

130  
25.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA COMPOSICION QUIMICA  
DE FRIJOLES (*Phaseolus vulgaris*)  
SILVESTRES Y CULTIVADOS.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A**

**HUGO SOUSA ROJANO**

1993

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

INTRODUCCION	1
OBJETIVO	3
GENERALIDADES	4
Análisis proximal	5
Humedad	5
Cenizas	6
Proteína	7
Grasa	8
Fibra cruda	8
Carbohidratos	9
Aminoácidos	10
Factores antinutricionales y tóxicos	11
Inhibidores de tripsina	12
Hemaglutininas	13
Saponinas	15
Glucósidos cianogénicos	16
Alcaloides	17
PARTE EXPERIMENTAL	19
Metodología	21
Preparación de la muestra	22
Análisis proximal	
Humedad	22
Cenizas	23
Proteína	24
Grasa	26
Fibra cruda	28
Carbohidratos	30
Determinación de proteína verdadera	31
Determinación de aminoácidos	33
Triptofano	41
Determinación de componentes antinutricionales y tóxicos	
Inhibidores de Tripsina	47
Hemaglutininas	53
Saponinas	57
Glucósidos cianogénicos	59
Alcaloides	64
RESULTADOS Y DISCUSION	68
CONCLUSIONES	88
BIBLIOGRAFIA	90

## INTRODUCCION

En el continente Americano existen alrededor de 40 especies de frijoles silvestres del género *Phaseolus*, de las cuales sólo cuatro fueron domesticadas: *Phaseolus vulgaris* (frijol negro, bayo, flor de mayo, etc.); *Ph. coccineus* (ayocote, acalete, gordo, frijolón, botill, etc.); *Ph. acutifolius* (tepari, escumite, etc.) y *Ph. lunatus* (frijol de lima, comba, ib, etc.), además de múltiples variedades de cada una de ellas. La distribución del género *Phaseolus* se concentra principalmente en México y América Central, pero su centro de distribución y seguramente su centro de origen se halla en México donde se localizan más del 90% de sus especies. Sembradas y consumidas de diferente forma las distintas variedades de frijol constituyen una de las más importantes fuentes de proteína en la dieta de los pueblos americanos, quienes han tenido relación con esta especie desde hace por lo menos 7000 a 8000 años. Cabe mencionar que de las restantes especies silvestres se reconocen varias que se utilizan aún como alimento, o para otros menesteres como sucede con plantas del grupo *Phaseolus maculatus* (antes *Ph. metcalfei*), cuya raíz conocida como cocolmecha es utilizada como planta medicinal y como agente "fortificador" en la fermentación del tejuino y cuyo exudado, producto de hervirla varias horas, es utilizado como pegamento. El follaje de esta especie ha sido usado como forraje y sus vainas tiernas y semillas, como alimento humano (1,2).

Existe una variabilidad morfológica entre las especies cultivadas o domesticadas y las especies silvestres; se han observado diferencias en cuanto a tamaño de la semilla, velocidad de germinación, impermeabilidad al agua, capacidad de adaptación, hábitos de crecimiento y reproductivos, resistencia a plagas, habitats, etc., pero además de la información sobre variabilidad fenotípica, existen reportes experimentales que documentan una equiparable, y en ocasiones correlacionada, variación química (2,3).

Las semillas del frijol común presentan una importante variabilidad química que hace promisorio cualquier estudio que se haga en esta dirección. Considerando, por ejemplo, que tanto en proteínas totales como en la fracción proteínica principal de reserva (Globulina 1), se ha encontrado variabilidad genética sustancial entre poblaciones cultivadas. Comparaciones hechas entre semillas de poblaciones cultivadas y silvestres demostraron nuevamente que existe diferencia en cuanto al contenido de proteína pero también demostraron que existe diferencia significativa en el contenido de aminoácidos dando con esto la pauta en la búsqueda del mejoramiento de la composición de aminoácidos de las especies cultivadas (3,4).

Igualmente indicativo de una importante variabilidad química resulta la notable resistencia de las especies silvestres al ataque de plagas, la cual probablemente es debida a la presencia de factores tóxicos ya que es característico encontrarlos en leguminosas seguramente actuando como mecanismo de defensa contra depredación (3,5).

**OBJETIVO:** Determinar si existen cambios importantes en el contenido de nutrimentos y tóxicos naturales en frijoles del género *Phaseolus vulgaris*, silvestres y cultivados.

## GENERALIDADES

El frijol común es un regalo de América Latina para el mundo. Históricamente constituye una de las especies alimenticias más importantes para los americanos después del maíz, ya que proporciona calorías y proteínas. Los ancestros silvestres de las especies de frijol han sido encontradas desde México hasta Argentina y sus especies domesticadas (cultivadas) se consumen en el desayuno, comida y cena ya sea solos o acompañados de cereales y otros alimentos y cocinados de diferente forma, sus vainas y hojas se usan como forraje para animales (6). Acerca de como ocurrió la domesticación del frijol, se ha propuesto que el uso de inflorescencias no tóxicas pudo ser el inicio y que la vinculación entre el frijol y el hombre se reforzaría con el descubrimiento de que el tostado o cocción de las semillas elimina muchas de sus toxinas. Al iniciarse su cultivo, su hábito de crecimiento voluble sugiere su asociación con otra planta útil como el maíz, para posteriormente seleccionar las especies que presentaron mejores características de cultivo (7). De este modo se inició el cultivo y llegó a convertirse en la leguminosa de consumo humano más común de América Latina pues representa más del 85% de la producción total de leguminosas para consumo humano, aunque es posible encontrar algunas especies silvestres. Con el mejoramiento y el cultivo selectivo se han modificado las características estructurales de los frijoles silvestres para adaptarlas al gusto de los consumidores, las vainas se han hecho grandes y blandas, con granos mayores y más jugosos. Estas vainas no se rompen al madurar como ocurre con las formas silvestres además de presentar diferencias en cuanto a composición de nutrimentos y tóxicos naturales.(8).

## **ANÁLISIS PROXIMAL.**

El análisis proximal o bromatológico es la estimación porcentual de un cierto componente del alimento en una forma general. Este análisis, también conocido como Sistema Weende desarrollado en Alemania hace más de 100 años, es de gran importancia ya que es el primer paso en el estudio analítico de cualquier alimento ya sea de origen animal o vegetal y mediante él se determinan los principales componentes de un alimento. Los datos arrojados por este análisis son de gran utilidad para saber hacia donde dirigir el estudio del alimento, que utilidad podría tener en un momento dado, predecir el posible aprovechamiento de alguno de los componentes del mismo, estandarizar materias primas y productos terminados, etc. El análisis proximal presenta la ventaja de proporcionar bastante información empleando una cantidad de muestra reducida además de ser sencillo y relativamente rápido. Generalmente el análisis se realiza de acuerdo a las técnicas descritas y aprobadas en el AOAC e incluye las determinaciones de humedad, cenizas, proteína cruda, grasa cruda, fibra cruda y carbohidratos asimilables calculados por diferencia.(9)

## **HUMEDAD**

Debido a que no tiene un valor energético ni sufre cambios químicos durante su utilización biológica, en muchas ocasiones el agua no se considera como nutrimento. Sin embargo, sin este líquido no podrían llevarse a cabo las reacciones bioquímicas que sustentan la vida. Las funciones biológicas principales del agua se basan en su capacidad para disolver y transportar sustancias, además sirve como lubricante para unir y transportar al alimento a través del tracto gastrointestinal, regula la temperatura del cuerpo y es componente estructural de las células.

Todos los alimentos, incluyendo los deshidratados, contienen una cierta

cantidad de humedad, la cual varía entre el 60 y el 95% en los alimentos naturales. El agua existe en dos formas generales: el agua "libre", que es la forma predominante y se libera con gran facilidad por lo que es la que se determina en la mayoría de los métodos de determinación de humedad, y el agua "ligada", que es el agua que permanece "inmóvil" unida a carbohidratos y proteínas, el agua de cristalización y aquella absorbida en las partículas coloidales (10).

La temperatura de secado es la variable mas importante en la determinación del contenido de humedad de una muestra, debido a que algunos de los componentes de los alimentos se descomponen a temperaturas elevadas, como por ejemplo las grasas, los azúcares y los compuestos volátiles distintos del agua típicos de las especias que pueden eliminarse en secados a altas temperaturas (100-110 °C). Existen diferentes métodos para llevar a cabo esta determinación y el método a emplear depende en gran parte del material a analizar (11).

## **CENIZAS**

Las cenizas están constituidas por los elementos minerales que forman parte de los compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en los alimentos. Durante la incineración las sales metálicas de los ácidos orgánicos se convierten en óxidos o carbonatos o bien reaccionan para formar fosfatos, sulfatos o haluros. Algunos elementos como el azufre y los halógenos pueden no ser retenidos, esto es que pueden volatilizarse. En las muestras vegetales predominan los derivados de potasio, mientras que en las animales los de sodio. Los minerales tienen actividad metabólica importante ya que intervienen principalmente en la actividad biológica de enzimas, en el transporte de electrones y unidos a proteínas como la hemoglobina y hemocianina.

Las cenizas de una muestra pueden proporcionar diferente información como: grado de refinación, presencia de adulterantes, cantidad de materia orgánica presente, presencia de elementos minerales tóxicos como plomo, selenio y mercurio y a partir de ellas puede llevarse a cabo el análisis de minerales y conocer el total de nutrimentos digeribles (11,12).

## **PROTEINA**

Las proteínas están constituidas por cadenas de aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Son indispensables para el organismo pues se encuentran en todas las células, pueden ser funcionales o estructurales. En el organismo desempeñan diferentes funciones como la formación y regeneración de tejidos, la síntesis de anticuerpos, enzimas y hormonas y como constituyentes de la sangre, además también forman parte de diferentes tejidos estructurales.

Debido a su importancia como nutrimento, se han convertido en uno de los principales focos de atención de los tecnólogos de alimentos. En los alimentos influyen en la textura y en las propiedades reológicas, y contribuyen a las propiedades organolépticas de los mismos. A medida que pasa el tiempo se aumentan las investigaciones encaminadas al aprovechamiento de proteínas de fuentes no convencionales, debido a la escasez de alimentos ricos en proteína sobre todo en los países en vías de desarrollo, de tal manera que se puedan satisfacer las necesidades de este nutrimento en poblaciones de escasos recursos.

En los alimentos el contenido de proteína cruda se calcula en base al nitrógeno total, el cual es determinado generalmente por el método de Kjeldahl, de este modo la determinación incluye no solo el nitrógeno proveniente de las proteínas de la muestra, sino también algunos otros compuestos nitrogenados

no proteícos como aminoácidos libres, aminas, amidas, bases nitrogenadas, etc., por esto es importante llevar a cabo una determinación de proteína verdadera para saber el contenido real de proteína de una muestra (10,11,13).

## **GRASA**

Los lípidos son un grupo de compuestos de estructura heterogénea muy abundantes en la naturaleza, del que las grasas y los aceites son los representantes más importantes.

La grasa cruda está constituida por los materiales solubles en éter e incluye gran variedad de compuestos orgánicos tales como grasas verdaderas, ácidos grasos, vitaminas liposolubles o provitaminas tales como carotenoides, esteroides y ceras.

En el organismo los lípidos desempeñan funciones importantes ya que forman parte de las membranas celulares y de las terminaciones nerviosas, además son precursores del colesterol y del ergocalciferol (vitamina D), sirven también como amortiguador físico en el organismo pues se encuentran en abundancia alrededor de los intestinos, el hígado y otros órganos vitales y están relacionados con la fisiología cardiovascular.

La grasa es importante en los alimentos ya que da características de palatabilidad, tiene capacidad para absorber aromas y sabores, influye en la estabilidad y representa la forma más concentrada de calorías en los alimentos.

A pesar de que las grasas y los aceites son necesarios para el organismo, su consumo excesivo produce problemas serios de salud como son la obesidad y las enfermedades cardiovasculares (10).

## **FIBRA**

En la mayoría de los alimentos vegetales existe una fracción de

polisacáridos no digerible denominada fibra cruda. Esta fracción está formada por celulosa, pentosanas, pectinas, hemicelulosa y en menor proporción lignina, que al no ser metabolizadas por el organismo humano son eliminadas en las heces. La fibra cruda proviene de las paredes celulares de los vegetales. La celulosa es un homopolisacárido de D-glucosa con uniones  $\beta(1-4)$ , helicoidal. La hemicelulosa es un heteropolisacárido compuesto por polímeros que contienen D-xilosa, L-arabinosa, D-glucosa, D-manosa unidos por enlaces  $\beta(1-4)$  a ácido D-galacturónico. La lignina es un polímero tridimensional formado por la unión de compuestos fenólicos, unidos por una cadena alifática de tres carbonos, insoluble en agua.

La fibra es importante en la dieta porque ayuda a la formación y transporte del bolo alimenticio a través del tracto intestinal pues tiene gran capacidad de retención de agua. El consumo exagerado de fibra puede reducir la densidad de nutrimento del alimento y puede llegar a causar irritación gastrointestinal en niños de corta edad (10,14).

## **CARBOHIDRATOS**

Los carbohidratos son de gran importancia en plantas y animales pues son precursores de la mayoría de los compuestos orgánicos sintetizados en los organismos. Los azúcares simples generalmente se encuentran formando polímeros cuyas propiedades funcionales varían: pueden encontrarse como material de reserva energética o pueden formar parte de la estructura rígida de las plantas.

Los carbohidratos son los nutrimentos más abundantes y más baratos que se encuentran en la naturaleza por lo que constituyen una de las principales fuentes de energía consumidas en la dieta de muchos países; las principales formas de consumo son los almidones y el azúcar de mesa o sacarosa. Los

carbohidratos además de ser buena fuente de energía, son necesarios para llevar a cabo una gran variedad de funciones biológicas, como es la mejor utilización de grasas y proteínas en el cuerpo humano.

La estructura química de los carbohidratos determina su funcionalidad y sus propiedades en los alimentos, esto es importante porque gracias a ellos se pueden lograr características de sabor, color, estructura y viscosidad. De este modo, las características de los alimentos, naturales y procesados, están influenciadas por el tipo de carbohidratos que contengan (10).

## **AMINOACIDOS**

Los aminoácidos son los monómeros y principales componentes de las proteínas, por lo tanto su naturaleza y distribución determinan las propiedades de cada proteína. Existen en dos formas ópticamente activas: D y L isómeros, los aminoácidos L son los que se encuentran en la naturaleza y tienen actividad biológica. La mayoría de las proteínas están estructuradas solamente por 20 o 21 aminoácidos pero además existen alrededor de 100 aminoácidos que existen en forma libre o combinada en diferentes tejidos, pero nunca en las proteínas, sino que pueden encontrarse como precursores de otras moléculas o como intermediarios metabólicos.

Los aminoácidos pueden clasificarse en base a la naturaleza de su grupo R o también como dispensables e indispensables en base a la capacidad que tiene el organismo para sintetizarlos. Los indispensables son aquellos que forzosamente deben ser obtenidos de la dieta, mientras que los dispensables son sintetizados en el organismo en concentraciones suficientes por lo que no es tan necesaria su presencia en las proteínas de los alimentos. Los aminoácidos indispensables para el hombre son 8: Treonina, Valina, Metionina, Lisina, Isoleucina, Leucina, Fenilalanina, y Triptofano.

Dentro de las principales funciones de los aminoácidos tenemos la formación de proteínas y péptidos, producción de energía y participación directa o indirecta en los mecanismos de eliminación o neutralización de compuestos tóxicos, además pueden acumularse y cuando se sobrepasan los requerimientos parte de los aminoácidos se degradan liberando energía o pasan a formar parte de las reservas energéticas en forma de grasas o carbohidratos (10).

### **FACTORES ANTINUTRICIONALES Y TOXICOS**

El conocimiento de la actividad tóxica crónica o de la actividad cancerígena de muchos alimentos ha adquirido especial interés en los últimos años. Se ha encontrado que es posible liberar a un alimento de una sustancia tóxica sometiéndolo antes del consumo a una preparación o un tratamiento adecuados (15).

Dentro de las características de las leguminosas, familia a la que pertenece el frijol, encontramos que tienen un alto contenido de proteína, son buena fuente de energía, contienen minerales y vitaminas, se adaptan a diferentes climas, enriquecen el suelo de cultivo (las bacterias que se alojan en los nódulos de sus raíces, fijan el nitrógeno atmosférico), entre otras, pero además también son portadores de factores antinutricionales y tóxicos que limitan su aprovechamiento; dentro de este grupo de compuestos se encuentran los inhibidores de Tripsina, las lectinas o fitohemaglutininas, los glucósidos cianogénicos, las saponinas, los factores bociogénicos, los factores productores de latirismo, alcaloides, aminoácidos raros, factores anticoagulantes y otros inhibidores de enzimas (16). Los factores antinutricionales y tóxicos que se presentan con mayor frecuencia en frijol común son los inhibidores de Tripsina, las hemaglutininas (lectinas), las saponinas y los glucósidos cianogénicos.

Debido a que algunos de los tóxicos presentan naturaleza proteica pueden ser destruidos mediante un tratamiento térmico prolongado y solo pocos casos presentan termorresistencia como por ejemplo los inhibidores de Tripsina, las saponinas y los promotores de flatulencia (16,17,21).

### **INHIBIDORES DE TRIPSINA**

Un inhibidor puede ser definido como una sustancia que reduce la actividad de una enzima.

Los inhibidores de proteasas han sido encontrados en altas cantidades en leguminosas sobre todo en las del género *Phaseolus*, en la soya y en *Vicia faba*. Los más comunes son los inhibidores de Tripsina los cuales coexisten con los inhibidores de Quimiotripsina. Las estructuras y propiedades de los inhibidores varían enormemente, algunas de sus características son: inhiben Tripsina, resisten la actividad proteolítica de otras enzimas como la papaína y la pepsina, presentan resistencia relativa hacia factores ambientales como el calor y el pH (15,18,19).

De las innumerables especies de *Phaseolus vulgaris* se han aislado y caracterizado distintos inhibidores cuyos pesos moleculares varían entre 20,000 y 8,000; mostrando en cada especie diferencias y semejanzas con los inhibidores de Bowman-Birk y de Kunitz que se encuentran en la soya y que son los más estudiados. Las grandes diferencias entre las variedades de *Phaseolus vulgaris* hacen que las comparaciones entre ellos sean difíciles de establecer (19,20).

Se encuentran distribuidos por toda la planta pero se encuentran principalmente en las semillas. En algunos frijoles se encuentran abundantemente en semillas y hojas; los inhibidores de cada parte de la planta son diferentes entre sí. Se cree que en las plantas desaparecen durante la

germinación y favorecen el catabolismo de proteínas durante la misma o previenen la degradación de proteínas almacenadas durante la maduración de la semilla. Además actúan como mecanismo de defensa contra microbios e insectos. En algunas plantas, después de un daño mecánico o desprendimiento o posterior a un ataque por insectos, se lleva a cabo una acumulación de inhibidores de proteasas no solo en el sitio del daño sino también en los tejidos adyacentes (19).

El calentamiento apropiado puede destruir el efecto de los principales inhibidores o al menos disminuirlo. La termoestabilidad de inhibidores de Tripsina en frijoles cultivados es elevada, pues se ha reportado una retención de actividad original entre el 50 y el 80%. La termoestabilidad es atribuida al elevado contenido de aminoácidos azufrados en los inhibidores; mientras que en el resto de las proteínas existe deficiencia de aminoácidos azufrados, en los inhibidores existe un alto contenido de cisteína y un alto número de enlaces disulfuro los cuales contribuyen a la termoestabilidad de estas proteínas (20).

Algunos de sus efectos antinutricionales y tóxicos son la inhibición del crecimiento por propiciar indisponibilidad de aminoácidos, producen incremento de la secreción pancreática (amilasas), en ratas producen hiperplasia de las células pancreáticas e incremento de la concentración de tripsinógeno y quimiotripsinógeno en el páncreas, tienen efecto sobre el valor nutritivo de las proteínas (18,19,21).

### **HEMAGLUTININAS (LECTINAS)**

Las hemaglutininas, también conocidas como lectinas, son proteínas que presentan la interesante habilidad de aglutinar los eritrocitos. Su detección y caracterización se ha basado en este hecho. Algunas se encuentran unidas a azúcares por lo que se les ha clasificado como glucoproteínas. Se encuentran

ampliamente distribuidas siendo encontradas en algunas familias de plantas y en algunos animales como esponjas, crustáceos, moluscos y peces. El grupo más estudiado han sido las leguminosas en donde generalmente van acompañadas de otros factores tóxicos.

Un gran número de lectinas han sido encontradas en plantas y distribuidas en diferentes partes de las mismas (semillas frutos y tubérculos). Su función en las plantas no es del todo conocida, se cree que actúan como anticuerpos, protegen a la planta contra el ataque de hongos y otras plagas y también almacenan y transportan azúcares (21,22).

Tienen cierta afinidad por carbohidratos complejos como los que forman parte de la membrana celular; esto ha explicado su mecanismo de acción el cual ha sido descrito del tipo antígeno-anticuerpo. Más aún como los anticuerpos, presentan una marcada especificidad ya que pueden aglutinar fuertemente eritrocitos de una especie y tener un efecto débil o nulo sobre eritrocitos de otra. Para que se lleve a cabo la interacción lectina-eritrocito deben existir como mínimo dos grupos activos. Basándose en la especificidad presentada, se ha correlacionado la toxicidad de las lectinas de frijoles con su capacidad para aglutinar eritrocitos de vaca, de tal manera que aquellas lectinas capaces de aglutinar dichos eritrocitos son más tóxicas que aquellas que no pueden hacerlo (15,17,22).

Dado que son proteínas presentan termosensibilidad por lo que su efecto puede ser eliminado mediante un tratamiento térmico en húmedo preferentemente (procesos convencionales de cocimiento) (21,22).

Entre los efectos tóxicos se ha observado que retardan el crecimiento, producen hemorragia gastrointestinal e incluso pueden provocar la muerte. Se ha observado que la toxicidad es mayor por administración intravenosa que por ingestión oral en ratas. Las lectinas de frijol *Phaseolus vulgaris* incorporadas a la

dieta de ratas producen retraso en el crecimiento, mala absorción de nutrimentos y crecimiento desmedido de flora bacteriana en el intestino delgado, lo que contribuye a la absorción deficiente de nutrimentos en el intestino (22,23).

## **SAPONINAS**

Las saponinas son glicósidos anfífilos que se han encontrado en una gran variedad de plantas, distribuidas en hojas, tallo, flores y raíces. Estructuralmente están formados por una parte polar constituida por los azúcares (hexosas, pentosas o ácidos urónicos) que se encuentran enlazados a un grupo no polar llamado sapogenina que puede ser un esteroide o un triterpeno, pero la mayoría de las sapogeninas identificadas son del tipo triterpenoide. Presentan 3 características principales: presentan sabor amargo, forman espuma en solución acuosa y pueden causar hemólisis de eritrocitos. Además son de difícil cristalización, en general inodoras, reducen fuertemente la tensión superficial por lo que pueden estabilizar emulsiones de grasas y aceites, son termorresistentes y son capaces de formar complejos con proteínas y con el colesterol y otros hidroxiesteroides (21,24,25).

Han sido aisladas de espinaca, betabel, espárrago, alfalfa, soya, chícharo y algunas otras leguminosas; además también han sido encontradas en el veneno de algunas serpientes y estrellas marinas. Su función en las plantas no es del todo conocida pero se les ha asociado con la resistencia de las plantas hacia el ataque de plagas (microorganismos e insectos).

Son altamente tóxicos para animales de sangre fría (peces y anfibios) por su propiedad de disminuir la tensión superficial. Algunas inhiben crecimiento microbiano por precipitación de esteroides de la membrana celular, se ha reportado toxicidad selectiva en hongos. Normalmente crean lesiones

gastrointestinales y si pasan al torrente sanguíneo causan hemólisis de los eritrocitos, pueden causar falla respiratoria, convulsiones y coma.

Su poder hemolítico es atribuido a un cambio drástico en la permeabilidad de la membrana celular como resultado de una combinación de interacciones no específicas de las saponinas con componentes de la membrana como son proteínas, fosfolípidos y principalmente con el colesterol, provocando la ruptura y una pérdida inmediata del contenido celular. Se ha observado que la velocidad de reacción es diferente dependiendo del eritrocito a probar. La actividad hemolítica es contrarrestada por el plasma sanguíneo o bien por el colesterol dejando en duda si son tóxicos *in vivo*.

Algunas saponinas son usadas en la industria como aditivos en bebidas carbonatadas, cerveza, helados, caramelos, jarabes, etc., aprovechando que son potentes surfactantes (21,25).

### **GLUCOSIDOS CIANOGENICOS**

En la naturaleza se han encontrado más de 100 especies vegetales que contienen glucósidos cianogénicos, entre ellas las leguminosas y las rosáceas. Los glucósidos cianogénicos son compuestos que desprenden HCN por tratamiento con ácido o por acción de las enzimas hidrolíticas apropiadas. ( $\beta$ -glucosidasa). Se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas, pero también se han encontrado en helechos, musgos e insectos. En plantas el HCN es desprendido solo cuando los tejidos de la planta son dañados o macerados. La descomposición del glucósido cianogénico da lugar a un azúcar, HCN y un aldehído o cetona con el cual el HCN estaba combinado como una cianohidrina. La descomposición de los glucósidos cianogénicos en las plantas, se lleva a cabo en dos pasos. En el primero actúa la enzima  $\beta$ -glucosidasa dando lugar al azúcar y la cianohidrina. En el segundo paso actúa la enzima hidroxinitriliasa

que da lugar al HCN libre y al aldehído o cetona correspondiente. El azúcar puede estar constituido por un monosacárido (generalmente glucosa) o por disacáridos como la gentobiosa o la vicianosa (26,27).

El glucósido no es tóxico por sí mismo pero si el cianuro generado por acción enzimática, el cual actúa a nivel de citocromo oxidasa, por ende inhibe la cadena respiratoria. La DL<sub>50</sub> del HCN administrado oralmente es de 0.5 a 3.5 mg/kg de peso, causando anoxia histotóxica. En el organismo el cianuro es absorbido rápidamente por el tracto gastrointestinal, la piel o en forma de gas por los pulmones. Durante la biotransformación el cianuro reacciona con productos de la degradación de la cisteína por lo que se alcanzan niveles altos de tiocianato. Sin embargo, ambos son eliminados en la orina como cianometahemoglobina (21,26).

Se han encontrado en semillas de frutas como manzana, ciruela, durazno, cereza y almendras amargas (amigdalina), en frijoles (linamarina y lotaustralina), sorgo (durrina), yuca, chícharo, linaza, etc. (26).

Dado que los glucósidos cianogénicos son termolábiles se ha observado que es posible eliminar el HCN de los alimentos que lo contienen por cocimiento en recipientes destapados para permitir su volatilización y eliminando el agua de cocción (15).

## **ALCALOIDES**

Los alcaloides, de los cuales se conocen alrededor de 5,500, están comprendidos dentro del grupo de sustancias secundarias de las plantas. Los alcaloides constituyen un grupo muy heterogéneo de bases vegetales nitrogenadas, algunas de las cuales son tóxicas para el hombre, y que presentan acción fisiológica mas o menos intensa en animales de ahí su amplio uso en medicina. No existe una definición para el término alcaloide pero dentro

de este grupo se incluyen a aquellas sustancias que contienen uno o más átomos de nitrógeno comúnmente como parte de un sistema cíclico. Muchos alcaloides son de naturaleza terpenoide y otros son considerados como terpenoides modificados desde el punto de vista biosintético; otros son compuestos aromáticos.

La mayoría de los alcaloides se encuentran en las plantas en forma de sales y ésteres de ácidos orgánicos, algunos otros se encuentran en forma de glicósidos de la ramnosa, galactosa y glucosa. Se clasifican en 254 tipos aunque también se pueden clasificar de acuerdo a su procedencia botánica.

La función de los alcaloides en las plantas no es del todo conocida, se les ha considerado como productos terminales del metabolismo del nitrógeno y se considera que sus precursores son los aminoácidos, se asocian como medio de protección del vegetal contra el ataque de insectos y animales herbívoros, y como reguladores del crecimiento del vegetal. Pueden encontrarse en órganos específicos de la planta o bien distribuidos por todo el vegetal.

Los alcaloides son poco frecuentes o no se encuentran en gimnospermas, helechos y plantas inferiores. En leguminosas se han encontrado alcaloides de tipo de las quinolizidinas.

Debido a que son un grupo químicamente heterogéneo y muy variado, no es posible identificarlos en extractos vegetales usando un simple criterio cromatográfico. En general, es difícil identificar un alcaloide de una nueva fuente vegetal sin saber aproximadamente que tipo de alcaloides es posible encontrar en dicho material (27,28).

## PARTE EXPERIMENTAL

Se estudiaron 10 muestras de frijoles del género *Phaseolus vulgaris* de las cuales cinco son cultivadas y las cinco restantes son silvestres. Los frijoles silvestres, denominados frijol del monte, pertenecen a la variedad *mexicanus*, fueron recolectados en 1991 y su hábito de crecimiento es trepador. Los frijoles cultivados seleccionados fueron el frijol Garrapata, frijol Pinto, frijol Encerado, frijol Flor de Mayo y frijol Flor de Mayo "bola"; dentro de este grupo, los frijoles Garrapata, Pinto y Encerado fueron recolectados en 1986 y los frijoles Flor de Mayo y Flor de Mayo "bola" fueron recolectados en 1991. Todos los frijoles cultivados presentan hábito de crecimiento trepador a excepción del frijol Flor de Mayo "Bola" el cual crece en mata. En los cuadros I y II se presentan las muestras de frijoles de este estudio divididas en silvestres y cultivadas.

La recolección y la clasificación botánica fué realizada por el M. en C. Marcelo Sánchez del Laboratorio de Ecología Fisiológica del Centro de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Frijoles silvestres y cultivados (*Phaseolus vulgaris*) seleccionados para el estudio.

### FRIJOLES SILVESTRES

NOMBRE COMUN	VARIEDAD	PROCEDENCIA
Frijol del monte (I)	mexicanus	Santiago Tepetlapa, Morelos
Frijol del monte (II)	mexicanus	Amatlán de Quetzalcoatl, Morelos
Frijol del monte (III)	mexicanus	Amatlán de Quetzalcoatl, Morelos
Frijol del monte (IV)	mexicanus	Amatlán de Quetzalcoatl, Morelos
Frijol del monte (V)	mexicanus	Amatlán de Quetzalcoatl, Morelos

Cuadro I.

### FRIJOLES CULTIVADOS

NOMBRE COMUN	VARIEDAD	PROCEDENCIA
Frijol garrapata	vulgaris	El Tunal, San Felipe del Progreso, Estado de México
Frijol pinto	vulgaris	Zacatlán, Puebla
Frijol encerado	vulgaris	La candelaria, Valle de Bravo, Estado de México
Frijol Flor de Mayo	vulgaris	Ixmiquilpan, Hidalgo
Frijol Flor de Mayo "bola"	vulgaris	Santiago Tepetlapa, Morelos

Cuadro II.

## **METODOLOGIA**

La metodología empleada para el análisis de los frijoles silvestres y cultivados fué la siguiente:

**Preparación de la muestra**

**Análisis proximal (9):**

Humedad

Cenizas

Proteína cruda

Grasa cruda

Fibra cruda

Carbohidratos asimilables calculados por diferencia

**Determinación de proteína verdadera (29)**

**Determinación de aminoácidos (30,31)**

**Análisis de componentes antinutricionales y tóxicos.**

Inhibidores de tripsina (32)

Hemaglutininas (lectinas) (33,34)

Saponinas (25)

Glucósidos cianogénicos (35)

Alcaloides (36)

**Análisis estadístico de los resultados (37).** Consistió en una prueba de T simple para determinar diferencia significativa entre las muestras silvestres y cultivadas.

## **PREPARACION DE LA MUESTRA**

Los frijoles fueron sometidos a una molienda en un molino Thomas-Wiley Mod. 4, con malla de 1 mm. de diámetro. Las muestras molidas se guardaron en frascos de vidrio y se utilizaron para los análisis mencionados anteriormente y que se explicarán a continuación.

## **ANALISIS PROXIMAL**

El análisis bromatológico o proximal se llevó a cabo siguiendo las técnicas descritas en el AOAC. Las determinaciones fueron humedad, cenizas, proteína cruda, grasa cruda, fibra cruda y carbohidratos asimilables calculados por diferencia. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

### **HUMEDAD.**

**Fundamento:** La pérdida de material que se volatiliza bajo ciertas condiciones de temperatura y presión, se denomina humedad.

**Material:**

\*Estufa de vacío LAB-LINE Mod. 3620

\*Desecador

\*Balanza analítica

\*Charolas de aluminio

**Procedimiento:**

1. Poner a peso constante las charolas de aluminio en una estufa de vacío a una temperatura de 60-65 °C y una presión de 15 a 20 inHg durante 2 a 4 horas.
2. Pesar de 2 a 5 g de muestra en cada charola y colocarla en la estufa para su secado.
3. Se saca la charola y se coloca en el desecador, se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se pesa. La determinación concluye hasta que las

charolas quedan a peso constante o hasta que dos pesadas sucesivas no registren una diferencia de más de 0.001 g.

**Cálculos:**

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

Donde:

P<sub>i</sub>= peso de la charola con muestra húmeda en gramos

P<sub>f</sub>= peso de la charola con muestra seca en gramos

m= peso de la muestra en gramos

## **CENIZAS.**

**Fundamento:** Las cenizas son el residuo inorgánico que se obtiene después de la incineración de una muestra.

### **Material:**

- \* Mufla THERMOLYNE Mod. 1500
- \* Balanza analítica
- \* Desecador
- \* Crisoles de porcelana

### **Procedimiento:**

1. Poner los crisoles a peso constante en la mufla a una temperatura entre 500 y 550 °C.
2. Pesar en el crisol de 2 a 5 g de muestra y carbonizar con ayuda de un mechero hasta que deje de salir humo.
3. Colocar el crisol en la mufla (500-550 °C) durante el tiempo necesario para obtener cenizas blancas o grises homogéneas, sin puntos negros. En caso de presentar puntos negros, pueden agregarse unas gotas de agua destilada a las cenizas frías y meterlas nuevamente a la mufla hasta que queden homogéneas.
4. Dejar enfriar un poco los crisoles y colocarlos en un desecador, dejar enfriar

hasta temperatura ambiente y pesar. Los crisoles con las cenizas deben quedar a peso constante.

**Cálculos:**

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{P_i - P_f}{m} \times 100$$

Donde:

Pf= peso del crisol con las cenizas en gramos

Pi= peso del crisol vacío (peso constante) en gramos

m= peso de la muestra en gramos

**PROTEINA.**

**Fundamento:** La determinación se realiza en base al método de Kjeldahl, el cual consta de una oxidación de la materia orgánica mediante la acción de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en presencia de un catalizador ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), como resultado de esta oxidación se produce  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{N}_2$  el cual se transforma en  $\text{NH}_4\text{HSO}_4$ . Para la liberación del  $\text{NH}_4$  de la sal formada, se realiza una destilación en presencia de  $\text{NaOH}$  al 60% y el amoníaco liberado es recibido en ácido bórico formándose borato de amonio el cual es titulado con una solución de  $\text{HCl}$  0.01 N. De este modo se sabe la cantidad de Nitrógeno que se liberó de la muestra el cual se multiplica por un factor que nos da el porcentaje de proteína de la misma.

**Material y Reactivos:**

- \* Digestor TECATOR Mod. AB-20/40
- \* Microdestilador LABCONCO
- \* Tubos para digestión de 75 ml TECATOR
- \* Mezcla digestiva (a)
- \* Hidróxido de sodio al 60% R.A.
- \* Sulfato de potasio R.A.
- \* Peróxido de hidrógeno al 30% R.A.

- \* Acido bórico con indicadores (b)
- \* Acido clorhídrico valorado 0.01N

**Preparación:**

a. Mezcla digestiva: disolver 3 g de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) en 20 ml de agua destilada, agregar 50 ml de ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) conc. y 430 ml de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) conc. resbalándolo por la pared. Agitar la mezcla durante 30 minutos.

b. Acido bórico con indicadores: disolver 10 g de ácido bórico y disolverlos en agua destilada, adicionar 70 ml de indicador A (100 mg de fenoltaleína disueltos y aforados a 100 con etanol) y 20 ml de indicador B (33 mg de verde de bromocresol y 66 mg de rojo de metilo disueltos y aforados a 100 con etanol) llevar a un volumen final de 2000 ml con agua destilada. Se ajusta el ácido bórico a un color café-rojizo.

**Procedimiento:**

**DIGESTION.**

1. Pesar de 20 a 60 mg de muestra finamente molida en un tubo de digestión; agregar 0.5 g de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  y 3 ml de mezcla digestiva.
2. Colocar el tubo en el digestor previamente calentado a una temperatura inferior a  $370^\circ\text{C}$ , durante 15 min. (predigestión).
3. Transcurrido el tiempo de predigestión, sacar el tubo del digestor y dejarlo enfriar, adicionar 1.5 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y colocar el tubo nuevamente en el digestor a  $370^\circ\text{C}$  hasta que el contenido del tubo sea translúcido, sin restos de materia orgánica ni coloraciones fuertes. Dejar enfriar el tubo antes de efectuar la destilación.

**DESTILACION.**

1. Pasar la muestra digerida a la copa de adición del microdestilador el cual debe haberse calentado previamente, colocar un vaso de precipitados que

contenga 50 ml de ácido bórico al final del refrigerante.

2. Vaciar el contenido de la copa de adición al bulbo de reacción lentamente, lavar el tubo y la copa de adición con un poco de agua destilada y agregar esto al bulbo de reacción.

3. Agregar 15 ml de NaOH al 60% y vaciarlos muy lentamente al bulbo de reacción, lavar la copa con un poco de agua y vaciarla al bulbo de reacción.

4. Destilar hasta un volumen de 100 o 125 ml, retirar el vaso y lavar el aparato. Al recibirse el nitrógeno amoniacal sobre el ácido bórico el indicador que éste contiene vira del café-rojizo al verde esmeralda.

#### TITULACION.

1. Titular el contenido del vaso con HCl 0.01 N hasta el vire del color verde esmeralda a rojo fresa, debe agitarse durante la adición de ácido.

NOTA: Debe realizarse un blanco sustituyendo la muestra por glucosa o sacarosa y tratándola de la misma forma.

#### Cálculos:

$$\% N = \frac{(P-B) \times N \times \text{meq} \times 100}{m}$$

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Nitrógeno} \times F$$

Donde:

P= ml de HCl 0.01 N usados para titular la muestra

B= ml de HCl 0.01 N usados para titular el blanco

N= Normalidad de la solución de HCl

meq= miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

F= Factor de conversión (6.25)

#### GRASA CRUDA.

**Fundamento:** La determinación se basa en la solubilidad de las grasas en éter;

la cantidad de material extraído de una muestra mediante el reflujo con éter se denomina extracto etéreo o grasa cruda e incluye grasa verdadera, ácidos grasos, aceites esenciales, ésteres, vitaminas liposolubles y carotenoides principalmente.

**Material y Reactivos:**

- \* Equipo de extracción Goldfish LABCONCO
- \* Balanza analítica
- \* Cartuchos de celulosa de 22 x 80 mm
- \* Vasos de borde esmerilado KIMAX
- \* Estufa de vacío LAB-LINE Mod. 3620
- \* Eter de petróleo R.A.

**Procedimiento:**

1. Pesar de 2 a 5 g de muestra en un cartucho de celulosa. Es conveniente emplear la muestra seca o la que se empleó en la determinación de humedad, pues así se evitará el arrastre de los componentes hidrosolubles debido a la humedad de la muestra, como son los carbohidratos.
2. Colocar el cartucho en el portadetal de vidrio y éste se coloca en el compartimiento del extractor.
3. En el vaso de borde esmerilado (previamente puesto a peso constante) se colocan 50 ml de éter de petróleo (nota 1), y con ayuda de un anillo metálico con rosca se asegura al extractor donde se ha colocado el cartucho. Se sube la parrilla del extractor hasta que esté en contacto con el vaso; el control de la temperatura debe estar en el mínimo (low). No olvidar abrir el agua de los refrigerantes. (nota 2).
4. Mantener el reflujo constante durante 8 horas. Al término de éste se baja la parrilla de calentamiento, se quita el vaso y se sustituye el portadetal con el cartucho por un colector de vidrio.
5. Asegurar nuevamente el vaso al extractor, se sube la parrilla de

calentamiento y se coloca el control de calentamiento al máximo para recuperar el éter, se calienta hasta que en el vaso queda un pequeño residuo.

6. Quitar el vaso del extractor y meterlo a la estufa de vacío a secar a una temperatura entre 60 y 65 °C. Sacar el vaso y colocarlo en el desecador para que se enfríe, al llegar a la temperatura ambiente se pesa. La determinación concluye cuando el vaso está a peso constante.

**Cálculos:**

$$\% \text{ Grasa} = \frac{P_f - P_i}{m} \times 100$$

Donde:

Pf= peso del vaso con el extracto etéreo en gramos

Pi= peso del vaso a peso constante en gramos

m= peso de la muestra en gramos

NOTA 1: Se utilizó éter de petróleo como disolvente de la fracción lipídica porque es más barato que el éter etílico, no absorbe humedad durante la extracción y con él se evitan problemas de explosiones pues no forma peróxidos como el éter etílico.

NOTA 2: Debido a que el punto de ebullición del éter de petróleo es bajo (34-45 °C), se recomienda enfriar los refrigerantes con agua-hielo.

**FIBRA CRUDA.**

**Fundamento:** La determinación está basada en la obtención de un residuo orgánico insoluble y combustible después que otros carbohidratos y proteínas han sido removidos mediante tratamientos sucesivos con ácidos y álcalis hirvientes.

**Material y Reactivos:**

- \* Aparato de digestión para fibra LABCONCO
- \* Estufa de vacío LAB-LINE Mod. 3620
- \* Desecador
- \* Mufla THERMOLYNE Mod. 1500
- \* Vasos Berzelius KIMAX de 600 ml
- \* Crisoles de porcelana
- \* Asbesto calcinado
- \* Solución de  $H_2SO_4$  al 1.25%
- \* Solución de NaOH al 1.25%
- \* Antiespumante (Emulsión Sigma B)
- \* Alcohol etílico R.A.

**Procedimiento:**

1. Pesar de 2 a 5 g de muestra desengrasada y colocarla en el vaso Berzelius, agregar 0.5 g de asbesto calcinado y unas perlas de vidrio.
2. Adicionar 200 ml de  $H_2SO_4$  al 1.25% que esté hirviendo y unas gotas de antiespumante; inmediatamente colocar el vaso en el digestor, el cual debe estar previamente caliente, subir la parrilla y digerir durante 30 min exactos.
3. Retirar el vaso del digestor y filtrar sobre el filtro de lino con ayuda de vacío, lavar el residuo con agua destilada caliente hasta eliminar el ácido (aproximadamente con 500 ml).
4. Transferir el residuo lavado y las perlas de vidrio al vaso Berzelius, agregar 200 ml de NaOH al 1.25% que esté hirviendo y unas gotas de antiespumante; colocar el vaso en el digestor, subir la parrilla y digerir durante 30 min exactos.
5. Retirar el vaso del digestor y filtrar sobre el mismo filtro de lino con ayuda de vacío, lavar el residuo con agua destilada caliente hasta eliminar el álcali (aproximadamente 500 ml).
6. Agregar al residuo 25 ml de alcohol etílico para facilitar su secado.
7. El residuo se pasa a un crisol de porcelana previamente puesto a peso

constante y se coloca en la estufa de vacío (60-65 °C) para secarlo, dejar enfriar en el desecador y pesar. (Secar hasta peso constante)

8. Carbonizar el residuo con ayuda de un mechero y luego pasarlo a la mufla (500-550 °C), dejar enfriar en el desecador y pesar. (Continuar hasta que el crisol esté a peso constante).

**Cálculos:**

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

Donde:

P<sub>s</sub>= peso del crisol con el residuo seco en gramos

P<sub>c</sub>= peso del crisol con el residuo calcinado en gramos

m= peso de la muestra en gramos (referido al peso original de muestra)

## **CARBOHIDRATOS ASIMILABLES**

Calculados por diferencia.

Se refiere a los carbohidratos digeribles y asimilables por el hombre como son los azúcares y los almidones; también se conocen como extracto libre de nitrógeno.

Es un dato obtenido de manera teórica restando al 100% el resultado de la suma de los porcentajes de humedad, cenizas, proteína cruda, grasa cruda y fibra cruda.

$\% \text{ Carbohidratos} = 100 - (\% \text{ cenizas} + \% \text{ proteína} + \% \text{ grasa} + \% \text{ fibra cruda})$

## **DETERMINACION DE PROTEINA VERDADERA.**

**Fundamento:** La técnica se basa en la solubilización del nitrógeno no proteínico así como de la proteína soluble y la posterior precipitación de dicha proteína con tungstato de sodio, con el fin de eliminar el nitrógeno no proteínico que puede interferir en la determinación por el método de Kjeldahl. Con este método, la proteína no soluble también es tomada en cuenta ya que en la etapa de filtración esta es incluida junto con la proteína soluble precipitada.

### **Material y Reactivos.**

- \* Digestor TECATOR Mod AB-20/40
- \* Microdestilador LABCONCO
- \* Tubos para digestión TECATOR de 75 ml
- \* Agitador magnético CORNING, con agitadores
- \* Papel WHATMAN # 542
- \* Mezcla digestiva<sup>1</sup>
- \* Solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%
- \* Solución precipitante<sup>2</sup>
- \* Acido bórico con indicadores<sup>1</sup>
- \* Acido Clorhídrico 0.01N valorado
- \* Solución de NaOH al 60%
- \* Sulfato de potasio RA

### **Preparación:**

1. Se preparan igual que para la determinación de proteína cruda.
2. Solución precipitante: Disolver 5 g de tungstato de sodio y 1.51 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O en 20 ml de H<sub>2</sub>O, añadir 22 ml de HCl 2 N y mezclar; aforar a 50 ml con agua destilada.

### **Procedimiento:**

#### **PRECIPITACION:**

1. Pesar 50 a 100 mg de muestra molida y colocarla en un vaso de precipitado de 50 ml.
2. Agregar 5 ml de H<sub>2</sub>O caliente, agitar mecánicamente 15 min; agregar 2 ml de

solución precipitante y dejar reposar 10 min.

3. Filtrar a través de papel Whatman # 542 utilizando 25 ml de agua caliente y vacío ligero.

#### DIGESTION:

1. El papel filtro con el precipitado se coloca en un tubo de digestión, se agregan 0.5 g de  $K_2SO_4$ , 5 ml de mezcla digestiva y se coloca en el digestor que ya debe estar caliente ( $T < 370\text{ }^\circ\text{C}$ ), durante 15 min.

2. Retirar el tubo del digestor y añadir 3 ml de  $H_2O_2$  al 30%, se coloca nuevamente en el digestor a una temperatura de  $370\text{ }^\circ\text{C}$  hasta digestión completa.

3. Dejar enfriar el tubo y proceder a realizar la destilación.

#### DESTILACION:

1. Pasar la muestra digerida a la copa de adición del microdestilador el cual debe haberse calentado previamente, colocar un vaso de precipitados que contenga 50 ml de ácido bórico al final del refrigerante.

2. Vaciar el contenido de la copa de adición al bulbo de reacción lentamente, lavar el tubo y la copa de adición con un poco de agua destilada y agregar esto al bulbo de reacción.

3. Agregar 15 ml de NaOH al 60% y vaciarlos muy lentamente al bulbo de reacción, lavar la copa con un poco de agua y vaciarla al bulbo de reacción.

4. Destilar hasta un volumen de 100 o 125 ml, retirar el vaso y lavar el aparato. Al recibirse el nitrógeno amoniacal sobre el ácido bórico el indicador que éste contiene vira del café-rojizo al verde esmeralda.

#### TITULACION.

1. Titular el contenido del vaso con HCl 0.01 N hasta el vire del color verde esmeralda a rojo fresa, debe agitarse durante la adición de ácido.

NOTA: Debe realizarse un blanco que incluya el papel filtro, sustituyendo la

muestra por glucosa o sacarosa y tratándolo de la misma forma.

**Cálculos:**

$$\% N = \frac{(P-B) \times N \times meq \times 100}{m}$$

$$\% \text{ Proteína verdadera} = \% \text{ Nitrógeno} \times F$$

Donde:

P= ml de HCl 0.01 N usados para titular la muestra

B= ml de HCl 0.01 N usados para titular el blanco

N= Normalidad de la solución de HCl

meq= miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

F= Factor de conversión (6.25)

## **AMINOACIDOS**

### **DETERMINACION DE AMINOACIDOS**

**Fundamento:** Se basa en la realización de una hidrólisis ácida (HCl 6N a 145°C) de la muestra para romper los enlaces peptídicos logrando así la liberación de los aminoácidos, después mediante un autoanalizador de aminoácidos se logra la separación y cuantificación de los mismos. El autoanalizador basa su funcionamiento en una cromatografía de intercambio iónico en donde se separan los aminoácidos, posterior a la separación ocurre una reacción con ninhidrina formando un compuesto colorido que permite la cuantificación colorimétrica de cada aminoácido en la muestra.

#### **Material y Reactivos:**

- \* Autoanalizador de aminoácidos TECHNICON Mod. NC-2P
- \* Rotavapor BÜCHI Mod. R
- \* Potenciómetro CORNING Mod. 10
- \* Digestor TECATOR Mod AB-20/40

- \* Vortex LABLINE Mod. Super-mixer No. 1290
- \* Adaptador para filtración en jeringa MILLIPORE XX30-012-00
- \* Membrana MILLIPORE tipo HATF 025 00 (tamaño de poro 0.45 $\mu$ M)
- \* Tubos de cultivo de pared gruesa con tapón de rosca y cubierta de teflón PYREX No.9826
- \* Acido clorhídrico 6 N
- \* Metil celosolve al 50%
- \* Amortiguador de acetato de sodio 0.4N (a)
- \* Sulfato de hidrazina (b)
- \* Ninhidrina (c)
- \* Solución lavadora (d)
- \* Amortiguador de dilución (e)
- \* Amortiguadores de acetatos para regeneración y elución (f)
- \* Hidróxido de sodio 0.1 N (f)
- \* Microjeringa HAMILTON Mod. 1001-LTN

**Preparación:**

a. Amortiguador de acetato de sodio 0.4N: Colocar aproximadamente 3 litros de agua destilada en un dispositivo de agitación, agregar lentamente 1,312 g de acetato de sodio anhidro para prevenir la cristalización, de ser necesario puede calentarse para la completa solubilización de la sal. Una vez fría la solución se le agregan 400 ml de ácido acético glacial lentamente y se deja enfriar. Aforar a 4 litros.

**NOTA:** El pH de este amortiguador debe ser de  $5.51 \pm 0.02$ ; si se requiere ajustar se debe usar álcali o ácido concentrado.

b. Sulfato de hidrazina: Disolver 1.049 g de sulfato de hidracina en agua destilada desionizada, a continuación adicionar 0.4 ml de ácido sulfúrico concentrado (R.A.) y 30 ml de solución BRIJ-35 al 20%, se lleva esta solución a un volumen de 4 litros. Para su conservación se requiere adicionar 0.8 ml de ácido caprílico.

c. Ninhidrina: Disolver 40 g de ninhidrina en 2 litros de metil-celosolve, a

~~El agua destilada se utiliza para preparar las soluciones de los reactivos y para diluir las soluciones de los reactivos.~~

~~El agua destilada se utiliza para preparar las soluciones de los reactivos y para diluir las soluciones de los reactivos.~~

1. ~~Antes de utilizar el agua destilada se debe verificar que no contenga iones de calcio y magnesio.~~

Forma de preparar las soluciones de los reactivos

1. En un recipiente con agua se pone la cantidad indicada del sólido y se disuelven todos los sólidos.
2. Adicionar los reactivos líquidos a las soluciones por separado y en excepción del ácido caprílico, el cual se adiciona luego después de ajustar el pH.
3. Agregar agua hasta un volumen aproximado de 100 ml. de la muestra que se tenga un margen para poder ajustar el pH.
4. Ajustar el pH con ayuda de un potenciómetro de acuerdo a la capacidad del mismo en calibró previamente con buffer de referencia pH 4.4. Adonar un volumen volumétrico de 1 ml. de agua de cada reactivo para mejorar la respuesta.
5. Filtrar con papel Whatman y pasar, para evitar contaminación con el material que está en los vasos de muestra y de la muestra.
7. El almacenamiento de las soluciones de los reactivos se debe hacer en recipientes de plástico.

continuación adicionar lentamente 1 litro del amortiguador de acetato de sodio 0.4 N. Por último se lleva a un volumen de 4 litros.

d. Solución lavadora: Agua-etanol (3:1 v/v) con hidroquinona al 0.01% como agente antioxidante.

e. Amortiguador de dilución: Se prepara una solución de ácido clorhídrico 0.2N (A) y una solución de cloruro de sodio 0.2 M (11.69g/l)(B). Se toman 50 ml de A y 33.3 ml de B, se lleva a 200 ml con agua destilada y adicionando hidroquinona al 0.01%. El pH de este amortiguador debe ser de  $1.50 \pm 0.05$ .

f. Amortiguadores de acetatos para regeneración y elución: La preparación se presenta a continuación y en la tabla 1 se muestran los reactivos y las cantidades de los mismos.

Forma de preparar las soluciones amortiguadoras:

1. En un recipiente con agitación se pone la mitad del volumen de agua y se disuelven todos los sólidos.
2. Adicionar los reactivos líquidos o las soluciones correspondientes a excepción del ácido caprílico, el cual se adiciona hasta después de ajustar el pH.
3. Agregar agua hasta un volumen aproximado de 900 ml, de tal manera que se tenga un margen para poder ajustar el pH.
4. Ajustar el pH con ayuda de un potenciómetro de escala expandida el cual se calibró previamente con buffer de referencia pH=4.5. Aforar en matraz volumétrico de 1 l con ayuda de ácido caprílico para romper la espuma.
6. Filtrar con papel filtro y vacío para eliminar cualquier partícula extraña, ya que estas soluciones pasarán por la resina de intercambio iónico.
7. El amortiguador ajustado y aforado se vacía en un recipiente que contenga la cantidad especificada de ácido caprílico en la tabla 1.

**TABLA 1**  
Preparación de amortiguadores

REACTIVO	BUFFER 1	BUFFER 2	BUFFER 3	NaOH 0.2N
Acetato de sodio anhidro	4.1g	5.0g	87.0g	
Acido acético glacial	20.0ml	15.0ml	20.0ml	
Solución de acetato de zinc 0.5M		0.6ml	2.0ml	
Alcohol etílico absoluto	78.0ml	78.0ml		
Alcohol benzílico			11.0ml	
Hidroquinona (antioxidante)	0.11g	0.11g		
Solución BRIJ-35 al 20% (MERCK # 1962)	8.0ml	8.0ml	8.0ml	
EDTA(Sal disódica)	0.1g			1.0g
Hidróxido de sodio (lentejas)				8.0g
Acido caprílico (conservador)	0.2ml	0.2ml	0.2ml	
Agua desionizada (<1ppm Na <sup>+</sup> )	1.0 l	1.0 l	1.0 l	1.0 l
Ajuste de pH (escala expandida)	3.9±0.02	4.1±0.02	5.3±0.02	
[Na <sup>+</sup> ]	0.05M	0.06M	1.06M	0.2M
[Zn <sup>++</sup> ]	0.0M	3x10 <sup>-4</sup> M	1x10 <sup>-3</sup> M	0.0 M

**BUFFER 1** Regeneración de la resina

**BUFFER 2** Elución de aminoácidos ácidos y neutros

**BUFFER 3** Elución de aminoácidos básicos

**NaOH 0.2 N** Lavado de la resina

### **Procedimiento:**

#### **HIDROLISIS Y PREPARACION DEL HIDROLIZADO:**

1. Pesar dentro del tubo de hidrólisis la cantidad de muestra (A) finamente molida y desengrasada (cuando el contenido de grasa sea mayor a 5%). Adicionar con cuidado la cantidad de ácido clorhídrico 6N (B), resbalándolo por las paredes tratando de que toda la muestra se humedezca con el reactivo; de ser necesario para lo anterior se puede ayudar con un agitador mecánico (Vortex).

$$A = \frac{0.05 \times 100}{\%P}$$

$$B = \frac{4 \times 100}{\%P}$$

Donde:

A = cantidad de muestra en gramos

B = ml de ácido (HCl 6 N)

%P = porcentaje de proteína en la muestra

2. Una vez pesada la muestra y agregado el ácido, se le insufla nitrógeno durante 30 segundos aproximadamente, cerrar bien el tubo con el tapón de rosca.

3. Colocar el tubo en el digestor a una temperatura de 145 °C durante 4 horas. El digestor se calienta previamente.

4. Dejar enfriar el tubo y agregar 5 ml del estándar interno de norleucina 5 mM, homogenizar y transferir cuantitativamente a un matraz bola de 100 ml, enjuagar el tubo con agua destilada desionizada caliente y solución lavadora, incorporar este volumen al hidrolizado

5. Con ayuda del rotavapor, eliminar el exceso de ácido hasta sequedad. Enjuagar nuevamente el tubo de hidrólisis y resuspender el residuo con este

volumen, llevar a sequedad por segunda ocasión.

6. Lavar nuevamente el tubo de hidrólisis, pero en esta ocasión con solución lavadora, resuspender el residuo y evaporar el solvente en el rotavapor hasta tener un volumen menor a 25 ml.

7. Filtrar el hidrolizado concentrado con ayuda de vacío a través de papel filtro doble (Whatman # 52), lavar con solución lavadora, es importante que el volumen no sobrepase los 20 ml.

8. Ajustar el pH del filtrado a  $6.8 \pm 0.2$  con un potenciómetro de escala expandida. Si se forma precipitado, filtrar a través de papel filtro doble (Whatman # 52) con ayuda de vacío. Lavar el residuo con un poco de agua destilada desionizada y aforar a 25 ml con agua destilada desionizada. En caso de que la muestra no vaya a ser empleada en ese momento debe congelarse hasta su uso.

#### INYECCION DEL HIDROLIZADO:

1. Diluir el hidrolizado tomando 1 ml del mismo y 1 ml del amortiguador de dilución (pH=1.5), con esto los aminoácidos pasan la forma catiónica.

2. Tomar el hidrolizado diluido con una jeringa de 5 ml y filtrar a través del dispositivo Millipore descartando las primeras cinco gotas.

3. Con una microjeringa se inyectan de 100 a 200  $\mu$ l del hidrolizado en la columna de intercambio iónico del autoanalizador de aminoácidos.

#### SEPARACION Y CUANTIFICACION:

Una vez que el hidrolizado ha sido inyectado en la columna catiónica la separación de los aminoácidos ocurre en forma automática pues el aparato bombea los amortiguadores de diferentes pH a través de la columna llevándose a cabo la elución de los aminoácidos. Los aminoácidos ya separados reaccionan con ninhidrina, pasan por un baño de aceite a 89 °C y desarrollan color; el cual es detectado en el colorímetro que está conectado a un registrador

que grafica el área correspondiente a cada aminoácido.

Antes de llevar a cabo el análisis de aminoácidos de las muestras debe correrse un estándar de aminoácidos de concentración conocida ya que sobre éste se basarán los cálculos. A continuación se muestran las condiciones físicas y el programa utilizado para el análisis realizado.

Condiciones físicas:

Tamaño de columna	470 x 4 mm
Altura de empaque de la columna	420 mm±5
Temperatura de la columna	60 °C
Velocidad de flujo de amortiguadores	0.6 ml/min
Velocidad de flujo de ninhidrina	0.8 ml/min
Velocidad de flujo de sulfato de hidracina	0.6ml/min
Velocidad de flujo de nitrógeno	0.32 ml/min
Velocidad de flujo sobre el colorímetro	0.6 ml/min
Temperatura del baño de reacción	89 °C±0.5
Sensibilidad del registrador	2.5U
Velocidad de la carta	3.0 mm/min

Programa:

PASO	TIEMPO	CARACTERIZACION
1	2	Amortiguador # 1; metil-celosolve.
2	6	Amortiguador # 2; metil-celosolve.
3	110	Amortiguador # 2; ninhidrina; registrador.
4	120	Amortiguador # 3; ninhidrina; registrador.
5	16	NaOH 0.2N; ninhidrina; registrador.
6	2	NaOH 0.2N; metil-celosolve; registrador
7	6	Amortiguador #1; metil-celosolve; registrador

8	10	Amortiguador # 1; metil-celolve; apaga registrador.
9	16	NaOH 0.2N; metil-celolve.
10	46	Amortiguador # 1; metil-celolve.

NOTA: En todos los pasos hay flujo de sulfato de hidrazina.

**Cálculos:**

Previamente hay que correr una solución estandar de aminoácidos que contenga 0.025  $\mu$ M de cada uno, para de cada aminograma obtener el área de cada uno de los aminoácidos.

Tanto en el estandar como en las muestras se debe incluir una cantidad constante del aminoácido sintético norleucina (estandar interno), para poder hacer los cálculos en base a los llamados equivalentes de norleucina de cada uno de los aminoácidos.

$$EN_{aa} = AN_{std} / AA_{std}$$

Donde:

$EN_{aa}$  = equivalente de norleucina del aminoácido correspondiente

$AN_{std}$  = área de norleucina en el estandar

$AA_{std}$  = área del aminoácido correspondiente en el estandar

De nuestro aminograma del hidrolizado de la muestra, calculamos el área bajo la curva de cada uno de los aminoácidos, así como el área de norleucina en el correspondiente aminograma; para lo anterior es conveniente trabajar con la mitad superior de cada uno de los picos, para evitar trabajar con la línea base que en ocasiones es demasiado irregular, así a continuación tenemos los cálculos que se deben desarrollar para cada uno de los aminoácidos, en donde se expresa su contenido en mg del aminoácido por gramo de nitrógeno de la muestra.

$$A_{aa} = B_{aa} \times H_{aa}$$

$$\text{mg aa/g N} = \frac{A_{aa} \times EN_{aa} \times \mu\text{Mstd} \times P_{Maa} \times A}{AN_m \times a \times \text{mgN}_m}$$

Donde:

$A_{aa}$  = área del aminoácido en el aminograma de la muestra

$B_{aa}$  = base a la mitad del pico

$H_{aa}$  = altura del pico desde la línea base

$EN_{aa}$  = equivalentes de norleucina del aminoácido correspondiente

$\mu\text{Mstd}$  = micromoles del aminoácido en el estándar

$P_{Maa}$  = peso molecular del aminoácido

$A$  = aforo al que se llevó el hidrolizado en ml

$AN_m$  = área de norleucina en el aminograma de la muestra

$a$  = alícuota inyectada en ml

$\text{mgN}_m$  = miligramos de nitrógeno de la muestra hidrolizada

## DETERMINACION DE TRIPOTOFANO.

**Fundamento:** Debido a que la hidrólisis ácida usada en la determinación de aminoácidos destruye completamente al triptofano, se realiza una hidrólisis alcalina empleando hidróxido de litio 4N. Los aminoácidos libres en el hidrolizado de la muestra son separados y cuantificados mediante un autoanalizador de aminoácidos.

### Material y Reactivos:

- \* Digesor TECATOR Mod. AB 20/40
- \* Vortex LAB-LINE Mod Supermixer # 1290
- \* Rotavapor BÜCHI Mod. R
- \* Potenciómetro CORNING Mod 10
- \* Autoanalizador de aminoácidos TECHNICON Mod. NC-2P
- \* Micro-jeringa HAMILTON Mod. 1001-LTN
- \* Tubos de cultivo de pared gruesa con tapón de rosca y cubierta de teflón

**PYREX No. 9826**

- \* Hidróxido de litio 4N
- \* Acido ortofosfórico concentrado (85%)
- \* Amortiguador de acetato de sodio 0.4N (a)
- \* Amortiguadores de acetatos para regeneración y elución (b)
- \* Hidróxido de sodio 0.1N (b)
- \* Metil-celosolve al 50%
- \* Sulfato de Hidrazina (c)
- \* Ninhidrina (d)
- \* Solución BRIJ-35 al 20%
- \* Solución lavadora (e)

**Preparación:**

a. Amortiguador de acetato de sodio 0.4N: Colocar aproximadamente 3 litros de agua destilada en un dispositivo de agitación, agregar lentamente 1,312 g de acetato de sodio anhidro para prevenir la cristalización, de ser necesario se puede calentar moderadamente para la completa solubilización de la sal. Una vez fría la solución, añadir 400 ml de ácido acético glacial lentamente, se deja enfriar y se afora a 4 litros.

b. Sulfato de hidrazina: Disolver en agua destilada desionizada 1.049 g de sulfato de hidrazina, adicionar 0.4 ml de ácido sulfúrico concentrado R.A. y 30 ml de solución BRIJ-35 al 20%, se lleva a un volumen de 4 litros. Para conservarla se requiere adicionar 0.8 ml de ácido caprílico como conservador.

c. Ninhidrina: Disolver 40 g de ninhidrina en 2 litros de metil-celosolve, agregar lentamente 1 litro del amortiguador de acetato de sodio 0.4N. Aforar a un volumen de 4 litros.

d. Solución lavadora: Agua-Etanol 3:1 v/v, con hidroquinona al 0.01% como agente antioxidante.

e. Amortiguadores para elución y regeneración e Hidróxido de sodio 0.2N: Los amortiguadores y la solución de hidróxido de sodio se preparan de la

misma forma que en la determinación de aminoácidos. En la tabla 1 se muestran los reactivos y las cantidades necesarias para preparar cada solución.

TABLA 1  
Preparación de amortiguadores.

REACTIVO	BUFFER 1	BUFFER 2	NaOH 0.2N
Acetato de sodio anhidro	4.1g	85.0g	
Acido acético glacial	11.8ml	15.0ml	
Solución de acetato de zinc 0.5M (110g/l)		2.0ml	
Alcohol etílico absoluto	78.0ml		
Alcohol benzílico		11.0ml	
Hidroquinona (antioxidante)	0.11g		
Solución BRIJ-35 al 20% (Merck # 1962)	8.0ml	8.0ml	
EDTA Sal disódica	0.1g		1.0g
Hidróxido de sodio (lentejas)			8.0g
Acido caprílico (conservador)	0.2ml	0.2ml	
Agua destilada desionizada (<1ppm como Na <sup>+</sup> )	1.0 l	1.0 l	1.0 l
ajuste de pH (escala expandida)	3.9±0.02	5.5±0.02	
[Na <sup>+</sup> ]	0.05M	1.036M	0.2M
[Zn <sup>++</sup> ]	0.0M	1.0x10 <sup>-3</sup> M	0.0M

BUFFER 1 Regeneración de la resina

BUFFER 2 Elución de aminoácidos de hidrolizado alcalino.

NaOH 0.2N Lavado de la resina

**Procedimiento:**

**HIDROLISIS Y PREPARACION DEL HIDROLIZADO:**

1. Dentro del tubo de hidrólisis se pesa la cantidad de muestra (A) finamente molida y desengrasada cuando el contenido de grasa sea mayor del 3%. Agregar con mucho cuidado la cantidad de álcali requerida (B) resbalando por la pared del tubo y tratando que toda la muestra se humedezca con el reactivo, de ser necesario se puede ayudar de un agitador mecánico (Vortex).

$$A = \frac{0.1 \times 100}{\%P}$$

$$B = \frac{4 \times 100}{\%P}$$

Donde:

A = cantidad de muestra en gramos

B = ml de álcali (LiOH 4N)

% P = porcentaje de proteína en la muestra

2. Se inyecta nitrógeno durante 30 segundos aproximadamente y se cierra perfectamente el tubo con el tapón de rosca y cubierta de teflón.
3. Colocar el tubo en el digestor a 145 °C; el tiempo de hidrólisis se fija en base al contenido de proteína de la muestra:

CONTENIDO DE PROTEINA	TIEMPO DE HIDROLISIS
9-35%	8 horas
35-64%	6 horas
64-91%	4 horas

4. Una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis dejar enfriar el tubo y trasvasar cuantitativamente su contenido a un vaso de precipitado, dándole algunas lavadas con agua destilada desionizada caliente y solución lavadora. De ser

posible el volumen del hidrolizado no debe sobrepasar los 40 ml.

5. Ajustar el pH del hidrolizado cerca de la neutralidad ( $6.8 \pm 0.2$ ) con ácido ortofosfórico concentrado y con ayuda del potenciómetro. Se forma un precipitado blanco.

6. Filtrar con ayuda de vacío sobre papel Whatman doble del # 2 y dar algunas lavadas al vaso con agua caliente y solución lavadora para que a su vez se lave el residuo del papel filtro. Procurar que el filtrado no sobrepase los 50 ml.

7. En caso de que el filtrado sobrepase 50 ml, transferir cuantitativamente el hidrolizado a un matraz de bola de 100 ml y eliminar el exceso de disolvente con ayuda del rotavapor. Volver a filtrar.

8. Llevar el volumen del hidrolizado a 50 ml en un matraz aforado. Cuando no se va a inyectar inmediatamente el hidrolizado se debe volver a checar al pH con el potenciómetro y ajustar a  $7.0 \pm 0.1$ , etiquetar y guardar en el congelador hasta su uso.

#### INYECCION DEL HIDROLIZADO:

1. Filtrar el hidrolizado empleando el dispositivo para filtración Millipore y una jeringa de 5 ml, descartando las primeras cinco gotas del filtrado.

2. Con la microjeringa inyectar de 100 a 200  $\mu$ l del hidrolizado en el autoanalizador de aminoácidos.

A continuación se muestran las condiciones físicas y el programa empleado en el presente análisis.

#### Condiciones físicas:

Tamaño de la columna	286 X 5 mm
Altura y empaqueo de la resina C-3	250 $\pm$ 5 mm
Temperatura de la columna	55 $\pm$ 0.5 °C
Velocidad de flujo de los buffers	0.62 ml/min
Velocidad de flujo ninhidrina	0.80 ml/min

Velocidad de flujo sulfato de hidrazina	0.60 ml/min
Velocidad de flujo sobre el colorímetro	0.60 ml/min
Velocidad de flujo de nitrógeno	0.32 ml/min
Temperatura del baño de reacción	89±0.5 °C
Sensibilidad del registrador	2.5U
Velocidad de la carta	3.0 mm/min

**Programa:**

PASO	TIEMPO	CARACTERIZACION
1	2 min	Buffer 1; metil-celosolve
2	6 min	Buffer 2; metil-celosolve
3	30 min	Buffer 2; ninhidrina; enciende colorímetro
4	30 min	Buffer 2; ninhidrina
5	14 min	NaOH; ninhidrina
6	2 min	NaOH; metil-celosolve
7	6 min	Buffer 1; metil-celosolve
8	2 min	Buffer 1; metil-celosolve; apaga colorímetro
9	6 min	NaOH; metil-celosolve
10	16 min	Buffer 1; metil-celosolve

Con las condiciones anteriores el triptofano eluye aproximadamente a los 45 min después de la inyección, saliendo entre los picos de amoniaco (NH<sub>4</sub>) y arginina.

**Cálculos:**

Previamente se debe correr una solución estandar de aminoácidos que contenga 0.025 µM de triptofano, para de esta poder calcular la correspondiente área que nos servirá como referencia.

Del aminograma de la muestra calculamos el área bajo la curva del pico de triptofano; para esto es conveniente trabajar con la mitad superior del pico

para así eliminar la línea base que en ocasiones es muy irregular.

$$A_m = B \times h$$

$$\text{mg try/g N} = \frac{A_m \times \mu\text{Mstd} \times \text{P.M.} \times A}{A_{\text{std}} \times a \times \text{gN} \times 10^3}$$

Donde:

$A_m$  = área de triptofano de la muestra

$B$  = base a la mitad del pico

$h$  = altura del pico desde la línea base

$A_{\text{std}}$  = área de triptofano del estandar

$\mu\text{Mstd}$  = micromoles de triptofano del estandar

P.M. = peso molecular del triptofano

$A$  = aforo del hidrolizado

$a$  = alícuota que se inyecta en ml

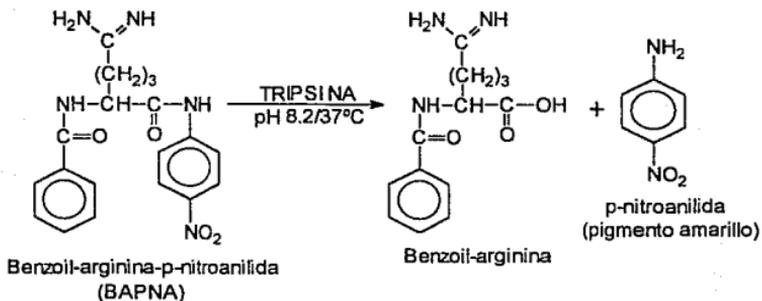
$\text{gN}$  = gramos de nitrógeno de la muestra hidrolizada

## COMPONENTES ANTINUTRICIONALES Y TOXICOS

### INHIBIDORES DE TRIPSINA.

**Fundamento:** La técnica se basa en poner en contacto el extracto acuoso directo o diluido de una muestra con una solución estandar de Tripsina (40  $\mu\text{g}/10$  ml) posteriormente se determina la actividad proteolítica remanente usando un sustrato sintético (Benzoil-arginina-p-nitroanilida [BAPNA]), el cual producirá coloración que es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de Tripsina y que se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm.

La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



### Material y Reactivos:

- \*Potenciómetro CORNING Mod. 10
- \* Parrilla con agitación magnética THERMOLYNE Mod. sp-13025
- \* Baño maría GRANT Mod. SE10
- \* Espectrofotómetro SEQUOIA TURNER Mod.340
- \* Mezclador de tubos LAB-LINE Mod. Super-mixer
- \* NaOH 0.01N
- \* Solución amortiguadora de TRIS pH 8.2 y 0.05M (a)
- \* Solución BAPNA (b)
- \* Acido acético al 30%
- \* Solución estandar de tripsina (c)
- \* HCl 0.001N

### Preparación:

a. Solución amortiguadora Tris (hidroximetil-amino-metano): pesar 6.05 g de tris y 2.94 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , disolverlos en 900 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8.2 y aforar a 1 litro.

b. Solución de benzoil-arginina-p-nitroanilida (BAPNA): disolver 100 mg de BAPNA en 2.5 ml de dimetil-sulfóxido, la disolución es más rápida si se calienta en baño de agua a  $37^\circ\text{C}$ , se afora a 250 ml con amortiguador Tris previamente calentado a  $37^\circ\text{C}$ . Esta solución se prepara el mismo día de su

uso y se mantiene a 37 °C.

c. Solución estandar de Tripsina: pesar con mucha exactitud 4 mg de tripsina bovina (SIGMA T-8253) y se disuelven en 200 ml de HCl 0.001N. Esta solución contiene 20 µg de tripsina/ml y debe ser almacenada en refrigeración donde puede durar de 2 a 3 semanas sin pérdida apreciable de actividad.

**Procedimiento:**

**PREPARACION DEL EXTRACTO:**

1. Pesar 1 gramo de muestra (finamente molida y desengrasada cuando el contenido de grasa sea superior al 5%) en un vaso de precipitado; adicionar 45 ml de NaOH 0.01N, ajustar el pH de la suspensión a  $9.6 \pm 0.2$  y aforar a 50 ml con NaOH 0.01N.
2. Transferir a un vaso de precipitados y agitar mecánicamente en la parrilla de agitación por espacio de 2 horas y media a 300 r.p.m. Después de dicho tiempo retirar el magneto y dejar reposar el extracto durante media hora.
3. Decantar el sobrenadante y eliminar el residuo insoluble. El sobrenadante debe ser diluido de tal manera que 1 ml del extracto produzca una inhibición entre 40 y 60%, esto ayuda a reducir la desviación estandar.

**DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD:**

1. Preparar 10 tubos de ensayo como se muestra en el cuadro 1. Agregar la cantidad especificada del extracto diluido o directo por duplicado y ajustar el volumen final de cada tubo a 2.0 ml con agua destilada.
2. Adicionar a todos los tubos 2 ml de tripsina a 37 °C agitando cada tubo con el vortex. A los blancos se les adiciona además 1 ml de ácido acético para detener la reacción.
3. Colocar todos los tubos en el baño de agua a 37 °C y dejar incubar durante 10 min para que entren en contacto inhibitor y enzima.
4. Adicionar a cada tubo 5 ml de solución de BAPNA a 37 °C y volver a colocar

los tubos en el baño de agua para incubarlos durante 10 min. Debe controlarse estrictamente el tiempo sobre todo después de adicionar el BAPNA para lo cual puede emplearse un cronómetro.

5. Detener la reacción enzimática añadiendo 1 ml de ácido acético a cada tubo a excepción de los blancos a los cuales ya se les había adicionado.

6. Es frecuente la formación de precipitado o el enturbiamiento de la mezcla de reacción por lo que se deja reposar durante 15 min y después se filtra primero el sobrenadante y posteriormente la porción residual a través de papel Whatman #

1. El filtrado deberá estar translúcido.

A continuación se muestra el cuadro 1 que permite observar en forma esquemática la serie de tubos para la determinación de actividad inhibitoria.

CUADRO 1

Tubo	ml Ext.	ml H <sub>2</sub> O	ml Std. Tripsina	<u>5 min</u> →	ml BAPNA 37°C	<u>10 min</u> → ácido acético 30% (Aac)
B1	1.8	0.2	2.0+1.0 ml Aac*		5.0	0.0
1	1.8	0.2	2.0		5.0	1.0
B2	1.4	0.6	2.0+1.0 ml Aac*		5.0	0.0
2	1.4	0.6	2.0		5.0	1.0
B3	1.0	1.0	2.0+1.0 ml Aac*		5.0	0.0
3	1.0	1.0	2.0		5.0	1.0
B4	0.6	1.4	2.0+1.0 ml Aac*		5.0	0.0
4	0.6	1.4	2.0		5.0	1.0
BR	0.0	2.0	2.0+1.0 ml Aac*		5.0	0.0
R	0.0	2.0	2.0		5.0	1.0

\* A los blancos les adiciona enseguida 1 ml de ácido acético 30%.

7. La lectura de cada tubo se realiza en el espectrofotómetro a 410 nm en el espectro visible. Previamente se debe ir ajustando a 100% de transmitancia con el respectivo blanco de cada dilución. Es importante remarcar que el tubo que contiene 0.0 ml de extracto (40 µg tripsina/10 ml) es nuestra referencia y sobre este tubo se basarán los cálculos.

NOTA: Es importante trabajar cada tubo con su blanco porque en ocasiones se arrastran coloraciones del extracto directo provocando interferencias en el momento de leer en el espectrofotómetro, de este modo mediante el blanco se hace una corrección.

**Cálculos:**

Una unidad de tripsina (U.T.) es arbitrariamente definida como un incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm por 10 ml de mezcla de reacción descritas por Kakade y colaboradores. La actividad de los inhibidores de Tripsina se expresa en términos de Unidades de Tripsina Inhibida (U.T.I.). La lectura de absorbancia (A), puede ser transformada directamente en unidades de tripsina:

$$U.T. = A \times 100$$

Ya que se tiene una serie de alícuotas, se tendrán a su vez una serie de valores de U.T., es conveniente determinar el % de inhibición para lo cual se toma como referencia el tubo 3 que es el que contiene 1 ml de extracto. Si el % de inhibición no cae dentro del rango de 40 al 60% de inhibición es necesario hacer un ajuste del extracto para que cumpla este requisito.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{R - A_3}{m} \times 100$$

Donde:

R = U.T. de la referencia

A3 = U.T. del tubo 3

m = peso de la muestra en gramos

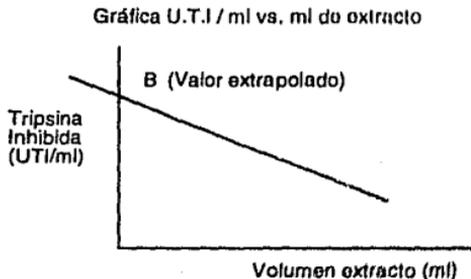
Para obtener los valores correspondientes de U.T.I. se restan los valores de U.T. al dato de referencia y posteriormente se puede calcular el valor de U.T.I./ml de cada una de las alícuotas.

$$U.T.I. = R - U.T.$$

Donde:

R = Valor de unidades de tripsina de la referencia

Cuando se grafica la actividad enzimática inhibitoria (U.T.I./ml) vs. ml de extracto de prueba, se observa una correlación lineal negativa de donde se puede obtener el valor extrapolado que corresponde al valor cero de la solución inhibitoria.



Este valor extrapolado, es el valor más cercano a la actividad inhibitoria real o verdadera (si se refiere uno al inhibidor de soya del tipo Kunitz).

Si la correlación lineal no es satisfactoria ( $r < 0.9$ ), se puede trabajar con un valor promedio de la serie de alícuotas y reportar en U.T.I./ml.

$$U.T.I./ml = UTI / ml \text{ de extracto}$$

Es conveniente reportar en unidades de tripsina inhibida con respecto a 1 mg de muestra:

$$U.T.I./mg \text{ muestra} = B \times F \times \frac{50}{1000}$$

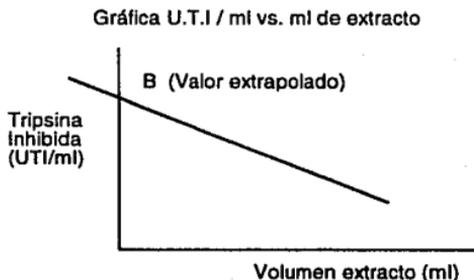
Para obtener los valores correspondientes de U.T.I. se restan los valores de U.T. al dato de referencia y posteriormente se puede calcular el valor de U.T.I./ml de cada una de las alícuotas.

$$U.T.I. = R - U.T.$$

Donde:

R = Valor de unidades de tripsina de la referencia

Cuando se grafica la actividad enzimática inhibitoria (U.T.I./ml) vs. ml de extracto de prueba, se observa una correlación lineal negativa de donde se puede obtener el valor extrapolado que corresponde al valor cero de la solución inhibitoria.



Este valor extrapolado, es el valor más cercano a la actividad inhibitoria real o verdadera (si se refiere uno al inhibidor de soya del tipo Kunitz).

Si la correlación lineal no es satisfactoria ( $r < 0.9$ ), se puede trabajar con un valor promedio de la serie de alícuotas y reportar en U.T.I./ml.

$$U.T.I./ml = UTI / ml \text{ de extracto}$$

Es conveniente reportar en unidades de tripsina inhibitoria con respecto a 1 mg de muestra:

$$U.T.I./mg \text{ muestra} = B \times F \times \frac{50}{1000}$$

Donde:

B = valor extrapolado o promedio en U.T.I./ ml

F = Factor de dilución, el cual depende de la(s) dilución(es) realizada(s).

Cuando se tiene el extracto directo  $F=1$ .

## **HEMAGLUTININAS**

### **DETERMINACION SEMICUANTITATIVA**

**Fundamento:** La determinación se basa en el poder aglutinante que tienen ciertos componentes de naturaleza protéica hacia los eritrocitos. Se emplea la técnica de microtitulación basada en una serie de diluciones donde el punto final de aglutinación se determina mediante una estimación visual, para ello se requiere que los eritrocitos sean sensibilizados mediante una proteasa. En el presente estudio se llevó a cabo la determinación semicuantitativa de hemaglutininas con eritrocitos de hamster y con eritrocitos de vaca.

#### **Material y Reactivos:**

- \* Agitador magnético con tacómetro THERMOLYNE
- \* Centrífuga DYNAC
- \* Tubos de centrífuga de 15 ml graduados PYREX
- \* Incubadora BLUE-M
- \* Espectrofotómetro COLEMAN Mod Junior IIA
- \* Adaptador para celdas de 10 x 75 mm con abertura de 1 cm<sup>2</sup>
- \* Filtro de vidrio de poro grueso
- \* Microdilutor de 50  $\mu$ l MICROTITER KIT (Cook Eng-Alexander Virginia USA)
- \* Pipeteador de gota de 50  $\mu$ l DYNATECH
- \* Placas para aglutinación tipo V
- \* Pipeta automática de 12 canales LABSYSTEMS
- \* Sangre de hamster sensibilizada
- \* Sangre de vaca sensibilizada
- \* Solución salina al 1%
- \* Solución salina al 0.9%
- \* Solución anticoagulante (a)

- \* Solución de proteasa al 0.1% en solución salina (b)
- \* Tripsina de pancreas porcino SIGMA T-8128
- \* Pronasa de S. griseus SIGMA P-5005

**Preparación:**

a. Cuando la sangre se use de inmediato, se puede usar como anticoagulantes la heparina o citrato en las siguientes concentraciones:

15-20 UI de heparina por mililitro de sangre

0.1 ml de solución de citrato por ml de sangre

Si la sangre no se va a usar de inmediato y se desea conservar en refrigeración por unos días, lo más conveniente es emplear la solución ALSEVER como anticoagulante en proporción 1:1. Esta solución es muy recomendable para mantener la sangre de vaca.

b. En términos generales se usa tripsina al 0.1% en solución salina, para el proceso de sensibilización; sin embargo, cuando se emplea sangre de cualquier roedor (hamster, ratón, rata, etc.) se recomienda sensibilizar con pronasa al 0.2% en solución salina.

**Procedimiento:**

**PREPARACION DEL EXTRACTO DE LA MUESTRA:**

1. Suspender 1 g de muestra finamente molida y desengrasada (cuando sea necesario) en 10 ml de solución salina al 1%.
2. Extraer por agitación mecánica durante 2 horas a 300 r.p.m. a temperatura ambiente.
3. Centrifugar el extracto a 1,400 r.p.m. durante 15 minutos para eliminar el residuo insoluble.
4. Filtrar el sobrenadante a través del filtro de vidrio de poro grueso, si es necesario se lava el residuo con solución salina al 1%.
5. Aforar el filtrado a 10 ml con solución salina al 1%.

#### **PREPARACION DE LA SANGRE:**

1. Una vez sangrado el animal, colocar la sangre en un matraz pequeño que contenga la solución anticoagulante, homogenizar suavemente.
2. Trasvasar la sangre con anticoagulante a tubos de centrifuga; lavar y centrifugar a 1,500 r.p.m. durante 10 minutos, 3 veces con solución salina al 0.9%. La relación sangre:solución salina es 1:5 aproximadamente. Si la sangre no está muy hemolizada es suficiente realizar dos lavados (el sobrenadante debe ser incoloro).
3. Después del último lavado, medir en el tubo de centrifuga la cantidad de paquete de eritrocitos y diluirlos al 4%, para lo cual se deben agregar 24 ml de solución salina al 0.9% por cada 1.0 ml de globulos rojos.

#### **SENSIBILIZACION DE LOS GLOBULOS ROJOS:**

1. Por cada 10 ml de suspensión de globulos rojos al 4% agregar 1 ml de solución de proteasa (para sangre de hamster se emplea pronasa al 0.2% y para sangre de vaca se emplea tripsina al 0.1%) y colocarlos en la incubadora a 37 °C durante 1 hora.
2. Centrifugar para eliminar la enzima sobrenadante y dar 3 lavados con solución salina al 0.9% centrifugando a 1,500 r.p.m. durante 10 minutos. Es importante realizar los tres lavados para eliminar completamente la enzima.
3. Después del último lavado resuspender el paquete de eritrocitos; por cada 1.0 ml de paquete de eritrocitos sensibilizados se agregan 19 ml de solución salina al 0.9% (la suspensión queda al 5%). Cuando se observa que la sangre tiene algunos coagulos, es necesario filtrar a través de gasa en un embudo de tallo corto.

#### **AJUSTE DE LA SUSPENSION DE ERITROCITOS:**

1. Tomar 1 ml de la suspensión de globulos rojos sensibilizados y agregar 4 ml de solución salina al 0.9%, mezclar. Se lee en el espectrofotómetro a 620 nm;

se ajusta a 100% de transmitancia usando solución salina al 0.9% como blanco.

2. Diluir la suspensión hasta que la lectura sea de  $25\% \pm 1$  de transmitancia. Al final la suspensión debe quedar al 4% y dar dicha lectura de transmitancia en el espectrofotómetro a 620 nm.

#### PREPARACION DE LAS PLACAS.

1. Con ayuda de la pipeta automática de 12 canales depositar 50  $\mu$ l de solución salina al 0.9% en cada pozo de las placas tipo V del microtiter, evitando tocar las paredes de los pozos.

2. Con un microdilutor tomar 50  $\mu$ l del extracto de la muestra, se introduce en el pozo sin tocar las paredes y se gira, se saca del pozo y se introduce en el pozo siguiente de tal forma que se van llevando a cabo las diluciones del extracto. Se recomienda checar que el volumen que toma el microdilutor sea el adecuado para lo cual se emplea una placa de prueba.

3. Con el pipeteador de gota se adicionan 50  $\mu$ l (una gota) de eritrocitos sensibilizados en cada pozo, se rota la placa en forma circular y se incuba a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora.

#### LECTURA

Transcurrido el tiempo, colocar la placa en el dispositivo de lectura teniendo cuidado de no agitar la placa. Se observa a través del espejo el fondo de los pozos de cada hilera de prueba. Se considera positivo aquel pozo que presente una difusión de eritrocitos en todo el pozo (aglutinación) y negativo aquel pozo donde se observe sedimentación de eritrocitos en el centro. Se reporta la máxima dilución donde se presenta aglutinación (título).

## **SAPONINAS**

### **DETERMINACION SEMICUANTITATIVA**

**Fundamento:** La determinación está basada en el aprovechamiento de la capacidad hemolítica de las saponinas sobre eritrocitos de hamster. Se emplea un método de microtitulación (como en la determinación de hemaglutininas) en el cual se pone en contacto un extracto metanólico de la muestra, resuspendido en solución salina, con los eritrocitos sensibilizados.

### **MATERIAL Y REACTIVOS**

- \* Equipo para extracción de grasas Goldfish LABCONCO
- \* Vasos de borde esmerilado KIMAX
- \* Rotavapor BÜCHI Mod R
- \* Incubadora BLUE-M
- \* Centrífuga DYNATECH
- \* Tubos para centrífuga de 15 ml graduados PYREX
- \* Placas para hemólisis tipo U
- \* Pipeta automática de 12 canales LABSYSTEMS
- \* Microdilutores de 50  $\mu$ l MICROTITER KIT (Cook Eng-Alexander Virginia USA)
- \* Pipeteadores de gota de 50  $\mu$ l DYNATECH
- \* Eter de petróleo R.A.
- \* Mezcla metanol-agua 85:15
- \* Solución salina al 0.9%
- \* Eritrocitos de hamster sensibilizados (a)
- \* Pronasa al 0.2% (Pronasa de *S. griseus* SIGMA P-5005) en solución salina al 0.9%
- \* Solución estandar de saponinas (saponina de quillaja BDH y digitonina SIGMA) (b)

### **Preparación:**

a. La preparación de la sangre de hamster se lleva a cabo de la misma forma que en la determinación de hemaglutininas, empleando pronasa al 0.2% para la sensibilización de los eritrocitos.

b. Solución estandar de saponinas: preparar una solución de saponinas

al 0.5% en solución salina 0.9% empleando una mezcla 1:1 de sapoina de quillaja y digitonina.

#### **Procedimiento:**

##### **PREPARACION DE LA MUESTRA**

1. Pesar 7.5 g de muestra en un cartucho de celulosa. Colocar el cartucho en el extractor de grasas Goldfish y desengrasar con éter de petróleo (igual que en la determinación de grasa cruda).

##### **EXTRACCION DE SAPONINAS**

1. Sobre la muestra desengrasada y empleando el mismo extractor Goldfish, se lleva a cabo una extracción con 50ml de mezcla metanol-agua 85:15 durante 2 horas y colocando el control de temperatura en high. Debe emplearse un vaso de borde esmerilado limpio.

2. El extracto metanólico se transfiere del vaso a un matraz bola de 100 ml y se concentra con el rotavapor hasta sequedad. Es importante eliminar todo el metanol.

3. Resuspender el residuo del matraz bola con solución salina al 0.9%. Filtrar a través de papel Whatman No. 4 y aforar el filtrado a 100 ml con solución salina al 0.9%.

##### **PREPARACION DE LAS PLACAS**

Las placas tipo U se preparan de la misma manera como se preparan las placas para la determinación de hemaglutininas. En cada placa se aplica en una hilera del estándar de saponinas como control positivo, de la misma forma como se aplica el extracto de las muestras; y se siguen los mismos pasos hasta la incubación a 37°C durante 1 hora.

##### **LECTURA**

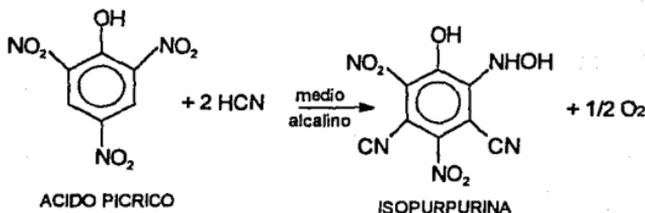
Transcurrido el tiempo de incubación se colocan las placas en el dispositivo para lectura, se consideran positivos aquellos pozos que se observen

translúcidos (hemólisis) y negativos aquellos pozos en los que se presente un punto rojo en el centro indicando la sedimentación de los eritrocitos.

Por definición: 1 Unidad de hemólisis (U.H.) equivale a 0.1  $\mu\text{g}$  del estandar, que es el límite de detección para la sangre empleada; de tal manera que pueden expresarse los resultados en base a U.H. dependiendo del título obtenido para cada muestra.

### GLUCOSIDOS CIANOGENICOS

**Fundamento:** El presente método aprovecha la reacción sensible y específica de Guignard, la cual es ampliamente utilizada en pruebas cualitativas para la detección tanto de glucósidos cianogénicos como del propio HCN. Para cuantificar el HCN total que potencialmente puede ser liberado se hace uso de una hidrólisis enzimática (por medio de una  $\beta$ -glucosidasa) del correspondiente glucósido cianogénico, el HCN liberado reacciona con el ácido pícrico formando la isopurpurina de color café rojizo, el color es directamente proporcional al contenido de glucósidos cianogénicos en la muestra.



### MATERIAL Y REACTIVOS

- \* Baño de agua con agitación LAB-LINE
- \* Incubadora BLUE-M
- \* Congelador comercial

- \* Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER Mod 340
- \* Tubos de cultivo con tapón de rosca PYREX No. 9826
- \* Solución de  $\beta$ -glucosidasa SIGMA G-8625 con activador (a)
- \* Solución de picrato de sodio alcalinizada (b)
- \* Papel indicador de HCN (c)
- \* Solución estandar de HCN equivalente a 100  $\mu$ g de HCN/ml (24.1mgKCN/100 ml)
- \* HCl 0.5N
- \* Amortiguador de fosfatos pH=7.0 (d)
- \* Fécula de maíz comercial.

**Preparación:**

a. Solución de  $\beta$ -glucosidasa con activador: pesar 0.25 g de  $\beta$ -glucosidasa y disolverlos en buffer de fosfatos pH=7.0, agitando con cuidado para evitar la formación de espuma. Una vez disuelta la enzima se agregan 1.7 g de  $\text{NaNO}_3$  que actúa como activador de dicha enzima, aforar a 250 ml con buffer pH 7.0. La concentración final es de 1 mg de  $\beta$ -glucosidasa /ml y 0.08 M de  $\text{NaNO}_3$ .

b. Solución de picrato de sodio alcalinizada: pesar 2.5 g de ácido pícrico y disolverlos en agua destilada, agregar 12.5 g de carbonato de sodio, agitar hasta su disolución, aforar a 500 ml con agua destilada.

c. Papel indicador de HCN: sumergir papel Whatman No. 2 en una solución de picrato de sodio alcalinizada (b), escurrir y secar en estufa a una temperatura de 55-60°C durante 30 minutos. Cuando esté seco, cortar tiras de 2x10 cm.

d. Amortiguador de fosfatos pH=7.0: se preparan dos soluciones como se indica a continuación:

A: Solución de fosfato de sodio monobásico 0.2 M (27.8 g en 1 l)

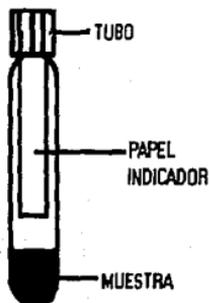
B: Solución de fosfato de sodio dibásico 0.2 M (53.65 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ó 71.7 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  en 1l)

Mezclar 39 ml de A y 61 ml de B y aforarlo a 200 ml. Finalmente se ajusta el pH a 7.0 empleando el potenciómetro.

**Procedimiento:**

**LIBERACION DEL HCN DE LA MUESTRA**

1. Pesar de 20 a 500 mg de muestra finamente molida en un tubo de cultivo Pyrex. Si no se tiene información sobre el contenido de glucósidos cianogénicos en la muestra se pesan 500 mg. El ensayo se hace por duplicado.
2. Adicionar 5 ml de solución de  $\beta$ -glucosidasa (fría) procurando humedecer toda la muestra. Homogenizar.
3. Colocar la tira de papel indicador humedecida (aproximadamente con 8 gotas de agua) en la boca del tubo sin tocar las paredes y cerrar herméticamente con el tapón de rosca. (FIG.1)



**FIG.1**

4. Colocar los tubos en el baño de agua que ya debe estar a una temperatura de 40 °C y con el control de velocidad de agitación ajustado a 3.5 por espacio de 4 horas.
5. Transcurrido el tiempo, colocar los tubos en el congelador durante 30 minutos.

6. Sacar los tubos del congelador y destapar para adicionar 1 ml de HCl 0.5N (frío). Volver a tapar los tubos. Homogenizar teniendo la precaución de que el líquido no toque el papel indicador. Si se usan los tapones adecuados, la tira de papel quedará adherida al tapón y no se presentarán problemas de manipulación.

7. Colocar los tubos en la incubadora por espacio de 30 minutos a 60 °C. Transcurrido el tiempo sacarlos y en ese momento se puede realizar visualmente la detección cualitativa. Aquellos tubos que presenten una coloración café-rojiza se consideran positivos y se procederá a realizar la cuantificación. Los tubos que no presenten coloración se consideran negativos. De manera simultánea se corre un blanco (todos los reactivos sin la muestra) y una curva estandar.

#### PREPARACION DE LA CURVA ESTANDAR

1. Para simular la interacción muestra-HCN liberado se emplea fécula de maíz; se pesa en cada tubo 500 mg de fécula de maíz.

2. Se adiciona a cada tubo los ml correspondientes de solución estandar de KCN y en seguida 5 ml de amortiguador de pH 7.0, procurando humedecer la fécula.

3. Se colocan las tiras de papel indicador como se describió anteriormente y se trabajan en la misma forma que para la liberación de HCN de la muestra.

En el cuadro 1 se muestra la forma de preparar los tubos. La curva estandar va de 5 a 60  $\mu\text{g}$  de HCN, ya que fué el rango óptimo encontrado en la respuesta concentración de HCN vs. D.O. ( $r=0.99$ ) en donde se cumple la ley de Lambert-Beer.

## TUBOS PARA LA CURVA ESTANDAR

Cuadro 1

ml de solución estandar	fécula de maíz (mg)	ml buffer pH 7.0	<u>4 hrs</u> → <u>40 °C</u> →	HCl 0.5N (frío)	[HCN] µg
0.0	500	5.0		1.0	0
0.05	500	5.0		1.0	5.0
0.10	500	5.0		1.0	10.0
0.20	500	5.0		1.0	20.0
0.30	500	5.0		1.0	30.0
0.40	500	5.0		1.0	40.0
0.50	500	5.0		1.0	50.0
0.60	500	5.0		1.0	60.0

### DETERMINACION CUANTITATIVA.

1. Extraer con cuidado la tira de papel indicador y colocarla en otro tubo de cultivo con tapón de rosca, adicionar 20 ml de agua destilada (medidos con bureta), tapar y agitar vigorosamente para extraer el pigmento del papel (isopurpurina).
2. Filtrar el contenido del tubo para separar los residuos de papel. En caso de que éstos presenten aún coloración se puede hacer otra extracción con 20 ml de agua destilada, filtrando y reuniendo el filtrado con el de la primera extracción.
3. El filtrado se transfiere a una celda para su lectura en el espectrofotómetro previamente ajustado a 100% T con el blanco a 520 nm. La curva estandar se lee de igual forma solo que en este caso el blanco corresponde al tubo que tiene 0.0 ml de solución estandar de KCN.

## Cálculos

Transformar las lecturas de % de Transmitancia a % de Absorbancia:

$$A = \log \frac{1}{\%T/100}$$

Trazar la gráfica de A vs.  $\mu\text{g}$  de HCN con los datos de la curva estandar e interpolar los valores de % A de las muestras para obtener los respectivos  $\mu\text{g}$  de HCN o de acuerdo a la ecuación de la regresión lineal el correspondiente contenido de HCN puede ser calculado.

$$\text{mg HCN} / 100 \text{ g de muestra} = \frac{X \times D \times 100}{m}$$

Donde:

X=  $\mu\text{g}$  de HCN

D=número de veces que se adicionaron 20 ml de agua (dilución)

m= mg de muestra

## ALCALOIDES

### DETERMINACION CUALITATIVA.

**Fundamento:** La determinación está basada en la extracción de los alcaloides con metanol y la posterior acidificación del extracto para después someterlo a un ensayo con 7 reactivos para alcaloides. El precipitado formado con los reactivos varía en cantidad con los diferentes alcaloides por lo que puede hacerse una estimación aproximada de la concentración de alcaloides.

### MATERIAL Y REACTIVOS

- \* Rotavapor BÜCHI Mod R
- \* Matraces bola de 100 ml PYREX
- \* Papel filtro Whatman No 4
- \* Parrilla de agitación CORNING Mod PC-351
- \* Estufa de vacío LAB-LINE
- \* Acido nítrico 30% o  $\delta=1.180$

- \* Acido sulfúrico 1%
- \* Acido silicotungsténico ( $4\text{H}_2\text{O}\cdot\text{SO}_2\cdot 12\text{WO}_2\cdot 22\text{H}_2\text{O}$ )
- \* Metanol R.A.
- \* Sulfato de sodio anhidro
- \* Reactivo de Mayer (a)
- \* Reactivo de Wagener (b)
- \* Reactivo de Dragendorff (c)
- \* Reactivo de Sonnenschein (d)
- \* Reactivo de Hager (e)
- \* Reactivo de Scheibler (f)
- \* Reactivo de Acido Silicotungsténico (g)

### Preparación

a. Reactivo de Mayer: disolver 1.36 g de  $\text{HgCl}_2$  en 60 ml de agua y aparte disolver 5.0 g de KI en 10 ml de agua. Reunir las dos soluciones y aforar a 100 ml con agua destilada

b. Reactivo de Wagner: disolver 1.27 g de yodo (resublimado) y 2 g de KI en 20 ml de agua; aforar a 100 ml con agua destilada.

c. Reactivo de Dragendorff: disolver 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 ml de  $\text{HNO}_3$  al 30% ( $d=1.18$ ) y 27.2 g de KI en 50 ml de agua. Se mezclan las 2 soluciones y se deja reposar 24 horas. Decantar y aforar a 100 ml con agua destilada.

d. Reactivo de Sonnenschein: a 100 ml de solución caliente de molibdato de amonio (43g en 100 ml de agua), adicionar 100 ml de una solución caliente de fosfato dibásico de sodio anhidro (10 g en 100 ml de agua); a esta solución clara adicionar 10 ml de ácido nítrico concentrado; se forma un precipitado amarillo, dejar reposar 1 hora. Eliminar el líquido sobrenadante, resuspender el precipitado en 50 ml de agua destilada y calentar. Cuando ya está caliente, se le agregan 100 ml de solución caliente de carbonato de sodio anhidro (28 g en 100 ml de agua), se forma una solución clara que se trasvasa a una cápsula de

porcelana y se evapora a sequedad; flamear con un mechero bunsen la superficie del polvo hasta que se encienda para evaporar las sales de amonio. El polvo se pesa en un vaso de precipitados (deben obtenerse aproximadamente 30 g). y disolverlo en 200 ml de agua destilada caliente, calentar y adicionar 50 ml de ácido nítrico concentrado. Aforar a 300 ml con agua destilada. Se obtiene una solución clara amarilla de ácido fosfomolibdico.

e. Reactivo de Hager: preparar una solución saturada de ácido pícrico, esto es: 2.0 g en 100 ml de agua.

f. Reactivo de Scheibler: disolver 10 g de tungstato de sodio y 7 g de fosfato disódico en 50 ml de agua. Acidular la solución con ácido nítrico.

g. Reactivo de Acido Silicotungsténico: disolver 5.0 g de ácido silicotungsténico en la cantidad necesaria de ácido sulfúrico 6N para preparar 100 ml de solución.

#### **Procedimiento**

1. Pesar de 2 a 4 g de muestra seca y molida, adicionar 40 ml de metanol, agitar y dejarla toda la noche.
2. Al día siguiente calentar durante 4 horas a 50 °C en baño de agua con agitación interrumpida.
3. Filtrar el extracto y lavar el residuo con 20 ml de metanol. Transferir el filtrado a un matraz bola de 100 ml y con ayuda del rotavapor evaporar el metanol hasta sequedad.
4. Resuspender el residuo con 2 ml de metanol y 12 ml de HCl al 1%, agitar.
5. Repartir el residuo resuspendido en 7 porciones empleando una pipeta Pasteur y ensayar cada porción con cada uno de los reactivos de alcaloides, a continuación se presenta un cuadro de los reactivos y el precipitado característico que forman al ponerse en contacto con soluciones aciduladas que contienen alcaloides.

REACTIVO	PRECIPITADO
Mayer	pp blanco
Wagner	pp floculento color marrón.
Dragendorff	pp anaranjado-marrón.
Sonnenchein	pp amarillo
Hager	pp amarillo.
Scheibler	pp blanco-grisáceo
Acido Silicotungsténico	pp blanco-grisáceo

Se considera que una muestra contiene alcaloides cuando su extracto da prueba positiva (forman precipitado) con los 7 reactivos de alcaloides. Debe mencionarse que en el reactivo de Hager (ácido pícrico) es de baja sensibilidad, por lo tanto cuando da prueba negativa mientras todas las demás son positivas, puede descartarse y debe considerarse positiva la presencia de alcaloides en la muestra.

## RESULTADOS Y DISCUSION.

Los resultados del análisis proximal en base seca de los frijoles silvestres y cultivados se muestran en la Tabla 1. Se observa que tanto los frijoles silvestres como los cultivados presentan valores de proteína que caen dentro del rango para leguminosas que es del 18 al 25%. Los frijoles silvestres presentan un contenido de proteína interesante (promedio=25.5%) mostrando marcada superioridad sobre los frijoles cultivados (promedio=21.7%); así mismo los frijoles silvestres superan a los frijoles cultivados en contenidos de fibra cruda y cenizas, mientras que los frijoles cultivados presentan mayor contenido de nutrimentos energéticos como son grasa y carbohidratos. En ambos grupos de frijoles, el contenido de grasa es muy pequeño y sólo el frijol Flor de mayo presentó un contenido superior al 1%. El contenido promedio de humedad para los frijoles silvestres fué de 7.6% y para los frijoles cultivados fué de 6.9%.

En todos los nutrimentos mencionados en el análisis proximal se encontró diferencia estadísticamente significativa entre frijoles silvestres y cultivados como se muestra en los resultados del análisis estadístico (Tabla 7). En la figura 1 se muestran más claramente las diferencias observadas en contenido de nutrimentos entre ambos grupos de frijol.

En la Tabla 2 se muestran los resultados de la determinación de proteína verdadera. Los frijoles silvestres mostraron nuevamente, mayores contenidos de proteína verdadera y al relacionar este resultado con el contenido de proteína cruda se encontró que los frijoles silvestres presentan una variación muy pequeña, mientras que los frijoles cultivados presentan variaciones mayores. Dado que las determinaciones de proteína se basan en la cuantificación de nitrógeno en la muestra, como ya se ha mencionado, los resultados indican que en los frijoles silvestres el contenido de nitrógeno total correlaciona aceptablemente con el contenido de proteína, mientras que en los cultivados no

todo el nitrógeno pertenece a las proteínas.

El análisis estadístico (Tabla 7) demostró que existe diferencia significativa en los contenidos de proteína verdadera entre los frijoles silvestres y los cultivados. En la figura 2 se presentan gráficamente las diferencias entre ambos grupos de frijoles en cuanto al contenido de proteína verdadera.

Los resultados del análisis de aminoácidos se muestran en las tablas 3 (aminoácidos dispensables) y 4 (aminoácidos indispensables). Como se puede observar en la Tabla 3, los frijoles cultivados presentan mayores contenidos de todos los aminoácidos dispensables, notándose mayor diferencia en los aminoácidos de reserva (ácido aspártico y ácido glutámico), prolina y tirosina, aunque el análisis estadístico (Tabla 8) indica que solo existe diferencia significativa entre frijoles silvestres y cultivados en el contenido de ácido aspártico, glicina y tirosina. En cuanto al ácido glutámico, se observó una desviación estandar elevada lo cual explica el que no se encuentre diferencia significativa. La figura 4 presenta en forma gráfica los contenidos de aminoácidos dispensables en los que se observó diferencia significativa para frijoles silvestres y cultivados.

En cuanto a los aminoácidos indispensables, los resultados se presentan en la tabla 4 en donde además se hace una comparación con el Patrón FAO (1973) de composición de aminoácidos. Como se puede observar los frijoles cultivados presentaron mayores contenidos de todos los aminoácidos indispensables y solo valina y el total de azufrados no superaron al Patrón FAO. Para los frijoles silvestres se observa que solo leucina, triptofano y los aromáticos superan al Patrón FAO. Ambos grupos de frijoles presentan deficiencia de aminoácidos azufrados como era de esperarse pues las leguminosas presentan deficiencia de estos aminoácidos.

El análisis estadístico (Tabla 9) mostró que solo existe diferencia

significativa, entre los frijoles silvestres y cultivados, en los contenidos de leucina y los aminoácidos azufrados. En general la desviación estandar es pequeña en todos los aminoácidos pues no se observaron desviaciones mayores a 1.0.

En cuanto a triptofano, en ambos grupos de frijoles se encontró superando al Patrón FAO, pero no existe diferencia estadísticamente significativa (Tabla 9) entre ambos grupos.

En la figura 4 se comparan los contenidos de los tres aminoácidos más escasos (lisina, triptofano y metionina [azufrados]) en frijoles silvestres y cultivados, con el Patrón FAO. Como se puede observar los aminoácidos azufrados son escasos tanto en frijoles silvestres como en frijoles cultivados, sin embargo en los frijoles cultivados se observa mayor contenido.

El contenido de aminoácidos indispensables en ambos grupos se comparan con el patrón FAO para así obtener la calificación química de cada uno de los frijoles del estudio. Como se observa en la Tabla 6 algunos aminoácidos proporcionan calificaciones superiores a 100 lo cual se debe a que dichos aminoácidos superan al Patrón FAO, por lo cual debe darse importancia a los tres aminoácidos mas escasos en alimentos que son lisina, triptofano y metionina (azufrados). Para ambos grupos de frijoles los aminoácidos limitantes son los azufrados, sin embargo, los frijoles cultivados alcanzan calificaciones químicas mayores que los frijoles silvestres (48 y 43.6 respectivamente). Además como se puede apreciar los frijoles cultivados presentan un mejor perfil de aminoácidos. Estos resultados muestran que los frijoles silvestres presentan mayor contenido de proteína pero los frijoles cultivados presentan mejor contenido y perfil de aminoácidos y por lo tanto una mejor calidad de la misma.

En la Tabla 6 se muestran los resultados del análisis de componentes antinutricionales y tóxicos. En ambos grupos de frijoles se encontraron

Inhibidores de tripsina y hemaglutininas (lectinas).

En cuanto a los inhibidores de tripsina los contenidos en frijoles silvestres y cultivados son significativos si se considera que a partir de 10 UTI/mg de muestra, la actividad del tóxico es de importancia; presentándose en mayor proporción en frijoles silvestres aunque no se alcanzan valores de UTI/mg de muestra tan altos como en la soya cruda (64 UTI/mg de muestra). El análisis estadístico mostró que existe diferencia significativa en el contenido de inhibidores de tripsina entre frijoles silvestres y cultivados (tabla 10).

En cuanto al contenido de lectinas o hemaglutininas, el ensayo se llevó a cabo con dos tipos de eritrocitos. El ensayo con eritrocitos de hamster permitió determinar la presencia del tóxico por ser estas células menos específicas y muy sensibles. Los títulos más altos se encontraron en frijoles silvestres o sea que el tóxico se encuentra en mayor proporción en estos frijoles; además se observó diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos de frijoles en este ensayo.

El ensayo con eritrocitos de vaca permite predecir la toxicidad de las lectinas con cierta reserva; ambos grupos de frijoles aglutinaron eritrocitos de vaca (tabla 6) por lo que las lectinas presentes pueden considerarse como posiblemente tóxicas para animales monogástricos. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en los resultados de este ensayo (tabla 10) por lo que solo podemos decir que las lectinas presentes en los frijoles estudiados pertenecen al grupo A de la clasificación que hace Jaffé (17) y que corresponden a frijoles tóxicos.

También se llevaron a cabo las determinaciones de saponinas, glucósidos cianogénicos y alcaloides, obteniéndose resultados negativos dentro del límite de detección para las técnicas empleadas que fué de 0.1 mg para saponinas y 0.01 mg HCN/100 g de muestra para glucósidos cianogénicos; para

alcaloides el ensayo fué cualitativo. Por lo anterior se considera que estos tóxicos no están presentes en los frijoles silvestres y cultivados de este estudio.

En la figura 5 se muestran de forma más clara los resultados del análisis de tóxicos.

Como se puede apreciar en los resultados anteriormente analizados, aunado a la mejoría de calidad protéica en los frijoles cultivados se presenta una disminución de componentes tóxicos, los cuales se encuentran en mayor proporción en los silvestres, lo cual se puede adjudicar al mejoramiento genético que lleva consigo la domesticación.

**Tabla 1**  
**ANALISIS PROXIMAL**  
g/100 g de muestra (base seca)<sup>a</sup>

**FRIJOLES SILVESTRES**

MUESTRA	CENIZAS	PROTEINA	GRASA	FIBRA	CHO'S <sup>b</sup>
Frijol del monte (I)	5.09	24.98	0.73	7.54	61.64
Frijol del monte (II)	5.28	25.43	0.55	7.90	60.81
Frijol del monte (III)	5.64	24.54	0.49	7.01	62.29
Frijol del monte (IV)	5.10	27.26	0.49	7.24	59.93
Frijol del monte (V)	4.66	25.48	0.54	5.73	63.57

**FRIJOLES CULTIVADOS**

MUESTRA	CENIZAS	PROTEINA	GRASA	FIBRA	CHO'S <sup>b</sup>
Frijol garrapata	3.90	21.90	0.79	5.32	68.06
Frijol pinto	4.19	21.60	0.79	4.88	68.53
Frijol encerado	4.20	21.06	0.73	5.31	68.67
Frijol flor de mayo	4.44	23.00	1.30	5.71	65.52
Frijol flor de mayo "bola"	4.04	21.38	0.87	4.20	69.49

a. Humedad promedio: Silvestres= 7.6 % Cultivados=6.9%

b. CHO'S = Carbohidratos asimilables calculados por diferencia.

**Contenido de nutrimentos.  
Frijoles silvestres y cultivados.**

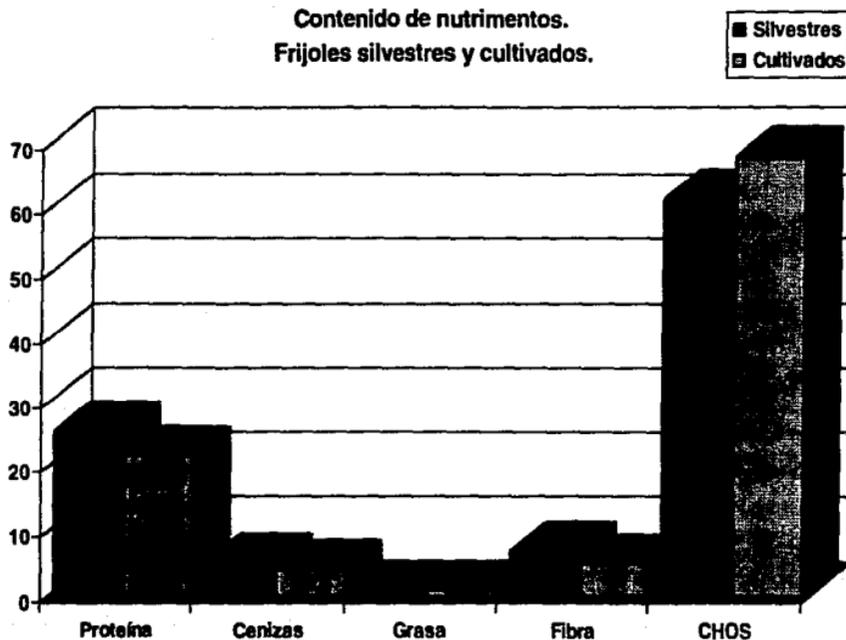


Fig 1

**Tabla 2**  
**CONTENIDO DE PROTEINA VERDADERA**  
 g/100 g de muestra

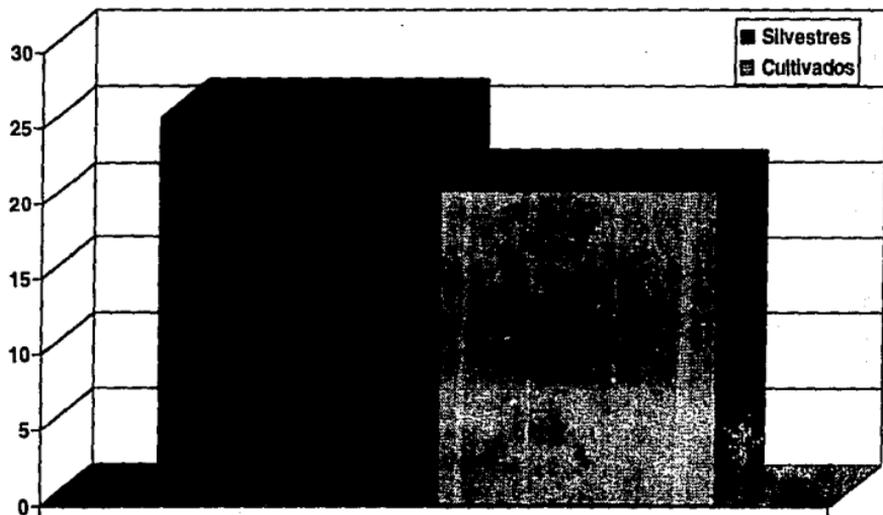
**FRIJOLES SILVESTRES**

MUESTRA	PROTEINA VERDADERA	% CON RESPECTO A PROTEINA CRUDA
Frijol del monte (I)	25.01	100
Frijol del monte (II)	25.28	99.4
Frijol del monte (III)	25.68	100
Frijol del monte (IV)	26.49	97.1
Frijol del monte (V)	25.54	100

**FRIJOLES CULTIVADOS**

MUESTRA	PROTEINA VERDADERA	% CON RESPECTO A PROTEINA CRUDA
Frijol garrapata	19.2	87.6
Frijol pinto	21.22	90.3
Frijol encerado	21.64	100
Frijol flor de mayo	22.36	97.19
Frijol flor de mayo "bola"	20.41	95.5

**Contenido de proteína verdadera.  
Frijoles silvestres y cultivados**



Proteína verdadera

Fig. 2

**Tabla 3**  
**CONTENIDO DE AMINOACIDOS DISPENSABLES**  
 (g aa/ 16 g N)

**FRIJOLES SILVESTRES**

Frijol	ASP	GLU	SER	PRO	ALA	GLI	TIR	HIS	ARG
del monte (I)	19.1	10.8	4.13	4.78	3.17	2.82	2.17	2.20	4.59
del monte (II)	11.9	15.5	5.11	6.49	3.00	2.68	2.75	2.41	5.57
del monte (III)	11.8	8.09	6.76	3.65	3.68	3.30	2.57	3.04	4.70
del monte (IV)	14.5	9.92	4.63	0.63	3.11	2.63	2.71	2.46	5.29
del monte (V)	15.3	5.57	4.44	3.73	3.29	2.84	2.71	2.41	4.73

**FRIJOLES CULTIVADOS**

Frijol	ASP	GLU	SER	PRO	ALA	GLI	TIR	HIS	ARG
garrapata	23.6	27.9	6.44	6.42	4.14	4.28	3.36	3.68	7.05
pinto	20.4	13.4	6.93	5.35	3.53	3.36	3.02	2.53	5.29
encerado	16.9	14.5	5.37	5.76	3.25	3.07	3.10	2.33	5.00
flor de mayo	20.4	17.7	6.50	4.40	3.57	4.01	3.19	2.62	6.24
flor de mayo "bola"	15.5	10.2	4.33	4.64	3.25	2.92	3.02	2.29	4.97

**Contenido de aminoácidos dispensables.  
Frijoles silvestres y cultivados**

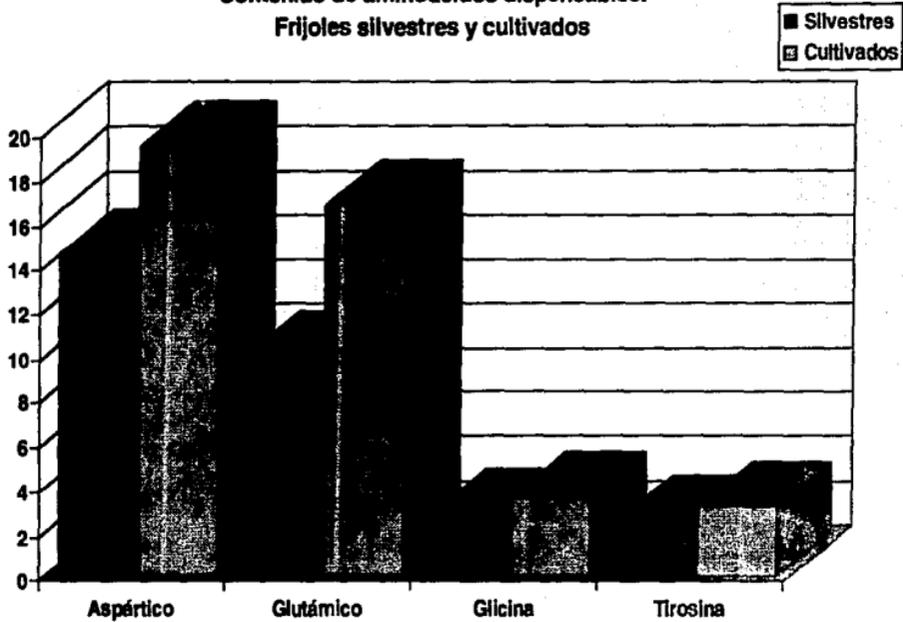


Fig. 3

TARIFA  
**CONTENIDO DE AMINOACIDOS EN MIGNONIAHIFR**  
 (2000)

**FRIJOL SILVESTRE**

Frijol	ILE	LEU	LIS	TRN	TRV	VAL	TOT. AZUF. N	TOT. AMIN. N
del monte (I)	3.90	6.66	4.80	3.65	0.07	3.37	2.00	6.01
del monte (II)	4.01	7.52	5.01	4.44	0.00	3.73	1.05	7.75
del monte (III)	3.89	6.54	5.07	3.60	0.00	3.62	2.01	7.61
del monte (IV)	3.54	7.46	5.10	4.22	0.00	4.14	2.01	7.04
del monte (V)	3.21	7.25	5.11	3.13	1.23	2.86	1.06	7.00
patrón FAO*	4.00	7.04	5.44	4.00	0.00	4.06	4.70	6.00

**FRIJOL CULTIVADO**

Frijol	ILE	LEU	LIS	TRN	TRV	VAL	TOT. AZUF. N	TOT. AMIN. N
garrapata	4.96	9.54	7.42	6.04	1.36	4.11	2.94	9.46
pinto	3.82	2.27	5.53	3.54	1.12	3.41	2.21	4.21
encarnado	3.73	7.59	5.44	4.34	0.34	4.19	2.93	4.10
frijol de mayo	4.33	3.24	3.32	3.71	0.74	3.97	2.21	4.63
frijol de mayo "ojal"	3.50	7.36	3.32	3.32	1.14	4.40	2.22	5.31
patrón FAO*	4.00	7.04	5.44	4.00	0.00	4.06	4.70	6.00

Σ TOTAL AZUF. FRIJOL = 118.20  
 Σ TOTAL AMIN. FRIJOL = 351.20

2000/03/15/1961/6



**Tabla 4**  
**CONTENIDO DE AMINOACIDOS INDISPENSABLES**  
 (g aa/ 16 g N)

**FRIJOL SILVESTRES**

Frijol	ILE	LEU	LIS	TRE	TRY	VAL	TOT. AZUF. <sup>a</sup>	TOT. AROM. <sup>b</sup>
del monte (I)	3.90	6.66	4.80	3.65	0.87	3.37	2.09	6.81
del monte (II)	4.01	7.52	5.01	4.44	0.99	2.73	1.85	7.75
del monte (III)	3.89	6.54	5.07	3.66	0.96	3.62	2.21	7.54
del monte (IV)	3.54	7.46	5.18	4.22	0.98	4.14	2.21	7.94
del monte (V)	3.21	7.25	5.11	3.13	1.23	2.85	1.96	7.06
patrón FAO*	4.00	7.04	5.44	4.00	0.96	4.96	4.72	6.08

**FRIJOL CULTIVADOS**

Frijol	ILE	LEU	LIS	TRE	TRY	VAL	TOT. AZUF. <sup>a</sup>	TOT. AROM. <sup>b</sup>
garrapata	4.96	9.54	7.42	5.89	1.38	4.11	2.39	9.36
pinto	3.88	8.07	5.00	3.64	1.12	3.87	2.20	8.21
encerado	3.78	7.89	5.44	4.16	0.93	3.19	2.31	8.06
flor de mayo	4.16	8.04	6.38	3.75	0.79	3.97	2.21	9.01
flor de mayo "bola"	3.50	7.96	5.53	3.53	1.04	3.40	2.22	6.55
patrón FAO*	4.00	7.04	5.44	4.00	0.96	4.96	4.72	6.08

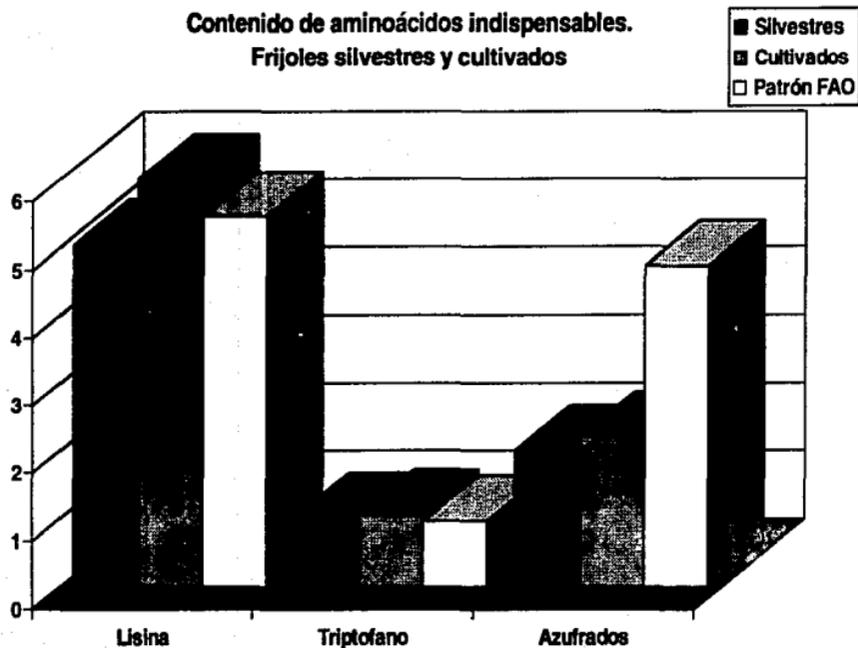
a. TOTAL AZUFRADOS = met + cis

b. TOTAL AROMATICOS = fen + tir

\*PATRON FAO 1973.

**ESTA TESTA NO DEBE  
 SALIR DE LA BIBLIOTECA**

**Contenido de aminoácidos indispensables.  
Frijoles silvestres y cultivados**



**Fig. 4**

**Tabla 5**  
**CALIFICACION QUIMICA\***

**FRIJOLES SILVESTRES**

MUESTRA	ILE	LEU	LIS	TIR	TRY	VAL	TOT. AZUF. <sup>a</sup>	TOT. AROM. <sup>b</sup>
Frijol del monte (I)	97.5	94.6	88.2	91.2	90.6	67.9	44.2	>100
Frijol del monte (II)	>100	>100	92	>100	>100	55	39.1	>100
Frijol del monte (III)	97.2	92.8	93.1	91.5	100	72.9	46.8	>100
Frijol del monte (IV)	88.5	>100	95.2	>100	>100	83.4	46.8	>100
Frijol del monte (V)	80.2	>100	93.9	78.2	>100	57.4	41.5	>100

**FRIJOLES CULTIVADOS**

MUESTRA	ILE	LEU	LIS	TRE	TRY	VAL	TOT. AZUF. <sup>a</sup>	TOT. AROM. <sup>b</sup>
Frijol garrapata	>100	>100	>100	>100	>100	82.8	50.6	>100
Frijol pinto	97	>100	91.9	91	>100	78	46.6	>100
Frijol encerado	94.5	>100	100	>100	96.8	64.3	48.9	>100
Frijol flor de mayo	>100	>100	>100	93.7	82.2	80	46.8	>100
Frijol flor de mayo "bola"	87.5	>100	>100	88.2	>100	68.5	47	>100

\*Calificación química =  $\frac{\text{g de aminoácido en la muestra}}{\text{g de aminoácido en el patrón}} \times 100$

\*Pellet, P.L., and Young, V.R. Nutritional Evaluation of Protein Foods. The United Nations University, Tokyo. 1980. p 5-27.

a. TOTAL AZUFRADOS = met + cis

b. TOTAL AROMATICOS = fen + tir

**Tabla 6**  
**CONTENIDO DE TOXICOS NATURALES**

**FRIJOL SILVESTRES**

MUESTRA	INHIBIDORES DE TRIPSINA UTI/mg <sup>a</sup>	LECTINAS eritrocitos hamster (Título) <sup>b</sup>	LECTINAS, eritrocitos vaca (Título) <sup>b</sup>
Frijol del monte (I)	23.39	10	1
Frijol del monte (II)	31.22	10	2
Frijol del monte (III)	27.74	9	2
Frijol del monte (IV)	25.82	10	2
Frijol del monte (V)	26.69	9	3

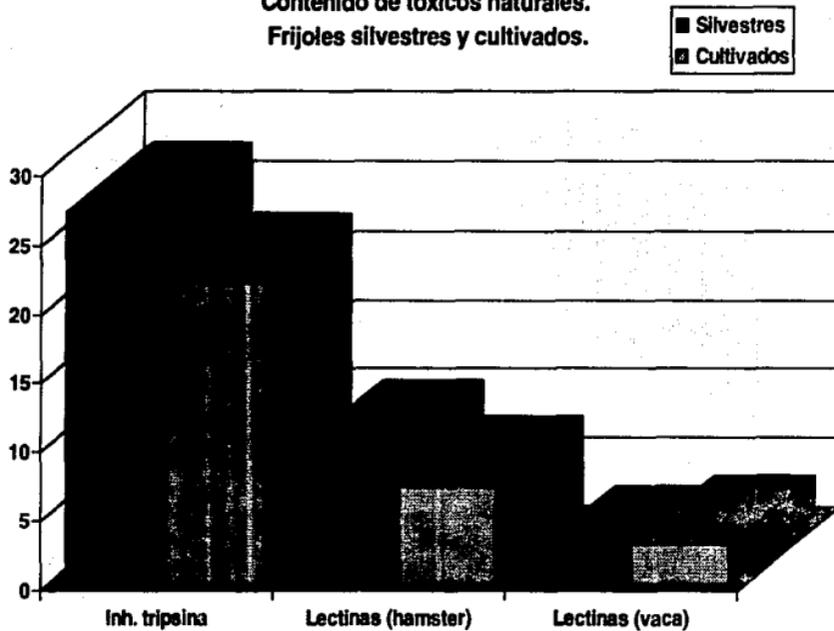
**FRIJOL CULTIVADOS**

MUESTRA	INHIBIDORES DE TRIPSINA UTI/mg <sup>a</sup>	LECTINAS eritrocitos hamster (Título) <sup>b</sup>	LECTINAS eritrocitos vaca (Título) <sup>b</sup>
Frijol garrapta	25.81	6	3
Frijol pinto	23.56	7	3
Frijol encerado	20.69	8	3
Frijol flor de mayo	18.54	7	2
Frijol flor de mayo "bola"	20.74	7	3

a. UTI/mg = Unidades de tripsina inhibida por mg de muestra

b. Título = máxima dilución donde se presenta aglutinación

**Contenido de tóxicos naturales.  
Frijoles silvestres y cultivados.**



**Fig. 5**

## ANALISIS ESTADISTICO.

**TABLA 7**  
**ANALISIS PROXIMAL**

	Cenizas <sup>a</sup>	Proteína <sup>a</sup>	Grasa <sup>a</sup>	Fibra <sup>a</sup>	*CHO'S <sup>a</sup>	Proteína <sup>a</sup> verdadera
<b>FRIJOLES SILVESTRES</b>						
Promedio	5.15	25.53	0.56	7.08	61.64	25.6
DS <sup>b</sup>	0.354	1.035	0.098	0.827	1.39	0.559
<b>FRIJOLES CULTIVADOS</b>						
Promedio	4.15	21.78	0.89	5.04	68.05	20.9
DS <sup>b</sup>	0.201	0.743	0.231	0.574	1.50	1.21

a. Se encontró diferencia estadísticamente significativa

Nivel de significancia = 0.05%.

b. DS = Desviación estandar.

\*CHO'S = Carbohidratos asimilables calculados por diferencia.

**Tabla 8**  
**CONTENIDO DE AMINOACIDOS DISPENSABLES**

	ASPa	GLU	SER	PRO	ALA	GLI <sup>a</sup>	TIR <sup>a</sup>	HIS	ARG
<b>FRIJOLES SILVESTRES</b>									
Promedio	14.52	9.97	5.01	3.85	3.25	2.85	2.58	2.50	4.97
DS <sup>b</sup>	2.99	3.67	1.03	2.13	0.262	0.264	0.240	0.315	0.429
<b>FRIJOLES CULTIVADOS</b>									
Promedio	19.36	16.74	5.91	5.31	3.54	3.52	3.13	2.69	5.71
DS <sup>b</sup>	3.20	6.78	1.05	0.823	0.363	0.592	0.142	0.570	0.908

a. Se encontró diferencia estadísticamente significativa.

Nivel de significancia = 0.05%

b. DS = Desviación estandar

**TABLA 9**  
**CONTENIDO DE AMINOACIDOS INDISPENSABLES**

	ILE	LEU <sup>a</sup>	LIS	TRE	TRY	VAL	TOT. AZUF. <sup>a(c)</sup>	TOT. AROM. <sup>(d)</sup>
<b>FRIJOLES SILVESTRES</b>								
Promedio	3.71	7.08	5.03	3.82	1.00	3.34	2.06	7.42
DS <sup>b</sup>	0.330	0.456	0.144	0.518	0.133	0.576	0.158	0.473
<b>FRIJOLES CULTIVADOS</b>								
Promedio	4.05	8.3	5.95	4.19	1.05	3.70	2.26	8.23
DS <sup>b</sup>	0.577	0.696	0.95	0.977	0.221	0.393	0.082	1.088

a. Se encontró diferencia estadísticamente significativa.

Nivel de significancia = 0.05%

b. DS = Desviación estándar

c. TOTAL AZUFRADOS = met + cis

d. TOTAL AROMATICOS = fen + tir

**TABLA 10**  
**CONTENIDO DE TOXICOS NATURALES**

	Inhibidores de tripsina <sup>a</sup>	Lectinas <sup>a</sup> (sangre hamster)	Lectinas (sangre vaca)
	<b>FRIJOLES</b>	<b>SILVESTRES</b>	
Promedio	28.0	9.6	2
DS <sup>b</sup>	2.86	0.547	0.707
	<b>FRIJOLES</b>	<b>CULTIVADOS</b>	
Promedio	21.86	7	2.8
DS <sup>b</sup>	2.83	0.707	0.447

a. Se encontró diferencia estadísticamente significativa.

Nivel de significancia = 0.05%

b. DS = Desviación estandar

## CONCLUSIONES

1. Existe una diferencia significativa en cuanto a la composición proximal de *Phaseolus vulgaris* silvestres y cultivados, observándose que el contenido de proteína, cenizas y fibra cruda en los frijoles silvestres es mayor que en los frijoles cultivados y éstos últimos muestran contenidos mayores de grasa y carbohidratos asimilables; además en los frijoles silvestres el contenido de proteína verdadera es elevado y además es muy similar al contenido de proteína total, mientras que en los frijoles cultivados se observan diferencias significativas en este respecto. (El contenido de proteína verdadera es inferior a la proteína total).

2. En cuanto al contenido de aminoácidos se observa que los aminoácidos dispensables se encuentran en mayor proporción en los frijoles cultivados, siendo los aminoácidos ácidos (glutámico y aspártico), glicina y tirosina los que presentan mayor diferencia con respecto a los frijoles silvestres. Los aminoácidos indispensables se encuentran en mayor proporción en los frijoles cultivados pero sólo se observó diferencia significativa entre frijoles silvestres y cultivados en contenido de leucina y de aminoácidos azufrados. Los frijoles cultivados demostraron contenidos de lisina y triptofano superiores al Patrón FAO, mientras que en los frijoles silvestres se observa que solo triptofano y los aromáticos superan al Patrón FAO. Los aminoácidos azufrados fueron los mas escasos como se esperaba, sin embargo en los frijoles cultivados se encuentran en mayor proporción, por lo tanto éstos alcanzan calificaciones químicas mayores. Los frijoles cultivados muestran una mejor calidad protéica por su

composición de aminoácidos indispensables lo que viene a demostrar que mediante la domesticación se consiguió un mejoramiento genético.

3. En cuanto al contenido de tóxicos naturales, los frijoles silvestres presentan lectinas e inhibidores de tripsina en mayor proporción que los frijoles cultivados. Las lectinas encontradas tanto en frijoles silvestres como en frijoles cultivados correlacionan con toxicidad. No se encontraron saponinas, alcaloides y glucósidos cianogénicos en los frijoles silvestres y cultivados de este estudio.

4. Los resultados encontrados en este trabajo sugieren que la domesticación fué positiva en cuanto a que se logra una mejor calidad protéica y una disminución notable de los dos tóxicos que se encuentran presentes con suma regularidad en estas leguminosas.

## BIBLIOGRAFIA

1. Delgado, A. y Manzanilla, L. El frijol prehispánico. ICyT, Información Científica y Tecnológica, Vol 12, No 168, 52-56. Sept. 1990.
2. Kaplan, L. and Kaplan L.N. Phaseolus in Archeology in: Genetic Resources of Phaseolus beans. Paul Gepts (Editor), Kluwer Academic Publishers. 1988. p 125-142.
3. Delgado, S. A., Bonet, A., and Gepts, P. The Wild Relative of Phaseolus vulgaris in Middle America in: Genetic Resources of Phaseolus beans. Paul Gepts (Editor), Kluwer Academic Publishers. 1988. p 163-184.
4. Brücher, H. The Wild Ancestor of Phaseolus vulgaris in South America in: Genetic Resources of Phaseolus beans. Paul Gepts (Editor), Kluwer Academic Publishers. 1988. p 185-214.
5. Gepts, P. Phaseolin as an evolutionary marker in: Genetic Resources of Phaseolus beans. Paul Gepts (Editor), Kluwer Academic Publishers. 1988. p 215-241.
6. Gómez, B. R., Elías, L. G., Molina, M. R., De la Fuente, G., and Bressani, R. Changes in chemical composition and nutritive value of common beans and other legumes during house cooking in: Nutritional aspects of common beans and other legume seeds as animal and human foods. Werner G. Jaffé (Editor). Proceedings of a meeting held in Riberão Preto, Nov. 6-9, Brazil 1973.
7. Hernández, X. E., Ramos, A. y Martínez, M. A. Contribuciones al conocimiento del frijol (Phaseolus) en México en: Etnobotánica. Engleman, M. (Editor). Colegio de Posgraduados, México 1979.
8. Utilización de alimentos tropicales: Frijoles tropicales. Estudio FAO alimentación y nutrición 47/4. FAO, Roma 1990. p 45-47.

9. Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists published by AOAC, Inc. Herlich, K. (Editor). 15<sup>th</sup> edition vol. I & II. Arlington 1990. p 17-18, 40-62, 69-83, 1012.
10. Baduñ, D. S. Química de los alimentos, 2<sup>da</sup> edición. Ed. Alhambra Universidad, México 1990. p 15-129.
11. Hart, F. L. Análisis moderno de los alimentos. Ed. Acribia, Zaragoza, España 1971. p 13-14, 247-250.
12. Acevedo, R. Elementos metálicos de la vida. ICyT, Información Científica y Tecnológica, Vol 10. No 136, 36-40. México 1988.
13. Pearson, D. The chemical analysis of foods. Churchill Livingstone, New York, USA 1976. p 13-40.
14. Wayne, B., Arlene, K., and Mark, M. Nutritional requirements of the elderly. Food Tech. 2, 1-67. 1986.
15. Lindner, E. Toxicología de alimentos. Ed. Acribia, Zaragoza, España 1978. p 1-21.
16. Contreras, E. Valor nutritivo de leguminosas silvestres de la Península de Yucatán. Tesis. Fac. Química, UNAM. México 1992. p 12-16.
17. Jaffé, W. G. Toxic factors in beans. Their practical importance in: Nutritional aspects of common beans and other legume seeds as animal and human foods. Werner G. Jaffé (Editor). Proceedings of a meeting held in Riberão Preto, Nov. 6-9, Brazil 1973.
18. Whitaker, J. R. and Feeney, R. E. Enzyme inhibitors in foods in: Toxicants occurring naturally in foods. National Academy of Sciences. Washington D.C., USA 1973. p 276-298.
19. Liener, I. E. Toxic constituents of plants foodstuffs, 2<sup>nd</sup> edition. Academic Press, Inc. New York, USA 1980. p 7-57, 73-99, 143-157, 161-181.

20. Rayas, D. P., Bergeron, D., and Nielsen, S. S. Screening of heat-stable trypsin inhibitors in dry beans and their partial purification from Great Northern Beans (*Phaseolus vulgaris*) using anhydrotrypsin-sepharose affinity chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 40, 32-42. 1992.
21. Valle Vega, P. Toxicología de alimentos. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud/ OPS/ OMS. México 1986. p 1-18.
22. Jaffé, W. G. Toxic proteins and peptides in: Toxicants occurring naturally in foods. National Academy of Sciences. Washington D.C., USA 1973. p 106-129.
23. Banwell, J. G., Howard, R., Cooper, D., and Costerton, J. W. Intestinal microflora after feeding phytohemagglutinin lectins (*Phaseolus vulgaris*) to rats. Applied and environmental microbiology. Vol 50, No 1, 68-80, July 1985.
24. Fennema, O.R. (Editor) Principles of food science. Part I. Marcel Dekker, Inc. New York, USA 1976. p 515-537.
25. Girón, M. C. Determinación semicuantitativa de saponinas en muestras vegetales aprovechando su capacidad hemolítica. Tesis. Fac. de Química, UNAM. México 1992. p 4-28, 55-67, 93.
26. Conn, E. E. Cyano-genetic glycosides in: Toxicants occurring naturally in foods. National Academy of Sciences. Washington D.C., USA 1973. p 299-308.
27. Harborne, H. B. Phytochemical methods. Chapman-Hall, London, G. B., 1973. p 192-194, 182-191.
28. Dominguez, X. A. Métodos de investigación fitoquímica. Ed. Limusa, México 1973. p 211.
29. Lucas, B., Guerrero, A., and Sotelo, A. True protein and nonprotein aminoacids present in legume seeds. *Nutr. Rep. Int.*, 37, 545-553. 1988.

30. Lucas, B. and Sotelo, A. Aminoacid determination in pure protein, foods and feeds using two different hydrolysis methods. *Anal. Biochem.*, 123, 349-356. 1982.
31. Lucas, B. and Sotelo, A. Effect of different alkalies, temperature and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins and of foods. *Anal. Biochem.*, 109, 192-197. 1980.
32. Kakade, M. L., Rackis, J. J., McGhee, J. E., and Puski, J. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: A collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chem.*, 51, 376-382. 1974.
33. Jaffé, G. W. y Brucher, O. Toxicidad y especificidad de diferentes fitohemaglutininas de frijoles. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 22, 267-281. 1972.
34. Jaffé, G. W., Levey, A., and González, D. I. Isolation and partial characterization of beans phytohemagglutinins. *Phytochemistry*, 13, 2685-2893.
35. Lucas, B. and Sotelo, A. A simplified test for the quantitation of cyanogenic glucosides in wild and cultivated seed. *Nutr. Rep. Int.*, 29, 711-719. 1984.
36. Abisch, E. and Reichstein, T. Alkaloid screening (Micromethod). *Helv. Chem. Acta*, 43, 1844-1861. 1960.
37. Steel, R. G. and Torrie, J. H. Principles and procedures of statistics. 1<sup>st</sup> edition. Mc Graw-Hill Book Co. New York, USA 1960.