

00381



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DETERMINACION DE LOS CAMBIOS  
ESTRUCTURALES RELACIONADOS CON EL  
FENOMENO DE REVERSIBILIDAD DEL  
ENDURECIMIENTO EN DOS CULTIVARES DE  
FRIJOL ( *Phaseolus vulgaris* L. )

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS  
( B I O L O G I A )

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

M. en C. MARIA EUGENIA TOVAR MARTINEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. CLARA ESQUIVEL HUESCA  
CODIRECTORA DE TESIS:  
DRA. IRMA OFELIA BERNAL LUGO



MEXICO, D. F.

1997

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

La ciencia es un cerillo que el hombre acaba de encender. Pensaba hallarse en un cuarto -un templo en momentos de devoción- y que esa luz, al reflejarse, le mostraría secretos maravillosos inscritos en las paredes y sistemas filosóficos, plenos de armonía esculpidos en las columnas. Qué curiosa sensación, ahora que el chisporroteo se ha desvanecido y la flama brilla nítidamente, ver sus manos iluminadas, sólo un vislumbre de sí mismo y la mancha de luz que lo sostiene, y en torno suyo, en lugar de todo ese bienestar y belleza que presentía la obscuridad persistente.

H. G. Wells. *The rediscovery of the unique.*

## Summary:

When beans are stored at high temperatures and high relative humidity, the phenomenon of hardening develops. This condition increases the cooking time of the beans and diminishes their nutritional qualities. During the process of hardening, physical, biochemical and structural changes in the seed occur. Diverse hypotheses to explain the causes of this hardening have been explored, but to date, there is no integral understanding of the process which intervenes in this phenomenon. Recently the possibility has been proposed of reverting the hardening by submitting the hardened seeds to a low temperature and high humidity. In spite of the importance of the beans as food, until now the structural components which are modified during the phenomenon of hardening and its reversion have not been identified. This investigation studied the structural changes which were presented in the tissues (testa, hilum and cotyledon) of the dry and moistened seeds of *Phaseolus vulgaris*, both "Flor de Mayo", "Flor de Junio" varieties, treated at 1.5, 3 and 6 months of accelerated hardening (29° C and 75 % RH) and subsequently submitted to reversion conditions (8° C and 75% RH), for six months.

To explain the obtained structural results, the participation of the testa in the hardening of the bean is proposed, along with the intervention of the modifications which were made at the level of the cotyledons. The structures which are specifically suggested to influence cooking times are the inclusions of tannins of the stratum palisade. The changes observed during the hardening of the proteic bodies and cell wall of the cotyledon cells with what has been observed by various authors.

The partial reversion of the hardening phenomenon was obtained. Microstructural changes to the testa after reversion were not evident, suggesting that this does not contribute in an important way to the phenomenon of reversion. In the cotyledon cells, the fundamental modifications were seen in the cell wall. Finally it is proposed that there are two components in the phenomenon of hardening, one which is reversible and one which is irreversible.

**Dedico esta tesis a los 3 hombres que me acompañan en mis empresas:**

**Chava, Eligio y David**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo, quien asumió responsablemente la codirección de esta tesis, por su apoyo académico, emocional y por ser para mí un ejemplo de dedicación al trabajo científico.

A la Dra. Judith Márquez Guzmán, por haberme impulsado en todo momento para realizar esta investigación, por brindarme su amistad y compañerismo.

A la Dra. Clara Esquivel Huesca, por su colaboración en la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado: Dr. Ernesto Moreno Martínez, Dra. Alma Delfina Lucía Orozco Segovia, Dr. Alfonso Octavio Delgado Salinas, Dra. Ma. Cristina Pérez Amador y Dra. Margarita Collazo Ortega, por sus acertados comentarios que mejoraron el presente documento.

Al M.V.Z. Rodolfo González Moreno, director del plantel Sur del Colegio de Ciencias y Humanidades, por su valioso y constante apoyo que me brindó para el desarrollo de esta investigación.

Al Comité de Becas del Colegio de Ciencias y Humanidades y a la Dirección general de apoyo al personal académico por haberme otorgado 18 meses de beca para la realización de esta tesis.

A los Ingenieros Javier Delgado Rosas y Eduardo Delgado Rosas, por la adaptación del diseño del cocinador Mattson.

Al M. en C. Francisco Barba Torres, por su asesoría en el análisis estadístico exploratorio de los resultados de este trabajo.

Al Dr. Jorge Ramírez González, por la orientación que me brindó en la etapa inicial de esta tesis.

Al M. en C. Alejandro Martínez Mena, por su colaboración en la toma de las microfotografías de los detalles de testas e hilos.

Reconozco el apoyo recibido por mis compañeros integrantes del laboratorio de Citología de la Facultad de Ciencias y del laboratorio 104 del posgrado de Ciencias Químicas.

## **INDICE**

### **Resumen**

#### **Capítulo I INTRODUCCIÓN**

	<b>1</b>
<b>I ANTECEDENTES</b>	<b>4</b>
1.1 Importancia de <i>Phaseolus vulgaris</i> en el mundo.	4
1.2 Producción del Frijol en México.	4
1.3 Los cultivares de Frijol en México.	5
1.4 Condiciones de almacenamiento.	6
1.5 Importancia Socioeconómica del Endurecimiento.	7
1.6 Proceso de cocción.	8
1.7 El almacenamiento de la semilla de frijol y su relación con el endurecimiento.	9
1.8 Estructura de la semilla de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	9
1.9 Ultraestructura de las células cotiledonarias.	11
1.10 El papel de la estructura de la semilla de frijol en la textura y absorción de agua.	13
1.11 Reversión del endurecimiento.	17
Capítulo II <b>HIPOTESIS Y OBJETIVOS.</b>	18
Capítulo III <b>MATERIAL Y METODOLOGÍA.</b>	19
III.1 Selección de los cultivares.	19
III.2 Contenido de humedad de la semilla.	19
III.3 Endurecimiento acelerado.	20
III.4 Reversión del endurecimiento.	20
III.5 Tiempo de cocción.	20
III.6 Procesamiento de muestras para microscopía de luz.	21
III.7 Fotomicrografías.	22
Capítulo IV <b>Identificación de los cambios estructurales inducidos durante la imbibición y endurecimiento de la semilla de frijol, que inciden en el tiempo de cocción.</b>	23
IV.1.1 <b>Resultados.</b>	23
IV.1.2 <b>Discusión.</b>	31
Capítulo V <b>Cambios microestructurales en las semillas endurecidas de frijol, después de ser sometidas a un tratamiento de reversión.</b>	34
V.1 <b>Resultados y discusión.</b>	34
Capítulo VI <b>CONCLUSIONES.</b>	40
<b>LITERATURA CONSULTADA</b>	<b>41</b>

## **RESUMEN:**

Cuando se almacena la semilla de frijol a altas temperatura y humedad relativa se desarrolla el fenómeno de endurecimiento. Esta condición aumenta el tiempo de cocción de la semilla y disminuye sus cualidades nutritivas. Durante el endurecimiento se presentan cambios físicos, bioquímicos y estructurales en la semilla. Se han explorado diversas hipótesis para explicar las causas del endurecimiento, pero hasta la fecha no existe una comprensión integral de los procesos que intervienen en este fenómeno. Recientemente se ha planteado la posibilidad de revertir el endurecimiento, sometiendo a las semillas endurecidas a baja temperatura y alta humedad. A pesar de la importancia alimentaria del frijol, a la fecha no se han identificado cuáles son los componentes estructurales que se modifican durante el fenómeno de endurecimiento y su reversión. En la presente investigación se estudiaron los cambios estructurales que presentaron los tejidos (testa, hilo y cotiledones) de la semilla seca y remojada de *Phaseolus vulgaris*, cultivares Flor de Mayo y Flor de Junio, tratadas a 1.5, 3 y 6 meses de endurecimiento acelerado (29 °C y 75% de HR) y posteriormente sometidas a condiciones de reversión (8°C y 75% de HR), por 6 meses.

Por los resultados estructurales obtenidos, se propone la participación de la testa en el endurecimiento de la semilla de frijol, además de la intervención de las modificaciones que se efectúan a nivel de los cotiledones. Las estructuras que específicamente se sugiere influyen en los tiempos de cocción, son las inclusiones de taninos de los estratos del esclorénquima en empalizada y parénquima de la testa e hilo. Los cambios observados durante el endurecimiento en los cuerpos proteicos y pared celular de las células cotiledonarias coinciden con lo señalado por diversos autores.

Se obtuvo la reversión parcial del fenómeno de endurecimiento. Por lo que se refiere a los cambios microestructurales de la testa, después de la reversión no fueron evidentes, sugiriéndose que ésta no contribuye de manera importante al fenómeno de reversión. En las células cotiledonarias las modificaciones fundamentales se dieron en la pared celular. Finalmente se propone la participación de dos componentes en el fenómeno de endurecimiento, uno reversible y otro irreversible.



## **INTRODUCCIÓN:**

El crecimiento de la población humana y su impacto sobre los recursos naturales se ha acelerado fuertemente, desde fines de la segunda Guerra Mundial; entre 1950 y 1986 la población mundial se duplicó y el consumo mundial de granos se incrementó 2.6 veces (75).

El esfuerzo agrícola de todas las naciones está encaminado a incrementar la producción de alimentos. Sin embargo, una quinta parte de la población mundial, distribuida en diversos países en vías de desarrollo, no consume suficientes calorías para llevar una vida activa de trabajo. Por lo que el reto actual de los países es satisfacer la creciente demanda de alimentos ante una aguda problemática de deterioro ambiental y una pauperización del sector agrícola.

La agricultura mexicana se orienta principalmente a la producción de granos básicos, y el cultivo del frijol constituye un factor estratégico tanto dentro de la perspectiva económica como de la social (71). El frijol, dentro de las leguminosas comestibles, es una de las especies más importantes tanto por su amplia distribución en diferentes zonas ecológicas, como por ser complemento nutricional indispensable en la dieta alimenticia de la mayoría de la población.

La producción de frijol en México presenta el problema de bajo rendimiento, el cual está influido por factores como los siguientes: el 81.4 % de las tierras donde se siembra son de temporal, y de éstas más de un millón de hectáreas se siembran en la zona semiárida del país, la que comprende principalmente los estados de Zacatecas, Durango y Chihuahua con 700 mil, 275 mil y 210 mil hectáreas respectivamente; la incertidumbre de la cosechas; la lenta maduración de la planta; la sensibilidad del frijol a las condiciones de crecimiento en todos los periodos de desarrollo y las graves pérdidas causadas por plagas. Por lo anterior, la investigación sobre el frijol se ha enfocado principalmente a la producción de cultivares de alto rendimiento (6, 71). En nuestro país, al igual que en otros países tropicales, el frijol cosechado se almacena en condiciones

por demás inadecuadas, por lo que el grano sufre pérdidas cualitativas y cuantitativas. Las pérdidas que se producen durante esta etapa de la cadena alimentaria son difíciles de calcular, aunque se estima que en México van del 30 al 50% y a nivel mundial llegan al 10% de las cosechas (65).

La pérdida cuantitativa durante el almacenamiento, se ocasiona por la merma en el peso del grano almacenado (que por consecuencia provoca una pérdida económica directa), y el daño cualitativo está representado por el fenómeno de endurecimiento. Este fenómeno se manifiesta como un aumento en el tiempo necesario para la suavización de la semilla durante el proceso de cocción, y como una disminución de las cualidades organolépticas y nutritivas (22).

El endurecimiento del frijol está asociado a condiciones deficientes de almacenamiento, tales como el alto contenido de humedad del grano, temperatura, humedad relativa del almacén y tiempo que permanece en éste. Como resultado del trabajo realizado por varios equipos de investigación se reconoce que el proceso de endurecimiento involucra cambios estructurales, físicos y bioquímicos en la semilla ocasionados por causas múltiples (43). Sin embargo, el mecanismo por el cual el frijol se endurece es muy complejo y todavía no está bien entendido.

La preparación de los frijoles para consumo humano incluye dos etapas; primero los frijoles son remojados y posteriormente se calientan para inducir la suavización. La imbibición en los frijoles frescos disminuye el tiempo de cocción, sin embargo se ha observado que en los frijoles endurecidos lo anterior no sucede, esto ha llamado la atención de algunos investigadores quienes se han abocado a estudiar la relación entre el endurecimiento y la absorción de agua, la salida de electrolitos y la pérdida de sólidos, y pocos han contemplado las modificaciones estructurales que acompañan a estos cambios fisicoquímicos.(85, 48, 94).

Recientemente, se descubrió que el endurecimiento que presentan los frijoles almacenados en condiciones desfavorables puede ser revertido (76, 41).

Hasta la fecha, son escasos los trabajos que estudian la reversión del endurecimiento, y éstos se han centrado en el uso de sales durante el remojo y su efecto sobre la desmineralización de la lámina media. En dichos estudios se registraron observaciones de la lámina media y pared de las células cotiledonarias (3).

Para disminuir las pérdidas económicas ocasionadas por el endurecimiento del grano de frijol y aumentar la aceptación de éste por parte de los consumidores, es necesario entender los cambios estructurales, fisiológicos y bioquímicos que se presentan durante el endurecimiento, remojo y reversión, con la finalidad de diseñar estrategias que disminuyan y/o eviten el fenómeno de endurecimiento

Una forma de resolver el problema anterior, sería el mejorar las condiciones de almacenamiento, lo que resulta poco práctico dadas las condiciones climáticas de nuestro país. Otra alternativa es la de contar con materiales que presenten menos susceptibilidad al endurecimiento. Esto se puede lograr por selección o por el diseño de plantas transgénicas. Pero para el desarrollo de cualquiera de estas alternativas se requiere conocer el mecanismo de endurecimiento del frijol. En la presente investigación se contribuye al conocimiento de los cambios estructurales que se presentan en la testa, hilo y cotiledones de la semilla de frijol endurecida, remojada y revertida, y se integran con la información que se tiene hasta el momento sobre las alteraciones en algunas biomoléculas.

## ***I. ANTECEDENTES***

### ***I.1 Importancia de Phaseolus vulgaris en el mundo.***

En la actualidad, tanto los países desarrollados como los que están en vías de desarrollo emplean las semillas de frijol como alimento. Los países en vías de desarrollo utilizan el frijol al igual que otros productos vegetales, porque poseen aminoácidos esenciales y tienen más bajo costo que los de origen animal.

Los frijoles secos contienen alrededor de un 20% de proteínas (con el doble de lisina que los cereales) y cerca del 65% de carbohidratos, además de varios minerales esenciales y vitaminas. Por lo que junto con los cereales, las raíces y tubérculos, constituyen los alimentos más importantes para Latinoamérica (5).

Las semillas de frijol, así como las de otras legumbres secas, producen un bajo y moderado incremento de glucosa en sangre, las causas que determinan esta característica todavía no se conocen pero pueden ser debidas a: la rigidez de las paredes de las células cotiledonarias, a la baja susceptibilidad enzimática de los almidones, al entrapamiento de los granos de almidón dentro de las paredes celulares, a efectos de la dieta con fibra, y a la presencia de polifenoles y otros inhibidores de la  $\alpha$ -amilasa. Estas cualidades de bajo contenido de carbohidratos hace interesantes a las legumbres para ser utilizadas como alimento para diabéticos (97).

### ***I.2. Producción del Frijol en México.***

México es el principal productor de frijol de América del Norte y Central, en los últimos 5 años se han producido un promedio de 1.045 millones de toneladas al año (4).

En América Latina, los países con mayor consumo de frijol son México, Paraguay, Nicaragua y Brasil. En México, todas las clases sociales consumen

frijol, la que, junto con el maíz, son la base de la alimentación de la mayoría de la población.

En México, uno de los aspectos de la problemática del frijol es la producción errática, que enfrenta un consumo per capita de 15 k al año, lo cual representa una demanda de 1.2 millones de toneladas. Existe por lo tanto la necesidad de equilibrar la producción ya que en el caso de haber excedentes, el mercado internacional es muy reducido y de presentarse un déficit, la oferta mundial prácticamente es inexistente (84).

Las siembras de frijol se practican en todos los estados del país, éste se produce en los dos ciclos agrícolas, primavera-verano, que aporta el 80% y el de otoño-invierno, que aporta el 20%. Los principales estados productores son en orden de importancia: para el ciclo primavera-verano: Zacatecas, Durango, Chihuahua, Guanajuato, y para el otoño-invierno, Nayarit, Sinaloa y Veracruz (84).

### ***1.3. Los Cultivares de Frijol en México.***

Los cultivares comerciales que se producen en México se catalogan como preferentes y no preferentes. El concepto de preferencia se relaciona con el precio de garantía, el preferente para el ciclo otoño invierno 1993/ 1994 contó con un precio de \$ 1,800.00 y 1,600.00 para el ciclo primavera verano 1994, con \$1,600.00 por tonelada, para los ciclos otoño invierno y el no preferente tuvo los precios de garantía de \$ 1,500.00 y \$ 1,300.00 para los mismos ciclos.

Dentro de los cultivares preferentes se encuentran: el Canario, Flor de Mayo, Pinto Nacional, Negro Jamapa, Flor de Junio y Mayocoba y dentro de los no preferentes se hayan: Garbancillo, Azufrado, Bayo Blanco, Alubia Blanca, Ojo de Cabra, Negro Arriaga, Veracruz, Querétaro y San Luis, Bayo Río Grande, Negro Zacatecas, Pastilla, Satevo, Pinto Mexicano, Pinto Delicias y Bayo Rata.

#### ***1.4. Condiciones de almacenamiento.***

Actualmente uno de los principales problemas de México, es el de asegurar una alimentación adecuada y suficiente para la población. Para garantizar lo anterior se ha tenido que aumentar la producción agrícola de los diferentes granos básicos, producción que es imposible consumir y utilizar en forma inmediata, por lo que gran parte de ella debe ser almacenada en forma segura para que se utilice y se consuma de acuerdo a las necesidades de la población, esto depende de la infraestructura de almacenamiento, de la capacidad técnica de los almacenes, del transporte y de la red de comunicaciones (75).

Conforme la producción de granos en una región llega a la autosuficiencia, los excedentes deben ser almacenados durante aproximadamente 7 meses, dentro del ciclo natural de la producción y el consumo (71)

Los sitios de acopio y almacenamiento del frijol en el país van desde patios encementados que se destinan a asolear y acondicionar el grano para su almacenamiento, hasta las bodegas manejadas por BORUCONSA (Bodegas Rurales CONASUPO), que fundamentalmente tiene edificios planos con techos de dos aguas y muros de mampostería o piedra. En ellos los granos se manejan encostalados. Otra forma de almacenamiento son los silos metálicos, dispuestos en formación circular para el manejo mecanizado del producto; también es frecuente el uso de cuartos de haciendas, viejos molinos de trigo, las bodegas tipo "Pantaco", que son bodegas planas con piso de cemento, muros de mampostería y techos de dos aguas o techos parabólicos formados con lámina de asbesto.

En los últimos años la CONASUPO se ha ido retirando de la compra y abasto de granos, por lo que éstos han quedado en manos de particulares que carecen de la infraestructura adecuada y adolecen de una preparación apropiada para enfrentar acciones orientadas a la postcosecha (35).

El daño de los granos en el almacén depende de factores como el contenido inicial de humedad del mismo, su susceptibilidad genética al endurecimiento, características y condiciones de la bodega, el clima del lugar donde se ubica el almacén y la atención que recibe el grano durante su almacenamiento.

#### ***1.5. Importancia Socioeconómica del Endurecimiento.***

La calidad de la semilla de frijol esta determinada por diversos factores como: sus características en el remojo, cocción, calidad proteínica y aceptabilidad por parte de los consumidores. En la aceptabilidad del grano influyen el tamaño, forma, color, apariencia, estabilidad en el almacenamiento, comportamiento en el remojo, facilidad para la cocción, calidad del producto obtenido y sabor (77).

El frijol endurecido presenta cambios como: el color, que es diferente al de una semilla recién cosechada; su comportamiento ante el remojo se modifica, requiere largos tiempos de cocción y presenta sabor y olor desagradables.

La cocción del frijol generalmente inactiva varios compuestos antinutricionales termolábiles como los inhibidores de enzimas, algunos de los componentes que ocasionan los sabores desagradables, reduce el nivel de taninos e inactiva a las lectinas (77).

Fundamentalmente el endurecimiento disminuye el valor nutritivo del frijol, porque modifica la calidad de las proteínas. Esto se refleja en una disminución de la eficiencia proteica, de su digestibilidad y disponibilidad de aminoácidos como la lisina y la metionina (5, 77).

Para aumentar la aceptabilidad del frijol tanto para su preparación, como para su almacenamiento y procesamiento, es necesario entender los cambios funcionales y de calidad de la semilla durante el proceso de la cocción, así como cuando se presenta el fenómeno de endurecimiento y la reversión del mismo.

### **1.6 Proceso de cocción.**

Durante la cocción del frijol y otras leguminosas ocurren cambios estructurales en la semilla. El tratamiento térmico fractura y solubiliza a la lámina media (92), con lo cual las células se separan, disminuyendo la rigidez de la semilla. En el citoplasma las proteínas se desnaturalizan y/o gelifican (34), lo que facilita la gelatinización de los gránulos de almidón. Estos cambios fisicoquímicos inducidos por el calor se reflejan en la suavización de la semilla, la pérdida de la toxicidad, la adquisición de sabor agradable y un aumento en la digestibilidad.

La solubilidad del material intercelular depende tanto de la cantidad de calcio y magnesio así como, de la interacción de éstos con las sustancias pépticas (56, 49), como del tamaño de éstos polisacáridos (56), por lo que el cambio en la solubilidad de las pectinas, observado durante la cocción, debe estar relacionado con una disminución en el contenido de cationes divalentes de la lámina media y/o con una disminución en el grado de polimerización de las sustancias que la forman.

La disminución de iones divalentes podría realizarse a través de un proceso que involucra su quelación por el ácido fítico, molécula con alta densidad de carga negativa, o bien por un proceso de intercambio iónico (ion divalente por monovalente). Si la primera sugerencia está contribuyendo a la suavización térmica del frijol, el contenido de fitato de calcio y magnesio (compuesto insoluble) debe ser mayor en el frijol cocido que en el frijol crudo. Se ha observado que el contenido de fitato insoluble no se modifica durante la cocción (20, 10); sin embargo la cantidad de sodio y potasio encontrada en el grano cocido disminuye notablemente (Bernal-Lugo, datos no publicados). Así mismo la cantidad de pectina presente en el grano cocido fue menor que en el grano no cocido (20). Los datos antes mencionados apoyan la propuesta de que durante la cocción del frijol, la solubilización de la lámina media se realiza a través de la despolimerización térmica de las pectinas y por un intercambio de iones divalentes por monovalentes. De lo anterior se concluye que cualquier factor que



modifica cualitativa o cuantitativamente los componentes de la pared celular y/o la susceptibilidad de los gránulos de almidón a la gelatinización o la estabilidad térmica de las proteínas afectará en forma importante el proceso de cocción.

### ***1.7 El almacenamiento de la semilla de frijol y su relación con el endurecimiento.***

Los factores que se han relacionado con el endurecimiento del frijol durante el almacenamiento son: humedad, temperatura y tiempo de almacenamiento (17). El frijol con un contenido de humedad de entre el 13-18% requiere de tiempos de almacenamiento mayores de 6 meses para endurecerse, siempre y cuando la temperatura de almacenamiento sea menor de 30° C (17), pero si se almacena a 4° C, no se endurece ni en dos años (27), expuesto a 100% de humedad relativa y a 14° C, sólo requiere de 14 días de almacenamiento para aumentar su tiempo de cocción (48).

Las regiones donde se produce, almacena y consume el frijol son por lo general de clima tropical, donde la humedad relativa promedio es del 85% y la temperatura de 30° C; semitropical con 65% de humedad relativa en el ambiente y 24° C; y en las zonas templadas con una humedad relativa del 35% y temperaturas entre 15 y 20° C. También se ha señalado que cuando se almacena frijol en el laboratorio, en condiciones similares a las anteriores (75% de HR y 30° C), a los 7 días de estar almacenado el frijol inicia su proceso de deterioro (24).

### ***1.8 Estructura de la semilla de Phaseolus vulgaris.***

El frijol posee un fruto monocarpelar, seco y abierto a lo largo de las suturas ventrales y dorsales (94).

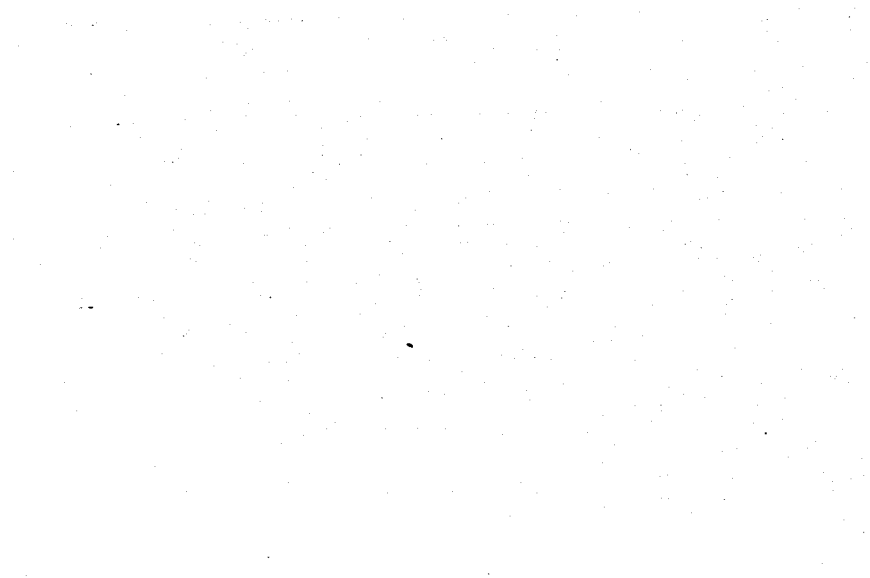
La semilla madura de *Phaseolus vulgaris* consta del embrión y la cubierta de la semilla o testa. En ésta se localiza el hilo, que es una cicatriz ovalada que aparece en el lugar donde la semilla estaba unida al fúnculo (figura 1) (28).

En la testa se distinguen varias regiones. La cutícula formada por las terminaciones exteriores de las células en empalizada. El esclerénquima en empalizada constituido de células hexagonales, de paredes celulares gruesas y lignificadas (15). En el interior de estas células algunos autores han observado taninos (90, 27). Las células de reloj de arena, son células que se encuentran entre las células del esclerénquima en empalizada y las del mesófilo, generalmente son columnares, pero ligeramente adelgazadas y con terminaciones estrelladas expandidas, y por último el mesófilo, un tejido que consiste de varias capas de células estrelladas, que en la semilla madura se encuentra colapsado (figura 2) (19).

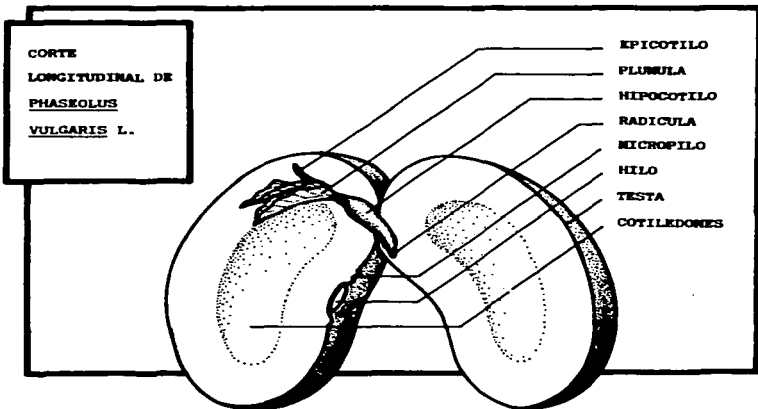
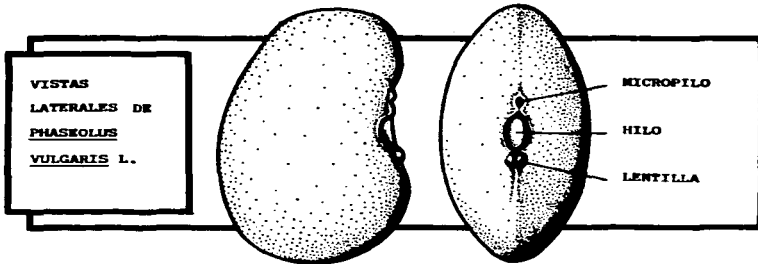
En el hilo, que como ya se indicó, es la cicatriz formada cuando la semilla se separa del fúnculo, se pueden distinguir dos estratos, el de empalizada y el del parénquima, las células reloj de arena no se presentan. En las semillas frescas de *Phaseolus vulgaris*, cultivar "ojo de cabra", Esquivel y col. (27), observaron taninos en el esclerénquima en empalizada de la zona hilar (figura 2).

EL embrión consiste de un eje embrionario con dos cotiledones. El eje embrionario está compuesto por el hipocotilo al cual están unidos los cotiledones, la radícula y la plúmula (el ápice del brote con las primeras hojas). Los cotiledones son abultados y constituyen el 90% de la masa de la semilla y en ellos se localizan las sustancias de reserva como proteínas, lípidos y carbohidratos, que son llevados hacia el hipocotilo a medida que este crece (figuras 1 y 2) (12, 94).

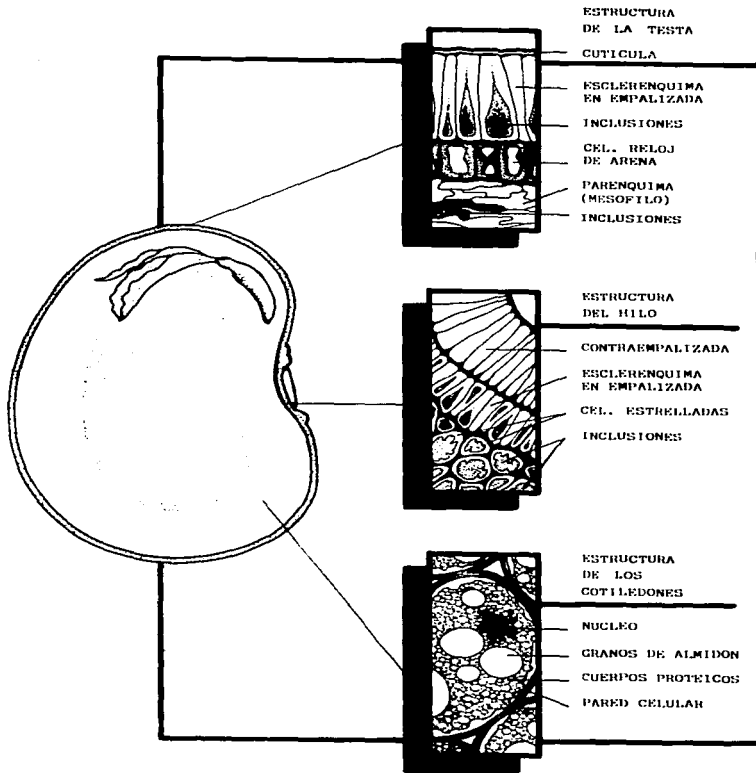
Por la desecación que sufre la semilla al madurar, las células parenquimatosas de los cotiledones reducen los organelos celulares y solamente contienen granos de almidón diseminados entre los cuerpos proteicos y/o cuerpos lipídicos (12, 94).



**Figura 1. Morfología externa de la semilla madura de *Phaseolus vulgaris* L.**



**Figura 2. Amplificación esquematizada al microscopio compuesto de la testa, hilo y cotiledones de *Phaseolus vulgaris* L.**



### **1.9 Ultraestructura de las células cotiledonarias**

Debido a que el fenómeno estudiado en este trabajo, el endurecimiento del frijol y su reversión, se realiza en los cotiledones, a continuación se describe la ultraestructura de las células cotiledonarias.

La pared celular de las células cotiledonarias, es una estructura de gran complejidad a nivel molecular, está constituida por microfibrillas de celulosa, hemicelulosa y lignina. Los carbohidratos, componentes de la celulosa y hemicelulosa, están unidos por enlaces glucosídicos formando polisacáridos, los cuales en las semillas de leguminosas son galactomanos, xiloglucanos y galactanos, que actúan también como sustancias de reserva (14). Parte de la complejidad de la pared celular se debe a la presencia de otros compuestos como el agua, proteínas, lignina, otros fenoles, iones, lípidos etc. Debido a que la función de los cotiledones es constituir las primeras hojas durante el desarrollo de la plántula, éstas células sólo presentan pared celular primaria, las cuales se unen por medio de la lámina media; compuesta por sustancias pécticas (94).

La membrana plasmática de las células cotiledonarias es una delgada bicapa lipoprotéica, la cual aparentemente mantiene su estructura durante la desecación de la semilla a través de reemplazar las interacciones establecidas con el agua por interacciones con los OH de los azúcares, que se acumulan durante el desarrollo de la semilla (16)

Otra estructura fácilmente identificable en preparaciones de cotiledones la constituyen los plasmodesmos que son canales abiertos que conectan las células vegetales, consisten de bandas delgadas cilíndricas de citoplasma que penetran las membranas plasmáticas y las paredes celulares de dos células adyacentes. La función de los plasmodesmos es el intercambio selectivo de sustancias entre las células (39, 50).

Las semillas de las dicotiledóneas no tienen tejidos especiales de almacenamiento y en ellas los cuerpos proteicos sirven para este fin, se encuentran rodeados por una membrana simple y contienen empacadas las proteínas de reserva (66).

Los cuerpos proteicos son organelos pequeños más o menos esféricos, cuyo tamaño varía de una planta a otra y de un tejido a otro. En *Phaseolus* se ha manifestado un diámetro promedio de 10  $\mu\text{m}$  (73).

Los cuerpos proteicos de *Phaseolus* contienen globulinas tipo faseolina y vicilina, y ácido fítico, pero también contienen enzimas hidrolíticas (proteasas y fitasas), cationes y ácido ribonucleico, así como otros componentes menores incluyendo ácido oxálico, azúcares y lípidos (60, 80).

Aunque se reconozca que las leguminosas contienen altas concentraciones de proteínas, existen en ellas factores que contribuyen a la deficiencia de las mismas, dentro de los que se encuentran: el bajo contenido de aminoácidos azufrados, la resistencia parcial de las globulinas a las enzimas digestivas y la presencia de inhibidores de la tripsina.

En las leguminosas, los granos de almidón son oblongos y de diferentes tamaños, aproximadamente entre 20-50  $\mu\text{m}$ , dependiendo de la especie, muestran capas concéntricas alrededor de un punto, el hilo, que puede estar en el centro del grano o a un lado. En condiciones de deshidratación los granos presentan fracturas que a menudo irradian del hilo (29, 94).

La formación de las capas en los granos de almidón se atribuye a la alternancia de dos carbohidratos, la amilosa (moléculas lineales) y la amilopectina (moléculas ramificadas). Cuando el grano se hidrata el hinchamiento diferencial de estos dos componentes acentúa la formación de capas (29).

El núcleo está presente como una masa viscosa, amorfa, de material rodeado por la envoltura nuclear. Dentro del núcleo de una célula en interfase se encuentra la cromatina, la matriz nuclear, el nucléolo y el nucleoplasma.



Los cromosomas se manifiestan como fibras de nucleoproteínas tremendamente extendidas que reciben el nombre de cromatina, esta puede estar condensada formando la heterocromatina, la que normalmente se presenta más teñida y la región menos densa que forma la eucromatina; la matriz nuclear, es una malla fibrilar de contenido proteínico.

Los nucleolos pueden ser uno ó más, poseen una estructura amorfa, electrónicamente densa que funciona en la síntesis del ARN ribosomal y en el ensamblaje de ribosomas (39, 50).

#### ***1.10 El papel de la estructura de la semilla de frijol en la textura y absorción de agua.***

El remojo antes de la cocción suaviza a los frijoles y disminuye la dureza proporcionalmente al tiempo de imbibición. En diversos estudios se ha indicado la posible relación entre la microestructura de la semilla fresca y la absorción de agua, sin embargo la función precisa de los constituyentes microestructurales no se conoce. La absorción de agua en las semillas de las legumbres parece ser un proceso complejo en el que intervienen la testa, el hilo y el micrópilo (85, 100, 23, 40, 27).

Al ser la testa la estructura más externa de la semilla desempeña un papel importante en el control de la captación y distribución del agua, se piensa que las capas celulares que la constituyen funcionan como almacén de agua para el eje embrionario ( 57, 58).

Se ha propuesto la posibilidad de que la testa contribuya a la modificación de la textura en el fenómeno de endurecimiento, el que fundamentalmente se atribuye a cambios físico-químicos y estructurales de las células cotiledonarias (43). Se sugiere que la participación de la testa en el deterioro de la semilla podría involucrar el incremento en la polimerización de fenoles (37, 36).

La absorción de agua de la semilla de frijol se modifica con los cambios de textura, lo que ocasiona que no disminuyan los tiempos de cocción después del

remojo, lo anterior se ha atribuido a la presencia de una capa de agua libre, que no penetra a las células cotiledonarias y que se encuentra entre los cotiledones y la testa (61, 49, 74, 42, 78).

Con la disminución de agua, las membranas celulares de las semillas que se encuentran en condiciones adversas de almacenamiento pierden integridad y solutos del citoplasma como: moléculas orgánicas, electrolitos, citoplasma y organelos; lo anterior hace que el plasmalema se retraiga de la pared celular.

Cuando en el ambiente se vuelve a presentar el agua, la membrana se organiza (102, 48, 44, 78). Otros factores que pueden influir en la merma de la integridad de las membranas son los radicales libres, que se producen al oxidarse los lípidos del citoplasma, y también se señala la reducción de los disacáridos protectores de las membranas (48, 51, 25, 2, 68, 53, 9, 36).

Se ha observado que las paredes celulares de las células cotiledonarias, de los frijoles deteriorados, reducen su tamaño y presentan una apariencia lamelada, con un arreglo similar al que presenta la lignificación (45, 7).

La hipótesis de intervención de los procesos de lignificación durante el endurecimiento ha sido apoyada porque ésta provocaría una disminución de la separación celular e impediría la difusión del agua al interior de las células cotiledonarias, alterando los tiempos de cocción. Aunque hay evidencias experimentales que apoyan los procesos que pueden originar la lignificación, a la fecha no ha sido probada completamente (62, 94).

Existen varios mecanismos que se propone contribuyen a la formación de lignina en la pared celular y lámina media, dentro de los que se señalan: la oxidación enzimática de los compuestos polifenólicos (94); el incremento en las proteínas lignificadas (62, 30); y la migración de taninos de la testa a los cotiledones, en donde formarían compuestos termoestables (37, 92, 96).

En los frijoles endurecidos se observa la disminución de la estructura granular del citoplasma, lo anterior puede estar relacionado con: la alteración de los cuerpos proteicos, con la pérdida del estado vítreo, con la peroxidación de

lípidos y por la degradación autofágica de las vesículas de ácido fítico (1, 93, 100, 53, 9, 54, 36).

El ácido fítico, que se encuentra en los cuerpos proteicos, ha sido involucrado en las hipótesis para explicar el fenómeno de endurecimiento. En 1946, Mattson formuló la participación del fitato como agente captador y transportador de cationes mono y divalentes. El fitato al actuar con la lámina media e intercambiar los cationes monovalentes por divalentes, la haría susceptible al ablandamiento por calor. Recientemente, Bernal Lugo y col. (10) encontraron que el fitato no es el agente quelante que participa en la suavización de la lámina media.

En diversos experimentos se han evidenciado las modificaciones en las proteínas durante el almacenamiento, en donde se mencionan los siguientes aspectos: la disminución en la calidad nutritiva, su hidrólisis, coagulación, el rompimiento de las proteínas de la membrana, el aumento de la actividad enzimática que impide la hidratación de los granos de almidón; la disminución de la energía de desnaturalización, la formación de complejos termoestables de proteínas-fenoles, la presencia de azúcares reductores que en estado seco pueden influir en el deterioro de las proteínas (5, 100, 46, 47, 33, 104, 9, 27, 54).

Cuando los gránulos de almidón son calentados en un medio acuoso, se lleva a cabo la gelatinización, durante ésta los gránulos pierden su estructura y se disgregan en sus constituyentes moleculares. La trascendencia nutritiva de este hecho radica en que el almidón no gelatinizado es mucho menos susceptible a la digestión enzimática que el gelatinizado (52, 18).

La gelatinización se presenta cuando el almidón se encuentra en un medio acuoso y sometido a temperaturas entre 63.8 y 76 ° C (en frijoles negros) (2), se inicia en el hilo del gránulo progresando radialmente, lo que lleva a una desaparición secuencial de los anillos concéntricos (38).

Dah (citado por Hahn y Jones (38)) sugirió que las altas temperaturas que se requieren para la gelatinización intracelular, que se presentan en los frijoles endurecidos, pueden deberse a la interacción del almidón con otros componentes

celulares como: las proteínas, el ácido fólico, taninos, sales inorgánicas y azúcares (27). Lo anterior puede ser apoyado por algunos estudios histológicos que se realizaron en el frijol de árbol (*Cajanus cajan*) en los que se observó que las células y gránulos de almidón de secciones de los cotiledones bien cocidos se dispersaron libre y rápidamente en el medio y los gránulos de los endurecidos, tendieron a dispersarse lentamente y se mantuvieron agrupados (67).

Algunos autores basados en sus observaciones proponen que el tiempo de almacenamiento afecta más que las condiciones del mismo (46, 72, 31). También se sugiere que las diferencias de gelatinización que presentan los frijoles duros se deben a problemas de absorción de agua y no a la estructura o composición del almidón (46, 44, 32, 74, 97, 98, 54).

Las observaciones de Silva y Luh (93), en los granos de almidón de los frijoles endurecidos resaltan la presencia de una arruga extensa en la superficie, que no se mostró tan pronunciada en los frijoles blandos, esta arruga puede ser un material como membrana, que tal vez fue afectada por la elevación de la temperatura y humedad.

Con el deterioro, el núcleo conserva su forma, aunque el citoplasma esté fuertemente dañado. La actividad mitocondrial disminuye por el daño progresivo de la actividad de las deshidrogenasas, que culmina con la pérdida completa de la síntesis de proteínas (51).

También se sugieren alteraciones en la transcripción y traducción del ADN, que podrían ser debidas a daños en el ADN modelo del núcleo, o ser el resultado de la acción de nucleasas, que producen la rápida degradación del ARN (51).

En las plantas, existe poca evidencia de la reparación del daño en el ADN, aunque se ha observado que el número de aberraciones cromosómicas ocasionadas por el almacenamiento declinaron después de repetidas divisiones celulares. Sin embargo, es poco probable que durante la germinación se lleve a cabo la reparación de las lesiones acumuladas durante el almacenamiento en seco (51).

La pérdida del molde de ADN impide la síntesis de enzimas lábiles y, en consecuencia que operen adecuadamente los sistemas de reparación celular , lo que desemboca en una pérdida de la organización celular (51).

#### ***1.11 Reversión del endurecimiento.***

Comúnmente se piensa que el endurecimiento de la semilla de frijol es una condición permanente, pero este fenómeno puede ser revertido, si el grano se almacena a una humedad relativa alta (75-85%) y a baja temperatura (8-15 °C.) (76, 41).

Diversos autores señalan las condiciones antes mencionadas para mantener el grupo control y son también en las que se conservan los bancos de germoplasma (92, 104, 3). González de la Concha (36) resaltó que estos parámetros parecen mantener el estado vítreo.

Los trabajos que abordan la reversión del endurecimiento son escasos, Ramírez (76) y Hentges (41) trabajaron exclusivamente los efectos de la reversión sobre los tiempos de cocción en diversos cultivares de frijol; en cuanto a los aspectos químicos, se ha investigado el efecto de sales mono valentes y agentes quelantes; Liu y colaboradores (54) al emplear soluciones de tetracetato diácido (EDTA) en el remojo de caupís endurecidos por 12 meses, revirtieron totalmente el endurecimiento, y cuando remojaron las semillas en ácido tetra acético (EGTA), lograron la reversión parcial; el método que utilizaron para medir la suavización de los caupís endurecidos fue el aparato denominado Instron.

Aguilera y Rivera (3) también utilizaron sales y agentes quelantes en el remojo de frijol negro endurecido y al observar la microestructura de las células cotiledonarias en el microscopio electrónico de barrido notaron que la separación celular no se modificó con el remojo, pero la morfología externa de la pared celular si se alteró, sin embargo no precisaron que tipo de cambios se presentaron.

## ***II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***

A la fecha se conocen las condiciones que inducen y revierten el fenómeno del endurecimiento, pero el mecanismo por medio del cual se realizan estos procesos no está dilucidado. En la ciencia de los alimentos se ha demostrado que el tiempo de termosuavización requerido por los productos vegetales, es un reflejo de la composición, organización y estructura de los tejidos. Por lo que en este trabajo se planteó la hipótesis de que el fenómeno de endurecimiento y su reversión estaban asociados a cambios microestructurales en los tejidos de la testa, hilo y cotiledones. Para comprobar la hipótesis anterior se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) Identificar los cambios microestructurales inducidos durante el endurecimiento en la testa, hilo y en los cotiledones de dos cultivares de frijol.
- 2) Determinar cuál de estos cambios, si existe alguno, está relacionado con el tiempo de termosuavización que presenta la semilla.
- 3) Determinar si la reversión del fenómeno de endurecimiento está asociado a la reversión de las modificaciones microestructurales características del endurecimiento.

## **III. MATERIAL Y METODOLOGÍA**

### **III. 1 Selección de los cultivares.**

Para llevar a cabo la presente investigación se realizó una revisión de los cultivares comerciales que tienen importancia en las distintas regiones agrícolas de la República Mexicana. Para la elección; se tomó en cuenta que las semillas fueran semejantes en cuanto a: tamaño, coloración, tiempo de siembra, lugar de cosecha y que se sembraran en la misma zona.

Por lo anteriormente expresado se seleccionaron dos cultivares: Flor de Mayo y Flor de Junio (figura 3), que se siembran en la región de Tecozautla, Hidalgo; en los meses de enero y febrero, y se cosechan en los meses de abril, mayo y junio.

Las semillas utilizadas en esta investigación, se cosecharon el 20 de abril de 1991, se secaron al sol durante tres semanas y se refrigeraron en frascos de vidrio con muñecas de sílica gel, así se transportaron al laboratorio, para ser procesadas.

### **III. 2 Contenido de humedad de la semilla**

Se empleó el método de secado en estufa que consiste en lo siguiente:

En cajas para secado de aluminio de 5 cm. de diámetro, se introdujeron 3 g de la muestra (cuatro repeticiones por muestra). Se registró el peso de la caja, posteriormente se pesó ésta con la muestra y se colocó destapada en una estufa con circulación forzada, se dejaron durante una hora a 130 °C, se extrajeron las cajas se taparon y pesaron. Se volvieron a introducir las cajas abiertas a la estufa por 15 minutos más, después de sacarlas de la estufa se cerraron y pesaron nuevamente, si el peso permanecía constante ya no se continuaba la desecación.

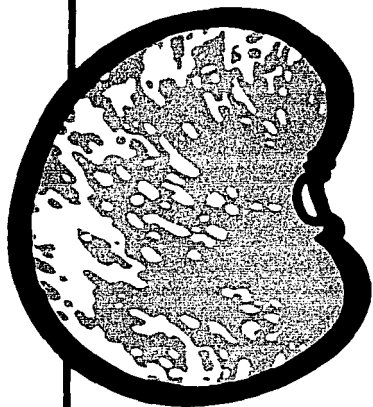
El contenido de humedad de las semillas se obtuvo por la diferencia de pesos entre el peso original (peso húmedo) y el peso después del secado en la estufa (peso seco). Se calculó el porcentaje de peso perdido en la desecación por cada caja y se registró el promedio (63).



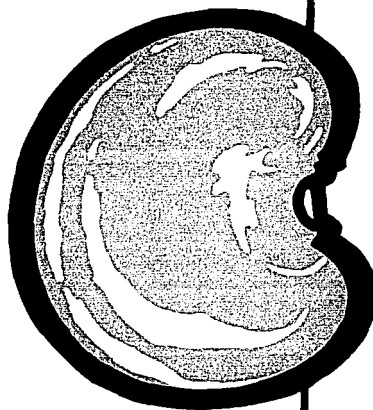
**Figura 3. Apariencia externa de los cultivares Flor de Mayo (FM) y Flor de Junio (FJ).**



**FM**



**FJ**



### ***III. 3 Endurecimiento acelerado***

Para inducir el endurecimiento acelerado en condiciones de laboratorio, se prepararon frascos de vidrio de boca ancha conteniendo solución de cloruro de sodio saturada para garantizar la humedad relativa del 75% (103). En los frascos se colocaron anillos metálicos que sostenían bolsas de malla plástica. En las bolsas de malla plástica se introdujeron de 100 a 150 g. de semillas de frijol, de tal manera que se encontraban suspendidos en el interior del frasco, sin tocar la solución contenida en el fondo de éste

Los frascos se mantuvieron a 29°C en una estufa de temperatura regulable, durante 1.5, 3 o 6 meses (Figuras 4 y 5) (100).

### ***III. 4 Reversión del endurecimiento***

Lotes de semillas endurecidas de la forma antes descrita, se pasaron a las condiciones en que se ha reportado se revierte el fenómeno de endurecimiento. Las que consistieron en almacenar semillas endurecidas durante seis meses a 8°C y una humedad relativa de 75% (76, 41). Al concluir el tiempo de reversión se extrajeron las semillas, y nuevamente se determinaron los TC<sub>50</sub>. Se procesaron muestras para microscopía óptica tanto de las semillas secas como las remojadas por 12 hrs (Figura 6).

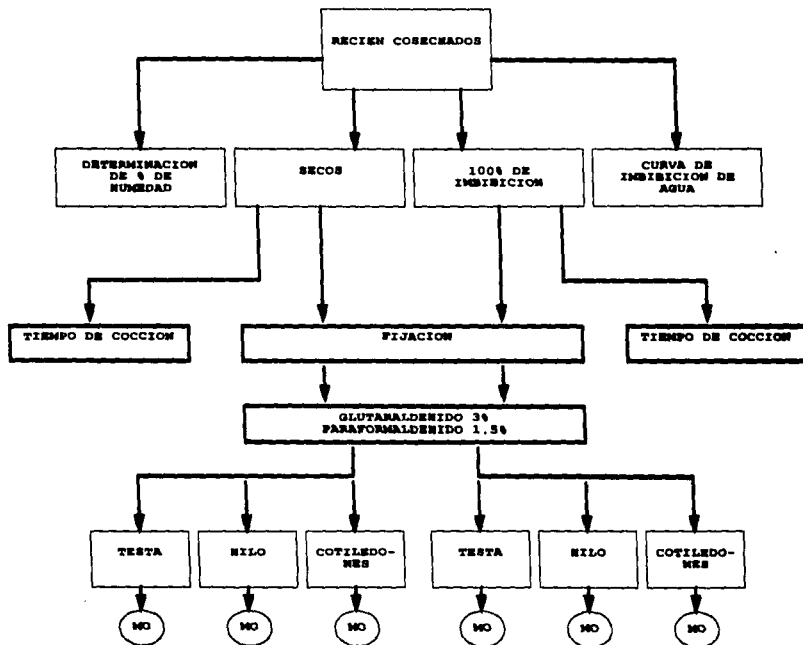
### ***III. 5 Tiempo de cocción***

Para poder emplear un método homogéneo para la determinación de los tiempos de cocción de las semillas de frijol, se hizo una adaptación del aparato que se conoce como "cocinador Mattson" (Figura 7) (100). Consistente en tres discos metálicos, sostenidos por tornillos o espárragos. La placa inferior es de lámina de acero inoxidable de 1/4 de pulgada de 20 cm de diámetro, las otras dos, la media y superior son de lámina de latón de 1/16 de pulgada y 20 cm de diámetro.

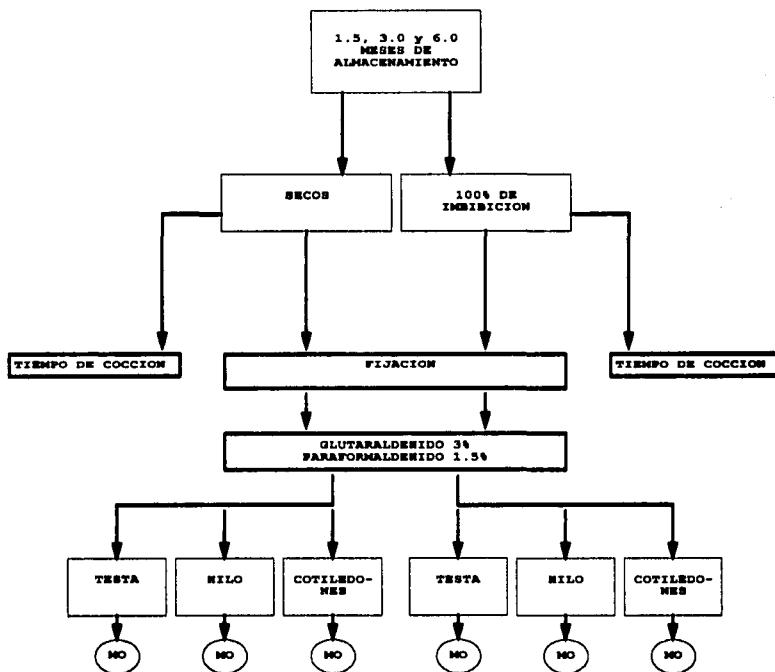


**Figura 4. Metodología empleada con las semillas recién cosechadas de *Phaseolus vulgaris*. MO= microscopía óptica.**

CULTIVARES FLOR DE MAYO Y FLOR DE JUNIO

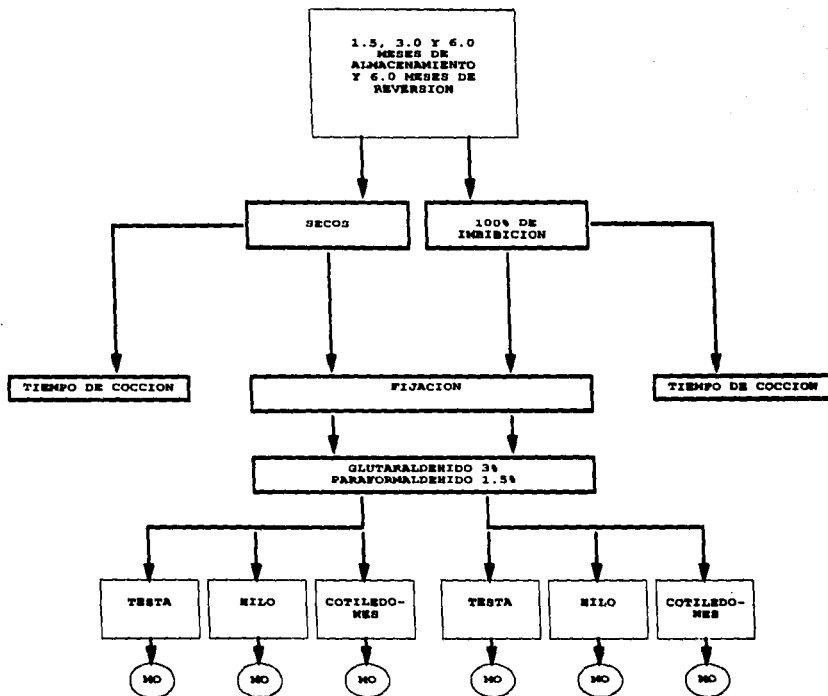


CULTIVARES FLOR DE MAYO Y FLOR DE JUNIO



**Figura 6. Metodología empleada con las semillas de *Phaseolus vulgaris* almacenadas a 1,5, 3,0 y 6,0 meses de almacenamiento y posteriormente tratadas durante 6 meses a las condiciones de reversión. MO= microscopía óptica.**

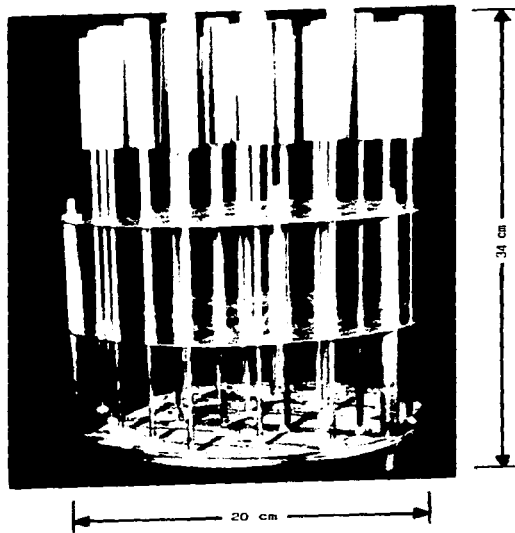
CULTIVARES FLOR DE MAYO Y FLOR DE JUNIO





**Figura 7. Adaptación del cocinador Mattson (véase texto página 20).**





La placa de acero inoxidable lleva 25 perforaciones de 3/8 de pulgada de diámetro superior y 5/12 de pulgada de diámetro inferior, en estas se colocaron las semillas; las otras dos láminas llevan también 25 perforaciones cada una que coinciden con las perforaciones de la placa inferior. La placa de acero inoxidable y las dos láminas de latón se unieron por medio de tornillos o espárragos de latón, de 1/16 de pulgada.

A través de los agujeros, pasan varillas de latón de 25 cm de largo y 1/8 de pulgada de diámetro, con un extremo redondeado y el otro en punta. En el extremo redondeado de la varilla se le colocaron contrapesos de hierro desmontables de 12 mm. de diámetro por 34 mm. de largo, con un peso de 82 g.

En ollas de peltre con agua hirviendo, se introdujeron los cocinadores que contenían una semilla de frijol por perforación. El tiempo medio de cocción ( $TC_{50}$ ) se determinó cuando el 50% de las varillas atravesaron los frijoles, lo que indica su cocción. Las pruebas de cocción se realizaron por duplicado.

Los tiempos de cocción se determinaron a las semillas frescas secas y remojuadas, a las almacenadas durante 1.5, 3 y 6 meses, secas y remojuadas, así como también a las semillas en las que se indujo el endurecimiento al almacenarlas durante 1.5, 3 y 6 meses y tratadas para la reversión de éste durante 6 meses secas y remojuadas (Figuras 4-6).

### *III. 6 Procesamiento de muestras para microscopía de luz*

De las semillas endurecidas o sometidas al tratamiento de reversión secas e imbibidas se realizaron secciones, no mayores de 3 mm de testa, hilo y cotiledones. Los cortes se fijaron con glutaraldehído-paraformaldehído 3%-1.5% en amortiguador de colidina 0.1 M. con sacarosa al 0.12 M.

Se deshidrataron en alcoholes graduales, 20 min en cada uno. En algunas ocasiones fue necesario emplear fijación al vacío por que la penetración del fijador, en las condiciones normales no era adecuada, principalmente para la testa e hilo.

La preinclusión se hizo en óxido de propileno, 3 cambios de 20 min. cada uno.

La inclusión en resina fue lenta, iniciando con una proporción de 1:1 epon-óxido de propileno, el tejido permaneció en esta solución 24 horas, después se trasladó a una solución 2:1 epon-óxido de propileno donde permaneció de 24 a 48 horas. Al término de éste tiempo, se sacaron las secciones de tejido y se pasaron a las tabletas de inclusión con epon al 100 %. Posteriormente se introdujeron a la cámara de polimerización en donde se dejaron 24 horas a 60°C.

Una vez obtenidos los bloques se procedió a rebajarlos y a construir las pirámides, para realizar los cortes se empleó el ultramicrotomo Sorval MT2-B, Dupont Instruments (21, 59, 69, 70). Dada la dureza del material se tuvo que cortar con cuchilla de diamante.

Los cortes se tiñeron con azul de toluidina al 1% .

### *III. 7 Fotomicrografías*

Se tomaron fotomicrografías en blanco y negro con rollo carga Technical Pan de Kodak y en color con rollo Gold 100 Ektacrome. El sistema óptico empleado para observar las preparaciones de testa e hilo fue campo claro, mientras que las de cotiledones se efectuaron en el sistema óptico de contraste de fases, en un fotomicroscopio Olympus BH-2-RFCA.

***IV. Identificación de los cambios estructurales inducidos durante la imbibición y endurecimiento de la semilla de frijol, que inciden en el tiempo de cocción.***

***IV. 1.1. Resultados***

En la primera parte se presentan los resultados de la comparación de la semillas frescas de ambos cultivares; la segunda sección se refiere a los cambios microestructurales asociados con el endurecimiento en testa, hilo y cotiledones de ambos cultivares y que inciden en el tiempo de cocción. En la tercera sección, se abordan los cambios estructurales provocados por el remojo en las semillas frescas de los dos cultivares relacionados con el tiempo de cocción; posteriormente se analizan las modificaciones estructurales que provoca el remojo en las semillas almacenadas.

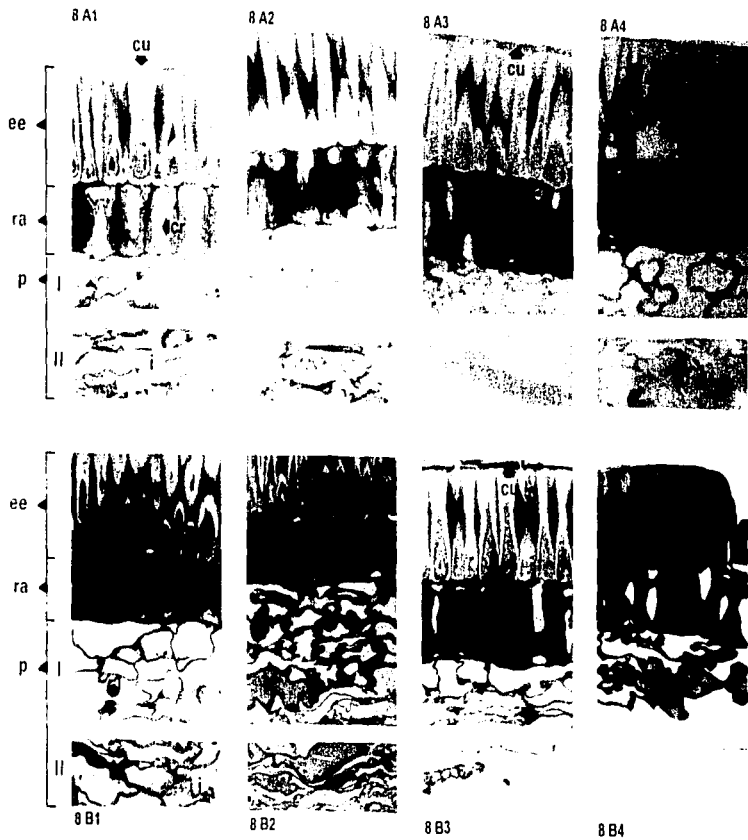
***La apariencia de las inclusiones de la testa e hilo son diferentes entre flor de junio y flor de mayo.***

La estructura de la cubierta de la semilla fresca, la testa, para ambos cultivares se muestra en las figuras 8 A, y 8 B<sub>1</sub>, en ellas se distinguen la cutícula y tres estratos: el esclerénquima en empalizada, las células reloj de arena y el parénquima. Con excepción de la cutícula, todos los demás estratos contienen inclusiones identificadas como compuestos fenólicos y las células reloj de arena contienen cristales de oxalato de calcio (90, 27).

En el cv. FJ, la cutícula presentó una apariencia continua, mientras que en FM, ésta misma estructura, se observó discontinua (rupturas, Fig 8 A<sub>1</sub>).

En ambos cultivares, las inclusiones del esclerénquima en empalizada presentaron una apariencia similar y se distribuyeron en todo el lumen de las mismas. La integridad celular de las células reloj de arena estuvo bien definida, de tal manera que los límites celulares se distinguieron claramente, así mismo, la densidad de este estrato fue homogénea. Los cristales de oxalato de calcio, presentes en este estrato, fueron más grandes y evidentes para el cv. FM que para FJ, llenando generalmente todo el lumen de la célula que los contenía.

**Figura 5. Metodología empleada con las semillas de *Phaseolus vulgaris*, sometidas a 1.5, 3.0 y 6.0 meses de almacenamiento. MO= microscopía óptica.**



**Figura 8. Efecto del almacenamiento en los estratos de la testa de semillas de frijol. (A) Secciones transversales del cv. FM. (40 X). (B) Secciones transversales del cv. FJ. (40 X). 8 A1 y 8 B1 Fresco; 8 A2 y 8 B2 con 1.5 meses de almacenamiento; 8 A3 y 8 B3 con 3.0 meses de almacenamiento; 8 A4 y 8 B4 con 6.0 meses de almacenamiento. cu, cutícula; ee, esclerénquima en empalizada; ra, células reloj de arena; p, parénquima; I, parénquima cercano a las células reloj de arena; II, parénquima cercano a los cotiledones; I, inclusiones; cr, cristales.**

En ambos cultivares, las inclusiones presentes en la capa celular del parénquima cercano a los cotiledones (zona II, figura 8 A<sub>1</sub>), ocupaban completamente algunas de éstas, aunque su apariencia no fue similar. En las inclusiones presentes en FM, se distinguieron dos regiones una hialina y otra que exhibió fracturas, localizada en el centro de la inclusión. La primera ocupando una área mayor que la segunda. En el caso de FJ, se presentaron dos tipos de inclusiones, unas más homogéneas interrumpidas por muy pocas fracturas y otras de aspecto reticulado con espacios internos.

La región del parénquima del hilo fue similar a las áreas ya descritas de la testa. En los dos cultivares, las células parenquimatosas del hilo presentaron una pared celular gruesa y en su interior se observaron inclusiones semejantes a las que se registraron en las células del parénquima de la testa. En el cv. FJ, las inclusiones mostraron una apariencia septada y otra reticulada con espacios internos (figuras 9 B<sub>1</sub>, 15 B<sub>1</sub> y 15 B<sub>2</sub>), mientras que en FM, se presentaron septadas y algunas con un centro ópticamente vacío (figura 9 A<sub>1</sub> y 15 A<sub>1</sub>).

***El grosor y presencia de lamelaciones de la pared celular de las células cotiledonarias no es similar entre los dos cultivares.***

En los cotiledones de ambos cultivares se observaron diversas microestructuras muy bien definidas, tales como: pared celular, gránulos de almidón y cuerpos proteicos.

En los frijoles frescos del cv. FJ, la pared celular de las células de los cotiledones fue de grosor regular y de aspecto liso, mientras que en FM, su grosor fue irregular y presentó estructuras semejantes a lamelaciones en las zonas de mayor grosor. En las zonas delgadas, se pudieron observar claramente, los plasmodesmos, cuya abundancia aparente fue mayor en FM que en FJ (figura 10 A<sub>1</sub> y 10 B<sub>1</sub>).

En los cotiledones de ambos cultivares, los espacios entre las células adyacentes fueron amplios. Se observó una abundante cantidad de cuerpos proteicos bien definidos que cubrían todo el protoplasto. La apariencia de los



**Figura 9. Efecto del almacenamiento en las células del parénquima del hilo de semillas de frijol. (A) Secciones transversales del cv. FM. (40 X). (B) Secciones transversales del cv. FJ. (40 X). 9 A1 y 9 B1 Fresco; 9 A2 y 9 B2 con 1.5 meses de almacenamiento; 9 A3 y 9 B3 con 3.0 meses de almacenamiento; 9 A4 y 9 B4 con 6.0 meses de almacenamiento. i, inclusiones; pc, paredes celulares.**

9 A1



9 A2



9 A3



9 A4



9 B1



9 B2

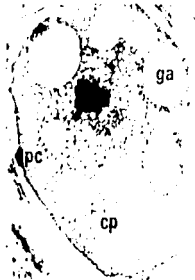
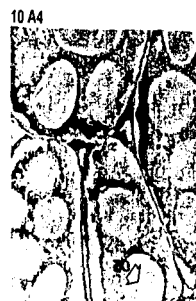
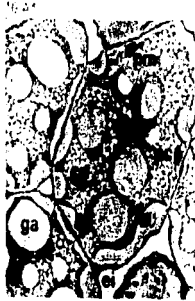


9 B3



9 B4

**Figura 10. Efecto del almacenamiento en las células cotiledonarias de semillas de frijol. (A) Secciones transversales del cv. FM. (40 X). (B) Secciones transversales del cv. FJ. (40 X). 10 A1 y 10 B1 Fresco; 10 A2 y 10 B2 con 1.5 meses de almacenamiento; 10 A3 y 10 B3 con 3.0 meses de almacenamiento; 10 A4 y 10 B4 con 6.0 meses de almacenamiento. *pc*, pared celular; *la*, lamelaciones, *pm*, plasmodesmos; *cp*, cuerpos proteicos; *ga*, granos de almidón; *ei*, espacios intercelulares; *n*, núcleo; *co*, regiones de coalecencia; *zo*, zonas claras; *df*, deformaciones, *pl*, pliegues.**



granos de almidón fue semejante en los dos cultivares, grandes y bien delimitados.

***El almacenamiento del frijol en condiciones subóptimas aumentó la dureza de la semilla y la microestructura de algunos de sus componentes se modificaron.***

La dureza de la semilla se incrementó a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento. Esto se manifestó como un aumento en la resistencia del tejido al corte, de tal manera que a partir de los tres meses de almacenamiento fue necesario emplear una cuchilla de diamante para realizar las secciones.

A cualquier tiempo de almacenamiento, las semillas de ambos cultivares presentaron una cutícula continua (figura 8 A y 8 B 2-4). Las inclusiones de los diferentes estratos de la testa y del hilo se fragmentaron de tal manera que a los seis meses de almacenamiento en el esclerénquima en empalizada (figuras 8 A 4, 8 B 4; 14 A<sub>1</sub> y 14 B<sub>1</sub>) y en el parénquima de la testa (figuras 8 A 4, 8 B 4; 14 A<sub>3</sub> y 14 B<sub>3</sub>) y del hilo (figura 9 A 4 y 9 B 4) las inclusiones mostraron un aspecto septado. En el hilo, además, la densidad de las inclusiones se intensificó.

La apariencia de las células de los cotiledones se modificó por el almacenamiento. En ambos cultivares el cambio inducido fue similar, pero la magnitud del mismo fue diferente en cada uno (comparar figura 10 A<sub>3</sub> con 10 B<sub>3</sub>). Los espacios intercelulares entre células adyacentes disminuyeron a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento. Esta reducción fue mayor para FJ, que para FM (comparar figuras 10 A<sub>4</sub> con 10 B<sub>4</sub>).

De manera progresiva los cuerpos proteicos perdieron nitidez, concomitantemente se observó la aparición de vesículas de mayor tamaño y también de áreas de material más denso (figura 10). Cabe resaltar que estos cambios se presentaron más temprano y conspicuos en FM que en FJ (comparar en la figura 10 A<sub>3</sub> y B<sub>3</sub>).

Después del almacenamiento, en los gránulos de almidón, tanto en FM como en FJ, se notaron algunas zonas claras (figura 10, A<sub>3</sub> y B<sub>3</sub>). En FM,

también se observaron algunas regiones de coalecencia de los gránulos (figura 10, A<sub>3</sub>) y pequeñas inclusiones, mientras que en FJ, se observaron algunas deformaciones y pocos pliegues, que no se presentaron en los frijoles frescos (figura 10, B<sub>4</sub>).

***Las inclusiones de la testa e hilo se solubilizan durante el remojo del frijol fresco y el grosor de la pared celular de las células cotiledonarias aumenta durante este mismo tratamiento.***

Para definir los cambios estructurales causados por el remojo, lo que se hizo fue observar cortes histológicos de semillas remojadas y compararlas con los de las semillas no remojadas.

Durante el remojo se solubiliaron los cristales de oxalato de las células de reloj, así como las inclusiones del esclerénquima en empalizada, muchos lúmenes de este estrato celular se observaron vacíos y en otros su contenido fue escaso (comparar figuras 11 A<sub>1</sub> y 11 B<sub>1</sub> con 8 A<sub>1</sub> y 8 B<sub>1</sub>; 14 A<sub>1</sub> y 14 B<sub>1</sub> con 14 A<sub>4</sub> y 14 B<sub>4</sub>).

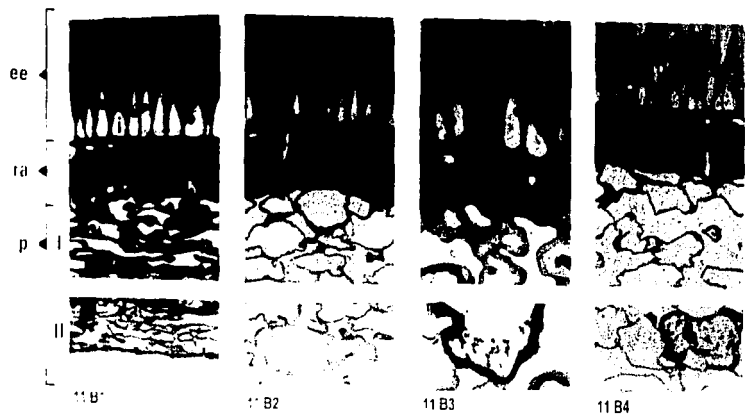
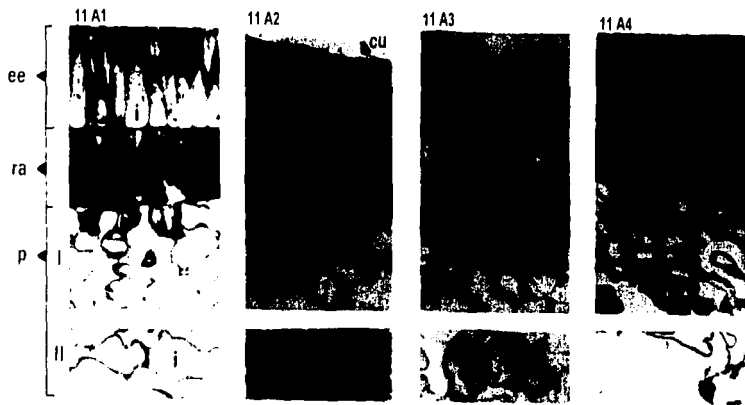
Así mismo, durante el remojo, también se modificó la apariencia de las inclusiones parenquimatosas (comparar figuras 11 A<sub>1</sub> y B<sub>1</sub> con 8 A<sub>1</sub> y B<sub>1</sub>; 14 A<sub>2</sub> y 14 B<sub>2</sub> con 14 A<sub>5</sub> y 14 B<sub>5</sub>).

El aumento de agua en la semilla también modificó el grosor de las paredes de algunos de los estratos celulares, por ejemplo, la pared de las células de reloj de arena se engrosó

Las inclusiones de las células parenquimatosas del hilo presentaron la apariencia similar a las del esclerénquima en empalizada y parénquima de la testa (figura 12A<sub>1</sub>, 12 B<sub>1</sub> y figura 15).

Contrastantemente, la imbibición de la semilla de frijol no modificó la microestructura de las células cotiledonarias, solo aumentó el grosor de la pared celular (comparar figura 10 B<sub>1</sub> con figura 13 B<sub>1</sub>).

Figura 11. Efecto remojo y almacenamiento en los estratos de la testa de semillas de frijol (A) Secciones transversales del cv. FM. (40 X). (B) Secciones transversales del cv. FJ. (40 X). 11 A1 y 11 B1 Fresco; 11 A2 y 11 B2 con 1.5 meses de almacenamiento; 11 A3 y 11 B3 con 3.0 meses de almacenamiento; 11 A4 y 11 B4 con 6.0 meses de almacenamiento. *cu*, cutícula; **●●**, esclerénquima en empalizada; *ra*, células reloj de arena; *p*, parénquima; *I*, parénquima cercano a las células reloj de arena; *II*, parénquima cercano a los cotiledones; *i*, inclusiones; *cr*, cristales.







**Figura 12. Efecto del remojo y almacenamiento en las células del parénquima del hilo de semillas de frijol. (A) Secciones transversales del cv. FM. (40 X) (B) Secciones transversales del cv. FJ. (40 X). 12 A1 y 12 B1 Fresco; 12 A2 y 12 B2 con 1.5 meses de almacenamiento; 12 A3 y 12 B3 con 3.0 meses de almacenamiento; 12 A4 y 12 B4 con 6.0 meses de almacenamiento. i, inclusiones; pc, paredes celulares.**

12 A1



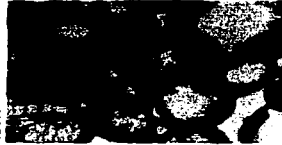
12 A2



12 A3



12 A4



12 B1



12 B2



12 B3



12 B4



**Figura 13. Efecto del remojo y almacenamiento en las células cotiledonarias de semillas de frijol. (A) Secciones transversales del cv. FM. (40 X). (B) Secciones transversales del cv. FJ. (40 X). 13 A1 y 13 B1 Fresco; 13 A2 y 13 B2 con 1.5 meses de almacenamiento; 13 A3 y 13 B3 con 3.0 meses de almacenamiento; 13 A4 y 13 B4 con 6.0 meses de almacenamiento. *pc*, pared celular; *la*, lamelaciones, *pm*, plasmodesmos; *cp*, cuerpos proteicos; *ga*, granos de almidón; *ei*, espacios intercelulares; *n*, núcleo; *co*, regiones de coalecencia; *zo*, zonas claras; *df*, deformaciones, *pl*, pliegues.**

13 A1



13 A2



13 A3



13 A4



13 B1



13 B2



13 B3



13 B4

**Figura 14. Detalles del efecto del almacenamiento y remojo en algunos estratos de la testa. (A) Secciones transversales del cv. FM. (100 X). (B) Secciones transversales del cv. FJ. (100 X). 14 A1 y 14 B1, inclusiones del esclerénquima en empalizada con 6 meses de almacenamiento. 14 A2 y 14 B2, células reloj de arena con 6 meses de almacenamiento. 14 A3 y 14 B3, inclusiones del parénquima con 6 meses de almacenamiento. 14 A4 y 14 B4, inclusiones del esclerénquima en empalizada de frijoles frescos remojados. 14 A5 y 14 B5, inclusiones del parénquima de frijoles frescos remojados.**



14 A1



14 B1



14 A2



14 B2



14 A3



14 B3



14 A4



14 B4



14 A5



14 B5

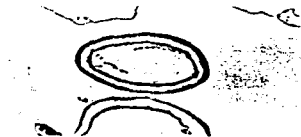
**Figura 15. Detalles del efecto del almacenamiento y remojo en las inclusiones del parénquima del hilo. (A) Secciones transversales del cv. FM. (100 X). (B) Secciones transversales del cv. FJ. (100 X). 15 A1 y 15 B1, semillas frescas. 15 A2 semillas frescas remojadas. 15 B2, semillas frescas. 15 A3 semillas frescas y remojadas 15 B3, semillas con 6 meses de almacenamiento. 15 A4 y 15 B4, semillas con 6.0 meses de almacenamiento y remojadas.**



15 A1



15 B1



15 A2



15 B2



15 A3



15 B3



15 A4



15 B4



***El tiempo de cocción del frijol fresco, fue menor en la semilla remojada que en la semilla sin remojar.***

El tiempo de cocción para las semillas de ambos cultivares, fue similar y mayor de 2 h (Tabla 1). En ambos casos, el remojo de la semilla, previó al tratamiento de cocción, disminuyó el tiempo requerido para la suavización de la semilla. Esta disminución fue de la misma magnitud para los dos cultivares (Tabla 1).

Cultivar	Flor de Mayo	Flor de Junio
Tratamiento	tiempo/ h	
No-remojado	2.23	2.13
remojado	1.23	1.12

***Durante el remojo de las semillas almacenadas, las inclusiones de la testa no se solubilizan y la cutícula se fractura.***

Cuando se remojaron las semillas almacenadas, de ambos cultivares, la cutícula se fracturó y se observaron numerosas rupturas (figura 11 A 2). Estos cambios fueron mucho más evidentes en FJ que en FM. Así mismo, las paredes de las células reloj de arena se hincharon, agrietaron y disminuyeron su integridad ( figuras 11 A 2 y 11 B 3).

Los cambios más espectaculares inducidos por efecto del remojo, en la semilla almacenada, se observaron en las inclusiones del esclerénquima en empalizada y en las del parénquima de la testa. En el primer estrato, las inclusiones se presentaron como estructuras de apariencia granulosa (figuras 11 A 4 y 11 B 3). El tamaño y densidad de estas granulaciones fue mayor entre mayor tiempo de almacenamiento tenía la semilla (figura 11). De tal forma que en las semillas almacenadas por seis meses, las densas granulaciones abarcaban

amplias áreas del lumen celular. La abundancia y densidad de estas inclusiones fue mayor en el cv. FM que en FJ (figuras 11 A<sub>4</sub>, 11 B<sub>4</sub>).

En el parénquima de las semillas almacenadas y remojadas del cv. FM, la apariencia de las inclusiones fue diferente a los diversos tiempos de almacenamiento (figura 11). A tiempos cortos de almacenamiento, las inclusiones presentaron apariencia granular compacta, mientras que a tiempos largos de almacenamiento, su aspecto fue granular con algunos cúmulos de material más denso y con áreas ópticamente vacías. En contraste, en el cv. FJ sometido a los mismos tratamientos, solo algunas células mostraron inclusiones con material granular disperso, por lo que se observaron espacios vacíos en el lumen celular (figuras 11 B<sub>2</sub>, 11 B<sub>3</sub> y 11 B<sub>4</sub>).

El remojo de las semillas almacenadas también indujo modificaciones en la apariencia de las inclusiones presentes en las células parenquimatosas del hilo. En el cv. FM, se notó la presencia de material poco denso con porciones filamentosas y granulares (figuras 12 A<sub>2</sub>, 12 A<sub>3</sub> y 15 A<sub>3</sub>) que tendieron a unirse a mayor tiempo de almacenamiento, hasta que a los 6 meses se observó que éste material cubría completamente el interior de las células, también se notaron rupturas de diferentes grosores lo que le dio a la inclusión una apariencia fracturada (figura 12 A<sub>4</sub>). En FJ, también se observó el material granuloso y filamentosos, descrito para FM (figuras 12 A<sub>2</sub> y 12 A<sub>3</sub>) que en ocasiones formó estructuras reticulares (figura 12 B<sub>3</sub>), que aumentaron con el tiempo de almacenamiento, sin embargo nunca llegó a cubrir completamente el interior de la célula, ni presentó rupturas (figura 12 B<sub>4</sub>).

El hecho de que a diferencia de las semillas frescas, el remojo de las semillas almacenadas no favorezca la solubilización de las inclusiones de la testa, indica que éstas se modificaron durante el almacenamiento de las semillas en condiciones subóptimas.

El remojo de las semillas almacenadas no produjo cambios observables en la microestructura de los cotiledones y al igual que en semillas frescas los cambios solo se observaron a nivel de la pared celular (figura 13).

En las semillas almacenadas de ambos cultivares, el remojo produjo un incremento en el grosor de la pared de las células de los cotiledones (figuras 13 A<sub>3</sub> y 13 B<sub>4</sub>). En estos engrosamientos se observaron lamelaciones (figuras 13 A<sub>2</sub> y 13 B<sub>4</sub>), las cuales fueron más evidentes a tiempos largos de endurecimiento. Los espacios intercelulares se redujeron y en algunos de estos espacios se observó material granuloso que fue más evidente en FM (figura 13 A<sub>2</sub>) que en FJ (figuras 13 B<sub>2</sub> y 13 B<sub>3</sub>). No obstante, para ambos casos este material granuloso, disminuyó a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento (figuras 13 A<sub>2</sub> y 13 A<sub>4</sub>; comparar figuras 13 B<sub>3</sub> con 13 B<sub>4</sub>).

Los cuerpos proteicos de las semillas almacenadas y remojadas presentaron una disminución en la nitidez de sus límites, debido aparentemente a la formación de vesículas de mayor tamaño y a la aparición de una substancia de mayor densidad, estos cambios fueron progresivos ( figura 13). En las semillas del cultivar FM, estas modificaciones fueron más intensas y se observaron a menor tiempo de almacenamiento (figura 13 A<sub>2</sub>) que en FJ (figura 13 B<sub>3</sub>).

En las semillas almacenadas y remojadas de FM, algunos gránulos de almidón se fusionaron (figuras 13 A<sub>3</sub> y 13 A<sub>4</sub>) mientras que en FJ, solo a los 6 meses de almacenamiento se observaron áreas claras en el centro de los gránulos (figura 13 B<sub>4</sub>).

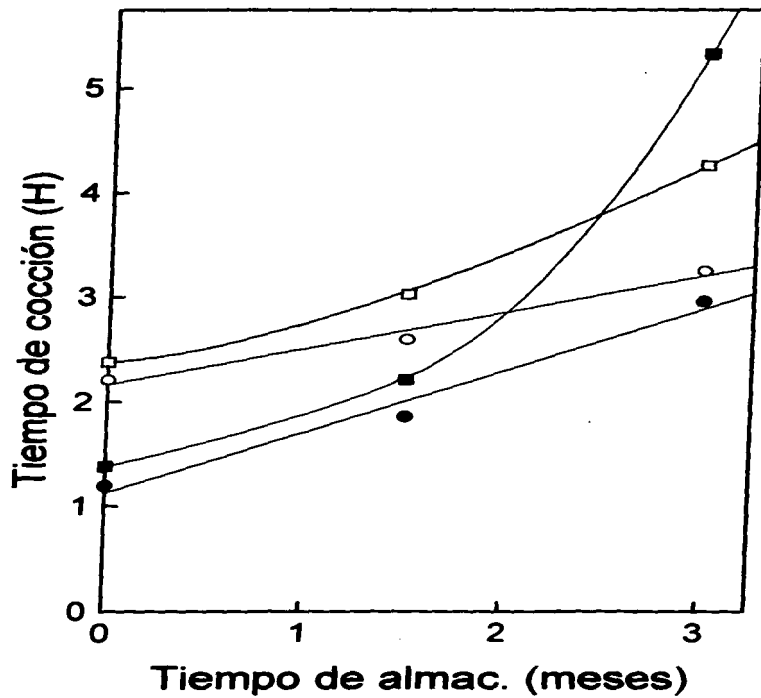
***La sensibilidad al endurecimiento es mayor cuando la determinación se realiza en frijoles remojados que en frijoles secos.***

A diferencia de lo observado en las semillas frescas de ambos cultivares, en las que el remojo disminuyó el tiempo de cocción, en las semillas almacenadas el efecto del remojo fue dependiente del cultivar y del tiempo de almacenamiento de la semilla.

En el frijol FJ, a todos los tiempos de almacenamiento, el remojo disminuyó el tiempo de cocción, en cambio en el cultivar FM este efecto fue observable solo a 1.5 meses de almacenamiento (figura16)

Figura 16. Relación entre el tiempo de cocción y el tiempo de almacenamiento de las semillas de frijol *Phaseolus vulgaris*, FM seco □, FM remojado ■.

FJ seco ○, FJ remojado ●.



En cuanto a su sensibilidad al endurecimiento, cuantificada como la tendencia a incrementar el tiempo de cocción a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento, se observó que el cultivar FM, tiene mayor sensibilidad que FJ, y esta diferencia fue aún mayor cuando en la determinación se utilizaron frijoles remojados (figura 16). Esto sugiere que el remojo, de alguna manera, intensifica los efectos deletéreos que el almacenamiento subóptimo tiene sobre los frijoles.

Las semillas de ambos cultivares, almacenados por seis meses, no se cocieron aún cuando el tratamiento térmico fue aplicado por siete horas.

Cuando se analizan las pendientes de las curvas de la figura 16, la velocidad de endurecimiento que presentó el cultivar FM seco (0.62667) fue dos veces mayor que la de FJ seco (0.34667), para ambos casos la velocidad de endurecimiento fue constante. Esto sugiere que podría tratarse de un mismo proceso que se va intensificando a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento. Cuando se cuantificó el endurecimiento en frijoles remojados el comportamiento de FM indicó dos diferentes velocidades, una que se presentó hasta 1.5 meses de deterioro (0.5533) similar a la velocidad de endurecimiento cuando la semilla no se remoja, y otra velocidad mucho más rápida hasta los 3 meses de almacenamiento (2.08), lo que puede interpretarse como: que a partir de 1.5 meses de almacenamiento en FM se desencadenan una serie de procesos cuya magnitud se incrementa por efecto del remojo. El hecho de que el agua los incremente sugiere que puede tratarse de eventos asociados con la germinación y que incrementan el tiempo de cocción.

El comportamiento de FJ ante el endurecimiento muestra que la velocidad depende de si la cuantificación se realizó en frijol seco o remojado, en FJ seco la velocidad fue de 0.34667 y en el remojado fue de 0.58667, lo que confirma que el agua actúa acelerando los cambios que conducen al endurecimiento.

## **IV.1. 2 DISCUSIÓN**

El remojo y la cocción de los frijoles son dos procesos separados que pueden o no llevarse a cabo sucesivamente. Ambos influyen en la textura de la semilla. La textura es una característica muy importante en la calidad culinaria del frijol, y es por esto, que en la práctica, la textura del frijol se cuantifica a través de su tiempo de cocción.

En el caso del frijol, al igual que en el de otros productos vegetales, la textura es una consecuencia directa del arreglo de sus componentes en la estructura, la que a su vez está determinada por la composición química de la semilla (81, 86, 54)

El efecto del tratamiento térmico en la semilla del frijol se determina con diferentes equipos, pero en todos ellos se cuantifica la textura de la semilla completa, esto es la suavización de la testa y de los cotiledones. Sin embargo, en la actualidad la suavización térmica de la semilla se atribuye únicamente a cambios en los componentes de los cotiledones (62, 100, 94, 43, 44, 3). Los resultados descritos en este trabajo demuestran que los componentes de la testa también contribuyen a la suavización térmica de la semilla de frijol.

Las células que forman la testa son células de pared gruesa que proveen fuerza mecánica y rigidez a la semilla (19, 94). Este tejido es rico en fenoles (90, 27), que se encuentran depositados en pequeñas vacuolas que al microscopio de luz se observan como inclusiones.

Las características estructurales de las testa de los cultivares de frijol aquí estudiados, fueron similares. Sin embargo, la apariencia y distribución de las inclusiones fue dependiente del cultivar. Dado que los fenoles son sustancias químicas que poseen un anillo aromático y uno o varios hidroxilos, en la célula se pueden encontrar como diversos derivados: libres, esterificados, glucosídicos, condensados (26). Por lo que las diferencias de apariencia observadas en las inclusiones de la testa podrían deberse a diferencias en el tipo y abundancia de

los derivados fenólicos que las constituyen. Independientemente de que tipo de derivados fenólicos estén presentes en las inclusiones de los cvs. FJ y FM, éstos son solubles en agua, ya que en ambos cultivares la mayoría se solubilizan durante el remojo. Esta disminución resulta en menores tiempos de cocción de las semillas, indicando que estos compuestos contribuyen a la dureza de las mismas.

Sin embargo, para que la remoción de fenoles de la testa durante el remojo sea benéfica en el tiempo de cocción, se requiere que los fenoles solubilizados no estén presentes durante el tratamiento térmico. Esto se infiere del hecho de que en los primeros 15 min. de tratamiento térmico, los frijoles no remojados se hidratan al mismo nivel que los hidratados a temperatura ambiente por 18 h y es de esperarse que las inclusiones se hayan removido. En el caso en que el agua de remojo que contiene a los fenoles se desheche y el tratamiento térmico se efectúe en agua fresca, el tiempo de cocción es menor que en el caso en el que el tratamiento térmico se realice en el agua en que se solubilizaron los fenoles.

La presencia de compuestos fenólicos durante la cocción podría facilitar la esterificación con polímeros de la pared celular y de esta manera disminuir la solubilidad de la lámina media, fenómeno que constituye uno de los eventos que se realizan durante el proceso térmico y conducen a la suavización de la semilla (100, 94, 3). Otra evidencia que apoya la propuesta de que los compuestos que forman las inclusiones participan en el proceso de cocción, se deriva del hecho de que cuando los frijoles se almacenan en condiciones subóptimas, su tiempo de cocción se incrementa y se dice que el frijol se ha endurecido (94, 2, 32, 45, 42, 34, 11). Aparentemente a este endurecimiento contribuye la testa, específicamente las inclusiones, porque en el frijol endurecido, éstas cambian de apariencia, distribución y propiedades fisicoquímicas, pues su solubilidad en agua disminuye considerablemente, y se refleja en el hecho de que el remojo de los frijoles endurecidos no resulta en una disminución del tiempo de cocción, a diferencia de lo que sucede en frijoles frescos.



Estos resultados no excluyen las modificaciones en los cotiledones que se presentan durante el remojo, tratamiento térmico y endurecimiento que contribuyen a la suavización de la semilla.

Los cambios más aparentes inducidos por estos tratamientos fueron a nivel de espacios intercelulares y cuerpos proteicos. Estos últimos pierden su integridad durante el endurecimiento, pero su estructura no se modifica de manera visible durante el remojo de la semilla.

El tamaño y número de espacios intercelulares disminuyen por efecto del remojo y almacenamiento, debido muy probablemente a la hidratación de los polímeros de la pared celular. Esta hidratación en algunos casos se reflejó como un aumento en el grosor de la pared celular.

Durante el remojo de la semilla la actividad del agua en la misma se incrementa, esto podría contribuir a activar enzimas de la pared celular, que dependiendo de su acción resultarán en un aumento o disminución de la sensibilidad térmica de la pared celular y por ende en un mayor o menor tiempo de cocción. Por ejemplo, el remojo de frijoles frescos podría activar algunas hidrolasas de la pared celular, lo que resultaría en una disminución del peso molecular de los polímeros de los azúcares de la pared celular y por tanto en una mayor termosensibilidad, mientras que durante el almacenamiento y debido a la pequeña cantidad de agua presente en la semilla, el tipo de enzima activada fuese una cuya acción disminuyera la termosensibilidad de los polímeros de la pared celular i.e. peroxidasa, la que entrecruzaría grupos fenólicos unidos a dos cadenas paralelas de polisacáridos, con lo que disminuiría la termosensibilidad de la pared celular y por tanto en su posterior remojo, ya no podría ser modificada. Sin embargo, si algunos de estos cambios moleculares suceden en la semilla, estos no son detectables por microscopía fotónica y esto podría explicar porque en las preparaciones no se observan diferencias en los cotiledones de las semillas sometidas a los diferentes tratamientos.

***V. Cambios microestructurales en las semillas endurecidas de frijol después de ser sometidas a un tratamiento de reversión***

***V.1 Resultados y Discusión***

Con la finalidad de identificar los cambios microestructurales que se realizan en el fenómeno de reversión del frijol endurecido, en esta sección se comparó la microestructura de frijoles con diversos grados de endurecimiento, con la de los frijoles almacenados a 75 % HR y 8°C, condiciones de reversión del endurecimiento. Esta reversión podría deberse a que las biomoléculas y/o microestructuras modificadas durante el endurecimiento regresan a su estado original o bien a que se realizan otras modificaciones que facilitan la termosuavización.

***El almacenamiento de frijol endurecido a baja temperatura y alta humedad disminuye su tiempo de cocción.***

Lotes de semillas de frijol con diversos grados de endurecimiento se almacenaron a 75 % de HR y 8°C por 6 meses. A estas muestras se les determinó su tiempo de cocción y se comparó con el que mostraban las semillas endurecidas, previo al tratamiento de reversión (Tabla 2). El efecto del tratamiento de reversión resultó en una disminución del tiempo de cocción del frijol, observándose sólo en los frijoles cuyo tiempo de cocción fué mayor de 3 h. En el cultivar flor de mayo esta disminución se observó a partir de los frijoles endurecidos por tres meses.

Tabla 2. Calidad de cocción de dos cultivares de frijol sometidos a dos condiciones de almacenamiento.												
Tiempo de cocción (h) <sup>1</sup>												
Tratamiento del grano	Sin remojo			Remojado			Sin remojo			Remojado		
Cultivar	Flor de Mayo						Flor de Junio					
Cond. grano / tiempo alm.	end <sup>2</sup>	rev <sup>3</sup>	rev. (%) <sup>4</sup>	end <sup>2</sup>	rev <sup>3</sup>	rev. (%) <sup>4</sup>	end <sup>2</sup>	rev <sup>3</sup>	rev. (%) <sup>4</sup>	end <sup>2</sup>	rev <sup>3</sup>	rev. (%) <sup>4</sup>
0 (Lote I)	2.28	Nd.		1.38	Nd.		2.21	Nd.		1.20	Nd.	
1.5 (Lote II)	3.03	2.70	11	2.21	2.06		2.60	2.40		1.86	2.63	
				6.7			7.6			141		
3.0 (Lote III)	4.26	2.65	38	5.33	2.36	56	3.25	3.05		2.96	2.66	
							6.1			10		
6.0 (Lote IV)	Nsc.	5.81		Nsc.	Nsc.		Nsc.	4.36		Nsc.	5.00	

<sup>1</sup> Promedio de dos repeticiones.

<sup>2</sup> Lotes de frijoles almacenados a 29 ° C. de temperatura y 75 % de HR.

<sup>3</sup> Lotes de frijoles almacenados a 8° C. de temperatura y 75% de HR, durante 6.0 meses .

<sup>4</sup> % de reversión, tomado como 100% el Tc. de los frijoles endurecidos.

Nd. No determinado.

Nsc. No se cocieron después de 7 horas.

Mientras que en FJ, se observó sólo en las semillas cuyo grado de dureza fue tal, que no se termosuavizaron. En este caso el efecto de reversión se

manifiestó claramente, i.e. semillas endurecidas que no se cocen, después del tratamiento de reversión se termosuavizaron, aunque con un largo tiempo de cocción (tabla 2).

Las semillas almacenadas en estas condiciones y que disminuyen su tiempo de cocción por el almacenamiento, de aquí en adelante se les denominara semillas revertidas.

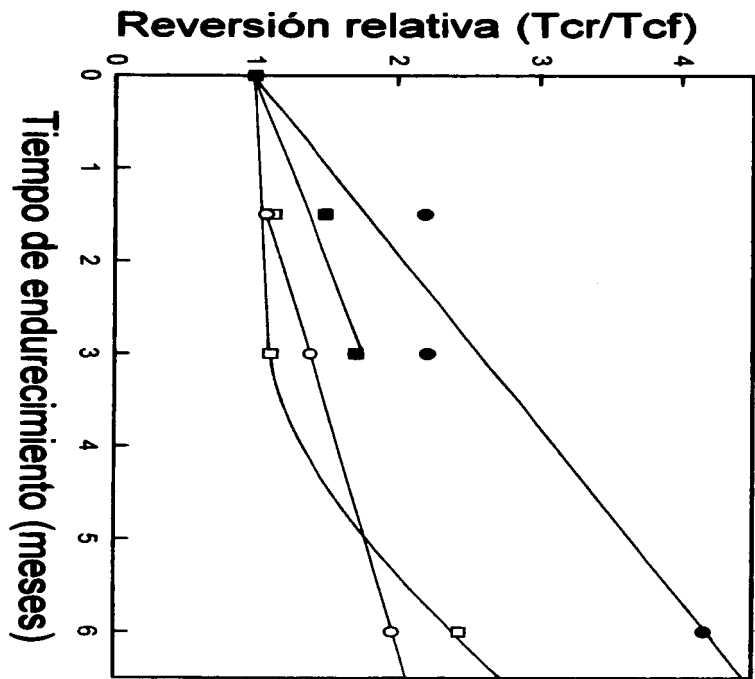
Como se muestra en la figura 17, cuando la reversión del frijol se expresa en términos relativos (el cociente que resulta de dividir el tiempo de cocción que presentó el lote después de la reversión, entre el tiempo de cocción del frijol fresco) la magnitud de la reversión depende de si el efecto se determina con o sin remojo. La reversión fué menor cuando el frijol se remojó previamente al tratamiento térmico y esto se manifestó porque la dureza relativa fue mayor en el frijol revertido y remojado que en el frijol seco. Otro dato sobresaliente en la figura es el hecho de que el efecto de la reversión fue similar en los lotes II y III, sugiriendo que la naturaleza del endurecimiento hasta tres meses de deterioro es reversible. Sin embargo, a mayor grado de endurecimiento (lote IV), el fenómeno tiene cuando menos dos componentes, uno que es reversible y el otro no.

***La disminución del tiempo de cocción del frijol endurecido, esta asociado a cambios en la microestructura de la testa.***

Dado que la disminución del tiempo de cocción del frijol endurecido fue más aparente en el lote III del cv. Flor de mayo y en el lote IV de FM y FJ, estos fueron los lotes de semillas que se utilizaron para estudiar los cambios microestructurales inducidos durante el tratamiento de reversión.

En el caso de FM lote III, en el que la disminución del tiempo de cocción con respecto al lote endurecido fue del 38 % cuando la cocción se realizó con semillas sin remojo y de 56 % cuando se utilizaron semillas remojadas, el

Figura 17. Velocidad relativa de reversión de la semilla endurecida de frijol. El cv. FM seco, □ mostró una reversión casi completa hasta los 3 meses de endurecimiento, después de este tiempo, el endurecimiento aparentemente tiene dos componentes uno reversible y otro irreversible, el elemento reversible permite que los frijoles se ablanden con el tratamiento térmico, situación que no se dio en las semillas endurecidas durante 6 meses y que no se les aplicó el tratamiento de reversión. El cv. FM remojado, ■ mostró una reversión del endurecimiento hasta los tres meses, sin embargo ésta fue menor que la de los frijoles secos, lo que evidencia la intervención del agua como agente que favorece el endurecimiento, ya que los frijoles con 6 meses de endurecimiento, revertsidos y remojados no se cocieron después de 7 horas. El cv. FJ seco, ○ se comportó igual que el cv. FM seco. Las semillas del cv. FJ remojadas, ● si se cocieron, a diferencia de lo observado para el cv. FM remojado.



tratamiento de reversión, no indujo cambios observables en la microestructura de la testa, hilo, ni de los cotiledones cuando la comparación se realizó entre semillas secas (figuras 18,19 y 20). Sin embargo, cuando la semilla se remojó, se observó que la densidad y apariencia de las inclusiones del esclerénquima y del parénquima de testa ; la organización de las células de reloj de arena y la apariencia de las inclusiones de cada uno de los estratos de la testa y del hilo se modificó, aunque estos cambios fueron muy discretos (figuras 21 A<sub>2</sub>, 22 A<sub>2</sub> y tabla 2). En el caso del lote IV, de ambos cultivares, donde el fenómeno de reversión se manifestó de manera franca, la testa no sufrió cambios estructurales conspicuos (figuras 21 A<sub>3</sub> y tabla 2). Estos resultados indican que la testa no contribuye de manera importante al fenómeno de reversión. Lo anterior podría deberse al hecho de que en el fenómeno de endurecimiento del frijol las modificaciones de los cotiledones son más importantes que las de la testa (Bernal-Lugo I, comunicación personal).

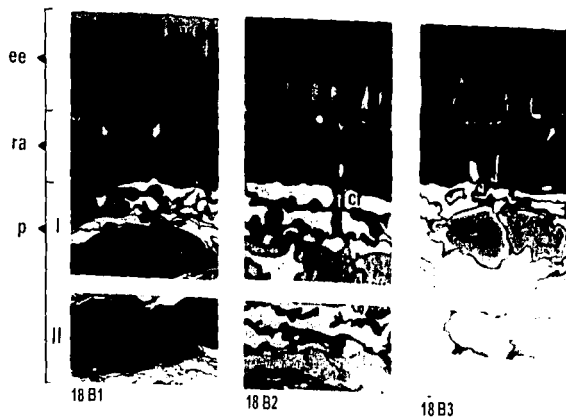
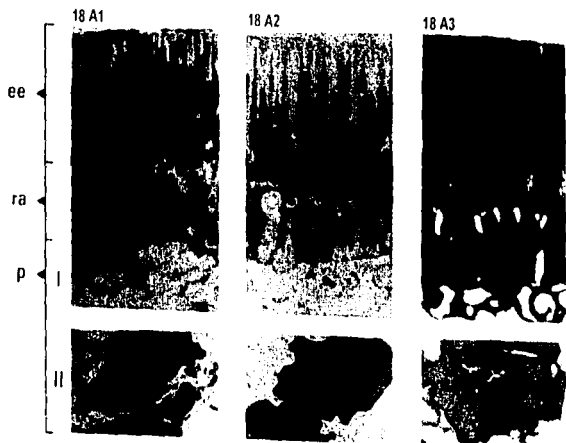
El hilo fue otro de los tejidos estudiados (figura 19). Al igual que la testa la microestructura del hilo de las semillas endurecidas sin remojo, no se modifica notablemente con la reversión; la apariencia de las inclusiones del parénquima del hilo, presentaron cambios similares a los que mostraron las inclusiones de la testa de las semillas remojadas y revertidas, sin embargo estos cambios parecen no guardar relación con los tiempos de cocción.

***El tratamiento de reversión modifica la apariencia de la pared de las células de los cotiledones.***

Por su parte en los frijoles endurecidos que no se cocían y que por efecto del tratamiento de reversión se cuecen, las diferencias más aparentes se observaron a nivel de la pared de las células de los cotiledones. Por ejemplo, el grosor de las paredes celulares, las lamelaciones y los espacios intercelulares aumentaron por efecto del tratamiento de reversión. Este incremento fue más

**Figura 18. Estructuras presentes en los estratos de la testa de semillas de frijol endurecidas, después de se sometidas al tratamiento de reversión (A) Secciones transversales del cv. FM. (40 X) (B) Secciones transversales del cv. FJ. (40 X). 18 A1 y 18 B1, Lote II ;18 A2 y 18 B2, Lote III; 18 A3 y 18 B3, Lote IV. **cu**, cutícula; **ee**, esclerénquima en empalizada; **ra**, células reloj de arena; **p**, parénquima; **I**, parénquima cercano a las células reloj de arena; **II**, parénquima cercano a los cotiledones; **i**, inclusiones; **cr**, cristales.**







**Figura 19. Estructura del hilo de semillas de frijol endurecidas, después de ser sometidas al tratamiento de reversión. (A) Secciones transversales del cv. FM. (40 X). (B) Secciones transversales del cv. FJ. (40 X). 19 A1 y 19 B1, Lote II; 19 A2 y 19 B2, Lote III; 19 A3 y 19 B3, Lote IV I, inclusiones; pc, paredes celulares.**

19 A1



19 A2



19 A3



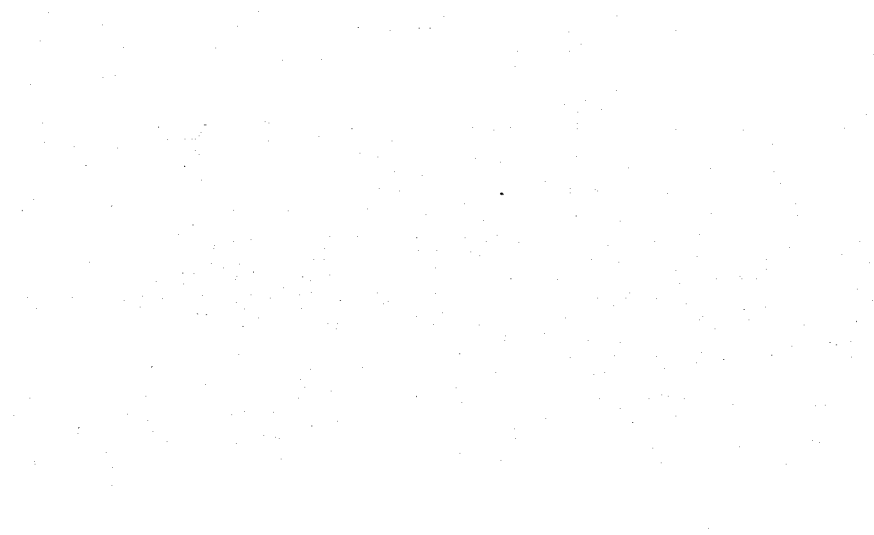
19 B1



19 B2



19 B3



**Figura 20. Estructura de las células cotiledonarias de semillas de frijol endurecidas, después de ser sometidas al tratamiento de reversión. (A) Secciones transversales del cv. FM. (40 X). (B) Secciones transversales del cv. FJ. (40 X). 20 A1 y 20 B1, Lote II; 20 A2 y 20 B2, Lote III ; 20 A3 y 20 B3, Lote IV. pc, pared celular; la, lamelaciones, pm, plasmodesmos; cp, cuerpos proteicos; ga, granos de almidón; ei, espacios intercelulares; n, núcleo; co, regiones de coalecencia; zo, zonas claras; df, deformaciones, pl, pliegues.**

20 A1



20 A2



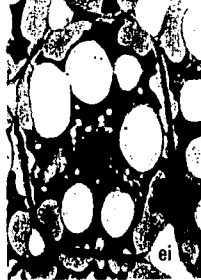
20 A3



20 B1

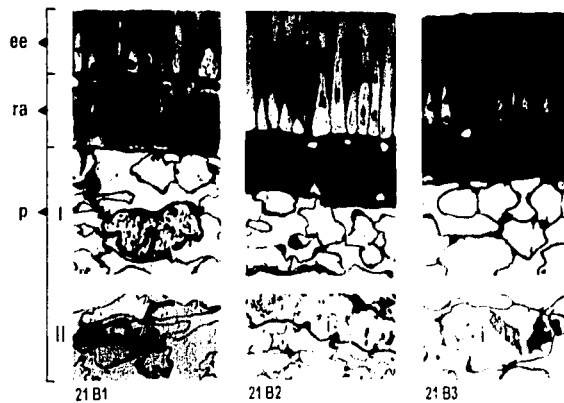
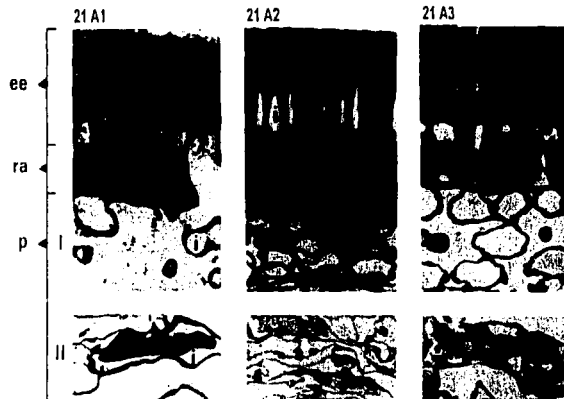


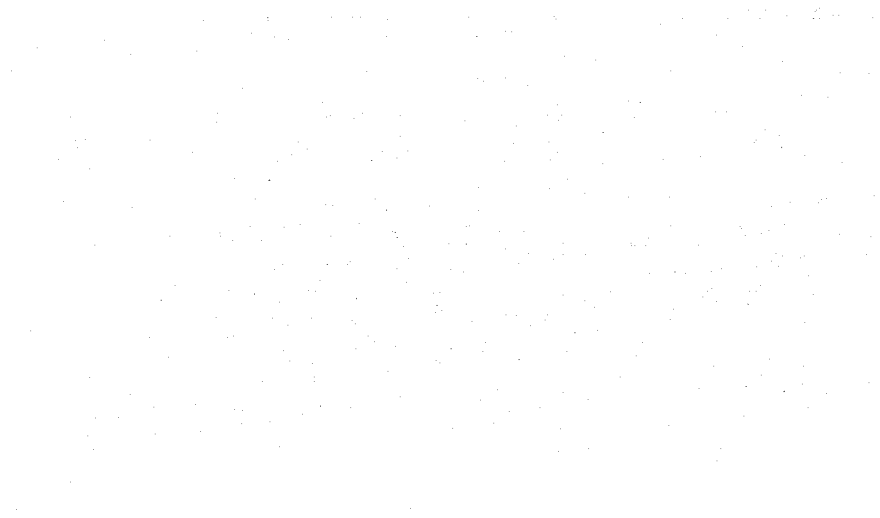
20 B2



20 B3

Figura 21. Efecto del remojo en las estructuras presentes en los estratos de la testa de semillas de frijol endurecidas, después de ser sometidas al tratamiento de reversión. (A) Secciones transversales del cv. FM. (40 X). (B) Secciones transversales del cv. FJ. (40 X). 21 A1 y 21 B1, Lote II; 21 A2 y 21 B2 Lote III; 21 A3 y 21 B3, Lote IV; cu, cutícula; ●●, esclerénquima en empalizada; ra, células reloj de arena; p, parénquima; l, parénquima cercano a las células reloj de arena; ll, parénquima cercano a los cotiledones; i, inclusiones; cr, cristales.





**Figura 22. Efecto del remojo en las células del parénquima del hilo en semillas de frijol endurecido después de ser sometidas al tratamiento de reversión. (A) Secciones transversales del cv. FM. (40 X). (B) Secciones transversales del cv. FJ. (40 X) 22 A1 y 22 B1, Lote II; 22 A2 y 22 B2 Lote III; 22 A3 y 22 B3 Lote IV. I, inclusiones; pc, paredes celulares.**



22 A1



22 A2



22 A3



22 B1



22 B2



22 B3

aparente en los lotes IV de FJ, que en FM (figuras 20 A<sub>3</sub>, 20 B<sub>3</sub>). Durante la imbibición el cambio más notable entre FM y FJ fue que en FM el grosor de la pared celular aumentó notablemente mientras las lamelaciones desaparecieron y en su lugar se observaron granulaciones ( figuras 23 A<sub>3</sub> y 23 B<sub>3</sub>). El resto de las estructuras de las células cotiledonarias no variaron.

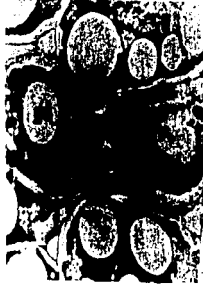
Las modificaciones que ocurren en la pared celular durante el proceso de reversión podrían estar relacionados a cambios en los polisacáridos que influyen en la termosuavización. Aparentemente estos cambios podrían aumentar la permeabilidad de la pared celular facilitando la entrada de agua, la que favorecería la gelatinización del almidón, lo anterior coincide con lo propuesto por Aguilera y Rivera (3) en relación a que la pared celular de los frijoles endurecidos fue más hidrofóbica que la de los frijoles suaves, al aumentar la permeabilidad de la pared celular por la reversión se favorecería la termosuavización. La reversión también podría influir en la solubilización de la lámina media, ya que los frijoles reventados se cuecen, aunque sea en un tiempo largo, mientras que antes del proceso de reversión, no se cocieron. Esta propuesta esta de acuerdo con el hecho de que las propiedades de solubilidad de las pectinas determinan la sensibilidad térmica de la semilla.

Los cambios observados en la pared celular de los cotiledones de frijoles reventados coincide con lo señalado por Aguilera y Rivera (3), quienes resaltaron modificaciones externas de la pared celular después de la reversión inducida por agentes quelantes.

El hecho de que los frijoles reventados del lote IV presenten un grado de dureza mucho mayor que los frescos, sugiere que en el endurecimiento del frijol, existen dos componentes uno reversible y otro irreversible. Sin embargo se requieren estudios bioquímicos y estructurales más finos para determinar la naturaleza de estos dos componentes.

Figura 23. Efecto del remojo en las células cotiledonarias de semillas de frijol endurecidas, después de ser sometidas al tratamiento de reversión. (A) Secciones transversales del cv. FM. (40 X). (B) Secciones transversales del cv. FJ. (40 X). 23 A1 y 23 B1, Lote II; 23 A2 y 23 B2 Lote III ; 23 A3 y 23 B3, Lote IV. **pc**, pared celular; **la**, lamelaciones, **pm**, plasmodesmos; **cp**, cuerpos proteicos; **ga**, granos de almidón; **ei**, espacios intercelulares; **n**, núcleo; **co**, regiones de coalecencia; **zo**, zonas claras; **df**, deformaciones, **pl**, pliegues.

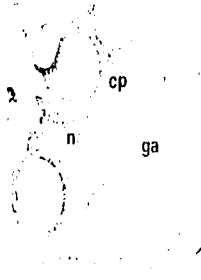
23 A1



23 A2



23 A3



23 B1



23 B2



23 B3

En conclusión, podemos decir que el frijol endurecido se revierte cuando se almacena a 75 % de HR. y 8° C. La efectividad de este tratamiento depende de las condiciones utilizadas para la determinación del tiempo de cocción y el grado de dureza de la semilla empleada. Así mismo, la microscopía fotónica no es una metodología adecuada para detectar los cambios microestructurales, si existe alguno, asociados al fenómeno de reversión.

## **VI. CONCLUSIONES**

1) El tiempo de almacenamiento afectó diferencialmente el comportamiento de ambos cultivares. El cv. Flor de Mayo, se mostró más sensible al endurecimiento que el cv. FJ, y esta sensibilidad se incrementó con el remojo. Se estima que el agua intensifica el deterioro de los frijoles.

2) Durante el remojo del frijol fresco las inclusiones de la testa se solubilizan. Esto hace que la semilla requiera menos tiempo para su termosuavización.

3) Durante el endurecimiento del frijol las inclusiones de la testa se modifican de tal manera que disminuyen su solubilidad en agua.

4) Durante el endurecimiento la apariencia y definición de los cuerpos proteicos se modifican. Estos cambios se intensifican a medida que la semilla se va endureciendo.

5) Los cambios que sufre la pared de las células cotiledonarias, durante el endurecimiento, no pudieron ser identificados con la metodología aquí utilizada.

6) La reversión del fenómeno de endurecimiento no es el resultado de la reversión de los cambios microestructurales de la testa inducidos por el endurecimiento.

7) La pared de las células de los cotiledones se modifican durante la reversión del fenómeno de endurecimiento, pero con la metodología utilizada no se pudo definir en que consistió el cambio.

8). El fenómeno de endurecimiento comprende dos fase, una de las cuales es reversible y la otra no.

#### **LITERATURA CONSULTADA:**

1. Abdul-Kadir R., T. Bargman, and J. Rupnow. 1990. Effect of heat processing on rehydration rate and cooking of *Phaseolus vulgaris* (Var. Pinto). *Journal of Food Science*. 55: 1472-1473.
2. Aguilera J. M., and A. Ballivian. 1987. A kinetic interpretation of textural changes in black beans during prolonged storage. *Journal of Food Science*. 52 : 691-695.
3. Aguilera J., and R. Rivera. 1992. Hard-to-cook defect in black beans: hardening rates, water imbibition and multiple mechanism hypothesis. *Food Research International*. 25: 101-108.
4. Alcalde B. A. 1994. Cultivos básicos: cifras y metodología. En: Quintanilla J. (Ed.) *El agua y la energía en la cadena alimentaria: Granos Básicos*. UNAM. México.
5. Antunes P., and V. Sgarbieri. 1979. Influence of time and conditions of storage on technological and nutritional properties of a dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) variety Rosinha G2. *Journal of Food Science*. 44: 1703-1706.
6. Aykroyd W. R. and J. Doughty. 1982. *Las leguminosas en la nutrición humana*. FAO. Roma.
7. Bhatti R. 1990. Cooking Quality of Lentils: The role of structure and composition of cell walls. *Agric Food Chem*. 38: 376-383.
8. Bernal- Lugo I, G. Prado , C. Parra, E. Moreno, J. Ramírez, and O. Velazco. 1990. Phytic acid hydrolysis and bean susceptibility to storage induced hardening. *Journal of Food Biochemistry*. 14: 253-261.
9. Bernal-Lugo I., and A. Leopold. 1992. Changes in soluble carbohydrates during seed storage. *Plant Physiol*. 98: 1207-1210.
10. Bernal-Lugo I, A. Castillo, F. Díaz de León, E. Moreno, and J. Ramírez. 1992. Does phytic acid influence cooking rate in common beans ? *Journal of Food Biochemistry*. 15: 367-374.
11. Bernal-Lugo I. 1994. Eventos moleculares asociados al endurecimiento del frijol. Cuadernos de Posgrado. Fac. de Química. UNAM. México. 129-141.
12. Bewley J., and M. Black. 1978. *Physiology and biochemistry of seeds*. Springer- Verlag. New York.

13. Bressani R. 1993. Evolución de la Ciencia y la Tecnología de alimentos en los países en desarrollo durante los últimos 50 años. Cuadernos de Nutrición. México. 16: 17-32
14. Brett C., and J. R. Hillman. 1985. Biochemistry of plant cell walls. Cambridge University Press. London.
15. Brett C., and K. Waldron. 1990. Physiology and biochemistry of plant cell walls. Urwin Hyman. Boston.
16. Burke, M. 1986. The glass state survival of the anhydrous biological systems. In: C. Leopold (Ed.) "Membranes, metabolism and dry organism" Ithaca; Cornell University Press. 358-363.
17. Burr H., S. Kon, and H. Morris. 1968. Cooking rates of dry beans as influenced by moisture content and temperature and time of storage. Food Tech. 22: 336-338.
18. Califano A. and M. Afón. 1990. Differential scanning calorimetry of Mung Bean Starch. Journal of Food Science. 55 (3): 771-773.
19. Corner E. 1951. The leguminous seed. Phytomorphology. 117-150.
20. Castillo, A. 1990. Participación del ácido fítico, pectinas y proteínas en la velocidad de cocción del grano de frijol. Tesis de Licenciatura. ENEP. Iztacala. UNAM.
21. Davis, C. 1971. Biological technics in electron microscopy. International Texbook Series. New York.
22. De León L., L. Elias, and R. Bressani. 1992. Effect of salt solutions on the cooking time, nutritional and sensory characteristics of common beans (*Phaseolus vulgaris*). Food Research International. 25: 131-136.
23. Deshpande S., and M. Cheryan. 1986. Microstructure and water uptake of *Phaseolus* and winged beans. Journal of Food Science. 51: 1218-1223.
24. Díaz de León F. 1989. Relación entre el grado de metilación de la pectina y el tiempo de cocción en algunas variedades de frijol. Tesis Licenciatura. Fac. de Ciencias UNAM.
25. Do Lago A., E. Zink, A. Savy, J. Feijao e N. Banzatto. 1985. Deterioracao de sementes de mamona armazenadas com e sem casca. Bragantia, Campinas. 46: 17-25.



26. Egley, G. H. 1990. Recent advances in the development and germination of seeds. ( Ed.) R. B. Taylorson Plenum Press. New York. 207-223.
27. Esquivel C., L. López, J. Márquez and I. Bernal Lugo. 1992. Chemical composition and structure of two Mexican bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars in relation to cooking time. *Pyton*. 53:143-153.
28. Esau K. 1967. Anatomía vegetal. Omega. Barcelona.
29. Esau K. 1982. Anatomía de las plantas con semilla. Ed. Hemisferio Sur. Argentina.
30. Fry S. 1988. The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. Longman Scientific & Technical. New York.
31. García E. and F. Lajolo. 1994. Starch alterations in hard-to-cook beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Agric. Food Chem.* 41: 612-615.
32. García-Vela L. and D. Stanley. 1989. Protein denaturation and starch gelatinization in hard-to cook beans. *Journal of Food Science*. 54: 1284-1286.
33. García-Vela L. and D. Stanley. 1989. Water-holding capacity in hard-to-cook beans (*Phaseolus vulgaris*): effect of pH and ionic strength. *Journal of Food Science*. 54 : 1080-1081.
34. García Vela L., J. del Valle, and D. Stanley 1991. Hard-to-cook defect in black beans: The effect of soaking in various aqueous salt solutions. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*. 24: 60-67.
35. Godínez J. 1994. El almacenamiento de granos básicos. En: Quintanilla J. (Ed.) *El agua y la energía en la cadena alimentaria: Granos Básicos*. UNAM. México.
36. González de la Concha S. 1994. Efecto del deterioro en los niveles de biomoléculas que participan en la protección del estado seco de la semilla de *Phaseolus vulgaris*. Tesis de Maestría. Fac. Ciencias. UNAM.
37. González de Mejía E. 1982. Efecto de diferentes condiciones de almacenamiento sobre el desarrollo de la dureza del frijol. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 32 (2): 258-273.

38. Hahn D., F. Jones, I. Akhavan and L. Rockland. 1977. Light and scanning electron microscope studies on dry beans: intracellular gelatinization of starch in cotyledons of large lima beans (*Phaseolus lunatus*). *Journal of Food Science*. 42 : 1208-1212.
39. Hall, J., T. Flowers and R. Roberts. 1984. *Plant cell structure and metabolism*. Longman. New York.
40. Heil J., M. Mc Carthy and M. Ozilgen. 1992. Magnetic resonance imaging and modeling of water up-take into dry beans. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 25: 280-285.
41. Hentges D., Weaver C., and S. Nielsen. 1990. Reversibility of the hard-to-cook defect in dry beans (*Phaseolus vulgaris*) and Cowpeas (*Vigna unguiculata*). *Journal of Food Science*. 55 : 1474-1476.
42. Hentges D., C. Weaver, and S. Nielsen. 1991. Changes of selected physical and chemical components in the development of hard-to-cook bean defect. *Journal of Food Science*. 56 : 436-442.
43. Hincks M. J., and D. Stanley. 1986. Multiple mechanisms of bean hardening. *Journal of Food Technology*. 21: 731-750.
44. Hincks M.; A. McCannel, and D. Stanley. 1987. Hard to cook defect in black beans. Soaking and cooking processes. *J. Agric. Food Chem.* 35: 576-583.
45. Hincks M., and D. Stanley. 1987. Lignification: evidence for a role in hard-to-cook beans. *Journal of Food Chemistry*. 11:41-58.
46. Hohlberg, A. and D. Stanley. 1987. Hard to cook defect in black beans. Protein and starch considerations. *J. Agric. Food Chem.* 35: 571-576.
47. Hussain A., B. Watts, and W. Bushuk. 1989. Hard-to-cook phenomenon in beans: changes in protein electrophoretic patterns during storage. *Journal of Food Science*. 54: 1367-1368.
48. Jackson M., and E. Varriano-Marston. 1981. Hard-to-cook phenomenon in beans: effects of accelerated on water absorption and cooking time. *Journal of Food Science*. 46: 799-903.
49. Jones P., and D. Boulter. 1983. The cause of reduced cooking rate in *Phaseolus vulgaris* following adverse storage conditions. *Journal of Food Science*. 48: 623-627.

50. Karp G. 1993. *Biología Celular*. McGraw-Hill. México.
51. Khan A. A. 1982. *The physiology and biochemistry of seed development dormancy and germination*. Elsevier Biomedical Press.
52. Kon S. 1979. *Effect of soaking temperature on cooking and nutritional quality of beans*. *Journal of Food Science*. 44: 1329-1340.
53. Koster K. and C. Leopold. 1988. *Sugars and desiccation tolerance in seeds*. *Plant Physiol*. 88: 829-832.
54. Liu K., R. Dixon, H. Yen, R. Shewfelt, and K. McWatters. 1992. *Hard-to-cook defect in cowpeas: storage-induced and treatment-induced development*. *Journal of Food Science*. 57 (5): 1155-1160.
55. Liu K., R. Dixon, and K. McWatters. 1993. *Induced hard-to-cook state in cowpeas by freeze-thawing and calcium chloride soaking*. *Cereal Chemistry*. 70: 193-195.
56. Loh J.; M. Breene, and E. Davis. 1982. *Between species differences in fracturability loss: microscopic and chemical comparison of potato and chinese waterchestnut*. *Journal of Texture Studies*. 13: 325-347.
57. McDonald M., C. Vertucci, and E. Roos. 1988. *Seed coat Regulation of Soybean seed Imbibition*. *Crop Science*. 28: 987-992.
58. McDonald M., C. Vertucci, and E. Roos. 1988. *Soybean seed imbibition: water absorption by seed parts*. *Crop Science*. 28: 993-997.
59. Mercer, E. and M. Birbeck. 1974. *Manual de microscopía electrónica para biólogos*. Blume. España.
60. Miège M. 1982. *Nucleic acids and proteins in plants I structure, biochemistry and physiology of proteins*. *Encyclopedia of Plant Physiology*. New Series. Vol. 14 A. Springer-Verlag. New York.
61. Molina M., G. de la Fuente, and R. Bressani. 1975. *Interrelationships between storage, soaking time, cooking time, nutritive value and other characteristics of the black bean (*Phaseolus vulgaris*)*. *Journal of Food Science*. 40: 587-591.
62. Molina M., M. Baten, R. Gómez-Brenes, K. King, and R. Bressani. 1976. *Heat treatment: a process to control the development of the hard-to cook phenomenon in black beans (*Phaseolus vulgaris*)*. *Journal of Food Science*. 41: 661-666.

63. Moreno E. 1984. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Instituto de Biología. UNAM. México.
64. Moreno E. y J. Ramírez. 1987. Comportamiento de siete variedades de frijol almacenadas bajo diferentes temperaturas. Turrialba. 37:155-160.
65. Moreno E. 1994. Almacenamiento y conservación de granos básicos: El maíz. En: Quintanilla J. (Ed.) El agua y la energía en la cadena alimentaria: Granos Básicos. UNAM. México.
66. Müntz K. 1982. Nucleic acids and proteins in plants I structure, biochemistry and physiology of proteins. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Vol. 14 A. Springer-Verlag. New York.
67. Narasimha H, T. Srinivas, and S. Desikachap. 1989. A histological basis for "hard-to-cook" phenomenon in red gram (*Cajanus cajan*). Journal of Food Science. 54 : 125-127.
68. Narayan R., G. Chauhan, and N. Verma. 1988. Changes in the quality of soybean during storage. Part 1. Effect of storage on some physico-chemical properties of soybean. Food Chemistry. 27: 13-24.
69. Nunn R. 1975. Microscopía electrónica. Preparación de muestras biológicas. El Manual Moderno. México.
70. Nunn R. 1976. Microscopía electrónica, microtomía, tinción y técnicas especializadas. El Manual Moderno. México.
71. Nuñez A. 1994. La producción e investigación de frijol en México. En: Quintanilla J. (Ed.) El agua y la energía en la cadena alimentaria: Granos Básicos. UNAM. México.
72. Paredes-López O., E. Maza Calviño, and R. Montes Rivera. 1988. Effect of the hard-to-cook phenomenon on some physicochemical properties of bean starch. Starch Staerke. 40: 205-210.
73. Pernellet J. 1978. Protein bodies of seeds: Ultrastructure, biochemistry, biosynthesis and degradation. Phytochemistry. 17: 1473-1480.
74. Pihak L., K. Caldwell and D. Stanley. 1989. Comparasion of methods used to characterize water imbibition in hard to cook beans. Journal of Food Science. 54 : 326-329.

75. Quintanilla J. 1994. El agua y la energía en la cadena alimentaria: Granos Básicos. UNAM. México.
76. Ramírez J. 1990. Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre el endurecimiento del grano de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis de Doctorado. Fac. de Ciencias. UNAM.
77. Reyes-Moreno C. y O. Paredes-López. 1992. Endurecimiento del frijol común. Cuadernos de Nutrición. México. 55: 18-32.
78. Richardson J., and D. Stanley. 1991. Relationship of loss of membrane functionality and hard-to-cook defect in aged beans. *Journal of Food Science*. 56: 590-591.
79. Rokland L., and F. Jon 1974. Scanning electron microscope studies on dry beans. *Journal of Food Science*. 39: 342-346.
80. Santino A., G. Daminati, A. Vitale, and R. Bollini. 1992. The  $\alpha$ -amilasa inhibitor of bean seed: two step proteolytic maturation in the protein storage vacuoles of the developing cotyledon. *Physiologia Plantarum* 85: 425-432.
81. Saio K., K. Arai and T. Watanabe. 1973. Fine structure of soybean seed coat and its changes on cooking. *Cereal Science Today*. 18: 197-205
82. Schoettle A., and C. Leopold. 1984. Solute leakage from artificial aged soybean seeds after imbibition. *Crop Science* 24: 835-838.
83. Secretaría de Recursos Hidráulicos. 1993. Anuario estadístico de la producción agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. Tomo I. SARH. México.
84. Secretaría de Recursos Hidráulicos. 1994. Cultivos básicos. Datos básicos No. 1 Noviembre. SARH. México.
85. Sefa-Dedeh S., and D. Stanley. 1979. The relationship of microstructure of cowpeas to water absorption and dehulling properties. *Cereal Chemistry*. 56: 379-386.
86. Sefa-Dedeh S.; D. Stanley, and P. Voisey. 1978. Effects of soaking time and cooking conditions on texture and microstructure of cowpeas (*Vigna unguiculata*). *Journal of Food Science*. 43: 1832-1838.
87. Sefa-Dedeh S., and D. Stanley. 1979. Microstructure of cowpea variety Adua Ayera. *Cereal Chemistry*. 56: 367-371.

88. Sefa-Dedeh S., D. Stanley, and P. Voisey. 1979. Effect of storage time and conditions on the Hard-to-cook defect in cowpeas (*Vigna unguiculata*). *Journal of Food Science*. 44: 790-796.
89. Sefa-Dedeh S., and D. Stanley. 1979. Textural implications of the microstructure of legumes. *Food Technology*. 77-83.
90. Serrato Valenti G., L. Melone, M. Ferro, and A. Bozzini. 1989. Comparative studies on testa structure of "hard-seeded" and "soft-seeded" varieties of *Lupinus angustifolius* L. (Leguminosae) and on mechanisms of water entry. *Seed Sci Technol*. 17: 563-581.
91. Shomer I., N. Poster, P. Linder, and R. Vasiliver. 1990. The role of cell wall structure in the hard to cook phenomenon in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Structure*. 9: 139-149.
92. Sievwright C., and W. Shipe. 1986. Effect of conditions and chemical treatments on firmness, in vitro protein digestibility, condensed tannins, phytic acid and divalent cations of cooked black beans (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Food Science*. 51: 982-987.
93. Silva H., and B. Luh. 1978. Scanning electron microscopy studies on starch granules of red kidney beans sprouts. *Journal of Food Science*. 43 (5): 1405-1408.
94. Stanley D. and J. Aguilera. 1985. A review of textural defects in cooked reconstituted legumes- the influence of structure and composition. *Journal of Food Biochemistry* 9: 277-323
95. Stanley D. and L. Pihak. 1989. Fluorescence intensity indicates bean hardening. *Journal of Food Science*. 54: 1078-1079.
96. Stanley D. 1992. A possible role for condensed tannins in bean hardening. *Food Research International*. 25: 187-192.
97. Tovar J., I. Björck, and N. Asp. 1990. Analytical and nutritional implications of limited enzymic availability of starch in cooked red kidney beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38: 488-493.
98. Tovar J., I. Björck, and N. Asp. 1990. Starch content and alpha- amilolysis rate in precooked legume flours. *J. Agric. Food Chem*. 38 : 1818-1823.

99. Varriano-Marston E., and E. Omana. 1979. Effects of sodium salt solutions on the chemical composition and morphology of black beans (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Food Science* 44 : 531-536
100. Varriano-Marston E., and M. Jackson. 1981. Hard to cook phenomena in beans: structural changes during storage and imbibition. *Journal of Food Science*. 46: 1379-1385.
101. Vindiola O., P. Seib, and R. Hosney. 1986. Accelerated development of the hard- to-cook state in beans. *Cereal Foods World*. 31: 538-552.
102. Webster B. and C. Leopold 1977. The Ultrastructure of dry and imbibed cotyledons of soybean. *American Journal of Botany*. 64: 413-418.
103. Winston P. W., and D.H. Bates. 1960 Saturated Solutions for the control of humidity in biological research. *Ecology* 41: 232-237.
104. Yu-Hui T., and R. Dixon. 1991. Effect of the hard-to-cook defect and processing on protein and starch digestibility of cowpeas. *Cereal Chem.* 68: 413-418.

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