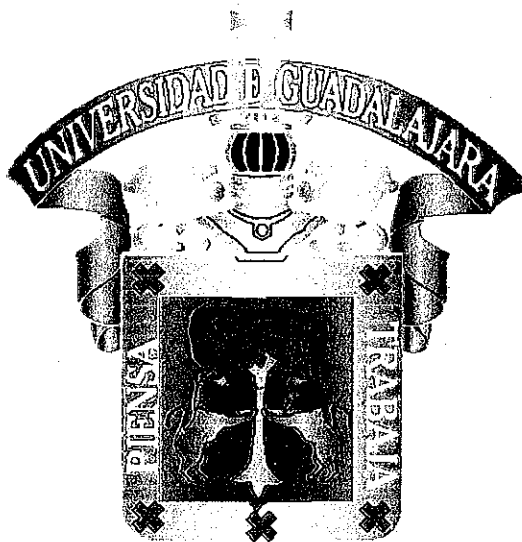


Fe de erratas:

- En la página 23, segundo párrafo y cuarto renglón dice :
...escasos recursos económicos y su inclusión□e
y debe decir:escasos recursos económicos y su utilización.....
- En el tercer párrafo, en el sexto renglón dice:
...(en particular de inclusión).
Y debe decir.....(en particular metionina)
- En el tercer párrafo, en el sexto renglón dice:
..... en variedades inclusión□e
y debe decir:..... en variedades semidulces.....
- En el tercer párrafo, en el décimo renglón dice:
... 80-85.8 %, en inclusión□e
y debe decir:.... 80-85.8 %, en comparación.....
- EN el cuarto parrafo, primer renglón dice: Además de la diferencia de inclion,....
Y debe decir:....Además de la diferencia de metionina,....
- En el cuarto párrafo, en el cuarto renglón dice:
.... inclusión□ente,
y debe decir:principalmente.....
- En la página 29, en el primer renglón dice:
...de las manifestaciones más notorias fue la autofagia.....
y debe decir:...de las manifestaciones más notorias fue la coprofagia.....
- En la página 51, dice :
- Figura 11. Corte de riñón.....
y debe decir:Figura 11. Corte de hígado de ratón del grupo de L. rotundiflorus 15%, tefido con H-E. El tejido muestra necrosis coagulativa de los hepatocitos y degeneración turbia como principales hallazgos histopatológicos (20X).
- Dice: Figura 12cuagulativa.....
Debe decir:coagulativa....

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS**



DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS

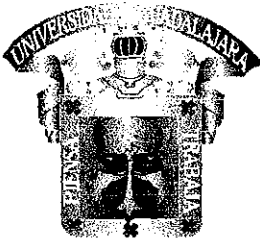
**"Evaluación de la calidad nutricia de la proteína y toxicológica de
cuatro especies silvestres del género *Lupinus* del Estado de Jalisco"**

**Tesis que para obtener el título de
Maestro en Ciencias en Nutrición Animal**

Presenta:

**M.V.Z JOSE DE JESUS CASTAÑEDA SANDOVAL
DIRECTOR: DR. JACINTO BAÑUELOS PINEDA.
ASESORES: DR. MARIO ALBERTO RUIZ LOPEZ
M en C: JUAN FRANCISCO ZAMORA NATERA**

Mayo de 2004.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS

COORDINACIÓN DE POSGRADO



75

COORDINACIÓN DE POSGRADO DE LA
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
PRESENTE.

Por este conducto nos permitimos enviar la VERSION FINAL DE LA TESIS que desarrolló el pasante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición Animal de la Universidad de Guadalajara, **M.V.Z. José de Jesús Castañeda Sandoval**, cuyo título es:

"Evaluación de la calidad nutricia de la proteína y toxicología de cuatro especies silvestres del genero Lupinus del estado de Jalisco"

Trabajo dirigido por: **Dr. Jacinto Bañuelos Pineda**

Los que suscriben la presente avalan esta versión, la cual fue revisada y reúne los requisitos teóricos y metodológicos necesarios.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. a 1 Abril del 2004

REVISOR

Dra. Ma. de Lourdes Isaac Virgen

REVISOR

Dra. Esther Albarrán Rodríguez

REVISOR

M en C Lucía Barrientos Ramírez

REVISOR

M en C Alberto Casilla Benítez

REVISOR

M en C Jorge Hernández Gobora

c.c.p. Archivo

Dedicatoria

A mi esposa, Donaji Ruth por su amor y por apoyo que siempre me brinda en cada acción que emprendo. Gracias por tu comprensión.

A mis hijos.

A mi padre, por tu amistad y los magníficos ejemplos y consejos que siempre me has dado.

A mis hermanos, Beatriz, José, María Magdalena, Alfredo, Rosa Catalina y Francisco Javier, gracias a todos ellos.

Reconocimientos

A mi director de tesis Doctor en Ciencias Jacinto Bañuelos Pineda, por su apoyo total y porque siempre me dedicó el tiempo y me orientó en el desarrollo de éste trabajo de investigación. Gracias por su amistad.

A mi co-director de tesis Doctor en Ciencias Mario Alberto Ruiz López, por su valiosa y siempre amable dirección. Gracias por su amistad.

A mi co-director de tesis Maestro en Ciencias Juan Francisco Zamora Natera, Gracias por tu ayuda y amistad.

A mi honorable Jurado:

Dra. María de Lourdes Isaac Virgen.

Dra. Esther Albarrán Rodríguez.

M en C. Lucia Barrientos Ramírez.

M en C. Alberto Casillas Benitez.

M en C. Jorge Hernández Gobora.

A mis Compañeros y amigos que en una forma u otra contribuyeron a la realización de mi trabajo, de manera muy especial a mi amigo Dr. Pedro Gómez Presciado quién me brindo su gran ayuda a través de sus amplios conocimientos y experiencia en la interpretación histopatológica de los cortes.

A mi amiga y compañera M en C. Josefina Casas Solis, por su apoyo y amistad que me has brindado.

A mi amigo y compañero M en C. Ricardo Solis Zamora, por su apoyo y amistad que me has brindado.

ÍNDICE

i Índice	I
ii Resumen	II
1.0 Introducción	1
2.0 Antecedentes	2
2.1 Historia e importancia del género	2
2.2 Los Lupinus en el viejo mundo	3
2.3 Los Lupinus en américa	4
2.4 El desarrollo de Lupinus en la era moderna	5
2.5 Taxonomía	7
2.6 Ecología del género	7
2.7 Distribución geográfica de los Lupinus	7
2.8 Los Lupinus en México	8
2.9 Características alimenticias	10
2.10 Usos de Lupinus en la alimentación animal	11
2.11 Alcaloides quinolizidínicos	14
2.12 Toxicidad y actividad biológica de los alcaloides	16
2.13 Toxicidad de loa alcaloides quinolizidínicos	18
3.0 Planteamiento del problema	22
4.0 Justificación	23
5.0 Hipótesis	25
6.0 Objetivo general	26
6.1 Objetivos particulares	26
7.0 Material y métodos	27
7.1 Preparación de muestras para cuantificación de aminoácidos	27
7.2 Relación de eficiencia proteinita	28
7.3 Toxicidad subcrónica	30
8.0 Resultados	32
8.1 Observaciones en la prueba toxicológica	38
8.2 Estudio histopatológico de la prueba de toxicidad	40
9.0 Discusión	53
9.1 Relación de eficiencia de la proteína (PER)	54
9.2 Digestibilidad in vivo	55
9.3 Calificación química de la proteína	56
9.4 Evaluación toxicológica	56
10.0 Conclusiones	58
11.0 Bibliografía	59
Figura 1 Municipio de del Estado de Jalisco donde se han realizado colectas de semillas de Lupinus	9
Figura 2 Distribución de Lupinus en el mundo	9
Figura 3 Estructura química de algunos alcaloides	17
Figura 4 Cromatograma de L. exaltatus	34

Figura 5 Cromatograma de <i>L. rotundiflorus</i>	35
Figura 6 Cromatograma de <i>L. elegans</i>	36
Figura 7 Corte coronal de corteza cerebral de ratón	49
Figura 8 Corte coronal de corteza cerebral de ratón	49
Figura 9 Corte coronal de corteza cerebral de ratón	50
Figura 10 Corte coronal de corteza cerebral de ratón	50
Figura 11 Corte de riñón de ratón	51
Figura 12 Corte de riñón de ratón	51
Figura 13. Corte de testículo de ratón	52
Cuadro 1 Contenido típico de minerales	11
Cuadro 2 Afinidad de los alcaloides a receptores nicotínicos	20
Cuadro 3 Composición de dietas experimentales	29
Cuadro 4 Análisis químico proximal	32
Cuadro 5 Composición de aminoácidos	33
Cuadro 6 Calificación química de la proteína	33
Cuadro 7 Prueba de eficiencia de la proteína	37
Cuadro 8 Prueba de digestibilidad in vivo	37
Cuadro 9 Análisis estadístico de PER sin suplementar metionina	37
Cuadro 10 Análisis estadístico de PER suplementando metionina	38
Cuadro 11 Prueba de toxicidad subcrónica	38
Cuadro 12 Comportamiento de la prueba de toxicidad subcrónica	39

RESUMEN

Los lupinus están ampliamente difundidos en el territorio nacional. El estado de Jalisco cuenta con varias especies silvestres, en el presente estudio se han utilizado las especies de *L. elegans*, *L. exaltatus*, *L. rotundiflorus* y *L. montanus*. Fueron recolectadas en estado de maduración. Se les sometió al análisis químico proximal, el contenido de Proteína Cruda en estas especies es de 41.79 a 56.11 %; Grasa de 6.25 a 14.91 %; Cenizas 2.82 a 3.49 %, Fibra Cruda 10.70 a 14.57 % y ELN 14.57 a 31.87 %.

Partiendo de la información obtenida por los análisis químicos proximales se diseñaron cinco dietas isoproteicas e isocalóricas a las que se sometieron 54 ratas machos de la cepa Swiss-Wistar recién destetadas con una edad de 21 a 28 días, con un peso de 60 ± 10 gramos). Fueron evaluadas por la Prueba de Eficiencia de la Proteína (PER) obteniendo los siguientes valores para las dietas sin suplementar: 0.90 ± 0.59 para *L. montanus*; 1.65 ± 0.50 para *L. exaltatus*; 0.11 ± 0.25 para *L. elegans*; 1.47 ± 0.61 para *L. rotundiflorus* y para las dietas suplementadas con el 0.2 % de metionina: 1.33 ± 0.41 para *L. elegans*; 0.34 ± 1.00 para *L. montanus*; 0.91 ± 0.88 para *L. exaltatus*; 2.36 ± 0.23 para *L. rotundiflorus*. Y 3.55 ± 0.27 para caseína.

La prueba de digestibilidad de las diferentes dietas sin suplementar fueron: 50.81 ± 2.78 para *L. montanus*; 63.90 ± 3.79 para *L. exaltatus*; 79.60 ± 1.92 para *L. elegans*; 56.09 ± 6.42 para *L. rotundiflorus* y para las dietas suplementadas: 80.03 ± 2.25 para *L. montanus*; 80.04 ± 0.84 para *L. exaltatus*; 65.49 ± 3.09 para *L. elegans*; 74.70 ± 3.14 para *L. rotundiflorus* y 86.61 ± 0.49 para caseína.

De las mismas semillas se determinó el perfil de aminoácidos por HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Presión).

Se desarrolló una prueba toxicológica paralela a los anteriores estudios utilizando 78 ratones de la cepa Balb C a los que se les proporcionó una dieta con semillas crudas de las cuatro especies silvestres de *Lupinus* con tres niveles de inclusión 5, 10 y 15 % y un grupo testigo. En las especies *L. rotundiflorus*, *L. exaltatus* y *L. elegans* tuvieron el 16 % de mortalidad, en las tres concentraciones de *Lupinus*. En la especie de *L. montanus* la mortalidad se incrementó significativamente.

Se sugiere realizar los estudios necesarios para lograr la eliminación total de los alcaloides y demás antinutrientes que contienen los *Lupinus*.

1.0 - INTRODUCCIÓN

En la elaboración de alimentos balanceados para animales se utilizan principalmente harinas de oleaginosas, carne y hueso, productos marinos y aviarios, cereales como el sorgo, oleaginosas, subproductos industriales (melaza de caña, pulpa de cítricos, subproductos de molienda), leguminosas deshidratadas (alfalfa), nitrógeno no proteico (urea), así como granos desecados, destacando que la mayoría de los ingredientes son de origen vegetal (Church y Pond, 1987).

Sin embargo, actualmente existe una competencia por la biodisponibilidad de granos entre el hombre y los animales, ya que las tierras cultivables dedicadas a la producción de granos para la alimentación humana en nuestros días se han reducido para ser destinadas a la producción de gramíneas forrajeras (zacate o pastos) para la alimentación animal. Por tal motivo nuestro país se ve obligado a depender de las importaciones para poder cubrir las demandas internas de grano, principalmente soya (Moreno, 1984).

México, como país consumidor de ésta leguminosa, debe importar este producto. Tan sólo en 2001, las importaciones realizadas a Estados Unidos fueron de \$ 1,008.25 millones de dólares, y hasta agosto de 2002 se han introducido al país 4,075.4 mil toneladas (Bancomext, 2002).

La competencia por la disponibilidad de granos puede ser disminuida gracias a la gran variedad de leguminosas que existe en el mundo y que constituyen la segunda fuente de alimento después de las gramíneas, tanto para el hombre como para sus animales. De estas leguminosas, las especies del género *Lupinus* son consideradas importantes debido a que están ampliamente distribuidas en muchos países, existen aproximadamente 400 especies. Pero sólo unas cuantas han sido sometidas a investigación profunda y utilizadas como fuente de alimentación; las especies más estudiadas son: *Lupinus albus* (Europa y América), *Lupinus luteos* (Europa), *Lupinus angustifolius*

(Australia) y *Lupinus mutabilis* (Sudamérica) (Jambrina,1983; Rodríguez y Ortega, 1981).

Del total de especies reportadas en el mundo, en México se localizan alrededor de 100, por lo que resultaría interesante realizar estudios que nos permitan conocer sus propiedades nutricias y toxicológicas con el propósito de ser aprovechables en la alimentación humana o animal.

Para finalizar, se puede decir que los lupinos silvestres de México representan un valioso recurso para obtener proteína de origen vegetal, ya que estas especies, por ser herbáceas, son de rápido crecimiento y se podrían incorporar a los sistemas de cultivo siguiendo el ejemplo de algunas de estas especies que son ampliamente cultivadas desde hace cientos de años en diversos países de Europa y Sudamérica y en Australia.

2.0 - ANTECEDENTES

2.1 Historia e importancia del género

El origen remoto del nombre botánico de éste género (*Lupinus*) se desconoce. Parece ser que es una derivación de la palabra latina "*lupus*" que significa lobo, probablemente por que ésta planta se desarrollaba en terrenos difíciles y salvajes teniendo así por compañeros a los lobos (Gladstones, 1974). Algunas citas bibliográficas se inclinan por que el nombre griego de *Lupinus* fue *Thermos*, presumiblemente se debe por el sabor amargo-caliente de las semillas, en donde al parecer todos los nombres esparcidos en el área del mediterráneo se generan de este vocablo, por ejemplo Termis (Egipto), Turmus (Arabia), Altramuz (España) y Turmusa (Siria y Palestina).

Una de las referencias más antiguas es la de Hipócrates (400-365 a. C. citado por Gladstones en 1974) quién menciona el uso medicinal, nutricional y cosmético de las semillas de *Lupinus*. Otra referencia, que data del siglo XV, es

la que aparece en el libro Árabe-Persa, "Las mil y Una Noches". En la noche 497 se menciona a varias mujeres asociadas con esta leguminosa. Así como Teofrasto (372 – 288 a. C.) en su tratado "Historia Natural de las Plantas" escribió extensamente sobre *Lupinus albus*, mencionando el tipo de suelos que necesita y como debe ser sembrado.

En Roma y Grecia, el cultivo de lupinos blanco (*L. albus*) se llevó a cabo ampliamente y fue descrito por tratadistas romanos, quienes frecuentemente hacen referencia de éste como una planta que crece en terrenos pobres e infértiles.

Asimismo, consideraban la importancia de desamargar la semilla artificialmente para que pudiera ser utilizada en la alimentación del ganado y de manera moderada para el consumo humano, sobre todo en las clases más pobres y en casos de fuerte necesidad. De hecho, la semilla de esta planta tuvo una importancia tal que fueron utilizados en la antigua Roma como unidad de cuenta o moneda de baja denominación cuyo nombre fue "*Nummus Lupinus*" (Gladstones, 1974).

2.2- Los *Lupinus* en el viejo mundo.

De las aproximadamente 400 especies de *Lupinus* existentes en el mundo, sólo doce son originarios del viejo mundo, desde los alrededores del mediterráneo hasta el este de África. La mayor parte del resto se distribuyen en el continente americano (Dunn, 1984).

Las especies del viejo mundo son: *L. albus* (*Lupinus* blanco, llamado así por el color de su flor), *L. luteus* (lupino amarillo), *L. angustifolius* (lupino de hoja angosta), *L. consentinii*, *L. atlanticus*, *L. pilosus*, *L. micranthus*, *L. hispanicus*, *L. palestinus*, *L. digitatus*, *L. somaliensis* (Gladstones, 1974).

La historia del cultivo de los *Lupinus* amargos (llamados así por el sabor característico de estas plantas y atribuido a su contenido de alcaloides, en

oposición de las especies dulces o con baja proporción alcaloidea) en el norte de Europa, pudo haber empezado en 1781 cuando el rey Federico II de Prusia, (Federico el Grande) mandó a manera de experimento semillas de *Lupinus albus* de Italia con el objeto de mejorar los suelos pobres del norte de Alemania, donde persistió el cultivo durante las seis décadas siguientes. Sin embargo, el cultivo no fue exitoso debido a la maduración tardía de las plantas y a la pobreza de los suelos (Hondelmann, 1996).

Más tarde se cultivó exitosamente el lupino amarillo (*L. luteus*), el cual tuvo una mejor adaptación que *Lupinus albus* en esta zona de Alemania y se mostró por primera vez en el mercado de Brademburgo en éste mismo año. De tal manera que, veinte años más tarde, *L. luteus* se convirtió en parte esencial de la agricultura de la zona costera Báltica, siendo utilizado en suelos ácidos y arenosos (Hondelmann, 1996; Gladstones, 1974).

Sin embargo, la aparición de Lupinosis (enfermedad causada por una micotoxina producida por el hongo *Phomopsis ssp*, el cual coloniza a las plantas de *Lupinus*) provocó una baja producción del cultivo.

2.3- Los *Lupinus* en América

Un desarrollo paralelo de los *Lupinus* del viejo mundo fue el que aconteció en América, la especie con mayor importancia agrícola y cultural es *L. mutabilis*, que crece en las tierras altas andinas de Sudamérica. Éste fue importante en la alimentación de los pueblos andinos, de hecho existen hallazgos arqueológicos del siglo VI ó VII a. C. que evidencian su cultivo. También encontraron semillas en las tumbas de la cultura Nazca (100-800 d.C.), en civilizaciones posteriores se utilizó en rotación de cultivos (Hondelmann, 1996).

Durante la existencia del imperio Inca, ésta planta alcanzó su último y mayor auge, en donde el cultivo se expandió desde Venezuela hasta el norte de Argentina. Actualmente todavía se encuentran parcelas de *L. mutabilis*, que es

conocido con el nombre de “chocho” (español) o “tarwi” (quechua), éstos cultivos existen entre los 2,500-4,000 msnm, o de manera silvestre en las orillas de los caminos. Usualmente el agricultor andino lo utiliza en la rotación de cultivos papa-cebada-lupino (Gross y Baer, 1977).

El cultivo de esta semilla ha sido muy importante para los pueblos latinoamericanos ya que se ha usado con fines religiosos, festivos y medicinales sobre todo para el tratamiento de algunas cardiopatías, reumatismo, malaria y parasitosis (López-Bellido y Fuentes, 1986).

Sin embargo, la llegada de los conquistadores españoles provocó una pérdida progresiva de la agricultura tradicional andina, la cual no retomó interés hasta hace un par de décadas (Gladstones, 1974).

2.4- El desarrollo de *Lupinus* en la era moderna

No fue sino hasta la primera guerra mundial (1914-1918) cuando se retomó el interés en el cultivo de *Lupinus*, dada la desesperada necesidad de una fuente proteica de bajo costo, siendo los años de la posguerra los de mayor desarrollo.

Como resultados de la posguerra, se obtuvieron nuevas variedades de *L. luteus* y *L. angustifolius*. En la década de los años veinte, estas variedades amargas tenían ventajas en maduración y ablandamiento de la semilla. De tal forma que para finales de la década existía ya una fuerte línea de investigación de *Lupinus* que empezó en Polonia (Gladstones, 1974).

La idea de hacer un cultivo libre de alcaloides surgió en el siglo XX, cuando en 1913 Von Rümker sugiere la primera posibilidad teórica de eliminar los alcaloides presentes en la planta mediante métodos genéticos (Hondelmann, 1996). Sin embargo, la idea no tomó importancia debido a que los lupinos utilizan los alcaloides como defensa ante sus depredadores, así como los hacen resistentes a algunas enfermedades debido a las propiedades antibacterianas, antimicóticas (Schmeller y col., 1994).

Von Sengbusch seleccionó el primer cultivo de lupino bajo en alcaloides en 1928, surgiendo la mejora moderna de lupino (Gladstones, 1974). De aquí parte una de las primeras aplicaciones en cultivos de la genética Mendeliana (Putnam, 1991).

Al inicio del nuevo milenio, siete especies de lupinos han sido totalmente domesticadas; *L. mutabilis*, *L. consentinii*, *L. atlanticus*, *L. pilosus*, *L. albus*, *L. luteus*, *L. angustifolius*. De éstas, sólo una es de origen americano *L. mutabilis*. Actualmente y mediante técnicas modernas de ingeniería genética como la tecnología recombinante del ADN, se han desarrollado un gran número de variedades dulces (Gladstones, 1974).

El resultante de los pioneros responsables del desarrollo actual (después de 1945) de los lupinos, es haber formado un nuevo banco de genes de *lupinos* dulces, logrando un cultivo de importancia en muchos países.

A mediados de la década de los ochentas, anualmente se sembraban más de un millón de hectáreas en Australia, que es el primer productor mundial de *Lupinus* (Cowling, 1984).

En la década de los años sesenta y setenta, se desarrolló resistencia al hongo *Fusarium spp.* mediante el gen *Fus1*, que ha mantenido una resistencia efectiva contra la parasitosis de este hongo en *L. luteus* y *L. angustifolios* (Troll, 1964).

Durante los años ochenta, en Australia, se lograron cultivos resistentes a *Diaporthe toxica*, hongo que parasita a los *Lupinus*, produciendo una micotoxina causante de lupinosis en vertebrados, enfermedad que causa una mitosis anormal de los hepatocitos (Warren y col., 1989).

Además se establecieron barreras genéticas contra otros organismos como: *Stemphylium vesicarium*, *Glomerella cingulata*, *Pleiochaeta setosa*, entre otros (Gladstones, 1974).

2.5- TAXONOMIA

Takhtajan, en 1987, clasificó al género *Lupinus* de la siguiente manera:

1. División: Magnoliophyta (Angiospermae).
2. Clase: Magnoliopsida (Dicotyledone).
3. Subclase: Rasidae.
4. Superorden: Fabanae.
5. Orden: Fabales.
6. Familia: Leguminosae.
7. Subfamilia: Papilionoideae.
8. Tribu: Genistea.
9. Género: *Lupinus*.

2.6- ECOLOGÍA DEL GÉNERO

Como la mayoría de las leguminosas, los lupinos están en simbiosis con bacterias del género *Rhizobium* o *Bradirhizobium*, lo que le otorga relevancia desde un punto de vista económico, ya que mejora la fertilidad de los suelos debido a la fijación biológica de importantes cantidades de nitrógeno. Logrando así su aprovechamiento en caso de utilizarlo con otros cultivos en rotación, lo cual disminuiría los costos de cultivo al reducir el uso de fertilizantes nitrogenados (Jambrina, 1980).

2.7- DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LOS LUPINUS

Un gran número de especies de lupinos se ubican en la costa y en las regiones montañosas del oeste de Norteamérica, desde Alaska hasta la frontera mexicana; en México, en las regiones superiores a los 1500 msnm. En las tierras altas de los Andes en Perú y regiones vecinas; en Brasil, Uruguay y Argentina. Algunas especies se encuentran en el este y sureste de las costas en Estados Unidos, así como en la región del Mediterráneo, incluyendo; Grecia, Turquía, España y Portugal. También existen en tierras

montañosas tropicales de África (Gladstones, 1974; McVaugh, 1987; Putman, 1991)

2.8- LOS *LUPINUS* EN MÉXICO

México es uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo, alberga un gran número de animales y plantas, el género *Lupinus* no es la excepción, en nuestro país existen, aproximadamente, 100 especies de *Lupinus* distribuidas en 26 estados (Ruiz, 2001).

En Jalisco existen alrededor de 15 especies de *Lupinus*, en su mayoría en la Sierra Madre Occidental y Sierra Volcánica Transversal; los municipios donde se han localizan son: Tapalpa y Chiquilistlán (Sierra del Halo), Mezquitic (San Juan Peyotán y San Andrés Cohamiata), Tequila (Volcán de Tequila), Mascota (Cerro del Molcajete y Lago de Juanacatlán), Autlán (Sierra de Manantlán), San Martín de Bolaños (San Miguel de la Sierra), Mazamitla (Sierra del Tigre), Cuquio (Cerca del Río Aguacaliente), Jocotepec (Sierra de Tecuán), Tonila (Volcán de Fuego), Talpa (cumbre del Cerro Tejamanil y Sierra de la Campana), Ciudad Guzmán, Ojuelos Lagos de Moreno, Yahualica, Atemajac de Brizuela, Venustiano Carranza, (La Primavera) Tala. (McVaugh, 1987).

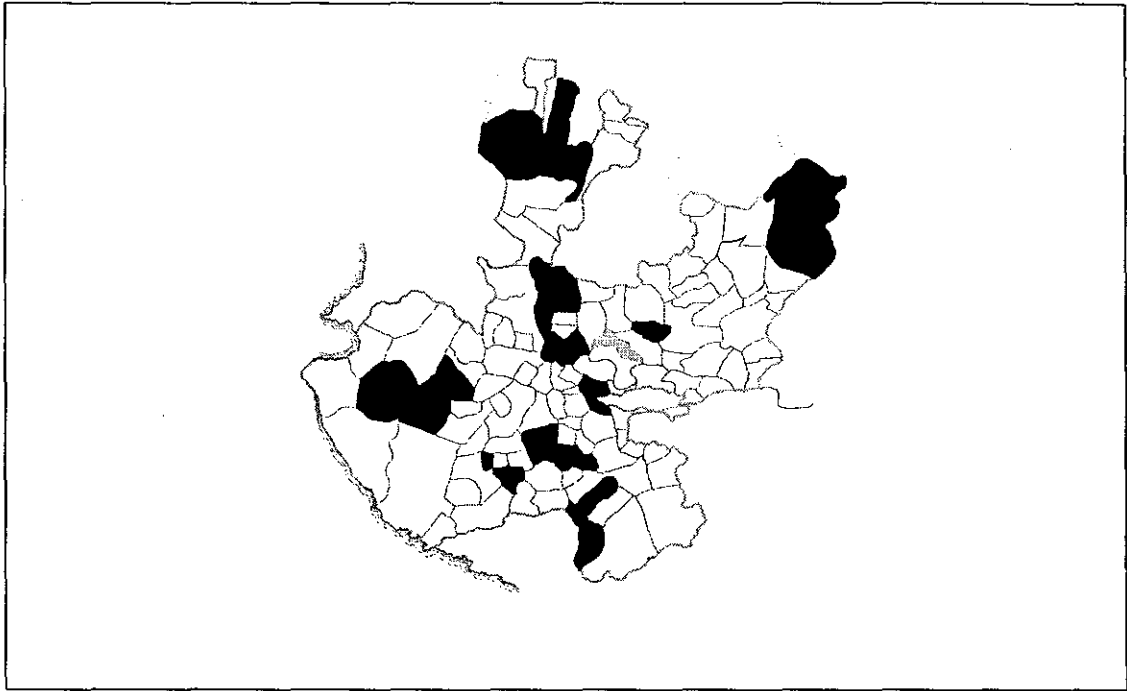


Figura 1. Municipios del Estado de Jalisco donde se han realizado colectas de *Lupinus*

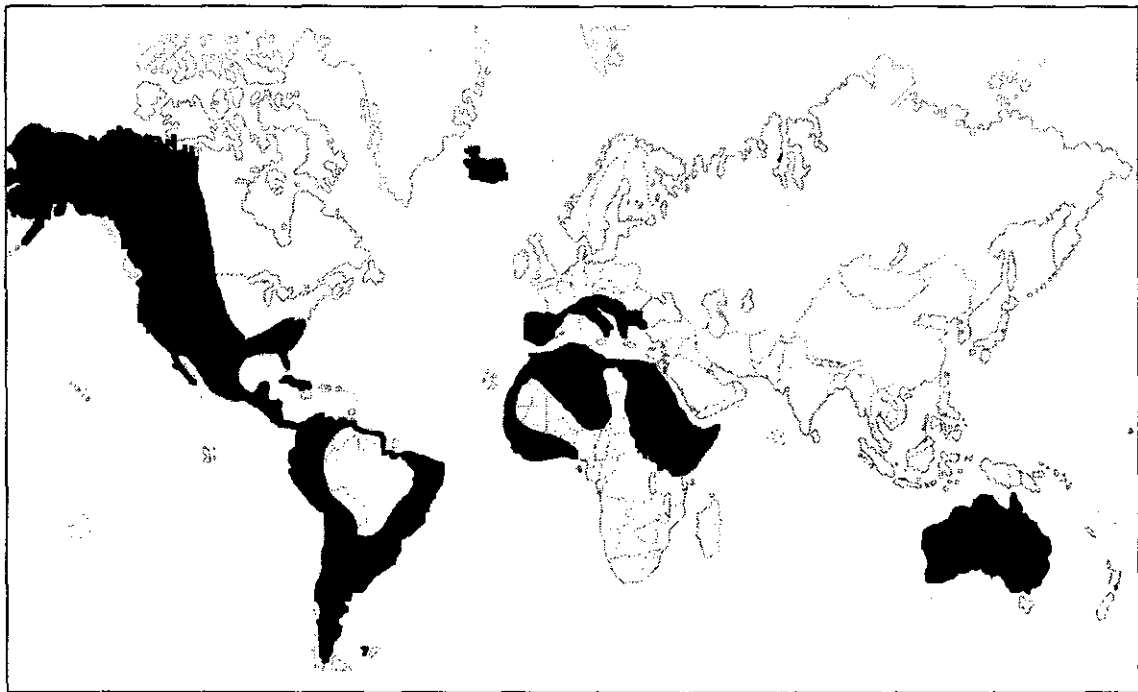


Figura 2. Distribución de *Lupinus* en el Mundo.

Entre las especies de *Lupinus* de mayor distribución son las siguientes: *L. montanus* H.B.K. Esta especie se encuentra ampliamente distribuida en Jalisco usualmente en suelos pobres, arenosos y poco fértiles, sobre praderas montañosas en zonas abiertas de bosque de *Pinus hartwegii*, o como maleza en hábitat perturbados a una altitud de 2,500-4,000 msnm. Su floración es en diciembre y junio (McVaugh, 1987).

L. exaltatus Zucc. Se localiza en zonas abiertas en bosques de pino-encino, y ésta es la especie más abundante en Jalisco, comúnmente se encuentra como maleza en zonas perturbadas o cultivadas, así como al borde de los caminos, en las montañas de la Sierra Volcánica Transversal, entre los 1,800-2,000 msnm. Su época de floración es en agosto y enero (McVaugh, 1987).

2.9- CARACTERÍSTICAS ALIMENTICIAS

Las semillas de varias especies de *Lupinus* se han utilizado como alimento por más de 3000 años en el área del Mediterráneo (Gladstones, 1974), y por más de 6,000 años en las tierras altas Andinas (Uauy y col., 1995). Sin embargo, nunca se les ha dado la misma importancia que otros cultivos; como la soya o el frijol. Los consumidores de esta semilla solían colocarla en agua corriente para remover la mayor parte de los amargos y tóxicos alcaloides, y después se guisaban o se tostaban las semillas para darle mejor sabor. No obstante, el descubrimiento de especies mutantes bajas en alcaloides ha impulsado su desarrollo como plantas de cultivo (Gladstones, 1974).

El análisis químico proximal de semillas de lupinos demuestra que éstas tienen una elevada cantidad de proteína entre 36 y 40 %; carbohidratos 40 a 50 %; fibra cruda de 10 a 15 %; grasa cruda 6 a 12 %; humedad de 85 a 90 %. Los principales carbohidratos son: galactosa, arabinosa, ácido urónico, glucosa, manosa, xilosa y ramnosa. La mayoría de las proteínas que contienen son globulinas que contienen en su mayoría tres tipos de proteína conglutina α , conglutina β y una proteína específica de los lupinos llamada conglubina δ

(Blagrove y Gillespie, 1975). El perfil de los aminoácidos nos muestran que son deficientes en lisina, treonina y metionina (Gladstones, 1974).

Cuadro 1. Contenido típico de minerales para la mayoría de las especies de *Lupinus*.

Calcio	Hierro	Magnesio	Manganeso	Fósforo	Molibdeno
Potasio	Zinc	Sodio Cobalto	Azufre	Selenio	Cobre

(Gross, 1990)

2.10- USOS DE LAS SEMILLAS DE LUPINUS EN LA ALIMENTACIÓN ANIMAL.

El principal interés del uso de las semillas de *Lupinus* es su alto contenido de proteínas y grasa, que oscilan entre 35–45 y 10–20 %, respectivamente, valores similares a los de la soya. Debido a esto, se han realizado numerosas investigaciones sobre el uso de éstas semillas en la alimentación animal. En dietas para cerdos se ha reportado el uso de lupinos dulces o desamargados reemplazando cereales, leche descremada y soya. Los autores mencionan que se puede sustituir hasta un 25% la harina de soya por harina de semilla de *Lupinus angustifolius*, desamargada y descascarada, sin que altere el crecimiento y la conversión alimenticia, e inclusive hasta un 50% si al alimento se le agrega lisina y metionina (Hale y Miller, 1985; Nelson y col., 1968). Sin embargo, algunos investigadores reportan bajo consumo de alimento y baja ganancia de peso, diarreas, parálisis y ablandamiento de la canal cuando la harina de pescado de la dieta es reemplazada con 25% de harina de *Lupinus luteus*. Los autores atribuyen estos bajos resultados a la deficiencia de lisina y metionina (Batterman y cols., 1986 b; Leibholz 1984; Leibholz 1986).

Las semillas de los *Lupinos* desengrasadas, descascaradas y ensiladas se han utilizado como fuente proteica para hembras porcinas gestantes con buenos resultados (Nelson y col., 1968). Asimismo el valor biológico proteico de la

semilla para cerdos se ha reportado con un 53 % para *Lupinus angustifolius*, 60% para *L. luteus* y 67 a 71% para *L. albus* Hill 1977). Batterman y col. (1986^a) han observado que los tratamientos térmicos en la semilla no aumentan la disponibilidad de lisina y energía neta en los cerdos. Por otra parte, en dietas para aves, (Rebdev citado por Hill, 1977) encontró que al sustituir avena por harina de lupinos aumenta la producción de huevo en 13 a 15%. Asimismo, raciones con 50% de *L. angustifolius* y 50% de harina de carne, aumentan el índice de postura (69%) en comparación con gallinas que solamente consumieron dietas con lupinos (58%) o harina de carne (63%) como suplemento proteínico (Castanon y Pérez, 1990; Hill, 1977).

Otro estudio nos revela que la utilización de dietas con 10 y 20% de *L. angustifolius*, adicionadas con 2% de metionina, no provocaron diferencias significativas durante la producción de huevo en 100 días de postura. Sin embargo, el consumo fue significativamente más alto en estas dietas, y se reporta que existe sabor amargo en el huevo si se adiciona más del 20% de harina de *Lupinus mutabilis*, que es una variedad amarga. Los estudios mencionan que un 10% aproximadamente de los alcaloides se depositan en la yema del huevo, debido a esto se produce el sabor amargo (Castanon y Pérez, 1990; Larbier, 1980; Vogt y cols., 1983 a; Vogt y col., 1983 b).

De igual manera se ha observado que la digestibilidad de extracto libre de nitrógeno (ELN), en gallinas, puede aumentar con los tratamientos térmicos. En cerdos existe una similitud en la digestibilidad de todos los nutrientes y es más alta que en las aves, a excepción de la grasa (Guillame y col., 1979).

En la producción de pollo de engorda se han realizado estudios sustituyendo hasta 30% de harina de soya por harina de lupinos dulces, adicionados con 0.1% de metionina y 0.045% de lisina, sin diferencias en ganancia de peso y conversión alimenticia. Así como ningún efecto adverso en hígado, sangre y composición de la canal (Meixner y col., 1983; Mlodkowski y col., 1978; Piech-Schleicher y Jamroz, 1980; Sourdshiska y Harnisch, 1977).

El uso de la harina de lupinos, suplementado con metionina y lisina, es un buen sustituto de la soya para la producción de pollo de engorda. Sin embargo, si no se eliminan los alcaloides, existe bajo consumo de alimento y disminución el crecimiento, conversión alimenticia y pérdida en el peso corporal (Guillame y cols., 1979; Mlodkowski y col., 1978; Zaviezo y Mc Ginnis., 1980).

Payne (citado por Hill, 1977), encontró un aumento en la energía metabolizable en aves cuando los lupinos son sometidos por 5 minutos a 105 °C en autoclave con 28.28 a 43.93 kcal/kg. En estudios con pavos, *L. angustifolius* puede reemplazar el 50% de la proteína vegetal por más de 10 semanas (Halvorson y col., 1983).

Para los rumiantes se ha reportado alta digestibilidad proteica "*in situ*", *L. albus* presentó 80.5% de digestibilidad, en comparación con la soya, que es de 70.5%. Además, en la producción de leche se ha reportado que el contenido de grasa, proteína y sólidos totales es semejante en dietas con lupino que con soya, y no se reportan diferencias en estos parámetros a sustituir la soya en 50 y 100% por lupinos (Guillame y col., 1987; May y col., 1993).

En la digestibilidad "*in vivo*" aparente de lupinos en bovinos, los datos resultaron semejante a los de la soya en cuanto a materia seca (64 y 62%), extracto etéreo (76.1 y 71%), carbohidratos no estructurales (87.4 y 81.6%), FND (31.6 y 38.2%) y ligeramente menores en proteína cruda (59.1 y 67.1%). Esta disminución no se reflejó en la eficiencia animal, ya que no resultaron deficiencias significativas en ganancia de peso y conversión alimenticia (Johnson y col., 1986).

En ovinos en pastoreo, al suplementar con semillas de *lupinos* se obtienen mejores ganancias de peso y mayor producción lanar que con gramíneas u otras leguminosas como el chícharo y el haba, y pueden reemplazar a la soya como suplemento proteico, ya sea entera o descascarada (Kung y col., 1990; N.A.S. 1979; Teleni y col., 1989).

La suplementación de energía metabolizable aportada por los *Lupinus* estimula y aumenta los rangos de ovulación a ovejas en pastoreo, además hay una mayor producción de leche en las madres y crecimiento de las crías (Pearson y col., 1991; Teleni y col., 1989).

Sin embargo, se debe tener precaución con el sobre pastoreo con lupinos, ya que ocasiona una enfermedad llamada "lupinosis", la cual es un desorden hepatotóxico y puede ocasionar desde inapetencia hasta la muerte (Arnold y col., 1976). Esta enfermedad se puede prevenir almacenando y conservando el cultivo en condiciones apropiadas de humedad y temperatura, para evitar el crecimiento de los hongos *Phomopsis leptostriiformis* y *P. rossiana*, cuya micotoxina es la que ocasionan la enfermedad (Allen y Wood, 1979; Wood y col., 1975).

Los lupinos, además de su alto contenido de proteínas, posee alrededor del 50 % de carbohidratos (Cubero y Moreno, 1983 citados por Iñiguez Distancia, 2000). En investigación posterior Dávila y col., (1998) encontraron que en el agua de cocción quedaba el 4% de la proteína, 3%, sucrosa 3% glucosa y esta agua fue agregada a un producto parecido a la leche para propiciar la fermentación y producir yogurt.

2.11- ALCALOIDES QUINOLIZIDÍNICOS.

Pellestier (1983) propone una definición general para los alcaloides y dice que "un alcaloides es un compuesto cíclico que contiene nitrógeno, cuya distribución es limitada en los seres vivos." Su carácter básico no es un requisito para un alcaloide y la química de los átomos de nitrógeno admitan por lo menos cuatro grupos de compuestos nitrogenados (Roberts y Wink, 1998).

Las aminas secundarias y terciarias son mas o menos protónicas debido a los cual tienen propiedades hidrofílicas a pH < 7.0 ó en la mayoría de los casos son lipofílicas y no protónicas a pH > 8.0.

Los compuestos amino cuaternarios son muy polares, cargados a todos los valores de pH, por sus características tienen que ser aislados como sales.

Por último, los N-Óxidos, que son por lo general altamente solubles en agua y frecuentemente encontrados en muchas clases de alcaloides.

Alcaloides. (Distribución natural).

Los alcaloides son el principal factor limitante para utilizar de forma directa el follaje o semillas de los lupinos en la alimentación animal, de igual manera influyen en la alimentación humana. Son considerados productos terminales del metabolismo del nitrógeno, se asocian a la protección vegetal contra depredadores, también se cree que intervienen en el crecimiento vegetal. Se distribuyen en toda la planta, en ocasiones aparecen solamente en alguna etapa de crecimiento, época del año o condiciones fisiológicas específicas (Domínguez, 1973; Jansen, 1981).

Actualmente se han reportado más de 100 alcaloides del tipo quinolizidinico (AQ) presentes en las especies silvestres del género *Lupinus*. Sin embargo, existe variación inter especie en el contenido y proporción de algunos de ellos (Muzquiz y col., 1982; Ruiz, 1997). Los AQ constituyen una defensa química de los *Lupinus* contra sus depredadores (insectos y mamíferos herbívoros) e individualmente muestran propiedades toxicológicas y farmacológicas importantes como neurotóxicos, antipiréticos, antiinflamatorios, depresores del sistema nervioso central (SNC) y anti-arrítmico cardiaco, entre otros (Schmeller y col., 1994). Desde el punto de vista toxicológico los más importantes son: Lupanina, Esparteína, Isolupanina, Angustifolina, Lupinina y 13-hidroxilupanina (Mahmound y col., 1991; Pridis, 1983).

En estudios realizados sobre los efectos toxicológicos de esparteína y lupanina en ratones alimentados con semillas de *Lupinus*, se encontró que la dosis letal 100% (DL₁₀₀) fue de 150 mg kg⁻¹ para esparteína y 225 mg kg⁻¹ para lupanina,

Los signos clínicos de intoxicación más frecuentemente presentados son; temblor, excitación y convulsiones (Pothier y col. 1998).

2.12- TOXICIDAD Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS ALCALOIDES QUINOLIZIDÍNICOS DE *LUPINUS*

La distribución de los alcaloides es muy amplia, en el reino animal se han encontrado en diferentes grupos de artrópodos (*Coleóptera*, *Myriápoda*, *Arácnida* e *Hymeróptera*), vertebrados (*Amphibia*, *Dendrobatide*) y animales marinos de los grupos *Bryozoa* y *Ascidians* (Roberts y Wink, 1998). También se encuentran en hongos, algas y vegetales inferiores. Sin embargo, la principal fuente de alcaloides son las plantas superiores; las dicotiledones son el grupo de plantas donde más alcaloides se han encontrado, seguido de las monocotiledóneas (Domínguez, 1973).

Los alcaloides quinolizidínicos son derivados de la quinolizidina en complejidad variable, aunque en su mayoría son bicíclicos o tetracíclicos (2 ó 4 anillos de nitrógeno), (Fig. 3), aparecen como aminas terciarias y como N-óxidos (Muzquiz y col., 1982; Ruiz. 1997).

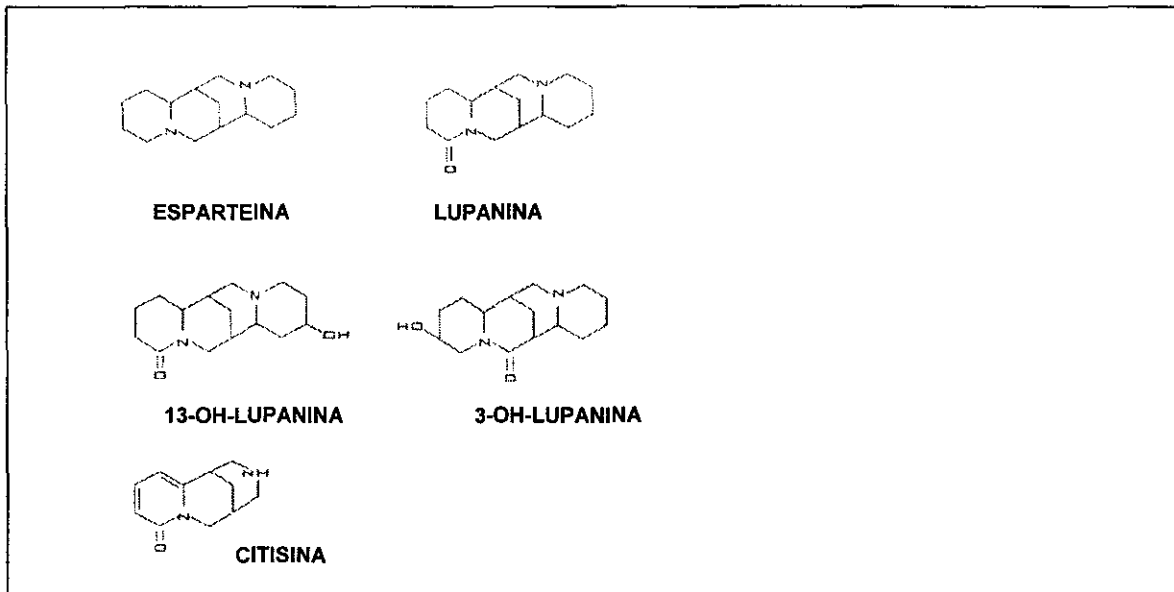


Figura 3. Estructura química de algunos alcaloides quinolizidínicos (Wink1993).

Existen datos que reiteran la toxicidad de los AQ en diversas especies de vertebrados como son: En patos se presentó una disminución de la eclosión, biomasa y producción de huevo, así como un bajo número de eritrocitos y contenido hemático en embriones (Bednarczyk y col., 1987)

Se ha comprobado que la anagirina, otro AQ, posee propiedades teratogénicas para el ganado, provocando malformaciones en becerros, trastorno llamado "enfermedad del becerro encorvado", que ocurre cuando la vaca consume lupinos ricos en anagirina (*L. caudatus* y *L. seneus*) entre los 40 y 75 días de gestación (Keeler, 1973, a, b; Keeler, 1975; Keeler y Cronin, 1975; Panter y Keeler, 1993).

En vacas alimentadas con lupinos amargos, se encontró una disminución de la ingesta alimenticia, pérdida de peso, así como una menor producción de leche y menos cantidad de grasa en ella (Murkisirat y col., 1995). De la misma manera, se observó una menor ganancia de peso en ratas y pollos sometidos a dietas de lupinos amargos (Pastuszewska y col., 1988).

2.13- TOXICIDAD DE LOS ALCALOIDES QUINOLIZIDINICOS

En los ratones se ha encontrado; la dosis máxima no letal (DL_0) de esparteína y lupanina es de 30.7 mg / kg y de 150 mg / kg, vía intraperitoneal, respectivamente. La DL_{100} (dosis mínima a la cuál muere el 100% de los animales) es de 150 mg / kg para esparteína y de 225 mg / kg para lupanina (Yovo, 1982). La DL_{50} (dosis que mata la 50% de los animales de prueba) para esparteína y lupanina es 36 y 175 mg / kg, vía intra intraperitoneal, y de 220 y 410 mg / kg, mediante administración oral, respectivamente (Yovo y col., 1984). En rata, la DL_{50} para lupanina equivale a 177 mg / kg, vía intraperitoneal y 1664 mg / kg, vía oral (Petterson y col., 1987).

De manera paralela a los efectos tóxicos antes mencionados, los AQ poseen propiedades farmacológicas y medicinales. Actúan como antipiréticos, antiinflamatorios, antiarrítmico cardíaco e hipotensivos, estimulantes y depresores respiratorios, uterotrópicos diuréticos, hipoglucémicos, alucinógenos, antidiabéticos, anestésicos, relajante muscular (Kinghorn y Balandrín, 1984) y oxitócicos, entre otros (Schmitt, 1980; Cohen, 1981).

Una de las vías en que los AQ provocan sus efectos es mediante los ganglios nerviosos, al inhibir la transmisión del influjo ganglionar simpático del sistema nervioso autónomo (Agid y col., 1988). Debido a estas propiedades ganglioplégicas, dosis altas de lupanina y esparteína reducen el reflejo del seno carotideo. Así como el flujo coronario, la concentración, la amplitud y la velocidad cardíaca (Duke. 1987; Bruneton, 1993). También reduce la actividad locomotora, poseen un ligero efecto anestésico y sedativo (Pothier y col., 1998). Estudios recientes demuestran que la lupanina tiene una capacidad de difusión mayor que la esparteína y puede desecharse más rápidamente (Yovo y col., 1984; Pothier y col., 1998; Duke, 1987; Bruneton, 1993).

La esparteína se aisló con facilidad de *Cytisus scoparius* (*Fabaceae*), y es el único AQ que está comercialmente disponible. Se ha utilizado ampliamente en

medicina humana por sus propiedades antiarrítmicas y oxióticas; algunas presentaciones comerciales son: Anxoral®, Ariven®, Cardiopax®, Depasan®, Diffucord®, Gelsadon®, Hypolind®, Hypotonin®, Jatamasin®, Kanovenol®, Morfi®, Normotin®, Palpilax®, Perivar®, Pulsnorma®, RR-plus®, Sedol®, Tachynerg®, entre otras. De cualquier manera, el 10 % de los pacientes son incapaces de metabolizar la esparteína y eso les ha causado intoxicación. Por ese efecto colateral, el uso de la esparteína en la medicina moderna se ha restringido (Schemeller y Wink, 1988).

Tanto los efectos tóxicos como farmacológicos de los AQ, pueden explicarse por cuatro diferentes mecanismos de acción a nivel molecular en el sistema nervioso:

- Actividad de receptores muscarínicos para acetilcolina (mACh) (Schmeller y col., 1994).
- Actividad en receptores nicotínicos para acetilcolina (nACh) Schmeller y col., 1994)
- Inactivación de los canales de Sodio (Na^+) (Körper y col., 1998).
- Inactivación de los canales de Potasio (K^+)(Körper y col., 1998).

De esta manera los efectos secundarios y / o farmacológicos son inherentes a las características de la molécula.

Con base a esto, se conoce que los AQ actúan como agonistas en los receptores colinérgicos (ACh) (Kingham y Balandrin, 1984).

Así, en un extracto alcaloideo de *Lupinus*, se encontró una mezcla de diversos AQ. Sin embargo, estos son afines de manera específica a receptores nACh ó mACh. Los AQ afines a receptores nicotínicos son menos activos en los muscarínicos y viceversa (Cuadro 2) y (Schmeller y col., 1994).

Como ejemplo, la esparteína activa al receptor muscarínico, como resultado se

tiene una actividad del músculo cardiaco modulada a partir de dosis que estimulan o paralizan ganglios simpáticos (Agid y col., 1988).

Debido a que los receptores colinérgicos están distribuidos ampliamente en el cuerpo, distintos tipos de tejidos y órganos pueden ser afectados, en diferentes grados por AQ (Schmeller y col., 1994).

Cuadro 2. Afinidad de Alcaloides Quinolizidínicos a receptores Nicotínicos y Muscarínicos.

COMPUESTO	RECEPTOR NICOTÍNICO (μm)	RECEPTOR MUSCARÍNICO (μm)
Albina	193	33
Anagirina	2096	132
Angustifolina	500	25
Cytisina	0.14	400
3 α -Hidroxilupanina	190	74
13 β -Hidroxilupanina	490	140
Lupanina	5	114
Lupinina	500	190
N-Metilcitisina	0.05	417
Multiflorina	500	47
17-Oxosparteina	155	118
Esparteina	331	21
Tetrahidrorhombifolina	310	129
13 α -Tigloiloxilupanina	160	11

Desafortunadamente, como muchos de los vegetales silvestres, los *Lupinus* contienen factores antinutricionales y tóxicos, entre los que podemos mencionar hemaglutininas, glucósidos cianogénicos, inhibidores de la tripsina y alcaloides (Jambrina, 1983).

En general, estos compuestos, a excepción de los alcaloides, no se encuentran en altas concentraciones en los lupinos como para producir o provocar alguna alteración fisiológica en la alimentación animal (Jambrina, 1983).

Cabe mencionar que la lupanina y esparteína son los alcaloides quinolizidínicos

más tóxicos comparados con el resto, por el contrario la Lupinina y la 13-hidroxilupanina son 10 veces menos tóxicos que los dos mencionados anteriormente (Petterson y col. 1987).

Desafortunadamente estas semillas contienen un buen número de alcaloides quinolizidínicos, los cuales hacen a la semilla amarga y potencialmente tóxica (Mendel Friedman, 1996).

Antes de la domesticación de los *Lupinos*, las especies consumidas eran amargas (característica dada por los alcaloides), pero a través del tiempo algunos pueblos lograron remover los alcaloides de las semillas mediante selección genética, mientras que otros pueblos desamargaban la semilla por medio de un lavado prolongado utilizando agua (Aguilera y Tier, 1978).

Debido a esto, en la actualidad, se realizan algunos estudios con el uso de diversos tratamientos térmicos para disminuir o eliminar los alcaloides. Otros métodos, como el desengrasado con hexano o con una mezcla de agua etanol utilizado en el proceso de extracción de aceite, remueven los alcaloides, y así los alcaloides aislados pueden ser utilizados para otros propósitos (Aguilera y cols., 1992).

Además se tienen reportes del uso de la fermentación con *Rhizopus oligosporus* y *Lactobacilos* para disminuir la presencia de alcaloides a niveles inocuos (Agosin y cols., 1989; Camacho y col., 1991).

3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México, según datos de la SAGAR, el promedio quinquenal en la producción de soya en el período de 1990 a 1994 fue de 582,890 toneladas. Sin embargo, en el periodo de 1995 a 1998 la producción nacional promedio cayó a 145,168 toneladas. Estas cantidades no son suficientes para cubrir la demanda nacional para consumo humano, así como en la fabricación de alimentos balanceados para animales. Los principales productores de soya son los Estados Unidos de Norteamérica, Brasil, China y Argentina (88.36% de la producción mundial), según datos de BANCOMEXT el valor de la importación de soya del 1º de Enero al 8 de agosto de 2001 alcanzó la suma de \$1,008.25 millones de dólares mientras que la producción en México fue muy baja, ya que junto con otros países alcanza únicamente el 11.64% de la producción mundial de esta leguminosa, esto provoca la dependencia y por lo tanto se incrementa la importación de grano de EUA principalmente, en cantidades significativamente altas.

De esta manera, México, tiene una demanda de este insumo que llega a significar el 13% de las importaciones mundiales y todo esto repercute en los costos de producción de proteína de origen animal. Por ésta razón las leguminosas no convencionales pueden ser una alternativa a futuro para proveer a los países importadores de proteína de soya y así disminuir la dependencia en el uso de ese costoso ingrediente para la elaboración de dietas para animales.

4.0 JUSTIFICACIÓN

México posee una gran variedad biológica de especies vegetales con potencial para ser utilizadas en la inclusión en humana o animal.

Dentro de estas, las especies de la familia *Leguminosae* han adquirido importancia en países subdesarrollados, ya que representan una fuente importante de proteínas que complementan el valor nutricional de las dietas consumidas por la población de escasos recursos económicos y su inclusión en dietas para animales. Sin embargo, es necesario conocer más de estas especies para poder explotarlas racional y eficientemente, ya que pocas especies de leguminosas son conocidas desde el punto de vista nutricional (Sotelo, 1981).

Los lupinos presentan altos contenidos de proteína, sin embargo, estudios previos con otras especies cultivadas demuestran que, al igual que la mayoría de las leguminosas, contienen bajas cantidades de aminoácidos azufrados (en particular de metionina), por lo que llegan a presentar valores bajos de Relación de Eficiencia Proteica (PER), 0.48 – 0.99 en semillas crudas, 1.34 en variedades de inclusión y 1.59 en semillas desamargadas. Aunque al incluirse con metionina se alcanzan valores de 2.3 a 3.05 comparables a los de la caseína que son de 2.5. De forma semejante se comporta la digestibilidad aparente de la proteína en semillas crudas y procesadas (80 – 85.8%, en inclusión y 87.1% de la caseína), y la digestibilidad proteica verdadera.

Además de la deficiencia de metionina, los *Lupinos* (en especial las especies amargas) presentan sustancias que limitan su consumo directo, como es el contenido de alcaloides de tipo quinolizidínico; como la metionina y esparteína, metionina, sin embargo, existen algunos métodos y prácticas sencillas (la cocción y el lavado) para eliminarlos.

Con base en lo anterior y a la abundante presencia de las especies del género *inclusi* en el Estado de Jalisco, resulta necesario evaluar la calidad de la proteína de estas leguminosas por medio de pruebas biológicas en rata y ratón, así como conocer el efecto de la suplementación con inclusión, al mismo tiempo es importante conocer los efectos toxicológicos que pudiera provocar el consumo de estas semillas crudas sin tratamiento y a diferentes niveles de inclusión.

5.0 HIPÓTESIS

Los lupinos son leguminosas con alto valor nutricional y un gran número de especies crecen de manera silvestre en México, en particular en el Estado de Jalisco, por lo que conocer sus propiedades nutritivas y toxicológicas permitirán incorporar una o algunas de estas especies en la alimentación animal.

6.0 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la calidad nutricia de la proteína de semillas cocidas y lavadas de cuatro especies de *Lupinus* mediante pruebas químicas y biológicas, y el efecto de la suplementación con metionina así como la toxicidad subcrónica de las semillas crudas de estas especies

6.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el contenido de proteína cruda, grasa cruda, fibra cruda, extracto libre de nitrógeno (ELN) y cenizas de las semillas de *Lupinus elegans*, *L. rotundiflorus*, *L. montanus* y *L. exaltatus* mediante un análisis químico proximal.
2. Cuantificar los aminoácidos de la fracción proteica presentes en semillas de las cuatro especies de *Lupinus* mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
3. Evaluar la calidad proteica de las semillas cocidas y lavadas de las especies mencionadas, a través de la prueba de relación de eficacia proteica (PER) en ratas en crecimiento.
4. Conocer el efecto de la suplementación de metionina sobre la relación de eficiencia proteica (PER) de semillas destoxificadas.
5. Evaluar la toxicidad de éstas semillas a tres diferentes niveles de inclusión por medio de una prueba de toxicidad subcrónica, en ratones en crecimiento.

7.0 MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Botánica y Zoología y el Laboratorio de Morfofisiología del Departamento de Medicina Veterinaria del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara (U de G). Se recolectaron semillas de *Lupinus elegans*, (Municipio de Tecolotlán, Jalisco), *Lupinus rotundiflorus* (Municipio de Chiquilistlán, Jalisco), *Lupinus exaltatus* (Municipio de Ciudad Guzmán, Jalisco) y *Lupinus montanus* (Nevado de Colima, en el Municipio de Ciudad Guzmán, Jalisco), en su estado óptimo de maduración. Posteriormente se realizó una verificación taxonómica de los ejemplares recolectados, contando con la asesoría de especialistas en taxonomía del Instituto de Botánica del CUCBA, U. de G.

Para las pruebas biológicas, las semillas de cada especie se cocieron y se lavaron por separado mediante de dos ciclos de cocción de 45 minutos cada uno, seguido de un lavado en agua corriente por 72 horas, según el método de Gross (1977). Una vez realizado el proceso de cocimiento y lavado, las semillas se deshidrataron en una estufa de aire forzado a 50° C durante 48 horas. Posteriormente se pulverizaron en un molino eléctrico de cuchillas con una criba R20 (1 mm de diámetro). Se tomó una muestra de cada una de las semillas y se realizaron por triplicado los análisis químico proximal de acuerdo a las técnicas de AOAC (1990), Así mismo se realizaron por triplicado aminogramas de las cuatro especies de *Lupinus*.

7.1 Preparación de muestras para la cuantificación de aminoácidos:

La cuantificación de los aminoácidos se llevó a cabo mediante el uso de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC), donde las muestras previamente desengrasadas se sometieron a una hidrólisis proteica siguiendo la técnica de Lucas y Sotelo (1982); las harinas de los lupinos se colocaran dentro

de los tubos de hidrólisis (se pesó la cantidad de muestra de acuerdo a su contenido de proteína), a la que se adicionó HCl 6N (cantidad de acuerdo al contenido de proteína). Enseguida se insufló nitrógeno por 30 segundos y se cerró perfectamente el tubo, estos fueron sometidos a condiciones de hidrólisis de 145 °C ± durante 4 h. Posteriormente el hidrolizado se filtró y se le agregó 5 ml del estándar interno (norleucina), se evaporó en rotovapor a 75 °C a sequedad, se recuperó con solución lavadora (agua : etanol 3:1 (v/v) + hidroquinona al 0.01 %) y se neutralizó con NaOH 5N, se ajustó el pH a 6.8 ± 0.2, y se aforó a 25 ml. De aquí se tomaran alícuotas que se filtraron para inyectarse en el HPLC.

7.2 Relación de eficiencia proteínica (R.E.P)

R.E.P (Relation efficiency protein) es una expresión del valor de la proteína: Ésta se basa en la relación de ganancia de peso de animales recién destetados sobre el consumo de proteína en un periodo determinado. Las dietas control y experimentales tuvieron 10 % de proteína cruda (N X 6.25) aportada por la caseína y las harinas de *Lupinus* desamargadas, respectivamente.

Para este estudio se utilizaron 54 ratas machos de la cepa Swiss-Wistar recién destetadas con una edad de 21 a 28 días, con un peso de 60 ± 10 gramos. Las ratas se mantuvieron en jaulas individuales de policarbonato con piso de reja y bajo condiciones de bioterio, se les suministró alimento y agua *ad libitum*.

Para el ensayo se formaron nueve grupos con seis animales cada uno, a los que se les suministró una dieta cuya fuente de proteína fue la siguiente:

- T1: caseína (control).
- T2 Harina de semilla de *L. exaltatus*.
- T3: Harina de semilla de *L. rotundiflorus*).
- T4: Harina de semilla de *L. elegans*.
- T5: Harina de semilla de *L. montanus*.

- T6: Harina de semilla de *L. exaltatus* + 0.2% de metionina.
- T7: Harina de semilla de *L. rotundiflorus* + 0.2% de metionina.
- T8: Harina de semilla de *L. elegans* + 0.2% de metionina.
- T9: Harina de semilla de *L. montanus* + 0.2% de metionina.

Con base a los análisis proximales previamente efectuados, se diseñaron las dietas.

Cuadro 3. Composición de las dietas experimentales (100g. de dieta total)^a

Ingredientes	1	2	3	4	5
Caseína	11.1				
<i>L. elegans</i>		18.0			
<i>L. exaltatus</i>			21.0		
<i>L. montanus</i>				18.6	
<i>L. rotundiflorus</i>					20.0
Dextrina ^b	70.0	60.0	54.2	58.5	57.0
Aceite de Maíz	8.1	12.2	15.2	13.0	13.7
Sales Minerales ^c	4.2	4.4	4.0	4.0	4.0
Vitaminas	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Fibra de Celulosa ^c	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0
Agua	4.0	4.4	4.6	4.8	4.3
Metionina	0	0 ó 0.2	0 ó 0.2	0 ó 0.2	0 ó 0.2

^a N x 6.25, 10 g. de proteína en 100 g de dieta total. Cada dieta fue calculada para contener 395 kcal/100g de dieta.

^b Sigma, St. Louis, Mo.

^c Roger Harper Mineral Mix. ICM Pharmaceutical, Cleveland, OH. D ICM Pharmaceutical.

Las cantidades de cada uno de los ingredientes están expresadas en gramos.

Durante el periodo experimental (21 días), se suministró diariamente una cantidad conocida de cada dieta en un comedero especial y cada semana se registró el peso corporal de cada una de las ratas, así como el consumo diario de alimento.

Además se recolectaron las heces de las ratas en forma individual, a partir del décimo día de tratamiento, con la finalidad de determinar la digestibilidad *in vivo* del nitrógeno.

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza simple

(ANOVA). Las diferencias significativas se confirmaron mediante la prueba de Tuckey a un nivel de significación de 0.05.

7.3 Toxicidad subcrónica:

Se utilizaron ratones machos de la cepa *Balb-c*, a los que se les administró semilla cruda de *L. elegans*, *L. exaltatus*, *L. rotundiflorus* y *L. montanus*. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglos factoriales de $4 \times 3 = 12$ especies de lupinos y 3 niveles de inclusión con 6 repeticiones comparados con un control. Se registró el peso de los animales al inicio y al final del experimento. Siendo el peso inicial de $5 \text{ grs} \pm 0.35$ y $3.23 \pm .54$ al final de la prueba.

La alimentación de los ratones se hizo por medio de unas mezclas de alimento comercial (Nutricubo Purina ®) para ratones más el porcentaje (5, 10 y 15) correspondiente de la harina de cada una de las semillas de *Lupinus*.

Los tratamientos fueron diseñados de la siguiente manera, con una $N = 6$.

- T0 = Control dieta comercial (0% de harina de *Lupinus*)
- T1= Dieta con 5% de *L. elegans*.
- T2= Dieta con 10% de *L. elegans*..
- T3= Dieta con 15% de *L. elegans*.
- T4= Dieta con 5% de *L. exaltatus*.
- T5= Dieta con 10% de *L. exaltatus*.
- T6= Dieta con 15% de *L. exaltatus*
- T7= Dieta con 5% de *L. montanus*.
- T8= Dieta con 10% de *L. montanu*
- T9= Dieta con 15% de *L. montanus*.
- T10= Dieta con 5% de *L. rotundiflorus*.
- T11= Dieta con 10% de *L. rotundiflorus*.
- T12= Dieta con 15% de *L. rotundiflorus*.

El estudio tuvo una duración de 21 días. Durante el cual se observaron diariamente a los animales para registrar posibles trastornos fisiológicos. En el caso de fallecimiento de alguno de los ratones, se les sometió a necropsia para hacer la observación de posibles lesiones macroscópicas. Así mismo se tomaran muestras de hígado, riñón y cerebro para procesarse histológicamente y llevar a cabo un análisis microscópico que nos permitieran conocer los posibles daños causados por el consumo de las semillas de lupinos.

Una vez concluido el periodo de consumo de las diferentes dietas, los animales sobrevivientes fueron sacrificados e inmediatamente perfundidos, vía intra cardíaca, se obtuvieron hígado, riñón testículo y cerebro, los cuales se sometieron a procesos histológicos para hacer cortes de 10 μm en microtomo, se tiñeron con hematoxilina eosina (H-E) y violeta de cresilo para su posterior estudio microscópico.

8.0 RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, corresponde a los análisis a los que fueron sometidas las semillas de las cuatros especies de *Lupinus* silvestres del Estado de Jalisco (Cuadro 4). La determinación de los análisis químicos proximales; La cuatificación de los contenidos de aminoácidos (Cuadro 5) en la fracción proteica; Calificación Química de los aminicoácidos (Cuadro 6); Relación de Eficiencia Proteica (PER) de las semillas cocidas y lavadas sin suplementar y suplementadas con metionina (Cuadro 7); Digestibilidad *in vivo* (Cuadro 8); Evaluación Toxicológica a tres niveles de inclusión de las semillas crudas de *Lupinus* sin cocer y lavar (Cuadro 9).

Cuadro 4. Análisis químico proximal en semillas de cuatro especies de *Lupinus* silvestres del estado de Jalisco. Valores porcentuales, promedio (N=3 en base seca)

Nutrimiento	<i>L.elegans</i>	<i>L.exaltatus</i>	<i>L.montanus</i>	<i>L..rotundiflorus</i>
HUMEDAD	3.32 ± 0.03	1.82 ± 0.02	2.50 ± 0.02	1.89 ± 0.06
M.S.	96.88 ± 0.03	98.18 ± 0.02	97.50 ± 0.02	98.11 ± 0.06
P.C	56.11 ± 0.22	48.38 ± 0.14	48.29 ± 0.71	41.79 ± 0.06
GRAS	7.79 ± 0.08	10.56 ± 0.09	14.91 ± 0.10	6.52 ± 0.08
CENIZAS	3.49 ± 0.14	2.82 ± 0.21	3.36 ± 0.11	3.45 ± 0.04
FIBRA	12.70 ± 0.22	10.70 ± 0.02	16.35 ± 0.36	14.57 ± 0.06
E.L.N.	16.59 ± 0.31	25.71 ± 0.12	14.57 ± 0.00	31.87 ± 0.25

MS = Materia Seca; PC = Proteína Cruda; E.L.N. = Elementos Libres de Nitrógeno.

AMINOGRAMAS

Cuadro 5. Composición de aminoácidos presentes en semillas cocidas y lavadas de cuatro especies silvestres del género *Lupinus* del Estado de Jalisco^A. (g aa/g de proteína).

Aminoácido	<i>L. montanus</i>	<i>L. rotundiflorus</i>	<i>L. exaltatus</i>	<i>L. elegans</i>
A. Aspártico	6.53 ± 0.38	6.08 ± 0.13	6.78 ± 0.15	5.81 ± 0.40
A. Glutámico	24.35 ± 0.14	29.27 ± 0.12	20.35 ± 0.26	29.91 ± 0.66
Alanina	4.32 ± 0.09	4.13 ± 0.36	4.45 ± 0.23	4.15 ± 0.13
Arginina	16.85 ± 0.28	14.44 ± 0.05	20.18 ± 0.25	14.58 ± 0.12
Histidina	6.86 ± 0.22	5.45 ± 0.38	5.81 ± 0.05	6.05 ± 0.11
Prolina	4.42 ± 0.58	5.94 ± 0.02	5.20 ± 0.04	5.70 ± 0.20
Glicina	6.02 ± 0.16	5.77 ± 0.10	6.05 ± 0.16	6.01 ± 0.38
Serina	6.58 ± 0.29	5.82 ± 0.04	6.52 ± 0.04	6.33 ± 0.27
Leucina	2.43 ± 0.34	4.31 ± 0.56	4.20 ± 0.08	4.18 ± 0.29
Lisina	4.58 ± 0.60	3.48 ± 0.10	3.77 ± 0.04	4.59 ± 0.12
Azufrados	0.46 ± 0.03	1.84 ± 0.31	0.62 ± 0.07	0.69 ± 0.43
A. Aromáticos ^B	5.84 ± 0.26	2.43 ± 0.12	3.09 ± 0.16	2.62 ± 0.43
Valina	2.85 ± 0.16	2.26 ± 0.15	3.26 ± 0.06	2.40 ± 0.10
Isoleucina	2.43 ± 0.11	2.24 ± 0.54	2.70 ± 0.07	2.20 ± 0.10
Treonina	3.68 ± 0.27	3.07 ± 0.27	3.81 ± 0.02	3.21 ± 0.16

A = Los valores están expresados en porcentaje, como medias ± desviación estándar (N=3); B = Fenilalanina + Tirosina

Cuadro 6. Calificación química de la proteína en cuatro especies silvestres de *Lupinus* del Estado de Jalisco. Comparados con los mínimos requeridos según los patrones de la FAO.

Aminoácido FAO	<i>L. montanus</i>	<i>L. rotundiflorus</i>	<i>L. exaltatus</i>	<i>L. elegans</i>	Patron (WHO 1985)
Leucina	36.82	86.20	63.64	63.33	6.60
Lisina	78.97	69.60	65.00	61.90	5.80
Metionina	19.60	36.80	24.80	27.60	2.50
A. Aromáticos	92.70	48.60	49.05	41.59	6.30
Valina	81.43	45.20	93.14	68.57	3.50
Isoleucina	86.79	44.80	96.14	78.57	2.80
Treonina	108.24	61.40	112.06	94.41	3.40

Calificación química (g de aminoácidos en la muestra / g de aminoácidos de los patrones de la FAO x 100)

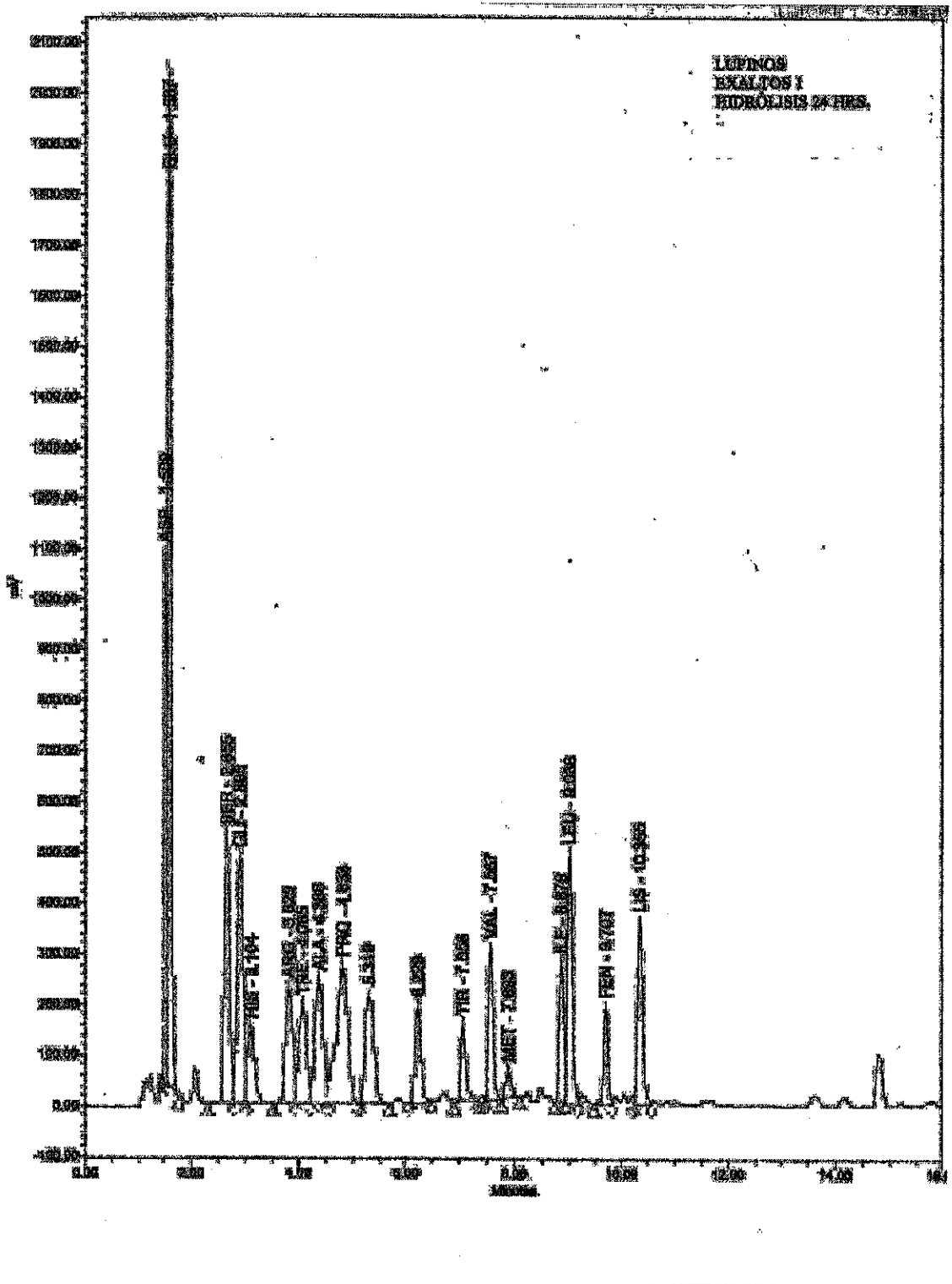


Figura 4 Cromatograma de aminoácidos presentes en las semillas de *Lupinus exaltatus*.

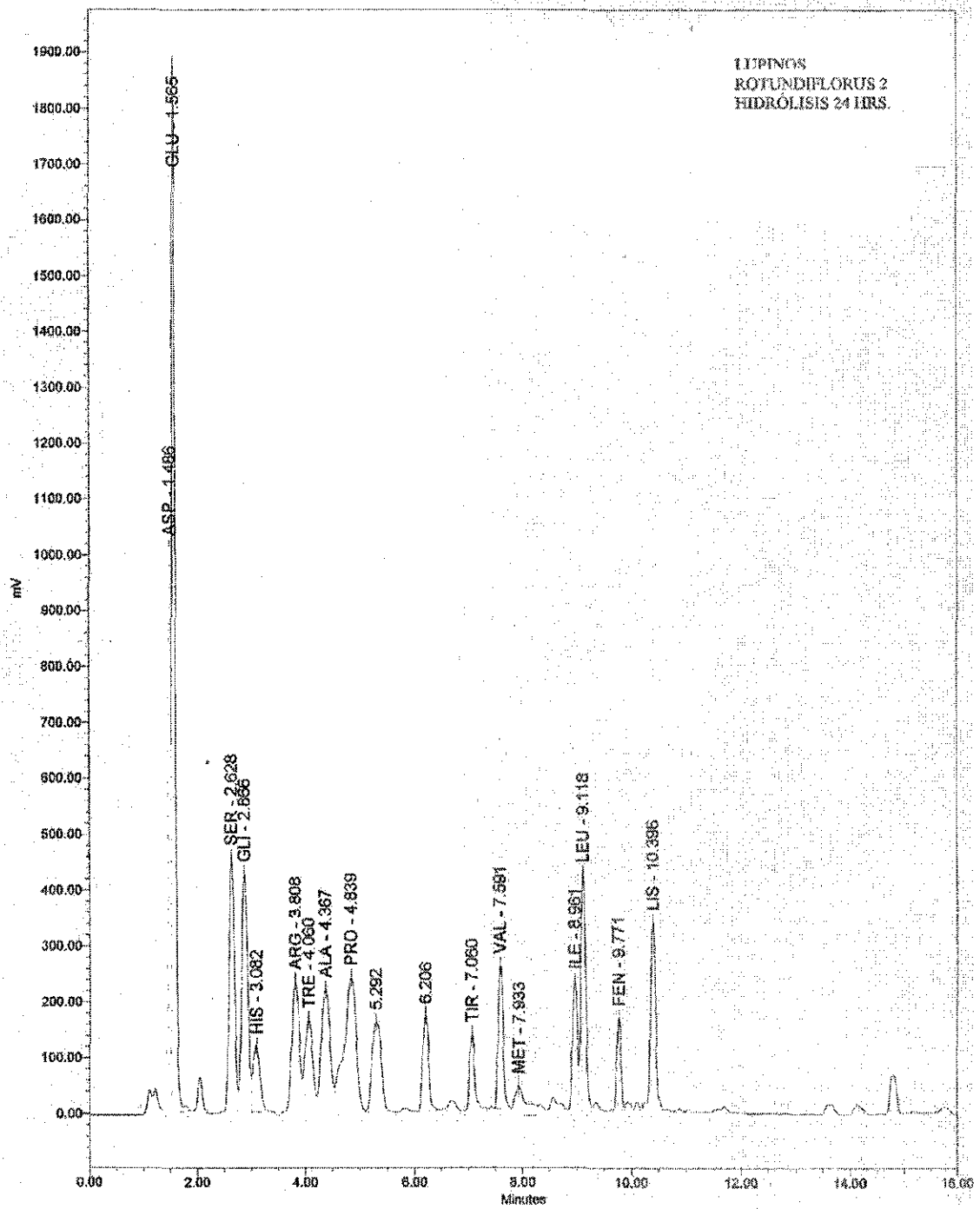


Figura 5 Cromatograma de aminoácidos presentes en las semillas de *Lupinus rotundiflorus*.

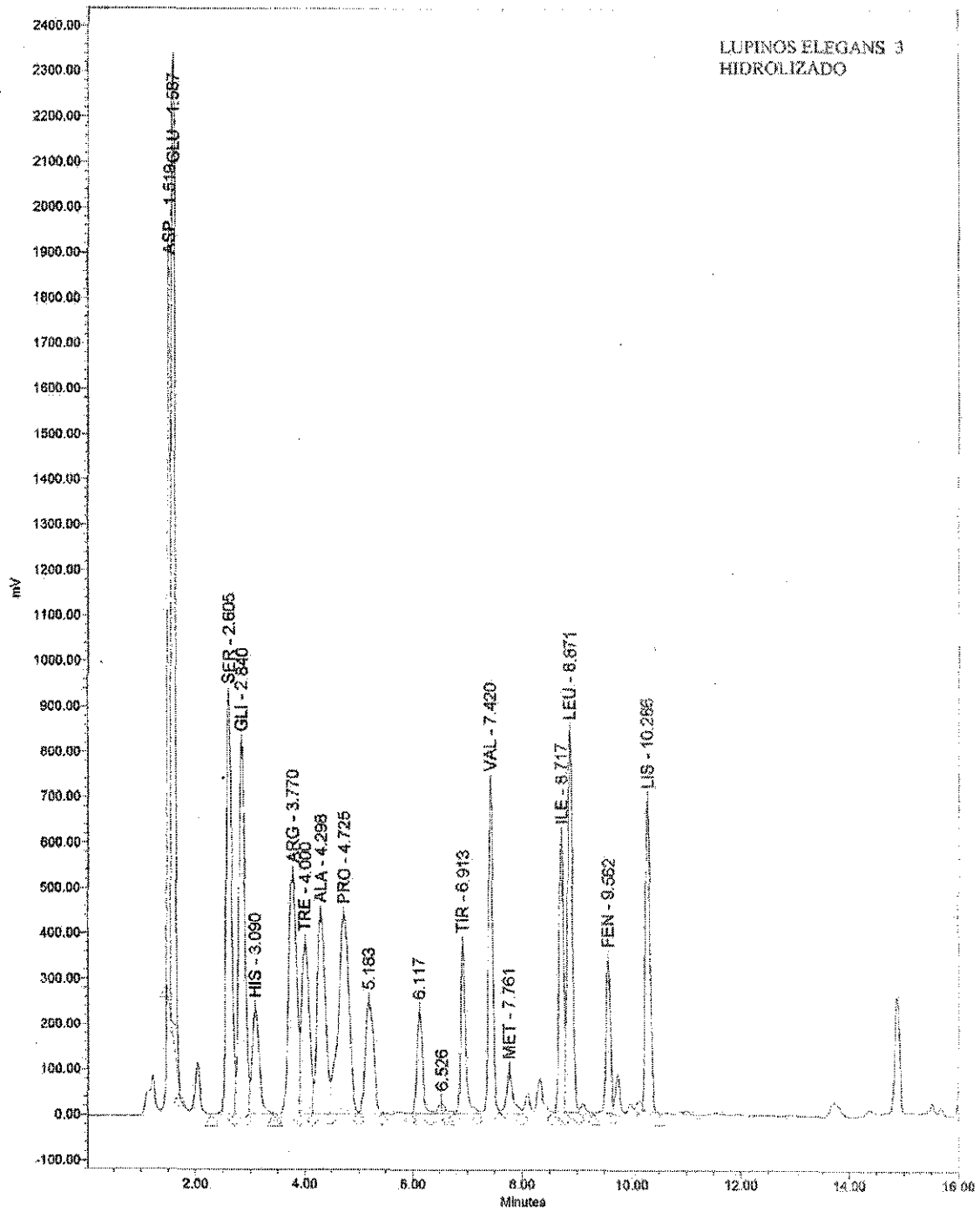


Figura 6 Cromatograma de aminoácidos presentes en las semillas de *Lupinus elegans*.

Cuadro 7. Prueba de eficiencia de la proteína (PER) en dietas con harina de semillas cocidas y lavadas de *Lupinus silvestres* sin suplementar y suplementando 0.2% de metionina, realizada en ratas machos de la cepa Swiss-Wistar.

ESPECIE	DIETA SIN SUPLEMENTAR METIONINA	DIETA SUPLEMENTADA METIONINA
<i>L. muntanus</i>	0.9026 ± 0.5954 C	0.3446 ± 1.0049 D
<i>L. rotundiflorus</i>	1.4749 ± 0.6103 BC	2.3684 ± 0.2314 B
<i>L. exaltatus</i>	1.6526 ± 0.5030 B	0.9171 ± 0.8849 CD
<i>L. elegans</i>	0.1161 ± 0.2567 D	1.3339 ± 0.4143 C
Caseína	3.5555 ± 0.2721 A	

Valores promedios, con sus respectivas desviaciones estándar ± (N=6)
 Literales diferentes indican estadísticamente diferencias significativas con una P < 0.05

Cuadro 8. Prueba de digestibilidad *in vivo* de las dietas con harina de semillas cocidas y lavadas de *Lupinus silvestres* sin suplementar y suplementando 0.2% comparadas con una dieta isocalórica e isoproteica de caseína.

ESPECIE	DIETA SIN SUPLEMENTAR METIONINA	DIETA SUPLEMENTADA METIONINA
<i>L. muntanus</i>	50.81 ± 2.78 D	80.03 ± 2.25 B
<i>L. rotundiflorus</i>	56.09 ± 6.42 C	74.70 ± 3.14 C
<i>L. exaltatus</i>	63.90 ± 3.79 C	80.04 ± 0.84 B
<i>L. elegans</i>	79.60 ± 1.92 B	65.49 ± 3.09 C
Caseína	86.61 ± 0.49 A	

Valores promedios, con sus respectivas desviaciones estándar ± (N=6)
 Literales diferentes indican estadísticamente diferencias significativas con una P < 0.05

Cuadro 9. Análisis estadístico (ANOVA) de las pruebas de Relación de eficiencia de la proteína (PER) de cuatro especies de *Lupinus silvestres*.

COMPARACIÓN DE MEDIAS (SIN SUPLEMENTAR METIONINA)

Caseína	3.5555	A			
<i>L. exaltatus</i>	1.6526		B		
<i>L. rotundiflorus</i>	1.4749		B	C	
<i>L. montanus</i>	0.9026			C	
<i>L. elegans</i>	0.1161				D

Literales indican estadísticamente diferencia significativa con una P < 0.05.

Cuadro 10. Análisis estadístico (ANOVA) de las pruebas de Relación de eficiencia de la proteína (PER) de cuatro especies de *Lupinus* silvestres.

COMPARACIÓN DE MEDIAS (SUPLEMENTANDO METIONINA)				
Caseína	3.5555	A		
<i>L. rotundiflorus</i>	2.3688		B	
<i>L. elegans</i>	1.3339			C
<i>L. exaltatus</i>	0.9171			C D
<i>L. montanus</i>	0.3357			D

Literales indican estadísticamente diferencia significativa con una $P < 0.05$.

Cuadro 11

PRUEBA DE TOXICIDAD SUB CRÓNICA CON SEMILLAS DE <i>LUPINUS</i>
COMPARACIÓN DE MEDIAS NO SE HACE COMPARACIÓN DE MEDIAS PORQUE NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE LOS TRATAMIENTOS.

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

8.1 OBSERVACIONES EN LA PRUEBA TOXICOLOGICA

A través del registro diario de los animales, se pudo constatar las reacciones que presentaron los de los ratones sometidos a la alimentación con diferentes niveles de lupinos, las manifestaciones más notorias fueron:

Excitación: a partir del día 4.

Acicalamiento: a partir del día 5.

Aletargamiento: a partir del día 5.

Piloerección: a partir del día 5.

Agresividad: a partir del día 10.

Hipotermia y lordosis, no en todos los animales se llegó a presentar, pero los que lo presentaron fue a partir de el día 14.

Una de las manifestaciones más notorias fue la autofagia en los animales que recibieron el tratamiento de *Lupinus montanus* (2 ratones) de la concentración de 10 % y (3 ratones) de la concentración de 15 %.

Cuadro 12. Comportamiento en la prueba de toxicidad subcrónica. Todos los niveles de inclusión de harina de semilla cruda de *Lupinus* resultaron ser tóxicas, en especial *Lupinus montanus*.

ESPECIE	NIVEL	MORTALIDAD (%)
<i>L. rotundiflorus</i>	5	16
<i>L. rotundiflorus</i>	10	16
<i>L. rotundiflorus</i>	15	16
<i>L. exaltatus</i>	5	16
<i>L. exaltatus</i>	10	16
<i>L. exaltatus</i>	15	16
<i>L. elegans</i>	5	16
<i>L. elegans</i>	10	16
<i>L. elegans</i>	15	16
<i>L. montanus</i>	5	16
<i>L. montanus</i>	10	32
<i>L. montanus</i>	15	50
Testigo	0	0

8.2 ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD SUBCRONICA

La descripción histopatológica de las lesiones se realizó en los cadáveres de ratones que previamente fueron sometidos a diferentes dietas con harina de semillas crudas de *Lupinus montanus*; *rotundiflorus*; *exaltatus* y *elegans* a niveles de inclusión de 5 %; 10 % y 15 % y un grupo control, al cual se les proporcionó una dieta de alimento balanceado comercial y agua *ad libitum*. Cada uno de los grupos experimentales contó con una n = 6, la observación de los animales se realizó dos veces al día y se registraron los cambios que presentaron.

Conforme cada deceso se presentaba, a cada cadáver se le sometió a una examinación haciendo las anotaciones correspondientes, así se obtuvieron fragmentos de tejido de hígado, riñón, cerebro y testículo, para hacer cortes histológicos para su posterior análisis microscópico.

***Lupinus elegans* 5 %.**

En éste grupo solamente falleció uno de los ratones, y las lesiones observadas en los cortes histopatológicos fueron:

HIGADO: Este órgano se presentó un patrón de lesión que afectó a la totalidad de la muestra presentando una degeneración turbia y zonas de necrosis coagulativa, destacándose la coagulación de las proteínas citoplasmáticas formando grumos eosinofílicos. Los núcleos de los hepatocitos se encontraron dañados en su cromatina, la cual se observó formando grumos. Los capilares sinusoides manifiestan presencia de proteínas globulares libres en una forma moderada, las células de Kupffer no muestran alteraciones en cuanto a la proporción morfológica y número.

Todas las muestras revisadas, presentaron el mismo patrón, solo en una de

ellas las lesiones son más moderadas, encontrándose respetadas las membranas nucleares de los hepatocitos.

CEREBRO: En las neuronas del sistema nervioso central destacó la coagulación de la cromatina nuclear que formó grumos abundantes acidófilos, especialmente en la capa molecular y granulosa del cerebelo. Las neuronas de Purkinje se encontraron igualmente afectadas, aunque en menor grado. Los gránulos acidófilos en algunas zonas de la capa granulosa se encuentran intercelulares en una forma abundante, lo que sugiere la posibilidad de la necrosis neuronal.

La Pía Madre está respetada, con la técnica de Violeta de Cresilo no se aprecian los espacios de Robin Virchow ni la posibilidad de identificación de proteínas extra celulares que nos permitan identificar algún tipo de inflamación o edema. Así mismo los vasos sanguíneos, no son apreciables con este colorante.

Lupinus elegans 10 %.

En éste grupo solamente falleció uno de los ratones, y las lesiones observadas en los cortes histopatológicos fueron:

HIGADO: Las lesiones observadas en las preparaciones histopatológicas obtenidas de los ratones sometidos a la prueba de toxicidad, son las mismas que se describen en la concentración de 5 %.

CEREBRO: La toxicidad de esta semilla es tal que en una concentración de 10 % continúa siendo igual de severa que en el nivel de 5 %.

Lupinus elegans 15 %

En éste grupo solamente falleció uno de los ratones, y las lesiones observadas en los cortes histopatológicos fueron:

HIGADO: Las lesiones observadas en los cortes preparados a partir de los tejidos obtenidos de los ratones sometidos a la prueba de toxicidad, son las mismas que se describen en las concentraciones de 5 y 10 %.

CEREBRO: La toxicidad de ésta semilla en una concentración de 15 % continúa siendo igual de severas que en los niveles de 5 y 10 %.

***Lupinus rotundiflorus* 5%**

En éste grupo solamente falleció uno de los ratones, y las lesiones observadas en los cortes histopatológicos fueron:

HIGADO: conserva su patrón arquitectónico, sin embargo, se observa claramente una degeneración turbia y la misma lesión a nivel nuclear donde la cromatina ha formado grumos sumamente notorios, tanto en los hepatocitos como en las células de Kupffer. Algunos hepatocitos tienen un núcleo notoriamente aumentado de tamaño los espacios porta se encuentran respetados. Algunas áreas, de algunas regiones del hígado, tienen una marcada necrosis coagulativa, pero no es un patrón generalizado, es solamente regiones focales, el núcleo puede estar aumentado en dos o tres veces su tamaño normal, mismo que presentan un patrón similar de cromatina glomerular y el nucleolo extendido.

CEREBRO: A este nivel, el cerebelo muestra que las neuronas de la capa molecular y la capa granulosa, tienen igualmente los núcleos afectados con el mismo patrón antes descrito, donde la cromatina ha formado una intensa cantidad de grumos hematoxilínicos a nivel de núcleo, es notorio como la capa células de Purkinje no se nota alterada, sin embargo, la corteza cerebral muestra en forma incipiente las mismas lesiones nucleares ya referidas, se observa edema y la sustancia gris especialmente afectada, no así la sustancia blanca sin embargo la lesión es notoriamente mas evidente en la capa granulosa de la corteza cerebelosa.

RIÑONES: En ellos se encuentra notoriamente afectado el núcleo de todas las células del nefrón, básicamente con granulación de la cromatina existen algunos tubos contorneados especialmente los proximales con necrosis coagulativa, los glomérulos presentan una gran cantidad de material proteico eosinofílico a nivel de espacio de filtración glomerular de tal forma que algunos están totalmente inundados.

TESTICULO: Muestra el mismo patrón de afectación de los núcleos especialmente en las primera etapas de la espermatogénesis. Destaca la lesión sobre todo en las espermatogonias, los espermatozitos de primer orden y las células y las células de sertoli; Sin embargo, se alcanzan apreciar espermatozoides maduros hacia la luz, misma luz que se encuentra totalmente inundada de un edema que evita ver algún claro, toda la luz está inundada de un material proteico edematoso eosinofílico en todas las muestras observadas y en todos los tubos seminíferos.

***Lupinus rotundiflorus* 10%**

En éste grupo solamente falleció uno de los ratones, y las lesiones observadas en los cortes histopatológicos fueron:

HIGADO: Las mismas lesiones anteriormente descritas de los anteriores grupos, pero más acentuadas y agregándosele focos microabscesos diseminados por todo el parénquima, donde, inclusive, se observa neutrófilos en banda y la descripción de la arquitectura microscópica clásica de una necrosis licuefactiva. Los núcleos están aún más agrandados con la lesión antes descrita, mucho más notoria. La necrosis es muy evidente, se nota con toda claridad una degeneración turbia donde los hepatocitos han perdido su morfología cuboidal, tornándose ovoides con evidente aumento de tamaño perdiéndose el patrón de detalle celular, pero persistiendo el detalle arquitectónico. Es, sin embargo, notoria la deformación de la morfología de las células hepáticas haciéndose completamente ovoides con núcleos de gran

tamaño y completamente granulados. Las células de Kupffer siguen conservando su morfología.

CEREBRO: Las lesiones en el cerebelo se han incrementado notoriamente especialmente en las células de la capa granulosa y en el resto de la corteza cerebral. Las neuronas se encuentran afectadas con los núcleos completamente distendidos algunos grumos eosinofílicos intranucleares, pero también se encuentran afectadas con el mismo patrón de núcleos granulares de todas las células de la glía, se observa edema cerebral y algunas neuronas con necrosis y una insipiente satelitosis.

TESTICULO: En este tejido se alcanza a percibir una pequeña porción de epidídimo en el que se observa que la capa de músculo liso, característica de la pared del mismo, al igual que las células epiteliales de tipo pseudo estratificado cilíndrico o la ciliado también muestran cambios de granulación nuclear. Sin embargo, la luz de dicho corte está repleta de espermatozoides, en cuya morfología no se observan alteraciones evidentes. Sin embargo, los tubos seminíferos muestran las mismas alteraciones descritas en el caso de la concentración del 5%, solamente que más notorias y nuevamente siendo las células espermatogonias, espermatocitos de primer orden y sobre todo las células de Sertoli las que se encuentran sumamente afectadas, notoriamente más graves que en el caso de la concentración anterior. Se sigue observando una actividad reproductiva, debido a que hacia la luz se observan una normal cantidad de espermatozoides maduros y la luz también inundada de un líquido proteico edematoso teñido por la eosina de un color rojo intenso que evidencia un pH alcalino.

RIÑONES: Las mismas lesiones anteriormente descritas, pero más acentuadas.

***Lupinus rotundiflorus* 15%:**

En éste grupo solamente falleció uno de los ratones, y las lesiones observadas en los cortes histopatológicos fueron:

HIGADO: Necrosis coagulativa, las mismas lesiones anteriormente descritas, pero sumamente acentuadas. Los núcleos de las células están dilatados, las células han perdido su morfología y la granulación intranuclear es muy evidente, sin embargo, se alcanzan a ver los nucleolos que aparentemente no han sido dañados. Las células de Kupffer están presentes, pero también presentan granulación intranuclear. Esta respetada la arquitectura microscópica y en este caso no se observan micro abscesos como en el caso anterior. Esto, posiblemente, nos evidenció que estos micro abscesos no son el patrón generalizado y que ese caso pudo haber sido un caso especial, ya que no se han observado más micro abscesos en el resto de las muestras de hígado observadas.

CEREBRO : Se observa que en la sustancia gris de la corteza del cerebro y cerebelo se localizan las mismas lesiones que las anteriormente descritas en la concentración del 10% de *Lupinus rotundiflorus.*, aunque más notorias. Destaca la lesión a nivel de la capa granulosa del cerebelo en una forma mucho más evidente que el resto de las capas, sin embargo, también se encuentra afectadas tanto a nivel neuronal como de las células de la glía. Las células de la capa de Purkinje, que anteriormente se observaron levemente afectadas, ahora se encuentran aumentadas de tamaño con lesiones similares, pero de una manera discreta.

A nivel de la corteza cerebral las lesiones similares a las ya anteriormente descritas, aunque más notorias. Se observó edema cerebral, necrosis de algunas neuronas, satelitosis, neurofagia, y al igual se encuentran afectadas tanto las células de la glía como las células neuronales, especialmente las de las capas granulosas interna y externa. Notoriamente

aumentadas de tamaño y con las mismas lesiones anteriormente descritas.

RIÑÓN: Con las mismas lesiones anteriormente descritas, pero más acentuadas con una gran concentración de proteínas eosinofílicas de los tubos contorneados, hay necrosis coagulativa tubular, los glomerulos también se encuentran afectados, los núcleos de algunas células tanto glomerulares como de los tubos contorneados se han tornado hematoxilínicos en una forma intensa y aleatoria. Pudiera ser que de un tubo una o dos de sus células tuviera este patrón que no se había visto en las concentraciones de 5 y 10 %. Existe hiperemia en la zona de la médula a nivel de las asas de Henle y los tubos colectores se encuentran igualmente afectadas, aunque en menor intensidad que en la región cortical a nivel glomerular y tubos contorneados, tanto proximales como distales.

TESTICULO: Las lesiones anteriormente descritas se han incrementado en una forma muy evidente. Destacan las células basales de la espermatogonia, en donde los núcleos granulados se han vuelto intensamente hematoxilínicos en una forma similar a los núcleos descritos en el tejido renal. Se observa el mismo edema, continúa la presencia de espermatozoides maduros hacia la luz, las células de Sertoli están claramente afectadas, se nota un agrandamiento a nivel de las células de las primeras etapas de la meiosis, aunque las células de las últimas etapas de la espermatogénesis no se encuentran tan afectadas como las de las primeras etapas.

Los núcleos de las cabezas de los espermatozoides, en algunos tubos seminíferos, se encuentran igualmente hematoxilínicos en una forma muy notoria. Sin embargo dicha alteración no afecta en la totalidad de los tubos seminíferos, inclusive puede estar un tubo seminífero notoriamente alterado con las lesiones que anteriormente se señalaron y el tubo seminífero vecino mostrar una pigmentación considerada como normal comparada con el resto de las células de la misma pared. Sin embargo, son las espermatogonias las que se

encuentran notoriamente alteradas con el patrón de lesión descrito anteriormente. Las células de Leydig también se encuentran con pérdida de su arquitectura microscópica normal en donde se ha perdido levemente la eosinofilia citoplasmática, afectando principalmente el núcleo, el cual está aumentado de tamaño, con la cromatina agranulada, y hematoxilínica, aunque notoriamente en menor grado que las células de la espermatogonia.

Lupinus montanus:

Las lesiones que se encontraron en estos cortes, son similares a los hallazgos producidos y ya descritos en las anteriores especies de lupinos. Sin embargo, existen dos diferencias muy notorias, la primera de ellas es que desde la concentración al 5% las lesiones son sumamente evidentes, por lo que se puede presuponer que la acción de los alcaloides es el más agresivo comparado con los contenidos en las otras tres especies, dado que las imágenes observadas en esta concentración (5%) equivale a las de 15 % de las otras especies.

Otra observación importante es que en el riñón es evidente una intensa cantidad de células de tipo retículo endotelial, que fue aumentando en cantidad conforme la concentración de semilla se aumentaba en la dieta, los núcleos están agrandados en los cortes de los animales sometidos a la dieta con ésta semilla.

Las células de la capa de Purkinje están menos afectadas que el resto de las neuronas, no así las neuronas de la capa granulosa.

Lupinus exaltatus: (5, 10 y 15% Hígado, Cerebro y Cerebelo Riñón y Testículo).

Las lesiones encontradas son similares a las ya descritas en las demás especies, pero cabe aclarar que estas placas fueron procesadas por la tinción de violeta de cresilo y también observamos una intensa granulación intranuclear

de la cromatina de las neuronas destacando en una forma muy evidente. Sin embargo, por la técnica de tinción no permite apreciar otros detalles que la técnica de hematoxilina-eosina se observaron con más claridad.

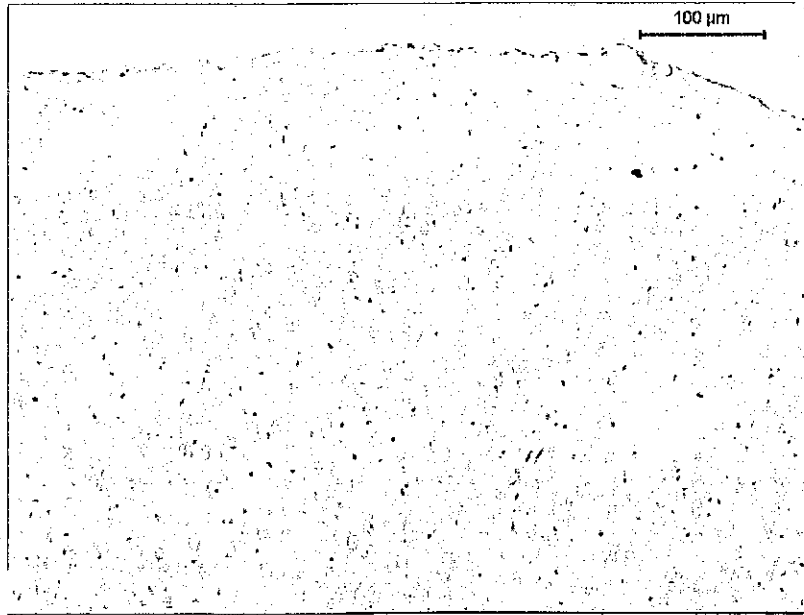


Figura 7. Corte coronal de corteza cerebral de ratón teñido con H-E. Se muestran las capas superficiales donde se aprecia la citoarquitectura neuronal normal de la corteza (10X).

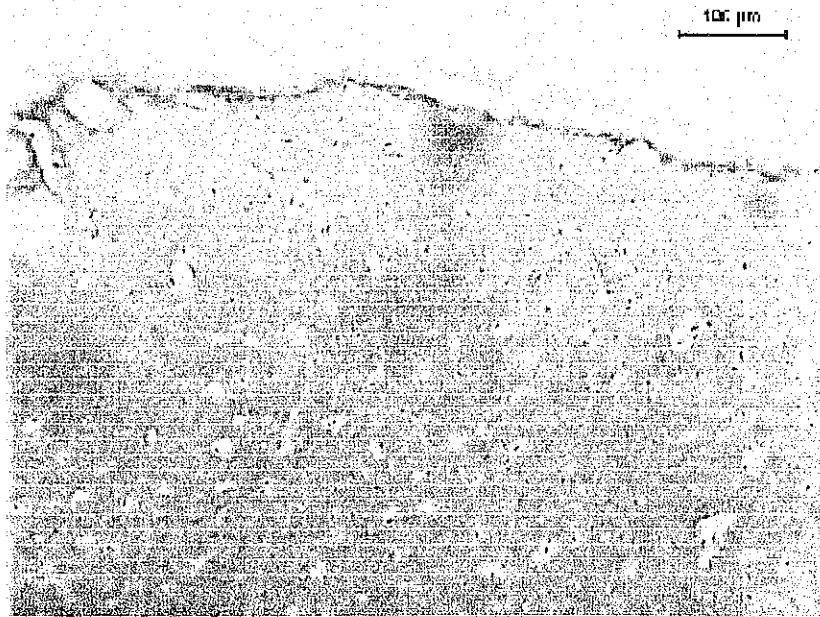


Figura 8 Corte coronal de corteza cerebral de ratón del grupo de *Lupinus rotundiflorus* 10 % teñido con H -E. Se aprecia la citoarquitectura neuronal edematizada, se observa algo de pia madre. Lesión de capa granular externa, núcleos alterados, con vacuolización con necrosis y satellitosis (20X).

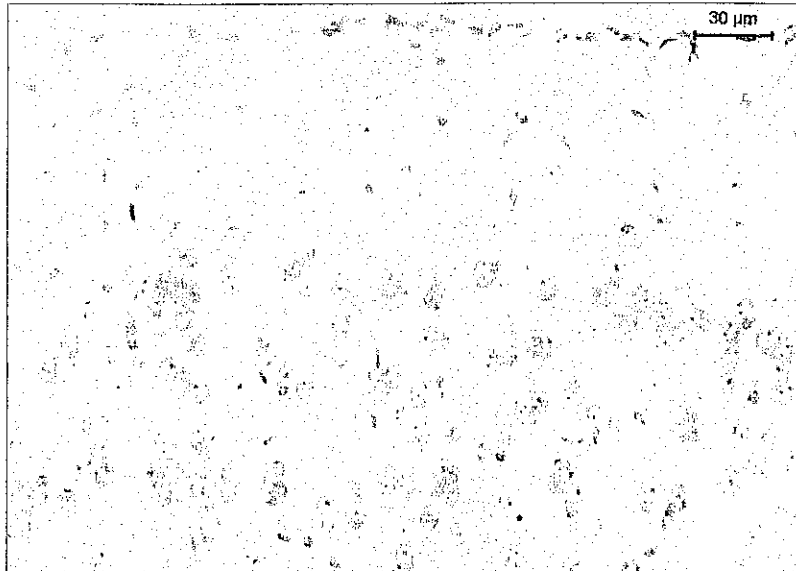


Figura 9. Corte coronal de corteza cerebral de ratón teñido con H-E. Se muestran las capas superficiales donde se aprecia la citoarquitectura neuronal normal de la corteza (20X).

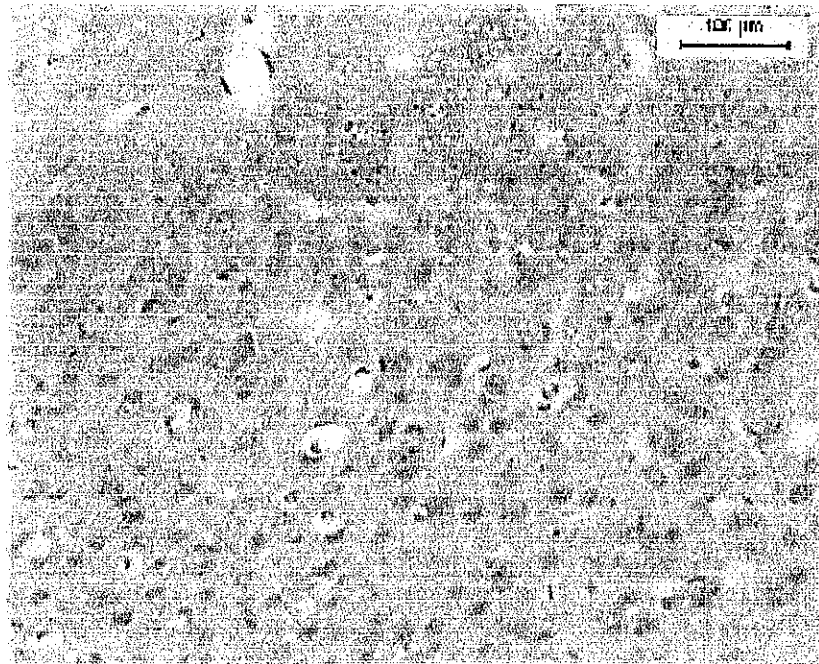


Figura 10 Corte coronal de corteza cerebral de ratón del grupo de *Lupinus rotundiflorus* 10 %, teñido con H-E. Se muestran neuronas con núcleos vesiculados y con cromatina granulosa (20 X)

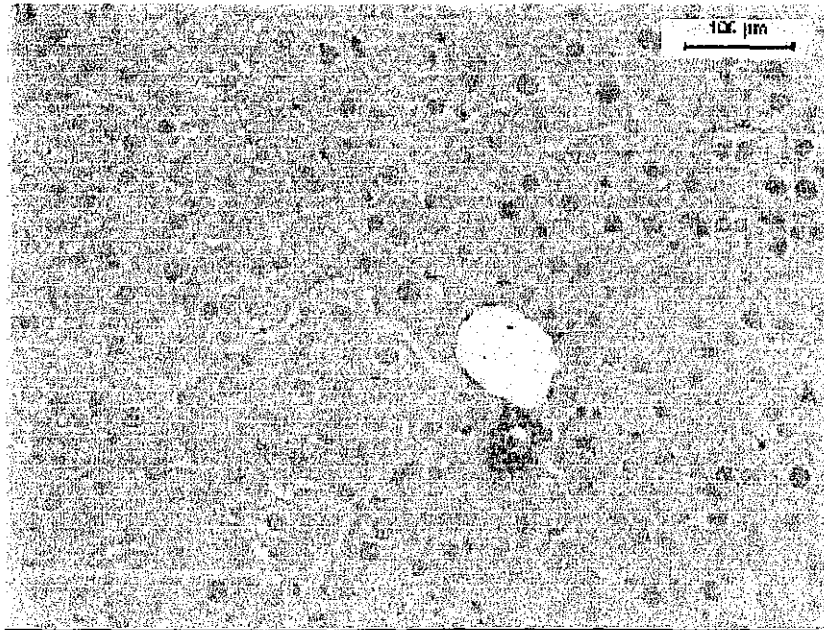


Figura 11. Corte de riñón de ratón del grupo de *Lupinus rotundiflorus* 15 % teñido con H - E. Muestra necrosis cuagulativa en tubos contorneados proximales, edema glomerular y moderada infiltración de grasa. (20X).

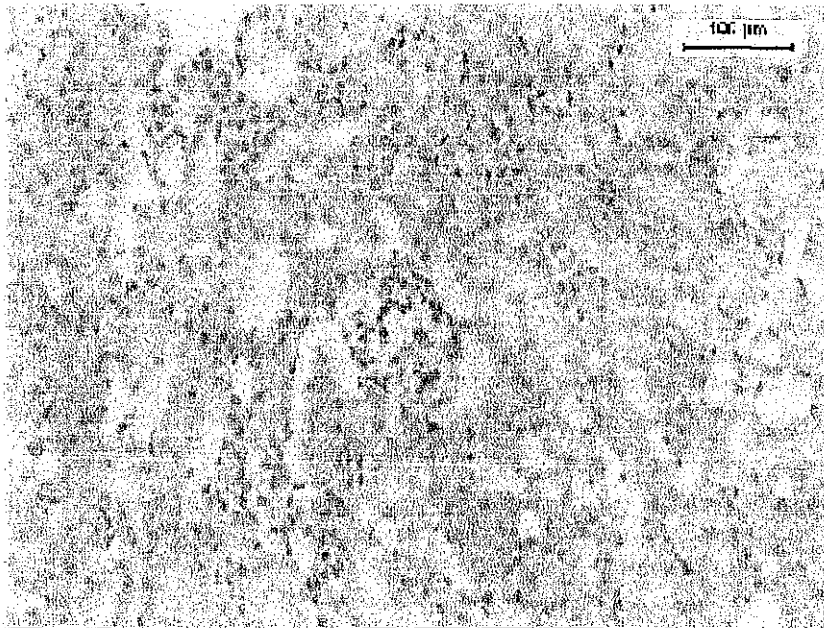


Figura 12. Corte de riñón de ratón del grupo de *Lupinus rotundiflorus* 10 % teñido con H-E. Muestra clara necrosis cuagulativa en tubos contorneados proximales, edema glomerular y moderada infiltración de grasa. (20 X)

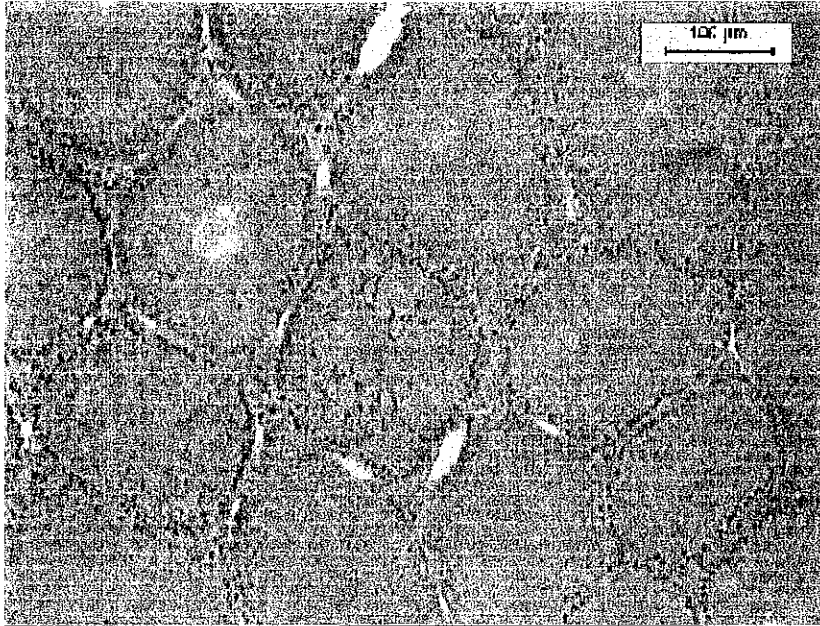


Figura 13. Corte de testículo de ratón del grupo de *Lupinus rotundiflorus* 15 %. Muestra edema tubular, alteración notoria de núcleos de espermatogonias con granulación de la cromatina, disminución de la producción de espermatozoides. Se aprecia alteración nuclear en células de Sertoli. Degeneración turbia en células de Leiding.(10X)

9.0 DISCUSIÓN

A partir de los exámenes proximales de las semillas de *Lupinus* de las diferentes especies analizadas, se observó que poseen un excelente porcentaje de proteína cruda en base seca, siendo *Lupinus rotundiflorus* el más bajo y *Lupinus elegans* el más alto. En contraste, la soya tiene (38-42%) por debajo de los *Lupinus* y muy similar a las especies domesticadas de *Lupinus* (*L. luteus*, *L. angustifolius*, *L. albus* y *L. mutabilis*) cuyo contenidos se ha establecido en 30 – 47 % (Petterson y cols., 1998; Ruiz-López, 2001) y más del doble de las leguminosas comúnmente utilizadas para la alimentación humana; así mismo estos valores son superiores a los encontrados en otras leguminosas silvestres con valores entre 10.6 a 37.8 % como lo son las especies silvestres europeas (Shumilin y cols., 1989; Muzquiz y cols., 1989; Sotelo y cols., 1980; Schoeneberger H. y cols. 1982).

Los contenidos de proteína de las semillas de *Lupinus elegans*, *exaltatus*, *montanus* y *rotundiflorus* son superiores a las reportadas por Petterson, (1998).

Grasa: El contenido de grasa de las cuatro especies de *Lupinus* silvestres del Estado de Jalisco, varían del 6.25 % para *Lupinus rotundiflorus* y 14.91 % para *Lupinus montanus*, lo que indican que están por debajo del promedio para la soya que tiene un 18 % (Aykroyo y Doughy, 1964).

Lupinus montanus presentó el más alto promedio (14.91 %) y *Lupinus rotundiflorus* el más bajo (6.25 %), lo que representa que son más bajos que la soya (18%), pero similar al compararlo con otras leguminosas silvestres, cuyos valores se han reportado entre 0.7 a 6.3 % (Sotelo y cols., 1980) Aunque se tiene información de leguminosas silvestres con concentraciones de 8.5 % hasta 24.4 %, y entran en el intervalo de los valores de los *Lupinus* cultivados de 5.7 a 14 % (Petterson 1998). Pero superior a *L. hispanicus* (3 %) (Muzquiz y cols., 1989). En cuanto a los demás nutrimentos que las especies silvestres del

Estado de Jalisco no difieren mucho de las reportadas internacionalmente para otras especies de *Lupinus*.

En los aminogramas realizados a las muestras de semillas de *Lupinus* silvestres nos revela una fuerte deficiencia de los aminoácidos esenciales comparados con el patrón de referencia de la FAO, a excepción del contenido de Treonina en *Lupinus exaltatus* y *montanus* que son ligeramente superiores.

9.1 RELACION DE EFICIENCIA DE LA PROTEINA: (REP)

Los resultados que obtuvimos en estas pruebas fueron detrimentales, porque cuando proporcionamos las dietas diseñadas con semillas cocidas y lavadas, sin suplementar metionina, en éstas, se obtuvieron resultados muy por debajo del grupo control (caseína).

Las semillas de las especies silvestres del Estado de Jalisco que fueron suplementadas con el 0.2% de metonina los resultados de la Relación de Eficiencia de la Proteína fueron: 0.3357 para *L. montanus*; 0.9171 para *L. exaltatus*; 1.3339 para *L. elegans*; 2.3688 para *L. rotundiflorus* y 3.55 para caseína.

Analizando los datos anteriores, encontramos diferencia en el comportamiento de las distintas especies de semillas. En las dietas que se incluyó la semilla cocida y lavada sin suplementar metionina, los animales no aceptaron satisfactoriamente la comida, tuvieron bajo consumo; por lo tanto se observó una disminución en su peso corporal, pelo hirsuto y excitabilidad, mostrando agresividad desde los cinco días de haber iniciado la prueba. Para los grupos con dieta suplementada con el 0.2 % de metionina se nos presentó el mismo efecto, poco consumo de alimento y por lo consiguiente poca ganancia de peso de los animales, aun cuando aceptaron mejor la comida.

En el alimento rechazado por los animales, se observó que no consumían la

cáscara que cubre a la semilla, quizás sea ésta la parte más amarga de la semilla.

Las medias de la Relación de Eficiencia de la Proteína estadísticamente hablando, en el grupo que consumieron las dietas sin suplementar metionina fueron 1.6 para *L. exaltatus*, 1.4 para *L. rotundiflorus*, 0.9 para *L. montanus* y 0.11 para *L. elegans*. Si comparamos estos resultados con los obtenidos en el grupo que recibieron las dietas suplementadas con el 0.2% metionina fueron 2.36 para *L. rotundiflorus*, 1.3 para *L. elegans*, 0.9 para *L. exaltatus* y 0.3 para *L. montanus*.

En los datos de ambas pruebas de la Relación de Eficiencia de la Proteína encontramos que las medias cambian, por ejemplo *L. exaltatus*, logró en la prueba sin suplementar, un PER de 1.6, aunque es bajo, si fue el mas alto de las cuatro dietas y una vez que se suplemento la metionina, su PER se redujo a 0.9. *L. rotundiflorus* de 1.4 pasa a 2.36; *L. montanus* de 0.9 a 0.3 y *L. elegans*, de 0.11 se incrementa a 1.3.

9.2 DIGESTIBILIDAD *in vivo*

La suplementación de 0.2% de metionina mostró que la digestibilidad de estas dietas es mejorada. Salvo el caso de *Lupinus elegans* que cuando se suplementa caé de 79.60 % a 65.49.

Las especies estudiadas nos revelan una significativa deficiencia de aminoácidos que tienen las semillas de *Lupinus*. Las especies estudiadas son deficientes en su aporte de leucina, lisina, metionina, aminoácidos aromáticos (fenilalanina+ tirosina) valina isoleusina y treonina. (Schoeneberger 1982; Ruiz-López, 2001).

9.3 Calificación química de la proteína:

La metionina es el aminoácido con más baja calificación química (19.60 % *L. montanus*; 24.80 %; *L. exaltatus*; 27.60 % *L. elegans* y 36.80 % *L. rotundiflorus*). El segundo aminoácido que presenta deficiencia en su contenido es Aminoácidos Aromáticos (41.59% *L. elegans*; 48.60 % *L. rotundiflorus*; 49.05 % *L. exaltatus*; con excepción de 92.70% *L. montanus*). La calificación química de la Treonina las especies *L. montanus* y *L. exaltatus* rebasan los patrones de la FAO.

9.4 Evaluación toxicológica:

Se puede decir que a partir de los resultados obtenidos de la prueba de toxicológica los *Lupinus montanus*, *exaltatus*, *rotundiflorus* y *elegans* son muy tóxicos, en particular *L. montanus*. Por los hallazgos obtenidos de los estudios histopatológicos podemos percibir que estas especies tienen marcados efectos neurotóxicos, ya que en este tejido fue en el que mas lesiones se localizaron y se han reportado, así como las manifestaciones nerviosas presentadas desde las etapas iniciales del tratamiento, esos animales desarrollaron automutilación de las extremidades posteriores y cola. Sobre todo en las concentraciones de 10 y 15%. Los daños a nivel hepático, renal y testicular fueron igualmente muy marcados.

Para recomendar el uso de las semillas utilizadas en este trabajo, será necesario realizar más investigaciones para eliminar por medios económicos y eficaces a los agentes antinutricionales que contienen las semillas. Además de que nos garanticen la completa neutralización de alcaloides quinolizidínicos.

Consideramos que el sistema de lavado utilizado en el presente trabajo, no es el más adecuado porque requieren grandes volúmenes de agua, en éste caso se utilizaron 30.24 M³ por cada una de las especies. Una posible solución

podría ser la utilización de un sistema de recirculación de agua haciendo cambios cada 12 horas.

CONCLUSIONES

1. Las características nutricionales de las cuatro especies *Lupinus* silvestres del Estado de Jalisco, poseen valores muy similares a las demás especies cultivadas y estudiadas en otras partes del mundo, en el contenido de proteína es superior a la soya y en grasa si se encuentran ligeramente por debajo de las demás.
2. Las concentraciones de los aminoácidos es más crítica en las especies estudiadas en este trabajo que las reportadas en la literatura internacional.
3. Los bajos valores de las pruebas de eficiencia de la proteína obtenidos pudiera deberse principalmente al contenido de residuos de alcaloides y posiblemente a otras sustancias antinutricionales presentes en los *Lupinus* estudiados. Ya que fue evidente el menor consumo de dietas con harina de *Lupinus*.
4. El proceso de cocción y lavado de las semillas resultó una práctica costosa, y además no obtuvimos el resultado esperado. Se demanda demasiada agua y el proceso de lavado se realiza durante 72 horas continuas.
5. Los animales que consumieron las dietas suplementadas con metionina mejoraron los valores de PER, aunque sólo en los grupos *L. rotundiflorus* y *L. elegans*.
6. La prueba de toxicidad subcrónica nos mostró la letalidad que tiene cada una de las especies estudiada. Las semillas de *Lupinus montanus* fueron las más tóxicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. AGID, Y. PERTUISET Y., B. DUBOIS. 1988 Motoneuron disease as manifestation of lupin seed toxicity. *Lancet*. Vol. 1 p. 1347
2. AGOSIN E., D. DÍAZ, R. ARAVENA and E. YAÑEZ. 1989. Chemical and nutritional characterization of lupine tempeh. *J. Food Sci.* 54: 102-107
3. AGUILERA J:F: and TRIER A. 1978. The revival of the lupin. *Food Technol.* 32: 70-76.
4. AGUILERA J.F.; M. BUSTOS AND E. MOLINA 1992. The degradability of legume seed meals in the rumen: effect of heat treatment. *Anim. Feed Sci. Tech.* 36: 101-112
5. ALLEN J.G. and WOOD P.M. 1979. The prevention of lupinosis by making lupin hay. *Aust. Vet. J.* 55: 38-39
6. ARNOLD G.W., J.L. HILL, R.A. MALLER, S.R. WALLACE, B.A. CARBON, M. NAIRN, P. MCR. WOOD and J. WEELDENBURG. 1976. Comparison of lupin varieties for nutritive value as dry standing feed for weaner sheep and for incidence of lupinosis. *Aust. J. Agric. Res.* 27: 423-35.
7. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS 1990. *Official Methods of Analysis*, 15th. Edition 1990. U.S.A. pp 1095-1098.
8. AYKROYO, W.R. AND DOUGTHY, J. 1964 *Las Leguminosas en la nutrición humana*. Ed. Organización de las Naciones Unidas, Organización de del Alimentación y la Agricultura. Roma Italia.
9. BEDNARCZYK, M., KARASINKI,D., MAZANOWSKI, A., GULEWICZ. K. 1987 Preliminary observations on the influence of alkaloids present in the seed extract of lupine (*L. angustifolius*) on the embryo-genesis and selected physiological indicators of duck embryonic Vol. *Blood. Arch. Geflügelk.* Vol. 51 pp. 185 – 189.
10. BLAGROVE, R.J., GILLESPIE, F.M. 1975 Isolation, purification and

- characterisation of the seed globulins of *Lupinus angustifolius*, Australian J. of Plant Physiology. Vol. 2 pp. 13-27.
11. BATTERMAN E.S., ANDERSEN L.M., B.V. BURNHAM and TAYLOR G.A. 1986_a. Effect of heat on the nutritional value of lupin (*Lupinus angustifolius*) seed meal for growing pigs. Br. J. Nutr. 55: 169-177
 12. BATTERMAN E.S., ANDERSEN L.M., LOWE R.F. and DARNELL R.E. 1986_b. Nutritional value of lupin (*Lupinus albus*) seed meal for growing pigs: availability of lysine, effect of autoclaving and net energy contents Br. J. Nutr. 56: 645-659.
 13. BRUNETON, J. 1993 Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Medicinales. Ed. Lavoisier-Tec et Doc. Paris. Francia. pp. 688-689.
 14. CAMACHO L., SIERRA C., MARCUS D., GUZMAN D., CAMPOS R., VON BAER D. and TRUGO L. 1991. Nutritional quality of lupine (*Lupinus albus* cv. Multolupa) as affected by lactic acid fermentation. Int. J. Food Microbiol. 14: 277-286
 15. CASTANON J.I.R. and J. PEREZ-LANZAC. 1990 Substitution of fixed amount of soybean meal for field bean (*Vicia faba*), Sweet lupins (*Lupinus albus*), chick pea (*Pisum sativum*) and vetch (*Vicia sativa*) in diets for high performance laying leghorn hens. Br. Poult Sci. 31: 173-180.
 16. COHEN, Y. 1981 Abrégé de pharmacologie. Ed. Masson. Paris. Francia. pp. 217-218.
 17. CHURCH D.C. y POND W.G. 1987. Fundamentos de nutrición y alimentación de animales. Ed. LIMUSA. Primera edición. México.
 18. COWLING, W.A. 1984 Report of a Mission to Collect Wild *Lupin* in Greece. Department of Agriculture, Western Australia. Perth. Vol. 3 p. 14.
 19. DÁVILA-ORTIZ, C. JIMÉNEZ, H. HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ. 1998 Production of a yogurt-like product from *Lupinus campestris*: substrate preparation and fermentation. Centro de Desarrollo de Productos

Bióticos, IPN, Apdo. Postal 24, Yautepec, Morelos, México. Memorias del IFT'S 1998 Annual Meeting. June 20-24, 1998 Georgia World Congress Center, Atlanta Georgia U.S.A.

20. DOMINGUEZ X.A. 1973 Métodos de investigación fitoquímica. Cap. 15 Alcaloides. Ed. por: Centro Regional De Ayuda Técnica. Buenos Aires, Argentina. pp. 211-218
21. DUKE, J.A. 1987 Handbook of medical herbs. Ed. CRC Press. Boca Raton. Florida. Estados Unidos de América. p. 155.
22. DUNN, D.B. 1984 Genetic resources, cytotaxonomy and distribution of New World Lupin species. Proceedings of the Third International Lupin Conference, International Lupin Association. La Rochelle. Francia. pp. 97-100.
23. . GLADSTONE S.J. 1974. The Mediterranean white lupin, Department of Agriculture, Western Australia. Tech. Bull. Vol. 26 pp 70-74.
24. GROSS, R. Y BAER, E. 1977 Posibilidades del *Lupinus mutabilis* y *Lupinus albus* en los países andinos. Arch. Latinoam. Nutr. Vol. 2. pp. 451-467.
25. GROSS, R. 1990. Nutriments and Anti-nutriments substances in lupin for human consumption Ed. Birk, Y., Doort. A., Waldman, M. And Uzureau C. Proceedings of the Joint CEC-NCRD Workshop, Israel pp. 164-176.
26. GUILLAME J., J.C. CHENIEUX and M. RIDEAU. 1979 Feeding value of *Lupinus albus* L. in chickens dieta (With emphasis on the role of alkaloids). Nutr. Rep. Inter. 1: 57-65
27. GUILLAME B., D.E. OTTERBY, J.G. LINN, M.D. STERN and D.G. JOHNSON. 1987 Comparision of sweet white lupin seeds with soybean meal as a protein supplement for lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 11: 2339-2348.
28. HALE O.M. and MILLER J.D. 1985. Effects of either sweet or semi-sweet blue lupine on performance of swine. J. Anim. Sci. 4:989-997.

29. HALVORSON J.C., M.A. SHEHATA and P.E. WAIBEL. 1983 White lupine and triticale as feedstuffs in diets for turkeys. *Poult. Sci.* 62: 1038-1044
30. HILL G.D. 1977. The composition and nutritive value of lupine seed. *Nutr. Abstr. Rev., B.* 47: 511-529.
31. HONDELMANN, W. 1996 Die Lupine: Geschichte and Evolution einer Kulturpflanze. Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL). Lanbauforschung Völkenrode, Sonderheft. Vol. 1. pp 162-247.
32. <http://www.bancomext.com.mx/Bancomex/Template/Nacional/default.jhtml?seccion=3512#8>
33. IÑIGUEZ D. J.L. 2000. Cultivo y producción de *Lupinus* (*Lupinus spp.*) Tesis Profesional. Universidad de Guadalajara.
34. JAMBRINA A.J. 1980. Introducción al cultivo del *Lupinus* (Altramuz). Editado por: Comunicaciones I.N.I.A. Serie producción vegetal. Madrid, España. No. 26. 18 pp.
35. JAMBRINA A.J. 1983. La genética de los alcaloides en el género *Lupinus*. Editado por: Comunicaciones I.N.I.A. Serie producción vegetal. Madrid, España. No. 51. 12 pp.
36. JANSEN D.H. 1981. The defence of legumes against herbivores. In *Advances in legumes systematics*. Edited by: Polrral and Raven. U.S.A. 340 p.
37. JOHNSON J.C. Jr., J.D. MILLER and D.M. BEDELL. 1986. Tifwithw-78 lupine seed as a feedstuff for cattle. *J. Dairy Sci.* 69: 142-147.
38. KELLER, R.F. 1973_a I Lupin alkaloids from teratogenic and nonteratogenic lupines. I - Correlation of the major alkaloids by tandem gas chromatography-mass spectrometry in plants producing crooked calf disease. *Teratology*. Vol. 7 pp. 23-30.
39. KEELER, R.F. 1973_b Lupin alkaloids from teratogenics and nonteratogenic lupines. II – Identification of the major alkaloids by

- tandem gas chromatography-mass spectrometry in plants producing crooked calf disease. *Teratology*. Vol. 7 pp. 31-36.
40. KEELER, R.F. Cronin, H. 1975 Lupin alkaloids from teratogenics and nonteratogenic lupines. IV – Concentration of the total alkaloids individual major alkaloids, and the teratogen anagryne as a function of plant part and stage of growth and their relationship to crooked calf disease. *J. Toxicol. Environ. Health*. Vol. 1 pp. 899-908.
 41. KINGHORN, A.D., BALANDRIN, M.F. 1984 Quinilizidine alkaloids of the Leguminosae: Structural types, analysis, chemotaxonomy, and biological activities, in: *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*. Ed. S.W. Pelletier. Wiley, New York. U.S.A. Vol. 2. pp 105-148.
 42. KÖRPER, S., WINK, M., FINK, H.A. 1998 Differential effects of alkaloids on sodium currents of isolated single skeletal muscle fibers. *FEBS Letters* Vol. 436 pp. 251-255.
 43. KUNG, L., K. MACIOROWSKI, S. WEIDNER, K. MURRAY, C. TIPPING and K. BUFFUM. 1990. Effect of roasting on the nutritive value of lupines for ruminants. *J. Anim. Sci.* 68 (suppl. 1): 513-514.
 44. LARBIER M. 1980. Feeding value of sweet lupins (*Lupinus albus*) for laying hens. *Arch. Geflügelk.* 44: 224-228.
 45. LEIBHOLZ J. 1984. Methionine supplementation of diets for pigs between 7 and 56 days of age. *Anim. Prod.* 39: 125-130.
 46. LEIBHOLZ J. 1986. The utilization of lysine by young pigs from nine protein concentrates compared with free lysine in young pigs ad lib. *Br. J. Nutr.* 55: 179-186.
 47. LÓPEZ-BELLIDO, L. Y FUENTES, M. 1986 Lupin crop as an alternative source of protein. *Advances in agronomy*. Vol. 40 pp. 239-295.
 48. LUCAS, B. and SOTELO, A. 1982. Aminoacid determination in pure protein, foods and feeds using two different acid hidrolisis methods. *Anal Biochem.* 123: 349-356
 49. MAHMOUND M. H., S. KASUKI, K. HANSEM A. TAHA K.I., A.

- HASSAM A. and I. SAMU M. 1991. Lupine alkaloids from the seeds of *Lupinus termis*. *Phytochem.* 30: 3111-3115.
50. MAY, M. G., OTTERBY D. E., LINN J. G., HANSEN W. P., JOHNSON D. G. and PUTMAN D. H. 1993. Lupins (*Lupinus albus*) as a protein supplement for lactating Holstein dairy cows *J. Dairy Sci.* 76: 2682-2691.
51. McVAUGH, R. 1987 *Flora novogaliciana. Leguminosae. A Descriptive account of the vascular plants of the western Mexico.* Ed. Ann Arbor The University of Michigan Press. Estados Unidos de América. Vol. 5. pp. 567-569.
52. MEIXNER B., HENNING vnd MERBACH W. 1983. Untersuchungen zum einatz der weben sÛbLupinensorte Kiewskij mutant (*Lupinus albus*) in der broilermast. *Tierernahrung und futterung.* 13: 197-203.
53. MENDEL FRIEDMAN 1996. Nutritional Value of Proteins from Different Food Sources. A Review. *J. Agric. food Chem.,* Vol. 44 N° 1, 1996.
54. MLODKOWSKI M. , CELEJEWSKA-GEBSKA T. and MLODKOWSKA I. 1978. Nutritive value for broiler chickens of two new varieties of yellow lupin. *Roczniki Nauk Rolniczych.* 99: 19-27.
55. MORENO M.E. 1984. Los problemas de la conservación de granos y semillas en México. *Ciencia y desarrollo (CONACYT).* 50 (8): 9-17.
56. MUKISIRAT, A.E., PHILLIP, E.L. MITARU, N.B. 1995 The effect of feeding diets containing intact or parialy detoxified lupin on voluntary intake and milk production by Fresian dairy cows. *J. Animal Science* Vol. 60 pp. 169-175.
57. MUZQUIZ, M., RÓDENAS, I., VILLAVERDE, J., CASINELLO M. 1982 Valoración cuantitativa de los alcaloides en semillas del género *Lupinus* (l.) En: L. López – Bellido, M. Fuentes and D.A. Milne, *Actas II Conf. Int. Lupino May 1982, Torremolinos. España.* pp. 196-206.
58. MUZQUIZ M., BURBANO C., REY C. AND CASSINELLO M.A. 1989. Chemical study of *Lupinus hispanicus* seed-nutritional components. *J. Sci. Food Agric.* 47:197-204.

59. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. 1979. Tropical legumes: resource for the future. Report of an hoc panel of the Advisory Committee on Technology Innovation. Washington, U.S.A. 318 p.
60. NELSON, D.A.; S.G. CORNELIUS; L.J. JOHNSTON and J.D. HAWTON. 1968. Dehulled, defatted lupine (*Lupinus albus*, CV. Kiev) seed meal in growing-fishing swine diets. *J. Anim. Sci.* 68 (Suppl.1): 103-104 (abstr.).
61. PANTER, E., KEELER, R.F. 1993 Quinolizidine and piperidina alkaloid teratogens from poisonous plants and their mechanism of the action in animals. *J. Congenital Abnormal.* Vol. 9 pp. 33-40.
62. PASTUSZEWSKA, B., JACH, K., PERKOWSKI, W. 1988 The effect of lupin alkaloids on growth performance of rats and chicken. First International Workshop in legume seeds. Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds. 23-25 Nov, 1988. pp. 9-60.
63. PEARSON, B.H.; MC MEIMAN, N.P. and DOWSETT, K.F. 1991. Effect of lupin (*Lupinus angustifolius*) supplementation on ovarian and pituitary activity in ewes. *Reprod. Fertil Dev.* 30: 109-112.
64. PETERSON, D.S.; ELLIS, Z.L.; HARRIS, D.J. and SPADEK, Z.E. 1987. Acute toxicity of the major alkaloids of cultivated *Lupinus angustifolius* seed to rats. *J. Appl. Toxicol.*, 7: 51-53
65. PETERSON, D.S. 1998 Competition and food uses of *Lupinus*. Chap. 12 In: *Lupin as crop plants. Biology, production and utilization*. Edited by Gladstones J.S., C. Atkins and J. Hamblin. CAB International. UK.
66. PIECH-SCHLEICHER A. and JAMROZ D. 1980. Zastosowanie nasion Lubinu żółtego pastewnego w mieszankach treściwych dla kurcząt brojlerów. Cz.II. Nasiona lubinu żółtego i drożdże pastewne jako substytuty poekstrakcyjnej sruoty sojowej. *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej W. Wrocławin.* 125:165-172.
67. POTHIER, S.L.; CHEAV, L.; GALAND, C.; DORMEAU, C. and VIEL, C. 1998. A comparative Study of the Effects of Sparteine, Lupanine Extract

- on the Central Nervous System of the Mouse. J. Pharm. Pharmacol. 1998. 50: 949-954.
68. PUTMAN, D.H 1991 An interdisciplinary approach to the development of lupin as an alternative crop. Proceeding of the Second National Symposium of New Crops, exploration research and comercialitation. Ed. Janick J. and Simon J.e. Purdue University. Indiana. Estados Unidos de Norteamérica. pp. 117 – 120.
 69. PRIDDIS C.R. 1983. Capillary gas chromatography of lupin alkaloids. J. Chromatography. 261: 95-101.
 70. ROBERTS F. Y WINK K. 1998 Alkaloids; biochemistry, ecology and medical applications. Ed. Plenum Press, New York, U.S.A pp 117-120.
 71. RODRIGUEZ R. y ORTEGA U. 1981. El Chocho, *Lupinus mutabilis* sweet, en el Ecuador. Ciencia y Naturaleza. 22: 82-92
 72. RUIZ LOPEZ, M.A. 2001 Caracterización bromatológica y toxicológica de 7 especies de *Lupinus* del occidente de México. Tesis de Doctorado UNAM.
 73. RUIZ, L.P. 1997 A rapid screening test for lupine alkaloid. N.Z. Agric. Res. Vol. 20 pp. 51-52.
 74. SCHMELLER, T., WINK, M., 1988 The alkaloids. Ed. Plenum Press. New York. Estados Unidos de América. Pp. 305-319.
 75. SCHMELLER, T., SAUERWEIN M., SPORER F., WINK M. 1994 Binding of quinolizidine alkaloids to nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors. Journals of Natural Products Vol 9 pp. 1316 – 1319.
 76. SCHMITT. H. 1980 Elements du pharmacology. Flammarion. Paris. Francia. p. 356.
 77. SCHOENEBERGER, R.; GROSS. R.; CREMER. H.D. and ELMADFA. I. J. 1982. composition and Protein Quality of *Lupinus Mutabilis* Nutr. 112: 70-76, 1982.
 78. SHUMILIN, P.I., CHERMEN'KAYA R.F. AND SHUMILINA, L.F. (1989) Evaluation of some Lupin species and varieties for protein content and

- amino acid composition. Seleksiya-I-Semenovodstvo-Moskva. N° 3, 17-20.
79. SOTELO L.A., B. LUCAS, A. UVALLE AND F, GIRAL. 1980 Chemical composition and toxic factors contained of sixteen leguminous seeds (II) Quat. J. Crude Drug Res. 18:9-16
 80. SOTELO A. 1981. Leguminosas silvestres, reserva de proteínas para la alimentación del futuro. Información Científica y Tecnológica (CONACYT) 3 (54): 28-32.
 81. SOURDSHISKA, S. vnd HARNISCH S. 1977. Süblipinen im futter von masthähnchen. Archiv. Für Geflügelkunde. 41: 56-61.
 82. TELANI E., W.R. KING, J.B. ROWE and G.H. MC DOWELL. 1989. Lupinus and energy-yielding nutrients in ewe. I. Glucose and acetate biokinetics and metabolic hormones in sheep fed a supplement of lupin grain. Aust. J. Agric. Res. 40: 913-24.
 83. TROLL, H.J. 1964 Cultivation, breeding and seed problem in large seeded legumes as contribution to the remedy of protein fodder-deficiency in particular in reference to cultivation –competition between Lupinus and field peas. Wissenschaftliche Zeitschrift der Karl-Max-Universität. Vol. 13 pp 651-663.
 84. UAUY, R., GATTAS, V., YÁNEZ, E. 1995 Sweet lupin in human nutrition. Simopoulos, A.M. Ed. World Review of nutrition and Dietetics Vol. 77 pp. 75-88.
 85. VOGT H., HARNISCH S., KRIEG R., RAUCH H.W. vnd KARARA, A. 1983_a. Einsatz eines teilentbitterten lupinen extraktions schrotes im legehennen futter. Landbau Forschung Volkenrode. 33: 27-30.
 86. VOGT H., HARNISCH S., KRIEG R. and RAUCH H.W. 1983_b. Use of lupin meal in laying hen feed after partial extraction of alkaloids. Ani. Res. Dev. 18: 47-54.
 87. WARREN, J., ALLEN, J.G., COWLING, W.A. 1989 Economic impact of growing Phomopsis-resistant lupins. J. Agriculture Western Australia. (4th Series) Vol. 30. pp. 8-10.

88. WOOD, P.M.; BROWN, A.G.; Meyer, A.P. and D.S. PETERSON. 1975. Control of ovine lupinosis: experiments on the use of fungicides. *Aust. Vet. J.* 51: 381-384.
89. ZAVIEZO D. and J. MC GINNIS. 1980. Nutritional value of lupin seeds for chicks. *Poul. Sci.* 59: 1679.
90. YOVO, K.S. (1982) Thèse Doct. 3ème cycle. Ed. Pharmacochimie pp. 47-58
91. YOVO. K.S., Huguet, F., Pothier, J., Durand, M., Breteu, M., Narcisse, G. 1984 Comparative pharmacological study of spartein and its ketonic derivate lupanina from seeds of *Lupinus albus*. *Planta Medica*. Vol. 50 pp. 420-424.