



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION NUTRICIA DE LA FRACCION
PROTEINICA DE LA SEMILLA DE COLORIN
(*Erythrina americana*) DESTOXIFICADA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

HUERTA BARRIENTOS HILDA



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2005

m.340851



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
Vocal
Secretario
1^{er}. Suplente
2^{do}. Suplente

Prof. Bernardo Lucas Florentino
Prof. Lucia Cornejo Barrera
Prof. Leticia Gil Vieyra
Prof. Bertha J. Sandoval Guillen
Prof. Rosa M. Argote Espinosa

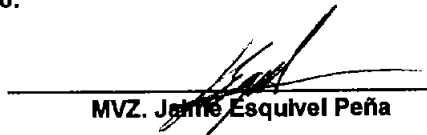
Sitio en donde se desarrolló el tema:
Lab. 111 del Depto. de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM
y C.E.I.E.P.A Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia, UNAM.

Asesor de tema:



M en C. Bernardo Lucas Florentino

Supervisor técnico:



MVZ. Jaime Esquivel Peña

Sustentante:



Hilda Huerta Barrientos

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Huerta Barrientos
Hilda
FECHA: 08/02/2005
FIRMA: [Handwritten Signature]

*Dedico este trabajo a mis padres, quienes me dieron la vida,
me inculcaron principios, perdonaron mis fallas y me
apoyaron en todo momento para lograr esta meta.
Los amo, esto es suyo.*

Agradecimientos y Dedicatorias

A ella quien a pesar de todo siempre me ha dado una nueva oportunidad, quien ha estado conmigo en los momentos más difíciles y que comprendió que estudiar química era lo que más deseaba y me apoyo.

Mi mamá

A él, a quien me ha enseñado que la disciplina es el mejor camino para alcanzar el éxito, quien a su manera me ha demostrado cariño y de quien he tenido todo el apoyo para mi realización profesional.

Mi papá

A ellas, con quienes he compartido toda mi vida, de quienes he aprendido mucho y que de una u otra manera han influido en mi para seguir adelante.

Maty, Aida y Roxana

A él, quien estuvo conmigo toda la carrera, con quien he compartido los estudios, la amistad y el amor, con quien tengo un proyecto de vida, a quien amo y quiero decirle que "La soledad se admira y desea cuando no se sufre, pero la necesidad humana de compartir cosas es evidente".

Juan Carlos

A ellas, por ser las mejores amigas que he tenido, con quienes he contado siempre a pesar de la distancia, quienes me han comprendido y ayudado cuando las he necesitado.

Diana, Paz, Pili, Estrella, Ana, Gaby, Lore, Han y Helen.

A todos ellos que me acompañaron a lo largo de la carrera, con quienes compartí experiencias, trabajo y sobre todo la amistad.

Rene, Paco y Generación 99

Al los integrantes del equipo de Basketball, en donde aprendí que si puede haber un balance entre el estudio y el deporte, en donde encontré también la amistad, comprensión y compañerismo.

Ene, Jimmy, Aby, Chan, Naya, Licha, Liz y Robert.

A Lety, Rosita, Doña Vicky, Arge e Ili por sus observaciones, ayuda, y sobre todo por hacer del laboratorio más que un lugar de trabajo un lugar calido, lleno de cariño y amistad.

A todos los que estuvieron en el laboratorio 111 durante mi estancia y que me brindaron su ayuda y amistad.

René, Ofe, Alicia, Héctor, Janette, Dora, Laura, etc.....

Al Maestro Bernardo Lucas por su confianza, sus consejos y su apoyo para la realización de esta tesis.

Al MVZ Jaime Esquivel por sus observaciones, apoyo y disposición para la realización de este trabajo.

Al todos los miembros de CEIEPA que me ayudaron e hicieron el préstamo de las instalaciones así como sus comentarios y consejos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México que ha sido mi casa por mucho tiempo, en donde he podido desarrollarme social e intelectualmente, y donde he vivido los instantes y satisfacciones más hermosas de mi vida.

A quien le debo todo lo que soy. Dios

“A TODOS USTEDES GRACIAS”

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	3
1. ANTECEDENTES	5
1.1 DESNUTRICIÓN EN MÉXICO Y EL MUNDO	5
1.2 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DEL COLORÍN (<i>Erythrina americana</i>)	5
1.3 GENERALIDADES SOBRE <i>Erythrina americana</i>	8
1.4 ALIMENTACIÓN DE AVES	9
1.4.1 HIDRATOS DE CARBONO	10
1.4.2 LÍPIDOS	10
1.4.3 PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS	11
1.4.4 MINERALES	13
1.4.5 VITAMINAS	14
1.4.6 PROCESO DE DIGESTIÓN EN AVES	15
1.4.7 LOS RANGOS NORMALES DE LA DIGESTIBILIDAD DE PROTEÍNAS	16
1.4.8 CAUSAS DE LA REDUCCIÓN EN DIGESTIBILIDAD DE PROTEÍNA	17
1.5 BIOENSAYOS NUTRITIVOS	19
1.5.1 MÉTODOS PARA DETERMINAR LA CALIDAD DE LAS PROTEÍNAS	19
1.5.2 RELACIÓN DE EFICIENCIA PROTEINICA (REP)	20
1.5.3 CONVERSIÓN ALIMENTICIA	20
1.5.4 DIGESTIBILIDAD	23
1.6 UTILIZACIÓN DE ENZIMAS EN DIETAS PARA AVES	24
2. OBJETIVO GENERAL	26
2.1 OBJETIVOS PARTICULARES	26

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	27
3.1 RECOLECCIÓN DE MATERIA PRIMA	28
3.2 PARÁMETROS FÍSICOS	28
3.3 FRACCIONAMIENTO	30
3.4 DESENGRASADO	30
3.5 EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES CON METANOL	33
3.6 PRUEBA CUALITATIVA DE ALCALOIDES	35
3.7 TAMIZADO	36
3.8 MOLIENDA FINA	37
3.9 TOXICOLOGÍA ANALÍTICA	38
3.9.1 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ALCALOIDES	38
3.9.2 INHIBIDORES DE TRIPSINA	40
3.9.3 DETERMINACIÓN SEMICUANTITATIVA DE HEMAGLUTININAS	45
3.10 ANÁLISIS PROXIMAL	48
3.11 REPARACIÓN DE DIETAS	57
3.12 EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LA FRACCIÓN PROTEÍICA DE LAS SEMILLAS DE COLORÍN	59
3.12.1 MANIPULACIÓN Y ALIMENTACIÓN DE LAS AVES	54
3.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	61
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
5. CONCLUSIONES	70
6. BIBLIOGRAFÍA	71
ANEXO 1	75
ANEXO 2	78

RESUMEN

En México el hambre y la desnutrición son un problema grave y no obstante el aumento de la disponibilidad de los alimentos el problema sigue acrecentándose, es por ello la incansable búsqueda de material biológico con potencial proteínico-energético. La producción de carne de pollo es una actividad pecuaria, gracias a la cual la población humana puede cubrir gran parte de sus necesidades de proteína mediante el consumo de este alimento, esto es factible debido a que es la carne más barata en el mercado, a pesar de que el alimento de estos animales es de los más caros. En un alimento para pollos, uno de los ingredientes más importantes es la proteína la cual representa el mayor costo del alimento. Son diversas las fuentes de proteína empleadas en la alimentación de los pollos, la soya y el sorgo son un ejemplo, sin embargo, en el presente trabajo se propone la potencial utilización de las semillas de Colorín que tienen un alto contenido de proteína y ésta ha manifestado un perfil de aminoácidos muy adecuado para alimentación de otros animales monogástricos. El problema que presentan las semillas de Colorín es que contienen factores tóxicos que si no son inactivados ejercen efectos indeseables a corto y largo plazo. Entre estos factores se encuentran los alcaloides y los inhibidores de tripsina, pero bajo las condiciones de destoxificación fue posible dejarla prácticamente libre de alcaloides; mientras que los inhibidores de tripsina presentan termoresistencia y el nivel de estos sólo se disminuyen en parte; sin embargo, con la adición de pancreatina en las dietas de prueba, es posible contrarrestar el efecto antinutricional de este factor tóxico. Se realizaron dos experimentos con la finalidad de evaluar la calidad nutricia de la fracción proteínica de las semillas de Colorín destoxificadas, en ambos se emplearon pollos de la estirpe Ross x Ross de un día de edad, un diseño experimental de cuatro repeticiones de 5 animales para cada tratamiento de prueba y el tiempo de experimentación fue de 2 semanas. El primer experimento del estudio constó de tres

tratamientos: dieta control (soya + sorgo), dieta 50% Colorín (soya + sorgo + Colorín +pancreatina bovina) y dieta 100% Colorín (Sorgo + Colorín + pancreatina bovina) de donde se observó una pobre respuesta biológica de los animales sometidos a las dietas con Colorín, lo que se atribuyó al alto contenido de inhibidores de tripsina y la poca efectividad de la pancreatina bovina debido a una variación ínterespecie, por lo que se procedió a realizar un segundo bioensayo utilizando pancreatina aviar (Avizime) obteniendo resultados satisfactorios para los parámetros biológicos estudiados: Relación de Eficiencia Proteínica (REP), Conversión Alimenticia (CA) y Digestibilidad de la Proteína; por lo que las semillas de Colorín muestran ser una alternativa potencial en la alimentación de aves domésticas (pollos).

1. ANTECEDENTES

1.1 DESNUTRICIÓN EN MÉXICO Y EL MUNDO

Los datos de México y el mundo entero demuestran que las causas subyacentes, en la mayoría de los problemas de nutrición, no se han modificado sustancialmente en los últimos 50 años, según datos de la FAO (**Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004**) actualmente 777 millones de personas en los países en desarrollo sufren algún grado de desnutrición; concretamente, es un hecho que el 55% de las 12 millones de muertes infantiles anuales se deben a la desnutrición, que 2 millones de personas (39% niños menores de cinco años y 52% mujeres embarazadas) sufren de anemia (**FAO,2004**).

La pobreza, la ignorancia y la enfermedad, junto con el suministro inadecuado de alimentos, ambientes insalubres, estrés social y la discriminación, todavía persisten sin cambio evidente como una maraña de factores que interactúan y se combinan para crear condiciones en las que florece la malnutrición. Sin embargo, lo que cambia de modo fundamental es el enfoque para tratar la malnutrición. Los problemas de desnutrición son cada vez mas frecuentes en el mundo en unos casos por la falta de alimentos que ingerir (países subdesarrollados y en vías de desarrollo) y en otros casos por una dieta inadecuada (países desarrollados) (**Latham, 2002**).

1.2 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DEL COLORÍN (*Erythrina americana*).

Paradójicamente al problema de desnutrición, el mal planeado desarrollo agropecuario en muchas comunidades rurales, pone en peligro la conservación de

plantas silvestres o de cultivo incipiente, no importando que algunas de ellas tienen un alto potencial alimenticio, y son apreciadas y utilizadas de manera sustentable en dichas comunidades. En estos entornos indígenas se destruye vegetación silvestre o en cultivo incipiente en forma indiscriminada, con tal de obtener tierras adecuadas para el sistema intensivo de monocultivo y extensión de la ganadería; esto pone en peligro el potencial germoplásmico de muchas especies silvestres, que algunos autores le denominan “erosión genética” (Flores, 1988; Doode y Pérez, 1994; Centurión et al, 2000). Por lo tanto, el riesgo de la implantación de la “modernidad” mal planeada en estas zonas, pone en peligro la pérdida de especies vegetales que hasta el momento no han sido valoradas en su plenitud (Bostid, 1989; Hernández y León, 1992).

La búsqueda de material biológico con potencial proteínico-energético, no es nueva ni difícil de implantar como recurso agroalimentario, ya que el territorio mexicano cuenta con una gran biodiversidad (Villela y Gerez, 1994; Granados y López, 1996). Con respecto a lo anterior, cabe mencionar que el sur de México junto con Centroamérica, fue uno de los principales centros de origen de muchas plantas cultivadas y que actualmente son alimentos de origen vegetal que el género humano disfruta (Granados y López, 1996).

Las leguminosas constituyen una de las familias botánicas más amplias del reino vegetal, pues comprende 650 géneros aproximadamente que incluyen alrededor de 18,000 especies distribuidas en todo el mundo, en especial en las regiones tropicales y subtropicales (Harborne et al, 1971; Smartt, 1990).

Una característica propia de las semillas de las leguminosas es su alto contenido de proteína, por lo tanto, no es sorprendente que algunas semillas sean utilizadas

como fuente de proteína en la alimentación de muchos países en vías de desarrollo. Hoy en día unas cuantas leguminosas (aproximadamente 20) son de importancia comercial como fuente de alimento humano, las cuales son consumidas en estado seco, cocidas y en estado inmaduro (**Sinha, 1978; Kay, 1991**).

En el caso de la planta conocida como Colorín (*Erythrina americana*), en ciertas regiones del país, las flores son usadas con fines comestibles; sin embargo se ha encontrado que las semillas tienen un alto contenido de proteína y grasa (**Sotelo et al, 1993**) y la proteína de la semilla destoxificada ha manifestado un perfil de aminoácidos muy adecuado para alimentación de animales monogástricos ya que en bioensayos realizados anteriormente se obtuvo una Relación de Eficiencia Proteínica (REP) sin diferencia significativa con respecto al REP control en el que se empleo como fuente de proteína, caseína, por lo que dicho resultado fue de gran relevancia, considerando la semilla de Colorín como una buena fuente de proteína para la alimentación de otros animales monogástricos (**Tenorio, 1993; Sotelo et al, 1993**).

La producción de carne de pollo es una actividad pecuaria, gracias a la cual la población humana puede cubrir gran parte de sus necesidades de proteína mediante el consumo de este alimento, esto es factible debido a que es la carne más barata en el mercado, a pesar de que el alimento de estos animales es de los más caros.

En un alimento para pollos, uno de los ingredientes más importantes es el proteínico el cual representa el mayor costo del alimento total. Este ingrediente debe presentar un perfil de aminoácidos tal que permita cumplir con los

como fuente de proteína en la alimentación de muchos países en vías de desarrollo. Hoy en día unas cuantas leguminosas (aproximadamente 20) son de importancia comercial como fuente de alimento humano, las cuales son consumidas en estado seco, cocidas y en estado inmaduro (**Sinha, 1978; Kay, 1991**).

En el caso de la planta conocida como Colorín (*Erythrina americana*), en ciertas regiones del país, las flores son usadas con fines comestibles; sin embargo se ha encontrado que las semillas tienen un alto contenido de proteína y grasa (**Sotelo et al,1993**) y la proteína de la semilla destoxificada ha manifestado un perfil de aminoácidos muy adecuado para alimentación de animales monogástricos ya que en bioensayos realizados anteriormente se obtuvo una Relación de Eficiencia Proteínica (REP) sin diferencia significativa con respecto al REP control en el que se empleo como fuente de proteína, caseína, por lo que dicho resultado fue de gran relevancia, considerando la semilla de Colorín como una buena fuente de proteína para la alimentación de otros animales monogástricos (**Tenorio, 1993; Sotelo et al, 1993**).

La producción de carne de pollo es una actividad pecuaria, gracias a la cual la población humana puede cubrir gran parte de sus necesidades de proteína mediante el consumo de este alimento, esto es factible debido a que es la carne más barata en el mercado, a pesar de que el alimento de estos animales es de los más caros.

En un alimento para pollos, uno de los ingredientes más importantes es el proteínico el cual representa el mayor costo del alimento total. Este ingrediente debe presentar un perfil de aminoácidos tal que permita cumplir con los

como fuente de proteína en la alimentación de muchos países en vías de desarrollo. Hoy en día unas cuantas leguminosas (aproximadamente 20) son de importancia comercial como fuente de alimento humano, las cuales son consumidas en estado seco, cocidas y en estado inmaduro **(Sinha, 1978; Kay, 1991)**.

En el caso de la planta conocida como Colorín (*Erythrina americana*), en ciertas regiones del país, las flores son usadas con fines comestibles; sin embargo se ha encontrado que las semillas tienen un alto contenido de proteína y grasa **(Sotelo et al,1993)** y la proteína de la semilla destoxificada ha manifestado un perfil de aminoácidos muy adecuado para alimentación de animales monogástricos ya que en bioensayos realizados anteriormente se obtuvo una Relación de Eficiencia Proteínica (REP) sin diferencia significativa con respecto al REP control en el que se empleó como fuente de proteína, caseína, por lo que dicho resultado fue de gran relevancia, considerando la semilla de Colorín como una buena fuente de proteína para la alimentación de otros animales monogástricos **(Tenorio, 1993; Sotelo et al, 1993)**.

La producción de carne de pollo es una actividad pecuaria, gracias a la cual la población humana puede cubrir gran parte de sus necesidades de proteína mediante el consumo de este alimento, esto es factible debido a que es la carne más barata en el mercado, a pesar de que el alimento de estos animales es de los más caros.

En un alimento para pollos, uno de los ingredientes más importantes es el proteínico el cual representa el mayor costo del alimento total. Este ingrediente debe presentar un perfil de aminoácidos tal que permita cumplir con los

requerimientos del ave y de esta forma mejorar su desarrollo (**Martínez Pró y Ávila, 1995**).

Son diversas las fuentes de proteína empleadas en la alimentación de los pollos, la pasta de soya, algodón, ajonjolí, gluten de maiz son algunos ejemplos, siendo actualmente la soya la mas utilizada, a pesar de que en México no se produce pasta de soya en cantidad suficiente, lo cual obliga a importar este producto, hecho que incrementa notablemente su precio y obliga al formulador de raciones a emplear otros productos que reduzcan los costos del alimento; sin embargo, en los últimos años el precio del alimento se ha incrementado notablemente por lo que es necesario buscar nuevas fuentes de proteína y que estas además de cumplir con los requerimientos nutrimentales, reduzcan el costo del alimento (**Ávila, 2001**).

1.3 GENERALIDADES SOBRE *Erythrina americana*.

El género ***Erythrina*** consta de 108 especies de amplia distribución en México se cultiva en terrenos tropicales y medianamente fértiles, se propagan con facilidad por medio de semillas o estacas.

El Colorín (***Erythrina americana***) es una leguminosa cuyo árbol alcanza de 4 a 5 metros de altura , su tallo es amarillento e irregular y sus ramas espinosas ; las hojas son trifoliadas , con hojuelas de 10 cm. de largo, casi cordiformes o deltoides y en la mayoría de los casos glabras provistas de estípulas.

El fruto es una legumbre de aproximadamente 20 cm. de largo y 2 cm. de ancho con estrangulamiento que limita los lóculos donde se alojan las semillas ,

que son de color rojo vivo, escarlata o naranja como las flores ,su testa es lisa y brillante.

Se le conoce con los nombres comunes de Colorín, Chocolín en Hidalgo y Chilicote en Baja California, Sonora y otros lugares del sur del país **(Tenorio, 1993)**.

El Colorín se caracteriza por biosintetizar alcaloides, a los que se les atribuyen propiedades paralizantes de los nervios motores similares al curare **(Guerrero, 1980; O' Gorman, 1993; Garcia-Mateos, 1996, 1998; Garín-Aguilar et al, 2000)**; además, en estudios previos se ha determinado que la semilla cruda tiene un alto contenido de inhibidores de tripsina, reportándose de 68-69 U.T.I / mg (unidades de tripsina inhibida por miligramo de muestra) por lo que es necesaria su destoxificación para poder proponerla con fines alimenticios **(Tenorio, 1993; Sotelo et al, 1993)**.

1.4 ALIMENTACIÓN DE AVES

La alimentación de las aves es lo más importante en una explotación avícola por tal motivo el productor de pollo deberá estar consiente de la calidad del alimento que compre o prepare ya que este debe cubrir las necesidades nutrimentales del ave de acuerdo a su estado fisiológico; en caso de que estas necesidades no se cubran, el potencial genético de las aves no se podrá manifestar, es decir al llegar a las siete semanas el peso del pollo será inferior al que exige el mercado.

El alimento para pollo está compuesto de una mezcla de ingredientes tales como: cereales, pasta de soya, aceite o grasa, vitaminas y minerales ya que por

medio de estos ingredientes se obtienen aminoácidos, energía y los nutrimentos necesarios para las funciones de mantenimiento y producción de carne (**Martínez Pró y Ávila, 1995**).

1.4.1 HIDRATOS DE CARBONO

La mayor parte de la cantidad de energía requerida por el pollo es suministrada por medio de los hidratos de carbono en la dieta, los cuales al ser oxidados durante el metabolismo proporcionan energía. La energía es utilizada por el organismo para realizar funciones de mantenimiento y producción. En un alimento balanceado, la energía que requiere el animal la obtiene principalmente de los cereales como el maíz, sorgo y trigo que son ricos en almidón y en el caso del pollo de engorda dado que sus necesidades de energía son muy altas se requiere además del uso de grasas o aceites para cubrir esos elevados requerimientos de energía metabolizable (**Ávila, 2001**). La Tabla 1 muestra las necesidades energéticas y nutrimentales de pollos de engorda (**NRC, 1994**).

1.4.2 LÍPIDOS

Tanto las grasas de origen animal como los aceites de origen vegetal desde el punto de vista nutricional son considerados como fuentes concentradas de energía; por lo cual en la formulación de alimento para pollos de engorda se adicionan grasas o aceites, ya que es imposible tratar de cubrir las necesidades energéticas de un pollo sólo con los hidratos de carbono (**Martínez Pró y Ávila, 1995**).

Las funciones que desempeñan los lípidos en la alimentación de las aves son:

- Permiten incrementar el nivel de energía de una dieta.

- Son fuentes de ácidos grasos indispensables, en particular del ácido linoleico.
- Mejoran la textura del alimento
- Mejora la absorción de las vitaminas liposolubles
- En las aves tienen un efecto extracalórico ya que se reduce la velocidad de paso del alimento a través del tracto digestivo mejorando de esta manera la utilización de la energía del resto de los componentes del alimento.

1.4.3 PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS

En el caso de las aves son 12 los aminoácidos indispensables y son: lisina, metionina, cistina, treonina, triptofano, leucina, isoleucina, arginina, histidina, valina, fenilalanina y tirosina.

La glicina es un aminoácido importante en el caso de las aves porque sirve para la síntesis del ácido úrico, principal metabolito para excretar los compuestos nitrogenados del catabolismo; es importante señalar que la glicina se forma a partir de serina y viceversa, por lo que ambos aminoácidos son críticos también para las aves.

La función de los aminoácidos desde el punto de vista productivo es que son requeridos por las células para formar proteína muscular, necesaria para el crecimiento del animal y para la formación de plumas.

De todo lo anterior se deriva la importancia de los aminoácidos desde el punto de vista de mantenimiento y producción, por lo que al formular un alimento se debe procurar que éste contenga las cantidades apropiadas para suplir las necesidades del animal.

Las necesidades de aminoácidos como de proteína se presentan también en la Tabla 1, no obstante que han cambiado y un factor que ha contribuido a ello es el continuo avance en el mejoramiento genético de las estirpes de pollos comerciales; estos cambios en la producción animal obligan a reevaluar las necesidades nutricias de manera continua para asegurar que el potencial genético del animal se manifieste (Martínez Pró y Ávila, 1995).

Tabla 1.
Necesidades nutricionales (NRC, 1994) de pollos de engorda en porcentaje o unidades por Kg. de dieta (90% de materia seca).

Nutriente	unidad	0-3 semanas	3-6 semanas
Energía metabolizable	kcal	3200	3200 ^a
Proteína ^b y aminoácidos	%	23.0	20.0
Arginina	%	1.25	1.10
Glicina + serina	%	1.25	1.14
Histidina	%	0.35	0.32
Isoleucina	%	0.80	0.73
Leucina	%	0.20	1.09
Lisina	%	1.10	1.0
Metionina	%	0.50	0.38
Metionina + cistina	%	0.90	0.72
Fenilalanina	%	0.72	0.65
Fenilalanina + tirosina	%	0.34	1.22
Prolina	%	0.60	0.55
Treonina	%	0.80	0.74
Triptofano	%	0.20	0.18
Valina	%	0.90	0.82
Ácido linoleico	%	1.0	1.0

^a Estos valores de EM/kg de dieta pueden ser menores dependiendo de los ingredientes y disponibilidad de las grasas o aceites.

^b Los pollos de engorda no tienen requerimientos de proteína *Per se*. Pero debe haber una cantidad suficiente para síntesis de aminoácidos dispensables.

1.4.4 MINERALES

Los elementos inorgánicos indispensables que se muestran en la Tabla 2 desempeñan funciones importantes y variadas por lo que un suministro inadecuado de estos puede causar graves daños al animal y afectar la actividad productiva. A continuación se expondrán algunas de las funciones de dichos elementos.

El calcio y fósforo se encuentran en el sistema óseo en forma de hidroxiapatita, sin embargo, estos dos elementos tienen otras funciones más importantes: la función del calcio es la coagulación y la del fósforo la formación de enlaces ricos en energía en la molécula de ATP.

El sodio, potasio y cloro son elementos que participan en la regulación del balance ácido – base, en el mantenimiento de la presión osmótica y en el balance hídrico.

El magnesio es un elemento requerido por el sistema enzimático que interviene en la síntesis de la matriz proteínica del hueso, por lo que su deficiencia produce malformaciones.

El hierro y cobre son necesarios para la formación de la hemoglobina y la falta de estos elementos puede producir anemia.

El Zinc es un elemento que está relacionado con procesos metabólicos que intervienen en la integridad de la piel, plumas y de los huesos.

La ración de minerales puede ser agregada a la dieta mediante una premezcla mineral sin embargo debe tenerse cuidado de que sea adecuada ya que una deficiencia o sobredosis puede causar graves daños al animal **(Martínez Pró y Ávila, 1995)**.

Tabla 2.
Necesidades de minerales expresados en porcentaje o mg/kg de dieta (NRC, 1994).

Macrominerales	unidad	0-3 semanas	3-6 semanas
Calcio	%	1.0	0.90
Cloro	%	0.2	0.15
Magnesio	mg	600	600
Fosforo	%	0.45	0.35
Potasio	%	0.30	0.30
Sodio	%	0.20	0.15
Minerales traza			
Cobre	mg	8	8
Yodo	mg	0.35	0.35
Fierro	mg	80	80
Manganeso	mg	60	60
Selenio	mg	0.15	0.15
Zinc	mg	40	40

1.4.5 VITAMINAS

Las vitaminas se pueden dividir en dos grupos: liposolubles e hidrosolubles, sus funciones incluyen mantenimiento del cuerpo, crecimiento, engorda, reproducción, actividad y procesos metabólicos tales como digestión, absorción y excreción. La carencia de una vitamina produce síntomas de deficiencias características y la mayoría de las vitaminas sirven como parte de sistemas enzimáticos que catalizan reacciones bioquímicas específicas que ocurren en diferentes células.

Todas las vitaminas deben proporcionarse en la dieta, por lo menos en las cantidades mínimas. En la Tabla 3 se presentan las necesidades establecidas por el NRC (1994).

Tabla 3.
Necesidades de vitaminas expresadas en porcentaje o mg/kg de dieta (NRC, 1994).

Vitaminas liposolubles	Unidad	0-3 semanas	3-6 semanas
A	UI	1500	1500
D	UIP	200	200
E	UI	10	10
K	mg	0.50	0.50
Vitaminas hidrosolubles	Unidad	0-3 semanas	3-6 semanas
B ₁₂	mg	0.01	0.01
Biotina	mg	0.15	0.15
Colina	mg	1300	1000
Fólico	mg	0.55	0.55
Niacina	mg	35	30
Ácido pantoténico	mg	10	10
Piridoxina	mg	3.50	3.50
Riboflavina	mg	3.60	3.60
Tiamina	mg	1.80	1.80

1.4.6 PROCESO DE DIGESTIÓN EN AVES

La digestión es el proceso de degradación de moléculas grandes y complejas, tal y como se proporcionan en el alimento del ave, en componentes más pequeños que puedan ser absorbidos hacia el sistema circulatorio portal. El proceso involucra cambios en las estructuras tanto físicas, como químicas, de la mayoría de los componentes de la dieta. Los alimentos avícolas consisten de una serie compleja de partículas que difieren no sólo en su composición química sino también en tamaño, dureza, solubilidad y características iónicas. Bajo condiciones ideales, esta serie de partículas y sustancias químicas con distintas características se degradan lentamente paso a paso conforme el alimento pasa del pico hasta el

intestino grueso. La absorción de péptidos es muy rápida en el yeyuno, mientras que la absorción de aminoácidos es más rápida en el íleon (**Crampton, 1972**).

La ruptura de las partículas es un proceso constante, aunque la molleja proporciona el lugar principal para esta actividad, las enzimas son en gran parte responsables de la degradación molecular y un factor muy importante es el pH ya que influye enormemente sobre su eficacia. Parece poco probable que la digestión por debajo del nivel óptimo de cualquier nutriente sea causada por una falta de disponibilidad de la enzima; sin embargo existe preocupación acerca de la cantidad de enzimas que se producen en las aves muy jóvenes, y esto se vuelve de importancia conforme disminuye la edad normal de mercado para las aves de engorda, aumentando así el tiempo proporcional de la capacidad digestiva juvenil.

Cuando la digestión se reduce, habrá un crecimiento reducido del ave o un aumento en el consumo de alimento (**Leeson, 2003**); sin embargo parece existir un aumento en la actividad enzimática conforme el ave envejece, ya que se ha encontrado que la actividad de la tripsina en el contenido intestinal aumenta alrededor de diez veces hasta los 30 días de edad y que al primer día existe sólo una actividad de tripsina de 2-4 unidades/g de contenido intestinal (**Nir et al. (1993)**).

1.4.7 LOS RANGOS NORMALES DE LA DIGESTIBILIDAD DE PROTEÍNAS

Los ingredientes para alimentos balanceados comúnmente usados en las dietas para aves varían ampliamente en cuanto a contenido y digestibilidad de proteína.

También existe una variancia significativa en los valores reportados para la digestibilidad de las proteínas del mismo alimento balanceado. Los distintos

factores, tales como la variedad de la planta y las condiciones de la fuente y el procesamiento en el caso de los alimentos balanceados, son probablemente las causas de la variación. La Tabla 4 muestra los contenidos promedio de proteína cruda y los rangos de digestibilidades para proteínas y ciertos aminoácidos en algunos alimentos balanceados comunes.

Tabla 4.

Contenido normal de proteína cruda y digestibilidad de las materias primas avícolas comunes (Leeson, 2003) *in vivo*.

<i>Materias primas</i>	<i>Proteína</i>	<i>Digestibilidad (%)</i>			
	<i>%</i>	<i>Proteína cruda</i>	<i>Lis</i>	<i>Met</i>	<i>Cis</i>
Maiz amarillo	8	82 - 86	81	91	85
Trigo	12	78 - 82	81	87	87
Cebada	10	70 - 82	78	79	81
Sorgo	10	67 - 72	78	89	83
Harina de maní (cacahuete)	49	88 - 91	83	88	78
Harina de soya	46	83 - 87	91	92	82
Harina de semilla de algodón	43	61 - 76	67	73	73

1.4.8 CAUSAS DE LA REDUCCIÓN EN DIGESTIBILIDAD DE PROTEÍNA

a) Factores antinutricionales

Algunas materias primas para alimentos balanceados que se usan comúnmente en las dietas para aves contienen factores antinutricionales que reducen de manera significativa su valor nutritivo. En la mayoría de los casos el efecto de estos se ve reflejado en una reducción de la digestibilidad de la proteína (Liener, 1980).

Es bien sabido que la alimentación con soya cruda causa una disminución en el crecimiento, baja eficiencia del alimento y el agrandamiento del páncreas en pollitos jóvenes (**Chubb, 1982**). Estos efectos se deben a los inhibidores de tripsina presentes en la soya (**Zhang y Parsons, 1993**). Estos factores antinutricionales inhiben la actividad de la enzima proteolítica tripsina, lo que produce menor actividad de otras enzimas proteolíticas que requieren de la tripsina para su activación. La disminución en el crecimiento de los pollitos se debe a la lenta liberación de todos los aminoácidos esenciales por las enzimas proteolíticas en presencia de los inhibidores de tripsina (**Chubb, 1982**).

b) Los efectos del procesamiento

El exceso de calor aplicado durante el procesamiento puede destruir o disminuir la biodisponibilidad de ciertos aminoácidos sensibles al calor y así reducir enormemente el valor nutricional de dichos ingredientes del alimento balanceado. Esto puede suceder debido a una temperatura de procesamiento muy alta o a un período prolongado de procesamiento, o a ambos. Muchos de los efectos negativos del sobrecalentamiento resultan en una menor calidad de la proteína y la disminución en la digestibilidad de los aminoácidos (**Parsons et al., 1991**).

c) Contenido de fibra

El efecto principal de la fibra consiste en incrementar la pérdida de aminoácidos endógenos por descamación de células de la mucosa intestinal y elevando la producción de moco.

1.5 BIOENSAYOS NUTRITIVOS

La estimación química de la calidad de un alimento o dieta es muy útil y constituye la base de la mayoría de las evaluaciones rutinarias; sin embargo no siempre puede predecir la verdadera biodisponibilidad de los nutrientes es decir, normalmente la evaluación química no considera la pérdida de nutrientes a causa de una deficiente absorción o del catabolismo por lo que es necesario hacer una evaluación de la respuesta biológica en animales de experimentación y de esta manera obtener la verdadera estimación de la calidad nutricia del alimento o dieta en estudio.

Con respecto a las pruebas biológicas o bioensayos es necesario contar con animales que cumplan los siguientes requisitos: deben ser animales totalmente sanos, todos deben ser de la misma cepa, el rango en el peso del lote debe ser el recomendado y de preferencia del mismo sexo. Además se debe contar con un espacio e infraestructura adecuada para tenerlos en condiciones que permitan el pleno desarrollo durante el tiempo de experimentación; el factor mas importante en los bioensayos nutricionales es el tipo de dieta que se suministre y la selección de ésta dependerá del objetivo del experimento, pero se recomienda que las dietas para los animales de laboratorio contengan aproximadamente 50 nutrientes en un balance adecuado **(National Research Council, 1977)**.

1.5.1 METODOS PARA DETERMINAR LA CALIDAD DE LA PROTEÍNA

Existen diversos métodos para evaluar la calidad de las proteínas, sin embargo, la elección de uno u otro dependerá del propósito de la prueba biológica y que información se desea obtener **(Pellet, P. and Young, V, 1980)**.

- Métodos basados en la variación de peso.
- Métodos basados en la retención de nitrógeno.
- Métodos basados en la digestibilidad de los aminoácidos.

1.5.2 RELACIÓN DE EFICIENCIA PROTEÍNICIA (REP)

En 1919 Osborne, Mendel y Ferry introdujeron el concepto de la REP, el cual es quizá el método mas utilizado para la evaluación de una fuente de proteína en animales de laboratorio y se define como la ganancia en peso por gramo de proteína ingerida:

$$REP = \frac{\text{Ganancia en peso}}{\text{Proteína ingerida}}$$

Este parámetro es usual en la experimentación con roedores, aunque a ultimas fechas ha sido utilizado en experimentación avícola sin que las condiciones del método sean modificadas (Treviño J. et al. 2000), es decir la dieta con la fuente de proteína experimental debe cubrir las necesidades del animal y debe ajustarse a una dieta de referencia, en el caso de los pollos de engorda se tienen bien establecidos los requerimientos del ave en el *Nutrient Requirements of Poultry* y la dieta de referencia esta hecha a base de pasta de soya.

1.5.3 CONVERSIÓN ALIMENTICIA

La conversión alimenticia (CA) es una medida de la productividad de un animal y se define como la relación entre el alimento que consume con el peso que gana.

$$CA = \frac{\text{Alimento consumido}}{\text{Ganancia en peso}}$$

factores, tales como la variedad de la planta y las condiciones de la fuente y el procesamiento en el caso de los alimentos balanceados, son probablemente las causas de la variación. La Tabla 4 muestra los contenidos promedio de proteína cruda y los rangos de digestibilidades para proteínas y ciertos aminoácidos en algunos alimentos balanceados comunes.

Tabla 4.

Contenido normal de proteína cruda y digestibilidad de las materias primas avícolas comunes (Leeson, 2003) *in vivo*.

Materias primas	Proteína	Digestibilidad (%)			
	%	Proteína cruda	Lis	Met	Cis
Maíz amarillo	8	82 - 86	81	91	85
Trigo	12	78 - 82	81	87	87
Cebada	10	70 - 82	78	79	81
Sorgo	10	67 - 72	78	89	83
Harina de maní (cacaahuete)	49	88 - 91	83	88	78
Harina de soya	46	83 - 87	91	92	82
Harina de semilla de algodón	43	61 - 76	67	73	73

1.4.8 CAUSAS DE LA REDUCCIÓN EN DIGESTIBILIDAD DE PROTEÍNA

a) Factores antinutricionales

Algunas materias primas para alimentos balanceados que se usan comúnmente en las dietas para aves contienen factores antinutricionales que reducen de manera significativa su valor nutritivo. En la mayoría de los casos el efecto de estos se ve reflejado en una reducción de la digestibilidad de la proteína (Liener, 1980).

Es bien sabido que la alimentación con soya cruda causa una disminución en el crecimiento, baja eficiencia del alimento y el agrandamiento del páncreas en pollitos jóvenes (**Chubb, 1982**). Estos efectos se deben a los inhibidores de tripsina presentes en la soya (**Zhang y Parsons, 1993**). Estos factores antinutricionales inhiben la actividad de la enzima proteolítica tripsina, lo que produce menor actividad de otras enzimas proteolíticas que requieren de la tripsina para su activación. La disminución en el crecimiento de los pollitos se debe a la lenta liberación de todos los aminoácidos esenciales por las enzimas proteolíticas en presencia de los inhibidores de tripsina (**Chubb, 1982**).

b) Los efectos del procesamiento

El exceso de calor aplicado durante el procesamiento puede destruir o disminuir la biodisponibilidad de ciertos aminoácidos sensibles al calor y así reducir enormemente el valor nutritivo de dichos ingredientes del alimento balanceado. Esto puede suceder debido a una temperatura de procesamiento muy alta o a un período prolongado de procesamiento, o a ambos. Muchos de los efectos negativos del sobrecalentamiento resultan en una menor calidad de la proteína y la disminución en la digestibilidad de los aminoácidos (**Parsons et al., 1991**).

c) Contenido de fibra

El efecto principal de la fibra consiste en incrementar la pérdida de aminoácidos endógenos por descamación de células de la mucosa intestinal y elevando la producción de moco.

1.5 BIOENSAYOS NUTRITIVOS

La estimación química de la calidad de un alimento o dieta es muy útil y constituye la base de la mayoría de las evaluaciones rutinarias; sin embargo no siempre puede predecir la verdadera biodisponibilidad de los nutrimentos es decir, normalmente la evaluación química no considera la pérdida de nutrimentos a causa de una deficiente absorción o del catabolismo por lo que es necesario hacer una evaluación de la respuesta biológica en animales de experimentación y de esta manera obtener la verdadera estimación de la calidad nutricia del alimento o dieta en estudio.

Con respecto a las pruebas biológicas o bioensayos es necesario contar con animales que cumplan los siguientes requisitos: deben ser animales totalmente sanos, todos deben ser de la misma cepa, el rango en el peso del lote debe ser el recomendado y de preferencia del mismo sexo. Además se debe contar con un espacio e infraestructura adecuada para tenerlos en condiciones que permitan el pleno desarrollo durante el tiempo de experimentación; el factor mas importante en los bioensayos nutricionales es el tipo de dieta que se suministre y la selección de ésta dependerá del objetivo del experimento, pero se recomienda que las dietas para los animales de laboratorio contengan aproximadamente 50 nutrimentos en un balance adecuado (**National Research Council, 1977**).

1.5.1 METODOS PARA DETERMINAR LA CALIDAD DE LA PROTEÍNA

Existen diversos métodos para evaluar la calidad de las proteínas, sin embargo, la elección de uno u otro dependerá del propósito de la prueba biológica y que información se desea obtener (**Pellet, P. and Young, V, 1980**).

- Métodos basados en la variación de peso.
- Métodos basados en la retención de nitrógeno.
- Métodos basados en la digestibilidad de los aminoácidos.

1.5.2 RELACIÓN DE EFICIENCIA PROTEÍMICA (REP)

En 1919 Osborne, Mendel y Ferry introdujeron el concepto de la REP, el cual es quizá el método mas utilizado para la evaluación de una fuente de proteína en animales de laboratorio y se define como la ganancia en peso por gramo de proteína ingerida:

$$REP = \frac{\text{Ganancia en peso}}{\text{Proteína ingerida}}$$

Este parámetro es usual en la experimentación con roedores, aunque a ultimas fechas ha sido utilizado en experimentación avícola sin que las condiciones del método sean modificadas (Treviño J. et al. 2000), es decir la dieta con la fuente de proteína experimental debe cubrir las necesidades del animal y debe ajustarse a una dieta de referencia, en el caso de los pollos de engorda se tienen bien establecidos los requerimientos del ave en el ***Nutrient Requirements of Poultry*** y la dieta de referencia esta hecha a base de pasta de soya.

1.5.3 CONVERSIÓN ALIMENTICIA

La conversión alimenticia (CA) es una medida de la productividad de un animal y se define como la relación entre el alimento que consume con el peso que gana.

$$CA = \frac{\text{Alimento consumido}}{\text{Ganancia en peso}}$$

En cuanto menor sea la conversión más eficiente es el animal. Los pollos convierten el alimento en carne muy eficientemente, y es posible lograr valores de 1.80 a 1.90 a la sexta semana de edad. La clave para conseguir una buena conversión alimenticia es comprender bien los factores básicos que la afectan y adoptar métodos de manejo que optimicen esos factores (Michael P. et al. 2001). Los factores que afectan la conversión alimenticia son los siguientes:

Temperatura

Es probablemente, el factor más importante que influye en la conversión alimenticia ya que las aves son homeotermos (de sangre caliente), lo que quiere decir que mantienen constante la temperatura corporal sea cual sea la temperatura ambiental. Las temperaturas óptimas permiten a los pollos utilizar los nutrimentos para engordar en lugar de regular su temperatura. La Tabla 5 muestra la temperatura ambiental ideal para promover la conversión alimenticia.

Tabla 5.
Temperatura ambiental ideal para promover la conversión alimenticia.

Edad (semanas)	Temperatura (°C)
1	34
2	31
3	26
4	26
5	23
6	20

Los pollos consumen menos alimento y lo convierte con menos eficiencia cuando la temperatura ambiental es muy alta.

Ventilación

La ventilación y la temperatura están interrelacionadas. Bajo la mayoría de las condiciones, el aumento de ventilación reduce la temperatura del galpón. El aire fresco y limpio es tan importante para los pollos en crecimiento como el alimento y el agua fresca. El amoníaco y otros gases tóxicos procedentes de la pollinaza se acumulan en los galpones mal ventilados y diversos estudios han demostrado que la conversión alimenticia puede verse afectada en forma adversa (de cuatro a siete puntos) por niveles de amoníaco superiores a 25 partes por millón (este nivel es apenas perceptible al olfato humano).

Calidad del alimento

La dieta que consume el pollo tiene mucha influencia sobre la conversión alimenticia por lo que el alimento debe mantener su calidad una vez que se pone en los comederos, por lo que debe cuidarse de la oxidación, del moho y las contaminaciones (moscas, plumas, pollinaza, etc).

Calidad del agua

El agua es el nutrimento más importante para cualquier animal; por lo tanto, es importante para la obtención de una buena conversión alimenticia que el agua esté limpia y fresca por lo que es necesario el aseo diario de los bebederos para evitar estancamiento.

Enfermedades y medicación

La salud general de todo el grupo influye sobre la conversión alimenticia. Ya que los pollos enfermos no progresan bien y el alimento suministrado se desperdicia, por lo que estos animales deben ser eliminados. Las vacunas y medicamentos deben usarse con cuidado porque las reacciones que produce una administración incorrecta pueden afectar adversamente la ganancia de peso y la conversión.

1.5.4 DIGESTIBILIDAD

El término digestibilidad se asocia estrechamente con la disponibilidad y a veces se usan como sinónimos; se define como la diferencia entre los aminoácidos consumidos y los aminoácidos excretados. Digestibilidad y disponibilidad pueden no ser exactamente lo mismo, ya que algunos aminoácidos complejos pueden ser absorbidos pero no estar disponibles para la síntesis proteínica.

La concentración de aminoácidos digestibles en los alimentos a menudo es sustancialmente menor que la concentración de aminoácidos totales determinados (**Parson, 1991**).

Para calcular la digestibilidad, se requiere conocer el contenido de nitrógeno de las heces (NF), pero además, es necesario contar con el nitrógeno ingerido durante el mismo período (NI). Lo anterior es relativamente fácil de obtener, ya que conociendo la concentración de proteína en la dieta y la cantidad consumida en dicho período se podrá obtener el nitrógeno ingerido (NI).

La fórmula para calcular la digestibilidad *in vivo* es la siguiente:

$$D = \frac{NI - NF}{NI} \times 100$$

Estrictamente la anterior fórmula corresponde a la digestibilidad aparente, la cual no considera el nitrógeno fecal metabólico (dieta libre de nitrógeno) ya que de considerarlo se obtendría la digestibilidad verdadera. En la experimentación con aves se ha establecido como una prueba convencional, la medición de la digestibilidad de aminoácidos; sin embargo es válido expresar la digestibilidad de la proteína cruda ingerida (Leeson, 2003).

1.6 UTILIZACIÓN DE ENZIMAS EN DIETAS PARA AVES

La adición de enzimas en la industria de los alimentos balanceados en México se inició en los últimos 25 años, mediante el empleo de β -glucanasas en dietas basadas en cebada, recientemente se han producido a escala industrial varias enzimas de utilidad práctica en la alimentación animal, entre estas enzimas se encuentran: las amilasas, proteasas, arabinoxilanasas, lipasas y fitasas. Las enzimas son catalizadores de los sistemas biológicos y son moléculas que determinan la pauta de las transformaciones químicas. Sin las enzimas los alimentos no pueden ser digeridos y las reacciones biológicas no podrían llevarse a cabo.

En el mercado existen 2 tipos de presentación física de enzimas: una en forma granulada que resiste hasta 9 meses de almacenamiento y temperaturas de hasta 85°C, temperatura a la cual se peletizan los alimentos y la presentación líquida, la

cual es más sensible a los factores antes mencionados por lo que se recomienda su uso después del proceso de la peletización.

Comúnmente las dietas para pollos de engorda que se elaboran en México están hechas a base de pasta de soya la cual contiene residuos de inhibidores de tripsina y lectinas que no son totalmente eliminados en el procesamiento por calor y que producen efectos antinutricionales, además de reducir la calidad de la proteína; es por ello que se ha hecho uso de enzimas de microorganismos que contienen proteasas y que son una alternativa o complemento al tratamiento por calor que se realiza a la soya, disminuyendo o eliminando de esta manera el efecto antinutricional de los inhibidores de tripsina y lectinas.

Recientemente un producto comercial enzimático llamado AVIZIME® (Finnfeeds Internacional Ltd) fue formulado para ser utilizado en dietas avícolas, contiene xilanasas, α - arabinosidasas, amilasas y proteasas; dicho producto aún está siendo probado en las dietas de pollos de engorda, pero los resultados que se han obtenido hasta ahora han sido muy satisfactorios para el comportamiento productivo (**Feed Enzymes, Technical Support Manual**).

2. OBJETIVO GENERAL

Realizar la valoración nutricia de la fracción proteínica de la semilla de Colorín (*Erythrina americana*) destoxificada, para proponerla como una nueva fuente de proteína en la alimentación de animales de granja (aves domésticas).

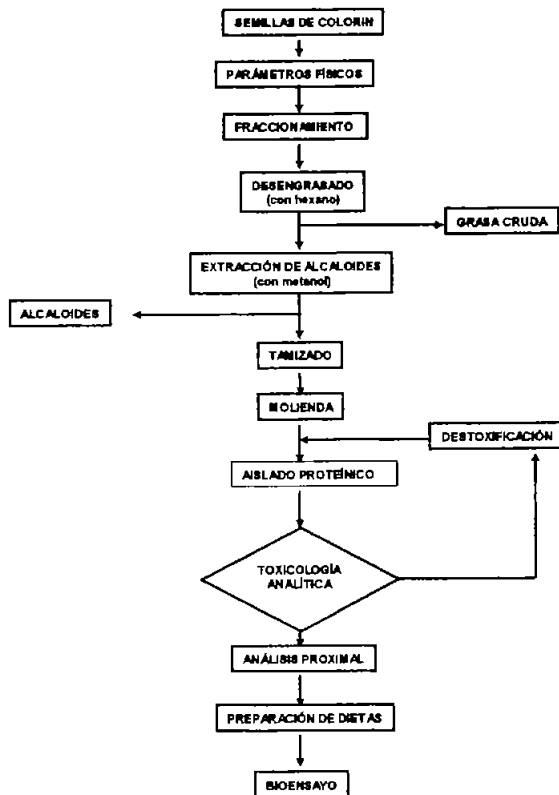
2.1 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar algunos parámetros físicos en la semilla de Colorín para una identificación rápida y su comparación con lotes estudiados anteriormente.
- Separar la fracción lipídica de la semilla fraccionada; así como la eliminación de los alcaloides.
- Tamizar el material destoxificado, para eliminar la fracción con mayor contenido de pericarpio.
- Determinar en el material destoxificado y tamizado, el nivel de alcaloides e inhibidores de tripsina residuales.
- Realizar el análisis proximal en el material destoxificado.
- Preparar dietas isoproteínicas, isoenergéticas y complementadas con los aminoácidos deficientes para la evaluación nutricia de la fracción proteínica en pollos de engorda.

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

A continuación se muestra la metodología seguida en este estudio.

Figura 1. Diagrama del desarrollo experimental.



3.1 RECOLECCIÓN DE MATERIA PRIMA

Las semillas de Colorín (*Erythrina americana*) se recolectaron de árboles localizados en la zona sur de la Ciudad de México específicamente dentro de Ciudad Universitaria; cabe señalar que la parte de las semillas recolectadas se adquirieron de los árboles localizados en la Facultad de Química los cuales han sido caracterizados botánicamente en el Herbario del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México (García – Mateos et al, 1996).

Las semillas recolectadas se seleccionaron para eliminar cualquier material extraño, así como aquellas dañadas física o biológicamente; se guardaron en un recipiente de plástico adecuadamente etiquetado con la fecha de recolección y el peso total de la muestra.

3.2 PARÁMETROS FÍSICOS

Se determinaron algunos parámetros físicos como dimensiones, peso hectolítrico y peso unitario, con la finalidad de poder comparar los resultados del presente trabajo con estudios anteriores de esta misma especie. y ver si se trata de la misma variedad; así como poder hacer una rápida identificación para adquisiciones posteriores (Moreno, 1984; Makkar et al, 1998).

Material

- 1regla de plástico (30cm) escala mínima 1mm
- 1Vernier
- 1probeta de 1L
- 1 probeta de 100ml

Procedimiento

Peso hectolítrico:

Se seleccionaron semillas aleatoriamente y se colocaron dentro de una probeta de 100ml hasta alcanzar el aforo, para ello se dejó caer el grano limpio libremente, desde una altura de 30cm, hasta llegar a la marca del aforo se pesó el grano en gramos; se obtiene el peso hectolítrico haciendo la conversión correspondiente (Kg/100L). Se reporta con un decimal.

Peso unitario

Se introdujeron las semillas a una probeta de 100ml hasta el aforo, se pesó el grano y se contó el número de semillas que se introdujeron en la probeta y se determinó el peso promedio. Cada determinación se efectuó por triplicado

Dimensiones

Se realizó una evaluación de la forma de las semillas, para ello se tomaron 10 semillas y se determinó largo, ancho y grosor, también se realizó una descripción de las mismas, evaluando el color y aspecto general.

$$\text{Peso hectolítrico} = \frac{\text{Peso de semillas en g}}{100\text{ml}} \text{ equivalente a } \frac{\text{kg}}{100\text{L}}$$

$$\text{Peso unitario} = \frac{\text{Peso de semillas contenidas en la probeta de 100ml}}{\text{Número de semillas}}$$

3.3 FRACCIONAMIENTO

Las semillas de Colorín tienen un tegumento o epispermo duro e impermeable (Flores Valle, 2003) por lo cual es necesario fragmentar el grano para así facilitar la extracción de la grasa y de los alcaloides (destoxificación) con el disolvente apropiado para cada uno.

Material

- Molino Thomas Willey, Modelo 4
- Malla de diámetro 4mm
- Vaso contenedor
- Balanza granataria

Procedimiento

Se realizó una molienda gruesa, con el Molino Thomas Willey, Modelo 4, utilizando una malla de diámetro 4mm. Se recolectó la harina obtenida en un recipiente, se pesó y etiquetó adecuadamente.

3.4 DESENGRASADO.

Fundamento: La grasa es soluble en disolventes orgánicos y la grasa presente en la muestra tiene una alta solubilidad en hexano por lo que al estar en contacto con este disolvente la grasa es extraída dando como resultado una harina desengrasada (Nolasco, 1987)

Material/ Reactivos

- Equipo de extracción tipo Soxhlet (Figura2)
- Matraz bola de 3L
- Refrigerante
- 2 Mangueras de látex
- Hexano
- Guantes de látex
- Papel filtro
- 1 Charola de aluminio

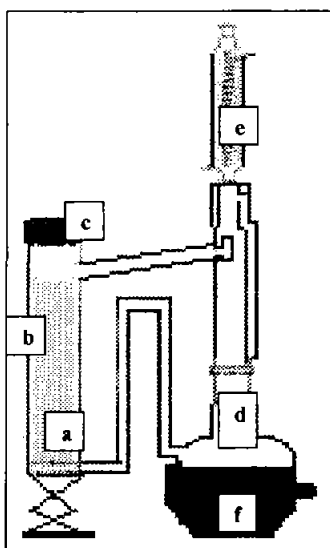
Procedimiento

Colocar de 1.5 -1.7kg de muestra fraccionada en la calceta (a) e introducirla en el tubo contenedor (b) cerrar perfectamente la tapa del contenedor y colocar un trapo húmedo sobre la tapa para evitar escape de disolvente (c). Colocar grasa de silicón en las juntas del material esmerilado, cubrir las manos con guantes y agregar el hexano al matraz de bola hasta la mitad de su capacidad (d) no olvidar agregar perlas de ebullición, colocar encima del matraz el refrigerante (e) y finalmente introducir en matraz dentro de una canastilla de calentamiento , verificar que todo el equipo quede perfectamente nivelado y asegurado (**Figura 2**) para evitar derrame de disolvente, conectar las mangueras de entrada y salida de agua del refrigerante y encender la canastilla de calentamiento a 60 – 65 °C. El aparato debe hacer descarga de disolvente aproximadamente cada 30 minutos. Cambiar el disolvente del matraz periódicamente para evitar la saturación. Después de 6 horas de funcionamiento continuo realizar la prueba de papel filtro

que consiste en tomar una muestra de harina del contenedor impregnada de disolvente y colocarla sobre un papel filtro, dejar que se evapore el hexano y retirar la harina, si sobre el papel filtro no se observa una mancha de grasa se considera que la muestra esta desengrasada en caso contrario se continuara con el proceso de desengrasado por 2horas mas o hasta que la prueba del papel filtro sea negativa.

Terminado el tiempo de desengrasado desmontar el equipo y colocar la harina sobre una charola de aluminio, y llevarla a la campana de extracción para la completa evaporación del disolvente. Cuando ya no sea perceptible el olor a disolvente, colocar la harina en un recipiente adecuado y etiquetado.

Figura 2. Equipo tipo Soxhlet utilizado para desengrasar la harina de Colorín.(a) Calceta (b) Recipiente contenedor (c) Tapa del contenedor (d) Matraz bola (e)Refrigerante, (f) Canastilla de calentamiento.



3.5 EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES CON METANOL.

Fundamento: Las semillas secas de *Erythrina americana* presentan un alto contenido de alcaloides, aproximadamente 1% (García – Mateos et al , 1996) por lo cual es necesario su destoxificación; para ello se realizo una extracción de los alcaloides presentes en la muestra con metanol debido a que los alcaloides tienen alta solubilidad en este disolvente (Jiménez L.V 1994).

Material/ Reactivos

- Rotavapor BUCHI Modelo R -187, Capacidad 12L (Figura 3).
- Metanol Q.P
- Guantes de látex
- Mangueras de látex
- Embudo
- Papel filtro
- Papel filtro Whatman # 1

Procedimiento

Colocar la proporción 1:4 de muestra: disolvente es decir 1.0 kg de harina y 4L de metanol en el matraz del rotavapor inmediatamente después colocar el matraz en el aparato y asegurarlo (Figura. 3); esperar a que la temperatura del baño del rotavapor sea de 64 a 65°C y bajar el matraz hasta que el nivel de agua lo cubra.

Encender la rotación hasta el número 7 y regular la ebullición dentro del matraz conectando la bomba de vacío. Mantener el refrigerante frío con la entrada y salida de agua helada.

Cambiar el disolvente cada 30 minutos durante las primeras 3 extracciones y posteriormente cambiarlo cada hora en las siguientes 3 para ello es necesario que cubra sus manos y vacíe el disolvente con alcaloides en un recipiente adecuado con la ayuda de un embudo y papel de filtración rápida.

Después de la extracción número 5 tomar una muestra del matraz y filtrar con papel Whatman #1 y realizar la prueba cualitativa de alcaloides (Sección 2.6). Se considera la muestra destoxificada hasta que la prueba cualitativa de alcaloides en la muestra sea negativa para los siguientes reactivos Wagner, Dragendorff y Mayer. La semilla de Colorín cumple esto último hasta la sexta extracción.

Figura 3. Equipo utilizado en el proceso de destoxificación de la harina de semillas de Colorín.



3.6 PRUEBA CUALITATIVA DE ALCALOIDES

Fundamento: Los alcaloides tienen propiedades básicas por lo que después de la extracción de los mismos con metanol y la posterior acidificación es posible obtener las sales las cuales al reaccionar con algunos de los reactivos más sensibles para la detección de alcaloides se puede obtener una estimación de la concentración de los mismos **(Martello and Farnsworth,1962)**.

Material/Reactivos

- Parrilla de agitación CORNING Mod. PC-351
- Rotavapor marca BUCHI Mod.R.
- Papel filtro Whatman #1
- Matraz bola 100ml
- Metanol R.A
- Ácido clorhídrico 1%
- Reactivo de Mayer (1)
- Reactivo de Wagner (2)
- Reactivo de Dragendorff (3)

- Reactivo de Mayer: Se disuelven 1.36g de $HgCl_2$ en 60ml de agua y 5.0g de KI en 10ml de agua. Se juntan las dos soluciones y se aforan a 100ml con agua destilada.

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

·Reactivo de Dragendorff: Se disuelven 8g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20ml de ácido nítrico (densidad 1.18 o sea el 30%) y 27.2g de KI en 50ml de agua. Se mezclan las 2 soluciones y se dejan en reposo durante 24 horas. Se decanta la solución y se afora con agua a 100ml.

Procedimiento

Obtener del matraz en donde se lleva a cabo el proceso de destoxificación una alícuota del sobrenadante del extracto metanólico, aproximadamente 40ml, evaporar el disolvente en el rotavapor a una temperatura de 65° C hasta sequedad, resuspender el residuo agregando 2ml de metanol R.A, y posteriormente adicionar 12ml HCl 1%. Si se observa precipitación o partículas suspendidas filtrar en papel Whatman # 1; tomar 3 alícuotas de 0.5ml del filtrado y colocarlo en tubos de ensayo, agregar 2 gotas del reactivo correspondiente y observar si presenta precipitado (prueba positiva), Mayer (precipitado blanco), Wagner (precipitado marrón) y Dragendorff (precipitado marrón).

3.7 TAMIZADO

Fundamento: La diferencia en el tamaño de partículas en la harina hace posible su paso por tamices de distinta apertura; quedando en las fracciones más gruesas la mayor cantidad de pericarpio que esta constituido principalmente por lo que se denomina fibra cruda.

Material

· Tamices No.10,14,20,25,30,40,50,y60

Dimensiones de los tamices utilizados.

Tamiz No	Abertura en pulgadas	Abertura en milímetros
10	0.0787	2
14	0.0555	1.40
20	0.0331	0.85
25	0.0278	0.710
30	0.0234	0.600
40	0.0165	0.425
50	0.0117	0.300
60	0.0098	0.250

Colocar los tamices en forma ascendente y agregar la muestra sobre el tamiz No.10, colocar la tapa sobre este y colocar la columna de tamices en el tamizador durante 15 minutos. Colectar las diferentes fracciones, se elimina la fracción correspondiente a la malla que retiene en su mayoría pericarpio (malla 10 y 14) y las fracciones restantes se mezclan.

3.8 MOLIENDA FINA

Fundamento: El tamaño de partícula en las determinaciones química y analíticas es muy importante, ya que influye directamente sobre la variación y precisión del método, así como en la validez de los resultados; si la muestra no es homogénea ni tiene el tamaño de partícula adecuada se corre el riesgo de no tomar una muestra representativa del lote por lo que los resultados son erróneos.

Material

Molino marca Cyclone, Modelo C5M564026

Malla de 0.5mm

Procedimiento

Tomar una muestra representativa del lote, para lo cual se debe muestrear abajo, parte central y superior del recipiente en donde se encuentra el material. Después de obtener la muestra pasarla a través del molino y realizar las determinaciones siguientes.

3.9 TOXIOLOGIA ANALÍTICA

Esta parte se refiere a el seguimiento de los principales factores tóxicos de la semilla de Colorín, como son los alcaloides y los inhibidores de tripsina, ya que de trabajos previos se reporta una concentración alta de estos factores tóxicos **(Guerrero, 1984; Kakade et al, 1974; Sotelo and Lucas, 1998; Moreno, 2001)**; sin embargo después del proceso de destoxificación se espera que el nivel de estos disminuya por lo que es necesaria su cuantificación.

3.9.1 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ALCALOIDES.

Fundamento: Debido a las propiedades ácido-básicas que presentan los alcaloides, es posible su cuantificación, Para ello es necesaria la extracción de los alcaloides de la muestra con solventes orgánicos y su acidificación para hacer una microtitulación analítica ácido – base con NaOH **(Moreno, 2001)**.

Material/Reactivos

- Embudo de separación de 125ml
- Parrilla de agitación CORNING Mod. PC-351
- Papel filtro Whatman #1

- Matraces bola de 100ml
- Metanol R.A
- Amoniaco concentrado 30%
- Cloroformo R.A
- Etanol R.A
- Sulfato de sodio anhidro
- Solución de sulfato de sodio saturada
- Rojo de metilo (1%)
- NaOH 0.1N
- Ácido sulfúrico 0.01N
- Mezcla cloroformo – etanol (3:2 v/v).

Procedimiento

Se pesan 5 g de muestra previamente desengrasada y se colocan en un matraz 40mL de metanol, se dejan en agitación toda la noche a temperatura ambiente, después de este tiempo, se colocan en un baño a $46\pm 2^{\circ}\text{C}$ con agitación constante durante 4 horas. Terminado el tiempo de agitación la mezcla es filtrada con papel Whatman #52, y el residuo se lava con 20mL de metanol, se evapora el disolvente en un rotavapor a 60°C , se resuspende el residuo con 2mL de metanol y se le adicionan 12mL de HCl 1% se coloca en un vaso de precipitados, el matraz bola se lava con 8mL de HCl 1% y se adiciona al resto. Esta solución se alcaliniza llevando a un pH de 9.5 ± 0.2 con NH_4OH concentrado. Se pasa a un embudo de separación y se extrae con tres porciones de cloroformo de 20mL cada una. Se recupera la fase orgánica (inferior)(A) y a la fase acuosa se le mide el volumen, y se le agrega el

mismo volumen medido de una solución saturada de sulfato de sodio, se extrae con tres porciones de la mezcla cloroformo –etanol de 20mL cada una .Ser recupera la fase orgánica y se junta con la anterior (A), se pasan a un embudo de separación y se le adiciona 10ml de una solución saturada de sulfato de sodio, se recibe la fase orgánica en un vaso que contenga 5g de sulfato de sodio anhidro y por decantación se pasa la fase orgánica a un matraz bola, se evapora a sequedad el disolvente y al residuo se le adicionan 10mL de ácido sulfúrico 0.01N con pipeta volumétrica, se homogeneiza y se lava con 10mL de agua desionizada, se adicionan 5 gotas de rojo de metilo al 0.1% y se realiza una micro titulación con NaOH 0.1N

$$\text{mg. de alcaloide/g de muestra} = \frac{(A-B) \cdot N \cdot \text{meq} \cdot 1000}{\text{g.muestra}}$$

A= mL de NaOH 0.1N gastados por el blanco

B= mL de NaOH 0.1N gastados por la muestra

N= Normalidad 0.1N

meq= 0.293 (Dos moléculas de alcaloide referidas a la β – eritroidina (PM:293) reaccionan con una molécula de H_2SO_4 en medio acuoso, formándose la sal correspondiente del alcaloide.

3.9.2 INHIBIDORES DE TRIPSINA

Fundamento: La técnica se basa en poner en contacto el extracto acuoso de una muestra con una solución estándar de tripsina , posteriormente se determina si hay actividad proteolítica remanente mediante el uso de un sustrato sintético (BAPNA) el cual producirá una coloración . Dicha coloración será inversamente proporcional al contenido de inhibidores (**Kakade, et al. 1974**)

Material/Reactivos

- Baño María GRNT Mod. SE10
- Potenciometro CORNING Mod. 10
- Espectrofotometro SEQUOIA TURNER MOD. 340
- Mezclador de tubos LAB –LINE MOD.SUPER MIXER.
- NaOH 0.1N
- Solución amortiguadora TRIS 0.05M^(a) pH 8.2
- Solución BAPNA (Sigma B -4875)^(b).
- Ácido acético al 30%
- Solución estándar de tripsina (Sigma T- 8253)^(c).
- HCl 0.001N

(a) Solución amortiguadora TRIS (hidroximetil – aminometano): pesar 6.05g de TRIS y 2.94g de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, disolverlos en agua destilada y llevar a un volumen de 900ml , ajustar el pH a 8.2 y aforar a 1000ml.

(b) Solución BAPNA (benzoil-arginina-p- nitroanilida): pesar 100mg de BAPNA y disolverlos en 2.5ml de dimetil sulfoxido, la disolución es mas rápida si se calienta en un baño de agua a 37°C , se afora a 250ml con solución amortiguadora TRIS previamente calentada a 37°C. Esta solución se prepara el mismo día de su uso y debe mantenerse a 37°C.

(c) Solución de tripsina: se pesan con exactitud 4mg de tripsina bovina y se disuelven en 200 mL de HCl 0.001 N, la concentración final es de 20 µg de tripsina/mL. Es

recomendable tener esta solución en refrigeración de esta forma se conservará de dos a tres semanas sin pérdida apreciable de actividad.

Procedimiento.

Preparación del extracto acuoso de la muestra: se pesa 1 g de muestra finamente molida y desengrasada en un vaso de precipitados, se adicionan 45 mL de NaOH 0.01 N y se procede a ajustar el pH de esta solución a 9.6 +/- 0.2, se afora a 50 ml con NaOH 0.01 N, se transvasa el contenido del matraz a un vaso de precipitados y se pone a agitación mecánica constante durante 2.5 h. a 300 r.p.m. Transcurrido este tiempo se deja en reposo durante 30 min. y por decantación se separa el sobrenadante del residuo insoluble. El sobrenadante debe ser diluído de tal forma que 1 mL produzca una inhibición del 40 al 60 %, con esto se logra reducir la desviación estándar.

Determinación de la actividad: se preparan 10 tubos de ensaye como se muestra en el cuadro 1 y se agrega la cantidad especificada del extracto diluído o directo por duplicado y se ajusta el volumen final de cada tubo a 2 mL con agua destilada. Adicionar a todos los tubos 2 mL de tripsina a 37 °C agitando cada tubo con el vórtex. A los blancos se les adiciona además 1 mL de ácido acético para detener la reacción. Colocar todos los tubos en el baño de agua a 37 °C y dejar durante 10 min. para que entren en contacto inhibidor y enzima. A continuación se adiciona a cada tubo 5 mL de la solución de BAPNA a 37 °C y volver a colocar los tubos en el baño de agua por un espacio de 10 min.

Es importante tener un control estricto del tiempo sobre todo después de adicionar el BAPNA, por lo cual debe utilizarse un cronómetro.

Posteriormente se detiene la reacción enzimática añadiendo 1 mL de ácido acético a cada tubo a excepción de los blancos a los cuales ya se les había adicionado.

Es frecuente la formación de precipitados o el enturbamiento de la mezcla de reacción por lo que se deja reposar durante 15 min. y después se filtra a través de papel de filtración rápida, el filtrado deberá estar traslúcido.

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

Tubo	mL de Extracto	mL de Agua	mL de Sol. Estándar de Tripsina	mL de BAPNA	mL de Ácido Acético
B1	1.8	0.2	2.0	5.0	----
1	1.8	0.2	2.0	5.0	1.0
B2	1.4	0.6	2.0	5.0	----
2	1.4	0.6	2.0	5.0	1.0
B3	1.0	1.0	2.0	5.0	----
3	1.0	1.0	2.0	5.0	1.0
B4	0.6	1.4	2.0	5.0	----
4	0.6	1.4	2.0	5.0	1.0
BR	0.0	2.0	2.0	5.0	----
R	0.0	2.0	2.0	5.0	1.0

NOTA: A los blancos, enseguida de adicionar la solución estándar de tripsina se le adiciona 1.0 mL de Ácido Acético.

La lectura de cada tubo se realizará en el espectrofotómetro a 420 nm; las determinaciones se realizan tanto en absorbencia como en % T.

Cálculos.

La actividad de los inhibidores de tripsina se expresa en términos de UTI (Unidades de Tripsina Inhibida), y se a definido una unidad de tripsina como el incremento de 0.01 unidades de absorbencia a 410 nm por 10 mL de mezcla de reacción descritos por Kakade y colaboradores.

De acuerdo a la siguiente relación se obtienen las siguientes unidades de tripsina (U.T.)

$$U.T. = \text{Absorbencia} \times 100$$

Una vez que se hayan obtenido las U.T. de cada alícuota del extracto es conveniente obtener el % de inhibición tomando como referencia el tubo con 1 mL de extracto, para conocer si cae en el rango 40 – 60 % de inhibición o bien si es necesario hacer dilución.

Para obtener las unidades de tripsina inhibidas se hace el siguiente cálculo:

$$U.T.I. = \text{Unidades de Tripsina de la Referencia (U.T.R.)} - U.T$$

Al graficar las U.T.I. / mL vs mL de extracto se obtiene una correlación negativa de la cual se extrapola el valor de la ordenada y este dato es el más cercano a la actividad inhibitoria real cuando se refiere al inhibidor tipo Kunitz que contiene la soya.

Si la correlación lineal no es satisfactoria ($r \leq - 0.9$) se puede trabajar el valor promedio de la serie de alícuotas y reporta como U.T.I./ml

$$U.T.I. = \frac{\sum_{i=1}^n (U.T.I. / mL)_i}{n}$$

Es conveniente reportar en U.T.I. con respecto a los mg de la muestra:

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

Donde:

B = Ordenada al origen de la gráfica = U.T.I. / mL vs vol. del extracto.

F= Factor de dilución = Aforo/Alícuota, en el caso del extracto directo F=1.

m= miligramos de muestra.

3.9.3 DETERMINACIÓN SEMICUANTITATIVA DE HEMAGLUTININAS

Fundamento: La determinación de hemaglutininas o Lectinas en extractos de plantas, se efectúa con una técnica de diluciones seriadas cuyo punto final se determina por una estimación visual de la aglutinación de los glóbulos rojos en estudio. Por lo tanto se necesita trabajar con glóbulos rojos lavados y activados con una solución de proteasa disponible como: pronasa, tripsina o papaina; ya que la sensibilidad de la aglutinación se mejora considerablemente con este tratamiento **(Lucas, B. and Sotelo, 1993)**

Material/Reactivos

- Agitador magnético con tacómetro marca THERMOLINE
- Centrifuga para tubos marca DINAC.
- Tubos de centrifuga de 15ml con graduación.
- Jeringa de 5 ò 10ml
- Espectrofotómetro COLEMAN Junior II-A
- Microtiter Kit (Cook Eng – Alexander Virginia USA)
- Sangre desfibrinada y lavada
- Solución anticoagulante (a)
- Solución salina al 1%
- Solución salina al 0.9%

- Solución de proteasa al 0.2% en solución salina (b)
- Pronasa (Pronase E.) Sigma P– 5147

(a) Cuando la sangre se va a utilizar inmediatamente se puede utilizar solución de citrato, la cual se usan en la siguiente relación:

Solución de citrato: sangre = 0.1ml: 1ml sangre

(b) Si se trabaja con sangre de roedor, es conveniente trabajar con pronasa al 0.2% en solución salina.

Procedimiento

Preparación del extracto:

Una vez que se tiene la muestra finamente molida y desengrasada, se suspende 1 gramo en 10ml de solución salina al 1%, se efectúa una extracción con agitación mecánica durante 2 horas a 300 r.p.m a la temperatura ambiente.

Después de este tiempo se centrifuga el extracto a 1,400 r.p.m durante 15 min. Para eliminar el residuo insoluble; el sobrenadante se filtra y de ser necesario se lava con solución salina al 1%, para llevar al extracto filtrado al volumen inicial.

Preparación de sangre:

Inmediatamente después de sangrar al animal, la sangre se coloca en un matraz pequeño que contenga solución anticoagulante, agitar suavemente para la completa homogeneización de la sangre con la solución anticoagulante. La sangre con anticoagulante se transvasa a tubos de centrifuga para lavarla (3 veces) con solución salina al 0.9%. La relación sangre : solución salina es de aproximadamente 1:5.

Se centrifuga a 1500 r.p.m durante 10 minutos y después del último lavado, se mide en el tubo de centrifuga, la cantidad de paquete de eritrocitos y se diluyen al 4% , para lo cual se agregan por cada 1.0ml de glóbulos rojos , 24ml de solución salina al 0.9%.

Sensibilización de los glóbulos rojos.

A cada 10ml de suspensión de glóbulos rojos al 4% agregarles 1ml de solución de pronasa al 0.2% y colocarlos en incubadora por espacio de 1 hora a 37°C. Después del tiempo estipulado, centrifugar para eliminar la enzima sobrenadante, dando además 3 lavados con solución salina al 0.9%. Después del último lavado se resuspende el paquete de glóbulos rojos al 4%, por lo cual cada 1.0ml de paquete de eritrocitos se le adiciona 24ml de solución salina 0.9%.

NOTA: Cuando se observa que la sangre tiene algunos coágulos, es necesario filtrar esta suspensión, para lo cual se puede utilizar un trozo de gasa.

Ajuste de la suspensión de glóbulos rojos.

Se toma 0.1ml de la suspensión de glóbulos rojos ya sensibilizados y se agregan 4.9ml de solución salina al 0.9%, se lee en el espectrofotómetro a 620nm , usando un adaptador de celdas que permita el paso de sólo 1cm² de luz, se usa como blanco solución salina al 0.9%.

La lectura que se debe obtener será de 24-29% de transmitancia, en caso contrario se realizará la dilución necesaria para que la suspensión de glóbulos quede dentro de dicho rango.

Microtitulación

En las placas tipo "V" del microtiter, colocar en cada pozo de una hilera 50µl de solución salina al 0.9% con el pipeteador de gota evitando tocar las paredes del pozo.

A continuación llenar el microdilutor de 50µl por contacto con la superficie del extracto problema y se procede a realizar las diluciones sucesivas en la hilera escogida, introduciendo el microdilutor en el pozo y rotándolo sin excesiva presión. Finalmente con un pipetero de gota colocar en cada pozo 50µl de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizada y ajustada.

Luego se rota la placa en forma circular y se lleva a la incubadora a 37°C por espacio de 1 hora.

NOTA: Se debe verificar que el volumen que esté tomando nuestro microdilutor, sea el requerido, para lo cual se utiliza una placa de prueba.

Lectura

Una vez transcurrido el tiempo en incubadora , se coloca la placa de plástico sobre el dispositivo de lectura y se observa a través del espejo el fondo de los pozos de cada hilera de prueba. Se reporta la máxima dilución que presente aglutinación.

3.10 ANÁLISIS PROXIMAL

El análisis proximal o bromatológico fue desarrollado por Weende hace mas de 100 años, en este tipo de estudio se determinan los componentes principales de los alimentos como humedad, proteína, grasa , cenizas ,fibra e hidratos de carbono. Los resultados de este análisis son de suma importancia ya que son una guía hacia

donde dirigir un estudio posterior. En el presente trabajo se realizó el análisis proximal siguiendo las técnicas descritas y aprobadas en el AOAC con ligeras modificaciones (**Bateman, 1970; Herlich, 1990; Adrian et al, 2000**).

3.10.1 HUMEDAD

Fundamento: Determinación de la pérdida de material por la evaporación de agua de la muestra durante el calentamiento de la misma se denomina humedad (**Herlich, K, 1990**).

Material/Reactivos

- Estufa de vacío LAB – LINE. Mod . 3620
- Balanza Analítica Sartorius Analytic
- Desecador
- Charolas de aluminio
- Estufa con corriente forzada LAB –LINE, mod. Imperial III

Procedimiento

Poner a peso constante las charolas de aluminio en las que se va a efectuar la determinación, rotularlas correctamente; esto tarda de 4-5 horas, a continuación se adiciona la muestra (2-5g), tratando de que presente la mayor superficie de evaporación, colocar en la estufa la cual debe estar a una temperatura de 60-65°C. y a 25mm de Hg. Verificar a las 8 horas que se haya alcanzado peso constante de no ser así continuar con el secado hasta alcanzar este propósito. Se considera a peso constante una muestra cuando al pesarla en la balanza analítica solo se presente variación en la cuarta cifra decimal.

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

Donde:

P_i = Peso de la charola con muestra antes de secada (g)

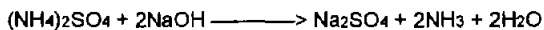
P_f = Peso de la charola después de secada (g)

m = Peso de la muestra (g)

3.10.2 PROTEÍNA

Fundamento: Basado en la oxidación de la sustancia orgánica por acción del ácido sulfúrico concentrado en presencia de un catalizador para formar dióxido de carbono, agua y liberar el nitrógeno como amoníaco; el amoníaco existe en la solución ácida como sulfato ácido de amonio, debido a que en la mezcla de reacción siempre hay un exceso de ácido.

El amoníaco obtenido después de la digestión, es liberado por una gran variedad de métodos; siendo el más usado por acción de un alcali y atrapando el amoníaco liberado en una cantidad conocida de ácido valorado



El amoníaco así formado se separa mediante destilación y se recoge sobre una cantidad exactamente conocida de disolución ácida titulada. El amoníaco formado se determina mediante valoración del exceso de ácido titulado (**Pearson, 1998**).

Material/Reactivos

- Digestor TECATOR, mod.ab-20/40
- Dispositivo de microdestilación Kjeltex AUTO 1030
- Tubos de digestión TECATOR de 75ml
- Mezcla digestiva (a)
- Peroxido de hidrógeno al 30%
- Sulfato de potasio (R.A)
- Solución de NaOH al 40%
- Solución de ácido bórico con indicadores (b)
- Solución de HCl 0.01N valorada

(a) Disolver 3g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) en 20ml de agua destilada; a continuación se agrega 50ml de ácido ortofosfórico (H_3PO_4) y una vez que este bien disuelta la sal, se adiciona con cuidado y resbalando por la pared del recipiente 430ml de ácido sulfúrico concentrado .

Agitar esta mezcla por 30minutos.

(b) Se pesan 10g de ácido bórico y se coloca en un matraz aforado de 1L, se adiciona agua hasta disolverlo y a continuación se afora a 1L. Se agrega al ácido 10 ml de rojo de metilo (100mg / 10ml de metanol) y 7 ml de verde de bromocresol (100mg /100ml de metanol), mezclar bien y colocar en el recipiente indicado.

3.10.3 GRASA

Fundamento: Las grasas presentan una alta solubilidad en compuestos no polares siendo los más utilizados el hexano, éter etílico y éter de petróleo, los cuales al ponerse en contacto con el alimento, solubiliza la grasa y la arrastra consigo para su posterior cuantificación (**Herlich, K, 1990**).

Material/ Reactivos

- Aparato de extracción Goldfish Labconco Modelo 35001
- Cartuchos de celulosa
- Vasos de borde esmerilado para equipo Goldfish
- Estufa de vacío Lab Line Modelo 3620
- Balanza analítica Sartorius Analytic
- Desecador
- Éter de petróleo R.A

Procedimiento

Poner los vasos Goldfish a peso constante. Colocar en un cartucho de celulosa de 4-5 g de muestra, y tapar el cartucho con un trozo de algodón y colocarlo en un sostenedor sobre el aparato Goldfish con un porta dedal. En los vasos a peso constante agregar 50ml de éter de petróleo y colocarlo en el aparato de Goldfish y sostenerlo con un anillo con empaque de hule, ajustar la parrilla para que este en contacto con el vaso, se abre la llave de agua para que circule esta sobre los refrigerantes y calentar durante 4 horas a baja temperatura (Low). Una vez transcurrido el tiempo de extracción se bajan las parrillas de calentamiento y se quita

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

Donde:

P_i = Peso de la charola con muestra antes de secada (g)

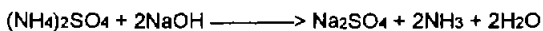
P_f = Peso de la charola después de secada (g)

m = Peso de la muestra (g)

3.10.2 PROTEÍNA

Fundamento: Basado en la oxidación de la sustancia orgánica por acción del ácido sulfúrico concentrado en presencia de un catalizador para formar dióxido de carbono, agua y liberar el nitrógeno como amoníaco; el amoníaco existe en la solución ácida como sulfato ácido de amonio, debido a que en la mezcla de reacción siempre hay un exceso de ácido.

El amoníaco obtenido después de la digestión, es liberado por una gran variedad de métodos; siendo el más usado por acción de un alcali y atrapando el amoníaco liberado en una cantidad conocida de ácido valorado



El amoníaco así formado se separa mediante destilación y se recoge sobre una cantidad exactamente conocida de disolución ácida titulada. El amoníaco formado se determina mediante valoración del exceso de ácido titulado (**Pearson, 1998**).

Material/Reactivos

- Digestor TECATOR, mod.ab-20/40
- Dispositivo de microdestilación Kjeltec AUTO 1030
- Tubos de digestión TECATOR de 75ml
- Mezcla digestiva (a)
- Peroxido de hidrógeno al 30%
- Sulfato de potasio (R.A)
- Solución de NaOH al 40%
- Solución de ácido bórico con indicadores (b)
- Solución de HCl 0.01N valorada

(a) Disolver 3g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) en 20ml de agua destilada; a continuación se agrega 50ml de ácido ortofosfórico (H_3PO_4) y una vez que este bien disuelta la sal, se adiciona con cuidado y resbalando por la pared del recipiente 430ml de ácido sulfúrico concentrado .

Agitar esta mezcla por 30minutos.

(b) Se pesan 10g de ácido bórico y se coloca en un matraz aforado de 1L, se adiciona agua hasta disolverlo y a continuación se afora a 1L. Se agrega al ácido 10 ml de rojo de metilo (100mg / 10ml de metanol) y 7 ml de verde de bromocresol (100mg /100ml de metanol), mezclar bien y colocar en el recipiente indicado.

Procedimiento

Pesar de 10 -100mg de muestra según sea la cantidad de proteína que contiene y colocarlos en el tubo de digestión, agregar aproximadamente 0.5g de K_2SO_4 y 3 ml de mezcla de digestión, se coloca el tubo en el digestor por espacio de 15 minutos y después de ello se retira, se deja enfriar un poco y se adiciona 1.5ml de H_2O_2 y nuevamente se coloca en el digestor que debe estar a $370^\circ C$. Se considera que la digestión es completa, cuando el tubo no muestra manchas, puntos negros y la mezcla digerida es transparente. Después de la digestión los tubos se colocan en una gradilla y se dejan enfriar; se agregan 25ml de agua destilada y se introducen uno a uno en el micridestilador para su destilación y titulación estas se efectúan de forma automática por el equipo pero es necesario introducir un blanco de glucosa.

Primero se expresa el resultado como contenido de nitrógeno:

$$\%N = \frac{(\text{ml muestra} - \text{ml blanco})(N_{HCl})(0.014)(100)}{\text{g de muestra}}$$

Para expresar el resultado en contenido de proteína bruta, debe multiplicarse el contenido de nitrógeno por un factor que depende del tipo de muestra y que, en general, tiene un valor que oscila alrededor de 6.25.

$$\% \text{ Proteína} = \%N (F)$$

$$F = 6.25$$

3.10.3 GRASA

Fundamento: Las grasas presentan una alta solubilidad en compuestos no polares siendo los más utilizados el hexano, éter etílico y éter de petróleo, los cuales al ponerse en contacto con el alimento, solubiliza la grasa y la arrastra consigo para su posterior cuantificación (**Herlich, K, 1990**).

Material/ Reactivos

- Aparato de extracción Goldfish Labconco Modelo 35001
- Cartuchos de celulosa
- Vasos de borde esmerilado para equipo Goldfish
- Estufa de vacío Lab Line Modelo 3620
- Balanza analítica Sartorius Analytic
- Desecador
- Éter de petróleo R.A

Procedimiento

Poner los vasos Goldfish a peso constante. Colocar en un cartucho de celulosa de 4-5 g de muestra, y tapar el cartucho con un trozo de algodón y colocarlo en un sostenedor sobre el aparato Goldfish con un porta dedal. En los vasos a peso constante agregar 50ml de éter de petróleo y colocarlo en el aparato de Goldfish y sostenerlo con un anillo con empaque de hule, ajustar la parrilla para que este en contacto con el vaso, se abre la llave de agua para que circule esta sobre los refrigerantes y calentar durante 4 horas a baja temperatura (Low). Una vez transcurrido el tiempo de extracción se bajan las parrillas de calentamiento y se quita

el anillo de rosca, se saca el porta dedal con el cartucho, sustituyéndose por el tubo recuperador volviéndose nuevamente a colocar el vaso para de nuevo calentarlo y que el disolvente quede en el tubo recuperador; una vez que el vaso este libre de disolvente, se coloca en la estufa de vacío para la completa eliminación del solvente y humedad; se obtiene el peso de la fracción lipóide.

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

Donde:

P_f = peso del recipiente después de la extracción (g)

P_o = peso del recipiente antes de la extracción (g)

m = peso de la muestra seca (g)

3.10.4 CENIZAS

Fundamento: De la carbonización y posterior calcinación de la muestra a 550°C se obtiene lo que se denomina cenizas y que comprende el material inorgánico (minerales).

Material / Reactivos

- Mufla THERMOLYNE, mod. 1500
- Balanza analítica Sartorius Analytic
- Mechero Bunsen
- Crisoles de porcelana

· Desecador

Procedimiento

Los crisoles deben ponerse a peso constante, para lo cual deben colocarse en la mufla a una temperatura de 500°C, marcándolos con lápiz o cualquier sustancia que no se elimine en el proceso de incineración. Colocar de 2-3 gramos de muestra en el crisol y carbonizarla a la flama del mechero y bajo una campana, cuando ya no haya desprendimiento de humo, se introduce el crisol a la mufla, la cual debe estar a una temperatura entre 500-550°C . El tiempo de permanencia es muy variable y depende del material que se esté trabajando.; en cuanto se obtiene cenizas grisáceas o blancas pero homogéneas indica el punto final de esta determinación.

$$\% \text{ cenizas} = \frac{P_f - P_o}{m} * 100$$

Donde:

P_f = peso del crisol con la muestra después de incinerada (g)

P_o = peso del crisol a peso constante (g)

m = peso de la muestra (g)

3.10.5 FIBRA

Fundamento: Determinación de las sustancias orgánicas libres de grasa e insolubles en medio ácido y alcalino, es llamada convencionalmente fibra bruta. La muestra, en su caso desengrasada, se trata sucesivamente con soluciones en ebullición de ácido sulfúrico e hidróxido potásico, se lava, se deseca, se pesa y se

calcina a 500°C. La pérdida de peso debida a la calcinación corresponde a la fibra bruta de la muestra de ensayo.

Material / Reactivos

- Vasos de Berzelius de 600ml KIMAX
- Aparato de Digestión LABCONCO
- Estufa de vacío LAB – LINE, mod. 3620
- Mufia THERMOLYNE, mod.1500
- Crisoles de porcelana
- Embudos California con malla de 200 mesh.
- Solución de H₂SO₄ al 1.25% (m/v)
- Solución de NaOH al 1.25% (m/v)
- Antiespumante (emulsión SIGMA – B)
- Alcohol etílico

Procedimiento

Pesar de 2-3 gramos de muestra desengrasada sobre un vaso Berzelius que contenga 0.5g de silicato de aluminio y unas perlas de vidrio, adicionar 200ml de H₂SO₄ al 1.25% que esté hirviendo y unas gotas de antiespumante e inmediatamente se coloca en el aparato de digestión, el cual debe estar previamente caliente , se deja digerir por espacio de 30 minutos exactos, Después de dicho periodo se vacía el contenido sobre un embudo con malla de 200 mesh y se realiza la filtración con ayuda de vacío , se lava el residuo con agua destilada caliente , hasta eliminar el ácido (aproximadamente 500ml); una vez lavado el residuo se trasfiere nuevamente al vaso de Berzelius, se adiciona 20ml de NaOH

1.25% hirviendo y se mantiene en el aparato de digestión por 30 minutos exactos, trascurrido este tiempo se repite la operación de lavado que se realizó con el ácido, se retiran las perlas de vidrio y se lavan con agua destilada para recuperar el material adherido y por último se le adiciona 25 ml de alcohol etílico.

El residuo se pasa a un crisol de porcelana (a peso constante) cuidando de pasarlo en forma cuantitativa, se coloca en la estufa de vacío para su secado, y después se pesa. A continuación se carboniza e introduce en la mufla para su incineración, y después de realizar esto volver a pesar el crisol.

$$\% \text{ Fibra} = \frac{P_s - P_c}{m} * 100$$

Donde:

P_s = peso del crisol con residuo después de secado (g)

P_c = peso del crisol con residuo después de calcinado (g)

m = peso de la muestra (g)

3.11 PREPARACIÓN DE DIETAS

Para el estudio biológico se prepararon dietas tomando en cuenta el perfil de aminoácidos de estudios previos de la semilla de Colorín y el análisis proximal que se realizó en este estudio, haciendo uso del programa Nutrion 5.0^R en base a los requerimientos mínimos (Tabla 6.1) para el desarrollo del ave en la etapa de iniciación.

Tabla 6.
Composición de las dietas empleadas en la prueba biológica.

Ingrediente (g/Kg)	Dieta control	Dieta 50% Colorín ^a	Dieta 100% Colorín ^a
Sorgo Milo 9%	570.89	498.849	424.262
Soya	354.07	199.210	-
Colorín	-	200.000	400.00
Aceite de soya	29.426	58.376	88.143
Ortofosfato	18.602	18.403	18.210
Carbonato de calcio	15.385	14.933	14.47
Sal(NaCl)	4.395	4.364	4.3348
Vitaminas y minerales ^b Pollo -E	2.500	2.500	2.500
Metionina 98	2.396	1.715	1.100
Cloruro de Colina 60	1.000	1.000	1.000
Bacitracina ^c	0.500	0.500	0.500
Coccidiostato	0.500	0.500	0.500
L – Lisina HCl	0.173	-	-
Insumos Químicos	0.150	0.150	0.150
Pancreatina ^d	-	1.0	1.0

^a Equivalencia del nivel de inclusión de Colorín como fuente de proteína en sustitución de la soya.

^b 2.5Kg de mezcla vitamínica tiene un aporte de: vitamina A 12, 500,000 UI, vitamina D 2, 500,000UIP, vitamina E 25000UI, vitamina K 2.63g, vitamina B₁ 2.0g, riboflavina 5g, vitamina B₁₂ 0.063g, Cloruro de colina 400g, Hierro 40g, Manganeso 80g, Cobalto 10g, Yodo 2g, Zinc 60g, Selenio 0.2g, Antioxidante 125.00g.

^c Promotor de crecimiento.

^d Durante el primer bioensayo se agregó pancreatina bovina y en el segundo bioensayo se agregó pancreatina aviar (Avizime).

Tabla 6.1 Nutrientes controlados en la dieta para aves.

Nutriente	(%)mínimo
Proteína cruda	22.00
Metionina	0.580
Metionina + cistina	0.930
Lisina	1.200
Arginina	1.250
Fósforo disponible	0.500
Calcio total	1.00
Triptofano	0.200
Ac. Linoleico	1.000
Energía metaboizable (kcal/kg)	3000

3.12 EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LA FRACCIÓN PROTEÍICA DE LA SEMILLA DE COLORÍN.

El bioensayo con aves se realizó en el **Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPA)** de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, en donde se tienen las siguientes condiciones una altura de 2,250 metros sobre el nivel del mar, temperatura media anual de 18° C y una precipitación pluvial de 747 mm; el tiempo de evaluación fue de 14 días, se realizó el primer bioensayo durante el mes de marzo, utilizando las dietas: 50% Colorín, 100% Colorín y dieta control, agregando pancreatina bovina para disminuir el efecto de los inhibidores de tripsina presentes en el material. El segundo bioensayo se realizó durante el mes de septiembre utilizando sólo las dietas: 100% Colorín y la dieta control, y en este bioensayo se agrego pancreatina aviar (Avizime) ya que durante el primer bioensayo se observo una pobre respuesta biológica al parecer por el uso de la pancreatina bovina.

En ambos bioensayos se utilizaron pollos de engorda mixtos de la estirpe Ross x Ross de un día de edad y un diseño experimental de 4 replicas y 5 animales en cada una para cada tratamiento.

3.12.1 MANIPULACIÓN Y ALIMENTACIÓN DE LAS AVES

Los pollos se pesan y se colocan en una criadora eléctrica en batería de marca Petersime modelo 2SD 12 series 3483 (**Figura 4**) previamente calibrada a 34 °C, en cuanto se introducen los pollos a la criadora es necesario que los bebederos estén abastecidos de agua y que esta sea lo primero que ingieran los animales.

Se pesa suficiente alimento aproximadamente 1.5 kg y se coloca en los comederos, este alimento es suficiente para la primera semana, sin embargo todos los días a la misma hora hay que removerlo con una brocha para evitar que sedimente o que las aves lo escojan, también hay que cambiar el agua diariamente y lavar con jabón los bebederos. Durante la primera semana es suficiente la ventilación del lugar donde se encuentra la criadora sin embargo para la segunda semana es necesario incrementar su ventilación para evitar la acumulación de amoníaco y otros gases tóxicos, por lo que hay que abrir las ventanas del lugar durante las horas de luz y cerrarlas por la noche, La temperatura de la criadora debe ser de 33-34°C durante la primera semana y 31-32°C para la segunda. Si el clima es muy caluroso, se puede apagar el regulador de temperatura durante el día y encenderlo por la noche.

Los animales se pesan cada 7 días así como el alimento que ingirieron durante el mismo período y se hace un registro de los datos para el posterior cálculo de los siguientes parámetros: Conversión Alimenticia, REP y Digestibilidad.

Los pollos deben ser vacunados al décimo día de iniciado el experimento contra la enfermedad de Newcastle (cepa *Lasota*), por vía acular y subcutánea en emulsión a fin de reforzar la respuesta inmunológica.

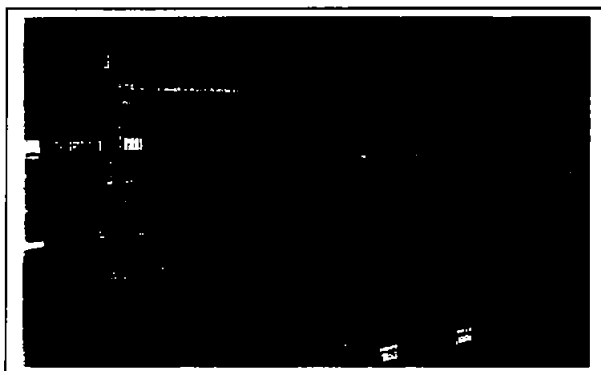
Para determinar digestibilidad de la proteína es necesaria la recolección de la pollinaza para ello, se coloca plástico sobre las charolas en donde los animales la depositan a fin de hacer una recolección diaria de la misma.

Después de recolectar la pollinaza esta se deja secar al ambiente, se separa de material extraño y posibles residuos de alimento, se guarda en frascos de plástico

perfectamente identificados con el número de lote en estudio y el día de recolección y finalmente se colocan en refrigeración para disminuir la actividad microbiana.

Posteriormente para determinar la digestibilidad se juntan todas las fracciones recolectadas en los 7 días y se determina nitrógeno por el método Kjeldahl descrito en el apartado 2.14 de este trabajo.

Figura 4. Criadora eléctrica en batería de marca Peterslime en la cual se llevo a cabo el bioensayo.



3.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el estudio estadístico de los resultados, se emplean dos pruebas estadísticas: ANOVA de una vía para el primer bioensayo y t student sencilla para el segundo bioensayo, esto debido al origen de los datos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los parámetros físicos de las semillas recolectadas para este trabajo se muestran en la **Tabla 7**; estos resultados son muy similares a los obtenidos en estudios anteriores (**Jiménez, 1994**) por lo que se puede asumir que se trata de la misma especie, o sea *Erythrina americana*.

Tabla 7.
Parámetros físicos de las semillas de Colorín.

Parámetro	Dimensiones^a
Peso hectolítrico(HL)	65.43 ± 0.30
Peso unitario (g)	0.676 ±0.012
Largo (cm) ^b	13.6 ±0.30
Ancho (cm) ^b	9.5 ±0.26
Grosos (cm) ^b	8.9 ± 0.20

^a Dato obtenido por triplicado ± D.E.

^b Medida obtenida de 10 semillas.

Después de realizar el proceso de destoxificación de la harina de semillas de Colorín y determinar el remanente de los factores tóxicos de mayor importancia como son los alcaloides, lectinas y los inhibidores de tripsina se encontraron los siguientes resultados.

Tabla 8.
Contenido Tóxicos en la semilla destoxificada.

Tóxico	Cantidad Residual^a
Alcaloides	6mg/100g de semillas ± 0.03 ^a
Lectinas	1,1,1,1,0,0 ^b
Inhibidores de tripsina	43.37± 3.24 UTI/mg ^c

^a Datos obtenidos por triplicado, ± D.E.

^b Título de la mínima dilución que presenta hemaglutinación

^c UTI/mg = unidades de tripsina inhibida por miligramo de muestra.

Como se puede observar la muestra tiene 0.006% de alcaloides (**Tabla 8**) el cual se considera bajo, aunque no se pudo llegar a la destoxificación total la muestra se considera apta para ser empleada con fines alimenticios ya que está por debajo del nivel establecido en la bibliografía el cual es de 0.03% de alcaloides (**Centurión, D., Espinoza, M. y Cázares, G. 2000**); por lo cual no se debe tener problemas a causa de este factor tóxico al efectuar el bioensayo nutricional; el nivel de Lectinas no es significativo y estos se eliminan fácilmente con la temperatura empleada durante el proceso de desengrasado y destoxificación. En cuanto a los inhibidores de tripsina, se disminuyó un poco el nivel ya que la semilla cruda contiene de 65-68 UTI/mg y la muestra destoxificada presenta aún 43.37UTI/mg, este nivel es alto, pero no es posible disminuirlo ya que al revisar trabajos previos se observa que los inhibidores de tripsina presentes en la *Erythrina americana* son termoresistentes y que aún bajo condiciones de drásticas de calentamiento (121°C / 30min), los niveles de inhibidores de tripsina no son menores a 30 UTI/mg (**Jiménez L.V 1994**), por lo que llegar a un nivel de 10UTI /mg como lo marca la bibliografía para fines alimenticios no es viable; sin embargo se puede emplear el material en alimentación animal, pero es necesario agregar pancreatina para contrarrestar el efecto antinutricional de los inhibidores de tripsina sobre la digestibilidad de la proteína.

La composición de la semilla se muestra en la **Tabla 9.**, de donde destaca la cantidad alta de fibra, la semilla integra presenta niveles de 15-16% y durante el proceso de desengrasado y destoxificación la cantidad de fibra se concentra hasta niveles de 38-40% es por ello que se planteó hacer un tamizado para retirar la mayor cantidad posible de pericarpio o epispermo y de esta forma obtener un buen resultado de

digestibilidad de la proteína durante el bioensayo, con el tamizado se logro disminuir la cantidad de fibra hasta un nivel de 21.84%.

Tabla 9.
Análisis proximal de las semillas de Colorín destoxificadas.
Base húmeda (g /100g de muestra) ^a

Determinación ^a	%
Humedad	6.22 ± 0.007
Proteína	40.11 ± 0.014
Grasa	0.11 ± 0.021
Cenizas	5.03 ± 0.056
Fibra	21.68 ± 0.219
CHO's ^b	26.85

^a Datos obtenidos por triplicado, ± D.E.

^b CHO's = Hidratos de carbono asimilables calculados por diferencia.

La cantidad de proteína presente en la muestra es de aproximadamente 40%, siendo una cantidad significativa de proteína, y en estudios previos ésta ha manifestado tener un buen perfil de aminoácidos para que sea empleada en alimentación animal, en la **Tabla10** se muestra el perfil de aminoácidos indispensables de la semilla de Colorín. La calificación Química (SQ) obtenida para todos los aminoácidos indispensables se puede considerar buena ya que se trata de una leguminosa, hay que destacar el SQ para total de aminoácidos azufrados el cual es alto para una proteína de origen vegetal, lo que le confiere un valor agregado a la proteína de las semillas de Colorín.

Tabla 10.
Perfil de aminoácidos esenciales de la semilla de Colorín destoxificada.
Contenido de aminoácidos Indispensables (mg a.a/g N)

Aminoácido	Colorín	Patrón FAO	sn (2)
ILE	307.86	250	85.97
LEU	674.36	440	>100
LIS	568.66	340	>100
TRE	260.59	250	82.69
TRP	85.08	60	>100
VAL	415.37	310	93.95
TOT. AZUF ^a	256.23	220	<u>81.85</u>
TOT. AROM ^b	622.27	380	>100

(1) Patrón FAO 1973.

(2) Score Químico, o Calificación Química

^a Total de azufrados = met + cis.

^b Total de aromáticos = fen + tir.

Con los resultados del análisis proximal y el perfil de aminoácidos de la semilla de Colorín se procedió a realizar dietas isoenergéticas e isoproteínicas. Durante el primer bioensayo se emplearon 2 dietas de prueba y una control, las dietas de prueba fueron: una en la que el 50% de la fuente de proteína esta dada por el Colorín y el otro 50% por soya + sorgo y la segunda en la que la fuente de proteína es únicamente la de las semillas de Colorín + sorgo y finalmente la dieta control que esta hecha a base de soya y sorgo (**Tabla 6.**). En este bioensayo se empleo pancreatina bovina debido a que en bioensayos realizados en roedores es usual el empleo de este preparado enzimatico para contrarrestar el efecto de los inhibidores de tripsina (**Tenorio, 1993**); sin embargo se observo una pobre respuesta en los parámetros de REP y CA (**Tabla 11 y 12**) en los animales sometidos a las dietas de Colorín, siendo los más afectados los animales con la dieta 50% Colorín ya que estos fueron los que presentaron menor ganancia en peso y desarrollo muscular como se puede observar en las fotografías del **Anexo 1**. Con lo que respecta a la

digestibilidad de la proteína se observa que esta es muy baja (**Tabla 13**) lo que se atribuye al efecto del alto nivel de inhibidores de tripsina en la dieta y el pobre desempeño de la pancreatina bovina debido a la variación ínterespecie, así como al alto contenido de fibra, ya que sólo los animales con dieta de Colorín presentaron fuertes diarreas durante todo el bioensayo.

Tabla 11.
Relación de Eficiencia Proteinica obtenida durante el bioensayo realizado con pancreatina bovina^{1,2,3}

Tratamiento	REP
Control	4.09±0.341 ^d
50% Colorín	0.59±0.064 ^a
100% Colorín	1.48±0.061 ^b

¹ Promedio ±D.E , n=4, a las dos semanas de experimentación

² Promedios con diferentes letras indican diferencia significativa estadísticamente ($\alpha=0.05$).

³ Incremento en peso/ Proteína consumido.

Tabla 12.
Conversión alimenticia obtenida durante el bioensayo realizado con pancreatina bovina^{1,2,3}

Tratamiento	CA
Control	0.78±0.036 ^a
50% Colorín	1.45±0.042 ^c
100% Colorín	1.41±0.018 ^b

¹ Promedio ±D.E , n=4, a las dos semanas de experimentación

² Promedios con diferentes letras indican diferencia significativa estadísticamente ($\alpha=0.05$).

³ Alimento Consumido/ Incremento en peso.

Resulta obvio que existe diferencia significativa estadística con respecto al control en todos los parámetros estudiados y aún entre las dietas de Colorín y en la **Tabla 13** se presentan los resultados de la digestibilidad y para mas detalles se puede revisar el **Anexo 2**.

Sin embargo de este bioensayo se pudo determinar que de los animales con dietas hechas a base de Colorín, la dieta 100% Colorín tuvo un mejor desempeño, siendo esta la dieta más adecuada a emplear.

Tabla 13.
Resultados de Digestibilidad obtenidos durante el bioensayo realizado con pancreatina bovina^{1,2,3}

Tratamiento	%Digestibilidad
Control	81.73±0.182 ^c
50% Colorín	41.47±0.361 ^a
100% Colorín	51.10±0.397 ^b

¹ Promedio ±D.E , n=4, a las dos semanas de experimentación

² Promedios con diferentes letras indican diferencia significativa estadísticamente ($\alpha=0.05$).

³ (Nitrógeno Ingerido - Nitrógeno Fecal/Nitrógeno Ingerido) *100

En base a los resultados obtenidos durante el primer bioensayo, se procedió a realizar un segundo estudio, con las dietas 100% Colorín y control de soya, además se agrego pancreatina aviar para eliminar el efecto interespecie de estas enzimas digestivas.

La respuesta de este bioensayo fue satisfactoria ya que la REP obtenida para la dieta de Colorín mejoro mucho con respecto al primer bioensayo e incluso supero al control (**Tabla 14**) de igual forma en la CA (**Tabla 15**) presentando diferencia significativa estadística en ambos parámetros con respecto al control (**Anexo 2**).

En cuanto a la digestibilidad esta mejoro pero no supero a la del control como se puede ver en la **Tabla 16** siendo la posible causa de esto, el alto contenido de fibra en la dieta; pese a ello la respuesta en los parámetros de crecimiento fueron mejores

en la dieta de Colorín por lo que la semilla de Colorín podría ser una alternativa potencial en la alimentación de pollos de engorda.

Tabla 14.
Resultados de Relación de Eficiencia Proteínica obtenidos en la realización del Bioensayo con la adición de pancreatina aviar (Avizime) ^{1,2,3}

Tratamiento	REP
Control	3.06±0.078 ^b
100% Colorín	3.74±0.115 ^b

¹ Promedio ±D.E , n=4, a las dos semanas de experimentación

² Promedios con diferentes letras indican diferencia significativa estadísticamente ($\alpha=0.05$).

³ Incremento en peso/ Proteína consumido.

Tabla 15.
Resultados de Conversión alimenticia obtenidos en la realización del Bioensayo con la adición de pancreatina aviar (Avizime) ^{1,2,3}

Tratamiento	CA
Control	1.31±0.026 ^b
100% Colorín	1.02±0.042 ^a

¹ Promedio ±D.E , n=4, a las dos semanas de experimentación

² Promedios con diferentes letras indican diferencia significativa estadísticamente ($\alpha=0.05$).

³ Alimento Consumido/ Incremento en peso.

Tabla 16.
Resultados de Digestibilidad de la proteína obtenidos durante el bioensayo realizado con pancreatina aviar ^{1,2,3}

Tratamiento	% Digestibilidad
Control	88.33±0.036 ^b
100% Colorín	87.28±0.108 ^a

¹ Promedio ±D.E , n=4, a las dos semanas de experimentación

² Promedios con diferentes letras indican diferencia significativa estadísticamente ($\alpha=0.05$).

³ (Nitrógeno Ingerido - Nitrógeno Fecal/Nitrógeno Ingerido) *100

En la **Figura 5** se presenta una fotografía de los animales de experimentación del segundo bioensayo donde se puede observar el adecuado desarrollo de los pollos alimentados con semillas de Colorín destoxificada y en el **Anexo 1** se pueden observar algunas fotografías comparativas de los animales sometidos a dieta de Colorín y dieta Control.

Figura5.

Ave sometida a dieta de Colorín (izquierda) y ave sometida a dieta control de soya (derecha) a los 14 días de edad, nótese el parejo desarrollo muscular en las diferentes dietas.



5. CONCLUSIONES

- El método de destoxificación del material biológico resulta eficiente ya que se logra disminuir el nivel de tóxicos de forma significativa.
- Dadas las condiciones en que se trató la muestra, no obstante que se disminuyó el nivel de inhibidores de tripsina, la concentración de este factor antinutricional todavía es significativa.
- El proceso de tamizado del material destoxificado contribuyó en gran medida a reducir el nivel de fibra, con lo que se logró una mejor digestibilidad de la proteína durante el bioensayo.
- De acuerdo al análisis proximal y al perfil de aminoácidos de la semilla de Colorín destoxificada esta podría ser empleada en la alimentación de pollos de engorda ya que cumple con los requerimientos nutrimentales mínimos del ave.
- Es necesaria la adición de pancreatina en la dieta para contrarrestar el efecto de los inhibidores de tripsina presentes en la semilla de Colorín y esta debe ser de origen aviar ya que con pancreatina bovina se obtiene una pobre respuesta biológica.
- Los resultados obtenidos para la REP y CA sobre el bioensayo donde se sustituyó la fuente de proteína convencional por semillas de Colorín destoxificadas y se adicionó pancreatina aviar muestran una mejor respuesta biológica que el respectivo control.
- Las Semillas de Colorín muestran ser una alternativa potencial en la alimentación de aves domésticas (pollos).

6. BIBLIOGRAFÍA

- ▶ Ávila, G. ALIMENTACIÓN DE LAS AVES. Trillas S.A. p 17-55. México, D.F (2001).
- ▶ Adrian, J., Potus, J., Poiffait, A. y Dauvillier, P. ANÁLISIS NUTRICIONAL DE LOS ALIMENTOS. ACRIBIA, S.A., pág. 19-30, 84, 247-260, Zaragoza, España (2000).
- ▶ Bateman, J. NUTRICIÓN ANIMAL (Manual de métodos analíticos). Herrero Hnos.,S.A., pág 110-112, 170-172, México D.F. (1970).
- ▶ Bostid, F.R. (Editor) Lost CROPS OF THE INCAS: LITTLE KNOWN PLANTS OF THE ANDES WITH PROMISE FOR WORLDWIDE CULTIVATION. National Academy Press., Washington, D.C., pp 203-209, 1989.
- ▶ Centurión, D., Espionza, M. y Cázares, G. CATÁLOGO DE PLANTAS DE USO ALIMENTARIO TRADICIONAL EN LA REGIÓN SIERRA DEL ESTADO DE TABASCO. SIGOLFO, pág. i-iii, 7, 10, Villahermosa (2000).
- ▶ Chubb, L.G. ANTI-NUTRITIONAL FACTORS IN ANIMAL FEED-STUFFS, pages 21-37. In: Recent Advances in Animal Nutrition. Ed. William Haresign. Butterworth, Londres (1982).
- ▶ Crampton, R.F. NUTRITIONAL AND METABOLIC ASPECTS OF PEPTIDE TRANSPORT. IN: PEPTIDE TRANSPORT IN BACTERIA AND MAMMALIAN GUT, pp 1-10. Eds. Elliot, K., and O'Connor, M. Associated Scientific Publishers, London (1972).
- ▶ Doode, M. y Pérez, E.P. SOCIEDAD, ECONOMÍA Y CULTURA ALIMENTARIA. CIAD, A.C., pág. 9-20, 273-302, Hermosillo (1994).
- ▶ Ferrando, F. ALIMENTOS TRADICIONALES Y NO TRADICIONALES. FAO: Colección de alimentos y nutrición No. 2, pág. IX-XI, 83-130, Roma (1980).
- ▶ Flores del V.N. EVALUACIÓN NUTRICIONAL Y TOXICOLÓGICA DEL EJOTE DE COLORÍN (ERYTHRINA AMERICANA) DESPUÉS DE SER SOMETIDO A UN PROCESO DE COCCIÓN. Tesis de Licenciatura . Facultad de Química UNAM. México DF (2003).
- ▶ Flores, N. (Editor) ¿PRODUCIR PARA LA DESNUTRICIÓN? Centro de Ecodesarrollo, pág. 13-34, 243-266, México, D.F. (1988).
- ▶ García-Mateos, R., Lucas, B., Zendejas, M., Soto-Hernández, M., Martínez, M. and Sotelo, A. VARIATION OF TOTAL NITROGEN, NON-PROTEIN NITROGEN CONTENT AND TYPES OF ALKALOIDS IN DIFFERENT STAGES OF DEVELOPMENT IN *Erythrina americana* SEEDS. J. Agric. Food Chem. 44, 2987-2991 (1996).
- ▶ Garín-Aguilar, M., Ramírez, E., Soto-Hernández, M., Valencia del Toro, G. and Martínez-Vazquez, M. EFFECT OF CRUDE EXTRACTS OF *Erythrina americana* MILL ON AGGRESSIVE BEHAVIOR IN RATS. J. Ethnopharmacol. 69, 189-196 (2000).
- ▶ Granados, D. y López, G. AGROECOLOGÍA U.A. de Chapingo, pág. 37-166, Texcoco (1996).

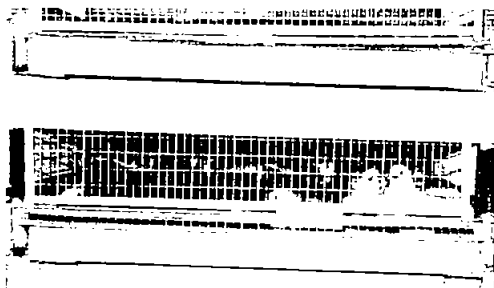
- ▶ Guerrero, L. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y LOS FACTORES TÓXICOS DE DOS VARIEDADES DE *Erythrina*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, D.F. (1980).
- ▶ Harborne, J., Boulter, D. and Turner, B. (Eds.) CHEMOTAXONOMY OF THE *leguminosae*. Academic Press, pp. 1-23, Nueva York (1971).
- ▶ Herlich, K. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC. Published by AOAC 15th edition, Vol. I, pp. 17-18, 40-62, 69-83; Vol. II, pp. 1095-1098, Arlington (1990).
- ▶ Hernández, J.E. y León, C. CULTIVOS MARGINADOS (OTRA PERSPECTIVA DE 1942) FAO: Colección de alimentación y nutrición No. 2, pág. IX-XI, 3-33, 37-120, Roma (1992).
- ▶ Howard, F. Latshaw, J. National Research Council. NUTRIENT REQUIREMENTS OF POULTRY. 9th revised edition. National Academy Press, Washington, DC (1994)
- ▶ Jiménez L.V. ELIMINACIÓN DE LOS COMPONENTES TÓXICOS DE DOS SEMILLAS DEL GÉNERO DE ERYTHRINA Y SU EVALUACIÓN BROMATOLÓGICA. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química UNAM. México D.F (1994).
- ▶ Kakade, M., Rackis, J., McGhee, J. and Puski, G. DETERMINATION OF TRYPSIN INHIBITOR ACTIVITY OF SOY PRODUCTS. Cereal Chem. 51, 376-382 (1974).
- ▶ Kay, D. LEGUMBRES ALIMENTICIAS. Editorial Acribia, pág. 233, 234, 243, Zaragoza, España (1991).
- ▶ Latham M. NUTRICIÓN HUMANA EN EL MUNDO EN DESARROLLO. Colección FAO: Alimentación y nutrición. 29, 1-25 (2002).
- ▶ Leontowics, H., Kostyra, H., Leontowics, M. and Kulash, G. THE INACTIVATION OF LEGUME SEED HAEMAGGLUTININ AND TRYPSIN INHIBITORS BY BOILING. 3th. International Workshop on ANFs. In legume seeds and rapeseed. EAAP Publication No. 93, pp. 429-432, Wageningen (1998).
- ▶ Leopold, A. and Andrey, R. TOXIC SUBSTANCES IN PLANT AND THE FOOD HABITS OF EARLY MAN. Sci. 176, 512-514 (1994).
- ▶ Leeson, S., y Zubair, A.K. THE POULTRY DIGESTION I. COMMERCIAL POULTRY NUTRITION 3th Ed. Publ. Univ. Books, Guelph, ON.(2003)
- ▶ Liener, I. E. TOXIC CONSTITUENTS OF PLANT FOODSTUFFS, 2nd ed. Nueva York; Academic Press(1980)
- ▶ Lucas, B. and Sotelo, A. EFFECTS OF DIFFERENT ALKALIES, TEMPERATURE AND HYDROLYSIS TIMES ON TRYPTOPHAN DETERMINATION OF PURE PROTEINS. Anal. Biochem. 109, 192-197 (1980).
- ▶ Lucas, B. and Sotelo, A. AMINOACIDS DETERMINATION IN PURE PROTEINS, FOODS AND FEEDS USING TWO DIFFERENT ACID HYDROLYSIS METHODS. Anal. Biochem. 123, 349-356 (1982).

- ▶ Lucas, B. and Sotelo, A. A USEFUL MODIFICATION OF THE HEMAGGLUTINATION METHOD FOR SEENING OF LECTIN IN LEGUME SEED. EAPP Publication, No.70, p 71-74, Wageningen(1993).
- ▶ Lucas, B., Guerrero, A., Sigales, L. and Sotelo, A. TRUE PROTEIN CONTENT AND NON-PROTEIN AMINO ACIDS IN LEGUME SEDES. Nutr. Rept. Int. 37, 545-553 (1988).
- ▶ Martello, R and Farnsworth, N;(1962). OBSERVATIONS ON THE SENSITIVITY OF SEVERAL COMMON ALKALOID PRECIPITATING REAGENTS. Lloydia, 25 176-185.
- ▶ Mansour, E., Dworschák, E., Lugasi, A., Bama, E. and Gergely, A. NUTRITIVE VALUE OF PUMPKIN (*cucurbita pepo* kakaí 35) SEED PRODUCTS. J. Sci. Food Agric. 61, 73-78 (1993).
- ▶ Martínez Pró A, ávila, G E. NUTRICIÓN DEL POLLO DE ENGORDA. National association, Inc. 1-6 septiembre 1995
- ▶ Michael, P. MEJORANDO LA CONVERSIÓN ALIMENTICIA EN POLLOS DE ENGORDE. Servicio de Extensión Universidad de Georgia., Publicaciones Profesionales, 33:pp1-6 (2004).
- ▶ Moreno, R.I. ESTIMACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA Y CUANTIFICACIÓN DE ALCALOIDES TOTALES EN *Erythrina americana* EN DIFERENTES FASES DE DESARROLLO. Tesis Fac. de Química, UNAM, México, D.F. (2001).
- ▶ Muller, H. y Tobin, G. NUTRICIÓN Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS. Acribia, pág. 73-77, Zaragoza (1986).
- ▶ Murphy, D.J. DESIGNER OIL CROPS (BREEDING, PROCESSING AND BIOTECHNOLOGY). VCH Publisher Inc. pp. 73-130, 253-281, N.Y. (1994).
- ▶ Nolasco S.M, Bertoni, L. ESTUDIOS SOBRE SEMILLAS DE *Onopordon acanthium*, *Cardus acanthoides* y *Cirsium vulgare*, ACEITES CRUDOS DE EXTRACCIÓN Y HARINAS RESIDUALES. Anal. Asoc. Quim. Argent. ,75(1), 29-34 (1987).
- ▶ Parsons, C.M., K. Hashimoto, K.J. Wedekind and D.H.Baker. SOYBEAN PROTEIN SOLUBILITY IN POTASSIUM HYDROXIDE: an *in vitro* test of *in vivo* PROTEIN QUALITY. J. Anim.: Sci. 69:2918-2924 (1991)
- ▶ Pearson, D. TECNICAS DE LABORATORIO PARA EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS, 3ª Reimpresión , Editorial acribia S.A. 62-68, Zaragoza, (1998).
- ▶ Pellet, P. and Young, V. NUTRITION EVALUATION OF PROTEIN FOOD. The United Nations University, pp. 26-75, Tokyo (1980).
- ▶ Sinha, S. LAS LEGUMINOSAS ALIMENTICIAS (SU DISTRIBUCIÓN, SU CAPACIDAD DE ADAPTACIÓN Y BIOLOGÍA DE SUS RENDIMIENTOS). FAO: Colección de producción y protección vegetal No.3, pág. 1-12, 19-79, Roma (1978).

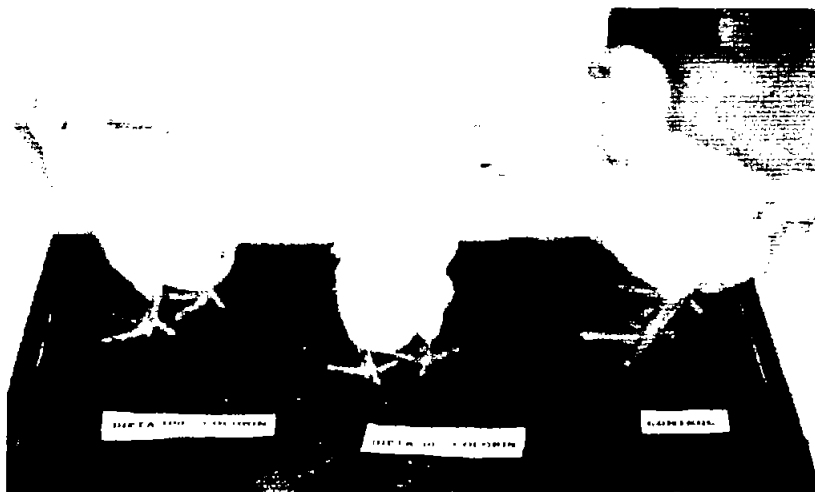
- ▶ Sotelo, A., Soto-Hernández, M., Lucas, B. and Giral, F. COMPARATIVE STUDIES OF THE ALKALOIDAL COMPOSITION OF TWO MEXICAN *erythrina* SPECIES AND NUTRITIVE VALUE OF THE DETOXIFIED SEEDS. J. Agric. Food Chem. 41, 2340-2343 (1993).
- ▶ Sotelo, A. and Lucas, B. VARIATION IN ANTINUTRITIONAL FACTORS AT DIFFERENT DEVELOPMENT STAGES IN SEED OF *Phaseolus vulgaris* AND *Erythrina americana*. 3th. International Workshop on ANFs. In legume seeds and rapeseed. EAAP Publication No. 93, pp. 409-412, Wageningen (1998).
- ▶ Tenorio, M.E. EVALUACIÓN PROTEICO-CALÓRICA DE DOS SEMILLAS DE *Erythrina* DESTOXIFICADAS. Tesis Fac. de Química, UNAM, México, D. F. (1993).
- ▶ Treviño, J ;Rodríguez, M, Ortiz, L. PROTEIN QUALITY OF LINSEED FOR GROWING BROILER CHICKS. Animal Feed Science and Technology.84, pp155-166 (2000)
- ▶ Villela, O. y Gerez, P. BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN EN MÉXICO. Ed. Técnico Científicas, SA de CV-UNAM, 2ª. Edición, pág. 7-34, 269-276, México, D.F. (1994).
- ▶ Wanasundara, P. and Shahidi, F. PROCESS-INDUCED CHEMICAL CHANGES IN FOOD. Plenum Press, pp. 307-327, N. Y. (1998).
- ▶ Zhang, Y., and Parsons C.M.. EFFECT OF EXTRUSION AND EXPELLING ON THE NUTRITIONAL QUALITY OF CONVENTIONAL AND KUNITZ TRYPSIN INHIBITOR-FREE SOYBEANS. Poultry Sci. 721, 2299-2303 (1993).

Anexo1. Fotografías de los animales de experimentación.

Fotografía 1 y 2. Acomodo de las aves dentro de la criadora Petersime.



Fotografía 3. Obsérvese la diferencia en el tamaño de los animales sometidos a dieta de Colorín (izquierda 100% Colorín, centro 50% Colorín) con respecto a los de la dieta control (derecha) durante el bioensayo realizado con pancreatina bovina.



Fotografía 4. Nótese el pobre desarrollo de los animales sometidos a dieta 50% Colorín (izquierda) con respecto a los de dieta control (derecha) a las dos semanas de experimentación.



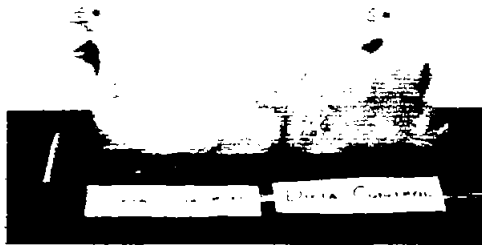
Fotografía 5. Ave con dieta control (soya) a la segunda semana de experimentación



Fotografía 6 . Ave con dieta 100% Colorín durante el bioensayo realizado con pancreatina aviar.



Fotografía 7. Se observa un parejo desarrollo de las aves sometidas a la dieta de Colorín y el control, durante el bioensayo realizado con pancreatina aviar



Fotografía 8 y 9. Es notable la diferencia del desarrollo de las aves del bioensayo realizado con pancreatina bovina (izquierda) con respecto al realizado con pancreatina aviar (derecha).



ANEXO 3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

ANOVA DE PER CON PANCREATINA BOVINA

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Valor de F
Entre grupos	26.5245	2	13.2622	244.867
Intragrupo	0.48745	9	0.05416	

Nivel de confianza 95%, Si hay diferencia significativa.

Prueba de Rangos Múltiples de Duncan.

Comparaciones entre grupos	Diferencia
Dieta Control - Dieta 50% Colorín	3.5025
Dieta Control – Dieta100% Colorín	2.6150
Dieta 50% Colorín - Dieta100% Colorín	-0.8875

Todos son estadísticamente diferentes.

ANOVA DE DIGESTIBILIDAD CON PANCREATINA BOVINA

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Valor de F
Entre grupos	3535.9279	2	1767.963	999.99
Intragrupo	1.2872	9	0.1430	

Nivel de confianza 95%, Si hay diferencia significativa.

Prueba de Rangos Múltiples de Duncan.

Comparaciones entre grupos	Diferencia
Dieta Control - Dieta 50% Colorín	40.2625
Dieta Control – Dieta100% Colorín	30.6275
Dieta 50% Colorín - Dieta100% Colorín	-9.6350

Todos son estadísticamente diferentes.

PRUEBA DE t SIMPLE PARA PER DEL BIOENSAYO CON PANCREATINA AVIAR.

	Dieta control	Dieta 100% Colorín
Numero de observaciones	4	4
Promedio	3.025	3.735
Varianza	6.166	0.0132
Desviación estándar	0.0785	0.1150
Media	3.055	3.735

Diferencia de medias = - 0.71

Intervalo de confianza = 95%

H₀= No hay diferencia significativa

Computo de t estadística = -10.195

Resolución = Ho se rechaza. Existe diferencia significativa estadística.

PRUEBA DE t SIMPLE PARA CONVERSIÓN ALIMENTICIA (CA) DEL BIOENSAYO CON PANCREATINA AVIAR.

	Dieta control	Dieta 100% Colorín
Numero de observaciones	4	4
Promedio	1.3125	1.02
Varianza	6.9166 e-4	1.8 e-3
Desviación estándar	0.0262	0.0424
Media	1.31	1.015

Diferencia de medias = 0.2925

Intervalo de confianza = 95%

H₀= No hay diferencia significativa

Computo de t estadística = 11.7195

Resolución Ho se rechaza. Existe diferencia significativa estadística.

PRUEBA DE t SIMPLE PARA DIGESTIBILIDAD DEL BIOENSAYO CON PANCREATINA AVIAR.

	Dieta control	Dieta 100% Colorín
Numero de observaciones	4	4
Promedio	88.3275	87.27
Varianza	1.3583 e-3	0.0116
Desviación estándar	0.0368	0.1080
Media	88.33	87.28

Diferencia de medias = 0.1164

Intervalo de confianza = 95%

H₀= No hay diferencia significativa

Computo de t estadística = 18.532

Resolución Ho se rechaza. Existe diferencia significativa estadística.