

# EFFECTO DE LA SUPLEMENTACION DE DIETAS A BASE DE SEMILLA DE CLITORIA TERNATA L. CRUDA O COCIDA CON METIONINA Y FENILALANINA PARA LA RATA EN CRECIMIENTO

M.V.Z., M.S., FRANCISCO O. BRAVO<sup>1</sup>

## Resumen:

Se condujeron tres experimentos con una duración de 28 días cada uno, para determinar si al adicionar 0.3% de metionina y 0.3% de fenilalanina a dietas de *Clitoria ternata* (CT) cruda o cocida (1.05 kg/cm<sup>2</sup>, 50 min) se mejoraban las ganancias de peso, de ratas en crecimiento. Las ratas de la dieta testigo ganaron 11.1 g durante el experimento, en tanto que, las ratas que consumieron CT cruda sólo ganaron 6.1 g. La cocción de CT permitió un mayor aumento en peso corporal, que fue de 13.6 g. La suplementación con metionina produjo los siguientes aumentos de peso: 11.9 g con CT cruda y 18.9 g con CT cocida durante el período experimental. La adición de metionina y fenilalanina mejoró notablemente las ganancias de peso: 19.6 g CT cruda y 29.5 g CT cocida. Sin embargo, la suplementación de fenilalanina sin metionina causó una notable depresión en las ganancias de peso las que fueron 4.5 g en CT cruda y 10.1 g para CT cocida. Se discute que derivados del ácido tánico, sean los posibles responsables de las bajas ganancias de peso obtenidas.

*Clitoria ternata* (CT) es una leguminosa que se localiza en las regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios (Sánchez, 1969). Su semilla tiene aproximadamente 10% de proteína cruda. Su composición de aminoácidos es característica de las semillas de leguminosas, ya que su contenido en lisina es elevado (Bravo, 1971) y es francamente limitante en los aminoácidos azufrados metionina y cistina. El valor nutritivo de la semilla de (CT) ha sido poco estudiado; Sánchez 1969) notificó que el conocimiento de esta leguminosa mejora las ganancias de peso de pollitos en crecimiento, indicando que la semilla cruda causaba la muerte de la totalidad de los pollitos recién nacidos alimentados con ella. Cuando CT cruda fue proporcionada a pollitos de cuatro semanas de edad, la mortalidad decreció notablemente, aunque las ganancias de peso obtenidas fueron muy bajas. El presente trabajo fue planeado con objeto de obtener información sobre el valor nutritivo de la semilla de CT para la rata.

## Material y métodos

Se condujeron 3 experimentos con ratas machos destetados, de la variedad Holtzman, con un peso promedio inicial de 50 gramos. Los

Recibido para su publicación el 14 de enero de 1971.

Departamento de Bioquímica y Nutrición Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, S.A.G., Km. 15<sup>1/2</sup> de la carretera México-Toluca, México, D. F.

animales fueron alojados en jaulas metálicas individuales en batería, en un cuarto con regulación termostática de temperatura que se mantuvo a 20°C, con una humedad relativa constante de 50%. Agua y alimento se proporcionaron a libertad. Cada experimento tuvo una duración de 28 días. La composición de las dietas experimentales se detalla en el Cuadro 1. El contenido de proteína cruda de las dietas fue de 10%. A excepción de la dieta testigo, toda la proteína fue aportada por la semilla de CT. Esta semilla fue sometida a la acción del autoclave a 1.05 kg/cm<sup>2</sup> (15 lbs/pulg<sup>2</sup>) durante treinta minutos. Posteriormente, se secó a 60°C en un horno de aire forzado durante 24 horas y fue triturada en un molino de martillos con perforaciones circulares de 0.75 mm. En todos los casos cada tratamiento contó con 8 ratas distribuidas al azar. Se llevó registro semanal de pesos y consumo de alimento.

*Experimento 1.* Este experimento tuvo como objetivo determinar la aceptación y aprovechamiento de la CT cruda o cocida por la rata recién destetada. Los tratamientos experimentales variaron en la fuente de proteína, que fue pasta de soya para el testigo y CT para los otros dos tratamientos.

*Experimento 2.* Se utilizó un arreglo factorial 2 X 2 en el que las variables fueron CT cruda o cocida y ausencia o presencia de metionina (0.3%). El objetivo del experimento fue determinar si la adición de metionina a dietas a base de CT mejoraba las ganancias de peso.

CUADRO 1  
Composición de las dietas experimentales (base seca) <sup>a</sup>

Ingrediente	CT cruda %	CT cocida %	Testigo %
Pasta de soya	...	...	19.67
Clitoria cruda	23.83	...	...
Clitoria cocida	...	23.83	...
Almidón	33.17	33.17	37.33
Dextrosa	...	33.00	...
Aceite de maíz	...	4.00	...
Mezcla de minerales Núm. 446 <sup>b</sup>	...	4.00	...
Mezcla de vitaminas <sup>c</sup>	...	2.00	...

a En los experimentos 2 y 3, 0 ó 0.3% de metionina y 0 ó 0.3% de fenilalanina substituyeron cuantitativamente 0, 0.3 ó 0.6% de almidón.

b Nutritional Biochemical Comparison Cleveland Ohio 44128 U.S.A.

Proporcionó por cada 100 g. de dieta: vitamina A, 1000 U.I.; vitamina D, 200 U.I.; d-alfa tocoferol 9 mg; Menadiona, 0.1 mg; riboflavina, 1.5 mg; niacina, 3.0 mg; d-pantotenato de calcio, 3 mg; ácido P-amino benzánico, 7.5 mg; inositol, 20 mg; cloruro de colina, 100 mg; biotina, 20 mcg; ácido fólico 0.3 mg; tiamina, HCl, 1.5 mg; piridoxina, HCl, 0.5 mg.

*Experimento 3.* A fin de observar el efecto que la adición de metionina y/o fenilalanina tiene sobre las ganancias de peso de ratas alimentadas con CT cruda o cocida, se diseñó este experimento en forma factorial 2x2X2 en el que metionina (0 ó 0.3%) fenilalanina (0 ó 0.3%) y tratamiento de la semilla, cocida cruda, fueron variables.

## Resultados

*Experimento 1.* El Cuadro 2 muestra las ganancias de peso obtenidas durante los 28 días del período experimental. El análisis

fue calculada debido a las bajas ganancias de peso obtenidas; asimismo las conversiones alimenticias fueron excesivamente pobres y variables, por lo que no se notifican en este artículo.

*Experimento 2.* En este experimento se confirmaron los resultados obtenidos en el experimento anterior. El cocimiento de la semilla de CT mejora su valor nutritivo. El análisis de varianza mostró diferencias significativas ( $P < 0.01$ ) atribuibles al tratamiento térmico de la clitoria. De igual forma, la adición de 0.3% de metionina, incrementó las ganancias de peso de ratas en relación a ratas consu-

CUADRO 2  
Ganancias de peso y consumo de alimento de ratas mantenida en dietas a base de clitoria ternata cruda o cocida <sup>1</sup>

Tratamiento	Ganancia de peso <sup>2</sup> (g)	Consumo de alimento (g)
Testigo	91.1 <sup>a</sup>	283
CT cruda	6.4 <sup>b</sup>	196
CT cocida (15 lbs/30 min)	12.6 <sup>c</sup>	264

<sup>1</sup> Las cifras notificadas corresponden al promedio de ocho ratas por tratamiento.

<sup>2</sup> Número con distinta letra son estadísticamente diferentes al 1% de probabilidad  $S\bar{x} - \bar{x} = 1.72$  g

de varianza indicó diferencias significativas  $P < 0.01$  entre tratamientos. La cocción de la CT permitió un mayor crecimiento de las ratas, pero en ningún caso comparable con el obtenido por ratas consumiendo la dieta testigo. La relación de eficiencia proteica no

miendo CT cruda o cocida no suplementada. No se observó interacción entre tratamiento térmico (cruda vs cocida) y nivel de suplementación de metionina (0 vs 0.3). Los resultados de este experimento se detallan en el Cuadro 3.

CUADRO 3

Efecto de la suplementación de metionina a dietas para ratas conteniendo clitoria ternata cruda o cocida

Tratamiento	Suplementación con metionina %	Ganancia de peso g
CT cruda	...	5.0
CT cruda	0.3	11.2
CT cocida (15 lbs/30 min)	...	13.5
CT cocida (15 lbs/30 min)	0.3	17.0

$S\bar{x}_i - \bar{x}_j = 1.57$  g; C.M.E. = 9.91

*Experimento 3.* La suplementación con metionina y fenilalanina a dietas a base de CT cruda o cocida resultó en un notable aumento en las ganancias de peso, comparado con el entre las varianzas de los tres experimentos, por lo que parte de los datos fueron combinados con objeto de aumentar la precisión estadística de los resultados.

CUADRO 4

Ganancias de peso y consumo de alimento de ratas en dietas a base de clitoria ternata cruda o cocida, suplementadas o no con aminoácidos

Tratamiento aplicado	Metionina %	Fenilalanina %	Ganancia de peso a (g)	Consumo de alimento. (g)
CT cruda	...	...	6.9	203
CT cocida (15 lbs/30 min)	...	...	14.6	289
CT cruda	0.3	...	11.9	200
CT cocida (15 lbs/30 min)	0.3	...	18.9	293
CT cruda	...	0.3	4.5	129
CT cocida (15 lbs/30 min)	...	0.3	10.1	173
CT cruda	0.3	0.3	19.6	307
CT cocida (15 lbs/30 min)	0.3	0.3	29.5	295

<sup>a</sup> Los resultados son promedios de ocho ratas por tratamiento.

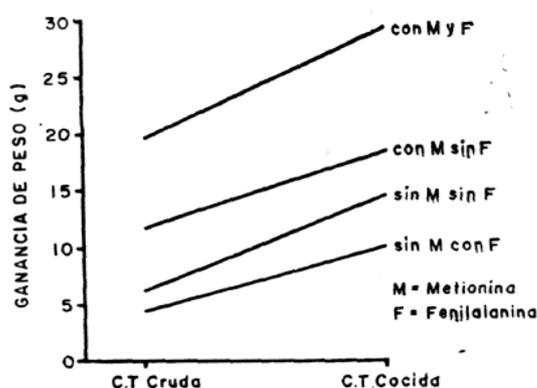
$S\bar{x}_i - \bar{x}_j = 1.73$  g; C.M.E. = 11.91 g.

obtenido con dietas de CT no suplementadas o suplementadas únicamente con metionina (Cuadro 4 y gráfica 1). La adición de fenilalanina sin metionina causó una notable disminución en ganancias de peso y en consumo de alimento. El análisis de varianza aplicado a este factorial señaló diferencias significativas ( $P < 0.01$ ) para los efectos de cocción, adición de metionina y suplementación de fenilalanina y metionina. La única interacción significativa ( $P < 0.01$ ) fue la de metionina x fenilalanina. La respuesta más favorable fue la obtenida en dietas de CT cocida suplementadas con metionina y fenilalanina.

Debido a la similitud de las condiciones Ambientales y del material experimental utilizados en los tres experimentos, se llevó a cabo a prueba de Hartley para homogeneidad de varianzas (Prueba de FMAX). Calzada (1970) esta prueba indicó que no existían diferencias

Gráfica-1

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACION DE METIONINA Y FENILALANINA EN LA GANANCIA DE PESO DE RATAS CON DIETAS DE *Clitoria ternata*



El Cuadro 5 muestra la información obtenida en este análisis combinado por esta manipulación estadística.

### Discusión

Numerosos informes indican que el cocimiento de semillas de leguminosas mejora

nos mejore la disponibilidad de su proteína (Bravo y Brambila, 1968).

Pruebas *in vitro* (Bravo, 1971) indican que, la semilla de CT no contiene inhibidores de tripsina ni hemaglutininas. Sin embargo, es probable que el mayor crecimiento observado en ratas consumiendo dietas a base de CT cocida, se deba a que el tratamiento térmico

CUADRO 5  
Resultados combinados de parte de los tres experimentos

Tratamiento	Número de ratas	Ganancia promedio de peso (g)
Testigo (E1) <sup>a</sup>	8	91.1
CT cruda (E1, E2, E3)	24	6.1
CT cocida (E1, E2, E3)	24	13.6
CT cruda + 0.3% metionina (E2 y E3)	16	11.6
CT cocida + 0.3% metionina (E2 y E3)	16	17.9

<sup>a</sup> E = Experimento.

$S\bar{x}$  cruda —  $\bar{x}$  cocida = 1.05 g.

$S\bar{x}$  metionina —  $\bar{x}$  sin metionina = 0.78 g.

C.M.E. = 9.79 g.

su valor nutritivo. Esto puede deberse a la inactivación de factores tóxicos tales como inhibidores de enzimas proteolíticas (Kunitz, 1947; Borchers, Ackerson y Sandstedt, 1947). hemaglutininas (Stillmark, 1889; Liener, 1962, 1964), antivitaminas D (Carlson, McGinnis y Jensen, 1964; Carlson *et al.*, 1964), vitamina E (Hogue *et al.*, 1962; Hintz y Hegue, 1964) y compuestos que se combinan con metales haciéndolos indisponibles para el organismo (O'Dell y Savage, 1957). Es también probable que el cocimiento de estos gra-

aplicado (1.05kg/cm<sup>2</sup>) haya inactivado algún compuesto tóxico no identificado. La notable diferencia en ganancias de peso entre el tratamiento testigo y el de CT cocida, sugiere la presencia de un compuesto tóxico resistente a la temperatura y presión aplicadas o a un desbalance de aminoácidos atribuibles a la composición de aminoácidos de esta semilla.

Teóricamente, metionina (+cistina) es el aminoácido más limitante de esta leguminosa (Cuadro 6). El incremento en peso logrado por ratas consumiendo dietas suplementadas

CUADRO 6  
Requerimientos de aminoácidos esenciales de la rata en crecimiento y porcentaje de esos aminoácidos aportados por la semilla de clitoria ternata

Aminoácido	Requerimiento % <sup>a</sup>	Cantidades aportadas por CT, % <sup>b</sup>	% del requerimiento
Fenilalanina (+ tirosina)	0.90	0.60	66
Histidina	0.30	0.24	80
Isoleucina	0.50	0.45	90
Leucina	0.80	0.79	98
Lisina	0.90	0.70	77
Metionina (+ cistina)	0.60	0.19	31
Treonina	0.50	0.33	67
Triptófano	0.15	0.16	106
Valina	0.70	0.50	71

<sup>a</sup> N.R.C., 1962. El requerimiento está expresado como por ciento de la dieta.

<sup>b</sup> Bravo, 1971. Los datos fueron obtenidos considerando las cantidades de aminoácidos aportados por 23.8% de CT en las dietas.

con 0.3% de metionina demuestra claramente que metionina es el primer aminoácido limitante para la rata. Sin embargo, las mejores ganancias de peso notadas con los tratamientos de CT cocida + 0.3% de metionina fueron muy inferiores a las obtenidas con la dieta testigo del primer experimento (14.1 vs 91.1 g).

Las mejores ganancias de peso obtenidas en estos experimentos fueron logradas por las ratas consumiendo dietas de CT suplementadas con metionina y fenilalanina. Esto demuestra que fenilalanina es el segundo aminoácido limitante de la semilla de CT. La adición de fenilalanina sin suplementación de metionina provocó una notable disminución tanto en ganancias de peso como en consumo de alimento. Este resultado muestra claramente que el desbalance de aminoácidos de la semilla de CT se acentúa, al suplementar el segundo aminoácido limitante sin añadir el primero. Este efecto fue más crítico debido al empleo de dietas con escasa cantidad de proteína. Harper *et al.* (1964) obtuvieron resultados similares cuando añadieron el segundo o tercer aminoácido limitante sin suplementar el primero a dietas bajas en proteína. Este grupo obtuvo incrementos de peso cada vez mayores cuando añadía cada aminoácido en el orden en que eran limitantes.

La suplementación de los dos primeros aminoácidos limitantes a dietas con CT cocida, no permitió pesos comparables con la dieta testigo del primer experimento. Es posible que la presencia de derivados del ácido tánico en la semilla CT (4.6% de ácido quercitánico) (Tejada, Irma, comunicación personal) sea responsable de las bajas ganancias de peso obtenidas en estos experimentos. Glick y Josliyn (1970) sugieren que el mecanismo de toxicidad del ácido tánico está asociado con una disminución en la retención de nitrógeno. Tamir y Alumot (1970) señalan que la acción de los taninos en los animales, depende de la solubilidad de estos compuestos en el aparato digestivo. En otro trabajo (Tamir y Alumot, 1969) encontraron que taninos obtenidos de algarrobas, en estado verde o maduro, actua-

ron como potentes inhibidores no competitivos de enzimas digestivas *in vitro*. Esta acción fue explicada como una combinación no específica de los taninos de la algarroba con proteínas en el tracto digestivo, haciéndolas indigestibles para la rata.

Los derivados del ácido tánico son resistentes a elevadas temperaturas y presiones de vapor de agua (Singleton y Kratzer, 1969). En tanto que la mayoría de otros compuestos tóxicos encontrados en semillas de leguminosas hasta la fecha, son poco resistentes a temperaturas elevadas (Liener, 1969). Es razonable suponer que las bajas ganancias de peso, notadas en estos experimentos se deban a la acción de los derivados del ácido tánico presentes en esta semilla.

### Summary

Three 28 day experiments were conducted to determine the effect of supplementing 0.30% methionine and 0.3% phenylalanine to diets based on *Clitoria ternata* Lin (CT) raw or autoclaved (15 lbs/in<sup>2</sup> for 30 min) upon rate of gain of weanling rats. Cooking CT increased gains from 6.1 g to 13.8 g. Methionine supplementation caused gain of: 11.9 g with raw CT and 18.9 g with cooked CT. Methionine and phenylalanine additions improved significantly ( $P < 0.01$ ) the gains: 19.6 and 29.5 g for raw and autoclaved CT respectively. Additions of phenylalanine without methionine caused a remarkable depression in gains: 4.5 g raw CT and 10.1 g cooked CT. Rats on control diet gained 91.1 g. It is discussed that compounds related to tannic acid might be responsible for the depression in rate of gain.

### Agradecimientos

Se agradece al Ing. Jorge A. Escobar su colaboración en el análisis estadístico de este trabajo. Al Dr. Robert J. Meade la ayuda en material y equipo para realizar estos experimentos. Al Dr. Irvin E. Liener por su asistencia técnica.

### Literatura citada

BORCHERS, R., C. W. ACKERSON and R. M. SANDSTEDT. 1947. *Trypsin inhibitor. III. Determinación and heat destruction of the trypsin inhibitor of soybeans.* Arch. Biochem. Biophys. 12: 367.

BORCHERS, R., C. W. ACKERSON and I. KIMMETT. 1947. *Trypsin inhibitor. IV. Occurrence in seeds of the Leguminose and others seeds.* Arch. Biochem. Biophys. 13: 291.

- BRAVO, F. O. y S. BRAMBILA. 1968. *Determinación de la energía metabolizable del garbanzo (Cicer arietinum L.) para aves de corral*, Téc. Pec. en Méx. 11: 21.
- CALZADA BENZA, J. 1970. *Métodos estadísticos para la investigación*. Editorial Jurídica, S. A., Perú, pp. 323-324.
- BRAVO, F. O. 1971. Estudios sobre la composición química de la semilla de clitoria ternata Linn. Téc. Pec. en Méx. 18º, en prensa.
- CARLSON, C. W., J. MCGINNIS AND L. S. JENSEN. 1964. *The antirachitic effects of soybean preparations for turkey poultis*. J. Nutr. 82: 366
- CARLSON, C. W., H. C. SAXENA, L. C. JENSEN AND J. MCGINNIS. 1964. *Rachitogenic activity of soybean fractions*. J. Nutr. 82: 507.
- GLICK, Z. AND M. A. JOSLYN. 1970 *Food intake depression and other metabolic effects of tannic acid in the rat*. J. Nutr. 100: 509.
- HARPER, A. E., P. LEUNG, A. YOSHIDA AND Q. R. ROGERS. 1964. *Some new thoughts on amino acid imbalance*. Fed. Proc. 23: 1087.
- HINTZ, H. E. AND D. E. HOGUE. 1964. *Kidney beans (Phaseolus vulgaris) and the effectiveness of vitamin E for prevention of nutritional muscular dystrophy in the chick*. J. Nutr. 84: 283.
- HOGUE, D. E., J. F. PROCTOR, R. G. WAGNER AND J. K. LOOSLI. 1962. *Relation of selenium vitamin E and an unidentified factor to muscular dystrophy (Stiff lamb or white muscle disease.)* J. Animal Sci. 21: 25.
- KUNITZ, M. 1947. *Isolation of a crystalline protein compound of trypsin and of soybean trypsin inhibitor*. J. Gen. Physiol. 30: 291.
- LIENEK, I. E. 1962. *Toxic factors in edible legumes and their elimination*. Am. J. Clin. Nutr. 11: 281
- LIENER, I. E. 1964. *Seed hemagglutinins*. Econ. Botan 18: 27.
- LIENER, I. E. 1969. *Toxic Constituents of Plant Food stuffs*. Academic Press. New York and London 500 p.
- N. R. C. 1962. *Nutrient requirements of domestic animals*. Nº X. Nutrient requirements of Laboratory Animals. National Research Council, Washington, D. C.
- O'DELL, B. L. AND J. E. SAVACE. 1957. *Potassium zinc and distillers'dried solubles as supplements to a purified diet*. Poultry Sci. 36: 459.
- SÁNCHEZ, C. F. 1969. *Estudios sobre el valor nutritivo de la semilla de Clitoria*. (Clitoria ternata Linn.) Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. U.N.A.M.
- SINGLETON, V. L. AND F. H. KRATZER. 1969. *Toxicity and related physiological activity of phenolic substances of plant origen*. J. Agr. Food Chem. 17 497.
- STILLMARK, H. 1889. *Uber Ricin*. Arch. Pharmakol. Inst. Dorpat. 3: 19.
- TAMIR, M. AND E. ALUMOT. 1969. *Inhibition of digestive enzymes by condensed tannins from green and ripe carobs*. J. Sci. Food Agr. 20: 199.
- TAMIR, M. AND E. ALUMOT. 1970. *Carob tannins Growth depression and levels of insoluble nitrogen in the digestive tract of rats*. J. Nutr. 100: 573.