



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESTOXIFICACIÓN DE LA SEMILLA DE
CACAHUANANO (*Gliricidia sepium*) Y SU
EVALUACIÓN NUTRITIVA**

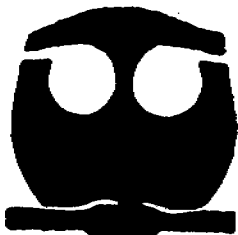
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

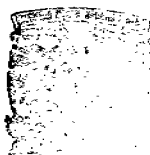
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

TANIA DE MIGUEL GÓMEZ



MÉXICO, D. F.



2008

**EXAMENES PRÁCTICOS DE
FAC. DE QUÍMICA**



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.

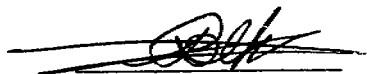
Jurado asignado:

Presidente M. en C. BERNARDO LUCAS FLORENTINO
Vocal M. en C. LUCIA CORNEJO BARRERA
Secretario QFB. INOCENCIA MARIA DE LOURDES FLORES TELLEZ
1er. Suplente QFB. LETICIA GIL VIEYRA
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

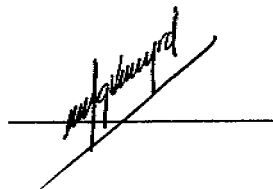
Asesor:

BERNARDO LUCAS FLORENTINO



Supervisor técnico:

LETICIA GIL VIEYRA



Sustentante:

TANIA DE MIGUEL GÓMEZ



Agradecimientos

- Al Colegio de Profesores y la Sección 024 del AAPAUNAM por su apoyo para la realización e impresión de esta tesis, por medio de la beca "Alberto Urbina del Raso" durante el período 2008-2.
- A mi asesor, Bernardo Lucas Florentino, por su apoyo incondicional, su disposición y entrega hacia el proyecto y todos los conocimientos compartidos.
- A Leticia Gil Vieyra, porque su apoyo y amistad es inigualable.
- A todos los integrantes del Laboratorio 111; en especial, a Rosa María Argote Espinosa, Argelia Sánchez y la Sra. Vicky.
- A mis sinodales: Bernardo Lucas Florentino, Lucía Cornejo Barreda e Inocencia María de Lourdes Flores Tellez por su tiempo y sus aportaciones.
- A la UNAM y a la Facultad de Química, lugares donde crecí de forma personal y profesional.

Dedicatoria

En realidad creo que no hay palabras suficientes para expresar lo feliz que me siento al llegar a esta etapa de mi vida. Al pensar a quien dedicaría esta tesis, decidí que se la podría dedicar a cada una de las personas que han dejado huella en mí.

Hay personas con las que he crecido profesional y personalmente, con las que he aprendido y compartido momentos fáciles y difíciles, desvelos y madrugadas. Con las que aprendí que una verdadera amistad va mucho más allá de las aulas. Hay otras personas que me han enseñado que los sueños se vuelven realidad; lo importante que es luchar por lo que uno anhela, día con día. Otras personas con las que he volado y otras que me han hecho volver a poner los pies sobre la tierra. Personas que me han enseñado que se puede reír y llorar al mismo tiempo y que las ilusiones pueden vivir eternamente en nosotros mismos. En mi vida, también existen personas que admiro y que son para mí, un ejemplo a seguir. Personas que vienen y van, pero que siempre están ahí. Personitas que siempre me regalan un abrazo y me hacen sentir la persona más afortunada del mundo. Personajes que me dan una inmensa alegría. Y sobre todo, siempre están las personas con las cuales nací, crecí y seguiré creciendo; las que me han brindado todo su amor, su apoyo y que son parte fundamental de lo que hoy soy, mi familia. A todos ustedes, ¡gracias! Gracias por existir y ser parte de mí.

Índice

	<i>Página</i>
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Objetivos	3
3.1. Objetivo General	
3.2. Objetivos Específicos	
4. Antecedentes	
4.1. Cacahuanano (<i>Gliricidia sepium</i>)	4
4.2. L-Canavanina	12
4.3. Jack bean (<i>Canavalia ensiformis</i>)	13
4.4. Procedimientos de destoxificación	15
5. Hipótesis	17
6. Metodología	18
6.1. Recepción de materia prima	19
6.2. Molienda	20
6.3. Análisis proximal de las semillas de cacahuanano	
6.3.1. Determinación de Humedad	20
6.3.2. Determinación de Grasa	22
6.3.3. Determinación de Fibra cruda	23
6.3.4. Determinación de Cenizas	26
6.3.5. Determinación de Proteína cruda	27
6.3.6. Determinación de Hidratos de carbono	29
6.4. Determinación del contenido de canavanina	29



6.5. Procedimientos de destoxificación de las semillas de cacahuanano	33
6.5.1. Procedimientos de destoxificación con medio de extracción acuoso	34
6.5.2. Procedimientos de destoxificación con recambios del medio de extracción acuoso	35
6.5.3. Procedimientos de destoxificación con medio de extracción acuoso y tratamiento térmico	36
6.5.4. Procedimientos de destoxificación con medio de extracción acuoso, muestra previamente desengrasada	39
6.5.5. Procedimientos de destoxificación con medio de extracción agua-metanol	40
6.6. Secado	42
6.7. Elaboración de dietas	42
6.8. Ensayo biológico (REP)	43
7. Resultados y Análisis	46
8. Conclusiones	63
9. Bibliografía	64



1. Resumen

En México, el hambre y la desnutrición son un problema ancestral. Una solución a corto plazo, consiste en incrementar la producción de alimentos de origen vegetal con una buena calidad nutritiva. El cacahuanano (*Gliricidia sepium*) es una leguminosa arbórea que está subutilizada. Tiene un gran potencial alimenticio pero tiene una alta concentración (6.74%) de un factor tóxico: canavanina; el cual, es un aminoácido no proteínico, análogo de la arginina. Utilizando las propiedades físico-químicas de la canavanina se intentó hacer su remoción de la semilla de cacahuanano. El mejor procedimiento de destoxificación se obtuvo utilizando como medio de extracción, una solución acuosa acidificada a pH=3; una relación de semilla:solución 1:10 y haciendo 2 cocciones, realizando un recambio de disolvente entre ellas; logrando así, disminuir el contenido de canavanina a un 2.01%, determinado por el método de Beil (2). Sin embargo, al realizarse el procedimiento de destoxificación a mayor escala, el contenido de canavanina residual (3.55%) manifestó efectos tóxicos, que produjeron un 100% de mortandad, en el ensayo biológico.

2. Introducción

En México, el hambre y la desnutrición son un problema ancestral; ya que se presenta un alto porcentaje de desnutrición calórico-proteica, que afecta a aproximadamente la quinta parte de la población. En particular, al sector infantil de las zonas rurales marginadas. Este problema puede afectar progresivamente el desarrollo físico-intelectual, su crecimiento y deteriora su respuesta inmunológica (26).

Una solución a corto plazo, consiste en incrementar la producción de alimentos de origen vegetal que tengan una buena calidad nutritiva. Un ejemplo de esto, son las leguminosas; pues tienen una alta eficiencia en el aprovechamiento de la energía solar y por consecuencia, son más redituables en la producción de víveres para el hombre.

En México, las leguminosas silvestres son muy abundantes y algunas tienen un gran potencial para ser utilizadas como alimento; en primera instancia, para animales de granja que indirectamente proporcionarían alimentos de una alta calidad nutritiva para el hombre.

El cacahuanano (*Glyricidia sepium*) es una leguminosa arbórea que está subutilizada. En algunos países, se utiliza para reestablecer la fertilidad de los suelos, como rodenticida y para formar cercas vivas, en la elaboración de forrajes y piensos e incluso en algunos lugares, en la alimentación. Sin embargo, aunque la semilla tiene un contenido elevado de proteína y grasa, lo que le da un valor nutritivo alto, se debe tener cuidado con la cantidad que se ingiere. Esto es debido a la alta concentración de un factor tóxico, la canavanina.

La canavanina es un aminoácido no proteínico, análogo de la arginina y puede actuar como antagonista de éste, manifestando efectos tóxicos drásticos hacia microorganismos e insectos. En animales superiores, no está bien definido su efecto tóxico; sin embargo, sí se han observado efectos dafinos en animales de experimentación, cuando se ingiere en dosis altas. Por ende, es necesario eliminar o disminuir significativamente el nivel de este aminoácido en las semillas del cacahuanano, para así, poder aprovechar el potencial alimenticio de este recurso vegetal poco estudiado.

3. Objetivos

3.1. Objetivo General:

- Realizar el proceso de destoxificación de la semilla de cacahuanano (*Gliricidia sepium*); en particular, la remoción del aminoácido no proteínico: canavanina; y evaluar, por medio de un ensayo biológico, su calidad proteínica.

3.2. Objetivos Específicos:

- Realizar el análisis proximal de las semillas de cacahuanano para caracterizarlo y justificar su uso potencial alimenticio.
- Determinar el porcentaje de canavanina presente en las semillas de cacahuanano; de reciente recolección (2007) y un lote de recolecciones anteriores.
- Llevar a cabo, distintos procedimientos de destoxificación para disminuir lo más posible el contenido de canavanina; realizando la determinación de este tóxico en el material destoxificado para evaluar la eficiencia de cada procedimiento.
- Evaluar la calidad nutritiva de la semilla de cacahuanano destoxificada, por medio de un ensayo biológico (REP).

4. Antecedentes

4.1. Cacahuanano:

A continuación, se presenta la clasificación botánica del cacahuanano y en la Figura 1, se puede ver una fotografía de esta planta:

Reino: Plantae

Subreino: Embryophyta

División (Phyllum): Tracheophyta

Subdivisión (Subphyllum): Pteropsida

Clase: *Angiospermae*

Subclase: *Dicotyledoneae*

Orden: Leguminosae

Familia: *Papilionaceae*

Género: *Gliricidia*

Especie: *Gliricidia sepium*



Figura 1. Planta de Cacahuanano.

Gliricidia sepium es el nombre científico del cacahuanano (25). Sin embargo, se conoce con muchos otros nombres comunes como: Cachuananche, Cokoite, Chanté, Muite, Cuacuite, Marinero, Cacahuanane, Madre del cacao (Guatemala, Puerto Rico), Lengua de perico, Madera negra (Panamá, Costa Rica, Honduras), Madriado (Nicaragua) Iaití, Sac-yub y Matarratón (Colombia), Sangre de dragón, Baba, Balo, Piñón de Cuba (República Dominicana), Piñón violento (Cuba), Piñón florido, Sayab, Ujcum, Tunduti, Yaité, Jelelte, Flor de San José, Palo de corral, entre otros (5,8,22,25).

El cacahuanano (*Gliricidia sepium*) es una leguminosa arbórea. Es un árbol perenne de la selva baja caducifolia, de clima cálido y suelo pedregoso; que llega a medir entre 10-15 metros de altura. Su tronco es torcido, con un diámetro entre 25-60 cm y sus ramas son ascendentes y luego horizontales. En ocasiones, las ramas, están huecas y habitadas por hormigas. La corteza es escamosa, ligeramente fisurada, de color pardo-amarillenta a pardo-grisácea. En el interior, es de color crema-amarillenta, fibrosa, con olor y sabor característico. Sus raíces son profundas y la copa es irregular y extendida. Las hojas miden entre 10-25 cm de largo; dispuestas en pares opuestos con hojuela terminal. En el periodo de floración, tiene numerosas flores amariposadas de color rosa-púrpura claro que miden aproximadamente 2 cm de longitud y se agrupan en racimos; como se puede apreciar en la Figura 2. Cada racimo tiene de 15 a 50 flores, dulcemente perfumadas (22,25). Los frutos son vainas dehiscentes aplanadas que miden 10-20 cm de largo, 1-3 cm de ancho y poseen entre 3-8 semillas (5). En la Figura 3, se puede apreciar que las semillas son lenticulares de color amarillo ocre-café rojizo y miden de 7.9 a 18 mm de largo por 12 a 15 mm de ancho, casi redondas, aplanadas, de superficie lisa (22,25).

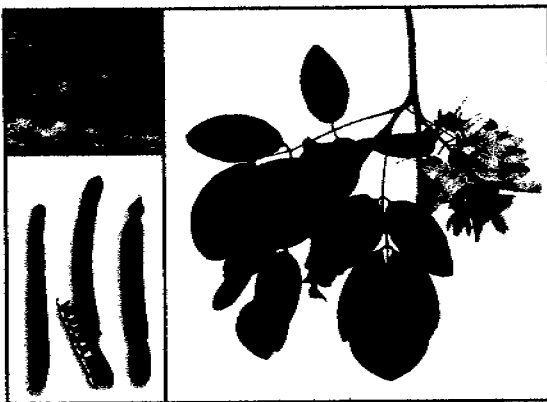


Figura 2. Cacahuanano.

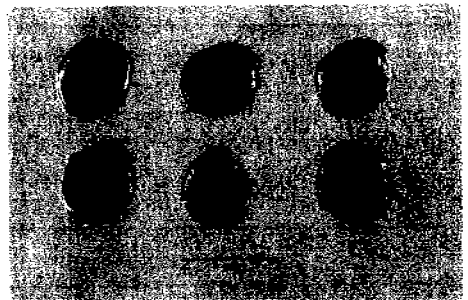


Figura 3. Semilla de cacahuanano.

Probablemente, el origen del cacahuanano haya sido en América Central (9); sin embargo, se ha propagado en distintas partes del mundo como: África occidental, las Antillas, el sur de Asia y las regiones tropicales de América (5). En las Figuras 4, 5 y 6 se puede observar parte de la distribución del cacahuanano en el mundo.

En México, se puede encontrar en los estados de: Campeche, Colima, Chiapas, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán (22).

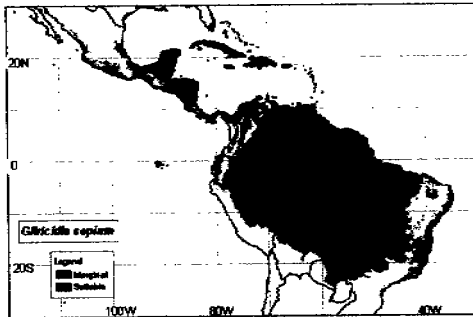


Figura 4. Distribución de Cacahuanano (América).

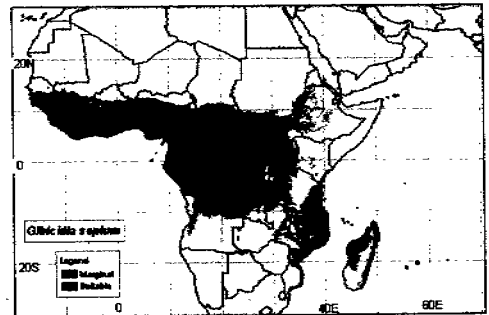


Figura 5. Distribución de Cacahuanano (África).

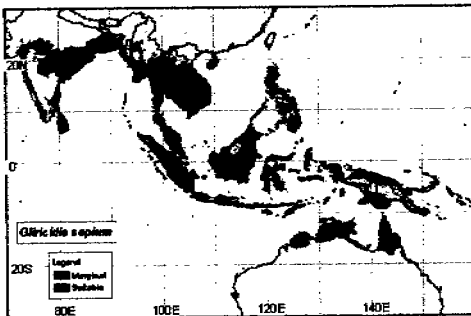


Figura 6. Distribución de Cacahuanano (Asia).

Las condiciones ideales para su crecimiento son, básicamente, buenas condiciones de humedad (800 – 2300 mm de precipitación al año) y calor (22-30°C). Florece en altitudes que van desde el nivel del mar hasta los 1,300 o incluso 1,600 msnm. Se desarrolla en una amplia variedad de suelos, incluidos los ácidos y los erosionados, ígneo, volcánico y calcáreo; siempre y cuando estén bien drenados. Soporta bien la sequía; sin embargo, su floración disminuye. No crece bien en suelos pesados y húmedos, prefiere los livianos y profundos. Esta especie no tolera competencia por luz (23,25).

Los usos de esta leguminosa son muchos; de hecho, se le considera un árbol multipropósito:

- Se utiliza el jugo de hojas y raíces para curar heridas, piquetes y enfermedades de la piel (6).
- La infusión de sus hojas se utiliza como expectorante.
- También, se cree que una ramita del árbol en la cabeza evita la insolación.
- Rodenticida: Las hojas, semillas y raíces se utilizan en un amasado junto con maíz o arroz cocinado como raticida (5,6,8,9).
- Algunos ésteres de la L-canavanina y otros compuestos derivados de ella como la D-canavanina y la L-homocanavanina han funcionado como insecticidas (11,12).
- Provee de sombra a las plantaciones de cacao, café y té (17). También, se utiliza de soporte en cultivos de pimienta negra (Costa Rica), maracuyá (Sri Lanka) y vainilla (Uganda). En Filipinas, los troncos viejos de *Gliricidia sepium* sostienen orquídeas.
- Es un árbol de madera dura, fuerte, pesada y resistente a las termitas (5). Por ello, se utiliza en construcción, como leña, y postes. Tiene un alto poder calorífico 4,050 - 4,900 Kcal/Kg; con una densidad de 0.803 g/cm³ y un peso específico de 0.942 g/cm³.
- Sus flores son muy llamativas para las abejas. Los apicultores clasifican de excelente calidad a la miel que proviene de las flores del cacahuanano.
- También se siembra para restaurar la fertilidad del suelo; ya que este árbol tiene nódulos en sus raíces, los cuales contienen bacterias fijadoras de nitrógeno (5).

- El material podado, tiene un alto valor de nutrientes, por lo que se descompone rápidamente y se utiliza como abono verde para cultivos perennes o anuales.
- Por su facilidad para propagarse; se utiliza para cercas vivas y así delimitar un área (9). Las estacas utilizadas son de 1.5 a 2.5 m de longitud con diámetros de 5 a 10 cm, enterradas 20 cm bajo el suelo. El distanciamiento entre las estacas depende mucho del fin, puede ir desde 0.5 a 5 m. Para el mantenimiento de estas cercas se les debe dar una poda de formación, podas de mantenimiento y podas de rejuvenecimiento, cuando la cerca empieza a degenerarse.

Propagación del Cacahuanano

El cacahuanano se propaga fácilmente por estacas o por semilla sexual. Generalmente, se propaga por estacas; ya que, su mayor uso ha sido en cercas vivas y como sombrío en diferentes cultivos. Sin embargo, en sistemas intensivos de producción de forraje se deben establecer las plantaciones con semilla sexual, para lograr una mayor persistencia en el cultivo; debido a que la planta desarrolla un sistema radicular más profundo, permitiendo la posibilidad de extraer agua y nutrientes de un mayor rango de profundidad; además de lograr un mejor anclaje, soportar los cortes que se realizan periódicamente y tolerar mejor los períodos de sequía. En evaluaciones que se han realizado, al comparar los dos sistemas de propagación (estaca vertical contra semilla sexual), se han encontrado pérdidas de plantas del 30 al 40% en parcelas establecidas con material asexual (estaca); mientras que por semilla sexual las pérdidas no superan el 10%. La germinación por semilla sexual es más rápida y uniforme que con estaca.

La propagación por semilla sexual puede hacerse de dos distintas formas; sin embargo, en ambas la profundidad de siembra no debe ser mayor de 2 cm y se utilizan 2 semillas por planta.

a) Establecimiento con etapa de vivero:

Cuando se utiliza este sistema las plantas son llevadas al campo de 2 a 3 meses de edad, en bolsas de 1 Kg de capacidad para evitar el daño de sus raíces. Se debe utilizar para su llenado una mezcla de 45% de tierra, 45% de arena y un 10% de abono orgánico seco, garantizando así, una buena aireación, fertilidad y retención de agua.

Al momento del trasplante es importante tener en cuenta:

- Disponibilidad de agua (riego o período de lluvias).
- Antes de realizar el trasplante es necesario regar y podar las raíces que crecen fuera de la bolsa.
- Hacerlo preferiblemente en las horas de la mañana o en la tarde (cuando el sol sea menos intenso para evitar la deshidratación).
- Evitar que queden cámaras de aire en el sitio donde se siembre la planta.

Dentro de las ventajas de utilizar este sistema están:

- Se trasplanta al campo cuando la planta tiene de 20 a 30 cm, que la hace más competitiva en el medio.

Las desventajas de este sistema son:

- Mayores costos.
- Mayor daño de la planta al ser trasplantada, limitando su desarrollo en este periodo.
- La primera cosecha tarda 2-3 meses más de lo normal.

b) Siembra directa al campo:

La siembra directa en el campo requiere una correcta preparación del suelo, manejo adecuado de las malezas y agua disponible.

Las ventajas de este sistema son:

- El costo de establecimiento es menor, por no tener el manejo de la etapa de vivero y posteriormente el trasplante.

- La planta adquiere un desarrollo normal y se obtiene la primera cosecha más pronto (7 meses).

Las desventajas son:

- En la etapa inicial (3 meses) requiere mucho cuidado en cuanto a control de malezas y disponibilidad de agua.
- El margen para la resiembra no debe superar los 20 días después de la siembra, evitando así la competencia por luz de las plantas vecinas.

Antes de proceder a la siembra, se debe evaluar el porcentaje de germinación de la semilla, que debe ser superior al 90%. La semilla se debe conservar en refrigeración, evitando someterla a un período muy largo de almacenamiento, debido a que pierde viabilidad.

La cosecha se realiza manualmente, con el implemento de corte (machete) bien afilado para evitar que el tallo quede desflechado, con mayor posibilidad de penetrar la humedad, que puede favorecer la presencia de hongos que deterioran la planta.

Desde el momento de la siembra hasta el primer corte deben transcurrir como mínimo 7 meses; esperando fundamentalmente el fortalecimiento del sistema radicular que le asegure una mayor persistencia al cultivo. Este primer corte arroja una alta producción de biomasa representada principalmente en leña. Para los siguientes cortes, la periodicidad lo determinan fundamentalmente las condiciones agroecológicas de la zona, teniendo en cuenta que a medida que se aproxime la altura al nivel del mar, el intervalo se puede reducir. La periodicidad de los cortes está dada también por el contenido de materia seca y nutrientes presentes en la biomasa recolectada. Cuando se realizan cortes tempranos, se obtiene menor cantidad de materia seca y mayor cantidad de proteína. Cuando los cortes son tardíos, la materia seca es mayor y la calidad nutricional se reduce ligeramente. Al establecer la frecuencia de cortes se pretende optimizar la cantidad de proteína/ha/año (25).

Generalmente, los periodos de distintas etapas del árbol son:

Caída de follaje.- Diciembre-Enero, Junio-Julio

Brote de follaje.- Enero-Febrero, Julio-Agosto

Floración.- Enero-Febrero, Junio-Agosto

Fructificación.- Febrero-Marzo-Abril, Septiembre-October

En la siguiente tabla, se presenta una comparación en la composición de aminoácidos del cacahuanano (Matarratón) y otras leguminosas (25).

Tabla 1. Comparación de aminoácidos.

Aminoácidos	Matarratón	Leucaena mg/g de N	Crotolero	Alfalfa
Arginina	399	294	82	357
Cistina	99	88	76	77
Histidina	127	125	128	139
Isoleucina	300	563	244	290
Leucina	603	469	419	494
Lisina	282	313	220	368
Metionina	105	100	120	96
Metionina + cistina	204	188	196	173
Fenilalanina	386	294	283	307
Treonina	300	231	212	290
Tirosina	280	263	167	232
Valina	401	338	339	356

Fuente: Chalcholar P.A 1982

4.2. L-Canavanina:

Es un aminoácido alcalino tóxico, no proteínico, biosintetizado por ciertas leguminosas (18). Se considera un factor tóxico, pues es una sustancia natural generada por el metabolismo secundario de las plantas como un mecanismo de defensa ante el ataque de mohos, bacterias, insectos, animales herbívoros (13). Generalmente, se encuentra libre (14) y se acumula principalmente en las semillas. Es una fuente vital de nitrógeno para el crecimiento del embrión (10). La naturaleza, los mecanismos de acción y efectos tóxicos pueden ser muy variados.

Como se puede ver en las Figuras 7 y 8, estructuralmente, la L-canavanina es semejante a la L-arginina y se encuentra presente en concentraciones elevadas (hasta el 1.5% en peso) en algunos materiales que ocasionalmente se utilizan como alimento, como los brotes de alfalfa, el cacahuanano y el Jack Bean. Por tener una estructura semejante a la arginina, puede competir con ella en su metabolismo o incluso ocupar su lugar en la síntesis de proteínas. Las proteínas con canavanina, en lugar de arginina, no pueden funcionar correctamente o en lo absoluto. Es decir, pierden su capacidad biológica, o incluso pueden producir reacciones autoinmunes, al reconocerse como extrañas (21). Al ser un análogo de la arginina se ha visto que algunos de sus efectos pueden ser: Reducción del crecimiento a través de la sustitución aberrante de los intermediarios metabólicos, aumento en el recambio de proteína, daño hepático y efectos teratogénicos (20). Por lo anterior, se le considera como una sustancia natural de alta toxicidad (16). No obstante, algunos herbívoros especializados toleran la L-canavanina porque la metabolizan eficientemente o bien porque evitan su incorporación a sus propias proteínas (10).

La canavanina es soluble en agua, por lo que, es posible mediante remojo disminuir el contenido de este tóxico en el cacahuanano (18). El uso de un tratamiento térmico se puede utilizar con la finalidad de hacer más eficiente el proceso de remoción de este aminoácido no proteínico.

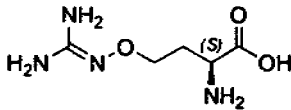


Figura 7. L-canavanina.

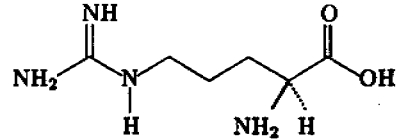


Figura 8. L-arginina.

4.3. *Canavalia ensiformis*:

Es importante conocer información sobre esta leguminosa; ya que por su alto contenido de canavanina, es la planta de la cuál se extrae actualmente este aminoácido tóxico. También, es la leguminosa sobre la cuál se han hecho mayor número de estudios relacionados con el contenido de canavanina. Su origen es Centroamérica y las Antillas y se conoce con otros nombres comunes como: Frijol de chanco, Frijol espada, Frijol machete, Frijol mantequilla, Frijol de playa, Judía de puerco, Judía sapia, Judía de caballo, Mate de costa (Cuba), "Jack bean" o "Sword bean" (24).

Es una especie anual trepadora, de crecimiento rápido, generalmente erecta y algunas veces arbustiva, que alcanza 1 m de altura. Los estolones pueden tener algunas veces hasta 10 m de largo (24). Sus raíces son profundas y los tallos poco ramificados. Su inflorescencia es colgante, hasta 30 cm de largo con 10-20 flores grandes abultadas, de color violáceo, rosado o blanco con base roja. Su fruto es aplastado y ligeramente curvo, como se puede ver en la Figura 9. La vaina contiene entre 12-20 semillas, que son oblongas, algo aplastadas, lisas, blancas con un hilo largo de color café; ver Figura 10. Las semillas son comestibles, pero algo tóxicas si se consumen en grandes cantidades. Sin embargo, si son tratadas térmicamente son inocuas. Tiene una tolerancia excelente para la sequía, moderada para las inundaciones y buena para la sombra.

Principalmente, se utiliza para alimento del hombre o abono verde, pero en algunos países se cultiva en regadío como forraje. El forraje sólo es apetecible cuando está seco. Debido a su toxicidad, hay que tener prudencia cuando se alimenta al ganado con herbaje de este frijol, y las harinas de legumbre y de semilla deben limitarse, como máximo, a un 30% de la ración total para los bovinos (24).

Los granos poseen una alta proporción de aminoácidos esenciales, a excepción de triptofano. Se comen cuando están maduros y las vainas y semillas inmaduras, al igual que las hojas, se consumen como verdura. Además, se puede incorporar en la dieta humana en forma de harina, pastas y galletas. Sin embargo, las semillas contienen factores tóxicos como la canavanina, que es un aminoácido libre (14), y las proteínas concavalina A y B. La concavalina A es una lectina con actividad hemaglutinante, que es utilizada para la caracterización de tipos de sangre en humanos. Además, interfiere en la capacidad de absorción de nutrientes de los intestinos, ya que destruye las células de la mucosidad intestinal. También, es una fuente industrial de ureasa; que es una enzima termolábil que cataliza la hidrólisis de la urea. Se extrae de las semillas con el propósito de usarla en laboratorios analíticos como reactivo para determinar las concentraciones de urea. Por todo lo anterior, hay que asegurar un procesamiento adecuado para reducir riesgos de intoxicación. Los granos requieren remojo prolongado antes de cocerlos. Para disminuir el riesgo de toxicidad, se recomienda eliminar la cáscara, cocinando un poco las semillas, escurriéndolas, quitando la mayor parte de la cáscara y, finalmente, terminar de cocerlas en agua. La producción de semilla puede ser tan alta como 4600 Kg/Ha (27).

En un análisis proximal de la semilla de *Canavalia ensiformis*, se obtuvieron los siguientes resultados: (27)

Humedad	Proteína	Grasas	Hidratos de carbono	Fibra	Cenizas
16.8 %	28.5 %	2.5 %	40.6 %	8.9 %	2.7 %

Canavalia ensiformis, puede contener hasta el 4% de canavanina en las semillas; y es la planta de la cual se extrae industrialmente la canavanina. Sin embargo, el cacahuanano llega a tener hasta un 7% de canavanina; lo cual podría sugerir la idea de extraer la canavanina de una manera más cuantitativa y por consecuencia, que sea más económico.



Figura 9. *Canavalia ensiformis*.



Figura 10. Semilla de *Canavalia ensiformis*.

4.4. Procedimientos de destoxificación:

Los procedimientos de destoxificación pueden ser físicos, químicos, biológicos y combinación de ellos. Algunos procedimientos son: remojo, cocción, tratamientos térmicos, presión con vapor, radiación con infrarrojo, tostado, extrusión, peletizado, extracción con disolventes, adsorción con carbón activado, entre otros (3).

Se deben evaluar las características físico-químicas del tóxico que se quiere eliminar para aprovechar esas características y aplicar el procedimiento de destoxificación más adecuado. Es decir, es de gran ayuda conocer el tipo de tóxico presente, su distribución, reactividad química, sensibilidad térmica, solubilidad, etc. en la matriz de la cual se quiere lograr su remoción (19). Sin embargo, hay otros factores que pueden influir en la elección del procedimiento como son material, equipo disponible, tiempo y costo.

Los usos que tienen los procedimientos de destoxificación son muchos. Por ejemplo, existen métodos de purificación para eliminar o disminuir los niveles de algunos factores tóxicos como: taninos, inhibidores de tripsina, lectinas, fitatos, alcaloides, entre otros. (4). Las leguminosas, generalmente contienen compuestos tóxicos y/o anti-nutricionales; que pueden interferir con el aprovechamiento y metabolismo de los nutrientes en los animales. Los efectos biológicos pueden ser desde efectos tóxicos ligeros hasta la muerte, inclusive con la ingesta de dosis pequeñas (19). Por lo anterior, es importante eliminarlos o reducir su contenido en los alimentos que los contengan y sean consumidos. También, se han utilizado tratamientos térmicos para inactivar algunas enzimas, microbios u otros componentes biológicamente activos; ayudando así a la retención de nutrientes y otros atributos de calidad como el color, textura, sabor y funcionalidad de los alimentos (15).

En el caso del cacahuanano, contiene canavanina. La canavanina es un aminoácido no proteínico, de estructura similar a la arginina. Por ser un aminoácido básico, se pueden utilizar soluciones ácidas para su extracción y por consecuencia, la destoxificación de las semillas de cacahuanano.

5. Hipótesis

- Aprovechando las características físico-químicas de la canavanina; es posible realizar la remoción de este aminoácido no proteínico tóxico de la semilla de cacahuanano hasta un nivel adecuado para comprobar su buena calidad nutritiva y así, poder aprovechar el potencial alimenticio de este recurso vegetal.

6. Metodología

A continuación, se presenta el diagrama general del trabajo de investigación:

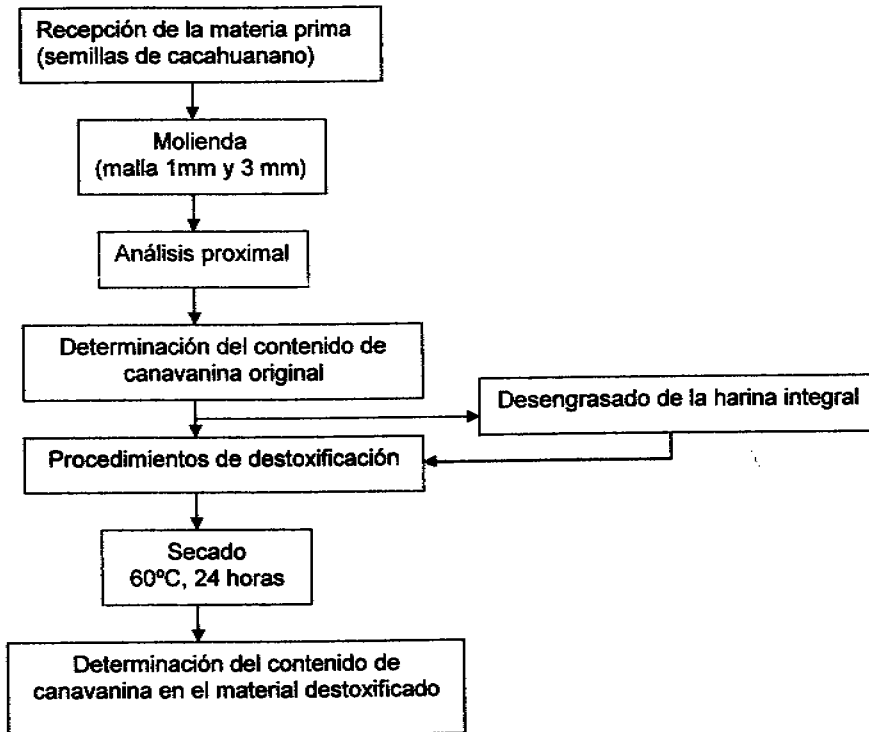


Figura 11. Caracterización y destoxificación de la semilla de cacahuanano.

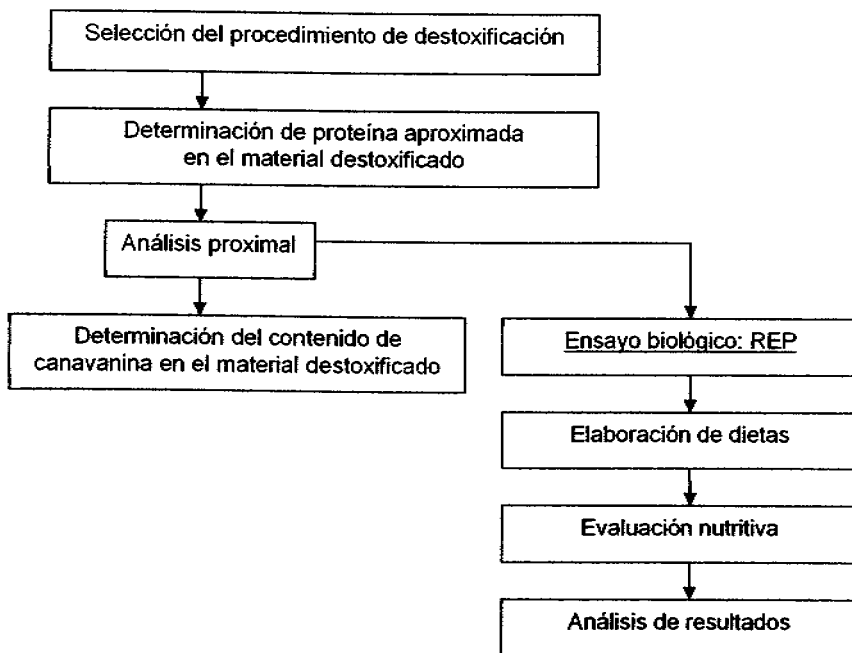


Figura 12. Evaluación biológica de la calidad nutritiva de la semilla de cacahuanano destoxificada.

6.1. Recepción de materia prima

La materia prima para el desarrollo del trabajo de investigación son las semillas de cacahuanano. Debido a que el cacahuanano se desarrolla en bajas altitudes; la muestra se recolectó en las costas del Pacífico; sobre la carretera, desde Guerrero hasta Oaxaca (7).

El material con el cual se trabajó es un conjunto de varias recolecciones, siendo la última realizada en el año 2007. Las semillas, se encuentran limpias y almacenadas en un bote de plástico con tapa, a temperatura ambiente.

Las condiciones óptimas de almacenamiento de las semillas es entre un 6-10% de humedad y a 4°C. Así, pueden permanecer viables por más de 10 años. Con un 50% de humedad y a 17°C pueden almacenarse por un año (22).

No obstante, aunque en este trabajo no es de interés la viabilidad de la semilla; la forma en la cual está almacenada posiblemente puede afectar su composición y el contenido de canavanina, con el paso del tiempo.

6.2. Molienda

Se realizó una molienda de aproximadamente 50 g de muestra, utilizando un tamiz con un tamaño de abertura de 1mm para poder llevar a cabo el análisis proximal.

También, se realizó una molienda con un tamaño de partícula de 3 mm. Esta harina integral de las semillas de cacahuanano es la que se utilizó para llevar a cabo todos los procedimientos de destoxificación.

En ambos casos, se utilizó un molino Thomas-Wiley Modelo 4.

6.3. Análisis proximal

El análisis proximal es el método clásico para determinar el contenido de los macronutrientes en los alimentos de forma integral. A continuación, se describen los métodos que fueron utilizados.

6.3.1. Determinación de Humedad:

Fundamento

Es un método que se basa en la pérdida de peso debido a la evaporación de agua en el punto de ebullición o temperaturas más bajas, si se utiliza vacío. La proporción de agua perdida aumenta al elevar la temperatura; por lo tanto, es importante comparar sólo los resultados obtenidos usando las mismas condiciones de secado, más aún, si es factible que ocurra alguna descomposición. La pérdida en peso también depende de diversos factores como son: el tamaño de la partícula (por lo que debe ser lo más pequeño y homogéneo posible), el peso de la muestra, y las variaciones de temperatura entre una y otra charola del horno.

Material

- 3 charolas de aluminio
- Balanza analítica (Sartorius Analytic)
- Estufa de vacío (Lab-Line Duo Vac Oven, Modelo 3620)
- Desecador de vidrio
- Pinzas para crisoles

Procedimiento (Técnica descrita por la AOAC -14.004- 1989)

Las charolas de aluminio se colocaron en la estufa de vacío hasta que alcanzaron su peso constante, el cual fue registrado. Posteriormente, se pesaron aproximadamente de 4-5 g de la muestra. Las charolas con la muestra se introdujeron en la estufa de vacío, a una presión no menor a 20 in de Hg y temperatura de 60-65°C. Durante el tiempo en que las charolas con la muestra permanecieron en la estufa de vacío, se realizaron pesadas periódicas de las mismas; sacándolas de la estufa y colocándolas inmediatamente en un desecador donde permanecieron 25 minutos para que se enfriaran. Después, cada charola con la muestra se pesó en una balanza analítica. Esta actividad se realizó hasta que se alcanzó el peso constante, el cual también fue registrado.

La determinación se hizo por triplicado.

Cálculos

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_i - P_f}{m} \times 100$$

Donde:

P_i = peso charola con muestra húmeda (en gramos)

P_f = peso charola con muestra seca (en gramos)

m = peso de la muestra (en gramos)

6.3.2. Determinación de Grasa:

Fundamento

El contenido de grasa de una matriz alimentaria está constituido por diversas sustancias lipídicas y puede ser extraído por los disolventes menos polares como lo son el éter de petróleo y éter etílico. La determinación se basa en la extracción con un disolvente (éter de petróleo) del material seco y molido en un aparato de extracción continua; en el que las gotas condensadas del disolvente caen sobre la muestra contenida en un recipiente poroso o dedal, alrededor del cual pasan los vapores calientes del disolvente.

Material y reactivos

- Aparato de extracción Goldfish (Labconco, Modelo 35001-00CV)
- 3 vasos de borde esmerilado (Labconco 35051)
- 3 porta dedales de vidrio
- 3 anillos metálicos para extracción Goldfish
- 3 tubos recuperadores de disolvente
- 3 cartuchos de celulosa de 22 x 80 mm
- Estufa de vacío (Lab-Line Duo Vac Oven, Modelo 3620)
- Balanza analítica (Sartorius Analytic)
- Bomba de recirculación (Little Grant Pump, Modelo 1)
- Éter de petróleo QP
- Desecador de vidrio
- Pinzas para crisoles

Procedimiento (Técnica descrita por la AOAC - 7.063 - 1989)

Se colocaron los vasos esmerilados en la estufa de vacío hasta que alcanzaron su peso constante, el cual fue registrado. En los cartuchos de celulosa se colocaron aproximadamente 4 g de muestra seca. Posteriormente, los cartuchos se taparon ligeramente con algodón y se

introdujeron a los porta-dedales de vidrio que se colocaron en el compartimiento de extracción de Goldfish. En los vasos esmerilados se vertieron aproximadamente 50 mL de éter de petróleo y fueron colocados, con ayuda del anillo metálico en el aparato de extracción, el cual a su vez se conectó con una bomba de recirculación de agua helada. Finalmente, se subió la parrilla de calentamiento del equipo y se trabajó con el control de calentamiento en la posición "low" durante un período de 8 horas. Al término de este tiempo, se bajaron las parrillas de calentamiento y se sacaron los porta-dedales, sustituyéndolos por los tubos recuperadores de disolvente y se volvió a colocar nuevamente el vaso para iniciar de nuevo el calentamiento. Cuando los vasos se encontraron libres de disolvente, se retiraron del equipo y se colocaron durante unos minutos en una campana de extracción, para asegurar la completa remoción del disolvente. Después, se colocaron en la estufa de vacío hasta que alcanzaron su peso constante, el cual fue registrado.

La determinación fue hecha por triplicado.

Cálculos

$$\% \text{ Grasa} = \frac{P_f - P_o}{m} \times 100$$

Donde:

P_i = peso del vaso con la grasa (en gramos)

P_f = peso del vaso a peso constante (en gramos)

m = peso de la muestra (en gramos)

6.3.3. Determinación de Fibra cruda:

Fundamento

La fibra cruda es el residuo orgánico insoluble y comestible que queda después de tratar la muestra desengrasada en las condiciones descritas a continuación: Hidrólisis ácida con ácido sulfúrico (1.25%), seguido de una hidrólisis alcalina con hidróxido de sodio (1.25%), lavado con

alcohol con una posterior incineración del material insoluble, de tal modo que por diferencia es posible obtener el contenido de hidratos de carbono no degradables. Este tratamiento empírico proporciona la fibra cruda, que consiste principalmente en celulosa y cierta proporción de lignina y hemicelulosa contenidas en la muestra original.

Material y reactivos

- 3 vasos de Berzelius de 600 mL (Kimax)
- Estufa de vacío (Lab-Line Duo Vac Oven, Modelo 3620)
- Balanza analítica (Sartorius analytic)
- Mufla (Heraew Hanau)
- Mechero Fischer
- Triángulo de porcelana
- Aparato de digestión (Labconco)
- 3 crisoles de porcelana
- 3 matraces de vidrio Kitasato (Kimax)
- 3 mangueras
- 3 soportes universales
- 3 pinzas
- Silicato de aluminio
- Embudo buchner tipo California (malla de 200 mesh)
- Solución de H_2SO_4 al 1.25% (m/v)
- Solución de NaOH al 1.25% (m/v)
- Solución antiespumante
- Alcohol etílico
- Desecador de vidrio
- Pinzas para crisoles

Procedimiento (Técnica descrita por la AOAC - 7.074 - 1989)

La muestra desengrasada obtenida a partir de la determinación de grasa, se pasó cuantitativamente a los vasos de Berzelius que contenían aproximadamente 0.5 g de silicato de aluminio. A continuación, se le adicionaron 200 mL de H₂SO₄ al 1.25% (m/v), en ebullición, así como unas gotas de antiespumante y perlas de vidrio para controlar la ebullición. Los vasos se colocaron inmediatamente en el aparato de digestión, el cual estaba previamente calentado, y se dejó digerir por un tiempo de 30 minutos exactos. Al término de éste tiempo, se filtró el contenido sobre un embudo buchner tipo California, con ayuda de vacío, y se lavó el residuo con agua destilada caliente hasta que se eliminó el ácido (aproximadamente 600-700 mL). Nuevamente, el residuo se transfirió cuantitativamente al vaso Berzelius, y se adicionaron unas gotas de antiespumante y 200 mL de NaOH al 1.25% (m/v) hirviendo. Se colocó en el aparato de digestión y se dejó digerir por un tiempo de 30 minutos exactos. Transcurrido éste tiempo, se vació al embudo buchner tipo California y se filtró con ayuda de vacío. El residuo se lavó con agua destilada caliente hasta que se eliminó el álcali (600-700 mL). Finalmente, se retiraron las perlas de ebullición y se agregaron 25 mL de alcohol etílico. El residuo se trasladó a un crisol de porcelana, previamente puesto a peso constante (registrando éste valor). Se colocaron en la estufa de vacío para su secado hasta que alcanzaron peso constante; el cual también fue registrado. A continuación, se carbonizó el residuo con un mechero Fisher, sobre un triángulo de porcelana y se introdujo en la mufla. Los crisoles se pesaron en diferentes periodos de tiempo hasta que alcanzaron peso constante, registrando el valor obtenido.

La determinación se hizo por triplicado.

Cálculos

$$\% \text{ de fibra} = \left[\frac{\text{Peso}_{\text{crisol con residuo después de secado}} - \text{Peso}_{\text{crisol + cenizas}}}{\text{Peso}_{\text{muestra}}} \right] \times 100$$

6.3.4. Determinación de Cenizas:

Fundamento

La determinación de cenizas se basa en la destrucción de la materia orgánica contenida en una matriz alimentaria, considerándose a las cenizas como el residuo inorgánico que queda después de incinerar dicha materia orgánica en una mufla.

Material

- 3 crisoles de porcelana
- Desecador de vidrio
- Mechero Fischer
- Campana de extracción
- Balanza analítica (Sartorius Analytic)
- Mufla (Heraew Hanau)
- Pinzas para crisoles
- Triángulo de porcelana

Procedimiento (Técnica descrita por la AOAC -7.009- 1989)

Los tres crisoles se colocaron en la mufla a una temperatura de 500-550°C, hasta alcanzar peso constante, el cual fue registrado. En cada crisol a peso constante, se colocaron de 2 a 3 gramos de muestra. El crisol con la muestra se colocó sobre el triángulo de porcelana para incinerar, en la flama del mechero; con el fin de carbonizar la muestra, hasta que se observó un mínimo desprendimiento de humo. Posteriormente, los crisoles se introdujeron en la mufla, la cual se mantuvo a una temperatura entre 500-550°C. Se realizaron pesadas periódicas; sacando los crisoles con la muestra de la mufla y colocándolos inmediatamente en un desecador donde permanecieron 25 minutos para que se enfriaran. Después, cada crisol con la muestra se pesó en una balanza analítica. Esta actividad se realizó hasta que se alcanzó el peso constante, el cual también fue registrado.

La determinación se hizo por triplicado.

Cálculos

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{Pf} - \text{Po}}{m} \times 100$$

Donde:

Pf = peso del crisol con las cenizas (en gramos)

Po = peso del crisol a peso constante (en gramos)

m = peso de la muestra (en gramos)

6.3.5. Determinación de Proteína cruda:

Fundamento

Para la determinación de proteína, generalmente es empleado el método Kjeldahl, que en realidad determina el nitrógeno orgánico total contenido en una matriz alimenticia. Este método se basa en la combustión en húmedo de la muestra por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado, en presencia de catalizadores metálicos y de otro tipo, para reducir el nitrógeno orgánico de la muestra hasta nitrógeno inorgánico en forma de amoniaco; el cual queda en solución en forma de sulfato ácido de amonio (NH_4HSO_4). La materia orgánica digerida, una vez alcalinizada (NaOH), se destila directamente o por arrastre con vapor para desprender el amoniaco, el cual es atrapado en una solución de ácido bórico y posteriormente titulado.

El contenido de proteína es 6.25 veces el contenido de nitrógeno, pues, por lo general, las proteínas tienen 16% de nitrógeno.

Las reacciones antes descritas se muestran a continuación:



Material y reactivos

- Digestor (Tecator 20 – 40)
- Equipo de microdestilación (Kjeltec Auto Analyzer Tecator, Modelo 1030)
- 4 tubos de digestión de 75 mL (Tecator)
- Mezcla digestiva

3 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 20 mL de agua, 50 mL de H_3PO_4 y 430 mL de H_2SO_4 concentrado

- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Sulfato de potasio (reactivo analítico)
- Solución de NaOH al 40%
- Solución de ácido bórico con indicadores

Se pesaron 10 g de ácido bórico, 7 mL rojo de metilo y 10 mL de verde de bromocresol y se llevó a un volumen final de 1L

- Solución de HCl 0.01 N valorada

Procedimiento (Método 2.055 de AOAC 1989)

El contenido de proteína se determina con el Método 2.055 de AOAC 1989 con las siguientes modificaciones: 1) Se colocaron aproximadamente 50 mg de la muestra y se agregaron 0.5 g de K_2SO_4 y 3 mL de mezcla digestiva en los tubos de digestión que se colocaron en el digestor; 2) Después de 15 minutos en el digestor a 340°C , se sacaron los tubos y se mantuvieron a temperatura ambiente entre 5-10 minutos. Se adicionó 1.5 mL de H_2O_2 al 30% a cada tubo y se colocaron nuevamente en el digestor a 370°C hasta que se obtuvo transparencia en la mezcla y 3) Se realizó la destilación, adicionando hidróxido de sodio al 40% y recibiendo en ácido bórico con indicadores, valorando con HCl 0.01N normalizado.

El objetivo de modificar la mezcla digestiva y utilizar peróxido de hidrógeno es lograr la completa oxidación de la materia orgánica y reducir la pérdida de nitrógeno por formación de aminas o nitrógeno libre, favoreciendo la formación de sulfato de amonio.

Se realizó el mismo tratamiento con caseína (88.88% de proteína) para corregir el valor obtenido. Se utilizó dextrosa como blanco.

Esta determinación también se realizó por triplicado.

Cálculos

$$\% \text{ de nitrógeno} = [(M - Y) \times N \times \text{meq} \times 100] / m$$

$$\% \text{ de Proteína} = \% \text{ nitrógeno} \times F$$

Donde:

M : mL titulación de la muestra

Y: mL titulación del blanco

N: normalidad de la solución de HCl

meq: miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m : peso de la muestra en gramos

F: factor de conversión de proteína. Se emplea el valor de 6.25

6.3.6. Determinación de Hidratos de carbono:

De acuerdo al esquema Weende, los hidratos de carbono se calcularon por diferencia.

Cálculo

$$\% \text{ Hidratos de carbono} = 100 - (\% \text{ Humedad} + \% \text{ Cenizas} + \% \text{ Grasa} + \% \text{ Fibra} + \% \text{ Proteína})$$

6.4. Determinación del contenido de canavanina en las semillas de cacahuanano

Fundamento

La canavanina es un análogo estructural de la arginina y por ello, es un compuesto biológicamente activo que inhibe el crecimiento de varios organismos como bacterias, virus, protozoarios e insectos. La metodología empleada para su determinación es la propuesta por Fearon y Bell (2) con ciertas modificaciones. Se basa en que los compuestos que tienen el grupo guanidoxi como la canavanina, reaccionan con el reactivo específico de

pentacianoaminoferrato, produciendo un color rojo-magenta. Sin embargo, es importante mencionar que para que se desarrolle esta coloración, se debe trabajar a un pH bien definido entre 5-7.5 y con una muestra que tenga menos de 5% de grasa. La coloración obtenida se lee en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm.

Como el cacahuanano tiene un alto porcentaje de grasa, es necesario llevar a cabo el desengrasado de la harina integral de cacahuanano para poder realizar la determinación del contenido de canavanina. Para desengrasar la muestra, se utilizó éter de petróleo como disolvente y un tiempo de extracción de 8 horas.

Material y reactivos

- Parrilla con agitación magnética y tacómetro (Thermolyne, Modelo SP-13025)
- Potenciómetro con electrodo de combinación (Corning, Modelo 430)
- Baño maría de temperatura controlada (Grant, Modelo SE-10)
- Espectrofotómetro (Sequoia-Turner, Modelo 340)
- HCl 0.1 N

50 mL de HCl 1N y se aforó a 500 mL

- NaOH 1 N
- Solución estándar de canavanina (100 μ g / mL)

0.0078 g de sulfato de canavanina y se aforó a 50 mL

- Buffer de fosfatos pH=7

Solución A: 6.95 g de fosfato monobásico de sodio anhidro y se aforó a 250 mL

Solución B: 14.22 g de fosfato dibásico de sodio anhidro y se aforó a 500 mL

Buffer: 39 mL A + 61 mL B = 100 mL que se aforaron a 200 mL

- NaOH 5N
- Pentacianoaminoferrato al 1% (PCAF)

0.625 g de PCAF con 80% de pureza y se aforó a 50 mL

Procedimiento (Método colorimétrico. Bell, E.A. 1958)

Se pesaron 100-150 mg de muestra finamente molida y desengrasada y se colocaron en un vaso de precipitado pequeño con un magneto adecuado. Se le adicionó 20 mL de HCl 0.1N y se sometió a extracción por toda la noche con una agitación constante de 200 rpm. Al día siguiente, se filtró el extracto sobre papel filtro Whatman de filtración rápida y ayuda de vacío. El filtrado se ajustó a un pH neutro (7.00) con NaOH 1N y 5N, con la ayuda de un potenciómetro. Se volvió a filtrar la solución, pues se puede enturbiar o formar precipitado; por lo que es recomendable. El filtrado se aforó a un volumen de 25 mL. De esa solución, se procedió a su cuantificación. Se tomaron tres alícuotas de 0.5 mL cada una. A una de ellas, se le adicionaron 9 mL de buffer pH=7.0 más 0.1 mL de NaOH 5N más 0.4 mL de PCAF al 1%; que funcionó como blanco. A las dos alícuotas restantes, se les adicionó 9.1 mL de buffer pH 7.0 más 0.4 mL de PCAF al 1%. Se llevaron a un baño maría a una temperatura de 30°C, por un tiempo de 25 minutos. Después de dicho tiempo, se leyó la coloración obtenida en un espectrofotómetro con una longitud de onda de 550 nm. Todo lo anterior se hizo por triplicado.

Fue necesario realizar una curva patrón para poder cuantificar el contenido de canavanina. Esto se hizo cada vez que se realizó la determinación; sobre todo si se cambiaba algún reactivo o se tenían otras condiciones; para así, disminuir errores. Se necesitó una serie de puntos para poder elaborar una gráfica.

A continuación, se muestra la curva estándar que se utilizó:

Concentración de canavanina (μ g)	Solución estándar de canavanina (mL)	Amortiguador pH=7.0 (mL)	PCAF al 1% (mL)
0	0.0	9.6	0.4
20	0.2	9.4	0.4
50	0.5	9.1	0.4
100	1.0	8.6	0.4
150	1.5	8.1	0.4
200	2.0	7.6	0.4
300	3.0	6.6	0.4

Con los valores de absorbancia (Abs) en el eje "y" y los valores de concentración de canavanina en el eje "x", se elaboró una gráfica. El ajuste de la curva se hizo por una regresión lineal; de la cual se obtienen los valores de la pendiente (m) y de la ordenada al origen (b); los cuales nos sirvieron para calcular fácilmente la concentración de canavanina del correspondiente dato de absorbancia de la muestra. El coeficiente de correlación lineal de la curva patrón fue un valor de 0.99. A partir de la gráfica, se determinó el contenido de canavanina, aplicando la siguiente ecuación:

$$\mu \text{ g de canavanina} = (\text{Abs} - b) / m$$

Donde:

b: ordenada al origen

m: pendiente de la recta

Cálculo

Cuando el material tiene más de 5% de grasa, el contenido de canavanina se determina en la muestra desengrasada de acuerdo a la siguiente ecuación:

I) Muestra desengrasada:

$$\text{mg canavanina/100 g muestra} = \frac{\mu \text{ g de canavanina} \times \text{aforo} \times 100}{\text{alícuota para desarrollar color} \times \text{mg muestra}}$$

Sin embargo, para poder expresar el contenido de canavanina en la muestra original, se debe conocer el contenido de grasa y humedad en la muestra, para poder conocer los sólidos totales no grasos (STNG).

II) Muestra original:

$$\text{STNG} = 100 - (\% \text{Humedad} + \% \text{Grasa})$$

$$\% \text{canavanina (muestra desengrasada)} \times \frac{\text{STNG (muestra original)}}{\text{STNG (muestra desengrasada)}}$$

6.5. Procedimientos de destoxificación de las semillas de cacahuanano, junto con el seguimiento de canavanina residual

Se llevó a cabo la prueba con distintos procedimientos de destoxificación, aprovechando las características físico-químicas del aminoácido no proteico que se quiere eliminar (canavanina).

Para llevar a cabo estos procedimientos, se utilizó en todos los casos la harina integral de la semilla de cacahuanano con un tamaño de partícula 3 mm. Después de cada procedimiento de destoxificación, se realizó la determinación del contenido de canavanina en el producto destoxificado para comparar con el contenido original y ver la eficiencia de cada procedimiento en la remoción del tóxico.

A cada procedimiento de destoxificación se le nombró utilizando siglas para facilitar su identificación.

6.5.1. PROCEDIMIENTOS DE DESTOXIFICACIÓN CON MEDIO DE EXTRACCIÓN ACUOSO

Se probó un medio de extracción acuoso pues se sabe que la canavanina es soluble en agua (18). Es importante ionizarla para facilitar su remoción.

En los siguientes procedimientos, el primer número corresponde a las horas de extracción, la letra "A" significa el medio de extracción acuoso y el último número corresponde al pH de trabajo.

Extracción de Canavanina 2A5

Se utilizó una relación semilla:H₂O de 1:10; por lo tanto, se pesaron 10 gramos de harina de cacahuanano y se colocaron en un vaso de precipitados de 250 mL. Se le agregó 90 mL de agua destilada más la cantidad necesaria de ácido acético 1M para llegar a un pH=5. Después, se completó hasta un volumen de 100 mL utilizando agua destilada con un pH ajustado=5. Se realizó una extracción de 2 horas, con agitación constante de 400 rpm, utilizando un magneto de cruz. Al finalizar la extracción, se filtró al vacío utilizando papel de filtración rápida y la muestra retenida se colocó en una charolita de aluminio.

Extracción de Canavanina 4A5

Se llevó a cabo el mismo procedimiento, pero utilizando un tiempo de extracción de 4 horas.

Extracción de Canavanina 8A5

Se llevó a cabo el mismo procedimiento, pero utilizando un tiempo de extracción de 8 horas.

Extracción de Canavanina 2A3

Se utilizó una relación semilla:H₂O de 1:10; por lo tanto, se pesaron 10 gramos de harina de cacahuanano y se colocaron en un vaso de precipitados de 250 mL. Se le agregó 90 mL de agua destilada más la cantidad necesaria de ácido acético glacial, para llegar a un pH=3 y se ajustó con agua destilada a un volumen de 100 mL. Se realizó una extracción de 2 horas, con una agitación constante de 400 rpm, utilizando un magneto de cruz. Al finalizar la extracción, se filtró al vacío utilizando papel de filtración rápida y la muestra retenida se colocó en una charolita de aluminio.

Extracción de Canavanina 4A3

Se llevó a cabo el mismo procedimiento, pero utilizando un tiempo de extracción de 4 horas.

6.5.2. PROCEDIMIENTOS DE DESTOXIFICACIÓN CON RECAMBIOS DEL MEDIO DE EXTRACCIÓN ACUOSO

Conociendo el pH de trabajo más adecuado para la remoción de la canavanina y debido a que el medio de extracción se satura, se probó hacer recambios de éste. El pH de trabajo para los procedimientos que se muestran a continuación fue 3.0 ± 0.1

En las siglas que identifican los siguientes procedimientos de destoxificación, el primer número corresponde al tiempo de extracción total en horas, la letra "R" significa recambios, el siguiente número corresponde al número de recambios realizados y el número que se encuentra entre paréntesis es el tiempo de extracción en horas, entre cada recambio.

Extracción de Canavanina 6R2(2)

Se llevó a cabo el mismo procedimiento anterior (2A3). Sin embargo, al finalizar una extracción de 2 horas, bajo las mismas condiciones; se filtró al vacío utilizando papel de filtración rápida y

la muestra retenida se volvió a colocar en el vaso de precipitados. Lo anterior se realizó dos veces más; ya que en este método se llevaron a cabo 2 recambios del medio de extracción, uno cada 2 horas, manteniendo el pH=3. Al finalizar el último tiempo de extracción, la muestra se filtró al vacío utilizando papel de filtración rápida y la muestra retenida se colocó en una charolita de aluminio.

Extracción de Canavanina 2.5R4(0.5)

Se llevó a cabo el mismo procedimiento; pero realizando 4 recambios, uno cada media hora.

Extracción de Canavanina 5R4(1)

Se llevó a cabo el mismo procedimiento; con 4 recambios, pero uno cada hora.

6.5.3. PROCEDIMIENTOS DE DESTOXIFICACIÓN CON MEDIO DE EXTRACCIÓN ACUOSO Y TRATAMIENTO TÉRMICO

Elevar la temperatura durante una extracción, puede facilitar la remoción de ciertos compuestos al mejorar su solubilidad.

En los siguientes procedimientos de destoxificación, el primer número corresponde al tiempo de extracción total en horas, la letra "R" significa recambios, el siguiente número corresponde al número de recambios realizados y el número que se encuentra entre paréntesis es el tiempo de extracción en horas, entre cada recambio. La letra "T" significa tratamiento térmico ligero y la letra "C" corresponde al tratamiento de cocción; el último número es el pH de trabajo.

Extracción de Canavanina 6R2(2)T3

Se utilizó una relación semilla:H₂O de 1:10; por lo tanto, se pesaron 10 gramos de harina de cacahuanano y se colocaron en un vaso de precipitados de 250 mL. Se le agregó 90 mL de

agua destilada más la cantidad necesaria de ácido acético glacial para llegar al pH=3 más lo necesario de agua destilada para completar un volumen de 100 mL. En este método se utilizó un baño de agua con una temperatura controlada a 50°C durante las extracciones. Cada extracción se dejó un tiempo de 2 horas, con agitación constante de 400 rpm, utilizando un magneto de cruz. Al finalizar este tiempo de extracción, se filtró al vacío utilizando papel de filtración rápida y la muestra retenida se volvió a colocar en el vaso de precipitados. Esto se repitió dos veces más para hacer un total de 2 recambios. Al finalizar la tercera hora de extracción, de nuevo, se filtró al vacío utilizando papel de filtración rápida y la muestra retenida se colocó en una charolita de aluminio.

Extracción de canavanina 72R2(24)C3

Se utilizó una relación semilla:H₂O de 1:10; por lo tanto, se pesaron 10 gramos de harina de cacahuanano y se colocaron en un vaso de precipitados de 250 mL. Se le agregó 90 mL de agua destilada más la cantidad necesaria de ácido acético glacial para llegar al pH=3 más lo necesario de agua destilada para completar un volumen de 100 mL. Se hizo una extracción de 24 horas, con una agitación constante de 400 rpm, utilizando un magneto de cruz. Al finalizar éste tiempo de extracción, se filtró al vacío utilizando papel de filtración rápida y la muestra retenida se volvió a colocar en el vaso de precipitados. Todo lo anterior, se volvió a realizar por segunda vez. Al finalizar el tiempo de extracción, se filtró al vacío utilizando papel de filtración rápida y la muestra retenida se volvió a colocar en el vaso de precipitados. Se llevó a cabo un segundo recambio, como anteriormente se hizo, y se sometió a una cocción, utilizando el autoclave 15 minutos a 121°C. Después, se filtró al vacío utilizando papel de filtración rápida y la muestra retenida se colocó en una charolita de aluminio.

Extracción de canavanina 72R2(24)C6

Se llevó a cabo el mismo procedimiento pero utilizando un pH de trabajo=6.

Extracción de Canavanina C

Se utilizó una relación semilla:H₂O de 1:10; por lo tanto, se pesaron 10 gramos de harina de cacahuanano y se colocaron en un vaso de precipitados de 250 mL. Se le agregó 100 mL de agua destilada y se midió el pH que tenía. Se llevó a cabo una cocción, 15 minutos a 121°C, utilizando el autoclave. Al finalizar, se filtró al vacío utilizando papel de filtración rápida y la muestra retenida se colocó en una charolita de aluminio.

Extracción de Canavanina 2R2CC3

Se utilizó una relación semilla:H₂O de 1:10; por lo tanto, se pesaron 10 gramos de harina de cacahuanano y se colocaron en un vaso de precipitados de 250 mL. Se le agregó 90 mL de agua destilada más la cantidad necesaria de ácido acético glacial para llegar al pH=3 más lo necesario de agua destilada para completar un volumen de 100 mL. Se llevó a cabo una extracción de 2 horas, con agitación constante de 400 rpm, utilizando un magneto de cruz. Al finalizar el tiempo de extracción, se filtró al vacío, utilizando papel de filtración rápida y la muestra retenida se colocó nuevamente en el vaso de precipitados. Ahí se le adicionó 100 mL de agua destilada, con lo cual se mantuvo el pH=3 y se sometió a un proceso de cocción, 15 minutos a 121°C, utilizando el autoclave. Al finalizar, se filtró al vacío utilizando papel de filtración rápida y la muestra retenida se colocó nuevamente en un vaso de precipitados de 250 mL. Se realizó el mismo procedimiento; se le agregaron 100 mL de agua destilada, manteniendo el pH=3 y se llevó a cabo una segunda cocción, con las mismas condiciones. Al finalizar, se filtró al vacío y la muestra se colocó en una charolita de aluminio.

Extracción de Canavanina R1CC3

Se utilizó una relación semilla:H₂O de 1:10; por lo tanto, se pesaron 10 gramos de harina de cacahuanano y se colocaron en un vaso de precipitados de 250 mL. Se le agregó 90 mL de

agua destilada más la cantidad necesaria de ácido acético glacial para llegar al pH=3 más lo necesario de agua destilada para completar un volumen de 100 mL. Se llevó a cabo una cocción, 15 minutos a 121°C, utilizando el autoclave. Al finalizar, se filtró al vacío utilizando papel de filtración rápida y la muestra retenida se colocó nuevamente en un vaso de precipitados de 250 mL. Se le agregaron 100 mL de agua destilada con lo que se mantuvo el pH=3 y se llevó a cabo una segunda cocción, con las mismas condiciones. Al finalizar, se filtró al vacío y la muestra se colocó en una charolita de aluminio.

Extracción de Canavanina R1CC6

Se llevó a cabo el mismo procedimiento pero utilizando un pH de trabajo=6.

6.5.4. PROCEDIMIENTOS DE DESTOXIFICACIÓN CON MEDIO DE EXTRACCIÓN ACUOSO, MUESTRA PREVIAMENTE DESENGRASADA

La grasa puede llegar a dificultar la extracción de algunos componentes.

Para llevar a cabo los procedimientos de destoxificación que se presentan a continuación, se desengrasó la harina de cacahuanano previamente. Esto se realizó con un equipo tipo Soxhlet, utilizando éter de petróleo como disolvente.

El pH de trabajo para los siguientes procedimientos fue de 3.0 ± 0.1

En los siguientes procedimientos de destoxificación, el primer número corresponde al tiempo de extracción total en horas, la letra "R" significa recambios, el siguiente número corresponde al número de recambios realizados y el número que se encuentra entre paréntesis es el tiempo de extracción en horas, entre cada recambio. La letra "C" corresponde al tratamiento de cocción y la letra "D" señala que la muestra fue previamente desengrasada.

Extracción de Canavanina 2D

Este procedimiento de extracción es prácticamente igual que el procedimiento de extracción 2A3. La única diferencia es que se llevó a cabo con la muestra previamente desengrasada.

Extracción de Canavanina 6R2(2)D

Este procedimiento de extracción es prácticamente igual que el procedimiento de extracción 2R2. La única diferencia es que se llevó a cabo con la muestra previamente desengrasada.

Extracción de Canavanina 8R3(2)D

Se llevó a cabo el mismo procedimiento anterior, pero dando un recambio del medio de extracción más. Por lo tanto, se hicieron 3 recambios, uno cada dos horas; bajo las mismas condiciones.

Extracción de Canavanina R1CCD

Este procedimiento de extracción es prácticamente igual que el procedimiento de extracción 1RCC3. La única diferencia es que se llevó a cabo con la muestra previamente desengrasada.

Extracción de Canavanina R2CCCD

Se llevó a cabo el mismo procedimiento anterior, pero dando un tratamiento de cocción más y por consecuencia, se hizo un recambio más del medio de extracción. En total, se hicieron 3 cocciones y 2 recambios, uno entre cada proceso de cocción.

6.5.5. PROCEDIMIENTOS DE DESTOXIFICACIÓN CON MEDIO DE EXTRACCIÓN

AGUA-METANOL

La canavanina se aísla comercialmente de *Canavalia ensiformis*. En el artículo de Bass *et al.* (1) se propone un método con el cual se extrae el 95% de la canavanina contenida en dicha

planta, utilizando como medio de extracción una mezcla de agua-metanol. También se menciona que el método es eficiente para cualquier leguminosa que tenga un alto contenido de canavanina. Por lo anterior, se decidió probar este método con la semilla de cacahuanano.

En las siglas que se utilizan para nombrar los procedimientos a continuación; los dos primeros números corresponden al porcentaje de metanol presente en el medio de extracción, la "M" significa metanol y el último número corresponde al tiempo de extracción; la letra "h" significa horas, la letra "m" minutos y la letra "D" significa que la muestra fue previamente desengrasada.

Extracción de Canavanina 60M0.5h

Se utilizó una relación semilla:H₂O de 1:5; por lo tanto, se pesaron 10 gramos de harina de cacahuanano y se colocaron en un vaso de precipitados de 250 mL. Se le agregó 50 mL de una solución: 60% metanol RA más 40% agua destilada más 1% de HCl concentrado. Se puso una extracción de 0.5 horas, con agitación constante de 400 rpm, utilizando un magneto de cruz. Al finalizar el tiempo de extracción, se filtró al vacío utilizando papel de filtración rápida y la muestra retenida se colocó en una charolita de aluminio.

Extracción de Canavanina 60M1h

Se llevó a cabo el mismo procedimiento pero con un tiempo de extracción de 1 hora.

Extracción de Canavanina 50M5m

Se realizó el mismo procedimiento anterior pero utilizando como medio de extracción, una solución: 50% metanol RA más 50% agua destilada más 1% de HCl concentrado; y un tiempo de extracción de 5 minutos.

Extracción de Canavanina 50M30m

Se llevó a cabo el mismo procedimiento pero con un tiempo de extracción de 30 minutos.

Extracción de Canavanina 50M30mD

Se llevó a cabo el mismo procedimiento, pero utilizando una muestra previamente desengrasada.

Extracción de Canavanina 50M2hD

Se llevó a cabo el mismo procedimiento, utilizando una muestra previamente desengrasada y una relación semilla:H₂O de 1:10. Por lo tanto, se pesaron 10 gramos de harina de cacahuanano, previamente desengrasada y se colocaron en un vaso de precipitados de 250 mL y se le agregó 100 mL de una solución: 50% metanol RA más 50% agua destilada más 1% de HCl concentrado. El tiempo de extracción fue de 2 horas.

6.6. Secado

Todas las muestras, una vez colocadas en la charolita de aluminio, se colocaron en una estufa de aireación por 24 horas, con una temperatura controlada a 60°C. Esto se realizó para secar las muestras destoxificadas y poder llevar a cabo la determinación de canavanina o cualquier otro análisis.

6.7. Elaboración de dietas

Fundamento

Para llevar a cabo la evaluación nutricional de una fuente de proteína, es necesario elaborar una dieta que sea isoprotéica e isocalórica con respecto a una dieta de referencia (caseína) y que además, la única variable sea precisamente la proteína a evaluar. Para ello, es

indispensable realizar previamente el análisis proximal de la fuente de proteína a evaluar, y así, realizar los ajustes necesarios.

Dieta de referencia

Es una dieta que utiliza caseína como fuente de proteína; ya que la caseína se considera una proteína de buena calidad.

En la Tabla 2, se muestra la dieta de referencia (Caseína) que se utilizó, al 10% de proteína:

Tabla 2. Dieta de referencia (C).

Ingrediente	g/100 g dieta
Caseína (94.3% proteína) 901293 MP Biomedicals	10.5
Sacarosa Comercial SALML ®	22.0
Glucosa Anhidra USP (Comercial Química BARSA)	19.0
Dextrina MAIZENA ®	25.0
Manteca vegetal INCA®	8.0
Aceite vegetal MAZOLA ®	6.0
Mezcla de sales (minerales) 902842 MP Biomedicals	4.0
Mezcla de vitaminas 904654 MP Biomedicals	2.0
Celulosa comercial SIGMA C-8002	3.5

6.8. Ensayo biológico (REP)

Fundamento

La Relación de Eficiencia Proteínica (REP) es probablemente el método biológico más ampliamente utilizado en la evaluación de proteínas. Existen muchos factores que tienen influencia sobre los resultados como son: edad, sexo y cepa de los animales de experimentación, calidad y cantidad de proteína, otros componentes de la dieta, condiciones

ambientales, etc. Por ello, se ha buscado estandarizar el método y así evitar errores experimentales.

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.

Animales de experimentación

Se emplearon ratas macho, de la misma cepa y camada, destetados entre los 21-23 días de edad, y el intervalo de peso no excedió de los 10 gramos.

Dietas

Las dietas que se utilizaron tenían un nivel de proteína del 10%, isocalóricas e isoproteínicas con la dieta de referencia.

Procedimiento

Al recibir los animales, fueron pesados y ordenados según el método de "culebra japonesa", para poder ser distribuidos por lotes. Fueron utilizadas 6 ratas por cada lote de prueba, colocadas en jaulas individuales. A cada animal, se le colocó su respectivo alimento (previamente pesado) y agua. Debido a que las ratas tienden a desperdiciar alimento, se colocó debajo de cada jaula una charola de papel, para poder recuperarlo. Cada tercer día, se registró el peso de cada rata y el alimento ingerido, restando a éste el alimento desperdiciado. Esto se debió haber hecho durante los 21 días que dura el experimento. Sin embargo, no fue posible, pues se obtuvo el 100% de mortandad de los animales de experimentación entre los días 7 y 9.

Cálculos

El REP se calcula para cada una de las ratas, empleando la siguiente ecuación:

$$\text{REP} = \Delta P / \Sigma AI * F$$

Donde:

ΔP : incremento de peso (g)

ΣAI : alimento ingerido total (g)

F: % de proteína en la dieta /100

Con cada uno de los valores individuales, se calcula el REP promedio del lote bajo estudio. El coeficiente de variación (CV) debe ser menor a 15% para que el resultado sea confiable.

$$CV = \frac{\text{desviación estándar}}{\text{REP promedio}} \times 100$$

Para que los datos sean comparativos, es necesario expresarlos en valores de REP ajustado.

Es decir, tomando como referencia el valor de 2.5 para la dieta de caseína.

$$\text{REP ajustado} = \text{REP experimental} \times \frac{\text{REPCaseína (referencia)}}{\text{REPCaseína (experimental)}}$$

7. Resultados y Análisis

En la Tabla 3, se muestran los resultados obtenidos del análisis proximal realizado a las semillas de cacahuanano:

Tabla 3. Resultados del análisis proximal de la semilla de cacahuanano.

Análisis proximal de la semilla de cacahuanano (%) **	
Humedad	4.72 ± 0.04
Grasa	22.49 ± 0.49
Fibra Cruda	5.44 ± 0.49
Cenizas	3.94 ± 0.01
Proteína Cruda*	43.48 ± 0.31
Hidratos de carbono	19.93

* N x 6.25

** Los valores reportados son la media de tres determinaciones

Como se puede ver, el cacahuanano es una semilla rica en grasa y con un alto porcentaje de proteína cruda. Con los resultados obtenidos se caracterizó la semilla y se justificó que si tiene un alto valor nutricional, por lo que tiene un gran potencial alimenticio.

Se realizó la determinación del contenido de canavanina a un lote de reciente recolección (2007) y a un lote de recolecciones anteriores. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la siguiente gráfica (Figura 13):

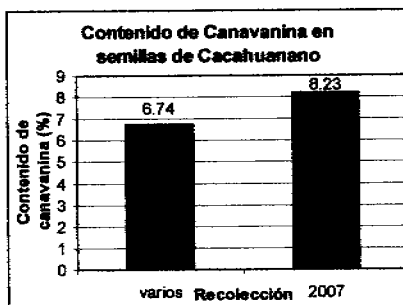


Figura 13. Contenido de canavanina en las semillas de cacahuanano.

Los resultados obtenidos difieren entre sí, pero una posible explicación es la madurez de la semilla. Cuando se va a recolectar la muestra no siempre se hace exactamente en la misma época, por lo que la madurez fisiológica puede variar y este puede ser el factor determinante por el cual, el contenido de canavanina disminuya o aumente en la semilla. Al ser un aminoácido tóxico que las leguminosas utilizan como mecanismo de defensa, se podría pensar que las semillas inmaduras tienen un mayor contenido de canavanina y que éste se pierde conforme la semilla alcanza su madurez. Por lo mismo, se podría suponer que al no tener unas condiciones óptimas de almacenamiento de las semillas de cacahuanano, el contenido de canavanina puede verse afectado y disminuir.

Posteriormente, se realizaron las distintas pruebas de varios procedimientos de destoxificación de la semilla de cacahuanano, con el objetivo de lograr la remoción de la canavanina o en su defecto, disminuir lo más posible su contenido. Todas estas pruebas se realizaron con la harina de cacahuanano con un tamaño de partícula de 3 mm.

Los procedimientos que se probaron y los resultados que se obtuvieron en la determinación de canavanina residual, se resumen en las siguientes tablas:

Tabla 4. Procedimientos de destoxificación con medio de extracción acuoso.

	Relación semilla:H ₂ O	pH	Tiempo de extracción (h)	% Canavanina residual
2A5	1:10	5 ± 0.1	2	6.16 ± 0.1708
4A5	1:10	5 ± 0.1	4	5.83 ± 0.1532
8A5	1:10	5 ± 0.1	8	5.73 ± 0.1289
2A3	1:10	3 ± 0.01	2	4.01 ± 0.2891
4A3	1:10	3 ± 0.01	4	4.59 ± 0.2447

Se utilizó un medio acuoso para llevar a cabo la extracción de la canavanina, ya que se sabe que ésta es soluble en agua. Dado que el pKa teórico de la canavanina es de 9.22, se pensó utilizar un pH inferior, es decir, un pH más ácido para que la canavanina estuviera lo suficientemente ionizada como para facilitar su remoción.

El primer pH con el que se trabajó fue 5, probándose tres diferentes tiempos de extracción: 2,4,8 horas (Procedimientos de destoxificación: 2A5, 4A5, 8A5). Lo que se observó fue que el medio de extracción se satura como se puede ver en la Figura 14. Después de las 4 horas, ya no se lleva a cabo una extracción significativa. Sin embargo, la disminución de la canavanina fue menor a la esperada y por ello, se decidió reducir aún más el pH.

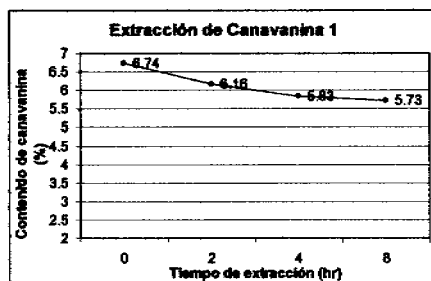


Figura 14. Extracción de canavanina 1.

Se utilizó un pH=3, para ver si al disminuir el pH se veía favorecida la extracción y únicamente se manejaron dos tiempos de extracción: 2,4 horas (Procedimientos de destoxificación: 2A3 y 4A3). Ver Figura 15.

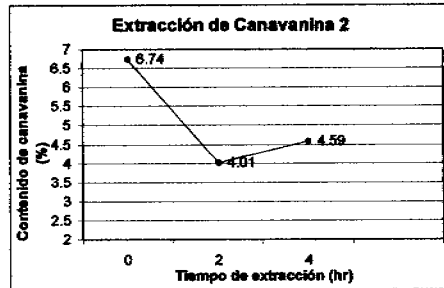


Figura 15. Extracción de canavanina 2.

El pH=3 sí influyó en la disminución del contenido de canavanina en la semilla de cacahuanano. La extracción fue más eficiente, posiblemente porque a un pH más bajo, la canavanina está más ionizada y por ende, se facilita su extracción con un disolvente acuoso. Sin embargo, de 2 a 4 horas no se vio favorecida la extracción. La diferencia encontrada entre estos dos tiempos de extracción no es significativa y el aumento que se obtuvo a las 4 horas puede deberse a un error experimental, a la falta de exactitud del método, entre otros.

Al ver que el medio de extracción se satura, se decidió hacer recambios del medio acuoso de extracción para evitar su saturación; manteniendo el pH=3.

Tabla 5. Procedimientos de destoxificación con recambios del medio de extracción acuoso.

	Relación semilla:H ₂ O	pH	Tiempo de extracción (h)	Recambios H ₂ O	% Canavanina residual
6R2(2)	1:10	3 ± 0.1	6	2 (c/ 2 h)	2.62 ± 0.1352
2.5R4(0.5)	1:10	3 ± 0.1	2.5	4 (c/ 0.5 h)	3.25 ± 0.1222
5R4(1)	1:10	3 ± 0.1	5	4 (c/ 1 h)	3.61 ± 0.1121

En el procedimiento de destoxificación 6R2(2), se realizaron 2 recambios cada 2 horas pues fue el tiempo en el que se vio una disminución significativa del contenido de canavanina, manteniendo el pH=3. La disminución del contenido de canavanina es bastante buena (2.62%) y el procedimiento por el cual se obtuvo este resultado, es un procedimiento práctico y sencillo.

Sin embargo, para comprobar si los recambios eran lo que más funcionaba para hacer la extracción de la canavanina, se probó otro procedimiento de destoxificación: 2.5R4(0.5). Se mantuvieron todas las condiciones iguales, pero se realizaron 4 recambios en total; uno cada media hora. La disminución del contenido de canavanina fue buena (3.25%), pero no tanto como en el procedimiento anterior (6R2(2)). Posiblemente, se debe a que se requiere un mayor tiempo de extracción entre cada recambio para poder lograr la remoción de la canavanina.

Por lo anterior, se probó otro método de destoxificación (5R4(1)), prácticamente igual al anterior (2.5R4(0.5)) pero dando un tiempo de extracción mayor entre cada recambio: 1 hora. El resultado obtenido de canavanina residual fue de 3.61%; es decir, ligeramente mayor al obtenido previamente. Con esto se comprobó que el tiempo de extracción más adecuado son dos horas. Con tiempos menores, la extracción de la canavanina no se lleva a cabo de forma tan eficiente.

Tabla 6. Procedimientos de destoxificación con medio de extracción acuoso y tratamiento térmico.

	Relación semilla:H ₂ O	pH	Tiempo de extracción (h)	Recambios H ₂ O	Temperatura (°C)	Cocción (15 minutos, 121°C)	% Canavanina residual
6R2(2)T3	1:10	3 ± 0.1	6	2 (c/ 2 h)	50	—	3.785 ± 0.1017
72R2(24)C3	1:10	3 ± 0.1	72	2 (c/ 24 h, 1 entre extracción y cocción)	—	1	3.575 ± 0.3376
72R2(24)C6	1:10	6 ± 0.1	72	2 (c/ 24 h, 1 entre extracción y cocción)	—	1	3.795 ± 0.2734
C	1:10	6.17	—	—	—	1	5.13 ± 0.2784
2R2CC3	1:10	3 ± 0.1	2	2 (entre extracción y cocciones)	—	2	3.41 ± 0.1462
R1CC3	1:10	3 ± 0.1	—	1 (entre cocciones)	—	2	3.39 ± 0.2145
R1CC6	1:10	6 ± 0.1	—	1 (entre cocciones)	—	2	3.86 ± 0.2451

El tratamiento térmico puede favorecer la extracción de algunos compuestos. Por ello, se realizó un procedimiento de destoxificación (6R2(2)T3) igual al 6R2(2) que era con el que se había obtenido los mejores resultados, pero utilizando una temperatura controlada de 50°C durante las extracciones. El resultado que se obtuvo no fue el esperado. Se pensó que el contenido de canavanina residual iba a ser menor a 2.62% (obtenido en el procedimiento 6R2(2)), sin embargo, fue de 3.785%. Una posible explicación para eso, es que al utilizar una temperatura de 50°C, se haya facilitado la extracción de otros compuestos distintos a la canavanina. Lo cual ocasiona que la canavanina se concentre dentro de la semilla y eso se refleje en el resultado obtenido.

Posteriormente, se probaron los procedimientos de destoxificación 72R2(24)C3 y 72R2(24)C6, en los que la única diferencia es el pH de trabajo, pH=3 para el primero y pH=6 para el segundo. Estos procedimientos habían sido probados con anterioridad dando muy buenos resultados, por lo que se llevaron a cabo de la misma manera con la que se habían hecho. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron los esperados: 3.575% para el 72R2(24)C3 y 3.795% para el 72R2(24)C6. En realidad, los resultados concuerdan con las conclusiones que se habían obtenido previamente. El pH=3 sí favorece la extracción y aún cuando se dejaron por tiempos de extracción largos (24 horas), la extracción de la canavanina no es efectiva, debido a la saturación del medio de extracción.

Después de realizar todos los métodos anteriormente mencionados, se quiso saber qué tan eficiente era el procedimiento de cocción por sí solo. En el procedimiento de destoxificación C, únicamente se vio que la cocción disminuía el contenido de canavanina a 5.13%. No es una disminución muy significativa, pero podría ser una opción adicional a los recambios; ya que la cocción se llevó a cabo sin ajuste de pH.

Combinando estas dos opciones, se realizó el procedimiento de destoxificación 2R2CC3. El resultado obtenido (3.41%) fue bueno pero muy similar al procedimiento de destoxificación R1CC3 (3.39%), en el cual únicamente se llevaron a cabo las 2 cocciones. Es decir, no se realizó la extracción previa de dos horas.

Finalmente, con el procedimiento de destoxificación R2CC6, que es prácticamente igual que el R2CC3 y la única diferencia es el pH de trabajo; se comprobó, una vez más, que el pH=3 sí favorece la extracción de la canavanina; esto sin importar el procedimiento que se utilice. En este procedimiento, el contenido de canavanina residual fue de 3.86%.

Tabla 7. Procedimientos de destoxificación con medio de extracción acuoso, muestra previamente desengrasada.

	Relación semilla:H ₂ O	pH	Tiempo de extracción (h)	Recambios H ₂ O	Cocción (15 minutos, 121°C)	% Canavanina residual
2D	1:10	3 ± 0.1	2	–	–	5.585 ± 0.2006
6R2(2)D	1:10	3 ± 0.1	6	2 (c/2 h)	–	2.80 ± 0.2534
8R3(2)D	1:10	3 ± 0.1	8	3 (c/2 h)	–	3.47 ± 0.0980
R1CCD	1:10	3 ± 0.1	–	1 (entre cocciones)	2	2.01 ± 0.0804
R2CCCD	1:10	3 ± 0.01	–	2 (entre cocciones)	3	3.09 ± 0.2003

En muchos de los procedimientos de destoxificación, se obtuvieron resultados del contenido de canavanina residual alrededor de 3%. Por eso, se pensó que tal vez había algo que impedía la extracción de la canavanina. Posiblemente, la canavanina puede quedar ocluida en la grasa y por ende, no extraerse de manera total. Por ello, se decidió desengrasar la muestra antes de someterla a cualquier procedimiento de destoxificación.

El procedimiento de destoxificación 2D es igual que el 2A3 y el 6R2(2)D es igual que el 6R2(2), pero con la muestra previamente desengrasada. En ambos casos el contenido de canavanina residual resultó mayor: 5.585% para el 2D y 2.80% para el 6R2(2)D; por lo que la grasa no influye en los procedimientos que se realizan con extracciones acuosas acidificadas y recambios.

No obstante, se probó el procedimiento de destoxificación 8R3(2)D, donde se lleva a cabo una mayor cantidad de recambios que en el procedimiento 6R2(2)D. El resultado obtenido (3.47%) no fue el esperado, pues se pensaba que al llevar a cabo un recambio más; la extracción de la canavanina se iba a ver favorecida. Por lo contrario, parece que el contenido de canavanina residual aumenta y esto puede deberse a que se extrae una mayor cantidad de otros compuestos distintos a la canavanina.

Sin embargo, en el procedimiento de destoxificación R1CCD, que es igual al R1CC3 pero con la muestra previamente desengrasada; sí se observó una disminución significativa en el contenido de canavanina residual. Esto puede deberse a que durante el proceso de cocción se alcanzan temperaturas en las cuales, la mínima grasa que aún contenga la muestra se funde y otros componentes como proteínas o hidratos de carbono también se extraen o se desdobl原因, facilitando la extracción de la canavanina.

Por lo anterior, en el procedimiento de destoxificación R2CCCD, se realizaron un mayor número de cocciones. Lo que sucedió fue algo similar que con el procedimiento 8R3(2)D. El resultado obtenido (3.09%) no fue el esperado, pues se pensaba que al llevar a cabo una cocción más; la extracción de la canavanina se iba a ver favorecida. Por lo contrario, parece que el contenido de canavanina residual aumenta y esto puede deberse a que se extrae una mayor cantidad de otros compuestos distintos a la canavanina durante la tercera cocción.

Tabla 8. Procedimientos de destoxificación con medio de extracción agua-metanol.

	Disolvente	Relación Semilla:Disolvente	pH	Tiempo de extracción (horas:minutos)	% Canavanina residual
60M0.5h	60% MeOH + 40% H ₂ O + 1% HCl	1:5	3.63	0:30	7.22 ± 0.4171
60M1h	60% MeOH + 40% H ₂ O + 1% HCl	1:5	3.63	1:00	7.24 ± 0.0860
50M5m	50% MeOH + 50% H ₂ O + 1% HCl	1:5	3.30	0:05	7.12 ± 0.0618
50M30m	50% MeOH + 50% H ₂ O + 1% HCl	1:5	3.30	0:30	6.60 ± 0.1805
50M30mD	50% MeOH + 50% H ₂ O + 1% HCl	1:5	3.36	0:30	6.06 ± 0.4095
50M2hD	50% MeOH + 50% H ₂ O + 1% HCl	1:10	3.52	2:00	4.18 ± 0.1359

Los procedimientos de destoxificación con medio de extracción no acuoso, están basados en un artículo de Bass *et al.* (1)

En los procedimientos de destoxificación 60M0.5h y 60M1h, se utilizó como medio de extracción una solución 60% metanol más 40% agua más 1% de HCl concentrado. En el artículo base no se mencionan los tiempos de extracción; por lo que, se decidió hacerlo por 30 minutos y 1 hora, respectivamente. Los resultados que se obtuvieron no concuerdan con lo reportado en el artículo base (1), donde se reporta que siguiendo este método se puede eliminar hasta un 95%

del contenido de canavanina en la semilla de Jack bean (*Canavalia ensiformis*). En los resultados, se puede ver que el contenido de canavanina en la semilla de cacahuanano parece haber aumentado (7.22% para 30 minutos y 7.24% para 1 hora). Esto indica que no se extrajo absolutamente nada y los valores más altos que el valor inicial pueden deberse a la extracción de otros componentes, ocasionando que se concentre la canavanina.

Sin embargo, se decidió volver a intentar este método pues se menciona que sí es aplicable para cualquier leguminosa que tenga un alto contenido de canavanina, como es el caso del cacahuanano (1). Únicamente se realizó una modificación utilizando como medio de extracción una solución 50% metanol más 50% agua más 1% HCl concentrado. Esto se hizo pues en el artículo base trabajan con semillas de *Canavalia ensiformis* enteras y las ponen a remojar toda una noche previo a la extracción. Al ser una leguminosa, puede absorber su peso en agua durante el remojo y por consecuencia, la concentración de metanol en el medio de extracción es menor que la que se menciona inicialmente de 60%. Como se vio que en realidad de media hora a 1 hora no hubo una diferencia significativa; se decidió hacer tiempos de extracción de 5 minutos (50M5m) (pues en el artículo dice que es inmediato) y de media hora (50M30m).

El resultado obtenido (7.12% para 5 minutos y 6.60% para 30 minutos) comprobó que el método no es adecuado para la remoción de la canavanina, para el caso de la semilla de cacahuanano. Incluso podría pensarse que de alguna forma se concentra por la extracción de algunos otros componentes. Sin embargo, los valores obtenidos no difieren significativamente del valor original, lo que indica que no se extrajo prácticamente nada. La variación puede deberse al método de determinación.

No obstante, lo que se ve claramente es que el medio de extracción con una solución metanol:agua no es eficiente para la extracción de la canavanina en la semilla de cacahuanano; sin importar, que el pH de trabajo fuera cercano a 3. Posiblemente esto se debe a que el artículo hace referencia a *Canavalia ensiformis* y aunque también es una leguminosa; la

matriz es diferente a la del cacahuanano. El cacahuanano tiene un porcentaje mayor de grasa y *Canavalia ensiformis* tiene un porcentaje mayor de hidratos de carbono.

En el procedimiento de destoxificación 50M30mD se realizó exactamente lo mismo que en el procedimiento 50M30m, pero con la muestra desengrasada previamente. La muestra se desengrasó para intentar asemejar más la matriz del cacahuanano a la de *Canavalia ensiformis*. La diferencia en el resultado obtenido (6.06%) es mínima; lo cual significa que efectivamente la eliminación de la grasa no favorece la extracción de la canavanina cuando se realizan extracciones.

Por último, se probó el procedimiento 50M2hD; utilizando el mismo medio de extracción pero con una relación de disolvente:semilla mayor (1:10), la muestra previamente desengrasada y el tiempo de extracción óptimo de 2 horas. Es decir, se tomó la idea de la composición del medio de extracción del artículo base; pero para otras condiciones, se utilizó lo que ya se había utilizado en procedimientos anteriores. El resultado obtenido fue mejor (4.18%). Sin embargo, no es un resultado bueno ni esperado. Posiblemente, la extracción metanol:agua no sea efectiva debido a que al desengrasar la muestra, el porcentaje de hidratos de carbono del cacahuanano es mayor que el de *Canavalia ensiformis*. Es decir, las matrices siguen siendo diferentes.

Al analizar todos los resultados de manera conjunta, se puede ver que la grasa influye en la extracción de canavanina en procedimientos que involucran altas temperaturas. Sin embargo, el contenido de canavanina no fue posible reducirlo a un valor menor de 2% aproximadamente.

Una posible idea es que el total de la canavanina no se encuentra en su forma libre. Es decir, que parte de la canavanina se encuentre unida a hidratos de carbono formando una especie de glicoproteínas o que se encuentre dentro de las proteínas, debido a su semejanza con la arginina.

Por lo tanto, el mejor procedimiento de destoxificación fue el R1CCD.

En la Tabla 9, se muestran los resultados obtenidos del análisis proximal realizado al producto destoxificado que se utilizó para la elaboración de las dietas que se utilizaron durante el ensayo biológico:

Tabla 9. Resultados del análisis proximal del producto destoxificado.

Análisis proximal de la semilla de cacahuanano (%) **	
Humedad	2.03 ± 0.05
Grasa	1.16 ± 0.03
Fibra Cruda	13.03 ± 0.21
Cenizas	2.87 ± 0.02
Proteína Cruda*	49.81 ± 2.12
Hidratos de carbono	31.1

* N x 6.25

** Los valores reportados son la media de tres determinaciones

Al finalizar el análisis bromatológico del producto destoxificado, se llevó a cabo la determinación de canavanina presente para conocer la cantidad de tóxico aún presente. El resultado obtenido fue de 3.55 ± 0.35 %.

Se puede observar que al aumentar el escalamiento del procedimiento de detoxificación no se obtuvo la remoción de canavanina como se había logrado en un inicio (2.01%). La cantidad de tóxico aún presente es considerable. Sin embargo, al formular la dieta, el tóxico se diluye con los otros componentes que la integran; por lo cual se esperaba que la ingesta del tóxico fuera menor y no manifestara síntomas clínicos de toxicidad.

Las dietas que se elaboraron se presentan a continuación, en las Tablas 10 y 11. Se elaboraron, de tal forma, que fueran isocalóricas e isoprotéicas con la dieta de referencia, (caseína).

Tabla 10. Composición de dieta de cacahuanano (T).

Ingrediente	g/100 g dieta	g/750 g dieta
Cacahuanano	20.08	150.60
Sacarosa Comercial SALML ®	19.92	149.40
Glucosa Anhidra USP (Comercial Química BARSA)	17.20	129.00
Dextrina MAIZENA ®	22.64	169.80
Manteca vegetal INCA®	7.87	59.03
Aceite vegetal MAZOLA ®	5.90	44.25
Mezcla de sales (minerales) 902842 MP Biomedicals	3.42	25.65
Mezcla de vitaminas 904654 MP Biomedicals	2.00	15.00
Celulosa comercial SIGMA C-8002	0.97	7.28

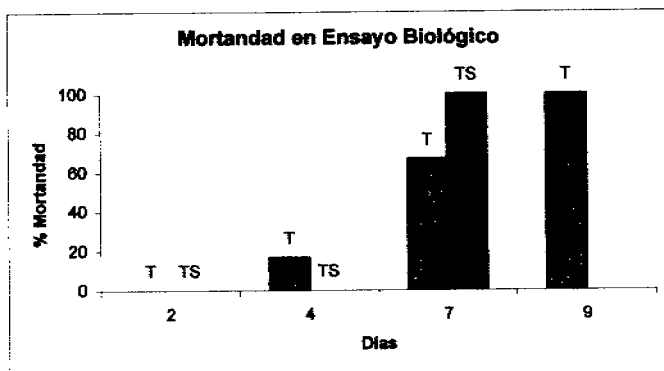
Se decidió probar una segunda dieta, suplementada con los dos aminoácidos en los que el cacahuanano es más deficiente: metionina y triptofano. Esto se realizó para ver si mejoraba la calidad nutritiva del cacahuanano.

Tabla 11. Composición de dieta de cacahuanano suplementada (TS).

Ingrediente	g/100 g dieta	g/750 g dieta
Cacahuanano	20.08	150.60
Sacarosa Comercial SALML ®	19.92	149.40
Glucosa Anhidra USP (Comercial Química BARSÁ)	17.20	129.00
Dextrina MAIZENA ®	22.64	169.80
Manteca vegetal INCA®	7.87	59.03
Aceite vegetal MAZOLA ®	5.90	44.25
Mezcla de sales (minerales) 902842 MP Biomedicals	3.42	25.65
Mezcla de vitaminas 904654 MP Biomedicals	2.00	15.00
L-Metionina Grado Comercial	0.4	3.0
L-Triptofano Grado Comercial	0.06	0.45
Celulosa comercial SIGMA C-8002	0.51	3.83

Al recibir los ejemplares para llevar a cabo el ensayo biológico, se encontraban en buen estado de salud y cumplían todos los requisitos, con los cuales se habían solicitado. Sin embargo, durante el ensayo biológico, todos los ejemplares (animales de experimentación) presentaron síntomas de algún efecto tóxico, obviamente causado por la canavanina.

La tabla de mortandad obtenida se muestra a continuación, en la Figura 16:



T = Dieta de cacahuanano.
 TS = Dieta de cacahuanano suplementada.

Figura 16. Mortandad durante el ensayo biológico.

Los resultados obtenidos no fueron los esperados.

En las dos dietas que se evaluaron, las ratas presentaron los siguientes síntomas:

- Hipotermia: Se sentían frías al tacto.
- Piloerección.
- Coloración ligeramente amarilla en el pelo.
- Orina muy densa y de color amarillo intenso.
- Falta de coordinación.
- A veces, temblores.
- Posible reacción alérgica: Se rascaban desesperadamente la nariz. Incluso hasta quitarse el pelo y la piel de la zona.

La falta de coordinación y los temblores pueden indicar un posible daño neurológico, es decir, que la canavanina puede afectar el sistema nervioso central.

Fue necesario sacrificar a la rata T1 el día 4 por los síntomas tan fuertes que presentaba. Sin embargo, al realizar la necropsia del animal no se observó daño en ningún órgano visceral, pulmones y corazón.

En realidad, no se sabe con exactitud los efectos tóxicos que tiene la canavanina, pero se comprueba que puede llegar a ser letal.

Los efectos de la suplementación no fueron evaluados, debido a que el tiempo de vida de los animales fue muy corto.

8. Conclusiones

- El cacahuanano tiene un alto potencial alimenticio, por la alta cantidad de proteína y grasa.
- La madurez fisiológica de la semilla influye en el contenido de canavanina.
- Mientras más ionizada se encuentre la canavanina, es mejor es su extracción en fase acuosa.
- Hacer recambios de agua favorece la extracción de la canavanina; pues se evita la saturación del disolvente.
- El procedimiento de purificación propuesto por Bass *et al.* (1), que utiliza un medio de extracción metanol:agua no es eficiente para la remoción de la canavanina en la semilla de cacahuanano.
- El mejor procedimiento de destoxificación fue el R1CCD; trabajando con la muestra previamente desengrasada, con una relación de semilla:agua de 1:10, pH=3, 2 cocciones (121°C, 15 minutos) y un recambio del medio de extracción entre cada cocción; obteniéndose un valor de $2.01\% \pm 0.0804$ de canavanina residual.
- Al aumentar el escalamiento del procedimiento de destoxificación R1CCD, para obtener suficiente cantidad del material destoxificado, fue menos eficiente la remoción de la canavanina.
- La harina de cacahuanano destoxificada tiene un alto contenido de proteína. Sin embargo, no se logró la remoción adecuada de la canavanina y se observaron sus efectos tóxicos durante el ensayo biológico.
- Con los resultados obtenidos, se puede asumir que no toda la canavanina se encuentra de forma libre en la semilla de cacahuanano, como se menciona en la literatura.

9. Bibliografía

1. Bass, M.; Harper, L.; Rosenthal, G. *et al.* (1995). "Large Scale Production and Chemical Characterization of the Protective Higher Plant Allelochemicals: L-Canavanine and L-Canaline." *Biochemical Systematics and Ecology*. Vol. 23, No. 7/8, 717-721.
2. Bell, E.A. (1958). "Canavanine and related compounds in leguminosae." *Biochem. J.* 70, 617-619.
3. Budinova, T.K.; Gergova, K.M.; Petrov, N.V.; Minkova, V.N. (1994). "Removal of Metal Ions from Aqueous Solution by Activated Carbons Obtained from Different Raw Materials." *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 60, 177-182.
4. Huisman, J.; Van der Poel, T.F.B.; Liener, S.E. (1988). "Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds." *First International Workshop on ANF's in Legume Seeds*. Woyeningen, Netherlands.
5. Little, E.L., Wadsworth, H.F. y Marrero, J. (1967). "Árboles Comunes de Puerto Rico y las Islas Virgenes." Editorial UPR. Puerto Rico. Págs. 277-278.
6. Macdonald, G.M. (1997). "A Dictionary of Natural Products." Editorial Plexus Publishing, Inc. Medford. Pág. 337.
7. Martínez, Alfredo. (2001). "Evaluación Bromatológica y Toxicológica de la Fracción Proteínica de la Semilla de Cacahuanano (*Gliricidia sepium*)." Tesis. Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF.
8. Martínez, Maximino. (1959). "Plantas Útiles de la Flora Mexicana." Editorial Botas. México, D.F. México. Págs. 499-500.
9. Patiño, V.M. (1967). "Plantas Cultivadas y Animales Domésticos en América Equinoccial." Tomo III. Imprenta Departamental. Cali, Colombia. Págs. 199-200.
10. Rosenthal, Gerald A. (1986). "Biochemical insight into insecticidal properties of L-Canavanine, a higher plant protective allelochemical." *Journal of Chemical Ecology*, Vol. 12, No. 5: 1145-1156.
11. Rosenthal, Gerald A. "Effect of Long-Chained Esters on the Insecticidal Properties of L-Canavanine." *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 296-299.
12. Rosenthal, Gerald A. "Insecticidal Properties of Some Derivatives of L-Canavanine." *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43, 2728-2734.
13. Rosenthal, Gerald A. *et al.* (1995). "Large scale Production and Chemical Characterization of the Protective Higher Plant Allelochemicals: L-Canavanine and L-Canaline." *Biochemical Systematics and Ecology*. Vol. 23. No. 7/8. Págs. 717-721.
14. Rosenthal, Gerald A. (1977). "Preparation and colorimetric analysis of L-canavanine." *Anal. Biochem.* 77 (1), 147-151.

15. Savage, W.D.; Wie, L.S.; Sutherland, J.W.; Schmidt, S.J. (1995). "Biologically Active Components Inactivation and Protein Insolubilization during Heat Processing of Soybeans." *Journal of Food Science*. Vol. 60. No. 1. 168-180.
16. Sivoli, Lilliam; Méndez, Adriana, Michelangeli, Coromoto. (2005). "Toxicidad del aminoácido no proteínico L-canavanina en pollos de engorde." *Revista Científica, FCV-LIZ*. Vol. XV. No. 2. 155-158.
17. Sotelo, Angela; Lucas, Bernardo; Blanc, Fernando; Giral, Francisco. (1986). "Chemical Composition of Seeds of *Gliricidia sepium*." *Nutrition Reports International*. Vol. 34. No. 3. Septiembre. Págs. 315-323.
18. Udedibie, A.B.I. (2001). "Semillas de canavalia *Canavalia ensiformis* en dietas avícolas. Resultados recientes de investigaciones en Nigeria." *Revista Cubana de Ciencia Avícola*. 25: 89-99.
19. Van der Poel, T.F.B.; Huisman, J.; Saini, H.S. (1993). "Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds." *EAAP Publication #70*. Woyeningen, Netherlands.
20. <http://www.sian.info.ve/> Belmar, Roberto; Nava, Rutilio. "Factores Antinutricionales en la Alimentación de Animales Monogástricos." Buscador: Google.
http://www.sian.info.ve/porcinos/publicaciones/encuentros/viii_encuentro/roberto.htm
Última fecha de consulta: 28-Octubre-2008.
21. <http://milksci.unizar.es/> Calvo, Miguel. "Otras Substancias Nocivas Naturales." *Bioquímica de los Alimentos*. Universidad de Zaragoza. Buscador: Google.
<http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/toxico/otrassustancias.html>
Última fecha de consulta: 28-Octubre-2008.
22. <http://www.conafor.gob.mx> Comisión Nacional Forestal. "Sistema Nacional de Información Forestal (SNIF)." Ficha técnica. Buscador: Google.
http://148.223.105.188:2222/snif_portal/secciones/usos/UsosPDF.php?especieURL=Gliricidiasepium
Última fecha de consulta: 28-Octubre-2008.
23. <http://www.tropicalforages.info/> CSIRO Sustainable Ecosystems, Department of Primary Industries & Fisheries (Qld), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), International Livestock Research Institute (ILRI). (2005). "Tropical Forages: An Interactive Selection Tool." Buscador: Google.
http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Htm/Gliricidia_sepium.htm
Última fecha de consulta: 28-Octubre-2008.
24. <http://www.fao.org/> Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). "Sistema de Información de los Recursos del Pienso." Buscador: Google.
<http://www.fao.org/ag/aga/agap/frq/afri/es/Data/207.HTM>
Última fecha de consulta: 28-Octubre-2008.

25. <http://www.agronet.gov.co/> Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Gómez, María Elena; Rodríguez, Lylian; Murgueitio, Enrique, *et al.* (2002). "Árboles y Arbustos Forrajeros Utilizados en Alimentación Animal como Fuente Proteica." Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria. Cali, Colombia. 3ra.edición. Buscador: Google.

http://www.agronet.gov.co/www/docs_si2/20061024152517_Arboles%20y%20arbustos%20%20forrajeros%20alimentacion%20animal.pdf

Última fecha de consulta: 28-Octubre-2008.

26. <http://www.invdes.com.mx/> Periodismo de Ciencia y Tecnología. (2002). "Los retos de la desnutrición en México." Buscador: Google.

<http://www.invdes.com.mx/antecedentes/Marzo2002/html/desnutri.html>

Última fecha de consulta: 28-Octubre-2008.

27. <http://www.sian.info.ve/> Vargas, Rubén; Michelangeli, Coromoto. "Utilización de la *Canavalia ensiformis* (L.) DC. en dietas para aves y cerdos." Laboratorio de Bioquímica Nutricional, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. Buscador: Google.

<http://www.sian.info.ve/porcinos/publicaciones/segencuentr/rubenv.htm>

Última fecha de consulta: 28-Octubre-2008.