
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS



**DIGESTIBILIDAD "in situ" Y EFECTO DE LOS
GLUCOSIDOS CIANOGENICOS CONTENIDOS EN
EL FRIJOL TERCIOPELO
(*Stizolobium deeringianum* B.)**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
ROSALINA SÁNCHEZ MORALES
DIRECTOR DE TESIS: M.C. LUCIA BARRIENTOS RAMÍREZ
A S E S O R E S
M.C. JUAN DE JESÚS TAYLOR PRECIADO
M.C. GERARDO SIMÓN ESTRADA MICHEL
LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO. MARZO DE 1998

CONTENIDO

	Pags.
Resumen	X
Introducción	1
Planteamiento del Problema	10
Justificación	11
Hipótesis	12
Objetivos	13
Material y Métodos	14
Resultados	20
Discusión	34
Conclusiones	38
Bibliografía	39

AGRADECIMIENTOS

A DIOS:

Por haberme dado la oportunidad de terminar mi formación académica y ayudarme a derribar cada uno de los obstáculos que hubo durante este trayecto.

A MIS PADRES:

Sr. Ubaldo Sánchez Marquez; por su dedicación, apoyo y gran interés para forjarme como toda una profesionista.

Sra. Rosalina Morales Nuñez; por su dedicación, apoyo y paciencia en todos estos años de estudios.

Y a ambos por estar con migó en los días buenos y malos.

A MIS HERMANOS:

José Luis; por tú apoyo y por el interés que demostraste hacia mi en estos 5 años de carrera.

Rigoberto; por tú apoyo y cariño.

Carlos Alberto; por tú cariño que me has brindado. Y por que los 3 estuvieron conmigo durante los tiempos asoleados y sombríos.

A MIS ABUELOS:

Sr. Luis Sánchez Mayorga (q.e.d.), aunque ya no estas aquí siempre me brindaste tú apoyo.

Sra. Guadalupe Marquez Calderón; por su cariño e interés en mi formación.

Sr. José Morales y Ma. De Jesús Nuñez; por su apoyo durante mi vida de estudiante.

A MI BISABUELA:

Sra. Soledad Torres Magaña (q.e.d.), aunque tú ya no estas con nosotros fuiste la que me impulsaste para tomar la alternativa de estudiar MVZ.

A MI NOVIO:

Ing. Agronomo Raúl E. García Casillas, por tú gran cariño e interes por ver realizados mis sueños de ser MVZ.

A MIS AMIGOS:

Los pasantes de M.V. Claudia E. Espinosa Robles, Leonor L. Chucuan Ayub, Elidía Jiménez Rojas, Mario D. González Barajas, Enrique Orozco Amador.

Los pasantes de Agronomía Lolita, Chany, Martha, Vicky, Vere, Hugo y Familia.

Los compañeros del Instituto de Madera Celulosa y Papel, en especial a mi Directora de Tesis MC Lucia Barrientos Ramírez, y al Dr. Dellamary, así como a los Q.F.B. Leticia Amaya, Q.F.B. Francisco, Q.F.B. Ricardo, Q.F.B. Ángel y a los prestadores de servicio Remigio y Ernesto. Y a todos y cada uno de los colaboradores de dicho centro.

AL H. JURADO:

A los MVZ David Ávila Figueroa y David Liceaga por formar parte en este día tan especial en mi vida.

A la MVZ Waldina a los tres les doy la gracias por dedicarme su tiempo.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES: En una forma muy especial ya que en el tiempo de la realización de esta investigación estuvieron muy dedicados a mí. Los amo.

A MIS HERMANOS: Por estar a mi lado. Los amo.

A MI BISABUELA: Donde quiera que estés. Te quiero.

A TI RAÚL: Te quiero.

A TI SONIA Y A TU FAMILIA: Por tu enorme apoyo y cariño.

A MIS AMIGAS:

Marcela A. Cardona Becerra (q.e.d.), pato aunque ya no estas aquí tu recordaras que desde el primer día que comenzamos hacer planes para cuando no tituláramos nos íbamos a dedicar nuestra tesis, desgraciadamente ya no estas aquí pero yo cumplí con la meta de las dos y mira hoy estoy cumpliendo otra de nuestras metas el de ser MVZ y esto va por ti, por Marcela Ruelas y por Ma. Lourdes.

Marcela Ruelas Villalobos (q.e.d.), aunque tú tampoco estas aquí hoy se ve realizada mi meta y también te la brindo a ti amiga.

Ma. Lourdes González Santiago (q.e.d.), hoy estas en un mejor lugar nena pero donde estés te digo lo logramos aunque ustedes haya y Yo por acá, siempre estarán presente en mi vida y desarrollo profesional.

A las tres las extraño aunque sea para pelear pero en su momento fueron lo más importante como amigas y ustedes supieron que nos profesábamos cariño y amor.

RESUMEN

Existen aproximadamente 500 géneros y 1100 especies de leguminosas en el mundo, de las cuales en América se encuentran unas 400. Las leguminosas son una buena fuente importante de nutrientes y pueden sustituir la proteína en las dietas basadas en granos, cereales y almidones. La proteína se encuentra principalmente en los cotiledones en cantidades que varían de 17 a 40%.

Se propuso como materia prima al frijol terciopelo, debido a la cantidad de proteína que tiene, de 25.5%, y lo hace considerarlo como una fuente alterna de alimento no convencional, con el fin de evaluar el potencial nutricional del frijol terciopelo (*Stizolobium deeringianum*) y los efectos de los factores antinutricionales (glucósidos cianogénicos), en el consumo de dicha leguminosa, en su fase de semilla cruda y semilla cocida, se determinó un análisis químico proximal, así como la digestibilidad "in situ", empleándose dos borregos de la raza pelibuey con un peso aproximado de 35 kg, previamente fistulados los cuales se les oferto un total de 1 kg, de alimento constituido por 800 grs, de alimento comercial y 200 grs, de harina de frijol terciopelo durante 15 días.

La determinación de los glucósidos cianogénicos, contenidos en la semilla de frijol terciopelo, fue llevado a cabo en una prueba de toxicidad en ratas, por ser esta la especie más utilizada para la investigación biomédica por su bajo costo de mantenimiento, facilidad de manejo y su amplia gama de procesos experimentales, para este trabajo se utilizó la línea Wistar dichos animales, se sometieron a 10 y 20 días de tratamiento, de esto se evaluó la ganancia de peso, consumo de alimento, para la dosificación de glucósidos cianogénicos se realizó un extracto acuoso de semilla de frijol terciopelo, sacrificando en este mismo tiempo las ratas para ver los daños causados por los mismos. Dentro de los resultados a los 10 días de tratamiento el daño más severo se presentó en los grupos tratados con semilla de frijol terciopelo en su fase cruda, donde el páncreas resultó dañado. A los 20 días de tratamiento el daño más severo se presentó en el riñón en los grupos tratados con glucósidos cianogénicos de semilla cruda, y no así en la semilla cocida.

Es de resaltar la importancia de esta leguminosa, debido a la alta cantidad de proteína que presenta, y a su baja toxicidad con la semilla tratada, la cual hace menos severo el daño que produce en esta fase.

INTRODUCCIÓN

En México existe una gran diversidad de especies vegetales y complejidad ecológica con un alto potencial productivo. Existen aproximadamente 500 géneros y 1100 especies de leguminosas en el mundo, de las cuales en América se encuentran unas 400. El nombre de la familia de clase leguminosas "leguminosae" se deriva de la palabra legumbre, nombre que se le da por el tipo de fruto (vaina), característico de esta familia. ^(8,24,30)

En algunos países estas especies figuran entre los alimentos consumidos en gran cantidad. Las leguminosas por su alto contenido en proteínas, bajo costo y buen rendimiento han sido consideradas como una de las soluciones más reales a los problemas nutricionales de estos países desarrollados y poseen una gran riqueza silvestre que son utilizadas como gran reserva proteica para aprovecharlas en alimentación del hombre o de los animales. Las leguminosas se distribuyen en todo el mundo, pero la mayoría de especies se localizan en los trópicos y subtrópicos, sin embargo la botánica tropical ha sido poco estudiada por lo que existe un gran número de especies prometedoras sin explotar, que requieren investigación y estudio. ^(36,37)

Estas especies al igual que los cereales (gramíneas) son las plantas más antiguas cultivadas por el hombre, ya que su historia se remonta al neolítico, época en que el hombre pasaba de la caza, a la recolección de frutos, adoptando nuevos modos

de vida basados en comunidades agrícolas. Se han encontrado rastros en excavaciones arqueológicas que permiten afirmar que estas plantas han constituido alimento para el hombre y sus animales domésticos durante 8000 años aproximadamente, la alfalfa fue probablemente la primer especie forrajera domesticada por el hombre. ^(3,4,23)

Las leguminosas son una fuente importante de nutrimentos y pueden sustituir la proteína en las dietas basadas en granos de cereales y almidones. La proteína se encuentra principalmente en los cotiledones en cantidades que van del 17 a 40%, estos cultivos son una fuente importante de fósforo, hierro y vitaminas solubles en agua. Las proteínas de las leguminosas son deficientes en aminoácidos azufrados pero son ricas en lisina; las concentraciones de estos nutrimentos son afectados por factores genéticos y ambientales. La proteína de las semillas de leguminosas es relativamente indigerible y tiene un valor biológico pobre, que puede ser mejorado con el cocimiento y la suplementación de metionina. ^(4, 21, 32, 34)

Estas especies ingeridas crudas ejercen una acción tóxica sobre los animales en experimentación, que incluso pueden llegar a producir la muerte. Los tratamientos térmicos disminuyen su toxicidad y mejoran su valor nutricional, factor que generalmente explica la destrucción de factores termolábiles, tales como inhibidores de proteínas, hemaglutininas etc., presentes en las semillas de leguminosas.

También se hallan presentes otros factores tóxicos como los glucósidos cianogénicos que están adheridos a una enzima que es capaz de hidrolizarlos para dar ácido cianhídrido (HCN).
(3,18,20,26,41)

Otra de las características de las leguminosas es que desarrollan nódulos o pequeñas bacterias nitrificantes que a través de precursores bioquímicos captan al nitrógeno atmosférico para fijarlo al suelo, tomarlo para su propia alimentación o cederlo de manera asimilable a especies vegetales vecinas por accidente, o por asociación simbiótica. Además de la fijación de nitrógeno ofrecen otros beneficios importantes tales como, mantener y mejorar las propiedades físicas del suelo, lo mantiene cubierto, lo cual reduce la erosión del mismo, la mayoría de estas especies son usadas como abono verde, tienen raíces profundas lo cual previene, o alivia la compactación en suelos cultivados intensivamente. (6,13,38)

En las montañas de Escocia se evaluaron diferentes leguminosas por sus propiedades como fuentes de nutrientes y como cultivos de cobertura. Dentro de estas especies se evaluó *Stizolobium deeringianum* (frijol terciopelo), especie seleccionada en base a su rendimiento vegetativo, contenido de nutrientes y cobertura del suelo, por lo que se sugiere como una posible fuente de nutrientes, materia orgánica y cultivo de cobertura. El frijol terciopelo en México, además de utilizarse como forraje para la alimentación animal y el grano para el

consumo humano, en algunas regiones se usa como abono verde o como aditivo para café. ⁽⁴⁵⁾

Esta especie de frijol terciopelo es nativo de la India y fue introducido a Florida, Estados Unidos en 1890. Se caracteriza por su crecimiento rápido, exuberante, alta producción en grano y no es muy exigente al tipo de suelo para su establecimiento. ⁽⁴³⁾ El frijol terciopelo es de ciclo veraniego y florece entre los 70 y 100 días, sus flores son de color blanco y las hay de color marrón oscuro, las hojas son grandes y trifoliadas, las vainas son cortas anchas y comprimidas de maduración irregular, con semillas grandes ovaladas y de varios colores.

El frijol terciopelo, es una leguminosa cuya semilla tiene un amplio potencial alimenticio para rumiantes, e inclusive para seres humanos, contiene un alto porcentaje de proteína que fluctúa entre el 18 y 30% además de otros nutrimentos de importancia nutricional.

De acuerdo con datos bibliográficos la semilla de frijol terciopelo tiene la siguiente composición química humedad 87%, proteína cruda 24-31.1%, fibra cruda 5.3-7.0%, grasa cruda 3.8-4.5%, cenizas 2.9-4.4%, carbohidratos 56.0-61.0%. Por tal razón dicha semilla puede ser usada como fuente de alimento en los trópicos. Los factores antinutricionales presentes, no constituyen un problema si el grano es cocido antes de consumirlo. Farmacológicamente el factor de 3-4 Dihydroxi-fenilalanina (L-DOPA) es potencialmente tóxico si se consumen grandes cantidades. ⁽⁴³⁾

ECOLOGÍA:

En Tamulté de las Sabanas, Tabasco, existen agroecosistemas de rotación, su establecimiento es de abril-mayo. Esta leguminosa trepa rápidamente sobre las cañas de maíz, de la cosecha anterior y después de dos meses cubre totalmente el terreno, permanece por seis o siete meses y al final de la época lluviosa noviembre-diciembre, después del llenado de la vaina del *Stizolobium* se "chapea" y se deja sobre el terreno. Posteriormente se realiza la siembra de maíz a macana, asociados con calabaza. El *Stizolobium* se corta con un machete durante el crecimiento inicial del maíz para que este último pueda crecer sin problemas. El maíz se cosecha entre abril-mayo, dejando a esta especie que trepe sobre el rastrojo de maíz y vuelva a cubrir completamente el terreno, hasta iniciar nuevamente el ciclo.⁽¹²⁾

Análisis químico proximal:

Este análisis señala un aproximado valor nutricional de un vegetal, se efectúa con una muestra a la cual se le hicieron tres repeticiones, para tener un dato más exacto. A la primera se le somete a calentamiento (100-110°C) por varias horas con el objeto de determinar la humedad (su complemento que es la materia seca, se calcula por diferencia); posteriormente

se calcina (500-600°C) para determinar la materia mineral (parte que desaparece se considera como materia orgánica).

En seguida se determina la proteína cruda, que no es más que una determinación de nitrógeno total liberado en una digestión química, multiplicado por el factor de 6.25. Posteriormente se realiza la extracción con un disolvente orgánico que arrastra al llamado extracto etéreo o grasa cruda y que comprende los aceites, grasas y otros materiales liposolubles como los pigmentos.

El material sobrante se le expone a una digestión ácida seguida de una alcalina, quedando como remanente la llamada fibra cruda. Este análisis determina parámetros proximales de los valores nutritivos del alimento como: proteína cruda (PC), fibra cruda (FC), extracto etéreo (EE), cenizas (C), humedad (H), elementos libres de nitrógeno (E.L.N.).^(1,2,7,10,35)

A continuación se describe en el cuadro 1 el comparativo del frijol terciopelo con otras leguminosas.⁽³²⁾

	H	EE	PC	FC	C	ELN
<i>Prosopis juliflora</i>	1.32	2.13	8.45	27.50	3.63	53.34
<i>Acacia farnesiana</i>	3.82	3.30	25.15	18.28	3.80	49.42
<i>Acacia pennatula</i>	8.49	4.18	28.11	18.40	4.85	43.49
<i>Acacia coelliacantha</i>	7.27	2.22	31.15	14.12	3.34	49.17
<i>Mucuna argyrophylla</i>	8.92	3.02	24.52	1.74	3.29	67.42
<i>Bahuinia purpurea</i>	2.15	15.12	30.62	4.08	3.87	45.56
<i>Leucaena pulverulenta</i>	65.70	0.96	37.84	12.92	5.53	42.71
<i>Phaseolus caracaya</i>	8.90	2.37	22.86	30.99	5.96	37.82
<i>Lysiloma bahamensis</i>	14.90	6.14	35.17	18.79	7.29	30.61
<i>Stizolobium deeringianum</i>	10.2	3.2	25.6	7.9	3.1	50.00

Digestibilidad " in situ ":

Este análisis es importante realizarlo ya que da el parámetro del alimento digerido y varía de acuerdo con factores propios del alimento y/o por efecto de los animales que lo consumen. En general, la digestibilidad de los granos de cereales y las leguminosas así como otras fuentes de azúcares o almidones es elevada para todas las especies de animales de granja, siendo posiblemente los menos digestibles la avena y la cebada, ambos por su elevada porción fibrosa.^(40,41)

Factores Antinutricionales :

El *Stizolobium deeringianum* B. Contiene algunos factores antinutricionales que hacen que disminuya el consumo de alimento de esta especie, siendo uno de ellos los glucósidos cianogénicos, que afectan el consumo crudo de este frijol.

El mundo vegetal es la fuente más importante de glucósidos cianogénicos (HCN) para los animales, son compuestos orgánicos que contienen azúcar y que son capaces de liberar cianuro por hidrólisis. En la planta intacta no se produce la liberación de cianhídricos sino que esta acción comienza hasta que los tejidos de las plantas se lesionan e inicia su descomposición. Las plantas de escaso desarrollo, marchitas o las que son lesionadas por heladas, el granizo o se pisotean son considerablemente más peligrosas que los ejemplares intactos. El tratamiento con abonos nitrogenados o con herbicidas aumentan también su contenido. ⁽⁸⁾

EXPERIMENTACION CON RATAS:

La Transaminasa Glutámico Oxalacética (TGO), es una enzima relacionada con la transaminación de los aminoácidos, esta presente en los sueros sanguíneos, se utiliza en el diagnóstico del infarto agudo del miocardio y en la enfermedad hepática aguda. No se presenta solamente en las células hepáticas sino también en miocardio y músculo esquelético.⁽³¹⁾

Se advierten cifras superiores de TGO en sueros en las alteraciones celulares hepática, pero también en enfermedades al miocardio y/o músculo esquelético (mioglobinuria, tétanos y trabajo muscular duro). Se encuentra la enzima en concentraciones elevadas en suero. La TGO no es por consiguiente una enzima específica del hígado, también los eritrocitos son ricos en TGO por lo cual solo se utiliza suero exento de hemólisis para determinar la actividad de la enzima. Debe señalarse que solo cabe esperar valores altos de enzimas en sangre cuando esta afectado el parénquima del hígado.⁽³¹⁾

La TGO se encuentra marcadamente en formas diferentes en las mitocondrias y en el citoplasma.⁽³¹⁾

Principales fuentes de Transaminasa Glutámico Oxalacética (TGO):

Las concentraciones más elevadas se encuentran en las células musculares en cantidades ligeramente menores en el hígado y en el músculo cardíaco. La TGO no es específica de algún órgano.⁽²⁰⁾

Para su experimentación se emplearon algunas variedades domésticas y albina de la rata gris o noruega (*Rattus, norvegicus*) originaria del Viejo Mundo, es quizás la especie más frecuente empleada en la investigación biomédica; su poco costo de mantenimiento facilidad de manejo, relativa rusticidad e indicación para una amplia gama de procesos experimentales.

Existen distintos tipos de ratas, clasificables en función de sus características ecológicas (libres de gérmenes) y genéticas. Entre las estirpes más empleadas cabe citar la Sprague-Dawley, la Long-Evans y la Wistar. Esta última que tiene así mismo la capa blanca posee una cabeza gruesa, cola más corta que el cuerpo, las orejas largas y una resistencia a algunas enfermedades infecciosas superior a la de otras variedades. ^(13,16),

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A las leguminosas se les ha empleado en la alimentación animal desde hace miles de años, las cuales son consideradas como un importante reservorio de nutrimentos. En nuestro país se han realizado muy pocos estudios nutricionales con leguminosas no convencionales, por lo que existe un escaso conocimiento de estas leguminosas.⁽³⁰⁾

Actualmente del *Stizolobium deeringianum* (frijol terciopelo) sólo se reportan trabajos sobre utilización de cobertura, sin embargo, no se han realizado trabajos sobre evaluaciones nutricionales y de factores antinutricionales para animales monogástricos. Esto ha sido una alternativa que después de estudios como evaluaciones nutricionales y factores antinutricionales, sean utilizadas otras leguminosas, que igual que el frijol son una fuente alterna de alimentos no convencionales. La mayoría de los cultivos de frijol terciopelo están distribuidas en el estado de Tabasco y Mérida, donde su cultivo es silvestre y muy abundante.

JUSTIFICACIÓN

En México existe una competencia indirecta por la disponibilidad de proteína entre el hombre y los animales, de esta práctica se hace necesario evaluar ingredientes poco comunes que aporten proteína para la alimentación animal.

Dentro de las leguminosas está el frijol terciopelo se da en forma silvestre en las regiones del sureste de Puebla, sur de Veracruz, sierra y centro de Tabasco, así como en Yucatán. Sin embargo en el estado de Jalisco se esta logrando introducir como cultivo alterno para su posterior aprovechamiento. Si a todo lo anterior se le agrega el incremento poblacional permanente que obliga a aumentar la producción de proteína de origen animal utilizando alimentos poco comunes para disponer de una mayor cantidad de ingredientes que cubran los requerimientos de los animales y por ende de los humanos.

Con base a lo anterior resulta importante realizar estudios orientados a conocer y aprovechar estos recursos naturales, para promover su cultivo e incorporarlos a la alimentación humana o animal.

CUCBA



ESTADÍSTICA

HIPÓTESIS

Dado el alto contenido de nutrientes en el frijol terciopelo y si el someterlo a tratamiento físico como la cocción disminuye su contenido de glucósidos cianogénicos, el frijol terciopelo pudiera resultar un probable sustituto de harina de soya y grano de sorgo.

OBJETIVOS**Generales :**

1. Evaluar las características nutricionales y la Digestibilidad de la semilla cruda y cocida del frijol terciopelo (*Stizolobium deeringianum* B.)

2. Determinar la toxicidad del frijol terciopelo por la presencia de glucósidos cianogénicos.

Particulares :

1.- Determinar las características nutricionales del frijol terciopelo mediante el Análisis Químico Proximal.

2.- Determinar la digestibilidad "in situ" en borregos Pelibuey, tanto de semilla cruda como cocida del frijol terciopelo.

3.- Determinar la toxicidad de glucósidos cianogénicos consumidos por ratas wistar en la semilla cruda y cocida del frijol terciopelo.

MATERIAL Y MÉTODO

Este trabajo se llevo a cabo alternamente en las Instalaciones del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, División de Ciencias Veterinarias en el Laboratorio de Morfofisiología y Áreas Experimentales y en el Departamento de Madera Celulosa y Papel (DMCyP), en el Laboratorio de Química de la Madera de la Universidad de Guadalajara.

El frijol terciopelo se obtuvo en el Estado de Yucatán en el "Instituto Tecnológico Agropecuario No. 2" Ing. José Navarrete Ruíz y se traslado al DMCyP.

La cocción de la semilla de frijol se realizo en 3 litros de agua para 1 kilogramo de frijol durante 2 horas, pasado este tiempo se procedio a la reducción de tamaño de partícula del frijol mediante un molino electrónico marca Wiley con malla del no. 2 en semilla cruda y cocida, se efectúo un tamizado para darles uniformidad a las partículas a analizar.

Análisis Químico Proximal:

Este análisis se realizo en el Laboratorio de Nutrición Animal de dicho Centro, en donde se determinó la muestra cruda y cocida de acuerdo a las técnicas descritas en la A.O.A.C. 1980.

Digestibilidad "in situ":

Se llevo a cabo en las Instalaciones del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, en la División de Ciencias Veterinarias, en las áreas experimentales para lo cuál se contaron con dos borregos de la raza pelibuey, con un peso aproximado de 35 kg., cada uno, previamente fistulados a nivel ruminal en forma permanente, durante 15 días se les dio una dieta que contenía 800 grs de alimento comercial más 200 grs de harina de frijol terciopelo para adaptación de la flora microbiana del rumen.

La alimentación se realizó cada 24 horas, después se procedió a la determinación del coeficiente de digestibilidad (C.D.), se realizó de acuerdo a la técnica de la bolsa de nylon, que consistió en pesar 5 grs de harina de frijol terciopelo para cada una de las bolsas y así tener un total de 25 grs de harina de frijol.

Posteriormente se cerraron las bolsas con una liga en forma individual y se colocaron en un tubo de látex amarrándose con un hilo de cáñamo, con un amarre tipo cochinilla y se procedió a colocarlos dentro del rumen de los animales, sujetándolas en el tapón de la fístula de manera que quedaran dentro del rumen. Se colocaron en total 5 bolsas de semilla cruda y 5 bolsas de semilla cocida, con un período de incubación de 72 horas, al término de este tiempo se extrajeron las bolsas lavándose inmediatamente para su secado posterior en una estufa

a 100°C, durante 48 horas, estando listas para el análisis químico próximoal.⁽²⁹⁾

A continuación se describe la fórmula empleada para la cuantificación del coeficiente de digestibilidad (CD) (tasa de desaparición) aplicada en esta investigación.

Formula :

C.D.% =

$$\frac{\text{Peso de la muestra antes de incubación} - \text{Peso de la muestra después de incubación}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

Toxicidad de Factores Antinutricionales Glucósidos Cianogénicos:

En el laboratorio de Morfofisiología de la División de Ciencias Veterinarias se realizó la medición de toxicidad de los glucósidos cianogénicos procedentes de la semilla cruda y cocida en diferentes dosis y tiempos. La determinación de glucósidos cianogénicos se hizo por medio de espectrofotometro.

Se pesaron 15 grs de la muestra de frijol terciopelo y se colocaron en un matraz Kjeldahl de 800 ml, agregaron 200 ml, de agua acidulada con ácido clorhídrico, unas piedras de vidrio y parafina (antiespumante). Se conecto el matraz al destilador de Kjeldahl. En el matraz colector se agregaron 25 ml, de agua.

Se dejó reposar 2 hrs. Al cabo de este tiempo se empezó lentamente la destilación cuidando que no pase la espuma al matraz colector. Se destilaron aproximadamente 100 ml. Se aforó el destilado a 100 ml, con agua. Se tomó una alícuota de 25 ml, y se colocaron en un matraz volumétrico de 50 ml, se agregaron 1 ml, de solución de cloramina, se agitó, se colocó una tapadera y se dejó reposar durante 1 minuto. Se agregaron 3 ml, de solución reactiva. Se aforó con agua y se leyó después de 8 minutos en el espectrofotómetro (rayos ultra violetas) 570 nm (nanómetros), contra un blanco.⁽⁴¹⁾

Se emplearon 12 ratas y 3 testigos de la línea Wistar, las cuales se mantuvieron en 5 jaulas de 3 individuos cada una, con cama de biruta que se les cambió cada 3 días. se les dio una dieta con alimento tipo pellet y la distribución de las jaulas realizó como a continuación se describe: 2 jaulas se les dio agua con 4.2 ml, de glucósidos cianogénicos de semilla cruda, 2 jaulas agua con 5.4 ml, de glucósidos cianogénicos de semilla cocida y 1 jaula con el grupo testigo, tomando solo 50 ml, de agua. La jaula (1) y (2) se sacrificaron a los 10 días y las jaulas (3) y (4) a los 20 días junto con el grupo testigo.

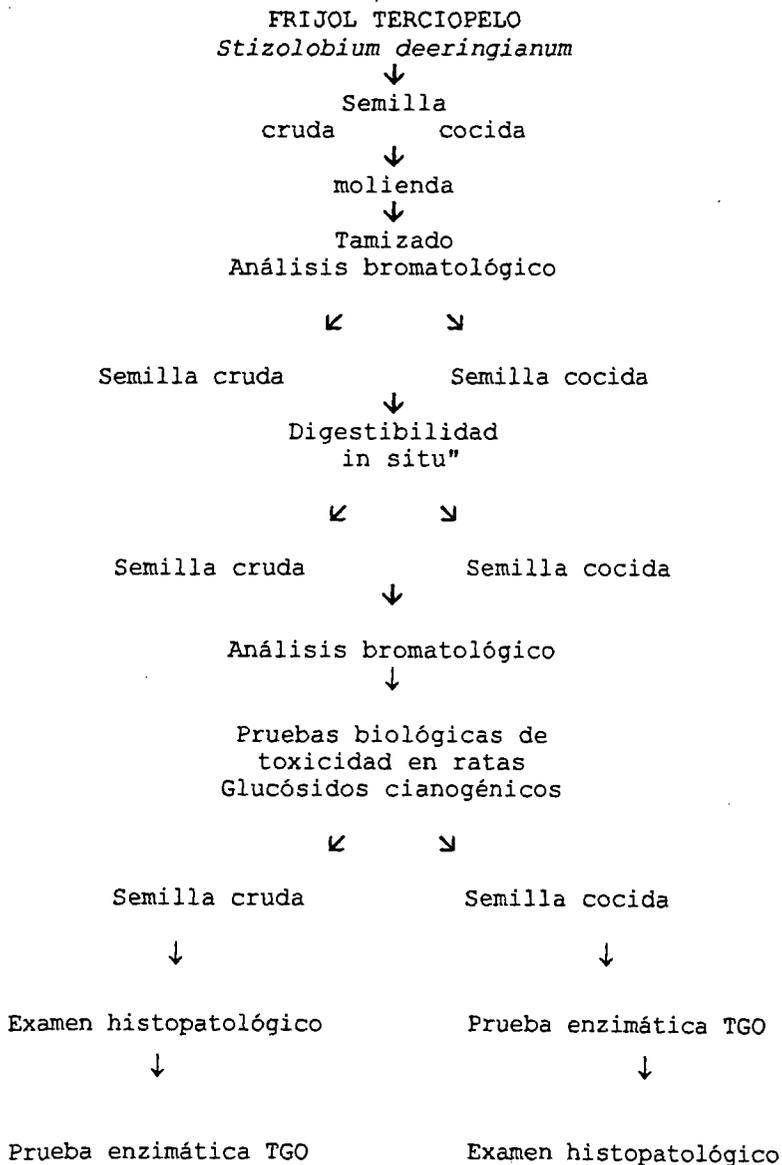
Transcurrido el período de tiempo se sacrificaron las ratas por el método de cámara de gases y se procedió a la toma de muestras de los siguientes tejidos; hígado, riñón, pulmón y páncreas. Para posteriormente remitirlos al Centro de Estudios en Patología Animal (CEPA), para el examen histopatológico.

Así como también se tomaron las muestras sanguíneas para remitirlas al laboratorio de análisis clínicos par la prueba de TGO.

Los resultados obtenidos se les aplico los métodos de desviación estándar y análisis de varianza para saber la diferencia de $P < .05$.

A continuación se muestra el diagrama de la metodología empleada durante la experimentación.

DIAGRAMA DE LA METODOLOGÍA



RESULTADOS

Análisis químico proximal:

El análisis fue realizado en semilla cruda y cocida observándose variaciones en la cantidad de proteínas que disminuyó con el tratamiento de cocción, así como, la fibra también disminuyó de 7.9 a 5.2% debido al tratamiento anteriormente citado.

Cuadro 1 Resultado porcentual del análisis bromatológico de la semilla de frijol terciopelo en su fase cruda y cocida (% base seca).

	Cruda	Cocida
Humedad	10.2	20.7
Cenizas	3.1	0.18
Proteína cruda	25.6	16.04
Grasa cruda	3.2	4.54
Fibra cruda	7.9	5.2
E.L.N.	50.0	53.0

DIGESTIBILIDAD "in situ":

La determinación de la digestibilidad in situ, mostró una disminución en materia seca de 16.2%, Proteína cruda un 2.9% en semilla cocida, en el cuadro no.2 se muestra los resultados obtenidos.

Cuadro 2 Análisis de la Digestibilidad *in situ* de la semilla de frijol terciopelo en su fase cruda y cocida. (% en base seca).

	Cruda	Cocida
Materia Seca	99.8	83.6
Materia Orgánica	82.5	83.5
Proteína Cruda	16.0	13.1
Fibra Cruda	19.9	14.4

PRUEBA BIOLÓGICA:

Consumo de alimento: En general en los cinco grupos tratados no existió una diferencia muy marcada en el consumo del alimento suministrado. (ver gráfica 1 y 2).

Consumo de agua: Dentro del consumo de agua se observó que en la jaula no. 2 con 5.4 ml, de glucósidos cianogénicos de semilla cocida fué la que más se incremento. (ver gráfica 3).

En comparación con el consumo de agua entre semilla cruda y cocida, se puede observar que la semilla cruda fué la que registro mayor consumo de agua (ver gráfica 4).

Ganancia de peso: En la ganancia de peso no existió una diferencia marcada entre las 5 jaulas. (ver gráficas 5, 6 y 7). En cambio el último de los datos registrados de peso si hubo diferencia y el peso menor lo registró la jaula no. 2. (ver gráfica 8). Para la ganancia de peso no existio diferencia estadística significativa entre los individuos tratados con diferentes dosis. (ver gráfica 9).

ANALISIS HISTOPATOLOGICO:

La prueba toxicológica fue realizada con extractos a diferentes porcentajes de glucósidos cianogénicos (factores antinutricionales) a 10 días de tratamiento, en su fase (cruda y cocida). Se observó que el único cambio, fue en semilla cruda a los 10 días, donde se afectó el pancreas. (ver cuadro 3).

El experimento realizado a los 20 días en semilla cruda y cocida mostró menos cambios severos en el consumo de semilla cocida, observandose que con el cocimiento disminuyen, los glucósidos cianogénicos. (ver cuadro 4).

Así como también se muestran los resultados obtenidos de la prueba de TGO. (ver cuadro 5).

Cuadro 3 Determinación de exámen histopatológico, a los 10 días de iniciado el tratamiento efectuado en ratas con semilla de glucósidos cianogénicos en su fase cruda, cocida y testigo.

Tratamiento	%HCN (ml)	Hígado	Riñón	Pancreas
Cruda	4.2	Degeneración turbia discreta	Amiloidosis discreta en lumen tubular	Disociación de acinis con vacuolización moderada
Cocida	5.4	Degeneración turbia discreta	Amiloidosis discreta en lumen tubular	Sin cambios
Testigo		Hepatitis discreta		

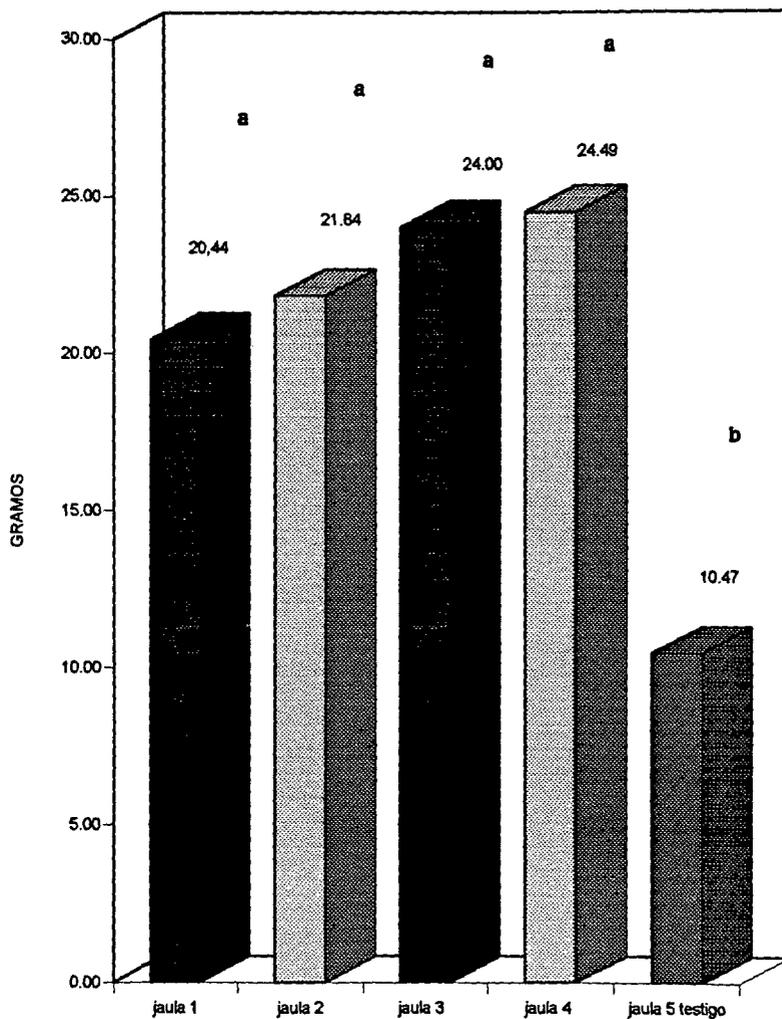
Cuadro 4. Se muestran los resultados obtenidos en los tratamientos de glucósidos cianogénicos de semilla cruda, cocida y testigo; a los 20 días de tratamiento.

Tratamiento	%HCN (ml)	Hígado	Riñón	Nódulo linfático
Cruda	5.4	Hepatitis turbia severa	Nefrosis turbia discreta con presencia de un pigmento similar a la hemosiderina	Con presencia de un pigmento similar a la hemosiderina
Cocida	4.2	Hepatitis moderada	Nefrosis moderada sin pigmentación	Con presencia de poco pigmento
Testigo		Hepatitis mononuclear discreta periportal		Hiperplasia mononuclear discreta

Cuadro 5 Muestra los resultados obtenidos de la prueba enzimática de TGO a los 20 días de tratamiento.

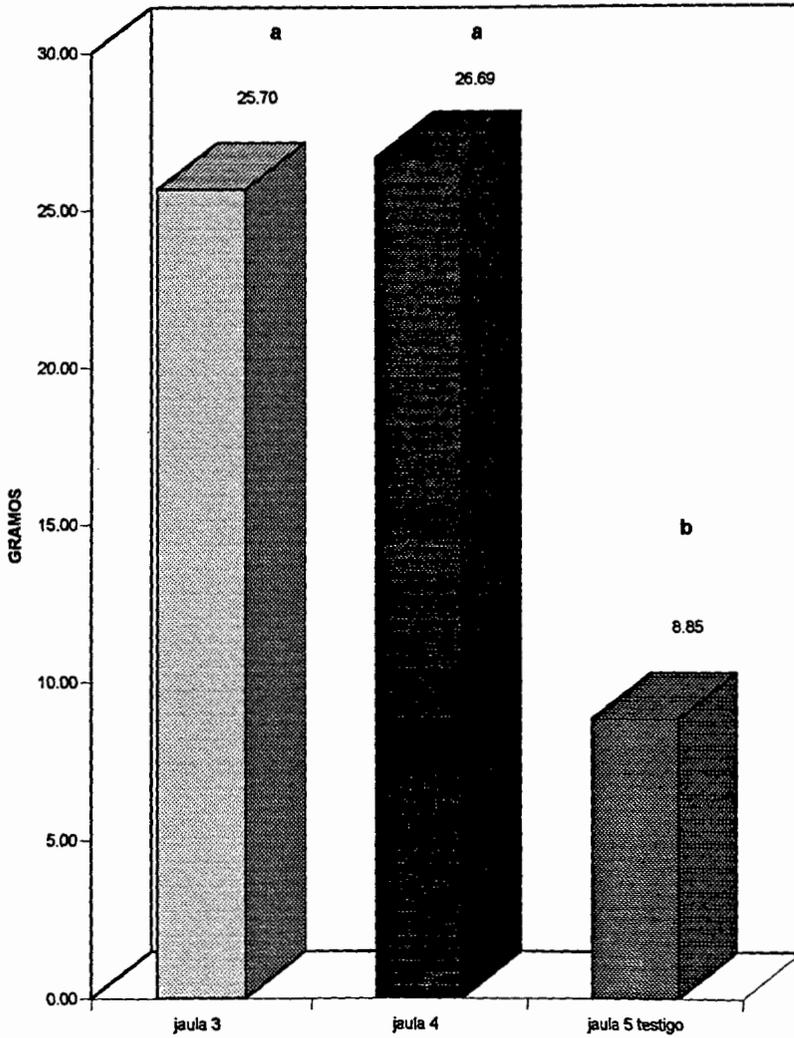
Tratamiento	Resultado (mg/ml)
Cruda	60
Cocida	65

Gráfica 1 Consumo de alimento durante los primeros 10 días.



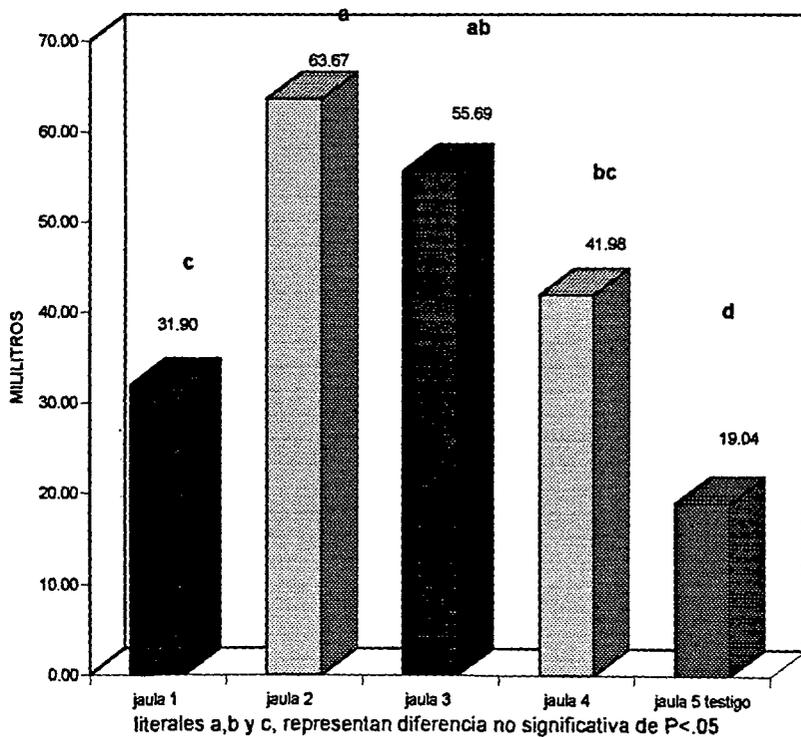
literales a,b, representan diferencia no significativa de $P < 0.05$

Gráfica 2 Consumo de alimento de las ratas a los 10 días de tratamiento con semilla cruda y cocida más un testigo.

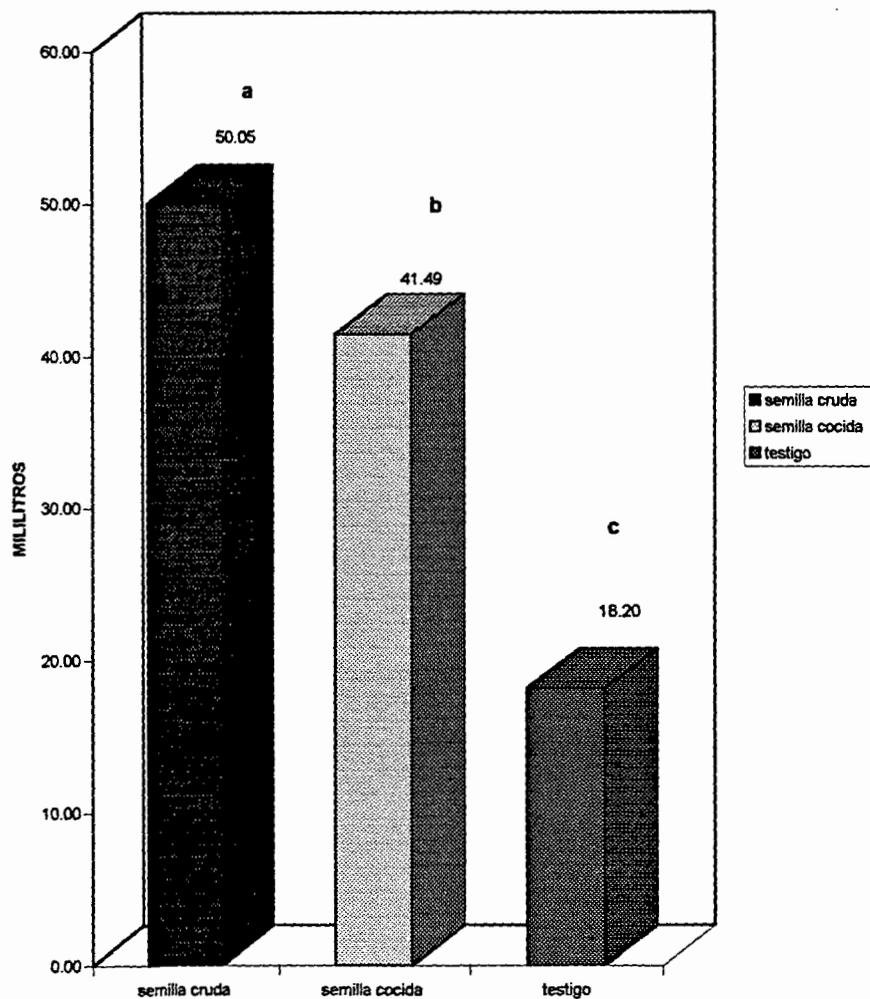


literales a,b, representan diferencia no significativa de $P < .05$

Gráfica 3 Consumo de agua con diferentes dosis de frijol terciopelo crudo y cocida .

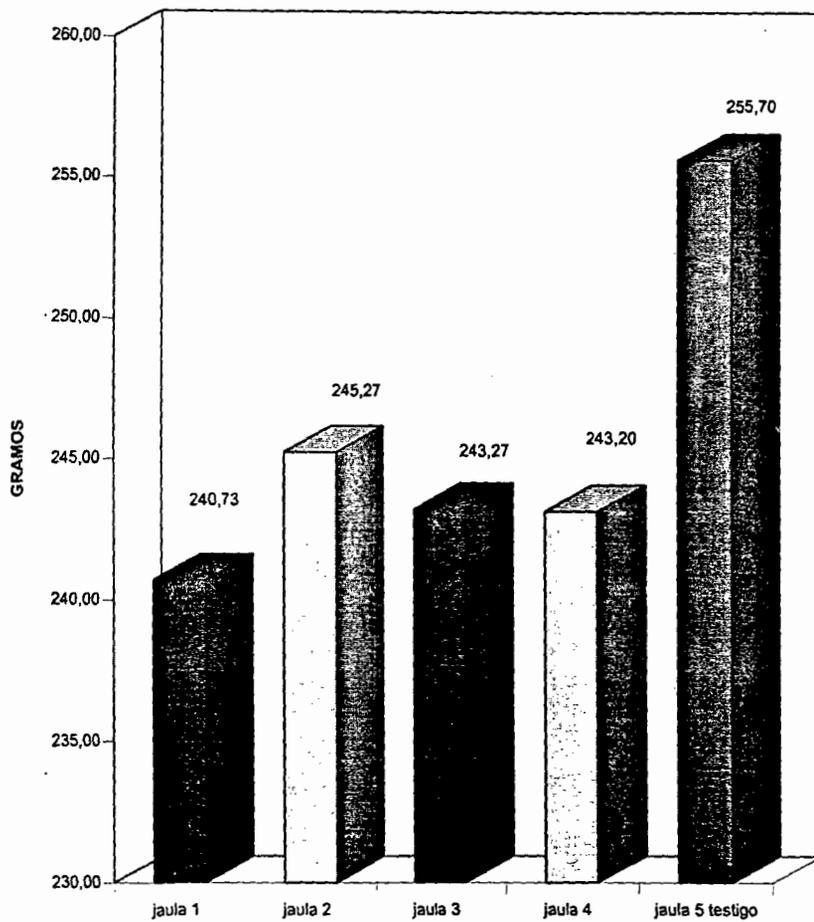


Gráfica 4 Consumo de agua con glucósidos cianogénicos de semilla cruda, semilla cocida y un testigo.



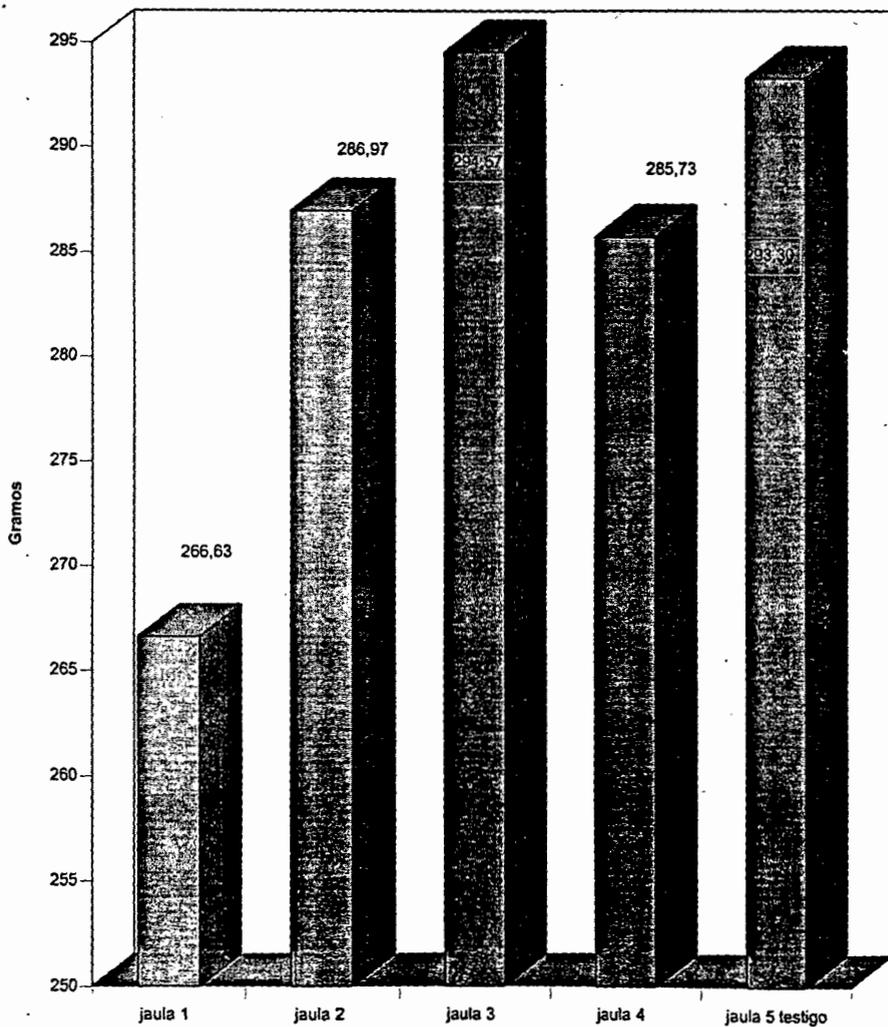
literales a, b y c, representan diferencia nosignificativa de $P < .05$

Gráfica 5 Peso de las ratas al inicio del tratamiento



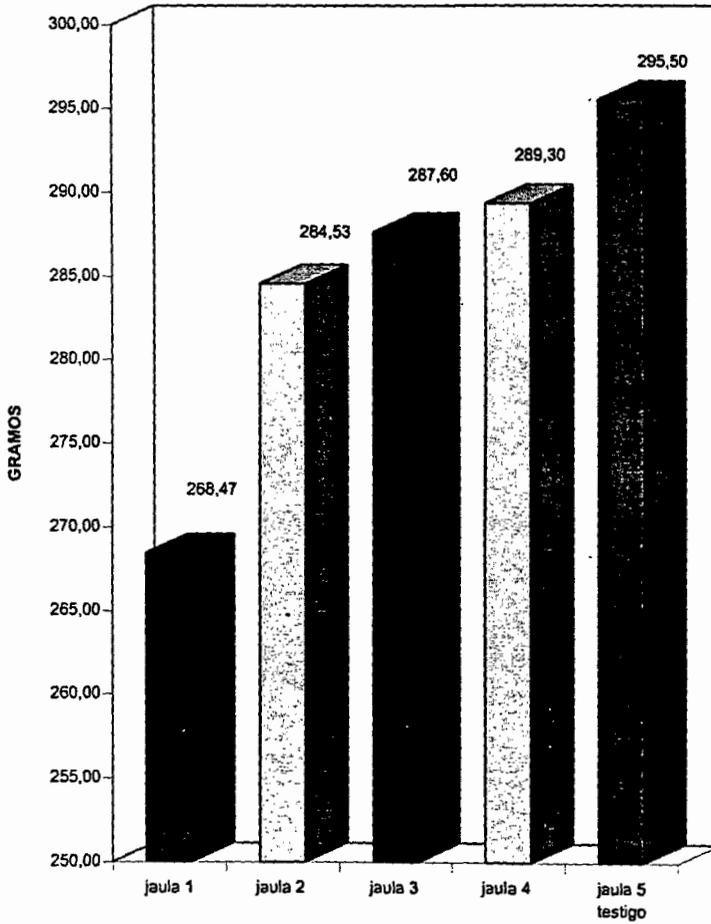
No existe diferencia significativa

Gráfica 6 Peso de las ratas con diferentes dosis de extractos de glucósidos cianogénicos de semilla de frijol terciopelo a los 15 días de iniciado el tratamiento.



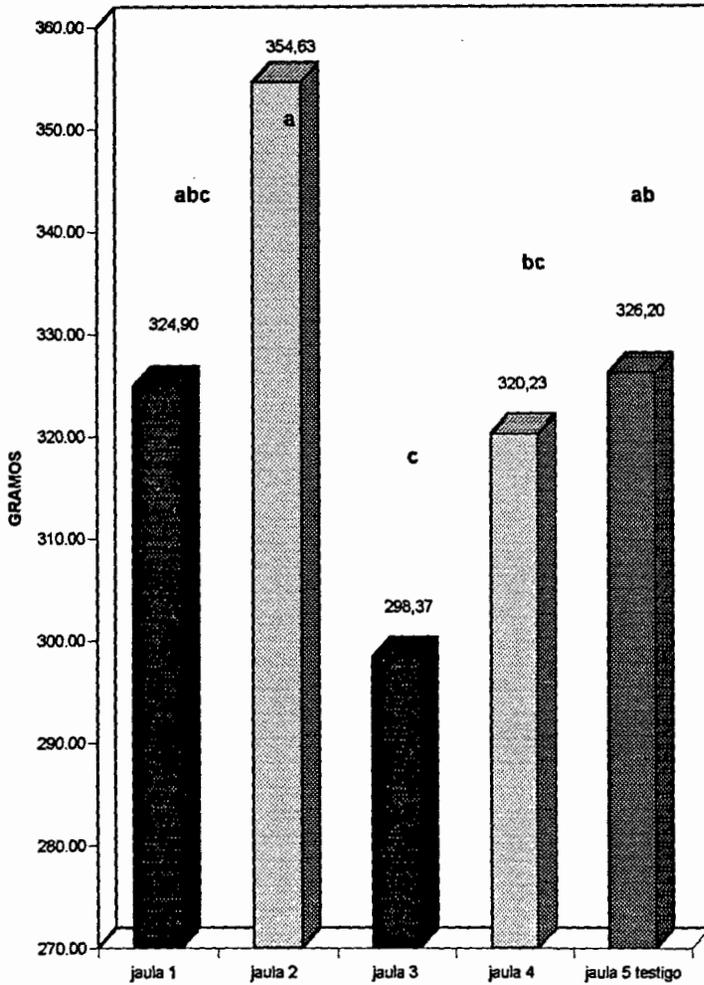
No existe diferencia significativa

Gráfica 7 Peso de las ratas tratadas a diferentes dosis de glucósidos cianogénicos de semilla de frijol terciopelo a los 20 días de tratamiento.



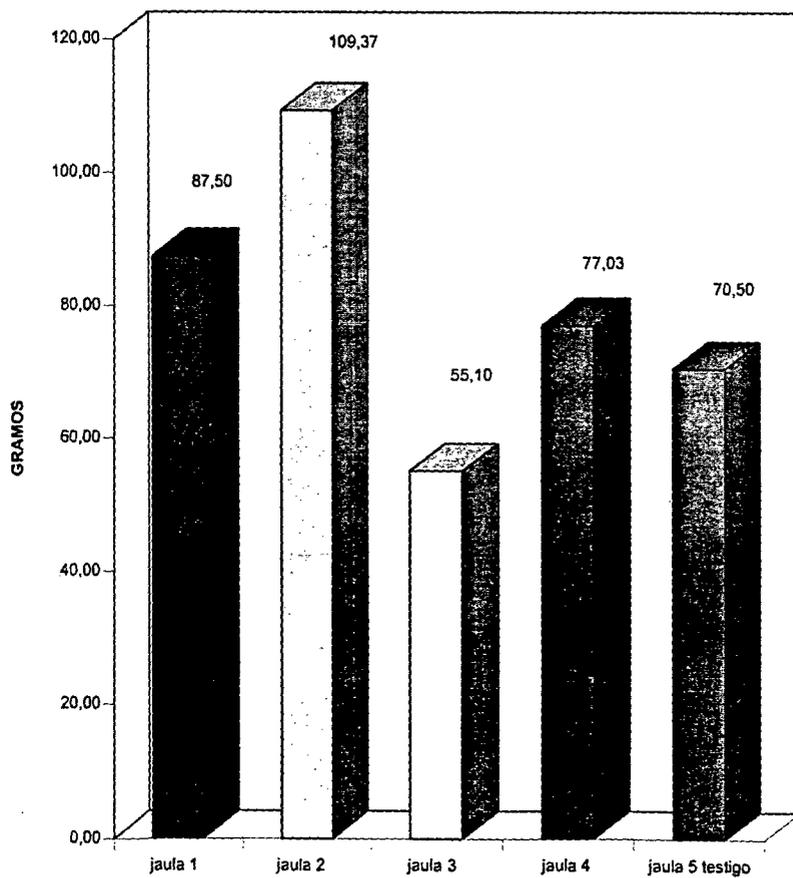
No existe diferencia significativa

Gráfica 8 Peso de las ratas al final del tratamiento.



literales a,b ,c y d, representan diferencia no significativa de $P < .05$

Gráfica 9 Ganancia de peso de las ratas al final del tratamiento.



No existe diferencia significativa

DISCUSION

ANALISIS QUIMICO PROXIMAL:

El análisis proximal refleja valores de Materia Seca (MS) superiores a los que se presentan en leguminosas forrajeras, como el trébol y la alfalfa (con porcentajes de 18-30% respectivamente), pero inferiores a los reportados en las semillas de otras leguminosas silvestres.⁽⁷⁾

El análisis proximal de la semilla de frijol terciopelo revela valores optimos de proteína, este valor indica que según la FAO entra en el rango que puede proponerse a esta leguminosa como una alternativa de sustitución en una dieta balanceada para monogástricos.

DIGESTIBILIDAD:

Las semillas de leguminosas son normalmente cocidas antes de ser comidas, en los frijoles el cocimiento mejora los valores nutricionales por la destrucción de los factores antinutricionales lábiles (sensibles) al calor como las lectinas.⁽³⁴⁾

A continuación se muestra un análisis de aproximadamente 15 semillas de leguminosas, el contenido de proteína vario de 10 a 31.54% y de grasa 10%, solo 2 de estas presentaron 24.4% y 27.6% respectivamente, la fibra cruda es aceptable en este estudio de 16% en 9 semillas y solo en 6 fué menor de 16%, solamente el

triptofano es el primer aminoácido limitado. En 9 muestras puede dar respuesta positiva a alcaloides. En base a las proteínas la fibra cruda y aminoácidos, contenidos en la composición de las semillas de leguminosas, estudiadas puede proponerse para alimento de los animales, previo recogido y tratamiento especial para rumiantes.⁽¹²⁾

TOXICIDAD:

Al ser ingerido el glucósido por rumiantes puede liberar glucósido cianogénico (HCN), bajo la posterior acción de la microflora del rumen. Este procedimiento se realiza también en el medio ácido del estómago de los monogástricos, cuando maceran los vegetales. Las sales de cianuro (por ejemplo KCN), se hidrolizan también con facilidad formándose cianuro libre.⁽⁵⁾

Se advierten cifras superiores de TGO en sueros en las alteraciones celulares hepáticas, pero también en enfermedades al miocardio y/o músculo esquelético (mioglobinuria, tétanos y trabajo muscular duro). Se encuentra la enzima en concentraciones elevadas en suero. La TGO no es por consiguiente una enzima específica del hígado, también los eritrocitos son ricos en TGO por lo cual solo se utilizó suero exento de hemólisis para determinar la actividad de la enzima. Debe señalarse que solo cabe esperar valores altos de enzimas en sangre cuando está afectado el parenquima del hígado.⁽²⁵⁾

El frijol terciopelo tiene aparte de sus factores nutricionales algunos productos que son considerados como tóxicos, estos hacen que el alimento les sea menos palatables para el animal. El frijol terciopelo tiene algunas sustancias como los glucósidos cianogénicos. En las leguminosas se han identificado tres tipos de glucósidos, estos son: **acacipetalina**, aislado e identificado en el género *Acacia*, **linamarina** y **lotautralina**, ambos encontrados en los géneros *Lotus*: *Phaseolus* y *Trifolium*.

La concentración de ácido cianhídrico cuantificado en las especies evaluadas de semilla cruda fueron mas altos que en semilla cocida. Comparadas con las especies que maneja Sotelo ⁽³⁶⁾ son menores que las concentraciones encontradas en el durazno, 233.12 mg, manzano 130.67 mg, y frijol lunatus de 138.00 mg, los animales pueden tolerar pequeñas cantidades de cianuro por ejemplo, las ovejas son capaces de metabolizar unos 22 mg/50 kg de peso corporal por hora. Los productos vegetales que son superiores a 20 mg/100 ml, se consideran niveles importantes de concentración. Por lo que se considera que el encontrado en el vegetal en estudio puede ser utilizado, en una dieta para animales monogástricos sin causar un daño severo, ya que el cocimiento libera el cianuro y la cantidad de ácido cianhídrico encontrada en semilla cocida fue aceptable para poderlo utilizar en una dieta como sustituto de algún ingrediente. ⁽⁵⁾

Experimentación de ratas:

Las ratas consumieron durante un periodo de 20 días, una solución de glucósidos cianogénicos a un porcentaje de 4.2 y 5.4 ml, obteniéndose un resultado de consumo de alimento durante los primeros 10 días en la jaula 1 y 3 consumieron solución de glucósidos cianogénicos de semilla cruda 4.2 ml. Y 5.4.

De la jaula 2 y 4 fueron de semilla cocida, para la primera fue de 5.4 ml, y 4.2 ml, para la segunda, se muestra en las gráficas anteriores que tanto la jaula 3 y 4 fueron las que consumieron mayor porcentaje de alimento en gramos, y la ingestión de los glucósidos en semilla cruda fué mayor en la jaula 3 con 5.4 ml. no habiendo una diferencia significativa en el consumo de los glucósidos cianogénicos entre la semilla cruda y cocida.

El consumo de agua fué mayor en la solución de glucósidos cianogénicos de la semilla cruda, que en la semilla cocida durante el experimento, observandose que la semilla cruda provoca que el animal consuma mayor cantidad de agua, debido a que los tóxicos hacen que la rata tenga una ligera deshidratación.

La ganancia de peso inicial fué la mayor en la jaula 3 seguido de la jaula 5 testigo, después siguió la jaula 4 habiendo una diferencia significativa entre la jaula 3 y 4.

CONCLUSIONES

- 1.- La semilla de frijol terciopelo cruda contiene 25.6% de proteína y la semilla cocida 16.14%, este porcentaje indica que el cocimiento baja la cantidad de proteína que se suministra al animal.
- 2.- La cantidad de fibra cruda que contiene indica que puede ser utilizado como una alternativa de alimento no convencional para animales monogástricos, aves cerdos y así emplear una especie silvestre que ha sido utilizada unicamente como de cobertura.
- 3.- La digestibilidad obtenida muestra que el frijol terciopelo por la cantidad que presenta en materia seca tanto en semilla cruda como cocida, y la materia orgánica que presentan las dos fases es considerada como una buena alternativa del potencial nutricional que puede tener como alimento ya que el animal lo digiere y le es palatable.
- 4.- Los resultados obtenidos por la toxicidad de HCN en ratas son severos en la semilla sin cocimiento y en semilla cocida no son significativos por lo que se recomienda un previo cocimiento para liberar los tóxicos que contiene y así poderlo proponer como sustituto.
- 5.- En base a los resultados obtenidos con los bromatológicos, digestibilidad y las pruebas de toxicidad, se puede considerar a la harina de frijol terciopelo como una alternativa para alimentación de monogástricos, ya que por su bajo contenido de fibra no es muy recomendable para poligástricos (rumiantes).

BIBLIOGRAFIA

1. A.O.A.C.1980 Official Methods of Analysis (13 edición), Association of official Analytical Chemistis. Washington, D.C. USA. Capitulo XIII.
- 2.- A.O.A.C. 1989. Official Methods of Analysis (14 Edición) Association of Official Analytical Chemistis, Arlington, USA. Capitulo XIII.
- 3.- Aykroyd, W.R. Doughty, J.: Las Leguminosas en la Nutrición Humana. FAO. 1964.
- 4.- Bressani, R. Elías, L.G.: Nutritional Value of Legume Crops for Humans and Animals. Ed. Summerfiel and Buting. 1980 pág. 135.
- 5.- Buck, W.B., Osweiler, G.D., y Gelder, G.A.V.: Toxicología Veterinaria Clínica y Diagnostica. De. Manual Moderno 1991. pp. 127-131.
- 6.- Cancio, T., Peña, J.L.y Peña, F.: Uso de abonos verdes en áreas tabacaleras de la región del Escambray. Rev. Centro Agrícola. 16 (4):59-67. (1989) Cuba.
7. Carrillo, J., 1980. De. LIMUSA. Los Forrajes, México.pp.28-32.
- 8.- Casares, R. and López H.C.: Bromatological study of the seeds of *Stizolobium deeringianum*, acclimatized in Spain. Archos Inst. Aclim., 8: 19-22. Almeria (1959)
- 9.- Duque, D.A.: Evaluación del Frijol Terciopelo (*Stizolobium deeringianum*), en el Control de las Malezas en Cítricos y como Fuente de Proteína en la ración de pollos de engorda en Cokal Yucatan. 1a. edición "Instituto Tenológico Agropecuario No. 2" SEP, SEIT, DGETA. Yucatán, 1993. pp. 12-38.
- 10.-Escarzaga, G.E.: Determinación del Potencial alelopático del "Nescafe"(*Stizolobium pruriens* L. Medic. Var Utilis Wall ex Wight), sobre cinco cultivos y tres malezas. Tesis de Licenciatura.Facultad de Agronomía. ITESM Queretaro, Qro. 1987 pág. 76

- 11.-Flores, M.: Bromatología animal. 7ma. Ed. Limusa, México. 1983 pp. 413-418.
- 12.-Giral, F., Sotelo, A., Lucas, B. and De la Vega, A.: Chemical composition and toxic factors content in filteca leguminous seeds. Departamento de Química Farmacéutica y Productos Naturales. División de Estudios Superiores, Facultad de Química UNAM. 1978 pp. 144-149.
- 13.-González, A. C.: La Fijación Biológica de Nitrógeno en un Agroecosistema de Bajo Ingreso Externo de Energía en Tamulte de las Sabanas, Tabasco. Rev. Sobre giro de Agrociencia, Vol. 1 Núm. 3. (1990). pp. 10-18.
- 14.-Harkness, E.J., Wagner, E.J.: Biología y Clínica de Conejos y Roedores. Zaragoza España. (1980). pp.43-44.
- 15.-Hernandez-Infante, M., Herrador-Peña, G. and Sotelo-Lopez, A.: Nutritive value of two different beans (*Phaseolus vulgaris*) supplemented with methionine. J. agric. Fd Chem. 27: 965-968. (1979).
- 16.-Hirano, H., Kagawa, H., and Okubok, K.: Characterization of Proteins release from legume seeds in hot water. Department of Molecular Biology, National Institute of Agrobiological Resources, Kannondai, 2-1-2 Tsukuba, Ibaraki 305 Japan. pp. 731-735. (1991).
- 17.-Holmes, D.D.: Clinical Laboratory Animal Medicine an Introduction. IOWA, Charper 2, pp.12-20. (1984).
- 18.-Humpherys, D.J.: Toxicología Veterinaria. 3ra. Edición pp. 195-197. (1990).
- 19.-Jaffé, W.C., Levy, A. and González, D.I.: Isolation and partial characterization of bean phytohemagglutininis. Phytochemistry 13: 2685-2693. (1974).
- 20.-Lehninger, A.L.: Bioquímica. Ed. OMEGA. España. (1985) pág. 49.
- 21.-Liener. I. E.: Toxic Factors in edible legumes and their Elimination. Am. J. Clin. Nutr. 11: 281-298. (1962)

- 22.-Lindsey, J.B. and Beals, C.L.: The Nutritive Value of Cattle Feeds. I. Velvet-bean meal for farm stock. Mass. Rev. Agric. 197:61-64. (1920).
- 23.-Lucas, B., and Sotelo, D.: Asimplifield test for the quantitation of Cyanogenic Glucosides ind wild and cultivated seeds. Departamento de Química Faramacocéutica y productos Naturales. División de Estudios de Posgrado. Facultad de Química. UNAM. vol. 2a. No. 3 pp. 711-719. (1984).
- 24.-Martínez, M.: Plantas Mexicanas. Catálogo de nuevas especies. Ed. Fondo de Cultura Económica México. México (1979). pp. 1122
- 25.-Maximine, M.B.: Manual de Patología Clínica en Veterinaria. Ed. LIMUSA. México. 1991. pp. 285-286.
- 26.-Metalcafe, S.D. Forrajes. Ed. CECSA México. 1978. pp. 89-94.
- 27.-Mongomery, R.D.: Observations on the cyanide content and toxicity of tropical pulses. West Indian Med. J. 13: 1-11. (1964).
- 28.-Muñoz, B.B.: Utilización del Huizache (*Acacia farnesiana* (L) willd) después de la extracción de taninos para su incorporación a la alimentación animal como especie forrajera de alto valor proteico. Tesis de Licenciatura Fac. de Agronomía Universidad de Guadalajara. Zapopan Jal. pág. 19. 1995.
- 29.-Neathery, W. M.: . Dry Matter Disappearance of Roughages in Nylon Bags Suspended in the Rumen. Received for publication June 14, 74-78. (1968)
- 30.-Nierbro, A.R.: Arboles y Arbustos útiles en México, Ed. LIMUSA. México. pp. 96-97. 1986
- 31.-Nolasco, G.: Determinación de Glucosa pH y Transaminasa Glutamico Oxalacetica Sanguinea en Cerdos sometidos a Estres de Sacrificio por 2 Métodos de Matanza. Tesis de Licenciatura Universidad de Guadalajara. Guadalajara. 1994. pp. 1-4

- 32.- Read, J.W. and Sure, B.: Nutritiva value of the Georgia velvet bean (*Stizolobium deeringianum*). J. agric. 24:433-439. (1923).
- 33.-Read, J.W.: The vitamin B content of the velvet bean. Rev. Science 57:750. (1923).
- 34.-Ruíz, E., V.,M.: Digestión de carbohidratos complejos y fermentación en Intestino Grueso para Ratas a base de chicharos crudos y cocidos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología Universidad de Guadalajara, pp. 1-3. 1995.
- 35.-Salmon, W.D.: Effect of feeding velvet beans to pigeons. Rev. Science 56:368. (1922)
- 36.-Shimada, S.A.: Fundamentos de Nutrición Animal Comparativa Patronato de Apoyo a la Investigación Pecuaria en México. Ed. México 1983. pp.30-40.
- 37.-Sotelo, A.: Leguminosas Silvestres, Reserva de Proteínas para la alimentación. Rev. Información Científica y Tecnológica 3: 28-32. (1981).
- 38.-Sotelo, A. and Hernández, M.: Nutritional evaluation of three varieties of beans (*Phaseolus*) using chemical and biological methods. Rev. Nutr. Rep. Int. 22: 607-616. (1980).
- 39.-Sure, B. and Read, J.W.: Biological analysis of the seed of the Georgia velvet bean, *Stizolobium deeringianum*. J. agric. Res 22: 5-15. (1921).
- 40.-Tejada, H.I.: Manual de Laboratorio para Analisis de Ingredientes Utilizados en la Alimentación Animal. Ed. México. pp. 353 y 354. 1985.
- 41.-Tejada, H.I.: Control de Calidad y análisis de alimentos para Sistema de educación Continua en Producción Animal, A.C., Ed. México. pp. 331-333. 1992.
- 42.-Vega de la, A., Giral, A. and Sotelo, A.: Nutritional evaluation of the velvet bean (*S. cinerium*) alone and supplemented with methionine or wheat flour. Nutrition Report International. 24 (4): pp. 817-823. (1965).

- 43.-Waterman, H.C. and Jones, D.B.: Studies on the digestibility of proteins in vitro. II. The relative digestibility of various preparations of the proteins from the Chinese and Georgia velvet beans. J. Biol. Chem. 47: 285-295. (1921).
- 44.-Worker, F. and Willimont, S.C.: The determination of cyanide in seeds. J. Pharm. 3: 905-917. (1951).
- 45.-Yamoah, Ch. F. and Mayfield, M.: Herbaceous legumes as nutrient sources and cover crops in the Rwandan Highlands. Rev. Biological Agriculture and Horticulture, 7:1-15. (1990)
- 46.-Zamora, N.F. Ruiz, L.M.: Las Leguminosas su Importancia en la Alimentación Humana y Animal. Rev. Agroicultura Año 3, no. 21, pág. 8. (1993)