



Universidad Nacional
Autónoma de México

FACULTAD DE QUÍMICA

Evaluación Nutricional y Toxicológica del
ejote destoxificado de *Erythrina americana*
(colorín) para alimentación animal

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

LAURA ALEJANDRA RAMOS MASTACHE



MÉXICO, DF.

2009



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.

Jurado asignado:

Presidente	M. en C. BERNARDO LUCAS FLORENTINO
Vocal	M. en C. LUCIA CORNEJO BARRERA
Secretario	QFB. INOCENCIA MARIA DE LOURDES FLORES TELLEZ
1er. Suplente	Q.A. ARGELIA SANCHEZ CHINCHILLAS
2do. Suplente	M. en C. ROSA MARIA ARGOTE ESPINOSA

Laboratorio 111, Departamento de Farmacia, Conjunto "E"
Facultad de Química, UNAM
Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, CP. 04510

Asesor:

BERNARDO LUCAS FLORENTINO



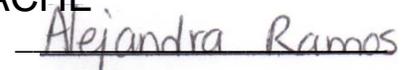
Supervisor técnico:

ROSA MARIA ARGOTE ESPINOSA



Sustentante:

LAURA ALEJANDRA RAMOS MASTACHE



Agradecimientos

A mis papas, Laura y Oscar, por brindarme su apoyo y cariño incondicional en todo momento, transmitirme sus conocimientos y sabiduría, por permitir que cometa mis errores, pero no dejarme caer en ellos dos veces, por su confianza y por empujarme para que llegara hasta esta etapa de mi vida, este triunfo es de los tres.

A mis hermanas Dany y Pau por escuchar día a día todas mis chocoaventuras, por aguantar mi olor en la bata a carne, leche, levadura, azufre etc. y lo peor es que eran todos los olores juntos, ya en serio, su comprensión y cariño fueron muy importantes para levantarme en esos días difíciles. Las amo!

A la memoria de la M. en C. Ángela Sotelo López, por su confianza al permitirme ser parte de este proyecto y por el apoyo económico, fue una gran sorpresa.

Al M. en C. Bernardo Lucas, por formar parte de este proyecto su tiempo, paciencia y apoyo fueron partes esenciales para poderlo concluir.

A todos los que formamos el laboratorio 111, Sra. Vicky, Rosita, Lety, Arge, Ericka, Toño y todos mis compañeros por sus consejos, su tiempo, por hacer que mi estancia fuera más agradable y sobre todo por su apoyo, creo que fueron clave para que ese laboratorio siguiera funcionando.

A mis amigos Pumas y sobre todo a las QA's, gracias por los buenos momentos que pasamos dentro y fuera de la facultad, inhalar tantos compuestos orgánicos, comer todo los productos bien elaborados en los laboratorios de tecnologías, no fue nada fácil y las horas de estrés no las hubiera podido pasar sin un buen chisme. Me llevo tantos recuerdos, conocimientos sobre la vida y porque no también conocimientos de química, pero sobre todo me llevo muy buenos amigos.

A mis amigos no tan químicos, por aguantar todas mis quejas sobre los alimentos, desaparecerme de repente, por escuchar cosas raras sobre la química y no tan química, por llorar juntos, por sonreír juntos y ser incondicionales, por seguir ahí compartiendo su vida conmigo en las buenas y en las malas y levantarme el ánimo en



los peores días, por apoyarme a pesar de que la vida nos llevo a caminos diferentes y por preocuparse por mí.

A mis tíos, primos, mis abuelitas que con sus conocimientos en cocina me salvaron de muchas, a toda mi familia que de manera directa o indirecta estuvieron ahí para brindarme su ayuda.

A todos...

GRACIAS!



Índice

	páginas
• Resumen	1
• Introducción	2
• Objetivos	4
• Capítulo 1. Generalidades	
1.1 Leguminosas	
1.1.1. Generalidades	5
1.1.2. Aspectos nutricionales	6
1.1.3. Toxicología	7
1.1.3.1 Taninos	8
1.1.3.2 Inhibidores de tripsina	9
1.1.3.3 Lectinas	9
1.1.3.4 Alcaloides	10
1.2 <i>Erythrina americana</i>	
1.2.1. Morfología y Taxonomía	11
1.2.2. Distribución y Hábitat	12
1.2.3. Valor nutritivo de <i>Erythrina americana</i>	13
1.2.4 Calificación Química	13
1.2.5 Toxicidad	14
1.3 Extracción en medio ácido	15
1.4 Calidad proteínica	16
1.4.1 REP	16
1.4.2 Digestibilidad (Da)	17
• Capítulo 2. Metodología	18
2.1 Recopilación de la materia prima	19
2.2 Preparación de la muestra	19
2.3 Destoxificación con agua acidulada	21
2.4 Análisis proximal	23
2.5 Determinación de factores tóxicos y antinutricionales	23
2.5.1 Determinación de Lectinas	23
2.5.2 Determinación de Taninos	26
2.5.3 Inhibidores de Tripsina	28
2.6 Cuantificación de alcaloides por titulación	31
2.7 Evaluación de la calidad proteica	33
2.7.1 Relación Eficiencia Proteica (REP)	34
2.7.2 Digestibilidad aparente (Da)	36
• Capítulo 3. Resultados y Discusión	38
• Conclusiones	49
• Bibliografía	50
• Anexos	54



Resumen

En México hay una gran diversidad de la flora, sin embargo, a nivel comercial solo se explotan unas cuantas especies vegetales. Existen especies no comerciales con un alto potencial que pueden ser una fuente alternativa de nutrimentos a bajo costo, como es el caso de las semillas de *Erythrina americana* conocidas como colorín, a cuyo interés nutritivo contribuye su elevado contenido de proteínas y lípidos pero que debido a la presencia de alcaloides, son tóxicas. La semilla de colorín destoxificada presenta una proteína de alto valor nutrimental y se puede considerar como una fuente alternativa para ser usada como alimento de animales monogástricos y rumiantes; sin embargo, se ha visto en trabajos anteriores que la destoxificación tiene un alto costo en obtención del alimento. Los frutos inmaduros del colorín (ejotes) presentan un bajo contenido de tóxicos y factores antinutricionales en comparación con los frutos maduros. En el éste estudio se presenta la eficiencia de doble remojo en agua acidulada con HCl 1% como un método económico de destoxificación, obteniendo una reducción de alcaloides del 33.66%, de la misma manera se redujeron los inhibidores de tripsina (64.36%), sin perder el aporte nutrimental. La proteína del ejote del colorín tiene un eficiencia bastante alta debido a que tiene un REP 1.70, con una digestibilidad del 85.41%, proporcionándonos un alimento de gran potencial debido a su proteína de alta calidad, variedad, disponibilidad de los aminoácidos y bajo costo.



Introducción

Desde sus inicios, la humanidad ha sustentado una lucha continua contra el hambre, que es y seguirá siendo uno de sus principales necesidades por satisfacer. Actualmente la desnutrición por falta de proteína ha disminuido aunque no se ha erradicado, uno de los principales factores se debe a que los productos proteínicos animales son más caros que los productos de origen vegetal, lo cual incide en la nutrición de poblaciones marginadas provocando la búsqueda de fuentes alternativas capaces de ofrecer proteína de alto valor nutritivo y cualidades organolépticas aceptables. Otra de las razones por las que se aprecia la necesidad de buscar nuevas alternativas viables es el uso de granos y otras materias naturales de alta calidad para la alimentación del ganado. Las proteínas vegetales constituyen una fuente de nutrimentos e ingredientes funcionales de interés por su variedad, disponibilidad y costo. (3, 14, 19, 45)

EL cultivo y compra de granos para consumo animal, conocido como “Ganaderización de la Agricultura”, podría aprovechar alimentos no convencionales como plantas forrajeras con alto valor nutrimental, utilizados de forma natural, para la alimentación del ganado y de un costo de producción bajo. (4, 48)

A pesar de la gran cantidad de plantas utilizables para alimentación, en el mercado hay pocas variedades que se explotan ampliamente, tal es el caso de la ***Erythrina americana*** conocida como colorín, a cuyo interés nutritivo contribuyen su elevado contenido en proteínas, hidratos de carbono, vitaminas, minerales y fibra, y además su aporte lipídico es rico en ácidos grasos insaturados. El papel nutricional de las proteínas no sólo depende de la cantidad en que se ingieren, sino también de su calidad, el cual esta en función en gran medida de su digestibilidad y su contenido de aminoácidos. Sin embargo, las semillas de ***Erythrina americana*** suelen contener algunos componentes que influyen negativamente en su potencial nutritivo por la presencia de factores tóxicos y antinutricionales que, sumados al desequilibrio en aminoácidos azufrados y a una baja digestibilidad de algunos de sus



componentes, impiden un aprovechamiento más amplio de sus propiedades alimenticias. (3, 14, 46)

Los tóxicos de mayor importancia contenidos en el colorín son los alcaloides, sin embargo, se ha observado que el proceso de desarrollo y maduración afecta la síntesis de éstos factores tóxicos y antinutricionales, siendo mayor la concentración de alcaloides con la maduración de las leguminosas. (20)

Los frutos inmaduros de la *Erythrina americana* (ejotes) presentan un bajo contenido de alcaloides y factores antinutricionales, los cuales se encuentran distribuidos en distintas partes de la planta en forma de sales o ésteres de ácidos. La mayoría de los alcaloides precipitan en soluciones neutras o ligeramente ácidas, debido a la capacidad que poseen de combinarse con metales y metaloides. Los métodos de procesamiento pueden tener efectos benéficos o nocivos sobre la calidad nutricional de las proteínas vegetales. (10, 20, 44, 47).

En el presente estudio se evalúa la eficiencia del remojo en agua acidulada como proceso económico de destoxificación en el ejote de la *Erythrina americana* mediante la cuantificación de alcaloides, inhibidores de tripsina, taninos y lectinas debido a que son encontrados comúnmente en esta leguminosa; además, se evalúa la calidad de la proteína determinando parámetros biológicos: Relación de eficiencia proteínica (REP) y Digestibilidad (Da), esperando una disminución significativa de los alcaloides y de los factores antinutricionales sin perder el aporte nutrimental, proporcionándonos un alimento de gran potencial debido a su proteína de alta calidad, variedad, disponibilidad y bajo costo dirigido a la alimentación animal.





Objetivos

General

Conocer la eficiencia del lavado acidulado como proceso económico de destoxificación en el ejote y la semilla inmadura de la ***Erythrina americana*** mediante la cuantificación de factores tóxicos y antinutricionales y evaluar biológicamente la calidad proteínica del ejote de ***Erythrina americana*** destoxificado.

Específicos

- Determinar el análisis proximal del ejote y la semilla inmadura de ***Erythrina americana*** antes y después de la destoxificación.
- Conocer la eficiencia del lavado acidulado mediante la cuantificación de los siguientes factores tóxicos y antinutricionales en las muestras:
 - Lectinas
 - Taninos
 - Alcaloides
 - Inhibidores de Tripsina
- Evaluar la calidad proteínica por los siguientes métodos biológicos:
 - Relación de la Eficiencia Proteínica (REP)
 - Digestibilidad aparente (Da)



Capítulo 1



Generalidades

1.1 Leguminosas

1.1.1 Generalidades

La familia botánica **Leguminosae** o **Fabaceae** está formada por plantas angiospermas, dicotiledóneas, que se caracterizan porque sus frutos son “legumbres”, es decir, que las semillas se producen dentro de una vaina; ésta es más o menos aplanada, con una sola cámara y dos suturas y puede contener una o varias semillas que generalmente, están unidas a una de las suturas. Contiene entre 2-10 semillas por vaina (12, 39)



Figura 1: Ejemplos de leguminosas

Algunas leguminosas silvestres al secarse, su vaina es dehiscente, es decir, que se abre por sí misma en dos cáscaras simétricas a lo largo de una línea de sutura dorsal. (18) Aunque las leguminosas y sus semillas difieren mucho en tamaño, forma y color, sus estructuras son muy parecidas; una cubierta delgada pero dura envuelve a una semilla con un pequeño embrión que dará origen a la raíz, el tallo y un par de hojas, como se puede observar en la figura 1. También hay un ojo o hilio y una especie de endospermo, los cotiledones almacenan el material alimenticio de la semilla. (38)

La familia **Leguminosae** incluye unas 18,000 especies y ocupa el segundo lugar entre las plantas de importancia económica, después de las gramíneas.



Existen básicamente dos grupos de leguminosas. En primer lugar un grupo rico en proteína y aceite, en el que figuran la soja, y cacahuate. El segundo grupo comprende los tipos de leguminosas con un contenido medio de proteína y bajo de aceite como el guisante, lenteja y el grupo *Phaseolus*.

En las raíces presentan nódulos radiculares, en ellos se encuentran bacterias fijadoras de nitrógeno (*Rhizobium leguminosarum*) la cual es capaz de transformar el nitrógeno atmosférico en nitrato asimilable (amoníaco) para las plantas.

1.1.2 Aspectos nutrimentales

Hay evidencia arqueológica, histórica, lingüística y botánica que indica que la judía (*Phaseolus vulgaris*) es originaria del continente americano. La judía es una de las principales fuentes de proteína, calorías, vitaminas del complejo B y minerales en Latinoamérica. ⁽³⁶⁾.

Agua: cuando los frutos de las leguminosas están inmaduros, la humedad es de 60-80%, y en la semilla madura suele alcanzar valores de 5-15% de humedad del peso total. ⁽¹⁾

Proteína: Las proteínas de las judías es relativamente constante, se han publicado valores que van desde 16-33%. ⁽³⁶⁾.

Lípidos: las judías contienen entre un 1-3% de lípidos. Los que predominan son lípidos neutros (triglicéridos, ácidos grasos libres, esteroides y ésteres de esteroles). Contienen ácidos grasos insaturados. ⁽³⁶⁾.

Hidratos de carbono: contiene de 20-60% en las semillas maduras; la presencia de monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos es muy variable, no obstante la mayoría es almidón, por lo que las leguminosas son consideradas una fuente barata de energía. ^(35, 7).

Cenizas: se consideran fuentes de hierro 5-7.6 mg/100g, calcio 68-250 mg/100 g y fósforo 300-400 mg/100g. ^(1, 7).

Fibra: se constituye de tres polisacáridos: celulosa, pectina y hemicelulosa, así como lignina. La fibra alimentaria de las judías oscila entre el 14-19% en semilla cruda. ^(36, 28).



La calidad de una proteína alimentaria depende del tipo de aminoácidos que contiene, ya que cuando uno o más aminoácidos resulta deficitario, se retrasa la síntesis de proteínas. Las leguminosas son pobres en los aminoácidos azufrados como metionina y cistina pero ricas en lisina. Además en ellas existen la presencia de factores antinutricionales y tóxicos, lo que provoca la disminución de la calidad y biodisponibilidad de las proteínas. (36)

1.1.3 Toxicología

En conjunto las leguminosas presentan algunos inconvenientes desde el punto de vista nutritivo, además de su deficiencia en aminoácidos azufrados, su baja digestibilidad, también presentan factores tóxicos. Éstos factores son sustancias xenobióticas que causan daño cuando son ingeridas a través de los alimentos produciendo un daño directo sobre un órgano o tejido o interfieren con la biodisponibilidad de algún nutrimento. Sin embargo, se puede distinguir dos tipos de sustancias dañinas que pueden ser ingeridas a través de los alimentos, que son: (39, 49)

Agente tóxico: Cualquier sustancia xenobiótica que es capaz de producir una anomalía fisiológica y/o anatómica a corto plazo (Toxicidad aguda o subaguda), la cual no puede ser atenuada por una simple fortificación o suplementación del alimento que lo contiene. De este tipo encontramos a los alcaloides.

Agente antinutricional: Sustancia presente en el alimento, que tiene la capacidad de reaccionar o interferir con un nutrimento, disminuyendo su biodisponibilidad y a largo plazo (Toxicidad crónica) es capaz de producir una anomalía fisiológica y/o anatómica, que en la mayoría de los casos es irreversible. Sin embargo, el propio nutrimento puede actuar como antagonista; por lo cual, una fortificación de éste, en la etapa inicial del efecto dañino, puede atenuar o eliminar el problema. De este tipo encontramos a los taninos, inhibidores de tripsina y fitatos. (29).

Los agentes tóxicos y antinutricionales naturales, pueden ocasionalmente causar problemas, debido a que inesperadamente se encuentran en alimentos a concentraciones mayores a los niveles considerados como normales. Otro factor de



riesgo es el de confundir especies inocuas, con tóxicas; como sucede frecuentemente con algunos hongos.

Las semillas de leguminosas, fueron de los primeros alimentos seleccionados por el hombre. Entre los principales factores tóxicos y antinutricionales asociados a estas plantas encontramos los siguientes: (49)

1.1.3.1 Taninos

El término tanino, se refiere originalmente a las sustancias que tienen la habilidad de curtir pieles, esto es debido a la propiedad general de los polifenoles de unirse y precipitar ciertas proteínas, en donde convierte las fibras de colágeno en estructuras impenetrables a ataques microbianos, haciéndola resistente a la degradación en condiciones extremas de humedad y temperatura. Pertenecen al grupo de los secuestrantes de minerales. (34)

Químicamente los taninos son compuestos orgánicos, no nitrogenados, heterogéneos, que van desde monómeros hasta polímeros. Contienen una gran cantidad de grupos hidroxilos, los cuales sugieren ser los responsables de la interacción con las proteínas y otras moléculas. Además tienen la capacidad de precipitar alcaloides y proteínas; se consideran metabolitos secundarios de las plantas. Los taninos se clasifican en 2 grupos: taninos hidrolizables y taninos condensados, aunque ambos tipos pueden sufrir procesos hidrolíticos en medio acuoso, debido a que son solubles en agua con alcohol. (18, 34)

Los taninos son compuestos pertenecientes a la familia de los polifenoles, los cuales poseen la característica de interaccionar con las proteínas y enzimas digestivas, disminuyendo así, el valor nutritivo del alimento ingerido, pues impiden que se lleven a cabo las etapas de la digestión por afectar la biodisponibilidad de los nutrimentos para que sean absorbidos y utilizados adecuadamente. Aunado a esto, los taninos forman complejos con los iones de metales divalentes como es el hierro, lo que trae como consecuencia una baja disponibilidad biológica de estos metales. (34). El frijol común de color negro contiene 1.26% de ácido tánico y el frijol colorado 1.42% (8).



1.1.3.2 Inhibidores de Tripsina

Los inhibidores de proteasas son agentes antinutricionales conocidos como antienzimas, los cuales se encuentran frecuentemente en la alimentación humana, inhibiendo los sistemas enzimáticos de sus depredadores (microorganismos o insectos), o tienen una función reguladora, interviniendo en el proceso de autorregulación proteolítica o de almacenamiento en el organismo que los contiene. La mayor proporción se manifiesta en la semilla, y en menor en tubérculos, raíces y hojas. Los inhibidores de tripsina pueden coexistir en la misma planta con otros inhibidores proteolíticos. Nutricionalmente causan un retraso en el crecimiento o un índice bajo de la Eficiencia Proteica (REP) y producen hipertrofia pancreática en ratas, como esfuerzo compensatorio. (49, 42)

Los inhibidores de proteasas, son proteínas que tienen la propiedad de inhibir las enzimas respectivas *in vitro*, generalmente en una relación 1:1 molar, por lo cual esta propiedad se aprovecha para poder identificarlos una vez que son extraídos del material biológico. La mayoría de los inhibidores de tripsina son inactivados por la acción del calor, sin embargo, existen algunos termoestables, los cuales en algunas especies del género *Erythrina*, se reporta hasta un 80% de actividad antitripsina. (46, 49)

1.1.3.3 Lectinas

Son un grupo heterogéneo de proteínas que se caracterizan por aglutinar los glóbulos rojos, además tienen actividad tóxica en pruebas de laboratorio. Debido a su especificidad hacia ciertos hidratos de carbono, a las hemaglutininas también se les conoce con el nombre de lectinas. En la semilla las lectinas se encuentran presentes en cuerpos proteínicos en el endospermo, donde llegan a constituir hasta el 10% de las proteínas totales; durante la germinación las proteasas son responsables de la inactivación de las lectinas. (7, 21)



Estos agentes antinutricionales termolábiles producen diferentes trastornos, entre los cuales resalta la intensa inflamación de la mucosa intestinal, con la posterior destrucción del epitelio y edema, o sea que reaccionan con las criptas y vellos intestinales, pero en diferente región de acuerdo a la especificidad de la hemaglutinina, lo que ocasiona una interferencia no-específica con la absorción de los nutrimentos, por consiguiente hay un efecto drástico en la nutrición del organismo que las ingiere. Todas las lectinas presentan una sintomatología similar, de mayor o menor gravedad. (7, 49, 43)

1.1.3.4 Alcaloides

Los alcaloides son un grupo importante de compuestos orgánicos complejos que tiene mínimo un nitrógeno heterocíclico que le da el carácter básico y son biológicamente activos, sintetizados en su mayoría por las plantas para protegerse de los insectos y otros animales. La mayoría de los alcaloides son sustancias cristalinas bien definidas que por unión con ácidos, forman sales. En las plantas pueden existir libres, en estado de sales, o como N-óxidos. Además de los elementos carbono, hidrógeno y nitrógeno, la mayoría contiene oxígeno.

A pesar de que algunos se utilizan en medicina (sedantes), la mayor parte de los alcaloides son agentes tóxicos y producen la muerte si se ingieren en grandes dosis. Los alcaloides en pequeñas dosis pueden producir efectos sobre el sistema nervioso central que producen sedación, euforia o alucinaciones. La adicción a los alcaloides con frecuencia produce la muerte a corto, medio o largo plazo, dependiendo del grado de intoxicación. (50)



1.2.- *Erythrina americana*

El género *Erythrina* pertenece a la familia *leguminosae* y comprende cerca de 115 especies de amplia distribución en las regiones tropicales del mundo. Se utiliza como productor de forraje, madera para manualidades, árbol de soporte para cultivos trepadores, de sombra para el café, cacao u otros cultivos y un árbol ornamental.

1.2.1 Morfología y Taxonomía

Los árboles de la especie de *Erythrina americana* miden hasta de 9-10 m con ramas espinosas; hojas trifoliadas con las hojuelas deltoideo – ovaladas; flores rojas, con el estandarte angosto y los otros pétalos pequeños; se producen en racimos cónicos y aparecen cuando la planta no tiene hojas (Figura 2); el fruto es una vaina de 10-13 cm (Figura 4) con semillas rojas y brillantes, venenosas. Permanecen por un tiempo en el árbol dentro de las vainas. Estas vainas son una especie de estuches cerrados en donde las semillas se desarrollan (Figura 3). Cuando las semillas están maduras, la vaina que las encierra se seca y se abre por los dos lados, para que las semillas salgan y se rieguen en el suelo durante el otoño. Las flores son comestibles en algunos países. (33)



Figura 2: Flores de *Erythrina americana* (9)

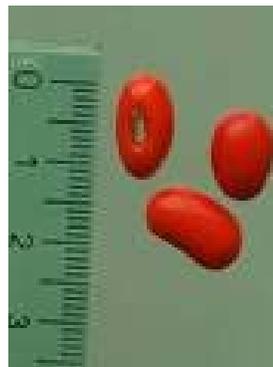


Figura 3: Semilla madura de colorín



Figura 4: Ejote inmaduro de colorín



Los estadios de maduración del fruto de *Erythrina americana* determinada por Ramírez en el año 1996 ⁽⁴¹⁾, tienen los siguientes parámetros físicos (tablas 1 y 2):

Tabla 1: Parámetros físicos en las semillas del colorín

Fases*	Peso hectolítrico	No. De semillas	Humedad del grano (%)	Características físicas
I	47.86 ± 3.8	40.0 ± 16.35	75.68 ± 1.57	Grano color verde
II	49.72 ± 3.3	38.5 ± 7.36	65.76 ± 6.40	Grano verde con pintas naranjas
III	64.12 ± 0.67	86.5 ± 5.63	6.33 ± 6.33	Grano color rojo-naranja

* Los estadios de maduración están determinados por la fase I, II y III, siendo ésta última la de mayor maduración.

Tabla 2: Parámetros físicos en la vaina del colorín

fases	Longitud vaina (cm)	Peso vaina (g)	Peso semilla (g)	No de semillas por vaina
I	23.72 ± 6.35	24.48 ± 18.34	1.28	6.0 ± 2.17
II	18.35 ± 7.87	10.62 ± 8.29	1.37	4.0 ± 2.34
III	20.81 ± 6.87	2.84 ± 1.77	0.98	4.0 ± 2.38

Para una mayor identificación de las fases descritas en las anteriores tablas (1 y 2), a continuación en las siguientes figuras 5 y 6 se muestran la fase I y III del ejote del colorín.



Figura 5: Ejote inmaduro del colorín fase I



Figura 6: Fruto maduro del colorín Fase III

1.2.2 Distribución y Hábitat

Se encuentra en el centro y sur de México, los cuales comprenden de México Distrito Federal a Veracruz, Chiapas y Yucatán. Se cultiva en muchos lugares templados pero generalmente no fructifica, esto con la finalidad de poder utilizar las flores en el arte culinario como legumbres a las cuales se les deben quitar las



antenas y el pistilo para evitar un sabor amargo y sólo los pétalos cocidos son los que se consumen. (11,17)

1.2.3 Valor Nutritivo de la *Erythrina americana*:

Un alimento es una asociación compleja de innumerables compuestos, por lo que la evaluación del valor nutrimental de un alimento es fundamental en la ciencia de la nutrición. (23)

En la tabla 3 se muestra el análisis químico proximal del ejote de colorín determinada por Flores en el año 2002 donde se observa su alto potencial alimenticio:(18)

Tabla 3: Análisis proximal de la muestra del ejote de *Erythrina americana*.
(g/100 g muestra)*

Muestra	Humedad	Proteína	Lípidos	cenizas	fibra	hidratos de carbono**
ejote crudo	85.09 ± 4.25	24.38 ± 1.01	6.11 ± 0.27	6.64 ± 0.09	26.14 ± 1.04	36.73
semilla inmadura cruda	83.55 ± 3.22	30.04 ± 0.64	13.77 ± 0.29	17.07 ± 1.43	4.21 ± 0.10	34.91

* los datos representan los promedios ± desviación estándar de un triplicado, C.V. < 5%

** los Hidratos de carbono se calcularon por diferencia.

1.2.4 Calificación Química

La calidad nutritiva de una proteína depende en gran medida de su contenido de aminoácidos como de su digestibilidad. Por lo que sí se comparan los aminoácidos individuales de una proteína con los requerimientos proteínicos, se puede obtener una predicción de su calidad nutritiva.

En la tabla 4 se muestra la calificación química de la semilla inmadura como del ejote del colorín determinada por Flores en el año 2002 (18).



Tabla 4: Calificación química de las muestras de *Erythrina americana**

Aminoácido	Patrón FAO (1985)	Semilla inmadura cruda	Ejote crudo
Triptofano	0.50	1.269	1.310
Lisina	1.60	9.306	8.728
Isoleucina	1.30	5.755	4.270
Leucina	1.90	9.910	6.780
Valina	1.30	7.429	6.472
Treonina	0.90	3.374	3.064
Metionina	} 1.70	} 0.602	} 0.785
Cistina			
fenilalanina	} 1.90	} 4.033	} 1.524
Tirosina			
Total a.a. esenciales	11.10	41.68	32.93
C.Q.		35.41	46.18
a.a limitante		azufrados	Azufrados

* El contenido de aminoácidos se expresan en g a.a./100 g de proteína, (100 g proteína = 16 g de nitrógeno)

1.2.5 Toxicidad

La semilla de *Erythrina americana* tiene una potente acción parálitica, y hay referencias de que en el centro y sur de México se utiliza como veneno para ratas y perros, donde *E. americana* es nativa y además se utiliza como ornamento. Aunque las semillas tiene una mala reputación sobre su toxicidad, fue hasta 1930 que Lehman confirmo que los extractos (con alcohol) de *E. americana* tienen efectos hipnóticos y paráliticos. A pesar de su alta toxicidad, hay muy pocos reportes asociados con problemas debido a la ingestión. En México, a pesar de su reputación como un débil hipnótico, las flores son hervidas y consumidas como vegetales. Las acciones toxicas que ejerce esta planta se deben principalmente a los alcaloides presentes en ella: α - y β -eritroidina, erisovina, eritravina. (10)

El esqueleto básico de los alcaloides de *Erythrina americana* es el erytrano. Alrededor del 2% de alcaloides se encuentran en su semilla. Se ha estudiado que cuando se detecta la presencia de α -eritroidina, también se encuentra β -eritroidina, la cual es la más abundante de los alcaloides en la semilla. Sin embargo dependiendo del estado de maduración de la leguminosa, el tipo y concentración de alcaloides se modifica. (38, 11, 17)



La destoxificación puede llevarse a cabo por varios métodos, ya sea por extracción con un disolvente en medio alcalino o ácido. ⁽¹⁰⁾

Estudios previos muestran que la dosis letal media para el ejote del colorín es de 78 000 mg/kg de peso corporal, con un contenido de alcaloides de 0.67 g alcaloides/100 g muestra. ⁽³⁸⁾

Los alcaloides suelen encontrarse acumulados en tejidos activamente en crecimiento ⁽³⁷⁾, sin embargo trabajos anteriores han demostrado que el ejote contiene un alto contenido de fibra y ésta tiene un efecto diluyente en los factores antinutricionales y tóxicos como podemos observar en la tabla 5. ⁽⁴⁶⁾

Tabla 5: Contenido de alcaloides de las muestras de *E. americana* (base seca)⁽⁴⁶⁾

Muestras	g alcaloides/100 g muestra
Semilla seca cruda	1.056 ± 0.028
Semilla inmadura cruda	0.769 ± 0.054
Ejote crudo	0.669 ± 0.038

Los datos representan los promedios ± desv. est. De triplicados, C.V. < 10%

1.3.- Extracción en medio ácido:

La extracción de alcaloides se basa, por regla general, en el hecho de que se encuentran habitualmente en la planta al estado de sales y en el de su basicidad, es decir, en la diferente solubilidad de las bases y de las sales en agua por una parte y en disolventes orgánicos por otra. Las bases libres son muy poco solubles en agua, pero solubles en los disolventes orgánicos; con la sales suele ocurrir lo contrario. El material vegetal contiene a menudo cantidades apreciables de grasas (especialmente las semillas) así como ceras, terpenos, pigmentos y otras sustancias lipofílas que pueden interferir en el proceso extractivo, sobre todo induciendo la formación de emulsiones.

La mayoría de los alcaloides precipitan en sus soluciones neutras o ligeramente ácidas, debido a la capacidad que poseen los alcaloides de combinarse con metales y metaloides. En el caso de la extracción en medio ácido, deja una disolución acuosa ácida de las sales de alcaloides la cual es necesario purificar. ^(10, 47)



1.4.- Calidad proteínica

La función primaria de las proteínas de la dieta es la de suministrar los aminoácidos que el animal necesita para mantenimiento y para fines productivos tales como crecimiento, gestación y lactación. La valoración de la calidad de las proteínas será más exacta si se realiza con la especie a la que la proteína va dirigida y en las condiciones bajo las que será empleada. Independientemente de la especie, todos los ensayos animales para valorar las proteínas del alimento miden, directa o indirectamente, el grado en el cual las proteínas satisfacen las necesidades de aminoácidos para la síntesis proteica y el mantenimiento. (2)

La determinación de la calidad de las proteínas se puede realizar por métodos directos, principalmente técnicas *in vivo*, o bien por métodos indirectos, en donde se correlacionan estadísticamente los resultados del análisis de aminoácidos y de la digestibilidad. (17, 24)

Entre los bioensayos más utilizados están la relación de eficiencia proteica (REP) y la digestibilidad aparente (Da).

1.4.1 Relación de la eficiencia proteica (REP)

Desarrollado por Osborne, Mendel y Ferry en 1919, es el método más antiguo y conocido para la evaluación nutritiva de proteínas. En 1975, fue adoptado por la AOAC como método oficial para determinar la calidad de las proteínas. (24)

La REP es un índice confiable del valor nutricional de una dieta proteínica, basándose en el incremento en peso de ratas alimentadas con una dieta, bajo condiciones estandarizadas ya que existen factores que ejercen una influencia sobre los resultados como son: edad, sexo, la cepa, la calidad y cantidad de proteína, condiciones ambientales (temperatura, tamaño de la jaula, luz). (22, 50)

La principal ventaja del método es su simplicidad y amplio uso. La correlación entre la REP y el peso corporal es generalmente muy alta, por lo que la ganancia en peso es, en circunstancias bien estandarizadas, suficiente para definir el valor nutricional, si el contenido de proteína en la dieta es fijo (10%). (16)



Probablemente la crítica más importante a la REP es que no toma en cuenta el mantenimiento y asume que toda la proteína es empleada para el crecimiento. (32)

Las proteínas de las judías tienen un valor nutritivo deficiente, excepto si se someten a tratamiento térmico. La REP oscila generalmente entre 0.9- 1.7. (36)

1.4.2 Determinación de Digestibilidad de una proteína *in vivo*

Cualquier método para evaluar la calidad nutritiva de una proteína alimenticia, debe estimar directa o indirectamente la biodisponibilidad de los aminoácidos para la síntesis de las proteínas tisulares y de mantenimiento. La digestibilidad sirve como un indicador inicial de la calidad nutritiva de un alimento y es definida como la “disponibilidad de los aminoácidos constituyentes de la proteína para ser absorbidos por el organismo de prueba”.

Durante la digestión de las proteínas por los animales monogástricos como el hombre, los enlaces peptídicos se deben hidrolizar en forma relativamente rápida mediante la acción de enzimas proteolíticas específicas, las cuales son secretadas por el estómago, páncreas e intestino delgado, de tal forma que se liberan aminoácidos y péptidos pequeños, los cuales son absorbidos en el intestino delgado. En general se conoce que los alimentos proteínicos de origen animal son más digestibles que los de origen vegetal debido a que los de origen animal tienen menor contenido de fibra y como consecuencia hay una menor velocidad del tránsito en el tracto intestinal, provocando una mayor absorción.

La digestibilidad *in vivo* es un método recomendable y confiable ya que dan resultados reproducibles. Se basa en suministrar una dieta que contiene a la muestra en estudio, siendo ésta la única que aporta proteínas a los animales experimentales. Los experimentos por lo general se realizan con ratas, ya que la digestibilidad de las proteínas es igual en ratas y humanos. (6, 13)



Capítulo 2

Metodología



A continuación se muestra en la figura 7 el diagrama general de trabajo para esta investigación y posteriormente se explica cada paso de manera detallada.

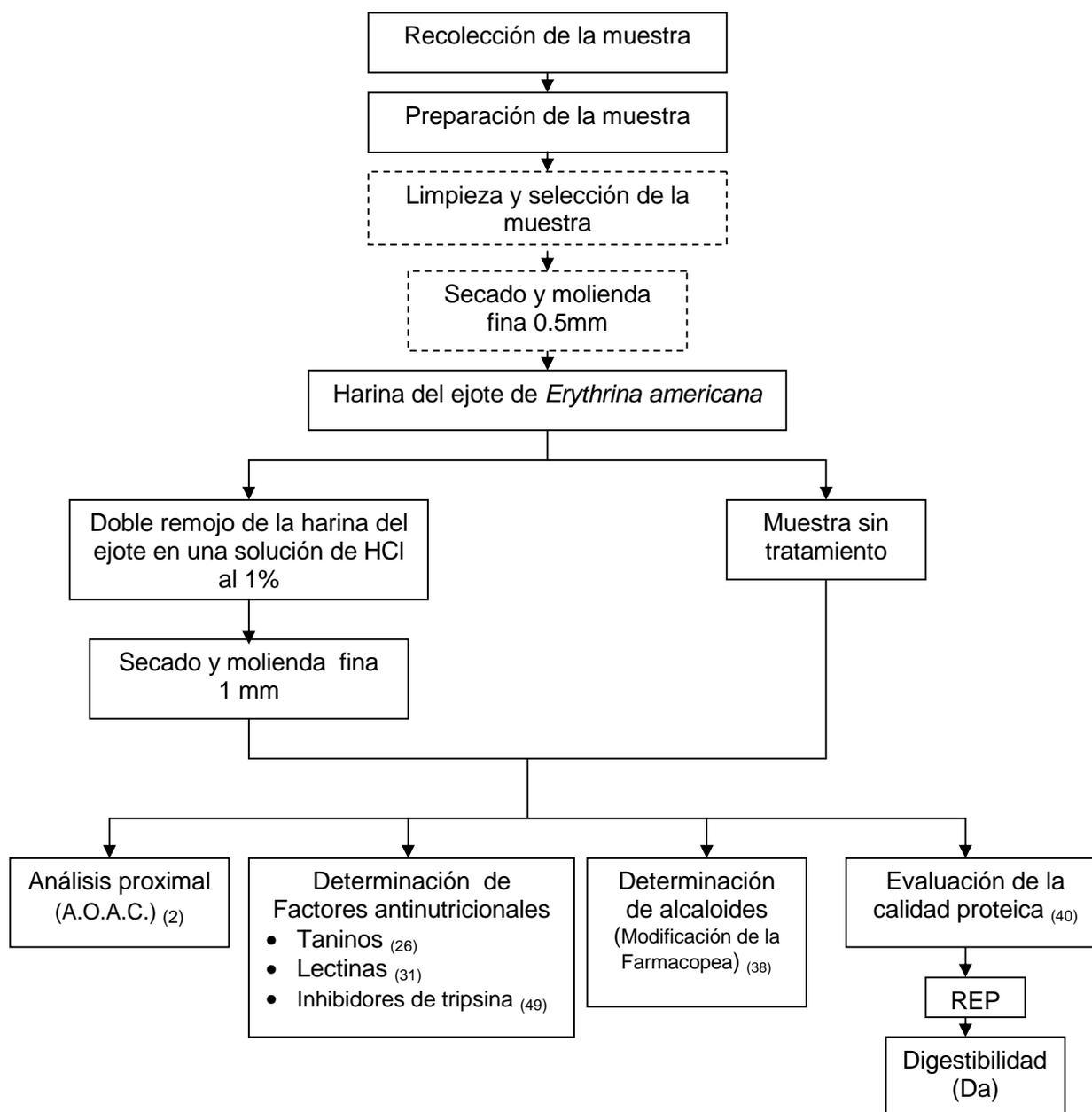


Figura 7.- Diagrama general de trabajo



2.1 Recopilación de la materia prima

Los ejotes de colorín (Figura 8), se recolectaron de un árbol clasificado botánicamente como *Erythrina americana*, situado frente al edificio “B” y el estacionamiento de la Facultad de Química, Cd. Universitaria, en Abril de año 2008.



Figura 8: Ejotes inmaduros de *Erythrina americana*

2.2 Preparación de la muestra

Los ejotes de *E. americana* fueron sometidos a una selección y limpieza, donde se elimina la materia extraña como tallos, hojas, basura, después fueron limpiados con una franela impregnada con hipoclorito de sodio al 10%, seguida de otra impregnada con agua destilada. Las características que se observan en las muestras son (Figura 9):

- Semillas inmaduras

Color: blanco

Forma: ovoide con un estrangulamiento en la parte central, teniendo forma arriñonada

Fase: I ⁽⁴¹⁾



Ejote completo

Vaina verde de 10 a 25 cm. de largo

Contiene entre 2-10 semillas.

Fase: I ⁽⁴¹⁾



Figura 9: Ejote y semilla de *Erythrina americana*

Una vez seleccionados los ejotes limpios se les realizó lo siguiente:

- Ⓢ Secado: los ejotes se colocan abiertos en charolas en capas delgadas como se muestra en las Figuras 10, 11 y 12, y se someten a corrientes de aire a 50° C hasta que la muestra muestre eliminación de la mayor cantidad de humedad. (Estufa de circulación forzada, marca LAB-LINE mod. Impereal III).
- Ⓢ Molienda: los ejotes secos se muelen y pasan a través de una malla de 1 mm de abertura. (Molino Thomas-Wiley, Modelo 4).
- Ⓢ Homogeneización manual.
- Ⓢ Almacenaje en recipiente de plástico a temperatura ambiente.

El lote de harina de ejote de *E. americana* se divide en dos partes:

Lote 1: Harina de ejote de *E. americana*. Este producto se utiliza para realizar el análisis químico proximal, cuantificación de alcaloides y factores antinutricionales.

Lote 2: Harina de ejote de *E. americana* utilizada para la destoxificación.



Figura 10



Figura 11



Figura 12

Figuras 10, 11 y 12: Ejotes abiertos de *E. americana* colocados en charolas para someterlos a secado.

2.3 Destoxificación con agua acidulada

Fundamento

La técnica usada se basa en la solubilidad de las sales de los alcaloides en agua. (48,46)

Material y Reactivos

- Harina de Ejotes de *Erythrina americana* (lote 2).
- HCl concentrado
- Charolas de plástico
- Coladera de plástico de abertura No. 25 Tyler equivalent 24 Mesh

Procedimiento:

- Se prepara ácido clorhídrico al 1%.
- Se toma cierta cantidad de harina de ejote de *E. americana*, y se le agrega HCl al 1%, con la finalidad de cubrir toda la harina de ejote (Figura 13).
- Se deja remojar la harina de ejote de *E. americana* durante 24 hrs. (durante ese periodo se remueve la solución para evitar la formación de hongos y para lograr una mejor extracción de alcaloides) (Figura 14).
- Una vez que se cumplen las 24 hrs., la harina de *E. americana* en solución HCl al 1% se pasa por una coladera de plástico de abertura No. 25 (Tyler equivalent 2 Mesh) para eliminar el agua acidulada.
- Al residuo (harina de *E. americana* húmeda) se le agrega HCl al 1% hasta cubrirla.
- Se deja remojar la harina de ejote de *E. americana* durante 24 hrs. (durante ese periodo se remueve la solución).
- Una vez que se cumplen las 24 hrs., se pasa por una coladera de plástico de abertura No. 25, quedando una pasta de harina de ejote de colorín mojada.
- La pasta de harina de ejote de colorín se seca en la estufa (Estufa de circulación forzada, marca LAB-LINE mod. Impereal III), durante 24 hrs. hasta que muestre la mayor eliminación de humedad.



Figura 13: Harina de ejote de *E. americana*, cubierta con solución de HCl al 1%.

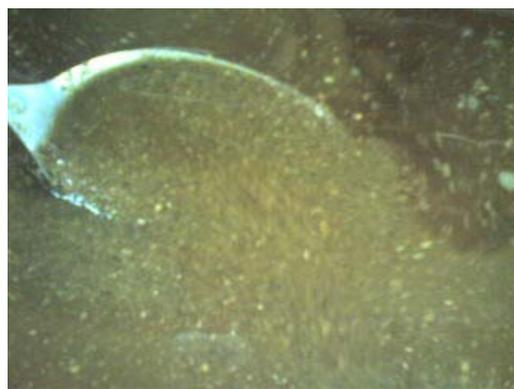


Figura 14: Harina de ejote de *E. americana* en solución de HCl al 1%. Se remueve para evitar la formación de hongos.

2.4 Análisis Químico Proximal

El análisis químico proximal se realizó de acuerdo a las técnicas descritas en el A.O.A.C. (2), las determinaciones fueron: humedad (925.09B), cenizas (923.03), proteína cruda (955.04), grasa cruda (920.39C) y fibra cruda (962.09E), las cuales se realizan por triplicado.

Por último los hidratos de carbono digeribles se calculan por diferencia:

$$\% \text{Hidratos de carbono} = 100 - (\% \text{humedad} + \% \text{cenizas} + \% \text{proteína} + \% \text{grasa} + \% \text{fibra})$$

2.5 Determinación de factores antinutricionales y tóxicos

*La preparación de soluciones se encuentran en el anexo A.

2.5.1 Determinación de lectinas (31)

Fundamento

La detección de hemaglutininas o lectinas en extractos de plantas se lleva a cabo con una técnica de diluciones seriadas en la cual se determina el punto final por una estimación visual de la aglutinación de los glóbulos rojos en estudio.

El método de microtitulación es rápido y requiere una mínima cantidad de muestra. Se necesita trabajar con glóbulos rojos lavados y activados con una solución de proteasa disponible (pronasa, tripsina o papaína), ya que la sensibilidad de la aglutinación se mejora considerablemente con este tratamiento.

Material y Reactivos

- Harina de ejote de ***E. americana***. (lote 1 y 2)
- Parrilla múltiple con agitación marca ***THERMOLINE***, Mod. 4
- Centrífuga marca Internacional Clinical Centrifuge, Mod. 5702
- Tubos de centrifuga de 15 mL con graduación
- Incubadora marca BLUE-M
- Espectrofotómetro marca ***SEQUOIA-TURNER***, mod. 340
- Adaptador para celdas de 10 x 75 mm (acondicionado a una abertura de 1 cm²)
- Microtiter Kit (Cook Eng-Alexander Virginia USA)
- Filtro de vidrio con fibra de vidrio
- Sangre de Hámster desfibrinada y lavada



- Solución anticoagulante (Anexo A.1)
- Solución salina al 1% (Anexo A.2)
- Solución salina al 0.9% (Anexo A.3)
- Solución de pronasa de *Streptomyces griseus* (sigma P-5147) al 0.2% en solución salina 0.9%.

Procedimiento

a) Preparación de la sangre:

Una vez que se sangra el animal, la sangre se coloca en un matraz pequeño que contiene solución anticoagulante (heparina 1mL), se agita suavemente para la completa homogeneización de la sangre con la solución anticoagulante. (No interrumpir hasta el momento de diluirla).

La sangre con anticoagulante se transvasa a tubos de centrifuga para lavarla 3 veces con solución salina al 0.9%. La relación sangre: solución salina es aproximadamente 1:5.

Se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos. Después del último lavado, se mide en el tubo de centrifuga, la cantidad del paquete de eritrocitos y se diluyen al 4% para lo cual se agregan por cada 1.0 mL de glóbulos rojos 24 mL de solución salina al 0.9%.

b) Preparación del extracto:

Una vez que se tiene la muestra finamente molida y con un contenido de grasa < 5%, se suspende 1 g en 10 mL de solución salina al 1%, se efectua una extracción con agitación mecánica durante 2 horas a 300 r.p.m. a la temperatura ambiente.

Después de este tiempo se centrifuga el extracto a 1400 r.p.m durante 15 minutos para eliminar el residuo insoluble; el sobrenadante se filtra a través del filtro de vidrio y se lava el residuo con más solución salina al 1%, para llevar el extracto filtrado al volumen inicial.



c) Sensibilización de los glóbulos rojos:

A cada 10 mL de suspensión de glóbulos rojos al 4% se les agrega 1 mL de solución de pronasa al 0.2% (en solución salina 0.9%) y se coloca en incubadora por espacio de 1 hora a 37° C.

Después del tiempo estipulado, se centrifuga para eliminar la enzima sobrenadante, dando además 4 lavados con solución salina 0.9%.

Después del último lavado se resuspende el paquete de glóbulos rojos al 4%, por lo cual cada 1.0 mL de paquete de eritrocitos se le adiciona 24 mL de solución salina 0.9%.

d) Ajuste de la suspensión de glóbulos rojos:

Se toma 1.0 mL de la suspensión de glóbulos rojos ya sensibilizados y se agregan 4.9 mL de solución salina al 0.9%. Se lee en el espectrofotómetro a 620 nm, se utiliza un adaptador de celdas que permite el paso de solo 1 cm² de luz y como blanco solución salina al 0.9%.

La lectura que se debe de obtener debe entrar entre 24-29% de transmitancia.

e) Microtitulación:

En las placas tipo "V" del microtiter, se coloca en cada pozo de una hilera 50 µL de solución salina al 0.9%.

En seguida, se llena por contacto con la superficie del extracto problema el microdilutor de 50 µL y se realizan las diluciones seriadas en la hilera escogida, introduciendo el microdilutor en el pozo y rotándola sin excesiva presión.

Por último, con un pipetero de gota se coloca en cada pozo 50 µL de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizados y ajustados. Después se rota la placa en forma circular y se lleva a la incubadora a 37° C por espacio de 1 hora.



f) Lectura:

Una vez que transcurrió el tiempo estipulado se coloca la placa de plástico sobre el dispositivo de lectura. Se observa a través del espejo el fondo de los pozos de cada hilera de prueba.

- **Aglutinación negativa:** se observa la formación de un punto rojo definido con un halo transparente.
- **Aglutinación positiva:** Se observa una turbidez rojiza, sin sedimentación de eritrocitos.

Se reporta la máxima dilución que presenta aglutinación.

*nota: cuando se trabaja con una sangre de alta sensibilidad (como Hámster o ratón) o un extracto de título alto, es conveniente realizar un mayor número de diluciones.

2.5.2 Determinación de Taninos ⁽²⁶⁾

Fundamento

Los taninos son compuestos pertenecientes a la familia de los polifenoles, y forman complejos con los iones de metales divalentes. El método se basa en la extracción de los taninos hidrolizables y condensados mediante dimetilformamida al 75% con la posterior reducción del ión férrico; debido a los polifenoles; con la subsiguiente formación de un complejo colorido en condiciones alcalinas, cuantificado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 525 nm.

Material y reactivos

- Harina de ejote de ***E. americana***. (lote 1 y 2)
- Espectrofotómetro marca **SEQUOIA-TURNER**, Mod. 340
- Parrilla múltiple con agitación marca **THERMOLINE**, Mod. SP-13025
- Centrífuga para tubos marca DYNAC
- Tubos de centrifuga con graduación de 50 mL
- Solución de dimetilformamida (DMF) al 75% (Anexo A.2)
- Solución estándar de ácido tánico (Anexo A.3)
- Solución citrato férrico de amonio (Anexo A.4)
- Hidróxido de amonio (Anexo A.5)
- Tubos de ensaye 16 x 150 mm
- Pipetas de 1, 5 y 10 mL
- Vasos de precipitados



Procedimiento

La metodología utilizada corresponde al método de determinación del contenido de taninos en sorgo ISO 9648-1988, con algunas modificaciones.

a) Preparación del extracto

Se pesa 1 g de la harina y se trasvasa cuantitativamente a un matraz Erlenmeyer de 125 mL. Se adicionan 25 mL de dimetilformamida al 75% y se agita en una parrilla durante una hora a 500 r.p.m. Transcurrido dicho tiempo, se deja en reposo 20 minutos. Se transfiere cuantitativamente el sobrenadante a un tubo de centrifuga. Se centrifuga a 3000 r.p.m durante 10 min. Se decanta cuidadosamente el sobrenadante, el cual se emplea para la determinación.

b) Preparación de la curva patrón

Se rotulan 7 matraces aforados de 25 mL y se agrega 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 mL del ácido tánico, respectivamente a cada matraz. Se afora con la solución de dimetilformamida al 75%.

Se rotulan 8 tubos de ensaye (del cero al 7), añadiendo al tubo cero 1 mL de la solución de dimetilformamida al 75%, al resto de los tubos se agrega 1 mL del matraz correspondiente. Se adicionan 5 mL de agua destilada a cada uno de los tubos y se agita. Se añade 1 mL de la solución de citrato férrico amoniacal a todos los tubos y se agita. Por último se agrega 1 mL de amoniaco a todos los tubos y se agita. Se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 525 nm.

c) Cuantificación

Se rotulan tres tubos (uno fue el blanco y dos la muestra problema), se agregan los reactivos de acuerdo a la siguiente tabla:

Tubo	Blanco	Problema 1	Problema 2
Muestra (mL)	0	1	1
Dimetilformamida al 75% (mL)	1	0	0
Agua destilada (mL)	6	5	5
Solución de citrato férrico amoniacal (mL)	-	1	1
Solución de amoniaco (mL)	1	1	1

* nota: se agitó después de cada adición



En cada adición se agita con vortex. Se lee la absorbancia a 525 nm. Se ajusta el espectrofotómetro con el blanco.

Se traza una gráfica de absorbancia vs μg de ácido tánico, se interpola el valor obtenido. El intervalo de concentración de ácido tánico de la curva patrón fue de 80 a 560 μg . Se reporta en % de taninos presentes en la muestra.

Cálculos

Se promedia el valor de los problemas. Se reporta como gramos de ácido tánico (A.T.) por 100 gramos de muestra (%).

$$\% \text{ A.T.} = \left(\frac{\mu\text{g A.T. } \uparrow}{1 \text{ mL de ext.}} \right) * \left(\frac{25 \text{ mL de ext.}}{\text{g de muestra}} \right) * \left(\frac{1 \text{ g de A.T.}}{10^6 \mu\text{g de A.T.}} \right) * 100$$

Donde:

\uparrow = corresponde a la interpolación del promedio de concentración de la muestra.

2.5.3 Inhibidores de Tripsina ⁽²⁷⁾

La técnica se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso (solución de NaOH 0.01N) de la muestra sobre una solución estándar de tripsina, y después de cierto tiempo se determina la actividad proteolítica remanente, por medio de un sustrato sintético N- α -Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA), el cual producirá una coloración amarilla que se lee en el espectrofotómetro a 410nm. Esta coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores en la muestra.

Material y reactivos

- Harina de ejote de ***E. americana***. (lote 1 y 2)
- Potenciómetro marca CORNING, mod. 10
- Parrilla múltiple con agitación marca **HERMOLINE**, mod. SP-13025
- Espectrofotómetro marca **SEQUOIA-TURNER**, Mod. 340
- Baño maría GRANT, mod. SE10
- Mezclador de tubos LAB-Line, mod. Super-mixer
- NaOH 0.01 N
- Solución amortiguadora de TRIS, pH 8.2 y 0.05 M (Anexo A.6)
- Solución BAPNA a 37° C (Anexo A.7)
- Ácido acético al 30%
- Solución estándar de tripsina a 37° C (Anexo A.8)



- HCl 0.001 N
- Tubos de ensaye de 16 x 150 mm
- Vasos de precipitado
- Buretas de 50 mL
- Centrifuga marca Internacional Clinical Centrifuge, Mod. 5702
- Tubos de centrifuga de 50 mL

Procedimiento

a) Preparación del extracto:

Se pesa 1 g de muestra finamente molida en un vaso de precipitado y se le adicionan 45 mL de NaOH 0.01 N, se ajusta el pH de esta suspensión a 9.6 ± 0.2 y se afora a 50 mL con NaOH 0.01 N. A continuación se transvasa a un vaso de precipitado que contenía un agitador magnético, se agita la suspensión mecánicamente en la parrilla de agitación por espacio de 2 ½ horas a 300 r.p.m. Después de dicho tiempo se quita el magneto y se transfiriere a un tubo de centrifuga. Se centrifuga a 3000 r.p.m durante 10 min. Se decanta el sobrenadante, el cual se emplea para la determinación. Un mL de este sobrenadante se diluye en 3 mL de NaOH 0.01N para la muestra destoxificada (lote 2), para el caso de la muestra sin destoxificar (lote 1) un mL del sobrenadante se diluye en 10 mL de NaOH 0.01N, dando una inhibición de 40-60%.

b) Determinación de la actividad:

En la tabla 6 se muestra en forma esquemática la serie de tubos que se preparan para poder medir la actividad inhibitoria de la muestra. Las proporciones del extracto diluido se adicionan a los tubos de ensaye por duplicado y se ajusta el volumen a 2 mL con agua destilada. Se les adiciona 2 mL de solución estándar de tripsina (atemperada a 37° C), se agita cada tubo en vortex y se introducen en baño maría (37° C) durante 10 min. (Exactos medidos con cronómetro). Pasado el tiempo se les adiciona 5 mL de solución BAPNA (atemperada a 37° C) a cada tubo, se agita cada tubo en vortex y se introducen en baño maría (37° C) durante 10 min. (con cronómetro). Después de los 10 min. se les adiciona 1 mL de ácido acético a cada tubo, se agitan en vortex logrando una homogeneización inmediata para detener la reacción enzimática. Algunos tubos presentan turbiedad por lo que se filtran con papel Whatman No 1.



Tabla 6: Adición de reactivos (mL)

Tubo	Extracto	Agua	Tripsina	BAPNA	Ácido acético al 30%
1	1.8	0.2	2.0	5.0	1.0
2	1.4	0.6	2.0	5.0	1.0
B3	1.0	1.0	2.0 + 1 mL Ac.	5.0	-----
3	1.0	1.0	2.0	5.0	1.0
4	0.6	1.4	2.0	5.0	1.0
BR	0.0	2.0	2.0 + 1 mL Ac.	5.0	-----
R	0.0	2.0	2.0	5.0	1.0

*nota: solo se realizaron 2 blancos (BR y B3) debido a que se diluyó la muestra, por lo que BR es el blanco de R y del tubo 4. El tubo B3 es el blanco de los tubos 3, 2 y 1.

B= blanco

Ac= Ácido acético al 30%

R= Referencia

La lectura en el espectrofotómetro se realiza a 410 nm y es necesario ajustar el equipo a 100% de transmitancia con su respectivo blanco.

Cálculos:

La lectura de absorbancia (A), se pasa directamente a unidades de tripsina (UT), de la siguiente manera:

$$UT.= A \times 100$$

Ya que se tuvo una serie de alícuotas del extracto, se calcula los valores de UT., los cuales al restarle este valor al dato de referencia, se obtienen los valores de tripsina inhibida (UTI.) y por consiguiente se calcula el valor de UTI/mL de cada una de las alícuotas.

Al realizarse la gráfica de la actividad enzimática inhibitoria (UTI/mL) como función de la alícuota del extracto se obtiene el valor extrapolado correspondiente al cero de la solución inhibitoria. Este dato es el más cercano a la actividad inhibitoria verdadera o real.

Los resultados se expresan como unidades de inhibición con respecto a 1 mg de muestra, de la siguiente forma:

$$\frac{\text{UTI}}{\text{mg muestra}} = (B) \left(\frac{\text{aforo}}{\text{alícuota}} \right) \left(\frac{50 \text{ mL}}{\text{mg muestra}} \right)$$

B= valor extrapolado o promedio (UTI)



2.6 Cuantificación de alcaloides por titulación

Para la cuantificación de alcaloides se siguió la técnica de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos del 2000, modificada por Moreno, 2001⁽³⁸⁾. Se cuantifican los alcaloides por triplicado en la harina de ejote de colorín sin destoxificar y destoxificado (lote 1 y 2).

Fundamento

Se basa en la extracción de los alcaloides, aprovechando sus propiedades de solubilidad en un sistema de disolventes y su posterior valoración, por volumetría, empleando un ácido valorado. Esto puede realizarse debido a las propiedades básicas de los alcaloides.

Reactivos

- Harina de ejote de ***E. americana***. (lote 1 y 2)
- H₂SO₄ 0.02 N valorado (hasta la cuarta cifra decimal)
- Solución indicadora, Rojo de metilo
- H₂SO₄ 1 N (p=1.84g/mL)
- NH₄OH (hidróxido de amônio) concentrado
- Sulfato de sodio Anhidro
- Metanol Q.P (para extracción)
- Metanol R.A. (para titulación)
- Éter etílico R.A
- Cloroformo R.A

Procedimiento

1. Se pesan 5 g de muestra harina de ejote de ***E. americana***.
2. Se adicionan 50 mL de metanol previamente alcalinizado a pH 8-9, con NH₄OH
3. Se agita (300-500 r.p.m) durante 8 horas, y después se filtra con ayuda de vacío usando papel Whatman No. 541
4. Al residuo se le adicionan nuevamente 50 mL de metanol alcalinizado y se agita 16 horas más. El filtrado se guarda en refrigeración.
5. Se filtra con ayuda de vacío (en el mismo embudo y con el mismo papel del día anterior), recibiendo el filtrado en el matraz que se guarda en refrigeración. Se lava el vaso y el residuo con 20 mL de metanol alcalinizado.
6. Se evapora el disolvente por medio de rotavapor (T=50° C).
7. Se disuelve el extracto en 15 mL de éter y 5 mL de H₂SO₄ 1 N.



8. Se filtra a través de papel Whatman No 541, recibiendo en un embudo de separación. Se extrae, recuperando la fase acuosa (inferior)
9. Se extraen tres veces la fase orgánica (superior) con 5 mL de H₂SO₄ 1 N cada vez. Se juntan las fases acuosas con la anterior y se vierten en un embudo de separación.
10. Se adicionan 25 mL de cloroformo y se extrae, recuperando la fase acuosa (superior)
11. Se extraen tres veces la fase orgánica (inferior) con 5 mL de agua y 5 mL de ácido cada vez. Se juntan las fases acuosas con la anterior y se extraen dos veces con 10 mL de cloroformo.
12. Se recupera la fase acuosa (superior) y se filtra a través de papel Whatman No. 2, enjuagando el papel y el embudo con 2 mL de agua.
13. Se alcaliniza con NH₄OH concentrado hasta un pH de 9 ó mayor.
14. Se extraen tres veces con 35 mL de cloroformo cada vez, recuperando la fase orgánica (inferior)
15. Se secan con sulfato de sodio anhidro y se evapora en rotavapor (T=40 °C).
16. Se redissuelve el residuo con 3 mL de metanol (agregando un mL a la vez), trasvasando cuantitativamente a un matraz Erlenmeyer que contenía 7 mL de agua destilada.
17. Se adiciona una gota de indicador rojo de metilo y se titula con H₂SO₄ valorado, con ayuda de una bureta de microtitulación.

***Nota:** esta es una determinación cuantitativa, así que se enjuaga el material empleado con disolventes adecuados en cada paso.

Cálculos

Se reporta como β-eritroidina

$$\frac{\text{g de } \beta\text{-eritroidina}}{100 \text{ g de muestra}} = \frac{(\text{mL H}_2\text{SO}_4 \text{ muestra} - \text{mL H}_2\text{SO}_4 \text{ blanco}) (\text{N H}_2\text{SO}_4) (0.273^{**}) (100)}{(\text{g de muestra})}$$

* El blanco se prepara con 7 mL de agua destilada y 3 mL de metanol

** meq de β-eritroidina = peso molecular de la β-eritroidina/ 1000



2.7 Evaluación de la calidad proteínica

Se valora la calidad de la proteína de las muestras por métodos biológicos:

- Ⓢ Relación de Eficiencia de la proteína (REP)
- Ⓢ Digestibilidad (Da)

En la realización de las pruebas biológicas se consideran los siguientes criterios.

Animales:

Se emplean ratas machos recién destetadas de la raza Sprague Dawley de 21 días de edad con un peso de 35 ± 5 g (6 por cada lote) colocadas en jaulas individuales, distribuidas mediante la técnica de la culebra japonesa (Anexo B).

Condiciones experimentales:

- Temperatura: 20-25° C
- Iluminación: 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad
- Alimentación: dieta respectiva de cada lote y agua *ad libitum*
- Tiempo de experimentación: 21 días para el REP

Material y Reactivos

- Rack para jaulas individuales
- Balanza analítica
- Balanza granataria para animales de laboratorio
- Comederos para ratas
- Bebederos
- Charolas de papel
- Caseína 901293 MP Biomedicals (94.3% proteína)
- Glucosa Anhidra USP (Comercial Química BARSÁ)
- Mezcla de sales (minerales) 902842 MP Biomedicals
- Mezcla de vitaminas 904654 MP Biomedicals
- Fuente de proteína (harina de colorín destoxificada y avena)
- Dextrina comercial (Maizena) ®
- Sacarosa Comercial SALML ®
- Aceite vegetal (Mazola) ®
- Manteca vegetal (INCA) ®



2.7.1 Relación de la eficiencia de la proteína (REP) ⁽⁴⁰⁾

Fundamento

El método se basa en que el incremento en peso de ratas alimentadas con una dieta, bajo condiciones estandarizadas es una medida confiable del valor nutricional de una dieta proteínica. En esta prueba se relaciona la ganancia en peso del animal de prueba con la proteína consumida, asumiendo que el incremento en peso es exclusivo del nitrógeno ingerido.

Procedimiento

a) Preparación de las dietas:

Se preparan 3 dietas: Control (elaborada a base de caseína), Colorín (elaborado a base de harina de ejote de colorín destoxificado lote 2) y Colorín/Avena en una proporción de 50:50 en relación al nivel de proteína (elaborado a base de harina de ejote de colorín destoxificado lote 2 y harina de avena comercial). Debido a la alta proporción de fibra que contiene la harina del ejote de colorín se intenta que las dietas sean isoproteínicas e isocalóricas a la dieta control (caseína) con 10% proteína y 432 Kcal/100g dieta, sin embargo solo se logra que sean isoproteínicas ya que el aporte energético se encontraba por debajo del valor. La composición de las dietas se muestra a continuación:

Tabla 7: Composición de las dietas experimentales (g/100g)

Componente	Control (g/100 g dieta)	Colorín (g/100 g de dieta)	Colorín/Avena (g/100 g de dieta)
Caseína (94.3% prot.)	10.5	--	--
Harina de ejote destoxificado (15.4% Prot.)	--	67.5	33.8
Avena (11.4 % prot.)	--	--	44.0
Sacarosa Comercial SALML®	22.0	5.9	2.8
Glucosa Anhidra	19.0	5.1	2.5
Dextrina (Maizena)®	25.0	6.7	3.2
Manteca Vegetal (INCA)®	8.0	9.5	8.3
Aceite Vegetal (Mazola)®	6.0	7.1	6.2
Mezcla de sales	4.0	1.3	2.0
Mezcla de vitaminas	2.0	2.0	2.0
Celulosa comercial	3.5	---	---
Aporte energético (Kcal/100g dieta)	432	410	422



b) Desarrollo de la prueba:

Una vez que se tienen los diferentes lotes, se le coloca a cada animal su respectivo alimento (previamente pesado) y agua *ad libitum*. Ya que las ratas al comer tienden a desperdiciar alimento, se coloca debajo de la jaula una charola de papel para recuperar el alimento desperdiciado. Cada tercer día se registra el peso de cada rata y el alimento ingerido, restando a éste el alimento desperdiciado. El experimento dura 21 días. (Anexo C).

c) Cálculos:

Se calcula el REP para cada una de las ratas utilizando la siguiente ecuación:

$$REP_i = \frac{\Delta P_i}{\sum A_{li} * F}$$

REP_i: relación de la eficiencia de la proteína individual

ΔP_i= incremento de peso individual

ΣA_{li} = alimento ingerido total individual

F = % de proteína en la dieta/100

Con los valores individuales, se procede a calcular el REP promedio y el coeficiente de variación (CV en %) del lote en estudio.

$$X = \frac{\sum REP_i}{n}$$

X = REP promedio

ΣREP_i: suma de los REP individuales

n: número de datos

$$CV = [\sigma/X] * 100$$

σ = desviación estándar

X = REP promedio

Para que los datos puedan ser comparados, se expresan en valores de REP ajustado, es decir, se toma como referencia el valor de 2.5 para la dieta de caseína.

$$REP \text{ ajustado} = REP \text{ exp} * \frac{REP \text{ caseína (ref)}}{REP \text{ caseína (exp)}}$$

Se traza una gráfica de curva de crecimiento (tiempo vs. Incremento de peso acumulado) para observar el crecimiento de los lotes de los animales en estudio con respecto al lote control.



2.7.2 Digestibilidad aparente (Da) ⁽⁴⁰⁾

Fundamento

La evaluación de la digestibilidad de proteínas *in vivo* se basa en suministrar una dieta que contenga la muestra en estudio como única fuente de proteína a los animales experimentales, de los cuales se determina la cantidad de nitrógeno absorbido mediante la diferencia del ingerido y el eliminado por heces, sin considerar el nitrógeno endógeno.

Material y Reactivos

- Diseño experimental del bioensayo de REP
- Equipo y reactivos necesarios para MicroKjeldahl
- Envases de plástico de boca ancha
- Mortero con pistilo
- Estufa de circulación forzada marca LAB-LINE mod. Impereal III
- Balanza analítica

Procedimiento

Del bioensayo de la evaluación de la calidad de una fuente de proteína (REP), se recolectan las heces y se registra el alimento ingerido en forma individual de los animales, durante los últimos ocho días del bioensayo. El total de heces de cada animal en el periodo indicado, se secan, pesan y muelen para obtener el material lo más homogéneo posible; se toma una muestra representativa del total de heces para determinar la concentración de nitrógeno por MicroKjeldahl.

Cálculos

Se calcula el contenido de nitrógeno ingerido individual (N_{li}) y el nitrógeno fecal individual (N_{fi}) de cada animal de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$N_{li} = (\%N \text{ dieta} * \text{Dieta ingerida expresada en g}) / 100$$

$$N_{fi} = (\% N \text{ heces} * \text{Total heces expresada en g}) / 100$$



La ecuación para calcular la Digestibilidad aparente individual (Dai) es:

$$Dai = \frac{Nli - Nfi}{Nli} * 100$$

Se reporta el valor promedio de digestibilidad aparente de cada lote con su desviación estándar y CV (Anexo D).

$$Da \text{ prom.} = \frac{\sum Dai}{n}$$

Da prom. = Da promedio

$\sum Dai$: suma de los Da individuales

n: número de datos

$$CV = [\sigma/X] * 100$$

σ = desviación estándar

X = Da promedio



Capítulo 3



Resultados y Discusión

3.1.- Análisis Proximal

En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos del análisis químico proximal del ejote y ejote remojado en agua acidulada en base húmeda, donde se observa un alto contenido de agua en el ejote como es el caso de la mayoría de las legumbres o frutos inmaduros (~80% de agua) y por lo tanto un bajo aporte de nutrimentos. Con el remojo en HCl al 1% se puede observar que hay una disminución de todos los nutrimentos.

Tabla 8: Análisis químico proximal del ejote de *Erythrina americana* sin tratamiento y destoxificado. (g/100 g muestra en base húmeda)¹

Muestra	Humedad gruesa	Proteína	Lípidos	Cenizas	Fibra	Hidratos de carbono ²
ejote sin tratamiento	85.09 ± 4.25	2.60 ± 0.84	0.51 ± 0.10	0.93 ± 0.05	4.16 ± 0.08	6.71
ejote destoxificado*	87.68 ± 0.45	1.90 ± 0.10	0.28 ± 0.15	0.51 ± 0.03	3.13 ± 0.31	6.50

¹ el dato representa el promedio ± desviación estándar de un triplicado, C.V. < 5%

² los hidratos de carbono se calcularon por diferencia.

* Después del remojo de la harina del ejote de *E. americana*, ésta se secó y se molió para realizar el análisis químico proximal.

Para una mejor comparación, en la tabla 9 se muestran los resultados de la harina de ejote con tratamiento y destoxificado en base seca, en donde se observa un contenido bajo en la concentración de proteína en las dos harinas, con respecto a lo informado en otros trabajos para el ejote del colorín donde se reporta un valor de 24.38% ⁽⁴⁵⁾, siendo la harina de ejote sin tratamiento el que presenta la



mayor concentración de proteína, grasa, cenizas y fibra. Sin embargo el contenido total proteínico de las leguminosas oscila entre el 18-25 % ⁽³⁾ por lo que el valor obtenido se encuentra dentro de lo esperado.

Tabla 9: Análisis químico proximal de las muestras del ejote de *Erythrina americana* sin tratamiento y destoxificado. (g/100 g muestra en base seca)¹

Muestra	Proteína	Lípidos	Cenizas	Fibra	Hidratos de carbono ²
Harina del ejote sin tratamiento	17.41 ± 0.84	3.42 ± 0.10	6.22 ± 0.05	27.90 ± 0.08	45.05
Harina del ejote destoxificado*	15.37 ± 0.10	2.25 ± 0.15	4.14 ± 0.03	25.42 ± 0.31	52.82
% de disminución con el tratamiento	11.72	34.21	33.44	8.89	

¹los datos representan los promedios ± desviación estándar de un triplicado, C.V. < 5%

²los hidratos de carbono se calcularon por diferencia.

* Después del remojo de la harina del ejote del *E. americana*, ésta se secó y se molió para realizar en análisis químico proximal.

El remojo con agua acidulada probablemente arrastró algunas fracciones de éstos nutrimentos en donde vemos que para el caso de la proteína solo disminuye un 11.72% ya que la pérdida de lípidos y cenizas se encuentra alrededor del 30%. Para el caso de la fibra la pérdida es de 8.89%, a lo que se le atribuye como una pérdida de fibra soluble, sin embargo la concentración de fibra y cenizas se encuentra dentro de lo informado en el ejote para otros trabajos utilizando un método similar⁽⁴⁵⁾. Los hidratos de carbono aumentaron con el tratamiento debido a que cambia la proporción de los demás nutrimentos. A pesar de que la vaina del ejote aporta un alto contenido de fibra teniendo un efecto diluyente en el contenido de proteína ⁽⁴⁵⁾, éste se considera alto en comparación con el de algunos cereales (12% proteína). ⁽³⁾.

Los métodos de destoxificación como ya hemos visto pueden afectar el contenido de nutrimentos en las muestras, es por eso que en la tabla 1.3 se muestra el análisis químico proximal; en base seca; de la harina del ejote sin tratamiento y destoxificado por diferentes métodos propuesto en trabajos anteriores, con el fin de comparar la disminución de los nutrimentos y eficiencia de los métodos.



Tabla 10: Análisis químico proximal de las muestras del ejote de *Erythrina americana* sin tratamiento y destoxificado por dos métodos diferentes. (g/100 g muestra en base seca)¹

Muestra	Método de destoxificación	Proteína	Lípidos	Cenizas	Fibra	Hidratos de carbono ²
Ejote	Crudo ₁₂ (sin cocción)	24.38 ± 1.01	6.11 ± 0.27	6.64 ± 0.09	26.14 ± 1.04	36.73
	Tratamiento Térmico (cocción con agua hirviendo 2 hrs.) ₁₂	23.12 ± 1.01	6.64 ± 0.38	4.27 ± 0.37	31.80 ± 2.15	34.17
	Sin tratamiento*	17.41 ± 0.84	3.42 ± 0.10	6.22 ± 0.05	27.90 ± 0.08	45.05
	Doble remojo en HCl al 1% (48 hrs)*	15.37 ± 0.10	2.25 ± 0.15	4.14 ± 0.03	25.42 ± 0.31	52.82

¹los datos representan los promedios ± desviación estándar de un triplicado, C.V. < 5%

²los hidratos de carbono se calcularon por diferencia.

*resultados de éste trabajo

En ésta se observa que las dos determinaciones del análisis químico proximal para los ejotes sin destoxificar son diferentes, teniendo una mayor concentración de proteína y lípidos el ejote informado en trabajos anteriores (18), que en éste. Esto pudo ser debido a la diferencia en la maduración del ejote, tanto de vainas como de las semillas, sin embargo en los dos trabajos se reporta que los ejotes se encuentran en la fase I de maduración fisiológica pero entre más maduro se encuentre el ejote la concentración de nutrimentos aumenta. (41).

Para una mejor visualización de la comparación del análisis proximal de las muestras, en la figura 15 se presenta una representación de barras en donde se puede observar que el ejote que recibió el tratamiento térmico tuvo una disminución del 5.16 % en proteína con un aumento de lípidos, fibra y hidratos de carbono. Las cenizas fueron lo que más se afectó ya que la disminución si es bastante significativa, sin embargo el tratamiento térmico mantiene el nivel de nutrimentos iniciales por lo que es un buen método. El ejote que recibió doble remojo en HCl tuvo una disminución muy grande de todos los nutrimentos a excepción de hidratos de carbono; que como ya se mencionó anteriormente estos aumentan porque cambia la concentración de los demás nutrimentos. Con el tratamiento térmico la disminución en proteína fue de 5.16% y con el doble remojo en agua acidulada fue de 11.72%,



por lo que el doble remojo en agua acidulada remueve un mayor nivel de la fracción proteínica en comparación con el tratamiento térmico.

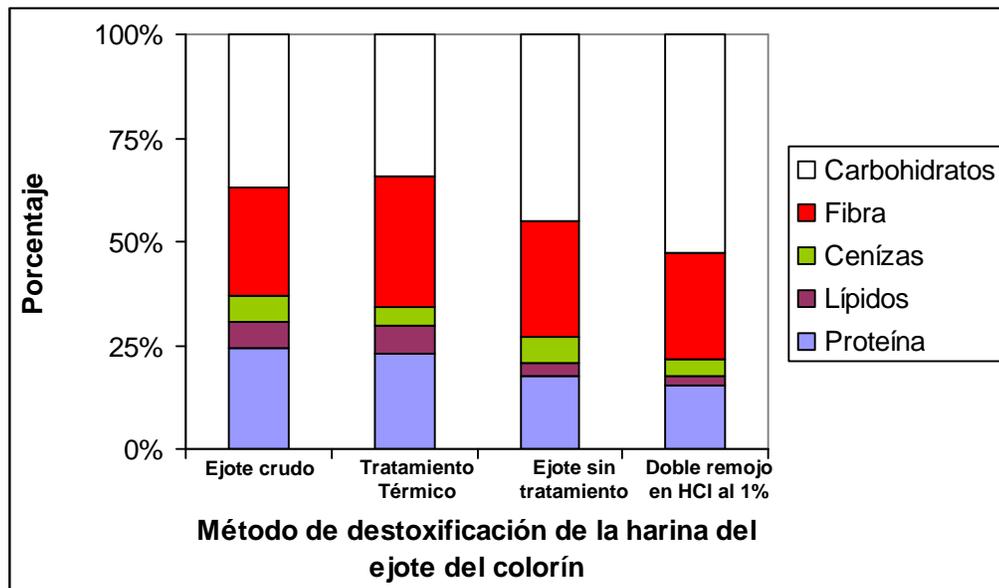


Figura 15: Caracterización Bromatológica de las muestras de *Erythrina americana* por diferentes métodos de destoxificación (base seca).

2.- Cuantificación de Factores tóxicos y antinutricionales

En la tabla 11 se muestran los resultados de los factores tóxicos y antinutricionales presentes en el ejote, así como el ejote remojado.

Tabla 11: Factores tóxicos y antinutricionales contenidos en el ejote sin tratamiento y destoxificado.*

Muestra	Lectinas Título **	Taninos (Ác. Tánico g / 100 g muestra)	Inhibidores de tripsina (UTI/mg de muestra)
Harina del ejote sin tratamiento	3	0.18 ± 0.01	23.53 ± 0.52
Harina del ejote Destoxificada	4	0.35 ± 0.01	8.39 ± 0.81

* Los datos representan los promedios ± desviación estándar de un triplicado, C.V. < 5%

** Título: la máxima dilución a la cual se encontró aglutinación



No hay un valor reportado en la concentración de taninos el cual tenga un efecto nocivo para la salud, sin embargo se ha observado que una concentración mayor al 2% de ácido tánico disminuye la ingestión del alimento, así como la digestibilidad de los compuestos nitrogenados ⁽²⁵⁾. La concentración de taninos en el ejote aumentó con el tratamiento ácido, sin embargo ésta concentración no se considera dañina para la salud ya que se encuentra por debajo de lo reportado en el frijol común de color negro (*Phaseolus vulgaris*) el cual contiene 1.26% de ácido tánico y el frijol colorado 1.42% ⁽⁸⁾, siendo este un alimento de consumo principal en la dieta de nuestro país.

La concentración de lectinas aumenta en un título con el doble remojo en agua acidulada, esto pudo ser debido a que con el ácido las lectinas quedan más expuestas y actúan más sobre los glóbulos rojos, sin embargo se determinó con una prueba semicuantitativa y los títulos obtenidos se consideran semejantes en la harina del ejote sin tratamiento y destoxificada. El contenido de lectinas en el ejote es relativamente bajo, ya que con un título > 10 se considera un alimento riesgoso para la salud, sin embargo no todas las lectinas son tóxicas; por lo que estos títulos obtenidos en el ejote se consideran de bajo riesgo para la salud.

Con respecto a los inhibidores de tripsina en la tabla 11 se observa que la harina del ejote sin tratamiento contiene un contenido significativo de inhibidores (23.53 UTI/mg muestra), ya que un contenido mayor de 10 UTI/mg de muestra, se considera un alimento dañino, sin embargo el valor obtenido es bajo con respecto a lo reportado para la semilla inmadura cruda (88.43 UTI/mg de muestra), por lo que la vaina inmadura del ejote sirve como diluyente del contenido de inhibidores ⁽¹⁸⁾. El remojo en agua acidulada arrastra a los inhibidores de tripsina, disminuyéndolos un 64.36%, dejándolo en un valor < 10 UTI/mg muestra, por lo que se considera no dañino. Ésta reducción la se puede relacionar con la disminución de proteína obtenida en el análisis químico proximal (tabla 9) debido a que los inhibidores de tripsina son proteínas, por lo que se puede decir que lo que se pierde de proteína son inhibidores de tripsina.



3.- Cuantificación de Alcaloides

La técnica de la Farmacopea modificada por Moreno en el año 2001 ⁽¹⁶⁾ permitió cuantificar los alcaloides totales en las 2 harinas: ejote y ejote remojado en agua acidulada. Se reporta como g β eritroidina/100 g muestra, debido a que se sabe que la mayor concentración de alcaloides es de β eritroidina.

Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 12, en la cual se observa que la cantidad de alcaloides es menor que la reportada en otros trabajos donde se obtienen concentraciones de hasta 1% ⁽³⁸⁾, esto se debe a que fueron determinados por métodos cromatográficos.

Tabla 12: Cuantificación de alcaloides en muestras de ejotes de *E. americana* sin tratamiento y destoxificados. (β eritroidina g/100 g harina)*

Muestra	(β eritroidina g/100 g muestra B.H)*	(β eritroidina g/100 g muestra B.S)*
Harina del ejote sin tratamiento	0.39 \pm 0.012	0.41 \pm 0.012
Harina del ejote Destoxificada	0.26 \pm 0.02	0.27 \pm 0.02
% de alcaloides eliminado	32.00%	33.66%

* Los datos representan los promedios \pm desviación estándar de un triplicado, C.V. < 10%

Considerando los valores en base seca se observa que la concentración de alcaloides disminuye un 33.66% con el tratamiento ácido, debido a que al estar en forma de sales, dichos compuestos se pueden solubilizar en la solución ácida. Algunas especies de lupinos pueden contener 2% o más de alcaloides totales en la semilla seca, el consumo de éstas como principal componente en la dieta podría ser fatal; sin embargo, el rango máximo permitido del contenido de alcaloides en estas especies es de 0.02% ⁽⁵⁾, por lo que la harina de ejote sin tratamiento y destoxificada sobrepasan el límite permitido para lupinos. Por otro lado la dosis letal media por vía oral para el ejote del colorín es de 78 000 mg/kg de peso corporal, con un contenido de alcaloides de 0.67 g β eritroidina/100 g muestra, lo que nos dice que el ejote con esa concentración de alcaloides puede considerarse inocuo a corto plazo, dada su alta dosis⁽³⁸⁾ y por lo tanto al darnos una concentración de 0.27 g β eritroidina/100 g muestra, utilizando el doble remojo en agua acidulada, la harina de ejote destoxificada puede considerarse no dañina en estudios de toxicidad subaguda.



Con respecto a la eficiencia del método de destoxificación, en la tabla 13 se observan los valores de alcaloides obtenidos antes y después de destoxificar al ejote del colorín por métodos diferentes, utilizando la misma técnica de la farmacopea modificada por Moreno 2001.

Tabla 13: Cuantificación de alcaloides en ejote de *E. americana* antes y después de la destoxificación por diferentes métodos.
(Alcaloides g/100 g muestra B.S.)

Muestra / Método de destoxificación	Tratamiento Térmico (cocción con agua hirviendo 1 hrs.) ⁽¹²⁾	Doble remojo en HCl al 1% (48 hrs.)
Harina de ejote sin tratamiento	0.669 ± 0.038	0.41 ± 0.012
Harina de ejote destoxificado	0.301 ± 0.023	0.27 ± 0.02
% alcaloides eliminados	55.01%	33.66%

El tratamiento térmico eliminó un 55.01% de los alcaloides en la harina del ejote y el doble remojo en agua acidulada solo eliminó un 33.66% por lo que el método propuesto en este trabajo es menos eficiente que el tratamiento térmico.

4.- Evaluación de la calidad proteínica

Los resultados de la calidad proteínica se presentan por cada método empleado.

4.1. Relación de la eficiencia proteínica (REP)

Para la realización de esta técnica se utilizaron 3 dietas: Control (elaborada a base de caseína), Colorín (elaborado a base de harina de ejote de colorín destoxificado lote 2) y Colorín/Avena en una proporción de 50:50 (elaborado a base de harina de ejote de colorín destoxificado lote 2 y harina de avena comercial).

En este bioensayo, las ratas alimentadas con la dieta de Colorín a base de harina de colorín destoxificado, ingirieron muy poca cantidad de alimento < 5 g por día comparado con caseína, con lo anterior fueron bajando de peso y presentaron síntomas clínicos anormales como: hiperactividad (movimientos rápidos y bruscos),



agresividad, euforia, piloerección (erección del pelo) y ataxia (la inseguridad de movimiento como consecuencia de la falta de movimientos coordinados) ⁽¹⁸⁾, provocando así la muerte entre el 4 – 7 día del ensayo, lo cual se atribuye a los alcaloides (0.27 g β eritroidina/100 g muestra B.S) ya que tienen efectos sobre el sistema nervioso central, por lo que el REP no fue posible calcularlo para esta dieta. La hiperactividad, euforia y agresividad no se consideran síntomas de los alcaloides en la dieta de Colorín ya que estos tienen efecto sedante, sino a la falta de alimento.

A continuación se muestra el incremento en peso acumulado por las ratas alimentadas con las dietas experimentales y control (tabla 14), en ésta se observa que hay una mayor ganancia en peso en la dieta control (caseína), que en la dieta de Colorín – Avena (50:50).

Tabla 14: Incremento en peso de las ratas alimentadas con las diferentes dietas (Gramos)

Dieta/Día	2	4	7	9	11	14	16	18	21
Referencia	3.10 ±	7.45 ±	15.78 ±	21.35 ±	29.10 ±	38.67 ±	41.65 ±	45.85 ±	50.65 ±
Caseína*	1.20	1.63	3.95	3.98	4.93	5.90	5.10	4.44	5.64
Colorín –Avena (50:50)*	-0.67 ±	2.25 ±	8.82 ±	10.67 ±	14.27 ±	17.75 ±	20.38 ±	23.13 ±	26.57 ±
	0.74	1.47	1.28	0.68	1.30	1.79	2.24	2.51	3.14

* Los resultados son el promedio \pm D.E.

Las ratas alimentadas con caseína son las que presentan un mayor incremento en peso en comparación con las de colorín-avena, sin embargo presentaron piloerección (figura 16) y su aspecto era más anormal que las de colorín-avena las cuales tenían un pelo más suave y brillante (figuras 17 y figura 18).





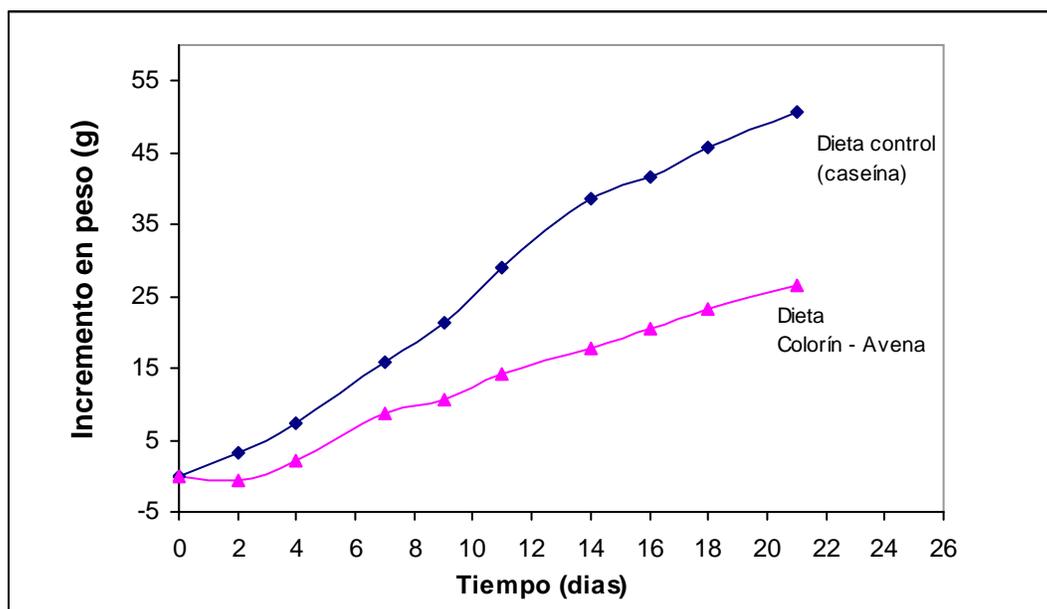
Figura 16: Rata alimentada con caseína.



Figura 17: Rata alimentada con colorín-Avena.

Figura 18: Arriba: Rata alimentada con Colorín-Avena.
Abajo: rata alimentada con Caseína (piloerección).

No obstante un aspecto anormal en el pelo de los animales alimentados con la dieta de referencia (caseína), éstos mostraron un mayor incremento de peso que los alimentados con la dieta de Colorín-Avena (50:50), como se puede observar en las curvas de crecimiento, figura 19.

Figura 19: Comparación del crecimiento de ratas alimentadas con *Erythrina americana*

De la figura 19 se puede observar que la dieta de colorín – avena en un principio hay una ligera disminución del peso pero después la ganancia de peso muestra una curva ascendente de crecimiento con tendencia al control pero de menor pendiente lo cual se le puede atribuir a la avena, ya que además de que aporta un alto contenido de nutrimentos disminuye en un $\approx 50\%$ la cantidad de alcaloides y de inhibidores de tripsina en comparación con la harina del ejote de colorín destoxificado. Los animales alimentados con colorín-avena no mostraron la sintomatología de los animales alimentados con la dieta de colorín, sin embargo el pelo era más blanco y suave y presentaban un comportamiento más tranquilo que el de la dieta de caseína debido a los efectos de los alcaloides, ya que también produce sedación en cantidades alrededor del 0.1%.

Los valores del REP se muestran en la tabla 15 donde se observa el valor de $REP_{ajustado}$ de la muestra la cual se encuentra dentro del rango estimado para una leguminosa que es 0.9 – 2.1 ⁽⁵⁾.

Tabla 15: Resultados de la Relación de Eficiencia Proteica en la dieta Colorín-Avena

Fuente de proteína de las dietas	$REP_{promedio}^*$	$REP_{ajustado}$
Caseína	3.41 ± 0.10	2.5
Ejote de colorín destoxificado	**	**
Ejote de Colorín destoxificado-Avena	2.32 ± 0.13	1.70 ± 0.09

* Los datos que se presentan son los promedios \pm desv. est. de sextuplicados, C.V.< 10%.

** No se determinó debido a que los animales murieron antes de finalizar el periodo de experimentación.

Nota: datos se encuentran en el anexo C

La destoxificación con doble remojo en agua acidulada afecta la composición de aminoácidos en el ejote estimando una calificación química ≈ 46 ⁽¹⁸⁾, lo cual es normal ya que cumple con el rango estimado para las leguminosas (30 -55) ⁽¹⁵⁾. Es por eso que la dieta de colorín-avena presenta un $REP_{ajustado}$ dentro del valor promedio de las leguminosas (0.9 – 2.1), sin embargo se esperaba un REP arriba de lo obtenido debido a que la avena aporta una proteína de buena calidad y en ningún momento es afectada por el tratamiento.



4.2. Digestibilidad aparente (Da)

Los valores de digestibilidad aparente se muestran en la tabla 16, en donde solo se determino para la dieta control y la dieta colorín-avena ya que para la dieta de colorín solo los animales no sobrevivieron.

Tabla 16: Digestibilidad aparente (%)

Dietas	% Da *
Caseína	94.91 ± 1.67
Ejote de colorín destoxificado	**
Ejote de Colorín destoxificado-Avena	85.41 ± 1.66

* Los datos que se presentan son los promedios ± desv. est. n= 12, C.V.< 5%.

** No se determino debido a que los animales murieron antes de finalizar el periodo de experimentación.

Nota: los datos se encuentran en el anexo D

La digestibilidad de la judía *Phaseolus vulgaris* oscila entre 77-92% ⁽³⁶⁾, por lo que el valor de digestibilidad obtenido en la dieta a base de ejote de colorín destoxificado-avena se encuentra dentro del rango, indicándonos una buena disponibilidad de los aminoácidos a pesar del alto contenido de fibra aportado por la vaina del ejote de *Erythrina americana*, el cual interfiere en la absorción de nutrientes debido a que acelera el tránsito del alimento a través del intestino, pero que a la vez nos aporta beneficios disminuyendo la absorción de algunos tóxicos como los alcaloides ^(15, 42).

Por otro lado la digestibilidad de la avena en el ser humano es de 86 % ^(44, 30) el cual es muy cercano al valor obtenido en nuestra dieta indicándonos que la harina de ejote de colorín destoxificada no afecta en la digestibilidad de los nutrimentos aportados por la avena pero tampoco se ve aumentada, por lo que mantiene la calidad de éste cereal. Es por eso que utilizando harina de ejote de colorín destoxificada se puede complementar algún alimento animal a base de cereal para reducir costos manteniendo un alto nivel de calidad nutrimental.



Conclusiones

- La destoxificación en agua acidulada con HCl 1% del ejote de ***Erythrina americana*** no mostró modificaciones considerables en el contenido de proteína, transfiriendo algunos componentes a la solución ácida, la cual se reflejó en la disminución del porcentaje de proteína en las muestras.
- El contenido residual de los taninos, lectinas e inhibidores de tripsina en el ejote destoxificado no se considera riesgoso para la salud.
- El lavado acidulado es un buen método económico de destoxificación, ya que se logró disminuir un 33.66% de los alcaloides contenidos en el ejote.
- La concentración de alcaloides no se redujeron lo suficiente ya que la dieta a base de ejote de colorín destoxificado es dañina para la salud.
- La proteína vegetal aportada en la dieta colorín-avena es de regular calidad, ya que se obtuvo un REP dentro de lo esperado.
- La fibra aportada por la vaina disminuye la absorción de algunos tóxicos como los alcaloides, sin afectar la digestibilidad (Da) la cual es bastante alta.
- El ejote de ***Erythrina americana*** destoxificado se puede catalogar como complemento alimenticio siempre y cuando se encuentre \leq al 30% en proporción a la dieta.



Bibliografía

1. Adrian J., Frangne R. La ciencia de los alimentos de la A a la Z. Editorial Acribia, Zaragoza, España. pág. 170-171. (1990).
2. Association of Oficial Analytical CHemists. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. (AOAC). 15th ed. Washington, D.C. Vol. I y II pp. 17-18, 40-62, 69-83 y 1012. (1995).
3. Badui D. Salvador. Química de los alimentos. Cuarta edición. Editorial Pearson. México D.F. pág. 120, 222, 224, 231. (2006).
4. Barba, A.A.; Luna, R.S.; Los recursos vegetales de México. Tópicos de investigación y posgrado. Vol. I No. 1; ENEP-Zaragoza, UNAM pág. 22-32, México. (1989).
5. Birch G.C and Parker K.J. Food and Health: Science and Technology. Applied Science Publishers LDT. London. Pp. 305 - 317. (1980).
6. Boisen, S. and Eggum, B. Critical evaluation of *in vitro* methods for estimating digestibility in simple stomach animal. Nutr. Res. Rev. 4: 141-162. (1991).
7. Bourges H. Las leguminosas en la alimentación humana (1ª parte). Cuad. Nutr. 10(1):17-32. (1987).
8. Bressani, R., De Mora, D.R., Flores R. y Gómez-Brenes R. Evaluación de dos métodos para establecer el contenido de polifenoles en frijol crudo y cocido, y efecto que éstos provocan en la digestibilidad de la proteína. Arch. Latinoamer. Nutr. ALAN. XLI (4): 569-583. (1991).
9. Brito, F. Iralda. Zompantle o colorín (*Erythrina americana* Miller). Tlahui-Medic. No. 20, II/2005. 22/Agosto/2007. (2007).
10. Bruneton J. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales. Segunda edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. pág. 785-788. (2001).
11. Burrows, G. E., Tyrl, Ronald J. Toxic plants of North America. Iowa state university Press. Iowa. pp. 552-555. (2001).
12. Camacho de la Rosa, N; Díaz G. K.; Santillana H. M; Velásquez M. O. Productos de Cereales y Leguminosas. 4º Edición. Facultad de Química, UNAM. México D.F. pág. 147-148. (2007).



13. Campbell, J.A. Methodology of protein evaluation. In: The PAG compendium. Sachs, M. (editor), John Wiley & sons. New York, pp. D649 -D723. (1975).
14. Cantoral R., Fernández-Quintela A., Martínez J. y Maraculla M. Estudio comparativo de la composición y el valor nutritivo de semillas y concentrados de proteína de leguminosas. Arch. Latinoamer. Nutr. ALAN. 45:242-248. (1995).
15. Cheftel Jean-Claude. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Vol II. Acribia, S.A. Zaragoza, España. pág. 106-110, 117-119, 145-153. (1983).
16. Clifford, J.A. The whole animal as an analytical tool. A review in Gruenwedel, D.W. and Whitaker, J, R., Food Analysis Principles and Techniques. Vol. 3 Biological Techniques Marcel Dekker Inc. New York. (1985).
17. Díaz, L. Mayra. Evaluación proteica en muestras crudas y cocidas del germinado y semilla seca de *Erythrina americana*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México D.F. pág. 56-66. (2003).
18. Flores D.V. Nancy I. Evaluación nutricional y toxicológica del ejote de colorín (*Erythrina americana*) después de ser sometido a un proceso de cocción. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México D.F., pág. 10-16, 44. (2002).
19. Gálvez M., María. A. Suplementación de Alimentos con proteínas. Información científica y tecnológica. 6(95)30-32. (1995).
20. García-Mateos R., Lucas B., Zendejas M., Soto-Hernández M., Martínez M. and Sotelo A. Variation of total nitrogen, non-protein nitrogen content, and types of alkaloids at different stages of development in *Erythrina americana* seeds. J. Agric. Food Chem. 44 (10): 2987-2991. (1996).
21. Gómez G., Quesada S. y Nanne C. Efecto de los factores antinutricionales en el pejibaye (*Bactris gasipaes*) sobre el metabolismo de las ratas jóvenes. Agron. Costarric. 22(2):191-198. (1998).
22. Hackler, R. Methods for measuring protein quality a review of bioassay procedures. Cereal Chem. 54 (4): 984-995. (1977).
23. Hermus R. Methodology for nutrimental evaluation of foods. Inter. J. Food. Sci. Nutr. 44 (Supág.l. 1): s3-s10. (1993).



24. Hernández T., Hernández A. y Martínez C. Calidad de proteínas. Conceptos y evaluación alimentaria. 274:27-37. (1996).
25. Hewitt D. and Ford I.E. Influence of tannins on the protein Nutritional quality of food grains. Proceedings of the Nutrition Society. 41: 7-17 (1982).
26. ISO 9648-1998. Determination of tannin content in sorghum. 1ª Edición 12-15 (1988).
27. Kakadé M. Rackis J. McGhee J. and Puski, G. Determination of trypsin activity of soy products: a collaborative analysis of a improved procedure. Cereal Chem. 51:376-383. (1974).
28. Kaufer-Horwitz M. La fibra y su aporte a la salud. Cuad. Nutr. 8(5):17-32. (1985).
29. Linden G., Loriet D. Bioquímica agroindustrial, Revaporización alimentaria de la producción agrícola. Editorial Acribia. Zaragoza, España. pág. 99-106. (1994).
30. Lloyd L.E., Mc Donald B.E., Crampton E.W. Fundamentos de nutrición. Segunda Edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. pág. 112-119 (1999).
31. Lucas B. & Sotelo A.A. Useful modification of the haemagglutination method for screening of lectin in legume seed. EAPP publication No. 70 Wageningen. pp. 71-74. (1993).
32. MacLaughlan, J.M. and Campbell, J.A. Methodology of protein evaluation. A review mammalian protein metabolism. Vol. 3 academic Press. New York. 391. (1969).
33. Martínez M. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de cultura económica. México D.F. pág. 204. (1979).
34. Martínez V. I., Periago, M. Ros, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Arch. Latinoamer. Nutr. ALAN. 50:1,5-18 (2000).
35. Mateo-Box J. Leguminosas de Grano. Salvat Editores. Zaragoza, España. pág. 3-4, 8-15. (1961).
36. Mazza G., Ph. D. Alimentos Funcionales. Aspectos Bioquímicos y Procesado. Editorial Acribia. Zaragoza, España. pág.307-311. (2002).
37. Miller. L.P. Phytochemistry. Van Nostrand Reynold Co. New York. Vol. II. pp. 118-170. (1973).



38. Moreno E., R. Estimación de la toxicidad aguda y cuantificación de alcaloides totales en *Erythrina americana* en diferentes fases de desarrollo. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México D.F. pág. 23-59. (2001).
39. Muller, H. G. y Tobin, G. Nutrición y ciencia de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza, España. pág. 142-145. (1991).
40. Pellet P. and Young. V. Nutritional evaluation of proteins foods. The United Nations University World Hunger Programme, Food and Nutrition Bulletin Supág.lement 4. The United Nations University Tokyo. pág. 26-75. (1980).
41. Ramírez R. G. Cambios en la composición química y contenido de tóxicos en el fruto de colorín durante su maduración. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México D.F. pág. 63-82. (1996).
42. Robinson D. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Acribia, S.A. Zaragoza, España. pág. 109-141 (1991).
43. Robinson R., Sadler M. Encyclopedia of Food Science and Nutrition. Wiley-Interscience Publication. London. Vol 1: pp. 102-111, 154-158; Vol. 4: pp. 2726-2730. (1993).
44. Shils E.M., Olson J. A., Shike Moshe, & Ross A.Catherine. Nutrición en salud y enfermedad. Novena edición. Vol II. México, Mc. Graw Hill Interamericana. pág. 2037-2038 (2002).
45. Sinha, S.K.; Las leguminosas alimenticias. FAO. Estudios de producción y protección vegetal No. 3, Roma. pág. 1-8. (1978).
46. Sotelo A.; Argote R.; Moreno R.; Flores N. and Diaz M. Nutritive Evaluation of the Seed, Germinated Seed, and String Bean of *Erythrina americana* and the Detoxification of the Material by Boiling. J. Agric. Food. Chem. 51: 2821-2825. (2003).
47. Trease y Evans. Farmacognosia. 13 Edición. Interamericana. McGraw Hill. Zaragoza, España. pág. 592-593. (1997).
48. Urquiza, G.; ¿Y ahora, que comemos?. ICYT. 10(144)41-43. (1998).
49. Valle, V.P. y Lucas F.B. Toxicología de alimentos. Instituto Nacional de Salud Pública. Centro Nacional de Salud Ambiental México, D.F. pág. 59-74 (2000).
50. Wade L.G. Jr. Química Orgánica. Quinta edición. Pearson . Madrid. pág. 836. (2004).



Anexo A

Preparación de reactivos

1. Solución anticoagulante (heparina): se utilizó en la siguiente relación

Sol. De heparina: sangre = 15-20 UI: 1 mL de sangre

2. Solución salina 1%:

Se disolvieron 10 g de cloruro de sodio en 1000mL de agua destilada.

3. Solución Salina 0.9%:

Se disolvieron 8.5 g de cloruro de sodio en 1000 mL de agua destilada.

4. Solución de dimetilformamida al 75% (DMF):

Se midió en una probeta 75 mL de dimetilformamida y se transfirió a un matraz aforado de 100 mL. Se llevó al aforo con agua destilada.

5. Solución estándar de ácido tánico 0.2 g/100mL:

Se pesaron 0.2 g de ácido tánico y se aforará a 100 mL con agua destilada.

6. Solución de citrato férrico amoniacal:

El contenido de hierro estaba entre el 17-20%. Se preparó una solución de 0.35 g/100 mL, 24 horas antes de su uso.

7. Solución de amoniaco:

Se prepara una solución que contenga 0.8 g de NH_3 /100 mL de hidróxido de amonio. Es necesario realizar los cálculos para medir el amoníaco que se encuentra en el hidróxido de amonio. Considerar la densidad 0.8928 g/mL. Medir 3.1 mL de hidróxido de amonio concentrado (29% de amoniaco) y aforar a 100 mL con agua desionizada.



8. Solución amortiguadora de TRIS:

Se pesan 6.05 g de tris (hidroximetil-amino-metano) y 2.94 g de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ se disuelven en 900 mL de agua destilada. Se ajusta el pH a 8.2 y se afora a un volumen de 1 L.

9. Solución BAPNA:

Se pesan 100 mg de benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida-HCl (BAPNA) se disuelven en 2.5 mL de dimetil-sulfóxido y se diluye a 250 mL con amortiguador TRIS previamente calentado a 37° C. Esta solución debe ser preparada el mismo día y cuando este en uso debe mantenerse a 37° C.

10. Solución estándar de tripsina:

Se pesan con mucha exactitud 4 mg de tripsina bovina (SIGMA T-8253) y se disuelven en 200 mL de HCl 0.001N. Esta solución debe ser almacenada en refrigeración donde puede durar de 2-3 semanas sin pérdida apreciable de actividad.



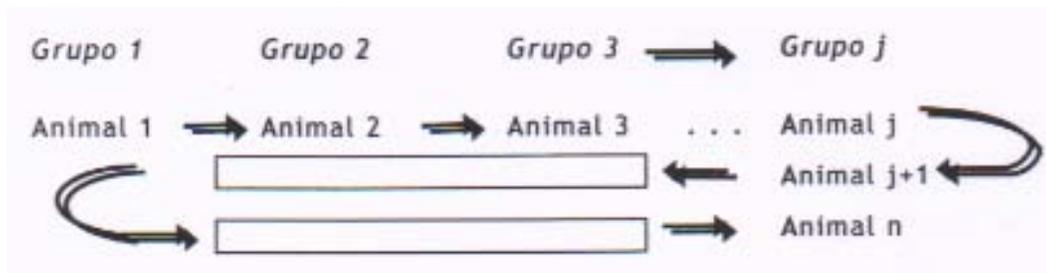
Anexo B

Técnica de distribución (Culebra japonesa)

Esta técnica se aplica con el objeto de distribuir un conjunto de elementos, en este caso animales, en un determinado número de grupos para obtener una uniformidad en los mismos.

Procedimiento:

1. Marcado al azar de los animales para su posterior identificación.
2. Pesado de los animales.
3. Con base en el peso corporal obtenido anteriormente, se ordenan en forma ascendente (animal 1, animal 2, animal 3,....., animal n). Se recomienda contar con animales extra, pues de ser necesario, se eliminan los animales con mayor y menor peso para disminuir la variabilidad entre los grupos, la diferencia en el peso promedio entre los lotes debe ser menor a 1 g.
4. Distribución de los animales, ya sea de derecha a izquierda o de arriba hacia abajo, con el siguiente patrón:



Anexo C

Formato de registro de datos para la prueba biológica REP

Rata: _____ sexo: _____ peso inicial (Pi): _____ dieta: _____													
Tiempo (días)													Peso final (Pf): _____
Peso animal (g)													$\Delta P = Pf - Pi =$ _____
Alimento inicial (g)													
Alimento final (Af)													
Alimento ingerido (AI)													$\Sigma AI =$ _____
Alimento acumulado													
Observaciones: _____													

Resultados de la Relación de Eficiencia Proteica

# rata	Caseína			Colorín-Avena			
	ΔP	ΣAI	REP	ΔP	ΣAI	REP	REP _{ajustado}
1	47.8	145.6	3.52	27.1	126.3	2.33	1.71
2	47.8	150.9	3.40	25.1	119.4	2.28	1.67
3	52.0	160.7	3.47	24.9	118.7	2.28	1.67
4	42.7	141.9	3.23	28.0	130.6	2.33	1.71
5	57.8	183.8	3.37	22.6	115.4	2.13	1.56
6	55.8	172.5	3.47	31.7	135.1	2.55	1.87
Prom.			3.41			2.32	1.70
D.E.			0.1042			0.1360	0.0998
C.V.			3.059			5.88	5.88

% proteína en la dieta de caseína= 9.33

% proteína en la dieta de colorín-avena= 9.21



Anexo D

Digestibilidad Da

Dieta de referencia - Caseína:

Proteína: 9.33%

Nitrógeno dieta: 1.4623%

# rata	% N (heces)	total heces	NF (g)	Ni (g)	% Da
1.1	2.65	6.60	0.17	0.87	79.93
1.2	2.80		0.18		78.77
2.1	1.88	5.28	0.10	0.86	88.40
2.2	1.83		0.09		88.76
3.1	1.79	5.15	0.09	0.88	89.57
3.2	1.70		0.09		90.09
4.1	1.99	5.42	0.11	0.71	84.82
4.2	1.82		0.10		86.18
5.1	2.11	6.49	0.14	1.04	86.91
5.2	2.09		0.14		87.01
6.1	1.76	5.43	0.10	0.85	88.76
6.2	1.72		0.09		89.01
X					86.52
D.E,					3.68
C.V.					4.25

Dieta Colorín-Avena:

Proteína: 9.2077%

Nitrógeno dieta: 1.4732%

# rata	% N (heces)	total heces	NF (g)	Ni (g)	% Da
1.1	2.39	14.32	0.34	1.86	81.61
1.2	2.08		0.30		84.01
2.1	2.25	10.49	0.24	1.76	86.58
2.2	2.10		0.22		87.45
3.1	2.35	11.44	0.27	1.75	84.60
3.2	2.29		0.26		84.99
4.1	2.45	11.92	0.29	1.92	84.80
4.2	2.08		0.25		87.12
5.1	2.31	10.33	0.24	1.70	85.98
5.2	2.12		0.22		87.10
6.1	2.22	13.74	0.31	1.99	84.66
6.2	2.02		0.28		86.08
X					85.41
D.E,					1.66
C.V.					1.94

