. Inhibidores de tripsina II: Efectos del procesado y métodos de determinación. *Alimentaria*, 279 (Ene-Feb): 33-38 (1997).
 - Martínez, M. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Ed. Fondo de Cultura Económica, pág. 193, 1122, México, D.F. (1987).
 - Martínez, M. Plantas útiles de la flora mexicana. Ed. Botas, pág. 499-500, México, D. F. (1959).
 - Martínez, A. Evaluación bromatológica y toxicológica de la fracción proteínica de la semilla de cacahuanano (*Gliricidia sepium*). Tesis Fac. de Química, UNAM, pág. 6, 66-85, México, D.F. (2001).
 - Martínez, V.J. Producción, composición y digestibilidad del ensilado de maíz-girasol para alimentación de rumiantes. Tesis Maestría, UNAM, pág. 17-25, México, D.F. (1993).

-
- McDonald, P., Edwards, R., Greenhalgh, J.F.D. Nutrición animal. Ed. Acribia, pág. 26, 108-109, 163, 401, Zaragoza (1993).
 - Moreno, E. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Instituto de Biología, UNAM, pág. 250-274, México, D.F. (1984).
 - Muller, H. y Tobin, G. Nutrición y ciencia de los alimentos. Ed. Acribia, pág. 73-77, Zaragoza (1992).
 - Nochebuena, G. y O'Donovan, B. Valor nutritivo del forraje rico en proteínas de *Gliricidia sepium*. Revista Mundial de Zootecnia, 57, 48-49 (1986).
 - Pedraza, O. Cervantes, R. y Pazos, G. Presencia de algunos factores "antinutritivos" en la harina de follaje de *Gliricidia sepium* con diferentes edades de rebrote. Red. Prod. Anim. 8(1), 49-51 (1994).
 - Petzke, K., Ezeagu, I., Proll, J., Akinsoyinu, A. and Metges, C. Amino acid composition, available lysine content and *in vitro* protein digestibility of selected crop seeds. Plant Foods Human Nutrition, 50, 151-162 (1997).
 - Rachie, O. And Brenan, J. Tropical Legume: Resources for the future. National Academy of Sciences Press. pág. 117, Washington, D.C. (1979).
 - Ramamoorthy, M. and Paliwal, K. Allelopathic compounds in leaves of *Gliricidia sepium* (Jack.) and effect on *Sorghum vulgare* (L.). Journal of Chemical Ecology, 19, 1691-1701 (1993).
 - Roder J. D. Veterinary Toxicology. Ed. Butterworth Heinemann, pág. 138-143, 205-207, 221-223, 255-258, USA (2001).

-
- Rosenthal, G., Dahlman, L., Crooks, P., Na Phuket, S. and Trifonov, L. Insecticidal properties of some derivatives of L-canavanine. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 43, 2728-2734 (1995).
 - Rosenthal, W. Preparation and colorimetric analysis of L-canavanina. *Analytical Biochemistry* 77(1) 147-151 (1977).
 - Sinha, S. Las leguminosas alimenticias (su distribución, su capacidad de adaptación y biología de sus rendimientos). FAO: Colección de producción y protección vegetal No.3, pág. 1-12, 19-79, Roma (1978).
 - Smartt, J. Grain legumes: evolution and genetic resources. Cambridge University Press, pp. 3-8, Cambridge (1990).
 - Smith, O. El forraje de árboles y arbustos como alimento para el ganado en los trópicos. FAO: colección de mejores cultivos No. 42, pág. 13-14, 30-49, Roma (1996).
 - Sotelo, A., Lucas, B., Blanc, F. and Giral, F. Chemical composition of seeds of *Gliricidia sepium*. *Nutritional Repertory International*, 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, pág. 41, 52, 96, 119, México, D.F. (1995).
 - Tecator, Inc. The determination of permanganate lignin, cellulose, insoluble ash and silica with the Tecator Fibertec System. Tecatopic No. 41, Colorado (1979).

-
-
- Tejada, I. Manual de laboratorio para análisis de ingredientes utilizados en la alimentación animal. SARH Patronato de apoyo a la investigación y explotación pecuaria en México., A.C. pág. 272-281, México, D.F. (1985).
 - Valle, V. P. Toxicología de Alimentos. OPS-OMS, 2ª edic., Edo. De Méx., pág. 6, 17 (1991).
 - Van Soest, P. J. Nutritional Ecology of the Ruminant. Cornell University Press, pág. 82-84, 120-122, 127-132, EUA (1982).
 - Wiseman, J., Cole, D. J. A. Feedstuff Evaluation. Ed. Butterworths, pág. 173, U.K. (1990).

ANEXOS

ANEXO I

Contenido energético

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mecha de algodón de 75 mm de longitud.
- Bomba calorimétrica balística GALLENKAMP, mod. CBB-330-010L.
- Ácido benzoico (valor calórico certificado).

PROCEDIMIENTO

1. Pesar de 0.4 a 1.5 g. de muestra finamente molida.
2. Colocar la muestra en un crisol previamente tarado junto con la mecha de algodón. El hilo debe quedar introducido dentro de la muestra sobrando un tramo que servirá para contactar con el alambre de ignición de la bomba.
3. Compactar la muestra con el mango metálico para que quede lo mas uniforme posible.
4. Colocar el crisol en la base superior del pilar central de la bomba.
5. Introducir la punta suelta de la mecha de algodón en el alambre de ignición.
6. Cerrar herméticamente.
7. Colocar el sensor del termopar en el orificio del capuchón de la bomba calorimétrica.
8. Teniendo suministro de oxígeno a presión (cilindro con mínimo 30 bars), se procede a abrir la válvula de paso girando de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ la

perilla hasta obtener una presión dentro de la bomba balística de 25 bars en aproximadamente 20 a 30 segundos.

9. Cerrar la válvula de paso y ajustar el galvanómetro a cero.
10. Si las condiciones anteriores se mantienen por aproximadamente 10 segundos, oprimir el botón de ignición, llevándose a cabo la combustión en 10 a 15 segundos.
11. La lectura máxima obtenida en el galvanómetro, es directamente proporcional al calor liberado en la combustión.
12. Tomada la lectura se abre la válvula de salida de los gases de combustión.
13. Desconectar el termopar del capuchón.
14. Abrir la bomba.
15. Cerrar la válvula de liberación de gases.
16. Enfriar el capuchón de la bomba en un baño de agua fría hasta temperatura ambiente.

Curva patrón

Para calcular la densidad calórica de la muestra, se realizó una curva de calibración y referencia, para lo cual se efectuó la combustión de diferentes pesos de ácido benzoico y se anotó la respectiva lectura de la escala del galvanómetro. Se recomienda pesar entre 0.1 a 0.7 g. de ácido benzoico (valor calórico certificado); además, es necesario llevar a cabo la combustión exclusiva de la mecha de algodón, ya que el valor obtenido se debe restar, o la escala del galvanómetro se puede ajustar para obtener la lectura en forma directa.

La determinación se realizó por triplicado, y una vez obtenida la lectura, se convirtió a unidades energéticas, para lo cual tenemos las siguientes conversiones:

$$1 \text{ g. de ácido benzoico} = 26\,454.3 \text{ Joules} = 26.45 \text{ KJ}$$

$$4.1868 \text{ Kjoules} = 1 \text{ Kcaloria}$$

Se traza la curva estándar de contenido calórico (abscisas) vs. lectura del galvanómetro (ordenadas) y se obtiene por interpolación la densidad calórica de la muestra.

CÁLCULOS

Las siguientes formulas permiten estimar teóricamente algunos términos energéticos biológicos, basándonos en la determinación proximal efectuada.

$$\text{TND} = \text{CPD} + \text{CCHOD} + 2.25 \text{ CEE} + \text{CFD}$$

$$\text{ED} = \text{TND} \times 18.42$$

Donde:

TND: Total de nutrimentos digeribles expresado en g. de ND / g. de alimento.

CPD: Contenido de proteína expresado como g. de proteína / g. de alimento.

CCHOD: Contenido de carbohidratos digeribles expresado en g. de carbohidratos / g. de alimento.

CEE: Contenido de grasa expresado en g. de grasa / g. de alimento.

CFD: Contenido de fibra digerible expresado en g. de fibra / g. de alimento.

ED: Energía digerible expresada en KJ/g.

ANEXO II

Determinación de lignina

MATERIAL Y REACTIVOS

- Cisoles Tecator para Fibertec de vidrio de porosidad 2P con 25 mL de capacidad .
- Solución Ácido Detergente **(1)**.
- Solución de Lignina **(2)**.
- Solución Desmineralizante **(3)**.
- Solución buffer de fosfatos pH = 7 **(4)**.

(1) Solución Ácido Detergente (SAD): Adicionar 20 g. de bromuro de cetil trimetil amonio en 1 litro de ácido sulfúrico 1N.

(2) Solución de Lignina (SL): Adicionar 2 partes de solución saturada de permanganato de potasio (KmnO_4) en una parte de buffer de fosfatos pH = 7. La solución debe presentar una coloración rojo claro y tiene un tiempo de vida media de 1 semana en condiciones de refrigeración.

(3) Solución Desmineralizante (SD): Mezclar perfectamente 50 g. de ácido oxálico dihidratado, en 700 mL de etanol al 95%, 50 mL de

ácido clorhídrico concentrado (12N aproximadamente) y 250 mL de agua destilada.

- (4)** Solución buffer de fosfatos pH = 7: Disolver 2.78 g. de NaH_2PO_4 en 100 mL de agua destilada. Por separado disolver 7.17 g. de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua destilada.

Se toman 39 mL de la solución de fosfato monobásico y se mezclan con 61 mL de la solución de fosfato dibásico dodecahidratado. Se revisa el pH y se ajusta de ser necesario con NaOH y H_3PO_4 . Se almacena a temperatura ambiente.

PROCEDIMIENTO

La determinación se realiza por triplicado y además es necesario llevar a cabo 2 procedimientos, uno para la determinación de la Fibra Detergente Ácido (FDA) y otro para la oxidación de la lignina, de modo que se requieren 6 muestras del alimento o material en estudio.

DETERMINACIÓN DE FDA

1. Pesar 1 g. de muestra seca finamente molida, desengrasada sobre un vaso de Berzelius.
2. Adicionar 100 mL de Solución Ácido Detergente (SDA).
3. Calentar lentamente hasta ebullición en un aparato de digestión de fibra.
4. Efectuar la digestión durante 60 minutos.

-
5. Posteriormente filtrar en un Buchner que tenga un filtro de porosidad 2 (2P).
 6. Lavar 3 veces con agua caliente y 2 veces con acetona.
 7. Secar durante 8 horas a 100°C.
 8. Pesar (*Fracción A*).
 9. Calcinar durante 3 horas a 500°C en un crisol de porcelana a peso constante.
 10. Registrar el peso (*Fracción B*).

CÁLCULOS:

Se determina el porcentaje de FDA en la muestra:

$$\% \text{ FDA} = \frac{\text{Fracción A} - \text{Fracción B}}{\text{Peso de la muestra seca}} \times 100$$

(FDA = Celulosa + lignina + cutina + sílica)

OXIDACIÓN DE LIGNINA

Se procede igual que en la determinación de FDA, desde el punto número 1 hasta el punto 8.

Una vez que se tiene la muestra seca se realiza lo siguiente:

1. Adicionar 25 mL de Solución de Lignina (SL) y agitar.

-
2. Efectuar una extracción en reposo a temperatura ambiente durante 90 ± 10 minutos (debe observarse una solución de coloración roja durante todo el tiempo).
 3. Filtrar.
 4. Adicionar 25 mL de solución desmineralizante (SD) y agitar esporádicamente.
 5. Filtrar después de 5 minutos y repetir el tratamiento con la solución desmineralizante hasta que la fibra presente una coloración blanca.
 6. Lavar 2 veces con etanol al 80% y 2 veces con acetona.
 7. Secar durante 8 horas a 100°C .
 8. Pesarse para obtener la cantidad de celulosa, cutina y sílica (*Fracción C*)

CÁLCULOS:

Se determina el porcentaje de lignina presente en la muestra de la siguiente manera:

$$\% \text{ Lignina} = \frac{\text{Fracción A} - \text{Fracción C}}{\text{Peso de la muestra seca}} \times 100$$

ANEXO III

Glucósidos cianogénicos

MATERIAL Y REACTIVOS

- Tubos de cultivo con tapón de rosca PYREX # 9825 y # 9826.
- Solución de KCN equivalente a 100 μg HCN / mL (24.1 mg KCN / 100mL).
- Solución de picrato de sodio alcalinizada **(1)**.
- Solución de β -glucosidasa con activador **(2)**.
- Papel indicador de HCN **(3)**.

(1) Se disuelven 2.5 g. de ácido pícrico en agua destilada y enseguida 12.5 g. de carbonato de sodio. Se afora a un volumen de 500 mL con agua destilada.

(2) Disolver 0.25 g. de β -glucosidasa (250mg) en una solución buffer de fosfatos a pH 7.0 agitando suavemente para evitar la formación de espuma. Ya disuelta la enzima, se adicionan 1.7 g. de NaNO_3 , el cual actúa como activador de dicha enzima; todo lo anterior se lleva a un volumen de 250 mL con el mismo buffer para obtener una concentración de 1 mg de β -glucosidasa / mL y 0.08 M de NaNO_3 .

(3) El papel Whatman # 2 se sumerge en una solución de picrato de sodio alcalinizada, se deja escurrir y se pone a secar en una estufa a

temperatura de 55-60°C durante 30 minutos. Finalmente se cortan tiras de un tamaño de 2 x 10 cm.

PROCEDIMIENTO

a) Determinación cualitativa

1. Colocar en un tubo de cultivo Pyrex de 20-500 mg de muestra, dependiendo del contenido aproximado de glucósidos cianogénicos (de no conocer esta información se coloca la cantidad máxima de 500 mg de muestra).
2. Adicionar 5 mL de la solución de β -glucosidasa fría.
3. Homogeneizar y colocar la tira de papel indicador humedecida (con aproximadamente 8 gotas de agua) en la boca del tubo y cerrar herméticamente con un tapón de rosca.
4. Poner en baño María durante 4 horas a una temperatura de $40 \pm 1^\circ\text{C}$ con una velocidad de agitación de 3.5 oscilaciones / minuto.
5. Sacar los tubos del baño María y colocarlos en el congelador durante 30 minutos.
6. Sacar los tubos y destaparlos para adicionarles 1mL de HCl 0.5N (frío).
7. Cerrar herméticamente.
8. Homogeneizar evitando que el líquido toque el papel indicador.
9. Colocar en la estufa por 15 minutos a una temperatura de 60°C.
10. Retirar de la estufa y realizar visualmente la detección cualitativa. Aquellos tubos que no muestren una ligera coloración café-rojiza en

el papel indicador son considerados negativos, mientras que aquellos tubos que muestran aunque sea una leve coloración se consideran positivos y se realiza su detección cuantitativa.

b) Determinación cuantitativa

1. Tomar el papel indicador y colocarlo en un tubo de cultivo Pyrex.
2. Adicionar 20 mL de agua destilada.
3. Tapar y agitar vigorosamente (durante 2-5 minutos) con el fin de extraer el pigmento de isopurpurina del papel indicador en el agua.
4. Una vez extraído el pigmento se recupera el solvente (agua), eliminando los residuos de papel mediante filtración rápida.
5. Colocar la solución filtrada en la celda para su lectura en el espectrofotómetro a 520 nm, ajustando antes a 100% de transmitancia con el blanco de la muestra.

c) Curva patrón

1. Tomar 0.0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 0.6 mL de solución estándar de KCN cuya concentración es equivalente a 100 μ g HCN / mL y colocarlos en tubos de cultivo Pyrex. Las concentraciones de HCN son: 0.0 para el blanco, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0 y 60.0 μ g de HCN respectivamente.
2. Adicionar 500 mg de fécula de maíz comercial.
3. Adicionar 5.0 mL de solución buffer de fosfatos pH 7.0.

-
4. Homogeneizar y colocar la tira de papel indicador humedecida en la boca del tubo y cerrar herméticamente con un tapón de rosca.
 5. Poner en baño María durante 4 horas a una temperatura de $40 \pm 1^{\circ}\text{C}$ con una velocidad de agitación de 3.5 oscilaciones / minuto.
 6. Sacar los tubos del baño María y colocarlos en el congelador durante 30 minutos.
 7. Sacar los tubos y destaparlos para adicionarles 1mL de HCl 0.5N (frío)..Cerrar herméticamente.
 8. Homogeneizar evitando que el líquido toque el papel indicador.
 9. Colocar en la estufa por 15 minutos a una temperatura de 60°C .
 10. Retirar de la estufa para realizar su detección cuantitativa.
 11. Tomar el papel indicador y colocarlo en un tubo de cultivo Pyrex.
 12. Adicionar 20 mL de agua destilada.
 13. Tapar y agitar vigorosamente (durante 2-5 minutos) con el fin de extraer el pigmento de isopurpurina del papel indicador en el agua.
 14. Una vez extraído el pigmento se recupera el solvente (agua), eliminando los residuos de papel mediante filtración rápida.
 15. Colocar la solución filtrada en la celda para su lectura en el espectrofotómetro a 520 nm, ajustando antes a 100% de transmitancia con el blanco de la curva patrón (0.0 mL de la solución estándar de KCN).

CÁLCULOS

Trazar la curva patrón usando los valores de absorbancia en las ordenadas y las respectivas concentraciones de HCN en μg en las abscisas. Se interpola el valor de absorbancia de la muestra en la grafica y se obtiene así el contenido de HCN liberado en μg .

ANEXO IV

Inhibidores de tripsina

REACTIVOS

- Hidroximetil-amino-metano (TRIS)
- Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida-HCl (BAPNA)
- Solución amortiguadora de TRIS pH 8.2 / 0.05M (1)
- Solución BAPNA preparada el mismo día (2)
- Solución estándar de tripsina 20 µg/mL (3)

(1) Se pesan 6.05 g de TRIS y 2.94 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y se disuelven en 900 mL de agua destilada. Se ajusta el pH a 8.2 y se afora a 1 L.

(2) Se pesan 100 mg de BAPNA, se disuelven en 2.5 mL de dimetil-sulfóxido y se diluye a 250 mL con amortiguador TRIS previamente calentado a 37°C.

(3) Pesar con mucha exactitud 4 mg de tripsina bovina SIGMA #T-8253 y se disuelven en 200 mL de HCl 0.001N.

PROCEDIMIENTO

a) Preparación del extracto

1. Pesar 1 g de muestra finamente molida y desengrasada y adicionarle 45 mL de NaOH 0.01N, ajustar el pH de la suspensión a 9.6 ± 0.2 y aforar a 50 mL.
2. Agitar la suspensión mecánicamente durante 2.5 horas a 300 r.p.m.

3. Dejar en reposo a la suspensión por ½ hora y, por decantación, obtener el sobrenadante eliminando el residuo insoluble.
4. Diluir el sobrenadante hasta que 1 mL del mismo produzca una inhibición de 40-60% (esto es indispensable para reducir la desviación estándar relativa).

b) Determinación de la actividad

La tabla siguiente presenta el modo de preparación de la serie de tubos necesaria para determinar la actividad inhibidora de la muestra.

Clave	Extracto (mL)	Agua (mL)	Std. Tripsina a 37°C (mL)	Ácido acético 30%		BAPNA a 37°C (mL)		Ácido acético 30%
B1	1.8	0.2	2.0	1 mL	Baño a 37°C 10 min.	5	Baño a 37°C exactos	---
1	1.8	0.2	2.0	---		5		1 mL
B2	1.4	0.6	2.0	1 mL		5		---
2	1.4	0.6	2.0	---		5		1 mL
B3	1.0	1.0	2.0	1 mL		5		---
3	1.0	1.0	2.0	---		5		1 mL
B4	0.6	1.4	2.0	1 mL		5		---
4	0.6	1.4	2.0	---		5		1 mL
BR	0	2.0	2.0	1 mL		5		---
R	0	2.0	2.0	---		5		1 mL

Mezclar perfectamente el contenido de los tubos después de cada adición.

Detener la reacción enzimática por la adición del ácido acético al 30%, el cual debe ser homogeneizado inmediatamente. Si se enturbia o se forma un precipitado en el tubo de ensayo tras la adición del ácido acético, filtrar el contenido a través del papel filtro Whatman #1, y verificar la transparencia del filtrado.

Realizar la lectura del espectrofotómetro a 410 nm para cada una de las alícuotas del extracto, ajustando previamente el aparato al cero de absorbancia con su respectivo blanco.

CÁLCULOS

- Pasar la lectura de absorbancia a unidades de tripsina, $U.T. = A \times 100$.
- Obtener los valores de unidades de tripsina inhibidas (U.T.I.) restando al dato de referencia (tubo con 0.0 mL de extracto) cada uno de los tubos con alícuotas del extracto y pudiéndose calcular el valor de U.T.I. / mL de cada una de las alícuotas.
- Trazar una gráfica de actividad enzimática inhibitoria (U.T.I. / mL) contra el volumen del extracto. Si se observa una correlación lineal negativa significativa ($r \geq 0.9$), el valor extrapolado es el valor más cercano a la actividad inhibitoria real.
- Reportar las unidades de inhibición con respecto a 1 mg de muestra (U.T.I. / mg muestra).

ANEXO V

Taninos

Método ISO 9648

REACTIVOS

- Solución estándar de ácido tánico **(1)**.
- Amoniac **(2)**.
- Dimetilformamida al 75% v/v (DMF).
- Citrato férrico de amonio **(3)**.

(1) Disolver 0.2 g. de ácido tánico en 100 mL de agua desionizada.

(2) Disolver 0.232 g. de hidróxido de amonio y aforarlos a 100 mL con agua desionizada.

(3) Preparado 24 horas antes de usarse 0.35 g. de citrato férrico de amonio aforados en 100 mL de agua desionizada.

PROCEDIMIENTO

1. Se pesan de 0.3 a 1 g. de muestra finamente molida y desengrasada.
2. Extraer con 20mL de DMF con agitación magnética por 1 hora.
3. Transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL, enjuagando con 3 mL de la solución de DMF y llevar a la marca de aforo con este reactivo.

4. Transferir al tubo de centrifuga y efectuar una centrifugación por 10 minutos a 2700 r.p.m.
5. Decantar el sobrenadante que debe homogenizarse.
6. Tomar 3 alícuotas del sobrenadante y efectuar lo siguiente:

Tubo	Extracto (mL)	Agua (mL)	Citrato férrico amoniacal (mL)	Amoniaco (mL)		
1 blanco	1	6	1	0	Incubación 30 ± 1°C 10 ± 1 min.	Lectura a 525nm
2	1	5	1	1		
3	1	5	1	1		

Mezclar perfectamente el contenido de los tubos después de cada adición.

CÁLCULOS

Para efectuar los cálculos es necesario elaborar una curva patrón que presente una concentración de 80 a 560 µg de ácido tánico; para ello se preparan 7 matraces volumétricos de 25 mL y se adicionan 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 mL respectivamente de solución estándar de ácido tánico y se lleva a la marca de aforo con dimetilformamida; obteniéndose una escala de 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 mg de ácido tánico.

Enseguida se elabora la curva estándar que tenga una concentración de 0 a 560 µg de ácido tánico como se muestra en la siguiente tabla:

Tubo	Solución de ácido tánico de 2-14mg (mL)	Agua (mL)	Citrato férrico amoniacal (mL)	Amoniaco (mL)		
0 blanco	*	5	1	1	Incubar a 30±1°C 10±1 min.	Lectura a 525 nm
1	1	5	1	1		
2	1	5	1	1		
3	1	5	1	1		
4	1	5	1	1		
5	1	5	1	1		
6	1	5	1	1		
7	1	5	1	1		

* Adicionar 1mL de DMF al 75%.

El contenido de cada uno de los tubos debe mezclarse perfectamente después de cada adición.

El contenido de taninos se obtiene mediante la ecuación de la línea recta correspondiente a los datos de la curva patrón y se reporta como % de ácido tánico.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Método de la vainillina

REACTIVOS

- Solución A: HCl concentrado en metanol al 8% v/v.
- Solución B: Vainillina en metanol al 4% m/v.
- Solución vainillina-HCl **(1)**.
- Solución estándar de catequina **(2)**.

(1) Se mezclan volúmenes iguales de la solución A y la solución B justo antes de llevar a cabo la reacción.

(2) Disolver 40 mg. de catequina en 100 mL de metanol.

PROCEDIMIENTO

1. Se pesan 200 mg. de muestra finamente molida y desengrasada.
2. Adicionar 50 mL de metanol (R.A.).
3. Colocar a temperatura constante en un rango de 24 a 32°C durante 24 horas.
4. Agitar y permitir la sedimentación.
5. Tomar 1 mL del sobrenadante y colocarlo en un tubo de ensayo.
6. Adicionar 5 mL del reactivo de vainillina-HCl.
7. Agitar y esperar 20 minutos.
8. Leer en el espectrofotómetro a 500 nm.

Elaborar una curva estándar que tenga una concentración de 0 a 0.04 mg de catequina como se muestra en la siguiente tabla:

Tubo	Solución estándar de catequina 0.4mg/mL (mL)	Metanol (mL)		
0 blanco	0.0	10	Adicionar 5mL de solución vainillina-HCl y esperar 20 min.	Lectura a 500 nm
1	0.1	9.9		
2	0.2	9.8		
3	0.3	9.7		
4	0.4	9.6		
5	0.5	9.5		
6	0.6	9.4		
7	0.7	9.3		
8	0.8	9.2		
9	0.9	9.1		
10	1.0	9.0		

El contenido de cada uno de los tubos debe mezclarse perfectamente después de cada adición.

Empleando la ecuación de la línea recta obtenida con los datos de la curva patrón, se determina el contenido del compuesto y se reporta como % de taninos.

ANEXO VI

Lectinas

MATERIAL Y REACTIVOS

- Microdilutor de 50 μ L MICROTITER KIT.
- Pipeta de gota de 50 μ L de DYNATECH.
- Microplaca tipo ELISA fondo "V"
- Pipeta automática de 12 canales LABSYSTEMS.
- Tubos capilares con solución anticoagulante de heparina.
- Solución anticoagulante (heparina).
- Sangre de hámster sensibilizada.
- Pronasa de *S. griseus* SIGMA P-5147 al 0.2% en solución salina.

PROCEDIMIENTO

a) Preparación del extracto de la muestra

1. Pesar 1 g. de muestra finamente molida y desengrasada (grasa <5%), adicionar 10 mL de solución salina al 1% y extraer con agitación magnética por 2 horas a 300 r.p.m. a temperatura ambiente.
2. Centrifugar el extracto a 1400 r.p.m. durante 15 minutos; eliminar el residuo insoluble y filtrar el sobrenadante a través de un filtro de vidrio de poro grueso.

-
-
3. De ser necesario, lavar el residuo con solución salina al 1% y aforar el filtrado a 10 mL con la solución salina.

b) Preparación de sangre

1. Realizar el sangrado vía ocular a un hámster.
2. Colocar la sangre en un matraz pequeño que contenga solución anticoagulante y homogeneizar con suavidad.
3. Trasvasar la sangre con anticoagulante a los tubos de centrifuga, lavar y centrifugar 3 veces con solución salina al 0.9% a 1500 r.p.m. durante 10 minutos. Debe existir una relación aproximada sangre-solución salina de 1:5.
4. Una vez efectuado el último lavado, el sobrenadante debe ser transparente para medir en el tubo de centrifuga la cantidad del paquete de eritrocitos que se diluyen al 4%. Para ello, se adicionan 24 mL de solución salina por cada mL de glóbulos rojos.

c) Sensibilización de los glóbulos rojos

1. Por cada 10 mL de suspensión de glóbulos rojos al 4%, se adiciona 1 mL de solución de proteasa y se incuba a 37°C durante 1 hora.
2. Se centrifuga para eliminar por completo la enzima sobrenadante y se hacen 3 lavados con solución salina al 0.9% centrifugando a 1500 r.p.m. por 10 minutos.

-
-
3. Ya efectuado el último lavado se resuspende el paquete de eritrocitos para diluirlos al 5% . Para ello, por cada mL del paquete de eritrocitos sensibilizados, se adicionan 19 mL de solución salina.
 4. Si se observa que la sangre tiene algunos coágulos, se filtra a través de una gasa en un embudo de tallo corto.

d) Ajuste de la suspensión de eritrocitos

1. Tomar 1 mL de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizados y mezclar con 4 mL de solución salina al 0.9%. Ajustar el espectrofotómetro a 100% de transmitancia empleando solución salina como blanco y leer a 620 nm.
2. Diluir la suspensión hasta que la lectura sea de $25\% \pm 1$ de transmitancia. Al final, la suspensión debe quedar al 4% y debe dar una lectura de transmitancia en el espectrofotómetro a 620 nm.

e) Preparación de placas

1. Colocar 50 μ L de solución salina al 0.9% en cada pozo de las placas tipo "V" del microtiter empleando para ello una pipeta automática de 12 canales.
2. Tomar 50 μ L del extracto de la muestra con un microdilutor y colocarlos en el primer pozo. El microdilutor se gira y se saca del pozo, para introducirlo en el siguiente, de tal forma que se van llevando a cabo las diluciones del extracto.

-
-
3. Empleando el pipeteador de gota se adicionan 50 μ L (1 gota) de eritrocitos sensibilizados en cada pozo de las diluciones. Se rota la placa en forma circular y se incuba a 37°C durante 1 hora.

LECTURA

Una vez transcurrido el tiempo, se coloca la placa, sin agitar, en el dispositivo de lectura. Se observa a través del espejo el fondo de los pozos de cada una de las hileras de prueba.

Se considera positivo aquel pozo que presente una turbidez de eritrocitos (aglutinación) en todo el pozo, mientras que aquel pozo que presente un botón de sedimentación de eritrocitos en el centro se considera negativo.

Se reporta el título de la determinación que corresponde al pozo de la máxima dilución que presenta prueba positiva de aglutinación.

ANEXO VII

Fitatos

REACTIVOS

- Sulfato férrico de amonio·12H₂O.
- Ácido tioglicólico.
- Fitato de sodio.
- Solución férrica **(1)**
- Solución de 2,2-bipiridina **(2)**
- Solución estándar de fitatos 1.5 mg / mL **(3)**

(1) Pesar 0.2 g de sulfato férrico de amonio·12H₂O, disolver en 100 mL de HCl 0.2N y aforar a 1 L con agua desionizada.

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

(3) Se utiliza la sal sódica del ácido fítico la cual tiene una pureza del 94% y una humedad del 8.3%; por lo que hay que pesar 0.1714 g de fitato de sodio y aforar a 100 mL con agua desionizada).

PROCEDIMIENTO

1. Pesar de 0.04-0.12 g de muestra finamente molida y desengrasada, y adicionarle 20 mL de HCl 0.2N, para someterla durante 20 minutos a una agitación mecánica a temperatura ambiente.

-
2. Después, centrifugar el extracto a 3000 r.p.m. a temperatura ambiente durante 15 minutos y coleccionar el sobrenadante.
 3. Tomar una alícuota de 1 mL del extracto de la muestra, colocarla en un tubo de ensayo, adicionarle 1 mL de solución férrica y taparla con una canica.
 4. A partir de este momento, para la corrida del blanco y de los estándares, tomar 1 mL de agua (para el blanco), o de cada uno de los estándares (3-30 $\mu\text{g P / mL}$) y seguir con el resto del análisis desde el paso anterior.
 5. Poner los tubos en un baño de agua a ebullición por 30 minutos cuidando que el agua cubra por completo el nivel del líquido en el interior de los tubos.
 6. Esperar que los tubos se enfríen, para que a temperatura ambiente se agreguen 2 mL de solución de 2,2-bipiridina, y mezclar perfectamente el contenido.
 7. Medir la absorbancia a 519 nm a los 30 segundos exactos tras haber agregado la solución de 2,2-bipiridina a cada tubo.
 8. Utilizar una celda con agua desionizada para calibrar el espectrofotómetro en cero y después leer la absorbancia del blanco, la de las muestras y la de los estándares. Restar cada una de las absorbancias por separado al blanco para obtener la absorbancia corregida de cada tubo.

CÁLCULOS:

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

La molécula de fitato de sodio y la de ácido fitico contienen 6 átomos de fósforo, cuyo peso molecular es de 30.97 g / mol, por lo que: $6 \times 30.97 = 185.82$ g de P / mol. Los pesos moleculares del ácido fitico y del fitato de sodio son de 660 g / mol y 923.8 g / mol respectivamente.

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

Tubo	Solución estándar (301.72 µg P/mL) (mL)	Aforar (mL)	Concentración final µg P/mL
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

Elaborar una curva patrón con los datos de absorbancia contra concentración de los estándares; se calcula la regresión lineal y se obtiene la

ecuación de la recta para interpolar el valor de absorbancia obtenido para cada problema así como la concentración correspondiente.

Formula de la ecuación de la recta: $y = mx + b$
 $X = (y-b) / m$

Donde:

x= fósforo del ácido fítico ($\mu\text{g/mL}$)

y = absorbancia de la muestra

b = ordenada al origen

m = pendiente de la recta

$$\% \text{ ácido fítico} = \frac{(\text{PM ácido fítico} \times \text{P ácido fítico}) / 6\text{P}}{\text{Peso muestra} \times 1000}$$

Donde:

% ácido fítico = gramos de ácido fítico en 100 g de muestra

PM del ácido fítico = 660.08 $\mu\text{g/mol}$

P del ácido fítico = fósforo del ácido fítico ($\mu\text{g/mL}$)

6P=185.82 $\mu\text{g/mol}$ (equivalente a 6 veces el peso de la molécula del fósforo)

Peso de la muestra = gramos de muestra

ANEXO VIII

Nitratos

REACTIVOS

- Solución patrón de nitrato (nitrato de potasio R.A.) de 10 mg / mL.
- Solución de ácido salicílico (R.A.) al 5% m/v en H₂SO₄ concentrado.

PROCEDIMIENTO

1. Realizar la determinación por triplicado.
2. Pesar de 0.1 a 0.5 g. de muestra finamente molida y desengrasada para triturarla en un mortero con 25 mL de agua destilada y 0.45 g. de carbón activado, hasta obtener una papilla homogénea.
3. Transferir cuantitativamente a un tubo de centrifuga enjuagando con agua destilada para llegar a un volumen final de 30 mL y centrifugar 1 hora a 2700-3000 r.p.m.
4. Se decanta el sobrenadante y se filtra con vacío utilizando papel Whatman # 542.
5. Homogeneizar el extracto de la muestra y trabajar de la siguiente manera:

Tubo	Extracto (μL)	Solución de ácido salicílico (mL)		Solución de NaOH (mL)		
1 Blanco	100	*	Incubar a 30°C 20±1min.	9.5	Incubar a 30°C 15±1min.	Lectura a 410nm
2	100	0.4		9.5		
3	100	0.4		9.5		
4	100	0.4		9.5		

* Adicionar 0.4mL de H₂SO₄ concentrado.

El contenido de cada uno de los tubos debe mezclarse perfectamente después de cada adición.

CÁLCULOS

1. Para conocer el contenido de nitratos en la muestra es necesario elaborar una curva patrón con escala de concentraciones de 6-60 μg. de nitrato.
2. A un tubo de centrifuga se le adicionan 3 mL de solución patrón de nitrato de 10 mg/mL, 0.45 g de carbón activado y 27 mL de agua destilada.
3. Homogeneizar y centrifugar 1 hora a 2700-3000 r.p.m.
4. Decantar el sobrenadante y filtrar con papel Whatman # 542 con ayuda de vacío y homogeneizar. De esta manera se obtiene una solución de nitrato de concentración 1 mg / mL.
5. Empleando el filtrado se procede a elaborar la curva patrón de la siguiente manera:

Tubo	Solución patrón de nitrato 1mg/mL (mL)	Agua (mL)	Solución de ácido salicílico (mL)		Solución de NaOH (mL)		
1 Blanco	0	100	0.4	Incubación a 30°C 20 ± 1 min.	9.5	Incubación a 30°C 15 ± 1 min.	Lectura a 410nm
2	6	94	0.4		9.5		
3	10	90	0.4		9.5		
4	30	70	0.4		9.5		
5	40	60	0.4		9.5		
6	60	40	0.4		9.5		

Se mezcla el contenido de los tubos después de cada adición.

Empleando la ecuación de la línea recta obtenida con los datos de la curva patrón se determina el contenido de nitratos presentes en la muestra y se reporta como % de nitratos.

ANEXO IX

Canavanina

REACTIVOS

- Sal sulfatada de canavanina (SIGMA C-9758)
- Solución estándar de canavanina (100 µg / mL).
- Pentacianoaminoferrato al 1% (PCAF).

PROCEDIMIENTO

1. Pesar de 100-150 mg. de muestra finamente molida y desengrasada y adicionar 20 mL de HCl 0.1N para realizar la extracción durante toda una noche con agitación de 200 r.p.m.
2. Al siguiente día filtrar el extracto sobre papel filtro doble (Whatman # 4) con ayuda de vacío y ajustar el filtrado cerca de la neutralidad con NaOH 1N (a un rango de 6.5-7.0).
3. Si llega a formarse un precipitado o se enturbia la solución, es necesario filtrar nuevamente. El filtrado ajustado se lleva a un volumen de 25 mL.
4. De esta solución, tomar 3 alícuotas de 0.5 mL cada una, a las cuales se les adicionan 9.1 mL de buffer pH 7.0 y 0.4 mL de PCAF, se llevan a un baño de 30°C por un tiempo de 25 minutos.
5. Una vez transcurrido este tiempo se lee la coloración obtenida en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm.

CÁLCULOS

Para efectuar los cálculos es necesario correr una curva estándar con concentraciones de 0 a 300 µg de canavanina como la que se muestra a continuación:

Concentración de canavanina (µg)	Solución estándar de canavanina (mL)	Amortiguador pH 7.0 (mL)	PCAF (mL)		
0 blanco	0.0	9.6	0.4	Incubar a 30°C por 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		

Se mezcla el contenido de los tubos después de cada adición.

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

ANEXO X

Determinación semi-cuantitativa de alcaloides

REACTIVOS

- Reactivo de MAYER (Cloruro de mercurio y yoduro de potasio) **(1)**.
- Reactivo de WAGNER (Triyoduro de potasio) **(2)**.
- Reactivo de DRAGENDORFF (Nitrato de bismuto y yoduro de potasio) **(3)**.
- Reactivo de SONNENSCHNEIDER (Ácido fosfomolibdénico) **(4)**.
- Reactivo de HAGER (Ácido pícrico) **(5)**.
- Reactivo de SCHEIBLER (Ácido fosfotúngstico) **(6)**.
- Reactivo de ÁCIDO SILICOTÚNGSTENICO **(7)**.

(1) Se disuelven 1.36 g. de HgCl_2 en 60 mL de agua y 5 g. de KI en 10 mL de agua. Se juntan las dos soluciones y se aforan a 100 mL con agua destilada.

(2) Se disuelven 1.27 g. de yodo (resublimado) y 2 g. de yoduro de potasio en 20 mL de agua; la solución se afora a 100 mL con agua destilada.

(3) Se disuelven 8.0 g. de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 mL de ácido nítrico ($\delta = 1.18$ ó al 30%) y 27.2 g. de KI en 50 mL de agua. Se mezclan las dos soluciones y se dejan reposar 24 h. Se decanta la solución y se afora con agua a 100 mL.

(4) A 100 mL de una solución caliente de molibdato de amonio (43 g / 100 mL), adicionar 100 mL de una solución caliente de fosfato de sodio dibásico anhidro (10 g / 100 mL); a esta solución adicionar 10 mL de ácido nítrico concentrado; se formará un precipitado amarillo que se deja reposar durante una hora. Decantar el líquido sobrenadante y desecharlo, suspender el precipitado amarillo en 50 mL de agua destilada y calentar. A la suspensión caliente adicionar 100 mL de la solución de carbonato de sodio anhidro caliente (28 g / 100 mL). Una solución clara debe formarse, y esta solución es evaporada en cápsula a sequedad; flamear la superficie del polvo con un mechero Bunsen hasta encender para evaporar las sales de amonio. Pesar el polvo . Disolver el polvo con 200 mL de agua destilada, calentar y adicionar a esta solución 50 mL de ácido nítrico concentrado, a esta solución adicionar agua destilada hasta llevar a un aforo de 300 mL; resultando una solución clara amarilla de ácido fosfomolibdico.

(5) Preparar una solución acuosa saturada de ácido pícrico (2.0 g / 100 mL).

(6) Se disuelven en 50 mL de agua 10 g. de tungstato de sodio y 7.0 g. de fosfato disódico. Se acidula con el ácido nítrico necesario para formar 100 mL de solución.

(7) Se disuelven 5 g. de ácido silicotúngstico en el ácido sulfúrico (6N) necesario para formar 100 mL de solución.

PROCEDIMIENTO

Pesar de 2 a 4 g. de muestra seca y molida (la muestra debe ser secada por debajo de los 50°C), manteniéndola toda la noche con 40 mL de metanol; a continuación calentar durante 4 horas a 50°C (agitando interrumidamente). La mezcla es entonces filtrada, y el residuo es lavado con 20 mL de metanol y los extractos se combinan y se evapora el metanol en un rotavapor. El residuo es resuspendido con 2 mL de metanol y 12 mL de HCl al 1%; la mezcla es agitada y filtrada; para lavar el residuo se usan 8 mL de HCl al 1%, se combinan los extractos filtrados y se hace básico con amoníaco concentrado (aproximadamente al 25%). Se extrae con 3 porciones de 20 mL de cloroformo cada una, dando la fracción "A".

A la solución acuosa residual de la anterior extracción, se procede a extraerla con una mezcla de cloroformo-etanol (3:2 v/v), con 3 porciones de 20 mL cada una, con lo cual se obtiene la fracción "B".

Las fases orgánicas son lavadas con 5 mL de solución media saturada de sulfato de sodio y secada con sulfato de sodio anhidro.

Las dos fracciones "A" y "B", son evaporadas en un rotavapor por separado; y el residuo es resuspendido con 1.5 mL de HCl al 1% y 1.5 mL de cloroformo, se agita vigorosamente y la fase acuosa de cada fracción es pipeteada y filtrada a través de algodón y dividida en 7 porciones; estas alícuotas son ensayadas con los siguientes 7 reactivos de alcaloides:

1) Reactivo de MAYER: El reactivo solo debe añadirse a soluciones previamente aciduladas con HCl ó H₂SO₄ diluídos.

La solución no debe contener ácido acético o etanol, porque disuelven el precipitado. Sólo deben agregarse unas cuantas gotas de reactivo porque algunos alcaloides son solubles en exceso de reactivo.

2) Reactivo de WAGNER: La mayoría de las soluciones aciduladas de alcaloides forman precipitados floculentos color marrón.

3) Reactivo de DRAGENDORFF: Se usa sobre soluciones aciduladas. Se puede recoger el precipitado anaranjado-marrón, liberar los alcaloides con solución de carbonato de sodio y extraerse con éter etílico o un disolvente similar.

4) Reactivo de SONNENCHEIN: Los alcaloides y sales de amonio dan precipitados amarillos. Se pueden recuperar los alcaloides disolviendo en amoniaco.

5) Reactivo de HAGER: La mayoría de soluciones aciduladas de alcaloides forman precipitados color amarillo.

6) Reactivo de SCHEIBLER: La solución acidulada da un precipitado blanco-grisáceo.

7) Reactivo de ÁCIDO SILICOTUGSTENICO: La solución acidulada da un precipitado blanco-grisáceo.

Resulta frecuente obtener reacciones falsas-positivas con los reactivos para alcaloides, motivo por el cual solo se considera como positiva la presencia de ellos cuando cualquiera de las dos fracciones (A y B) dan reacción positiva con los siete reactivos anteriormente enumerados.

El reactivo de HAGER (ácido pícrico) presenta una baja sensibilidad, de modo que cuando da una reacción negativa y todas las demás dan reacción positiva, este resultado se puede descartar, considerando positiva la presencia de alcaloides en la muestra.

Esta prueba puede ser empleada de forma semi-cuantitativa comparando los precipitados formados con soluciones de estricnina de concentración conocida.

ANEXO XI

Digestibilidad *in vitro* para rumiantes

MATERIAL Y REACTIVOS

- Taponés de hule acondicionados con una aguja hipodérmica (No. 21) simulando una válvula de Bunsen.
- Solución amortiguadora de McDougall. **(1)**
- Solución de pepsina ácida. **(2)**
- Líquido ruminal.

(Se utilizó un animal rumiante fistulado para extraer el líquido ruminal, el cual fue transportado al laboratorio de investigación bajo condiciones controladas de temperatura. Su lugar de procedencia fue el Colegio de Post-graduados de la Universidad Autónoma Chapingo).

(1) Solución amortiguadora de McDougall:

Solución 1: Se pesaron 3.7 g. de Na_2HPO_4 , 9.8 g. de NaHCO_3 y se llevaron a un volumen final de 1 L con agua desionizada a 40°C.

Solución 2: Se pesaron 4.7 g. de NaCl , 5.7 g. de KCl , 0.4 g. de CaCl_2 y 0.6 g. de MgCl y se llevaron a un volumen final de 100 mL.

La solución amortiguadora se preparó adicionando 10 mL de la solución 2 a 1 L de la solución 1, y se agitó durante 15 minutos, esta solución fue preparada el mismo día en que inició la determinación.

(2) Solución de pepsina ácida:

Se pesaron 0.2 g. de pepsina y se disolvieron en 1 mL de HCl 6N. Esta relación es por cada matraz.

PROCEDIMIENTO

a) Preparación de la solución amortiguadora-líquido ruminal

1. Una vez extraído el líquido ruminal se mantiene a temperatura constante.
2. Se filtra el líquido ruminal a través de gasas y se mantiene a 38°C.
3. Se ajusta la solución amortiguadora de McDougall a pH = 7 y se adiciona 1 mL de MgCl₂ al 4% (p/v) por cada litro de solución amortiguadora McDougall a utilizar.
4. Se toman 5 mL de solución amortiguadora y se mezclan con 15 mL de líquido ruminal.
5. La solución amortiguadora-líquido ruminal se introduce en un baño de agua a 38°C y se le burbujea CO₂ durante 8 minutos.

b) Determinación de la digestibilidad ruminal

La determinación se efectúa por triplicado.

Es necesario correr un blanco de la reacción que contenga todos los reactivos (excepto la muestra en estudio) y sea tratado bajo las mismas condiciones de experimentación.

-
1. Pesar 0.25 g. de muestra molida y colocarla en un matraz Erlenmeyer.
 2. Adicionar 20 mL de la solución amortiguadora-líquido ruminal a 38°C.
 3. Tapar los matraces con tapón de hule acondicionado con la aguja hipodérmica para eliminar el CO₂.
 4. Introducir en baño de agua a una temperatura de 38°C bajo condiciones de oscuridad durante 48 horas.
 5. Una vez transcurrido el tiempo, se sacan los matraces del baño de agua y se adicionan 5 gotas de HCl 3N para detener la digestión bacteriana.
 6. Adicionar a cada matraz 1 mL de la solución de pepsina ácida, agitando suavemente.
 7. Introducir en baño de agua a una temperatura de 38°C bajo condiciones de oscuridad durante 48 horas.
 8. Sacar los matraces del baño de agua y filtrar por gravedad con papel Whatman # 4 (a peso constante).
 9. Lavar el residuo con agua destilada y dejar filtrar durante 12 horas aproximadamente.
 10. Una vez transcurrido el tiempo se deja secar el papel con el residuo digerido en estufa de vacío hasta peso constante.

CÁLCULOS

$$\text{Muestra digerida} = [\text{Peso muestra digerida} + \text{Peso papel}] - \text{Peso papel}$$

$$\% \text{ Digestibilidad} = \frac{\text{Peso muestra} - (\text{Peso muestra digerida} - \text{Peso blanco digerido})}{\text{Peso muestra}} \times 100$$