



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

POSTGRADO EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**EFFECTO DE LA EXTRUSIÓN Y FERMENTACIÓN SÓLIDA EN LA
CONCENTRACIÓN DE CANAVANINA EN LAS SEMILLAS DE
CANAVALLIA (*Canavalia ensiformis* L.)**

ELMER DANIEL CARRILLO HERNÁNDEZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO.

2014

La presente tesis titulada: **Efecto de la extrusión y fermentación sólida en la concentración de canavanina de las semillas de Canavalia (*Canavalia ensiformis* L.)**, realizada por el alumno: **Elmer Daniel Carrillo Hernández**, bajo la dirección del **Consejo Particular** indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

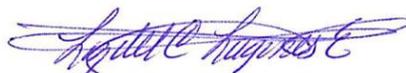
MAESTRO EN CIENCIAS
PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. EMILIO M. ARANDA IBÁÑEZ

ASESOR:



DRA. LUZ DEL CARMEN LAGUNES ESPINOZA

ASESOR:



MC. MAÑUEL BARRÓN ARREDONDO

ASESOR:



DR. JUAN CARLOS KÚ VERA

H. Cárdenas, Tabasco a 13 de Octubre de 2014.

**EFFECTO DE LA EXTRUSIÓN Y FERMENTACIÓN SOLIDA EN LA
CONCENTRACIÓN DE CANAVANINA EN LAS SEMILLAS DE CANAVALLIA
(*Canavalia ensiformis* L.)**

Elmer Daniel Carrillo Hernández, MC.

Colegio de Postgraduados, 2014

Canavalia ensiformis es una leguminosa con atributos agronómicos potenciales para producir semillas y forraje verde. La semilla posee un contenido alto en proteína, que no se aprovecha eficientemente, dado los compuestos antinutricios como la canavanina, que presenta funciones antimetabólicas en animales y el hombre. El objetivo del presente estudio fue conocer el efecto de la extrusión (EX) y fermentación sólida (FES) sobre la concentración de canavanina en semilla de *C. ensiformis*. Se determinaron los contenidos de materia seca (MS), cenizas, proteína cruda (PC), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), extracto etéreo (EE), la digestibilidad *in situ* de la materia seca (DIMS) y la concentración de canavanina (CCV) en semillas, pericarpios y vainas completas después de inocularse con Vitafert ó del extruido a 150°C. El diseño factorial fue 3 x 3 considerando como factor A los componentes de la planta y como factor B el tratamiento aplicado. No se observaron cambios en la concentración de canavanina por efecto de los tratamientos aplicados. Se observó una disminución de 5.35 unidades en el porcentaje de PC de la semilla fermentada respecto a la semilla sin tratamiento, sin cambios en FDN, FDA y EE. Los tratamientos fermentados mostraron mayor contenido de cenizas (4.65 a 6.63%). El contenido de EE fue mayor en semilla fermentada (1.68%) respecto a la extruida (1.38%). La

extrusión disminuyó la PC en semillas y pericarpios pero mejoró la DIMS en semillas (83.59%) a las 24 h; los demás tratamientos no fueron diferentes ($p \leq 0.05$). La extrusión y la FES no son métodos eficaces para eliminar el contenido de canavanina en *C. ensiformis*.

Palabras clave: Proteínas de leguminosas, extrusión, fermentación, canavanina.

**EFFECT OF EXTRUSION AND SOLID FERMENTATION ON THE
CONCENTRATION OF CANAVANINE OF SEEDS OF CANAVALIA (*Canavalia
ensiformis* L.)**

Elmer Daniel Carrillo Hernández, MC.

Colegio de Postgraduados, 2014

Canavalia ensiformis L. is a legume with potential agronomic attributes for seed production and forage. The seed has a high protein content, but is not use efficiently since the antinutritional compounds as canavanine, that presents antimetabolic functions in animals and man. The aim of this study was to determine the effect of extrusion (EX) and solid state fermentation (SSF) on the concentration of canavanine in *C. ensiformis* seeds. Content of dry matter (DM), ash, crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (FDA), ether extract (EE), canavanine (CCV) and *in situ* dry matter digestibility (DIMS) were determined in seeds, pod walls and pods after inoculation Vitafert or extrusion at 150 ° C. The factorial design was 3 x 3. No changes were observed in the concentration of canavanine after application of treatments. It was observed a decrease of 5.35 percentage units in PC of the fermented seed regarding untreated seed. No changes in NDF, ADF and EE were observed. Fermented treatments showed higher ash content (4.65 to 6.63%). EE content was higher in fermented seed (1.68%) compared to extruded (1.38%). PC extrusion decreased in seeds and pod walls but DIMS of seeds was improved (83.59%) at 24 h; other

treatments were not different ($p \leq 0.05$). Extrusion and FES are no effective methods to remove the canavanine content in *C. ensiformis*.

Key words: legume protein, extrusion, fermentation, canavanine.

ABREVIATURAS USADAS

mm	milímetros	FDN	fibra detergente neutro
kg	kilogramos	FDA	fibra detergente ácida
m	metros	rpm	revoluciones por minuto
cm	centímetros	min	minutos
pH	potencial de Hidrógeno	FLS	fermentación líquida sumergida
msnm	metros sobre el nivel del mar	°C	grados Celsius
ELN	Extracto libre de nitrógeno	DIMS	degradación de la materia seca
Kcal	kilocalorías	AOAC	Association of Official Analytical Chemists
EM	energía metabolizable	CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
g	gramos	EE	extracto etéreo
P	Fósforo	FES	Fermentación en Estado Sólido
Ca	Calcio	ACC	ácidos orgánicos de cadena corta
N	Nitrógeno	HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
ha	hectárea	MS	materia seca
t	tonelada	PC	proteína cruda
M.O	materia orgánica	L	Litros

DEDICATORIAS

A **DIOS** padre celestial, por haberme iluminado durante todo este camino, por su amor infinito y su misericordia.

A mi nena, **Aranza Carrillo Silvano**, que con tu llegada has transformado mi vida y gran parte de este trabajo te lo dedico a ti, esperando que algún día pueda servirte de inspiración y no trunques ninguno de tus sueños.

“Toda la historia del progreso humano se puede reducir a la lucha de la ciencia contra la superstición”.

Gregorio Marañón

AGRADECIMIENTOS

Al **Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco**. Por haber permitido formarme en el seno de sus aulas.

Al **CONACYT** por haberme otorgado la beca como apoyo y estímulo para continuar con mi formación académica.

A la **Línea Prioritaria de Investigación 2 (LPI-2)**, Agroecosistemas Sustentables del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco.

Al **Dr. José Manuel Piña Gutiérrez**, por haber permitido laborar en las instalaciones de su rancho, y por haber proporcionado el material vegetal para llevar a cabo este proyecto. Además por haber financiado parcialmente este trabajo.

Al **MC. Víctor Manuel Munguía Flores**, por el apoyo incondicional y las facilidades brindadas para la obtención de las muestras, recomendaciones y sugerencias para el trabajo.

Al **Dr. Juan Manuel Zaldívar Cruz**, quizás no hayan palabras suficientes como para poder expresar infinitamente mi agradecimiento hacia usted, por haberme brindado primeramente su amistad y confianza, antes, durante y en el transcurso de esta gran experiencia vivida en este campus. Gracias le doy a Dios por haber conocido a tan gran y extraordinaria persona y ser humano, por haber creído en mí. Le doy gracias por haber permitido abrir las puertas de su laboratorio para llevar acabo mi experimento, por los incansables consejos que

desinteresadamente me brindó y por el tiempo infinito que dedicó para mejorar este trabajo cada día, gracias por ser mi amigo y mi mentor.

A mi consejero, **Dr. Emilio M. Aranda Ibáñez**. Por la dedicación de su valioso tiempo y por los consejos brindados para mejorar el presente trabajo cada día.

A mi consejo particular, **Dra. Luz del Carmen Lagunes Espinoza**, **Dr. Juan C. Kú Vera** y el **M.C. Manuel Barrón Arredondo**, por haber dedicado de su valioso tiempo a mejorar este trabajo, por la confianza otorgada y sus abundantes consejos y recomendaciones, muchas gracias.

A la **Ing. Siomara López Blanco**, por esa amistad que me brindas incondicionalmente en momentos difíciles y alegres, y que no hay palabras para agradecer por todo lo que me has apoyado.

A mi amigo y compañero, **Wilber Hernández Montiel**. Por su amistad, consejos y experiencia compartida, que de una u otra forma me han ayudado en mi formación, muchas gracias por tu amistad.

A mis padres, **Elidita Hernández Martínez** y **Edel Carrillo López**, que con su cariño y consejos me enseñaron a salir adelante y luchar.

A mis hermanos, **Fredy Carrillo Hernández**, **Mario Humberto Carrillo Hernández** y **Normando Xavier Carrillo Hernández**, que con paciencia y cariño han contribuido en enseñarme a ser un mejor ser.

A **Vanesa Silvano Méndez**, por haberme regalado el ser más querido de mi vida.

A mis compañeros, **Lidia García Ferrer, Miriam Castro Gutiérrez, Martha María López González, Selene J. Jacinto Pimienta, Eglá Lugo Cruz, José María Hernández Olan, Sergio Alexander López Juárez, Baltazar Sánchez Díaz, Carlos Arce Recinos, Beatriz Garduza Acosta y Dalia María Vicente de la Fuente.** Gracias por haberme brindado su amistad chicos!!

“La ciencia puede descubrir lo que es cierto, pero no lo que es bueno, justo y humano”.

Marcus Jacobson

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS.....	4
General	4
Particulares	4
III. HIPOTESIS	5
IV. Revisión de Literatura	6
4.1 Situación actual de la ganadería en el trópico	6
4.1.2 Importancia de los pastos en la alimentación animal.....	9
4.1.3 <i>Canavalia ensiformis</i>	11
4.2 Metabolitos secundarios de la semilla de <i>C. ensiformis</i>	15
4.2.1 Canavanina.....	16
4.2.2 Distribución de la canavanina en plantas.....	18
4.2.3 Síntesis y Degradación de la Canavanina en plantas.....	19
4.2.4 Efectos de la canavanina en plantas, en animales y humanos.....	24
4.3 Usos de <i>C. ensiformis</i>	26
4.3.1 Métodos utilizados para disminuir los compuestos secundarios en <i>C. ensiformis</i>	27
4.3.2 Tostado.....	27
4.3.3 Peletizado	28
4.3.6 Extruido.....	29
4.4 Fermentación en estado sólido	31
4.4.1 Vitafert	34
4.5 Técnicas utilizadas para determinar Canavanina	35
V. MATERIALES Y METODOS	36
5.1 Obtención de la materia prima.	36
5.2. Manejo agronómico y labores culturales del cultivo.....	36
5.2.1 Procesamiento de la materia prima.	38
5.2.2 Tratamientos y Diseño experimental.....	39

5.3.1 Elaboración del Vitafert.....	40
5.3.1.2 Proceso de Fermentación de <i>C. ensiformis</i>	41
5.3.2 <i>Canavalia ensiformis</i> extruida.....	43
5.4 Composición química proximal	44
5.5 Fibra en solución detergente neutro (FDN) y Fibra en solución.....	44
5.6 Degradación <i>in situ</i> de la materia seca (DMS).....	44
5.7 Determinación de <i>Canavanina</i>	45
5.8 Diseño experimental y análisis estadístico.....	46
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
5.1 Composición química proximal de <i>Canavalia ensiformis</i> L.	47
5.1.1 Fermentación en sustrato sólido y extrusión.....	47
5.1.1.1 Materia Seca (MS)	47
5.1.2 Cenizas.....	49
5.1.3 Proteína	50
5.1.4 Fibra Detergente Neutro y Fibra Detergente Ácido.....	51
5.1.5 Extracto Etéreo	54
5.1.6 Degradación <i>In situ</i> de la Materia Seca	55
5.2 Contenido de Canavanina en <i>Canavalia</i> sometida a fermentación y extrusión	57
VII. CONCLUSIONES	60
VIII. RECOMENDACIONES.....	61
IX. LITERATURA CITADA.....	63
X. ANEXOS.....	74

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición proximal (%) de la semilla de <i>C. ensiformis</i>	14
Cuadro 2. Contenido de Canavanina en harinas crudas y extruidas en <i>C. ensiformis</i>	14
Cuadro 3. Contenido de Canavanina en algunas especies.	19
Cuadro 4. Bacterias ácido lácticas en alimentos fermentados	32
Cuadro 6. Ingredientes utilizados y porcentaje de inclusión para elaborar el Vitafert.	40
Cuadro 7. Ingredientes utilizados para fermentar <i>C. ensiformis</i>	42
Cuadro 8. Composición química proximal de los componentes de las vainas de <i>C. ensiformis</i> en el tratamiento de fermentación.	49
Cuadro 9. Composición química proximal de los componentes de las vainas de <i>C. ensiformis</i> en el tratamiento de extruido.	50
Cuadro 10. Composición química proximal de FDN, FDA y EE en los componentes de las vainas de <i>C. ensiformis</i> en el tratamiento de fermentación.	53
Cuadro 11. Composición química proximal de FDN, FDA y EE en los componentes de las vainas de <i>C. ensiformis</i> en el tratamiento de extrusión	53
Cuadro 12 .Concentración de Canavanina en los diferentes componentes de <i>C. ensiformis</i>	58
Cuadro 13. Análisis de Varianza del efecto de la interacción de tratamientos y componentes sobre la concentración de canavanina.	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistemas radicales de <i>C. ensiformis</i>	12
Figura 2. Cultivo de <i>Canavalia ensiformis</i> (Foto. Tomada por Elmer D. Carrillo Hernández).....	13
Figura 3. Estructuras químicas de la L –Canavanina y L –Arginina, mostrando la sustitución del grupo metileno con el oxígeno.....	17
Figura 4. Ruta metabólica de la Canavanina en semillas de <i>C. ensiformis</i>	21
Figura 5. Representación esquemática de una extrusora de husillo.	30
Figura 6. Molino Picadora, utilizado para moler las muestras.	39
Figura 7. Semillas de <i>C. ensiformis</i> fermentadas.	42
Figura 9. Interacción de tratamientos y componentes de <i>Canavalia</i> en las variables, Panel A: materia seca, Panel B: proteína, Panel C: cenizas y Panel D: extracto etéreo. S. Semilla, VC. Vaina Completa, P. Pericarpio.....	48
Figura 10. Interacción de los tratamientos y componentes de las variables FDN y FDA de canavalia. S. Semilla, VC. Vaina Completa, P. Pericarpio.	52
Figura 11. Degradación de la materia seca de vainas completas, semilla extruida y fermentada a las 24 h de incubación.....	55
Figura 12. Degradación de la materia seca de vaina completa, vaina completa extruida y vaina completa fermentada a las 48 h de incubación.	56

I. INTRODUCCIÓN

México cuenta con una gran diversidad de climas, que van desde el templado a cálido y del muy húmedo hasta el muy seco. Al igual que el clima, presenta una orografía muy accidentada y heterogénea con diferentes tipos de suelos.

Todo esto hace que el país presente sistemas de producción bovina y ovina muy variados, con características propias de cada región y que son determinados por la disponibilidad de los recursos y por los hábitos en el consumo de productos bovinos y ovinos. A pesar de los avances tecnológicos recientes en el país solo se produce el 70% de la carne ovina que se consume, por lo que tiene un mercado potencial de 30, 000 t anuales (Partida de la Peña, 2013).

En la región del trópico mexicano principalmente en el estado de Tabasco, la población actual de ovinos es de alrededor de 75,175 cabezas. Black Belly y Pelibuey son las razas predominantes. El 60% del inventario ovino se encuentra en los municipios de Balancán (27%), Huimanguillo (15%), Macuspana (9.5%) y Tenosique (8.5%), distribuidas en poco más de 3,334 unidades de producción. La superficie destinada a pastoreo está constituida en 37% por pastos mejorados, un 37% con gramas nativas y 26% con ambos, mejorados y gramas nativas (INEGI, 2012), dentro de los cuales se encuentran pastos de los géneros *Brachiaria*, *Cynodon*, *Panicum*, entre otros, que tienen un alto potencial de producción para la alimentación animal, principalmente bovinos y ovinos, sin embargo, estos recursos forrajeros tienen poco valor nutritivo.

Por ello se ha recurrido a nuevos recursos vegetales que cubran el déficit nutricional en la alimentación animal. Sin embargo, para satisfacer esos requerimientos se requiere incrementar la producción al menor costo posible. Normalmente en ovinos en pastoreo la ganancia promedio en peso es de 80 g por día, lo que hace al sistema de producción muy deficiente en cuanto a productividad. Entonces si se requiere mejorar la eficiencia del sistema de producción, hay que buscar nuevas alternativas de alimentación. Dado que en la actualidad los insumos se han incrementado sustancialmente en el mercado, como es el caso de la soya donde el kg supera los 12 pesos haciéndolo poco rentable.

Como una alternativa potencial es *Canavalia ensiformis*, esta leguminosa puede adaptarse a ambientes diversos, crece desde el nivel del mar hasta 1800 m en suelos con pH entre 5 y 6, es resistente a la sequía y tolera la sombra. Fija hasta 81.7 kg de N ha⁻¹, por lo que puede ser aprovechada en asociación con otros cultivos, principalmente maíz; y como cobertera para evitar la erosión del suelo. Tiene potencial de uso como leguminosa de grano o como forraje verde, con un rendimiento de 1.6 a 6 t ha⁻¹ de semilla ó 18 t ha⁻¹ de forraje. Estudios previos han mostrado que la semilla de *C. ensiformis* posee de 32 a 35% de proteína y 40% de almidón, por lo que es un recurso energético-proteico, además es rica en aminoácidos como lisina, treonina y arginina pero pobre en aminoácidos azufrados y triptófano, es una fuente importante de minerales como fósforo (3.5 g kg⁻¹) y calcio (1.4 g kg⁻¹). Contiene metabolitos secundarios que impiden su aprovechamiento seguro en alimentación animal.

Destacando el aminoácido no proteico canavanina, un análogo estructural a L-arginina. La canavanina tiene la capacidad de interferir en los procesos celulares y fisiológicos normales de células, procariotas, virus, animales vertebrados e invertebrados, incluyendo el hombre. La disminución o en algunos casos eliminación de este metabolito se ha logrado al someter la semilla a tratamientos como el malteado, remojo en solución salina, tostado, peletizado, extruido y fermentado. La fermentación en estado sólido (FES) es un proceso biotecnológico que permite transformar alimentos o subproductos de la agroindustria con el fin de mejorar su calidad para ser aprovechados eficientemente por los animales. Su aplicación para la reducción de compuestos no deseados en semillas con potencial en la alimentación animal no se ha evaluado. Por lo que en este trabajo se planteó la extrusión y aplicación de la fermentación en estado sólido (FES) a semillas y vainas de *C. ensiformis* para conocer su efecto sobre la concentración de canavanina.

II. OBJETIVOS

General

Conocer el efecto de la aplicación de los tratamientos de extrusión y fermentación sólida en la concentración de Canavanina en vainas y semillas de *Canavalia ensiformis* L.

Particulares

1.- Evaluar el valor nutritivo de la semilla y de la vaina al momento de la cosecha de *Canavalia ensiformis* y después de cada tratamiento.

2.- Determinar la concentración de Canavanina en las semillas y vainas de *Canavalia ensiformis* después de aplicar el tratamiento extruido y el de fermentación sólida.

III. HIPOTESIS

1.- El efecto de la extrusión y fermentación sólida disminuye la concentración de canavanina en semillas y vainas de la leguminosa.

2.- La fermentación sólida tiene mayor efecto en la reducción del contenido de canavanina en la semilla.

3.- La concentración proteica se mantiene después del efecto de extrusión y fermentación sólida.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Situación actual de la ganadería en el trópico

México es uno de los países que posee una gran diversidad de suelos y climas, lo que le da la propiedad de tener potencial para la producción en el sector primario. Está constituido por 32 estados y un Distrito Federal, repartidos en 3 regiones (Norte, Centro y Sur), al norte colinda con los Estados Unidos, al sur con Guatemala y Belice; al este con el Golfo de México y al oeste con el Océano Pacífico. Dependiendo de la temperatura y las precipitaciones se divide comúnmente en cinco zonas climáticas: árido, semiárido seco, templado, tropical seco y tropical húmedo (Bolaños *et al.*, 2010). La zona del trópico húmedo está compuesta aproximadamente por 24 millones de hectáreas la cual representa el 12% del territorio nacional, generalmente se encuentra localizada en los estados de Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Chiapas, Campeche y Quintana Roo. Se caracteriza principalmente por precipitaciones anuales de 1,729 mm con una temperatura promedio anual mayor a 18 °C (INEGI, 2013).

El estado de Tabasco se encuentra ubicado en la región del trópico húmedo en el sureste del país, localizado entre los paralelos 17° 19" y 18° 39" latitud Norte y 90° 57" y 94° 17" longitud Oeste. El clima predominante en esta región son abundantes lluvias en verano, con una precipitación promedio anual de 2,317.5 mm y una temperatura media anual de 27°C (INEGI, 2013).

México ocupa el octavo lugar a nivel mundial en población de ganado bovino, con un inventario de 33 millones de cabezas, y las razas que predominan son la Cebú y sus cruces con razas europeas.

cifra que corresponde al 2.2% del hato mundial. Dicha población se mantiene en una superficie de 114 millones de hectáreas, las cuales corresponden al 57% de la superficie terrestre. En las regiones árida y semiárida, se localiza el 20.3% del hato nacional; en la templada centro se aloja el 16.2%; y en la del trópico húmedo y seco, con 63.5% de la población bovina nacional (Enríquez *et al.*, 1999; Bolaños *et al.*, 2010). En el año 2012 la producción nacional de carne fue de 1,820,547 t y 10,880, 870 L de leche, de los cuales el 28.43% correspondieron al trópico húmedo, destacando los estados de Veracruz, Chiapas y Tabasco los cuales ocupan el 1º, 3º y 9º lugar respectivamente (SIAP, 2012). El estado de Tabasco representa el 3.87% de su producción anual.

La demanda en el consumo de carne y leche en el país ha estado en constante crecimiento, sin embargo la producción nacional pasó de 2.5% a 2.4% en carne (2010 y 2011) y a 4.5% en leche respectivamente (INEGI, 2011). Está claro que la productividad del país no abastece dicha demanda para los 112 millones de habitantes y por lo tanto es necesaria la importación de dichos recursos, principalmente leche en polvo. Por este motivo los insumos en la alimentación animal se incrementan, debido a los altos requerimientos de energía y proteína que los animales necesitan para su producción y mantenimiento.

Sin embargo para satisfacer las demandas del constante crecimiento demográfico, se necesita que el sistema producto carne-leche, busque nuevas alternativas de alimentos ricos en proteína y energía de origen vegetal para satisfacer los requerimientos de los animales, abaratando así los costos de producción. Un ejemplo de ello es la pasta de soya, subproducto de la extracción de aceite a la

semilla, es rica en proteína (hasta un 45%) utilizada como ingrediente básico para la elaboración de dietas en la alimentación animal (Bovinos leche, Bovinos de Carne, Ovinos, Cerdos y Aves). Dada su importancia, se incrementa el precio en el mercado de este subproducto, lo que se refleja en el incremento de los costos de producción de los sistemas donde se incluye. El efecto negativo que esto representa para los sistemas de producción ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas de recursos proteínicos–energéticos. La semilla de *C. ensiformis*, por sus propiedades y características nutritivas promete ser una opción como recurso proteico – energético puesto que contiene alrededor de 32 a 35% de proteína bruta y 40% de almidón (Valdivié *et al.*, 2006; Rincón *et al.*, 1999).

Por otro lado la población ovina está conformada por razas de pelo, destacando las razas Pelibuey y Blackbelly, debido a su nivel de adaptación biológica a las condiciones climáticas del trópico húmedo (Ross *et al.*, 1985). Las cruces de ovejas Pelibuey y Blackbelly con carneros Dorper y Katahdin también se encuentran presentes, aunque sin un programa de cruzamiento definido (Hinojosa *et al.*, 2009).

La producción de carne de ovinos con base en el pastoreo es una alternativa que resulta de baja inversión económica, pero el proceso de crecimiento, desarrollo y finalización es prolongado, de ahí que resulta necesario establecer alguna estrategia de tipo alimenticia para suplir las necesidades nutricionales de los animales a lo largo del año, manteniendo una oferta estable de materia seca, para obtener respuestas satisfactorias por parte de los animales.

Por ejemplo, en pastoreo, los corderos lactantes ganan de 0.100 a 0.140 kg d⁻¹. Sin embargo, la ganancia post-destete es menor a 0.050 kg animal⁻¹ día⁻¹, requiriéndose de 426 a 517 días para que el ovino alcance un peso vivo comercial de 30 kg (González *et al.*, 2011). A diferencia del pastoreo, el crecimiento y finalización de ovinos en estabulación con apoyo de dietas integrales, reduce los días a mercado sustancialmente. Pascual *et al.* (2009) muestran que el uso de dietas integrales para alimentar a las corderas en condiciones de estabulación es una opción que ha permitido conocer y aprovechar el potencial de crecimiento de las corderas Pelibuey en sus diferentes etapas de crecimiento (pre-destete y post-destete).

4.1.2 Importancia de los pastos en la alimentación animal

La importancia que juegan los pastos en la producción animal es determinante, ya que tienen bajo costo, son fáciles de obtener y altamente disponibles. Sin embargo, su calidad nutricional es baja, en comparación con otros recursos alimenticios, requieren del manejo agronómico o de procesos tecnológicos para elevar su valor nutritivo incrementando a su vez los costos de producción.

En el trópico la explotación de ganado bovino generalmente es a partir del pastoreo de gramas nativas. En el trópico húmedo, principalmente en el estado de Tabasco, la producción ganadera está basada en un sistema de pastoreo extensivo para una ganadería de doble propósito (Carne y Leche), con un bajo o nulo uso en el uso de cereales y complementos alimenticios. De todo esto los productores del estado de Tabasco, tienen como propósito engordar el ganado para el abasto, ya sea dentro o fuera del estado y unos cuantos se dedican a

producción de leche (zona de los Ríos y zona de la Chontalpa) para la producción de quesos frescos, ahumados, mantequillas, crema y venta de suero para la alimentación de cerdos.

El periodo que se requiere para que los animales alcancen el peso al sacrificio (400 a 450 kg) se alarga, debido a la producción estacional de los pastos, puesto que se presentan dos épocas críticas en la región (Secas y Nortes), las cuales son épocas de baja disponibilidad de forraje en las praderas, y por ende el ganado consume menos pasto, por lo que hay detrimento de las reservas del organismo del animal para llevar a cabo el proceso de mantenimiento, provocando la pérdida del peso corporal. Es por esto que algunos productores utilizan complementos de la agroindustria local y/o alimento comercial para poder contrarrestar el efecto negativo que ocasiona la época seca y de nortes (Ramos, 2005).

Los recursos forrajeros más utilizados son los nativos, primordialmente los géneros *Axonopus spp.* y *Paspalum spp.* Los cuales tienen bajo valor nutricional y poco potencial de producción. Sin embargo, se han introducido gramíneas de los géneros, *Panicum*, *Cynodon*, *Digitaria*, *Pennisetum*, *Hyparrhenia* y *Cenchrus*, *Brachiaria* y *Andropogon*, así como también algunas especies leguminosas como: *P. phaseloides*, *Clitoria ternatea*, *Arachis pintoii*, *Centrosema pubescens*, *Gliricidia sepia* y *Leucaena leucocephala*, las cuales podrían utilizarse en asociaciones con gramíneas o como bancos de proteínas (Ramos, 2005; Bolaños *et al.*, 2010; Meléndez, 2012).

4.1.3 *Canavalia ensiformis*

Canavalia ensiformis es una leguminosa, que posee un sistema radicular pivotante que puede llegar a penetrar el suelo hasta 1.50 m (Figura 1); lo cual le da la propiedad de resistir épocas de estiaje.

Esta planta es de fotoperiodo corto, de rápido crecimiento, la cual forma guías que le da la oportunidad de trepar a una altura de aproximadamente 10 m, algunas veces se presentan arbustivas, posee la capacidad de tener ciclos vegetativos anuales o bianuales dependiendo de su manejo agronómico, generalmente sus hojas son de forma elípticas, de color verde oscuro, con dimensiones que van de 10-18 cm por 6-14 cm (Figura 2).

Sus flores son de colores que van de rojo violáceo, morado o blanco el cual presentan grupos de 2 a 3 racimos, la floración se presenta 3 meses después de que se haya dado la siembra.

Las vainas de esta legumbre son por lo general largas, planas, grandes y duras, sus dimensiones van de los 15 cm hasta los 50 cm de longitud. Así mismo albergan a las semillas las cuales se deben recolectar a mano cuando éstas ya maduran, su peso individual varía de 8.2 g a 20.8 g según la especie y los genotipos, (Mariño 2007). Sin embargo, si no se cosechan a tiempo, las pérdidas pueden ser considerables debido a la dehiscencia de sus vainas.

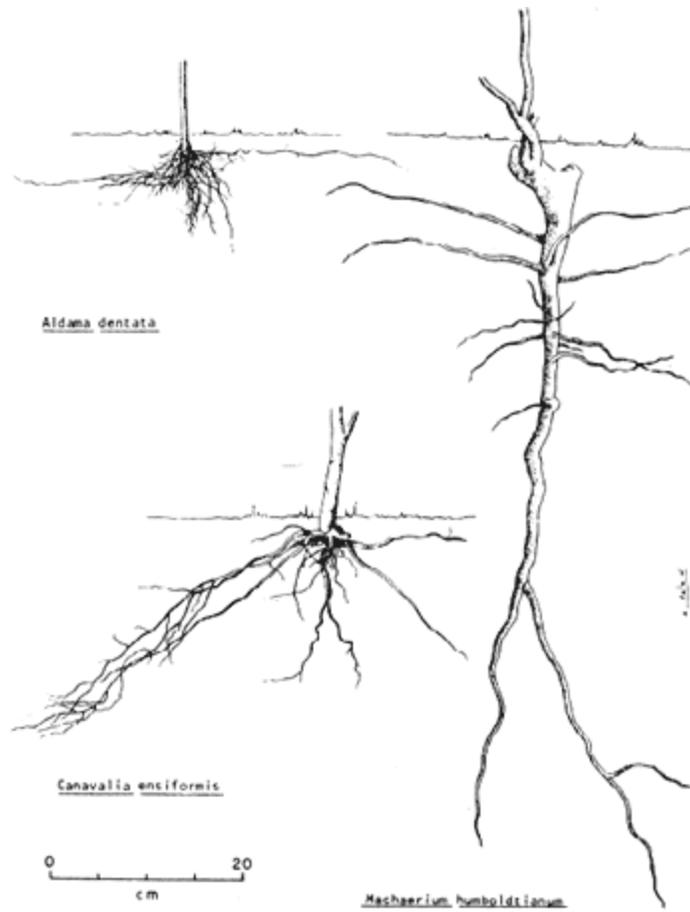


Figura 1. Sistemas radicales de *C. ensiformis*

Fuente: SIAN 2013.

Las vainas pueden llegar a contener de 8 a 20 semillas, su color puede variar desde un blanco a rosa según sea el ecotipo.



Figura 2. Cultivo de *Canavalia ensiformis* (Foto. Tomada por Elmer D. Carrillo Hernández)

Mariño (2007) menciona que la morfología de la semilla de la *Canavalia* revela importancia taxonómica, lo cual indica que el color y la forma son características que se deben considerar para separar las especies más no para separar los genotipos.

La *C. ensiformis* posee atributos agronómicos que la hacen atractiva como recurso tanto forrajero como productor de semilla. Uno de esos atributos es que es tolerante a la sombra, puede crecer desde el nivel del mar hasta los 1,800 msnm, tolera suelos con pH que oscilan entre 5 a 6 con una precipitación anual promedio de 900 a 1200 mm, aunque también es muy resistente a la sequía (BSTID, 1979; Alemán y Flores, 1993).

4.1.4 Composición química de la semilla de *C. ensiformis*

La composición proximal de la semilla de la *C. ensiformis* ha sido reportada anteriormente por otros autores (Cuadro 1). Es una leguminosa que posee propiedades benéficas en alimentación humana y animal.

Cuadro 1. Composición proximal (%) de la semilla de *C. ensiformis*.

		a	b	c	d
Proteína Cruda	(%)	30.62	27.5	26.9	31.37
Cenizas	(%)	3.1	5.4	3	2.93
Fibra Cruda	(%)	7.76	7.12	8.5	10
Grasa Cruda	(%)	1.89	4.4	3.5	1.6
ELN	(%)	52.98	55.58	--	59.6

ELN= Extracto libre de nitrógeno. a .Rajaram *et al.*, 1992; b Johnson *et al.*, 2003; c Bressani *et al.*, 1987; d Ramírez *et al.*, 1997.

El contenido de proteína cruda de la semilla de la *C. ensiformis* reportado por diferentes autores varía desde 27 a 31.4% (Cuadro 1), también presenta contenidos variables de canavanina (Cuadro 2) un aminoácido tóxico para la alimentación.

Cuadro 2. Contenido de Canavanina en harinas crudas y extruidas en *C. ensiformis*.

Harina	Canavanina (g/100g)
Cruda	4.42 ± 0.01
Cruda dializada	0.15 ± 0.01
Extruida	4.71 ± 0.07
Extruida dializada	0.15 ± 0.01

Fuente: Adaptado de Zamora (2003).

Valdivié y Elías (2006) indica que el aporte de nutrimentos de la semilla es de 40% de almidón, 2500 y 3000 kcal/kg de energía metabolizable (EM) para las aves dependiendo del tratamiento aplicado. Se considera rica en aminoácidos como lisina, treonina y arginina y pobre en aminoácidos azufrados y triptófano. Presenta también altas concentraciones del aminoácido tóxico canavalina (11.5 g/100g de aminoácidos). Zaldívar (1996) la considera una fuente importante de minerales por el alto contenido de fósforo (P) y calcio (Ca) (3.5 g/kg y 1.4 g/kg, respectivamente).

4.2 Metabolitos secundarios de la semilla de *C. ensiformis*

Los compuestos antinutricionales, son un grupo diverso de moléculas que intervienen en la adaptación de las plantas a su medio ambiente, por lo que los términos, compuestos secundarios, fitoquímicos, factores antinutricionales y xenobióticos son términos relacionados (Cab, 2011).

La calidad nutritiva de las leguminosas es afectada por la presencia de estos compuestos que tienen capacidad de producir un efecto adverso en los animales, cuando se encuentran en concentraciones elevadas.

Estos son productos del metabolismo secundario de las plantas, provocan la disminución del consumo voluntario del forraje ofertado y la utilización de los nutrientes en el tracto digestivo de los animales que la consumen (Díaz *et al.* 2002). Las manifestaciones de toxicidad de estos compuestos pueden llegar a tener un efecto hepatotóxico, neurotóxico y en casos severos hasta letal.

En un ambiente natural los metabolitos secundarios juegan un papel importante como mecanismo de defensa contra insectos y microorganismos en las plantas,

así mismo regulan el catabolismo durante la germinación o degradación de las proteínas de reserva en la maduración de la semilla, también intervienen como mediadores de la relación simbiótica *Rhizobium*–leguminosa.

Los principales compuestos secundarios que se han observado en la semilla de *C. ensiformis* y que tienen un efecto negativo, son los inhibidores de tripsina, quimotripsina, inhibidor de la α -amilasa, Hemaglutinas, factores goitrogénicos, saponinas, ácido fítico, constituyentes fenólicos (genistina y diadzina, los cuales presentan actividad estrogénica), antivitaminas A, Concanavalina A y Canavanina (Ganem y Martín, 2000; León *et al.*, 2007). De éstos, el último se considera el más importante, sin embargo, los compuestos secundarios mencionados excepto canavanina se han eliminado en un 90% o en algunos casos la totalidad de ellos por métodos tecnológicos o convencionales, logrando un mejor aprovechamiento de este recurso, en contraste, la canavanina no ha sido posible eliminarla o inhibirla con métodos comunes, puesto que para hacerlo se necesita de métodos más complejos y más caros (Celis, 2000; Zamora, 2003). Entre ellos se encuentran el tostado, malteado, extruido, peletizado que han demostrado ser efectivos en su reducción.

4.2.1 Canavanina

La *Canavanina* (ácido 2-amino-4 (guanidinooxi) butírico), es un aminoácido no proteico libre, análogo estructural de la L-arginina, es sintetizado por una gran diversidad de leguminosas. Es un aminoácido básico, posee dos grupos aminos y uno ácido, sobre una cadena lineal de carbono. Contiene dentro de la molécula el grupo guanidino.

Tiene una marcada similitud con la L- arginina, donde el grupo metileno terminal de la L-Arginina es sustituido con un oxígeno en L-Canavanina (Figura 3). El oxígeno es más electronegativo que el carbono, por lo tanto hace que sus electrones estén disponibles para reaccionar, lo que facilita la desprotonización y reduce el valor de la constante de disociación (pKa) del grupo guanidinooxi a 7.04 menor a 12.48 pKa del grupo guanidino de la arginina.

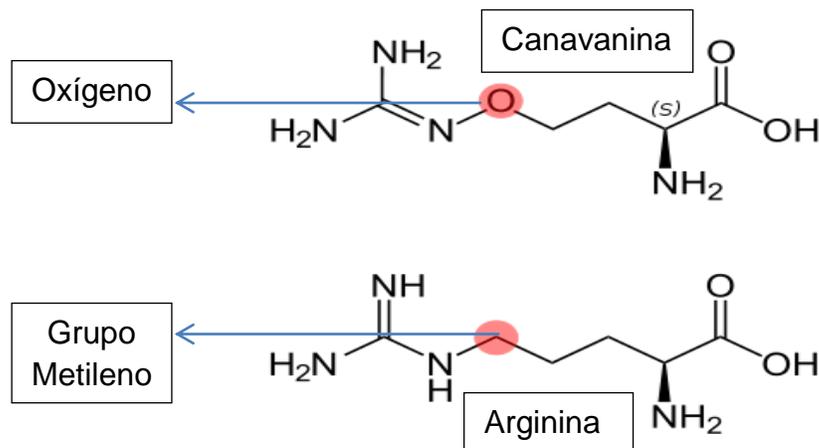


Figura 3. Estructuras químicas de la L –Canavanina y L –Arginina, mostrando la sustitución del grupo metileno con el oxígeno.

Fuente: Boyar y Marsh, 1982, Modificado por Carrillo-Hernández 2014.

Bajo condiciones fisiológicas la L-Canavanina es más aniónica que la L-Arginina, esta diferencia en la carga del grupo R de la canavanina comparado con la arginina, puede interrumpir las interacciones críticas con el grupo R dentro de una determinada proteína y afectar adversamente la forma en que la proteína se pliega en su conformación tridimensional; lo que alteraría la función de la proteína (Boyar y Marsh, 1982; Rosenthal, 2001; Andriole *et al.*, 2006).

4.2.2 Distribución de la canavanina en plantas

La Canavanina se ha encontrado en la familia de las leguminosas, en la subfamilia Papilionoideae. Está presente en el 60% de las aproximadamente 540 especies examinadas y en el 35% de 150 géneros (Turner y Harborne, 1967). Se encuentra en al menos 1500 especies de Lotoideae, una de las principales subdivisiones de las leguminosas; su aparición se limita estrictamente a este grupo de las angiospermas (Rosenthal, 1990; Ekanayake *et al.*, 2007).

Dentro de estas leguminosas destaca el género *Canavalia*, que comprende un pequeño grupo de 4 subgéneros con 51 especies (Sridhar y Seena, 2006), entre ellas se incluyen a *C. ensiformis* (L.) DC. (Sinónimo: *Dolichos ensiformis* L.), *Canavalia gladiata* (Jacq.) DC. (Sinónimo: *Dolichos gladiatus* Jacq.), *C. maritima* Thouars [sinónimo: *Canavalia lineata* (Thunb.) DC; *Canavalia obtusifolia* (Lam.) DC.; *Canavalia rosea* (Sw.) DC.; *Dolichos maritimus* Aublet; *Dolichos obtusifolius* Lam.; *Dolichos roseus* Sw] y *C. cathartica* Thouars [sinónimo: *Canavalia microcarpa* Piper (DC.); *Canavalia turgida* Graham ex A. Gray; b *Canavalia virosa* (Roxb.); *Dolichos virosus* b Roxb.; *Lablab microcarpus* DC (Udedibie y Carlini, 1998)].

Muchas leguminosas almacenan grandes cantidades de canavanina y su concentración depende de la especie y del estado de desarrollo de las plantas. En plantas jóvenes la concentración oscila de 1.3 a 2.4 % de materia seca (Rosenthal y Nokomo, 2000). Algunas especies del género *Canavalia* poseen entre 3-5% de canavanina del peso seco de la semilla (Rosenthal, 2001), tal y como se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Contenido de Canavanina en algunas especies.

Espece	Contenido de Canavanina (% en Materia Seca)
<i>C. ensiformis</i>	3-5
<i>C. gladiata</i>	3.06
<i>C. virosa</i>	2.86
<i>C. cathartica</i>	2.87- 3.27
<i>C. marítima</i>	-

Adaptado de Sridhar y Seena, 2006.

4.2.3 Síntesis y Degradación de la Canavanina en plantas

La leguminosa *C. ensiformis* es una de las pocas plantas superiores conocidas que poseen las enzimas y los intermediarios del ciclo de la ornitina-urea o ciclo de Krebs-Henseleit. Las plantas superiores no sintetizan urea para la excreción del nitrógeno, así que la urea que se forma se hidroliza rápidamente por acción de la ureasa a CO₂ y NH₃, una enzima ampliamente distribuida en plantas superiores (Follmer, 2008).

La importancia de las reacciones del ciclo de la ornitina-urea en estas plantas reside en que son el principal medio para la producción y almacenamiento de arginina y en algunas plantas, de la citrulina. La sandía (*Citrullus lanatus*), la fuente original de la citrulina, es un ejemplo de una planta superior que acumula en las hojas, concentraciones significativas de este metabolito secundario (Rosenthal, 1972).

Por otro lado, la ornitina es otro constituyente importante en las plantas, dado que es el precursor de la prolina, además de que puede servir como fuente del ácido glutámico e intervenir en la síntesis de poliaminas (Thompson, 1980).

Ciertas leguminosas, entre ellas, *Canavalia*, sintetizan canavanina, de una forma similar a la biosíntesis de la arginina (Figura 4). La presencia de este metabolito en las semillas de *Canavalia* y su aparente restricción a la familia de las leguminosas, sugiere que su biosíntesis podría estar directamente o indirectamente asociada con la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno en los nódulos de las raíces de esas plantas (Fearon y Bell, 1955).

La canavanina se encuentra presente en el cotiledón y el embrión de las semillas secas y está ausente en la cubierta de la semilla. Funciona como la mayor fuente de almacenamiento del nitrógeno en las semillas (representa cerca del 95% del nitrógeno encontrado en los aminoácidos libres) y pudiera proveer de una ventaja adaptativa a las plantas (Rosenthal, 2001).

La biosíntesis de la canavanina ha sido estudiada en *C. ensiformis* por autores como Naylor (1956); Rosenthal (1970) y (1971); Downum *et al.*, (1983).

El metabolismo de la canavanina involucra una fase de síntesis que incluye una secuencia de reacciones que van desde la canalina y que culmina con la biosíntesis de la canavanina (Rosenthal, 1982).

Mientras que la fase degradativa combina la acción hidrolítica de las enzimas arginasa y ureasa, las que movilizan el nitrógeno desde el grupo guanidinooxi de la canavanina mediante una transferencia secuencial de la canalina, urea y eventualmente a CO_2 y NH_3 (Figura 4).

La síntesis y los pasos de degradación de la canavanina son similares a la de la arginina en plantas superiores (Rosenthal, 1982). En el ciclo de Krebs-Henseleit, la formación de canavanina (o arginina) a partir de la canalina (u ornitina) involucra la formación de los intermediarios O-Ureidohomoserina (o citrulina) y del ácido canavaninosucínico (o ácido argininosucínico) (Figura 4) (Rosenthal, 1982).

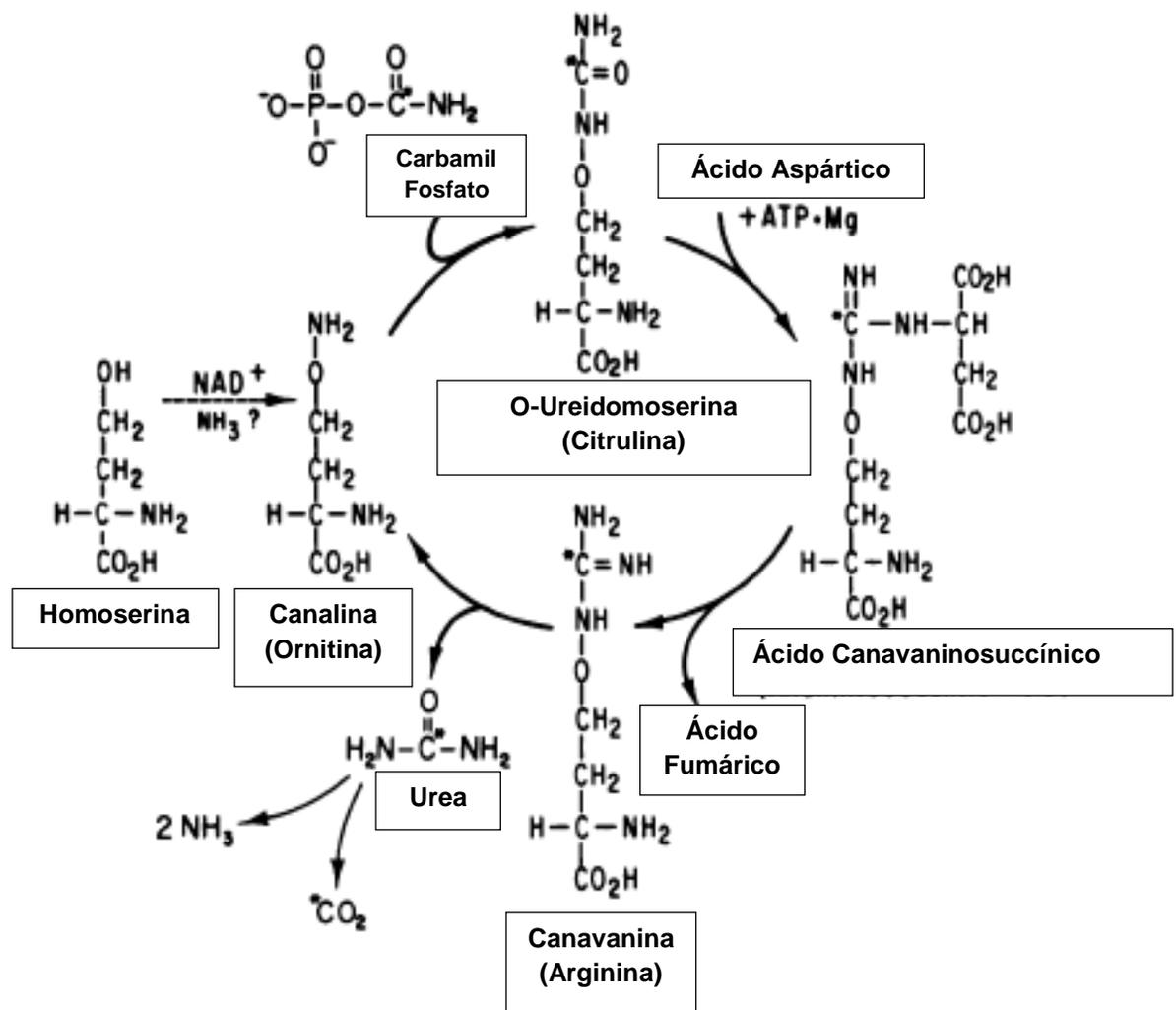


Figura 4. Ruta metabólica de la Canavanina en semillas de *C. ensiformis*.

Fuente: Rosenthal, 1982. Modificado por Carrillo-Hernández, 2014.

La formación del O-ureidohomoserina a partir de la canalina y la condensación del Fosfato de carbamilo, es catalizada por la enzima Ornitina carbamoil transferasa (EC 3.1.3.3). Esta enzima ha sido aislada y purificada de hojas de 11 días de edad en *Canavalia* (Hwang *et al.*, 1996). La canavanina acumulada o suplementada exógenamente es utilizada como una fuente de nitrógeno y carbono, por la acción combinada de la enzima arginasa (EC 3.5.3.1) y la canalina reductasa (EC 1.6.6.) (Rosenthal, 1970, 1992; Hwang *et al.*, 1996a).

La siguiente fase del ciclo involucra una reacción de condensación entre la O-ureidohomoserina y al ácido aspártico (Figura 4), acoplada a la hidrólisis del ATP y que es catalizada por la canavaninosuccinato sintetasa (EC 6.3.4.5): Los productos de la reacción son el ácido cavaninosuccínico y el AMP y el PPI. (Rosenthal, 1982; Hwang *et al.*, 1996a; Hwang *et al.*, 1996b).

Posteriormente el ácido cavaninosuccínico por acción de la canavaninosuccinato liasa (EC 4.3.2.1.), se convierte en la L-*canavanina* mediante la remoción del ácido fumárico y la formación de un doble enlace en el carbono del grupo guanidinooxi (Rosenthal, 1982; Hwang *et al.*, 1996a).

En la siguiente etapa de la reacción, la L-*canavanina* es convertida en canalina y urea, mediante la acción combinada de reacciones de hidrólisis, catalizadas por la arginasa (EC 3.5.3.1) y la ureasa (EC 3.5.1.5), degradando esta última enzima a la urea hasta CO₂ y NH₃, obteniéndose de esta forma una fuente importante de nitrógeno reducido, que es asimilado e incorporado dentro del nitrógeno del grupo amido de la asparagina (Rosentahl, 1982). Por último, la L-canalina puede

reaccionar con el fosfato de carbamilo e iniciarse nuevamente la síntesis de la canavanina (Figura 4).

La canavanina es sintetizada en las vainas y transportada a las semillas. Su movilización y utilización en *Canavalia* ocurre a través de la arginasa (EC 3.5.3.1), una enzima que ha sido encontrada en las hojas, y que convierte la L-canavanina en L-canalina y urea (Ronsenthal, 1982). Posteriormente la urea es hidrolizada por la ureasa (EC 3.5.1.5), que también ha sido encontrada en las hojas de la misma planta, hasta CO_2 y NH_3 (Figura 4). El NH_3 , representa una fuente importante de Nitrógeno reducido que es asimilado e incorporado dentro del nitrógeno del grupo amido de la asparagina (Rosenthal y Rhodes, 1984).

Ornitinatranscarbamilasa media la formación de O-ureidohomoserina a canalina y carbamilo fosfato. Esta enzima ha sido ampliamente purificada a partir de hojas. Se ha sugerido que las vías metabólicas que culminan en la síntesis de ciertos aminoácidos no proteicos podrían reflejar sutil alteración en el genoma responsable de dirigir la formación de aminoácidos importantes. La mayoría de las especies de plantas leguminosas poseen las enzimas del ciclo de la ornitina-urea, proporcionando así un mecanismo para la biosíntesis de la arginina, un elemento esencial para una gran variedad de productos vegetales (Rosenthal, 1972).

Whiteside y Thurman (1971) sugieren que durante la germinación del cotiledón el carbono guanidoxy de la canavanina aparece como urea, que es luego convertido en CO_2 y NH_3 a través de la acción de la ureasa. Este esquema proporciona un medio por el cual el cotiledón podría convertir el nitrógeno de la canavanina en nitrógeno amoniacal que podría entonces ser asimilado en aminoácidos.

4.2.4 Efectos de la canavanina en plantas, en animales y humanos

La canavanina es un importante compuesto de almacenamiento de nitrógeno en las semillas de muchas plantas de la familia de las Leguminosas. La L-canavanina puede ser utilizada por *C. ensiformis* de una manera bastante eficiente, tanto para reacciones respiratorias, rendimiento de energía y para el reciclaje de nitrógeno para producir metabolitos primarios de plantas. Juega un papel importante como agente secuestrante del nitrógeno presente en la planta para el crecimiento del embrión donde el contenido de nitrógeno es elevado (31.8%) (Pizzani *et al.*, 2006).

Es un análogo y antimetabolito de la L-arginina y es altamente tóxico para una amplia gama de organismos, incluyendo bacterias, hongos, levaduras, algas, plantas, insectos, y mamíferos (Zaldívar, 1996; Sívoli *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2011) y es probablemente el aminoácido no proteico mejor estudiado en la defensa de la planta contra los insectos.

Algunos insectos que son sensibles a este compuesto, han desarrollado la capacidad para detectar y evitar el consumo de este aminoácido tóxico, como por ejemplo *Drosophila melanogaster*, en el cual el reconocimiento de canavanina es seguida por una respuesta de evitación de comportamiento que depende de un mecanismo quimio sensorial funcional detectado por receptores específicos. Este antagonista de arginina reduce marcadamente el crecimiento de larvas, pupas y adultos, además provoca diuresis severa. Por lo general, las larvas tratadas con *canavanina* y que sobreviven a los estadios larvales, muere en un intento inútil de la metamorfosis de pupa-adulto o las partes del cuerpo de los adultos presentan malformaciones para ser funcionales (Rosenthal, 2001).

La canavanina manifiesta efectos antimetabólicos en plantas y animales mediante su inserción en el núcleo de la célula y otras proteínas, interfiriendo con la síntesis de ADN y ARN. Es así que la mayoría de la regulación catalítica de metabolismo de la arginina, para su captación y formación de componentes estructurales y otros procesos celulares son imitados. Además, induce la formación de proteínas no funcionales en una variedad de organismos (inhibe el procesamiento proteolítico de varias proteínas), lo que afecta a la secreción de proteínas de plasma, en los macrófagos, polimorfonucleares y leucocitos, es capaz de prevenir la síntesis de L-arginina derivado del óxido nítrico (Lon-Wo, 2007).

Todas estas propiedades se deben al favorecimiento del desarrollo del genoma para la síntesis y el almacenamiento de canavanina, sin duda, por la similitud estructural que existe entre canavanina y la arginina. Esto se debe principalmente por la reducción apreciable en la basicidad de canavanina relativa a la arginina que se logra mediante la sustitución de un grupo metileno terminal con el oxígeno. Por lo que al combinarse estos factores se crea un antimetabolito que proporciona un alto nivel de eficacia en defensa contra una amplia gama de depredadores y plagas (Rosenthal, 2001).

En animales ha mostrado tener numerosos efectos perjudiciales tras el consumo de legumbres que contienen *canavanina*, por ejemplo, disminuye la ingesta de alimentación y el crecimiento, una reducción significativa en la concentración plasmática de aminoácidos básicos y una reducción de la arginina en plasma, lisina e histidina. Otro de los efectos usando harinas de semillas de *Canavalia* en la alimentación de animales monogástricos (cerdos y aves principalmente) es la

reducción del consumo voluntario y la ganancia de peso, la digestibilidad ileal y fecal de la materia seca, nitrógeno, aminoácidos y FDN (Michelangeli *et al.*, 2004a, 2004b). En rumiantes se ha observado el incremento de protozoarios flagelados y la disminución de la población microbiana, cuando se utiliza harina de *Canavalia* cruda, la cual afecta la fauna ruminal de los animales en pastoreo (Sandoval-Castro y Herrera, 2001).

En la actualidad, la L-canavanina está siendo probada como un medicamento potencial contra el cáncer, debido a su toxicidad para las células cancerosas humanas, probablemente a través del aumento de los efectos pro-apoptóticos de la privación de L-arginina en las células cancerosas humanas cultivadas (Ekanayake *et al.*, 2007).

4.3 Usos de *C. ensiformis*

Esta especie se ha utilizado en los países de Suramérica en asociaciones con el cultivo de maíz, así como también en monocultivo, y como mejorador de suelo, logrando fijar hasta 81.7 kg N ha⁻¹ (Martín *et al.*, 2007).

Jiménez *et al.* (2005), encontraron que el rendimiento de forraje verde disponible (FVD) en *Canavalia* fue de 43.18 t ha⁻¹ corte, en maíz de 39.23 t ha⁻¹ y para la asociación maíz-*Canavalia* de 47.27 t ha⁻¹ corte, mientras que la producción de MS fueron de 45.64, 47.88 y 49.64 t ha⁻¹ año para maíz y *Canavalia*, respectivamente. También indicaron que la asociación leguminosa-maíz mejoró la PC y FDN en forraje verde y ensilaje en comparación con el maíz. Otros posibles usos que están tomando auge son las asociaciones con plantaciones de cacao,

caña de azúcar, piña, tabaco y coco (BSTID, 1979; Villanueva–Avalos *et al.*, 2010).

4.3.1 Métodos utilizados para disminuir los compuestos secundarios en *C. ensiformis*

Los métodos más utilizados para contrarrestar el efecto negativo que tienen los compuestos secundarios de la semilla de *Canavalia ensiformis* han sido el tostado, peletizado, malteado, remojo en solución salina, extruido y fermentado (Udedibie, 2001, Centurión, 2005; Sivolí, 2005; Valdivié, 2006).

4.3.2 Tostado

El método de tostado consiste en hacer pasar la harina a través de una cámara térmica con la ayuda de un tornillo sin fin acoplado a un motor de varios ciclos de revoluciones, controlado manualmente por un selector de revoluciones (reóstato). Este mismo dispositivo también permite controlar con precisión el tiempo de tostado de las harinas. Las condiciones de tostado son temperaturas por arriba de los 150°C y tiempos variables (Sivoli *et al.*, 2004).

En un estudio realizado por Michelangeli *et al.* (2004), las semillas de *C. ensiformis* se sometieron a diferentes temperaturas (187 °C, 177 °C, 184 °C, 194 °C y 198 °C) y demostraron que la utilización del tostado de la semilla reduce el contenido de *canavanina*, pero con incrementos en la fracción de fibra cruda, indicando que éste método tiene potencial para mejorar el valor nutritivo de las semillas de *Canavalia*.

En tanto que Pizzani *et al.* (2006) evaluaron el tostado sobre el valor de la energía metabolizable, y el contenido de Concanavalina A y *canavanina* en harinas de semillas de *Canavalia*, sus resultados mostraron que al someter las semillas a temperaturas de 180 °C, 200 °C, 220 °C, 230 °C y 240 °C, no hubo hemoaglutinación debido a la Concanavalina A y la canavanina fue reducida hasta un 90% en relación con el contenido de la harina cruda. No observaron efecto de los tratamientos de temperatura aplicadas sobre el valor de la energía metabolizable. Concluyeron que el tostado puede reducir sustancialmente ($p \leq 0.05$) el contenido de estos factores antinutricios de las harinas de *Canavalia*.

4.3.3 Peletizado

Este es uno de los procesos tecnológicos más utilizados en la industria de la alimentación animal, tiene una característica particular, donde tres aspectos fundamentales juegan un papel muy importante: el calor que se genera en el proceso, la inyección de vapor y la presión ocasionada le dan al alimento una conversión de compactado, la cual tiene como objetivo tres funciones: concentrar nutrientes, mejorar la textura y reducir las contaminaciones. Sin embargo este procedimiento presenta inconvenientes puesto que al exponer el alimento a altas temperaturas durante determinado tiempo, se inactivan vitaminas y otros aditivos, también ha mostrado mejorar los valores de digestibilidad del almidón de la canavalia, sin embargo los aminoácidos y el contenido de energía metabolizable no fueron favorecidos (Lon-Wo, 2007).

4.3.5 Malteado

El proceso de malteado de *C. ensiformis* consiste en la germinación controlada de la semilla, la cual libera cantidades de enzimas capaces de convertir el almidón en azúcares fermentables. Centurión y Espinosa (2005) encontraron que al germinar la semilla de canavalia la concentración de canavanina se redujo un 25% (3.40 a 2.55 g/100g antes y después de la germinación, respectivamente). Posteriormente se secaron las semillas germinadas y se encontró que la concentración de *canavanina* fue de 2.27 g/100g, esto es 33% menos que la cantidad inicial de la semilla. Sin embargo, estos investigadores indican que el proceso de malteado incrementa el costo de energía eléctrica durante el secado, tostado, extrusión y peletizado.

4.3.6 Extruido

Este tipo de técnica, se emplea generalmente para el procesado de cereales y proteínas destinados a la alimentación humana y animal. Se trata de un proceso que opera de forma continua, de gran versatilidad y alto rendimiento productivo. El proceso de extrusión de alimentos es una forma de cocción rápida, continua y homogénea. Mediante este proceso mecánico de inducción de energía térmica y mecánica, se aplica al alimento procesado a alta presión y temperatura (en el intervalo de 100-180°C), durante un breve espacio de tiempo. Como resultado, se producen una serie de cambios en la forma, estructura y composición del producto. Debido a la intensa ruptura y mezclado estructural que provoca este proceso, se facilitan reacciones que, de otro modo, estarían limitadas por las características difusionales de los productos y reactivos implicados. El proceso

consiste en forzar el paso del alimento a través de una boquilla para obtener un producto de sección transversal constante y en principio de longitud indefinida. Como se aprecia en la Figura 5, el equipo consta de un extrusor de husillo (tornillo o husillo) y consiste en un cilindro largo rodeado por un filete helicoidal. Su función principal es transportar, calentar, fundir y mezclar el material, por lo que el material se presuriza a medida que avanza por el tornillo utilizado, generalmente para estos procesos.

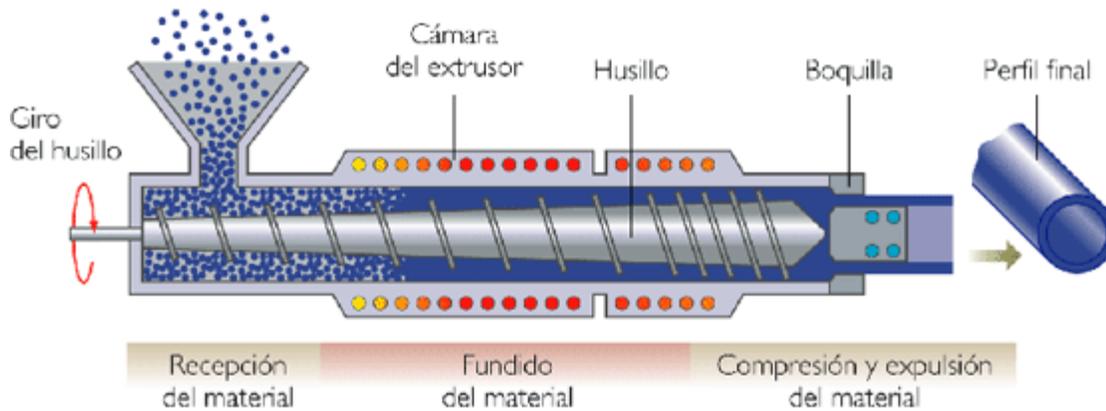


Figura 5. Representación esquemática de una extrusora de husillo.

Tomado de: tecnologia-informatica.es

La evaluación del efecto de extrusión en semilla de *Canavalia* realizada por Zamora (2003), a 155 °C con 20% de humedad una velocidad de husillo de 75 rpm con una capacidad de alimentación de 205 g/min, mejoró la digestibilidad proteica *in vitro* de 57.5% a 89.5%, y redujo en un 95% la actividad de inhibidores de proteasas (tripsina y quimotripsina) así como la actividad inhibitoria de la α -amilasa. La actividad hemoaglutinante fue eliminada totalmente como respuesta a

la alta temperatura empleada durante el proceso de extrusión. Sin embargo el contenido de canavanina no fue afectado por el efecto de extrusión.

4.4 Fermentación en estado sólido

La fermentación es una técnica biológica aplicada desde la antigüedad, la cual ha sido explotada para la producción de alimentos para animales, combustible y enzimas. El proceso de fermentación se puede dividir en fermentación líquida sumergida (FLS) y fermentación en estado sólido (FES). La principal diferencia que existe entre estos dos procesos biológicos es la cantidad de agua disponible en el alimento. En la FLS la cantidad de sólidos no pasa de 50% y la FES solo varía hasta un 70%, o bien el cual tiene un contenido bajo en humedad (12%) y el cual ocurre en estado aséptico y natural. La FES produce una alta concentración de producto con un relativamente bajo requerimiento energético (Robinson *et al.*, 2002; Ramos, 2005).

La FES puede llevarse a cabo sobre una variedad de residuos agrícolas, tales como paja de trigo, cascarilla de arroz, maíz y caña de azúcar. Ramos (2005) la define como una transformación de una sustancia orgánica (azúcares o carbohidratos) en otra utilizable mediante un proceso metabólico por la acción de las enzimas de los microorganismos presentes en el sustrato, mismas que pueden ser producidas por bacterias, hongos y levaduras. En el Cuadro 4 se muestran las bacterias presentes en alimentos fermentados.

Cuadro 4. Bacterias ácido lácticas en alimentos fermentados

Homofermentativas	Homofermentativas facultativas	Heterofermentativas
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Lactobacillus bavaricus</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. buchneri</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>L. coryniformis</i>	<i>L. cellobiosus</i>
<i>L. lactis</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. confusus</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. coprophilus</i>
<i>L. leichmannii</i>	<i>L. sake</i>	<i>L. fermentatum</i>
<i>L. salivarius</i>		<i>L. sanfrancisco</i>
<i>Streptococcus bovis</i>		<i>L. dextranicum</i>
<i>S. thermophilus</i>		<i>L. mesenteroides</i>
<i>Pediococcus acidilactici</i>		<i>L. paramesenteroides</i>
<i>P. damnosus</i>		
<i>P. pentosaceus</i>		

Beuchat (2008).

La fermentación en estado sólido (FES) es un proceso mediante el cual ocurren cambios microbiológicos en las partículas del sustrato, con una cantidad mínima de líquido disponible para que ocurran las reacciones químicas necesarias en las células de los microorganismos. La FES ha mostrado ser un proceso prometedor para el desarrollo de bioprocesos y productos que pueden ser obtenidos por este método. Estos productos pueden ser metabolitos secundarios tales como; Actinorhodina, metilenomicina, aflatoxina, antibiótico, endotoxinas bacteriales, cefalosporinas, alcaloides del ergot, ácido giberélico, iturina, micotoxina, oxitetraciclina, penicilina, intermediarios de esteroides, surfactina, tetraciclinas, clorotetraciclinas, zearalenona. Entre las ventajas que puede tener la FES sobre otros métodos de procesamiento se encuentran la mayor productividad, simplicidad de la técnica, menor costo de inversión, reducción del consumo energético, menor volumen de aguas residuales producidas y ausencia de problemas producidos por espuma. Los sustratos comúnmente utilizados son el salvado de trigo, granos de

cereales, las leguminosas, la madera y la paja. La importancia de la fermentación microbiana de leguminosas y mezclas de leguminosas con cereales mejora sustancialmente el valor biológico de estos productos debido a la disponibilidad de proteínas, carbohidratos, aminoácidos, vitaminas del complejo B y minerales. Así como también la digestibilidad y la utilización de los nutrientes. En tanto que este proceso ayuda a eliminar elementos tóxicos como fitatos, inhibidores de proteasas, factores de flatulencia y lectinas (Zaldívar, 1996; Robinson *et al.*, 2002; Ramos, 2005).

Con base en estos principios se han realizado diversos estudios para disminuir los compuestos secundarios en *C. ensiformis*. Valdivié *et al.* (2006), lo aplicó en pollos de engorda, utilizando la Sacchacavalía como dieta base. Los tratamientos consistieron en una dieta control, una dieta con 10% de grano y una dieta con el 20% de Sacchacavalía el cual aportaba el 10% del grano fermentado. Sus resultados mostraron que el tratamiento con el 10% de Sacchacavalía redujo el consumo de alimento en 6.19%, la ganancia de peso vivo en 16.17% y empeoró la eficiencia alimenticia en 290 g más de alimento por cada kg de incremento de peso vivo, con relación al control. Con el aporte del 10% de Sacchacavalía se mantuvo reducido el consumo de alimento (6.30%) con relación al control, la ganancia de peso vivo no se afectó menos del 7.4% y la conversión alimenticia no se alteró, por lo que sugirieron que la FES de la *Canavalía* puede ser promisoría para contrarrestar los efectos adversos de los compuestos secundarios.

Por otro lado con la fermentación en estado sólido y el uso de microorganismos específicos se ha logrado modificar tanto la composición proximal y compuestos

secundarios de la *C. ensiformis*, con la finalidad de obtener un producto mejorado para la alimentación. Gabriel *et al.* (2011) mejoraron la calidad nutritiva de *C. ensiformis* al inocular con *Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Penicillium italicum* y *Rhizopus oryzae*, los cuales mejoraron el contenido de proteína (26.21 g 100⁻¹ a 33.51 g 100⁻¹), la composición mineral mostró un aumento (30.07, 18.51 y 23.51, magnesio, sodio y potasio, respectivamente) y el contenido de *canavanina* disminuyó (0.79 mg g⁻¹ (control) a 0.53 mg g⁻¹, respectivamente). Por lo que es notable que la utilización de microorganismos, pueden llegar a mejorar la calidad nutricional de *C. ensiformis*.

4.4.1 Vitafert

Es un producto biológico obtenido por fermentación en estado líquido, que se compone a su vez de bacterias lácticas, levaduras y sus metabolitos que funciona como Probiótico. Estas bacterias lácticas y levaduras son capaces de producir cantidades apreciables de ácidos orgánicos de cadena corta (ACC) como láctico, acético, propiónico, succínico y pirúvico, vitaminas y enzimas. Es elaborado a partir de yogurt, melaza, agua, minerales y otros ingredientes. Además funciona como activador de la fermentación estimulando la producción de ácidos orgánicos, disminuye el pH, incrementa y estabiliza la proteína, aumenta la digestibilidad de la materia seca y disminuye las fracciones de la pared celular de la materia prima alimentaria sometida a su acción. La composición química y microbiológica del producto incluye concentraciones de levaduras y lactobacilos, que oscilan entre 10⁷-10⁸ ufc, respectivamente, y de 450-600 mmol L⁻¹ de ácido láctico y 225-230 mmol L⁻¹ de ácido acético (Cadena, 2010; Gutiérrez *et al.*, 2012).

4.5 Técnicas utilizadas para determinar Canavanina

Para estudiar la eficacia de los tratamientos para destoxificación y el efecto metabólico de la *canavanina* en animales o plantas se requieren de métodos sensibles, específicos y rápidos de análisis. El método más común de análisis de *canavanina* se basa en la formación de un compuesto cromóforo por reacción con pentaciaminoferrato y su posterior detección por espectrofotometría. El método es criticado por carecer de especificidad y umbral elevado de sensibilidad, por lo que se ha recurrido a técnicas más precisas y costosas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Capetillo *et al.*, 1999).

V. MATERIALES Y METODOS

El presente estudio se realizó en los Laboratorios de Ciencia Animal y de Ciencia de los Alimentos del Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. Los cuales se ubican en el km 3.5 Periférico Carlos A. Molina s/n, Carretera Cárdenas-Huimanguillo.

5.1 Obtención de la materia prima.

La semilla de *C. ensiformis* fue proporcionada por el Dr. José Manuel Piña Gutiérrez, propietario del rancho "EL RODEO" ubicado en el municipio de Jalapa Tabasco entre las coordenadas 17° 50' 39.9" Latitud Norte y 92° 48' 57.9" Longitud oeste. La cosecha de la semilla se realizó en agosto del 2012, en una superficie de 1 ha. La plantación de canavalia se encontraba en un suelo Luvisol Crómico (LVcr), denominado como tierra roja o barro colorado (Palma-López, 2006), con pH de 6. La cosecha, el manejo agronómico y las labores culturales que recibió el cultivo se indican a continuación:

5.2. Manejo agronómico y labores culturales del cultivo.

Preparación del terreno: tiene el propósito de garantizar la germinación de la semilla y un buen desarrollo de la planta. Primero se chapeó para controlar las malezas, después se barbechó a una profundidad de 25 cm para exponer las plagas a control biológico. Cinco días después se dieron tres pasos de rastra cruzados con el propósito de homogenizar el suelo.

Siembra: se realizó 15 días después de la preparación del terreno, esta actividad se llevó a cabo manualmente a espeque depositando dos semillas por golpe a una profundidad de 3 cm, se utilizaron 20 kg de semilla por hectárea.

Control de maleza: para contrarrestar el crecimiento de arvenses se realizó una control antes de la siembra con herbicida Faena® al 1 % (un litro de producto comercial en 100 L de agua). Después establecido el cultivo, se realizaron dos deshierbes con azadón a los 30 y 60 días postsiembra.

Control de plagas y enfermedades: no se presentaron plagas o enfermedades que tuvieran un efecto económico por daño al cultivo, por lo tanto no fue necesaria la aplicación de pesticidas durante la fase de desarrollo y de producción del cultivo.

Fertilización: durante el crecimiento del cultivo, se fertilizó con una dosis de 4 g de urea y 8g de superfosfato de calcio triple/planta que corresponde a una fórmula de fertilización 40-80-00, a los 30 días de la siembra, la aplicación fue manual alrededor del tallo de la planta.

Aporque: al momento de la fertilización se aprovechó para realizar el aporque de las plantas, y evitar el acame e inducir un buen desarrollo del sistema radicular.

Colocación de espalderas: las balizas fueron puestas cada 3 m a los extremos de cada surco, las cuales se ataron con rafia sirviendo como espalderas; la altura de cada espaldera fue de 60 cm, después se colocó otro a 1 m del nivel del suelo. La función principal de las espalderas es evitar que tanto las guías como la planta

se acamaran, evitando la pérdida de las semillas o las dehiscencias de sus vainas una vez que entraran en contacto con el suelo.

Cosecha: esta actividad se realizó entre los 6 y 7 meses de edad de la planta. Para determinar el momento óptimo de cosecha se observó el cambio en la coloración de las vainas, las cuales de verdes se tornaron a un color amarillo-café, o bien amarillo-limón. La cosecha fue manual.

Después de la cosecha, fueron secadas en un cobertizo donde estuvieron expuestas al sol y después fueron encostaladas y apiladas para su almacenamiento. A los 6 meses de haberse almacenado, se tomaron 25 kg como muestra representativa de cada componente: vainas completas, pericarpio y semilla. El pericarpio fue la vaina sin semilla.

5.2.1 Procesamiento de la materia prima.

Los componentes obtenidos fueron sometidos a procesamiento físico para el molido y homogenización de las muestras. El molido se realizó con Molino picadora M300 (Figura 6) con criba de 12 mm y en una segunda ocasión con criba de 6 mm. Para homogenización del tamaño de partículas, se procedió a moler 5 kg de cada componente en un molino de tracción con criba de 2 mm.



Figura 6. Molino Picadora, utilizado para moler las muestras.

5.2.2 Tratamientos y Diseño experimental

Se utilizó un arreglo de tratamientos factorial considerando como factor A los componentes de la *C. ensiformis* (Semilla, Pericarpio y Vaina completa), y como factor B el tratamiento físico (Extruido), biológico (Fermentado) y el testigo, resultando los tratamientos: (T1) Semilla molida, (T2) Pericarpio molido, (T3) Vaina completa molida (T4) Semilla fermentada, (T5) Pericarpio fermentado, (T6) Vaina completa fermentada (T7) Semilla extruido, (T8) Vaina extruido, (T9) Vaina completa extruido .los cuales generaron 27 unidades experimentales.

5.3.1 Elaboración del Vitafert. Para la elaboración del Vitafert se utilizó la metodología descrita por Cadena (2010), utilizando los siguientes ingredientes (Cuadro 6).

Cuadro 5. Ingredientes utilizados y porcentaje de inclusión para elaborar el Vitafert.

Ingredientes	Inclusión
	%
Melaza	15
Pasta de soya	4
Pulido de arroz	4
Sales minerales	0.5
Sulfato de magnesio	0.3
Urea	0.4
Yogurt	5
Agua	70.8
Total	100

5.3.1.1 Preparación del inóculo

Se elaboraron 10 L de Vitafert en 1 cubeta de plástico limpia con capacidad de 20L de acuerdo al Cuadro 6. La pasta de soya y el pulido de arroz se compraron en la empresa ALBACA S.A de C.V. La urea y el sulfato de magnesio se adquirieron en la empresa de Fertilizantes y Productos Agropecuarios (FYPA) S.A. de C.V. Los minerales usados fueron de la marca FOSFORYSAL 70C la cual contiene según la etiqueta mínimo 70 g/kg de fósforo, 4 g/kg de zinc, 15 g/kg de

hierro, 0.45 g/kg de cobre, 0.01 g/kg de iodo, 140 g/kg de calcio, 10 g/kg magnesio, 4 g/kg de manganeso, 0.02 g/kg de cobalto y 300 g/kg máximo de sal, además de melaza de caña y salvado de trigo. Se utilizó como inóculo de bacterias lácticas al yogurt natural y para completar el 100% se agregó agua. (Figura 7).



Figura 1. Elaboración del Vitafert.

5.3.1.2 Proceso de Fermentación de *C. ensiformis*

Después de obtener el Vitafert se preparó 1 kg de cada muestra previamente molida con tamaño de partícula de 2 mm, al cual se le aplicaron los ingredientes que se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 6. Ingredientes utilizados para fermentar *C. ensiformis*.

Ingredientes	% de inclusión
Urea	0.3
Melaza	10
Minerales	0.5
Sulfato de magnesio	0.3
Vitafert	12
<i>C. ensiformis</i>	76.9

Después de haber combinado todos los ingredientes con las muestras de *C. ensiformis*, estas se dejaron fermentar en charolas de plástico y se monitoreó el pH durante 5 días hasta que se mantuvo en 3.5, que es un indicador de una buena fermentación (Figura 8).



Figura 7. Semillas de *C. ensiformis* fermentadas.

5.3.2 *Canavalia ensiformis* extruida

Para el tratamiento de extruido, las muestras fueron llevadas al rancho el “RODEO” y se utilizaron 10 kg de cada componente de *C. ensiformis* (semilla, Pericarpio y Vaina completa).

Para los tratamientos de extrusión se utilizó un extrusor prototipo diseñado en proyecto CONACYT (Extrusor prototipo, marca CIATEQ, motor 50 HP, 150 revoluciones por minuto, 50 MPa de presión y 150 °C de temperatura); compuesto por un usillo y camisa adaptada a un alimentador. La capacidad de extrusar es de poco más de 1 t d⁻¹ (Figura 9).



Figura 9. Extrusor utilizado (Foto. Elmer D. Carrillo Hernández)

5.4 Composición química proximal

Se determinaron las siguientes variables proximales; Materia seca (MS), Ceniza, Proteína cruda (PC) y Extracto Etéreo. Para la determinación de estas variables, se utilizaron las metodologías propuestas por la AOAC (2000).

5.5 Fibra en solución detergente neutro (FDN) y Fibra en solución detergente ácido (FDA)

Para la estimación de estas variables se utilizaron bolsas de tela nylon (5 x 10 cm) a las cuales se les agregaron 0.4 g de muestra por tratamiento, previamente molidas y sometidas a estufa de aire forzado 65 °C para mantener peso constante. Posteriormente, fueron selladas y se sometieron a la acción del detergente neutro y ácido utilizando la metodología propuesta por Van Soest (1991).

5.6 Degradación *in situ* de la materia seca (DMS)

Para determinar la variable de la DMS se procedió a utilizar la metodología descrita por Orskov (1992). Estas se incubaron a 24 y 48 horas. Se pesaron 5 g de muestra con tamaño de partícula de 2 mm y previamente secadas en estufa de aire forzado a una temperatura de 65 °C para obtener peso constante. Estas se colocaron en bolsas de poliseda (10 x 20 cm) y se incubaron respectivamente en dos toros fistulados cruzados (cebú x europeo). No se incubaron tratamientos que incluyeran semillas en el horario de 48 horas, puesto que hay trabajos que demuestran que el contenido de almidón de semillas de leguminosas se degradan dentro de las 16 y 24 horas posterior al haberse incubado (datos no publicados). Una vez finalizada la incubación, las muestras fueron retiradas y lavadas con agua corriente hasta que se eliminó todo el residuo. Posteriormente fueron colocadas en una estufa de aire forzado a 65°C durante 48 horas para tener peso constante. Al

final se pesaron y por diferencia de peso se determinó la DMS, mediante la siguiente fórmula:

$$DMS = \frac{PI - PF}{PI} \times 100$$

Dónde:

PI= peso inicial de la muestra

PF= peso final obtenido

DMS = Degradación de la MS

5.7 Determinación de *Canavanina*

Para determinar la concentración de *Canavanina* se utilizó la metodología propuesta por Makkar *et al.* (2007). El método está basado en la reacción del grupo guanidoxy (-O.NH.C(:NH).NH₂) de la *canavanina* con pentacianoaminoferrato trisódico en solución acuosa a pH 7.0, con la formación de un color magenta – cromóforo de color. La absorbancia del color formado se mide a 520 y 530 nm (ver anexo).

5.8 Diseño experimental y análisis estadístico

El modelo estadístico empleado para el análisis de los datos establecidos en el experimento factorial 3 x 3 bajo un diseño completamente al azar fue:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + C_k + (ABC)_{ijk} + (AC)_{ik} + (BC)_{jk} + \epsilon_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk} = Valor de las características observadas

μ = Media general

A_i = Efecto del factor A al nivel i, correspondiente a la *Canavalia* no fermentada

B_j = Efecto de la fermentación al nivel j

C_k = Efecto de la extrusión C al nivel K

$(ABC)_{ijk}$ = Efecto de la triple interacción al nivel i, j, k

$(AC)_{ik}$ = Efecto de la interacción AC al nivel i, k

$(BC)_{jk}$ = Efecto de la interacción BC al nivel j, k

ϵ_{ijk} = Error experimental

El procesamiento de los datos obtenidos se realizó mediante el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System), se efectuó una prueba de comparación múltiple de medias mediante el Método de Tukey (Steel *et al.*, 1997; SAS, 2013).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Composición química proximal de *Canavalia ensiformis* L.

5.1.1 Fermentación en sustrato sólido y extrusión

El contenido de MS, cenizas, EE, PC, FDN y FDA de los componentes del pericarpio, semillas y la vaina completa de *C. ensiformis* se muestran en Figura 10.

5.1.1.1 Materia Seca (MS)

El contenido de materia seca mostró valores entre el 90.8 y 93.2 %, para los tratamientos de FES y extrusión respectivamente (Cuadro 8). Valores similares fueron observados por Ajeigbe *et al.* (2012) en *Canavalia*: 92.7% de MS con 7.3% de humedad, cuando utilizó tratamientos de fermentación espontánea y el tostado. Estos valores fueron superiores al 84.2% de MS de harinas integrales de *Canavalia* y *Vigna* ensiladas (González *et al.*, 2012).

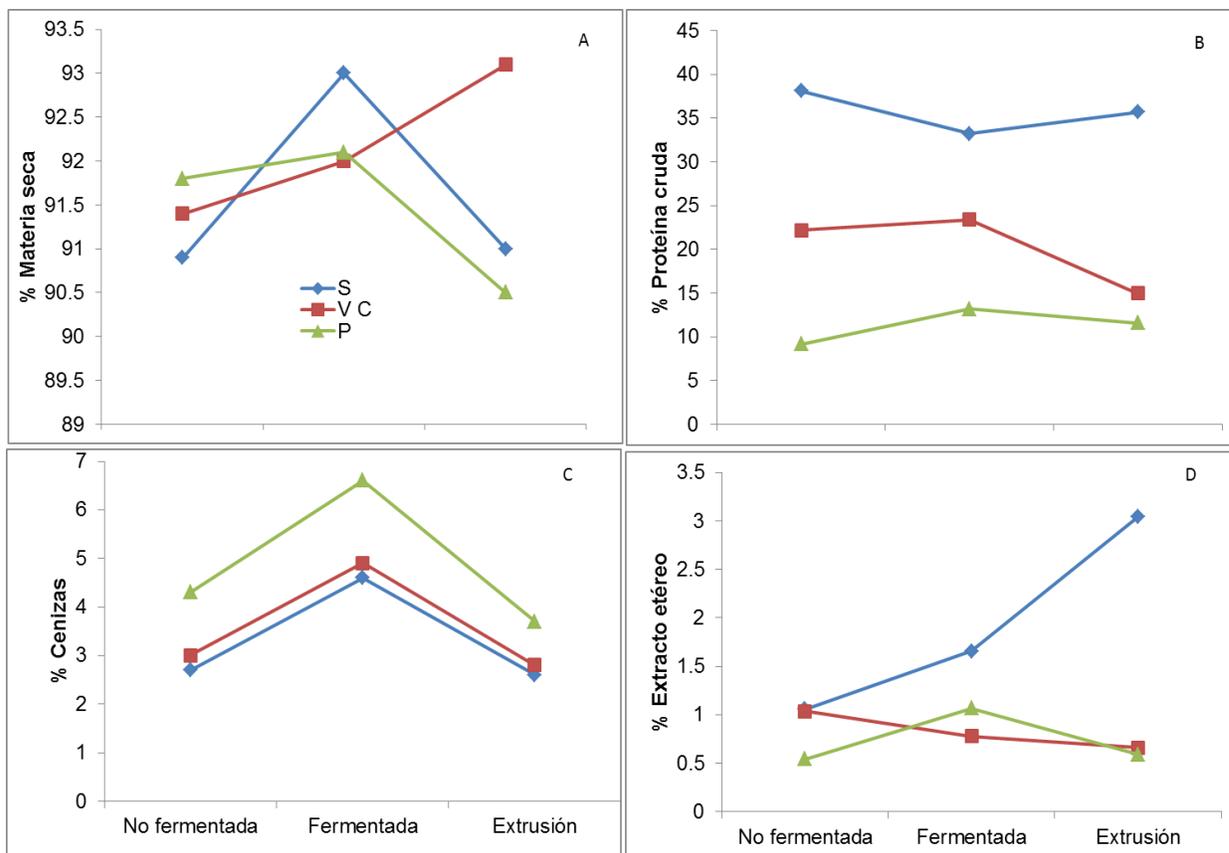


Figura 8. Interacción de tratamientos y componentes de *Canavalia* en las variables, Panel A: materia seca, Panel B: proteína, Panel C: cenizas y Panel D: extracto etéreo. S. Semilla, VC. Vaina Completa, P. Pericarpio.

El análisis de varianza (Figura 9, paneles A-D) mostró diferencias altamente significativas ($p \leq 0.0001$) entre tratamientos (extruido, fermentado y testigo) y componentes de la planta (semilla, vaina completa, pericarpio) con las variables proximales. Los mayores valores de MS encontrados en este estudio, pudieron estar afectados por el tiempo de almacenamiento de las muestras (seis meses), entre la cosecha y la aplicación de los tratamientos, por lo que el contenido de humedad presente en las muestras no superó el 10%. Además en ese periodo de tiempo, se presentaron una temperatura y precipitación promedio anuales de 35 °C y 2.1 mm, respectivamente (CONAGUA, 2012).

5.1.2 Cenizas

La FES incrementó significativamente los contenidos de cenizas de la semilla, vaina y vaina completa en comparación con los observados con la extrusión (Figura 9, panel C). Probablemente esto se debe a que el tratamiento con Vitafert contiene minerales, los cuales no fueron previamente cuantificados y en parte también se deba a la naturaleza propia de esta variedad y a su manejo agronómico. Resultados similares fueron observados al fermentar la semilla de *Canavalia* con *Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Penicillium italicum* y *Rhizopus oryzae* (Gabriel *et al.*, 2011).

Cuadro 7. Composición química proximal de los componentes de las vainas de *C. ensiformis* en el tratamiento de fermentación.

TRATAMIENTOS	Materia Seca (MS) %	Cenizas (%)	Proteína (%)
Semilla no Fermentada	90.97 ± 0.11 ^{abcd}	2.79 ± 0.11 ^e	38.71 ± 2.30 ^a
Semilla Fermentada	93.06 ± 0.02 ^{ab}	4.65 ± 0.004 ^b	33.36 ± 0.06 ^b
Vaina Completa no Fermentada	91.61 ± 0.52 ^{bcd}	3.02 ± 0.20 ^{de}	22.14 ± 0.82 ^c
Vaina Completa Fermentada	92.27 ± 0.45 ^{abc}	4.97 ± 0.13 ^b	23.46 ± 0.08 ^c
Pericarpio no Fermentado	92.08 ± 0.46 ^{abcd}	4.38 ± 0.26 ^b	9.34 ± 0.46 ^e
Pericarpio Fermentado	92.18 ± 0.35 ^{abcd}	6.63 ± 0.32 ^a	13.19 ± 0.37 ^d

Medias con la misma letra en cada columna, son significativamente iguales (Tukey 0.05).

El análisis de varianza (Figura 9, Panel C) mostró diferencias significativas ($p \leq 0.0001$) entre tratamientos (extruido, fermentado y testigo) y componentes de la planta (semilla, vaina completa, pericarpio).

Aunque los elementos minerales representan una porción menor de la composición de los alimentos, juegan un papel importante en la alimentación

(Singh *et al.*, 2007). Como se muestra en el Cuadro 9, el contenido de minerales del tratamiento de extrusión disminuyó numéricamente respecto al testigo, sin embargo, solo el pericarpio extruido fue diferente ($p \leq 0.05$) respecto a los otros componentes.

Por lo tanto someter la canavalia a proceso de extrusión no afecta el contenido de minerales puesto que son estables al calor y es poco probable que se pierdan en el destilado de vapor en la boquilla. La extrusión puede mejorar la absorción de minerales por la reducción de otros factores que inhiben la absorción.

Cuadro 8. Composición química proximal de los componentes de las vainas de *C. ensiformis* en el tratamiento de extruido.

TRATAMIENTO (S)	Materia Seca (MS) %	Cenizas (%)	Proteína (%)
Semilla no Extruida	90.97 ± 0.11 ^{abcd}	2.79 ± 0.11 ^e	38.71 ± 2.30 ^a
Semilla Extruida	91.09 ± 0.01 ^{dc}	2.65 ± 0.18 ^e	33.88 ± 0.09 ^{ab}
Vaina Completa no Extruida	91.61 ± 0.52 ^{bcd}	3.02 ± 0.20 ^{de}	22.14 ± 0.82 ^c
Vaina Completa Extruida	93.16 ± 0.09 ^a	2.95 ± 0.12 ^e	15.04 ± 0.08 ^d
Pericarpio no Extruido	92.08 ± 0.46 ^{abcd}	4.38 ± 0.26 ^b	9.34 ± 0.46 ^e
Pericarpio Extruido	90.76 ± 0.62 ^d	3.72 ± 0.02 ^{cd}	11.71 ± 0.01 ^d

^{abcde} Medias con la misma letra en cada columna en una variable, son significativamente iguales (Tukey 0.05).

5.1.3 Proteína

La aplicación del tratamiento de FES no mejoró los contenidos de proteína en las semillas ni en vainas completas (Figura 9, Panel B). Este comportamiento puede estar influenciado por el tipo de inóculo y el tiempo de duración de la fermentación (120 h) al cual se expusieron los componentes de *C. ensiformis*, debido tal vez a que el nitrógeno fue utilizado para el crecimiento microbiano y no se haya logrado

crecimiento microbiano eficaz que pudiera modificar el valor nutritivo. Se observa una reducción significativa en el contenido de proteína de las semillas fermentadas con respecto al tratamiento sin fermentar. Al igual que la fermentación sólida, la extrusión no modificó el contenido de proteína (Figura 9, Panel B) ($p \geq 0.05$). La pérdida observada puede estar asociada a la volatilización de nitrógeno por efecto de compactado y calentamiento del extrusor. Zamora (2003) menciona que el efecto de extrusión no modifica el contenido de proteína cuando la harina de la semilla de *C. ensiformis* se somete a extrusión. El contenido de proteína de 23.38% de la harina de semilla de Canavalia determinado por Zamora (2003) es inferior a los observados en este trabajo (33.88%). Lo anterior puede deberse a diferencias en el genotipo utilizado y a las condiciones edafoclimáticas durante el desarrollo del cultivo. Estos tratamientos disminuyeron el contenido proteico de la semilla, lo que podría deberse a la degradación de la proteína por efecto de la temperatura de la extrusión y probablemente a que no existió sincronización entre el Nitrógeno No Proteico (NPP) disponible de la urea y los carbohidratos de la Canavalia, por lo que los microorganismos del VITAFERT no sintetizaron proteínas ni tuvieron mayor crecimiento. El análisis de varianza (Figura 9) mostró diferencias altamente significativas ($p \leq 0.0001$) entre tratamientos (extruido, fermentado y testigo) y componentes de la planta (semilla, vaina completa, vaina).

5.1.4 Fibra Detergente Neutro y Fibra Detergente Ácido

El contenido de FDN y FDA en las semillas y vaina completa no presentaron diferencia después de la aplicación del tratamiento FES respecto al testigo (Figura 10).

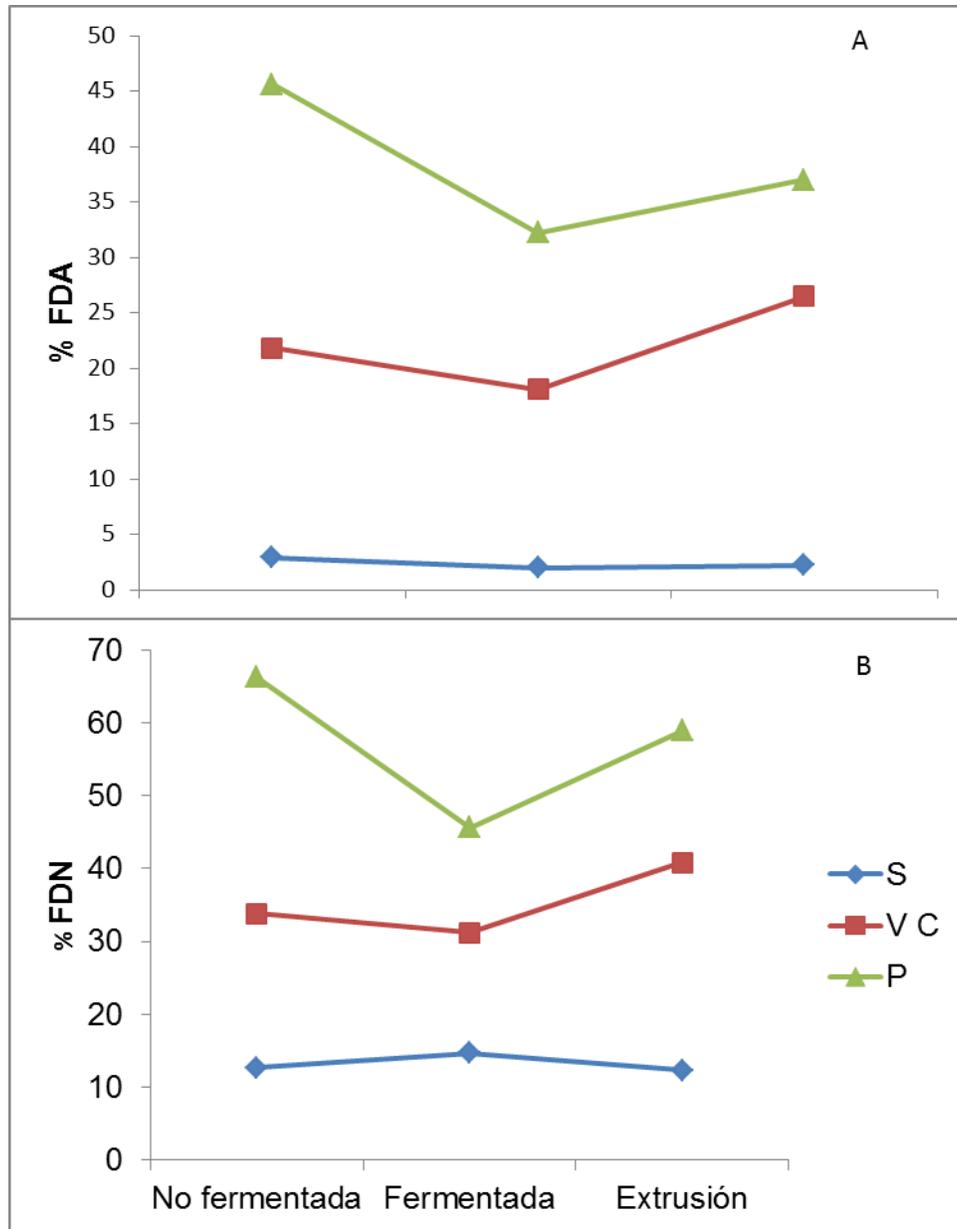


Figura 9. Interacción de los tratamientos y componentes de las variables FDN y FDA de canavalia. S. Semilla, VC. Vaina Completa, P. Pericarpio.

Esto puede estar asociado con el alto grado de madurez de las semillas y vainas que se tomaron como muestras, y esto a su vez modifica el contenido de FDN y celulosa (Pérez-Gil *et al.*, 2014).

En contraste el tratamiento extruido incrementó los contenidos de FDN y FDA en vaina completa (40.8% y 26.4% respectivamente) y pericarpio (59.0% y 37% respectivamente).

Cuadro 9. Composición química proximal de FDN, FDA y EE en los componentes de las vainas de *C. ensiformis* en el tratamiento de fermentación.

TRATAMIENTO (S)	Fibra en solución detergente neutro (FDN) %	Fibra en solución detergente ácida (FDA) %	Extracto Etéreo (EE) %
Semilla no Fermentada	12.46 ± 2.41 ^e	2.87 ± 1.22 ^f	1.08 ± 0.21 ^{bc}
Semilla Fermentada	15.05 ± 2.14 ^e	2.27 ± 0.44 ^f	1.68 ± 0.99 ^a
Vaina Completa no Fermentada	33.55 ± 4.22 ^d	22.28 ± 3.46 ^{de}	1.05 ± 0.08 ^c
Vaina Completa Fermentada	31.3 ± 3.83 ^c	17.73 ± 1.82 ^{ce}	0.77 ± 0.21 ^c
Pericarpio no Fermentado	66.49 ± 0.57 ^a	45.65 ± 0.05 ^a	0.53 ± 0.02 ^c
Pericarpio Fermentado	48.88 ± 0.14 ^{bc}	32.05 ± 1.10 ^b	1.09 ± 0.40 ^{bc}

Medias con la misma letra en cada columna en una variable, son significativamente iguales (Tukey 0.05).

Para los tratamientos aplicados al pericarpio se observa que ambos redujeron los contenidos de FDN y FDA respecto al testigo.

Cuadro 10. Composición química proximal de FDN, FDA y EE en los componentes de las vainas de *C. ensiformis* en el tratamiento de extrusión

TRATAMIENTO (S)	Fibra en solución detergente neutro (FDN) %	Fibra en solución detergente ácida (FDA) %	Extracto Etéreo (EE) %
Semilla no Extruida	12.46 ± 2.41 ^e	2.87 ± 1.22 ^f	1.08 ± 0.21 ^{bc}
Semilla Extruida	12.35 ± 3.23 ^e	2.21 ± 0.35 ^f	3.03 ± 1.31 ^a
Vaina Completa no Extruida	33.55 ± 4.22 ^d	22.28 ± 3.46 ^{de}	1.05 ± 0.08 ^c
Vaina Completa Extruida	40.83 ± 3.04 ^c	26.42 ± 2.04 ^{cd}	0.67 ± 0.30 ^c
Pericarpio no extruido	66.49 ± 0.57 ^a	45.65 ± 0.05 ^a	0.53 ± 0.02 ^c
Pericarpio Extruida	59 ± 1.79 ^b	37.05 ± 1.28 ^b	0.59 ± 0.10 ^c

Medias con la misma letra en cada columna son significativamente iguales (Tukey 0.05).

El análisis de varianza (Figura 10, Páneles A y B) mostró diferencias significativas ($p \leq 0.0001$) entre tratamientos (extruido, fermentado y testigo) y componentes de la planta (semilla, vaina completa, pericarpio).

5.1.5 Extracto Etéreo

Aunque por lo general, las leguminosas contienen un bajo contenido de grasas, es importante que estén presentes en la dieta para animales, puesto que son una fuente potencial de energía (Mubarak, 2005). Lo cual implica en mayor o menor medida que estos contenidos de extracto etéreo pudieran ser utilizados por animales rumiantes para la síntesis de grasa en leche o ser utilizado como fuente de reservas corporales en los animales. En este estudio, el contenido de extracto etéreo se incrementó significativamente ($p \leq 0.05$) con el tratamiento de la FES a la semilla (1.6%) respecto al extruido (1.3%), sin embargo, aunque los valores encontrados en el presente estudio fueron diferentes a los encontrados por Mubarak (2005) (1.82%) en el frijol mungo (*Phaseolus aureus*), el contenido sigue siendo bajo, por lo que indicaría que utilizar la harina de Canavalia como recurso en la alimentación implicaría adicionar energía en forma de grasa para elevar su contenido. Resultados similares fueron reportados por Sridhar y Seena (2006), obteniendo el mismo valor de extracto etéreo en *C. ensiformis* (1.6%) cuando realizaron un estudio comparativo de 4 leguminosas del mismo género. El análisis de varianza (Figura 9, Panel D) mostró diferencias significativas ($p \leq 0.0001$) entre

tratamientos (extruido, fermentado y testigo) y componentes de la planta (semilla, vaina completa, pericarpio).

5.1.6 Degradación *In situ* de la Materia Seca

La degradación de la MS de los tratamientos estudiados no fue diferente ($p \geq 0.05$), excepto para la semilla extruida alcanzando 83.59% a las 24 h (Figura 11). Este resultado concuerda con González (2004) al estudiar tiempos de incubación 3, 6, 9, 12, 24 y 36 h con harinas de *C. gladiata* y *C. ensiformis* obteniendo 97.77 y 96.17% de DMS a las 24 h, respectivamente.

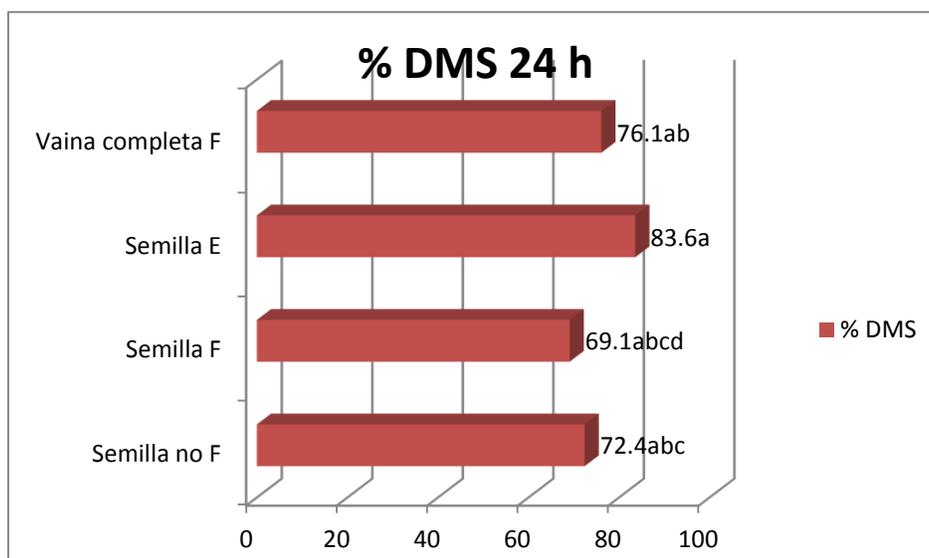


Figura 10. Degradación de la materia seca de vainas completas, semilla extruida y fermentada a las 24 h de incubación.

Los resultados de nuestro estudio indican que la extrusión facilitó la digestibilidad de la MS de la semilla de Canavalia debido probablemente a que el precalentado hizo posible la disponibilidad de los carbohidratos, haciéndolo más digestibles para utilizarse como fuente de energía por los microorganismos ruminales.

La degradación de la materia seca a las 48 horas (Figura 12) mostró que la mayor degradación fue para el tratamiento de vaina completa fermentada con 70.3% comparado con el tratamientos de extrusión (57.8%) y vaina completa (63.6%) respectivamente. Esto puede estar mediado por la actividad microbiana de las bacterias lácticas presentes en el Vitafert, con el cual se inoculó al tratamiento y que degradan la glucosa presente en las vainas en forma de celulosa y hemicelulosa (Velázquez *et al.*, 2011). Por lo que puede ser empleada de manera potencial en la alimentación de ovinos, siempre y cuando esta sea previamente fermentada para dejar disponibles las unidades de glucosa que contienen estos polisacáridos.

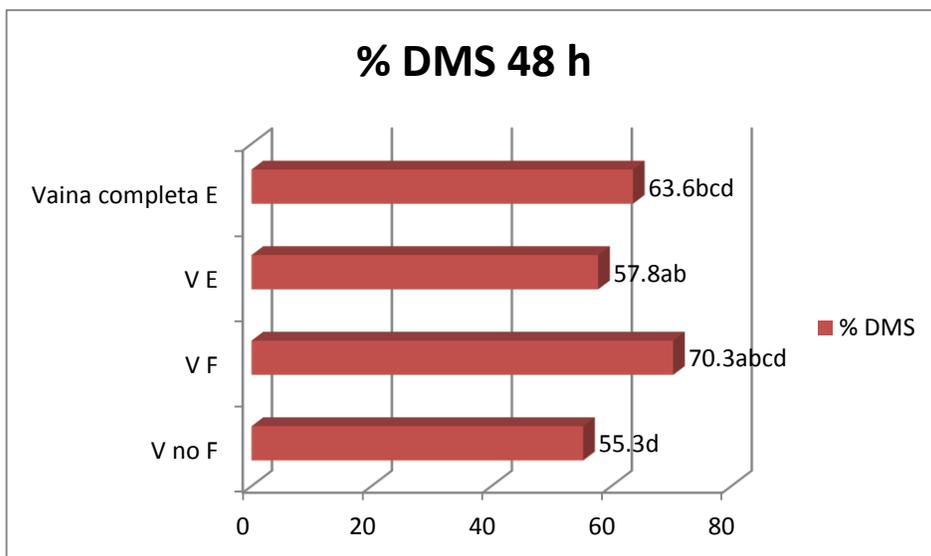


Figura 11. Degradación de la materia seca de vaina completa, vaina completa extruida y vaina completa fermentada a las 48 h de incubación.

5.2 Contenido de Canavanina en *Canavalia* sometida a fermentación y extrusión

El tratamiento de extrusión y fermentación incrementaron el contenido de canavanina en el pericarpio con respecto al testigo (Cuadro 12). En semillas y vainas completas, el tratamiento de fermentación redujo significativamente ($p \leq 0.05$) el contenido en 0.55 y 0.07 g 100g⁻¹ MS, respectivamente. Mientras que el tratamiento de extrusión incrementó los contenidos en semillas. Resultados similares en semillas fueron observados por Zamora (2005). La temperatura de descomposición de la canavanina es de 184°C, por lo tanto la temperatura alcanzada con el extrusor utilizado (150°C) en este estudio pudo no ser suficiente para degradar al aminoácido.

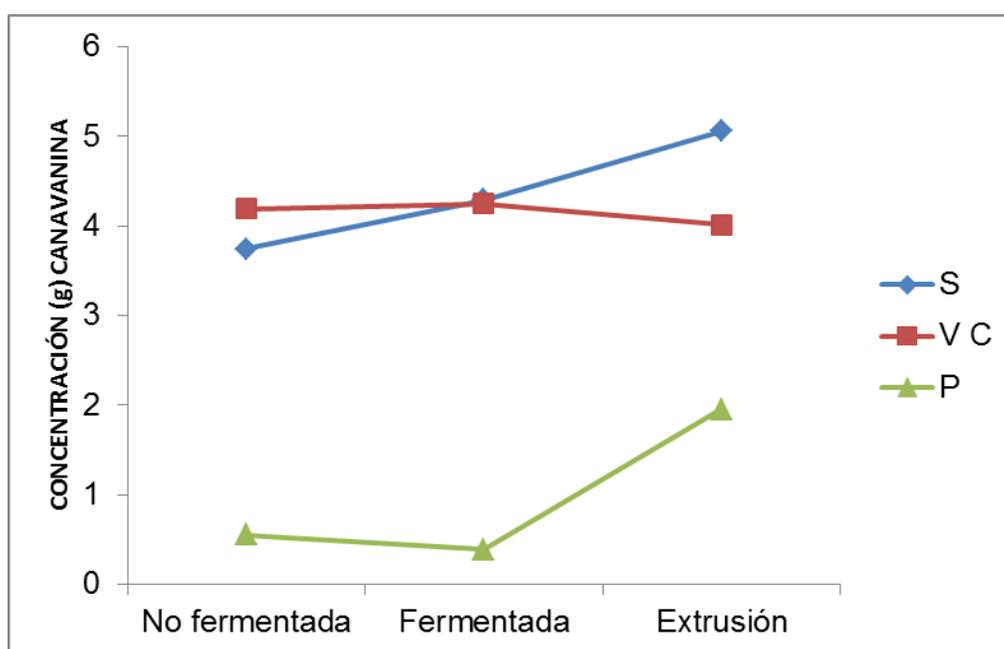


Figura 13 Interacción de tratamientos y componentes de *Canavalia* en el contenido de canavanina. S. Semilla, VC. Vaina Completa, P. Pericarpio.

En tanto que para la fermentación pudo haber estado mediado por el tipo de inóculo utilizado que fue un cultivo de lactobacilos ya que con *A. niger* se logran reducir los contenidos de canavanina en semillas de *Canavalia* (Gabriel *et al.*, 2011). El análisis de varianza (Cuadro 13 y Figura 13) mostró diferencias significativas ($p \leq 0.0001$) entre tratamientos (extruido, fermentado y testigo) y componentes de la planta (semilla, vaina completa, pericarpio).

Cuadro 11 .Concentración de Canavanina en los diferentes componentes de *C. ensiformis*.

Tratamiento	Concentración de Canavanina g de Canavanina/100g MS
Semilla no Fermentada	4.2±0.02 ^b
Semilla Fermentada	3.7±0.00 ^c
Semilla Extruida	5.0±0.01 ^a
Vaina completa no Fermentada	4.2±0.01 ^b
Vaina completa Fermentada	4.1±0.02 ^b
Vaina completa Extruida	4.0±0.02 ^b
Pericarpio no Fermentada	0.3±0.01 ^f
Pericarpio Fermentada	0.5±0.03 ^e
Pericarpio Extruido	1.9±0.01 ^d

Medias con la misma letra son significativamente iguales (Tukey 0.05). F. Fermentada, E. Extruida.

Cuadro 12. Análisis de Varianza del efecto de la interacción de tratamientos y componentes sobre la concentración de canavanina.

	GL	SC	CM	F calculada	Pr> F
REP	2	0.00071852	0.00035926	Infty	<0.0001
TRATA	8	72.38342963	9.04792870	Infty	<0.0001
FUENTE	2	65.19327407	32.59663704	Infty	<0.0001
FORMA	2	3.69467407	1.84733704	Infty	<0.0001
FUENTE*FORMA	4	3.49548148	0.87387037	Infty	<0.0001

VII. CONCLUSIONES

1.- Los resultados indican que la extrusión y la Fermentación en Estado sólido (FES) bajo las condiciones utilizadas en este estudio, no tuvieron efecto sobre la reducción del contenido de canavanina en los componentes de *C. ensiformis*. Por lo tanto el contenido presente en los tratamientos es similar a los reportados en la literatura, sin embargo, se observó que el pericarpio presenta cantidades mínimas en comparación con las semillas.

2.- Los resultados demuestran la importancia de seguir investigando para mejorar la calidad nutricional de los alimentos elaborados con *Canavalia*, o investigar más sobre la fracción proteica y almidonosa con la finalidad de incorporarla en las dietas para animales.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Uso de cultivos mixtos puros poniendo énfasis en el empleo de hongos como el *Aspergillus niger*, *Rhizopus oligosporus*, y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, además de bacterias lácticas como *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*.
2. Uso de otras condiciones fijas de fermentación en sustrato sólido (Otras temperaturas, pH, actividad de agua (a_w) o porcentaje de humedad, tiempo de fermentación).
3. Probar diferentes niveles de inclusión de componentes de Canavalia, ya que en este estudio se tomó un nivel fijo de 76% para el tratamiento de fermentación para encontrar el valor óptimo del porcentaje de inclusión en la utilización de Canavalia.
4. Utilizar un extrusor comercial que posea las condiciones propicias para poder hacer las evaluaciones correspondientes, puesto que el prototipo utilizado en el presente estudio no las presentaba (cortador, inyector de vapor y estimación de la capacidad de alimentación de la tolva).
5. Utilizar pretratamientos como la germinación y el remojo de los componentes de la Canavalia, puesto que han demostrado tener un efecto en la disminución de estos factores.

6. Recurrir al método de diálisis en la harina de la Canavalia, el cual ha demostrado disminuir los contenidos de canavanina a concentraciones no perceptibles.
7. El uso del mejoramiento genético para obtención de variedades con bajo contenido de canavanina.

IX. LITERATURA CITADA

- Ajeigbe, S. O., Mohammed, A. K., Yahaya, I. A., Oyelowo, A. O. 2012. Effect of Processing Techniques on Levels of Minerals and Antinutritional Factors of *Canavalia ensiformis*. Pakistan Journal of Nutrition 11 (12): 1121-1124.
- Akingbade, A. A., Sodeinde, F. G., Olaniyi, C. O., Oyetayo, T. S., Fadare, O. R., Rabi, A. O. 2009. Proximate and Mineral Elements Composition of Water Soaked *Canavalia ensiformis* Seeds. Pakistan Journal of Nutrition 8 (9): 1401-1403.
- Alemán, R.; Flores, M. 1993. Algunos datos sobre *Canavalia ensiformis*. Informe Técnico Número 10, pp. 4.
- Andriole, E., Colyer, K., Cornell, E. and Poutsma, J. 2006. Proton Affinity of Canavanine and Canaline, Oxyanalogues of Arginine and Ornithine from the Extended Kinetic Method. Journal of Physical Chemistry A. 110:11501-11508
- A.O.A.C. 2000. Association of Official Analytical Chemistry Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemists. 17thEd. Gaithersburg. United States of América.
- Beuchat, L. R. 2008. Indigenous Fermented Foods, in Biotechnology Set, Second Edition (eds H.-J. Rehm and G. Reed), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany. DOI:10.1002/9783527620999.ch13j
- Bressani, R., Brenes, R. G., García, A. and Elías, L. G. 1987. Chemical composition, amino acid content and protein quality of *Canavalia* spp. seeds. Journal Science of Food and Agriculture, 40:17–23.

- Board on Science and Technology for International Development (BSTID). 1979. Jack bean and Swordbean. Advisory Committee on Technology Innovation, Commission on International Relations, National Academy of Sciences-National Research. pp. 54-59
- Boyar, A. y Marsh, E. R. 1982. L-Canavanine, a Paradigm for the Structures of Substituted Guanidines. *Journal American Chemical Society*. 104 (7):1995-1998.
- Bolaños-Aguilar, E.-D. J.-C. Emile, J.-F. Enríquez-Quiroz .2010. “Les fourrages au Mexique: ressources, valorisation et perspectives de recherché”, *Fourrages*, 204, 277-282.
- Cab, J, F. E. 2011. Morfología y potencial forrajero de leguminosas no convencionales, nativas de México, para la producción en pastoreo extensivo en el trópico. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Texcoco, Edo, de México. pp. 141.
- Cadena H, J. 2010. Elaboración y caracterización de un aditivo biológicamente activo a través de una fermentación en estado líquido. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados Campus Tabasco. pp. 53.
- Celis, A.G. 2000. Calidad de pastas de soya mexicanas y su relación con el síndrome de transito rápido en pollos de engorda. Tesis de Maestría. Universidad de Colima. Colima, México. pp. 52.
- Centurión, H. D. y Espinoza, M. J. 2005. Efecto de Malteado para disminuir la concentración de Concanavalina A y Canavanina en las *semillas de Canavalia ensiformis*. VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Guanajuato, Gto, pp. 83-87.

- Capetillo L, M.C. Reyes R, R.R. Sandoval C, C.A. 1999. Determinación de L-canavanina por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa y por colorimetría. *Revista Biomédica*, 10:17-22.
- Comisión Nacional del Agua. 2012. <http://www.cna.gob.mx>. Consultado el 28 de agosto de 2014.
- Díaz, F. M. G, A. Padilla, C. Curbelo, F. 2002. Caracterización de granos y forrajes de las leguminosas temporales *Canavalia ensiformis*, *Lablab purpureus* y *Stizolobium niveum* sembradas a finales de la estación lluviosa. *Revista de Ciencia Agrícola*, 36(4):409-416.
- Downum, K. R., Rosenthal, G. A., Cohen, W. S. 1983. L-Arginine and L-Canavanine Metabolism in Jack Bean, *Canavalia ensiformis* (L.) DC. and Soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *Plant Physiology*, 73:965-968.
- Enríquez Q. J. F., Meléndez N. F., Bolaños A. E.D. 1999. Tecnología para la producción y manejo de forrajes tropicales en México. INIFAP. CIRGOC. Campo Experimental Papaloapan. Libro Técnico Núm. 7. Veracruz, México. 262 p.
- Ekanayake, S. K. Skog, N. –G. Asp. 2007. Canavanine content in sword beans (*Canavalia gladiata*): Analysis and effect of processing. *Food and Chemical Toxicology*, 45:797-803.
- Follmer, C. 2008. Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry*, 69:18–28.
- Gabriel, R. A. O., Akinyosoye, F., Adetuyi, F. C. 2011. Nutritional composition of *Canavalia ensiformis* (L) (Jack Beans) as affected by the use of mould

- starter cultures for fermentation. Trends in Applied Sciences Research, 6 (5): 463-471.
- Ganem B, F. A., Martín G, O. 2000. Lectina concaivalina A: obtención y purificación. Universo Diagnóstico, 1(1): 1-41.
- Gonzales, M. H., Martínez, D. R., Orozco, E. A., Hulguín, L. C., Perea, N. H., López, M. B., Hernández, C. H. E. 2011. Efecto del tipo de dieta y del grupo racial sobre el comportamiento digestivo en borregos. Reporte Técnico de Investigación, 38 p.
- Gutiérrez, D.; Elías, A.; García, R.; Herrera, F.; Jordán, H.; Sarduy, L. 2012. Efecto del aditivo microbiano VITAFERT en el consumo de la materia seca y fibra neutro detergente en cabras Saanen alimentadas con heno de *Brachiaria brizantha*. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, 46(3):267-271.
- Huang, T., Jander, G., Vos, M. 2011. Non-protein amino acids in plant defense against insect herbivores: Representative cases and opportunities for further functional analysis. Phytochemistry, 72: 1531–1537.
- Hinojosa, C. J. A., Regalado, A. F. M., Oliva, H. J. 2009. Crecimiento prenatal y pre destete en corderos Pelibuey, Dorper, Katahdin y sus cruces en el sureste de México. Revista Científica FCV-LUZ, 19 (5): 522- 53.
- Hwang, I. D., Sang-Gu K, Y. L. Lee S, J. Myung K, Y. 1996a. Enzyme Activities of Canavanine Metabolism in *Canavalia lineata* L. callus. Journal of Plant Physiology, 149. pp. 494-500.
- Hwang, I. D., Sang-Gu K. Myung K, Y. 1996b. Canavanine metabolism in tissue cultures of *Canavalia lineata*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 45: 17-23.

http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/Agronomia%20Tropical/at3413/arti/marin_d.htm. Consultado el 13 de Enero del 2014.

<http://www.tecnologia-informatica.es/> Consultado: 17 de Noviembre de 2013.

<https://www.google.com.mx/#q=extrusora> Consultado: 15 de Enero del 2014.

<http://www.siap.gob.mx> Consultado: 19 de Noviembre del 2013.

INEGI. 2012. Producción de carne y leche. <http://www.inegi.org.mx> Consultado: 21 de Agosto del 2014.

INEGI. 2013. Población Nacional. <http://www.inegi.org.mx> Consultado: 19 de Noviembre del 2013.

Jiménez P. Cortés R., H; Ortiz G., Sanín. 2005. Rendimiento forrajero y calidad del ensilaje de canavalia en monocultivo y asociada con maíz. Acta Agronómica, 54(2): 31-36.

Lon-Wo, E. 2007. IX Encuentro de nutrición y producción en animales monogástricos, Montevideo, Uruguay. Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, La Habana Cuba, pp. 41-48.

León T, M. V.; Rueda A, E. E.; Castañeda D, M. V.; Méndez O, A.; Michelangeli B, C. C. 2007. Efecto de la Concanavalina A sobre la actividad de las enzimas α -amilasa pancreática y tripsina en pollos de engorde. Revista Científica, FCV-LUZ. 17(1):83-88.

Mariño, N. Escala M. Cerovich M, M. Ramis, C. 2007. Características morfológicas cualitativas y cuantitativas en semillas de algunas especies del género *Canavalia*. Revista de la Facultad de Agronomía (Maracay), 33:55-76.

- Martín, G. M., Rivera, R. A. Mujica, Y. 2007. Estimación de la fijación biológica del nitrógeno de la *Canavalia ensiformis* por el método de la diferencia de N total. *Cultivos Tropicales* 28(4):75-78.
- Meléndez, N. F. 2012. Principales forrajes para el Trópico. Secretaría de Desarrollo Agropecuario, Forestal y Pesca. Universidad Popular de la Chontalpa. pp. 483.
- Michelangeli, C. Pérez, G. Méndez, A. Sívoli, L. 2004a. Efecto del tostado del grano de *Canavalia ensiformis* sobre el comportamiento productivo de cerdos en crecimiento. *Zootecnia Tropical*, 22(1):87-101.
- Michelangeli, C. Pérez G, A. Méndez, A. Sívoli, L. Pizzani, P. 2004b. Digestibilidades ileal y fecal en cerdos del nitrógeno, aminoácidos, energía y componentes de la pared celular de granos tostados de *Canavalia ensiformis* (L.). *Zootecnia Tropical*, 22(1):71-86.
- Mubarak, A. E. 2005. Nutritional composition and antinutritional factors of mung bean seeds (*Phaseolus aureus*) as affected by some home traditional processes. *Food Chemistry*, 89:489–495.
- Makkar, H.P.S., Siddhuraju P. Becker, K. 2007. Canavanine in. *Plant Secondary Metabolites. Methods in Molecular Biology*. 393:47-49.
- Orskov, E. R. Hovell, F. D. y Mould. 1992. Uso de la técnica de la bolsa de nylon para la evaluación de los alimentos. *Producción Animal Tropical*. 5:195-123.
- Palma-López D. J., J. Cisneros D., E. Moreno C., J. A. Rincón-Ramírez. 2006. Plan de uso sustentable de los suelos de Tabasco. 3^a. ed. ISPROTAB-Fundación Produce Tabasco-Colegio de Postgraduados. Villahermosa, Tabasco, México. 196 p.

- Partida de la Peña, J. A., Braña, V. D., Jiménez, S. H., Ríos, R. F. G., Buendía, R. G. 2013. Producción de carne ovina. Libro técnico. 5
- Pascual, C. A., Oliva, H. J., Hernández, S. D., Torres, H. G., Suárez, O. M. E., Hinojosa, C. J. A. 2009. Crecimiento postdestete y eficiencia reproductiva de corderas Pelibuey con un sistema de alimentación intensiva. Archivos de Medicina Veterinaria, 41(3): 205-212.
- Perspectiva Estadística México. 2011. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Diciembre.
- Pérez-Gil RF, Carranco Ma. E, Calvo Ma. C, Solano L, Martínez TJ. 2014. Caracterización química de panojas y vainas con semillas nativas del estado de Guerrero, México, para uso en la alimentación animal. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias. 5(3):307-319.
- Pizzani, P. Vargas, R. E. Pérez, S. Méndez, A. Michelangeli, C. Sívoli, L. 2006. Efectos del tostado sobre el valor de la energía metabolizable verdadera y el contenido de factores antinutricionales de harinas de granos de *Canavalia ensiformis* (L). Revista Científica, FCV-LUZ, 16(5):523-530.
- Ramírez, A. Ortiz B, L. 1997. Chemical and nutritional characteristics from grains of five genotypes of *Canavalia ensiformis*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 47(3):234-6.
- Ramos J, J. A. 2005. Obtención de un concentrado energético-proteínico por fermentación en estado sólido de la caña de azúcar para bovinos en ceba. Tesis doctoral. Instituto de Ciencia Animal, Departamento de Ciencias Biofisiológicas. La Habana. Cuba, pp.139.

- Rincón C, A. M., Pérez S, E. E. González P, Z. M. Rodríguez G, P. J. 1999. Microstructural changes of *Canavalia ensiformis* starch modified by thermal methods. Food Science and Technology International. 5:31 DOI: 10.1177/108201329900500103. <http://fst.sagepub.com/content/5/1/31>
- Consultado: 28 de Diciembre de 2013.
- Robinson, T., Singh, D., Nigam, P. 2002. Fermentación en Estado Sólido: Una tecnología microbiana promisorio para la producción de metabolitos secundarios. Vitae, 9(2):27-36.
- Ross T, T., Goode, L., Linnerud C, A. 1985. Effects of high ambient temperature on respiration rate, rectal temperature, fetal development and thyroid gland activity in tropical and temperate breeds of sheep. Theriogenology, 24(2): 259-269.
- Rajaram, N. Janardhanan, K. 1992. Nutritional and chemical evaluation of raw seeds of *Canavalia gladiata* (Jacq) DC. and *C. ensiformis* DC: the under utilized food and fodder crops in India. Plant Foods for human Nutrition. 42:329-336.
- Rosenthal, G. A. 2001. L-Canavanine: a higher plant insecticidal allelochemical Amino Acids. 21: 319–330.
- Rosenthal, G. A. 1970. Investigations of Canavanine Biochemistry in the Jack Bean Plant, *Canavalia ensiformis* (L.) DC. Plant Physiology. 46: 273-276.
- Rosenthal, G. A. 1972. Investigations of Canavanine Biochemistry in the Jack Bean Plant, *Canavalia ensiformis* (L.) DC. Plant Physiology, 50: 328-331.
- Rosenthal, G. A. 1982. L-Canavanine Metabolism in Jack Bean, *Canavalia ensiformis* (L.) DC. (Leguminosae). Plant Physiology, 1: 69, 1066-1069.

- Rosenthal, G. A. Nokomo, P. 2000. The natural abundance of L-canavanine, an active anticancer agent, in alfalfa, *Medicago sativa*. *Pharmaceutical Biology*, 38(1):1-6.
- Rosenthal, G. A. 1992. Purification and characterization of the higher plant enzyme L-canaline reductase. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 89:1780-1784.
- Rosenthal, G. A. and Rhodes, D. 1984. L-Canavanine Transport and Utilization in Developing Jack Bean, *Canavalia ensiformis* (L.) DC. [*Leguminosae*]¹. *Plant Physiology*. 76: 541-544.
- Rosenthal, G. A. 1990. Metabolism of L-Canavanine and L-Canaline in Leguminous Plants. *Plant Physiology*, 94:1-3.
- SAS/STAT[®] (Programa de Computadora). Versión 9.3. SAS Institute Inc; 2013.
- Sandoval-Castro, C. A. Herrera G, F. 2001. Cambios en la población de protozoarios ruminales por efecto de la inclusión de *Canavalia ensiformis* a la dieta de bovinos. *Revista Biomédica*, 12:166-171.
- Sivolí, L. R. Méndez, O. A. Michelangeli, B. C. 2005. Toxicidad del aminoácido no proteico L-canavanina en pollos de engorde. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 15:(2)155-158.
- Sívoli, L. Michelangeli, C. Méndez, A. 2004. Efecto combinado de la deshidratación en doble tambor y del tostado sobre la Energía Metabolizable Verdadera y factores antinutricionales de harinas de *Canavalia ensiformis*. *Zootecnia Tropical*, 22(3) 241-249.
- Singh, S. Gamlath, S. Wakeling, L. 2007. Nutritional aspects of food extrusion: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 916–929.

- Sridhar K. R., Seena S. 2006. Nutritional and antinutritional significance of four unconventional legumes of the genus *Canavalia* – A comparative study. *Food Chemistry*, 99:267–288.
- Steel GDR, Torrie HJ, Dickey DA. 1997. Principles and procedures of statistics a biometrical approach. 3ra Ed. Michigan, USA: McGraw Hill Companies, Inc; 666 pp.
- Turner, B.L., Harborne, J.B. 1967. Distribution of Canavanine in the plant kingdom. *Phytochemistry*. 6:863-866.
- Udedibie, I. B. A. 2001. Semillas de *Canavalia ensiformis* en dietas avícolas. Resultados recientes de investigaciones en Nigeria. *Revista Cubana de Ciencia Avícola*, 25:89-99.
- Udedibie, A.B.I., Carlini, C.R. 1998. Questions and answers to edibility problem of the *Canavalia ensiformis* seeds - A review. *Animal Feed Science and Technology*, 74: 95 – 106.
- Valdivié, M., Elías, A. 2006. Posibilidades del grano de la *Canavalia ensiformis* fermentado con caña (*Sacchacana*) en pollos de ceba. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 40(4): 459-464.
- Velázquez, A.J.; González-Ronquillo, M., Bórquez, J., Domínguez, I. A., Pérez grovas, R. 2011. Composición química y producción de gas *in vitro* de dietas con vainas de *Acacia farnesiana*. *Archivos de Zootecnia*, 60(231): 637-645.
- Villanueva-Avalos. J. F., F. Herrera – Cedano, R. Plascencia – Jiménez. 2010. *Leguminosas forrajeras: Un recurso sustentable para el Trópico Mexicano.*

- INIFAP – CIRPAC. Campo Experimental Santiago Ixcuintla. Folleto Técnico Núm. 14. Santiago Ixcuintla, Nayarit, México. 56 p.
- Whiteside, J. A., Thurman, D. A. 1971. The Degradation of Canavanine by Jack Bean Cotyledons. *Planta (Berl.)* 98: 279-284.
- Zaldívar B, L. B. 1996. Evaluación del efecto de la fermentación de diferentes microorganismos sobre la calidad nutricional de la *Canavalia ensiformis*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán. 105 pp.
- Zamora, N. C. 2003. Efecto de la extrusión sobre la actividad de factores antinutricionales y digestibilidad *in vitro* de proteínas y almidón en harinas de *Canavalia ensiformis*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 53(3): 293-298.

X. ANEXOS

Análisis colorimétrico

Reactivos.

- a) Buffer de fosfatos pH 7.0
- b) Persulfato de amonio al 1%
- c) Pentaciaminoferrato (PCAF) al 1%
- d) Canavanina 10 mmol/ml

Procedimiento. Se utiliza 1 ml del extracto y 4 ml de agua destilada, añadiéndole 5 ml de buffer, 1 ml de Persulfato y 0.5 ml pentaciaminoferrato. La curva de calibración se construye de acuerdo a la tabla 3.

Tabla 3. Datos para la elaboración de la curva de calibración utilizada para el análisis colorimétrico de canavanina.

STD ml	H2O ml	Buffer ml	Persulfato ml	PCAF ml	Conc. ml
0	5	5	1	0.5	0
1	4	5	1	0.5	2
2	3	5	1	0.5	4
3	2	5	1	0.5	6
4	1	5	1	0.5	8
5	0	5	1	0.5	10

Adaptado de Capetillo *et al.* (1999).

Metodología para determinar *Canavanina* en *C. ensiformis*

Palabras Clave: Canavanina; 2-amino-4- (guanidinooxi) ácido butanoico; antimetabolito; antagonista de arginina; enfermedad autoinmune; lupus eritematoso; pentacianoaminoferrato; Persulfato de potasio; *Canavalia* spp.; *Sesbania* spp.

1. Introducción

1.1. Naturaleza, Mecanismo de acción y efectos biológicos

Canavanina (2-amino-4- (guanidinooxi) ácido butanoico) se produce en más de 350 especies de la Papilionoideae, o subfamilia y de leguminosas es un análogo de arginina de la más alta concentración de canavanina (13% de peso seco) se ha informado en *Dioclea megacarpa* y se produce hasta 5% en las semillas de *Canavalia ensiformis*. L-canavanina exhibe propiedades antimetabólicos potentes en organismos que van desde virus y procariotas a los animales enteros. Canavanina actúa principalmente como un antagonista de la arginina y se incorporan al núcleo de la célula y otras proteínas e interfiere con la formación de ácido desoxirribonucleico y ácido ribonucleico. En los monos causa anomalidades hematológicas y serológicas. Estas anomalías son similares a los observados en humanos lupus eritematoso sistémico, una enfermedad autoinmune que afecta adversamente el riñón y la piel. Canavanina afecta a la superficie de carga de la membrana de las células β autoinmunes, y se ha sugerido que tales alteraciones pueden estar asociadas con la respuesta autoinmune anormal.

1.2. Presente en:

Canavalia spp., *Medicago sativa*, *Sesbania spp* y *Dioclea megacarpa*.

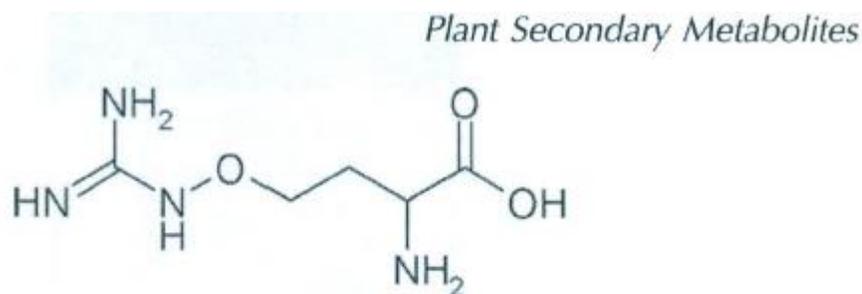


Fig. 1. Structure of canavanine.

1.3 Principio de ensayo

El grupo guanidoxy, $-O.NH.C(:NH).NH_2$, en canavanina reacciona con pentacianoaminoferrato trisódico en solución acuosa a pH 7.0 y se forma un color magenta – cromóforo de color. El color formado se mide de 520 a 530 nm (1).

2. Materiales

1. Tampón de fosfato de potasio (0.2M, pH 7.0). Tomar 50 ml de 0.2 M KH_2PO_4 (27.20 g/L) y 29.1 ml de 0.2 M NaOH y diluido en 100 ml. Comprobar el pH y ajustar a pH 7, si es necesario.
2. Persulfato de potasio (1%). Se pesa 1 g de Persulfato de potasio y se disuelve en 100 ml de agua destilada.
3. Preparación de Pentacianoaminoferrato (PCAF). Disolver 10 g de Nitroprusiato de sodio en 55 ml de solución Hidróxido de amonio (25% o 32% w/v). Mantener

esta solución en la oscuridad a 0°C por 24 horas y filtrar el precipitado de color amarillo-verde que contiene una mezcla de pentacianoaminoferrato de sodio (II) y (III). Añadir etanol al filtrado hasta que no haya precipitado. Filtrar y combinar este precipitado con el primer precipitado. Lavar el precipitado combinado con etanol absoluto hasta que se elimine todo el amoniaco. Secar el precipitado sobre H₂SO₄ (un desecador que contiene el ácido) y luego almacenar en la oscuridad más CaCl₂ (un desecador que contiene seca CaCl₂).

4. Solución pentaciaminoferrato fotoactivado (1%). Tomar 1 g de PCAF en un matraz aforado, añadir 50 ml de agua destilada para que se disuelva y aforar a 100 ml con agua destilada. Transferir la solución a un vaso de precipitados de 200 ml de capacidad independiente e iluminar toda la solución bajo una fuente de luz (60 w lámpara de mesa) durante 1 hora. Por último, se transfiere la solución PCAF fotoactivado en una botella con tapón de rosca de color ámbar. Almacenar la solución en estado oscuro. La solución PCAF debe ser preparado cada día.

5. HCl (0.1 M). Tomar una alícuota de 1.1 ml de HCl (w / v) y completar el volumen hasta 100 ml con agua destilada.

6. NaOH (0.2 M). Pesar 8 g de hidróxido de sodio, se disuelven en 500 ml de agua destilada, y luego completar el volumen hasta 1 litro con agua destilada

7. Solución de Canavanina. Disolver 1 mg de canavanina en 1 ml de tampón Fosfato de Potasio 0.2 M, pH 7.

Canavanina

3. Método

3.1 Preparación del extracto

La preparación de extracto se basa en Cacho *et al.* (2). Tomar 5 g de la muestra finamente molida de una planta, se desgrasa en un extractor Soxhlet con hexano durante 5 h, y después de secar en el aire, añadir 25 ml de 0.1 M HCl. Se agita la mezcla usando un agitador magnético durante 6 h a temperatura ambiente y centrifugar a 4000 g durante 20 min. Guardar el sobrenadante y repetir una vez más la extracción con 20 ml de 0.1 M HCl y combinar con el primer sobrenadante, ajustar el pH 7.0 con solución 0.2 M de NaOH y se afora hasta un volumen final de 100 ml usando Buffer de fosfato 0.2 M de pH 7.0.

3.2 Preparación de la curva de calibración.

1. Tomar 1 ml de solución de canavanina (5-80 μg de canavanina en 0.2 M tampón fosfato de potasio de pH 7.0 en un matraz aforado de 10 ml).
2. A esta solución, añadir 6.5 ml del tampón de fosfato de pH 7.0, 1 ml de Persulfato de Potasio al 1% y 0,5 ml de PCAF acuosa al 1%. Completar el volumen hasta 10 ml con agua destilada. Mezclar bien la solución y después de 15 min se lee la absorbancia a 520-530 nm contra el blanco reactivo (el buffer de fosfato en lugar de la solución canavanina).

3.3 Determinación de *canavanina*

Tomar 1 ml de la extracción de la planta en un matraz aforado de 10 ml en vez de 1 ml de solución de *canavanina* y siga el procedimiento indicado en el apartado 3.2. Determinar la concentración de *canavanina* en la muestra mediante la curva de calibración y expresar los resultados en gramos de materia seca *canavanina* / 100g

Referencia

1. Rosenthal, G. A. (1977) Preparation and colorimetric analysis of L-canavanine. Anal. Biochem. 77. 147-151.
2. Cacho, J., Garcia, M. A., and Ferrando, I. (1989) Selective spectrophotometric determination of canavanine. Analyst 114, 965-968.

ANALISIS FACTORIAL PARA TODAS LAS VARIABLES

Dependent Variable: CEN

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	42.04469630	5.25558704	288.36	<.0001
Error	18	0.32806667	0.01822593		
Corrected Total	26	42.37276296			

R-Square Coeff Var Root MSE CEN Mean
 0.992258 3.403130 0.135003 3.967037

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
FUENTE	2	12.23654074	6.11827037	335.69	<.0001
FORMA	2	28.94847407	14.47423704	794.16	<.0001
FUENTE*FORMA	4	0.85968148	0.21492037	11.79	<.0001

Dependent Variable: MS

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	19.39480000	2.42435000	18.94	<.0001
Error	18	2.30426667	0.12801481		
Corrected Total	26	21.69906667			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MS Mean
0.893808	0.389676	0.357792	91.81778

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
FUENTE	2	2.16695556	1.08347778	8.46	0.0026
FORMA	2	5.31126667	2.65563333	20.74	<.0001
FUENTE*FORMA	4	11.91657778	2.97914444	23.27	<.0001

Dependent Variable: **PROT**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	2907.500400	363.437550	718.33	<.0001
Error	18	9.107067	0.505948		
Corrected Total	26	2916.607467			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	PROT Mean
0.996878	3.169160	0.711300	22.44444

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
FUENTE	2	2721.264156	1360.632078	2689.27	<.0001
FORMA	2	35.962067	17.981033	35.54	<.0001
FUENTE*FORMA	4	150.274178	37.568544	74.25	<.0001

Dependent Variable: FDN

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	9419.403867	1177.425483	736.23	<.0001
Error	18	28.786800	1.599267		
Corrected Total	26	9448.190667			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	FDN Mean
0.996953	3.594489	1.264621	35.18222

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
FUENTE	2	8600.838422	4300.419211	2688.99	<.0001
FORMA	2	292.363267	146.181633	91.41	<.0001
FUENTE*FORMA	4	526.202178	131.550544	82.26	<.0001

Dependent Variable: FDA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	6196.135200	774.516900	530.67	<.0001
Error	18	26.271267	1.459515		
Corrected Total	26	6222.406467			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	FDA Mean
0.995778	5.765994	1.208104	20.95222

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
FUENTE	2	5813.091756	2906.545878	1991.45	<.0001
FORMA	2	174.152822	87.076411	59.66	<.0001
FUENTE*FORMA	4	208.890622	52.222656	35.78	<.0001

Dependent Variable: EE

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	14.76567407	1.84570926	140.22	<.0001
Error	18	0.23693333	0.01316296		
Corrected Total	26	15.00260741			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	EE Mean
0.984207	9.906328	0.114730	1.158148

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
FUENTE	2	7.82827407	3.91413704	297.36	<.0001
FORMA	2	1.37325185	0.68662593	52.16	<.0001
FUENTE*FORMA	4	5.56414815	1.39103704	105.68	<.0001

Dependent Variable: Concentration of Canavanine

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	18	72.38689630	4.02149424	Infty	<.0001
Error	8	0.00000000	0.00000000		
Corrected Total	26	72.38689630			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	conc Mean
1.000000	0	0	3.159630

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
rep	2	0.00071852	0.00035926	Infty	<0.0001
trata	8	72.38342963	9.04792870	Infty	<0.0001
fuelle	2	65.19327407	32.59663704	Infty	<0.0001
forma	2	3.69467407	1.84733704	Infty	<0.0001
fuelle*forma	4	3.49548148	0.87387037	Infty	<0.0001

Análisis de varianza de los tratamientos y componentes en la concentración de canavanina.

Componente	Tratamiento		
	NF	F	E
S	*	*	*
VC	*	*	*
P	*	*	*

S. Semilla, VC. Vaina Completa, P. Pericarpio, NF. No Fermentado, F. Fermentada, E. Extruido. * Diferencia significativa ($p \leq 0.0001$).

Análisis de varianza de los efectos de los tratamientos y componentes en el análisis químico proximal.

Interacción	Variables					
	CEN	MS	PROT	FDA	FDN	EE
Fuente	*	ns	*	*	*	*
Forma	*	*	*	*	*	*
Fuente*Forma	*	*	*	*	*	*

Fuente: semilla, vaina completa, pericarpio. Forma: no fermentada, fermentada y extruida. * Diferencia significativa ($p \leq 0.0001$); ns: no significativo.

Análisis de comparación de medias de tratamientos y componentes sobre el contenido de ceniza.

FUENTE/FORMA	NO FERMENTADO	FERMENTADO	EXTRUIDO
SEMILLA	2.7 ^e	4.6 ^{bc}	2.6 ^e
VAINA COMPLETA	3.0 ^e	4.9 ^b	2.8 ^e
PERICARPIO	4.3 ^c	6.6 ^a	3.7 ^d
PROMEDIO	3.3 ^b	5.4 ^a	3.0 ^c

Análisis de comparación de medias de tratamientos y componentes sobre el contenido de materia seca.

FUENTE/FORMA	NO FERMENTADO	FERMENTADO	EXTRUIDO
SEMILLA	90.9 ^{ef}	93.0 ^{ab}	91.0 ^{def}
VAINA COMPLETA	91.4 ^{cdef}	92.0 ^{bcd}	93.1 ^a
PERICARPIO	91.8 ^{cde}	92.1 ^{abc}	90.5 ^f
PROMEDIO	91.4 ^b	92.4 ^a	91.5 ^b

Análisis de comparación de medias de tratamientos y componentes sobre el contenido de proteína.

FUENTE/FORMA	NO FERMENTADO	FERMENTADO	EXTRUIDO
SEMILLA	38.1 ^a	33.2 ^c	35.7 ^b
VAINA COMPLETA	22.2 ^d	23.4 ^d	15.0 ^e
PERICARPIO	9.2 ^g	13.2 ^{ef}	11.6 ^f
PROMEDIO	23.2 ^a	23.2 ^a	20.8 ^b

Análisis de comparación de medias de tratamientos y componentes sobre el contenido de FDN

FUENTE/FORMA	NO FERMENTADO	FERMENTADO	EXTRUIDO
SEMILLA	12.7 ^f	14.7 ^g	12.3 ^g
VAINA COMPLETA	33.8 ^e	31.2 ^f	40.8 ^d
PERICARPIO	66.3 ^a	45.6 ^c	58.9 ^b
PROMEDIO	37.6 ^a	30.5 ^c	37.3 ^b

Análisis de comparación de medias de tratamientos y componentes sobre el contenido de FDA

FUENTE/FORMA	NO FERMENTADO	FERMENTADO	EXTRUIDO
SEMILLA	2.9 ^g	2.0 ^g	2.2 ^g
VAINA COMPLETA	21.8 ^e	18.1 ^f	26.5 ^d
PERICARPIO	45.6 ^a	32.2 ^c	37.0 ^b
PROMEDIO	23.4 ^a	17.4 ^c	21.9 ^b

Análisis de comparación de medias de tratamientos y componentes sobre el contenido de EE.

FUENTE/FORMA	NO FERMENTADO	FERMENTADO	EXTRUIDO
SEMILLA	1.056 ^c	1.656 ^b	3.040 ^a
VAINA COMPLETA	1.036 ^c	0.776 ^{cd}	0.660 ^d
PERICARPIO	0.540 ^d	1.066 ^c	0.590 ^d
PROMEDIO	0.877 ^c	1.666 ^b	1.430 ^a

Arreglo de los tratamientos.

Factor B	Factor A		
Testigo	T1	T2	T3
Fermentado	T4	T5	T6
Extruido	T7	T8	T9