

00528
16 A

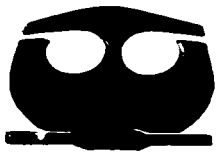


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“Comparación bromatológica y de factores tóxicos entre el frijol Comba (*P. lunatus*) y frijol peruano (*P. vulgaris*), consumidos en San Miguel Totolapan, Gro.”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
ALICIA BRAUN BRUCKMAN



MEXICO, D. F.



2003

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA



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.

B

Jurado asignado:

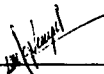
Presidente: Angela Sotelo López
Vocal: Bernardo Lucas Florentino
Secretario: I. María de Lourdes Flores Téllez
1er suplente: Rosa María Argote Espinosa
2do suplente: Leticia Gil Vieyra

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 111 del Edificio E, Departamento de Farmacia, de la Facultad de Química.



M. en C. Bernardo Lucas Florentino
Asesor



Q.F.B. Leticia Gil Vieyra
Supervisor técnico



Alicia Braun Bruckman
Sustentante

C

Dedicado a Mario, por estar siempre a mi lado, porque sé que cuento contigo y porque nuestro amor es la mejor dicha que podríamos poseer.

Te amo.

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Bernardo Lucas, por su gran calidad humana y por su apoyo en la realización de esta tesis.

A mis papás, porque gracias a ustedes soy lo que soy.

A Boris, porque tu dedicación y esfuerzo me han reforzado el valor de la lucha.

A Jaco, porque tu apoyo y bondad han sido, entre otras cosas, un gran ejemplo para mí.

A Fran, porque siempre estás al tanto y te preocupas por mí, como buena hermana grande.

A mis amigos, porque el compartir con ustedes este momento tan importante para mí, es una muestra que tanto en las buenas como en las malas debemos contar los unos con los otros.

A todos los del laboratorio que contribuyeron en la realización de esta tesis.

A mis maestros, cuya labor no siempre es apreciada como debiera, pero que en mí han dejado una huella invaluable.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Alfonso Araujo
Arce
FECHA: 1 de febrero 2003
FIRMA: [Firma]

ÍNDICE

Resumen.....	1
Objetivos.....	2
Capítulo 1.- Antecedentes.....	3
1.1- Leguminosas.....	3
1.2- Factores tóxicos.....	5
1.2.1- Lectinas.....	6
1.2.2- Glucósidos cianogénicos.....	7
1.3- Factores antinutricionales.....	8
1.3.1- Inhibidores de enzimas.....	9
1.3.1.1- Inhibidores de tripsina.....	9
1.3.2- Agentes ligantes de minerales.....	10
1.3.2.1- Taninos.....	10
1.3.2.2- Fitatos.....	11
1.4- Frijol Comba.....	13
1.5- Frijol común.....	13
1.6- Digestibilidad <i>in vitro</i>	15
Capítulo 2.- Metodología.....	16
I Limpieza y selección.....	17
II Análisis proximal.....	17
III Determinación de factores tóxicos.....	18
III.1.- Determinación cuantitativa de hemaglutininas.....	18
III.2.- Determinación de glucósidos cianogénicos.....	23
III.3.- Determinación de inhibidores de tripsina.....	27
III.4.- Determinación de taninos.....	31
III.5.- Determinación de fitatos.....	33
IV Digestibilidad <i>in vitro</i>	36
V Procesamiento con calor.....	39
VI Análisis estadístico.....	39
Capítulo 3.- Resultados y Discusión.....	40
Conclusiones.....	58
Bibliografía.....	59

E

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la calidad nutricia y toxicológica del frijol Comba (*Phaseolus lunatus*) y la variedad del frijol peruano (*Phaseolus vulgaris*), consumidos por los habitantes de las comunidades del municipio de San Miguel Totolapan, en Guerrero. El objetivo fue evaluar comparativamente con ensayos químicos, la calidad nutritiva de ambos frijoles; realizando el análisis proximal y la medición de los siguientes factores tóxicos y antinutricionales: lectinas, inhibidores de tripsina, taninos, fitatos y glucósidos cianogénicos, y además la digestibilidad *in vitro* de ambas variedades; para conocer si ofrecen ventajas con otras variedades de *Phaseolus*. Se les aplicó a ambos frijoles dos tratamientos de cocimiento, uno que es tal y como lo consumen en la región y otro con un tratamiento más moderado propuesto por un laboratorio de Salud Pública Inglés (PHLS). Se encontró que el contenido de proteína es muy similar entre las dos variedades. El nivel de lectinas es alto en el frijol peruano crudo y en el frijol peruano con el tratamiento moderado; ambos frijoles en crudo presentan un alto nivel de inhibidores de tripsina y de fitatos, y es insignificante la cantidad de taninos; el frijol Comba presenta un nivel insignificante de glucósidos cianogénicos. Por lo que el frijol Comba presenta ventajas para ser consumido sobre el frijol común por tener menor contenido de lectinas. Sin embargo se debe confirmar por medio de ensayos biológicos.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar comparativamente con ensayos químicos, la calidad nutritiva del frijol Comba (*Phaseolus lunatus*) y el frijol común, variedad peruano (*Phaseolus vulgaris*), aplicando diferentes tratamientos térmicos y conocer el grado de destoxificación empleando dos tratamientos térmicos, determinando el nivel de tóxicos residuales.

Objetivos específicos:

- ◆ Determinar el contenido de proteína del frijol Comba y peruano, tanto crudo como tratado bajo los diferentes tratamientos térmicos.
- ◆ Realizar varios procesos de cocción de ambas especies de frijoles para su consumo y evaluar el proceso de destoxificación.
- ◆ Realizar la digestibilidad *in vitro* de ambos frijoles tanto crudos como procesados, para predecir su calidad nutritiva.
- ◆ Determinar el contenido de factores tóxicos y antinutricionales más comunes en leguminosas en ambos frijoles.

CAPÍTULO 1.- ANTECEDENTES

1.1- Leguminosas

La familia de las leguminosas o fabáceas, es la tercera más numerosa de las plantas superiores, ya que existen alrededor de 18,000 especies agrupadas en 620 géneros y representa la segunda en importancia después de los cereales desde el punto de vista alimenticio; además, las semillas de la mayoría de las leguminosas son las de mayor contenido de proteína en el reino vegetal y por lo tanto son las más atractivas en el estudio de nuevas fuentes o de fuentes alternativas de este nutrimento.

Las leguminosas tienen de dos a tres veces más proteína que los cereales, y se consideran como una fuente que puede cubrir una buena parte de los requerimientos en nitrógeno en ausencia de proteínas de origen animal.

Los granos de leguminosas son alimentos concentrados, con alto contenido en materia seca, un nivel de proteína superior al 20%, con un 50-70% de carbohidratos, 8% de fibra y 3% de sustancias minerales (1,2).

Las proteínas en las leguminosas son pobres en aminoácidos azufrados (metionina y cistina), y son limitantes por contener sustancias antinutritivas que condicionan el valor biológico real de las proteínas, pero su proteína es rica en lisina, aminoácido deficiente en los cereales.

Las leguminosas de mayor consumo son las lentejas, los garbanzos y los frijoles, y las semillas oleaginosas (soya y cacahuate). Su valor calórico es del orden de las 340 Kcal/100g; sin embargo, tienen un coeficiente de digestibilidad bajo (60 a 70%) (1,3).

Las leguminosas han sido usadas desde hace miles de años como alimento por el hombre y actualmente las semillas de estas plantas son importantes productos agrícolas en todos los países tropicales y subtropicales.

La dieta en las comunidades rurales está constituida principalmente de alimentos de origen vegetal, donde el grupo de las leguminosas complementa a los cereales para tratar de cubrir los requerimientos necesarios de proteína de buena calidad.

En la India las leguminosas aportan alto contenido proteínico en la dieta media, consumiéndose actualmente más de 10 millones de toneladas de semillas (4,5).

Dentro de las leguminosas más consumidas se encuentra el frijol, el cual forma parte de la alimentación tradicional de la dieta mexicana, siendo la principal fuente de proteína vegetal; y los frijoles constituyen una fuente importante de proteína en la dieta de varios segmentos de la población mundial (6,7).

Los granos o semillas de leguminosas son apreciadas por sus cualidades nutritivas, pero muchas de ellas contienen sustancias dañinas -las cuales, según algunos investigadores, juegan un papel importante en la defensa contra sus depredadores- y pueden presentar intoxicación aguda o crónica cuando son consumidas en forma natural o sin procesamiento (7,8). Dentro de estas sustancias dañinas, hay algunas que se presentan con frecuencia como son: inhibidores de proteasas, fitohemaglutininas, taninos y fitatos, algunas de las cuales son de naturaleza proteínica y por consiguiente son termolábiles (7,9), así pues, la cocción destruye los inhibidores de tripsina y las hemaglutininas, que contienen los frijoles, mejorando la calidad nutritiva. Por otro lado, los inhibidores de proteasas y lectinas son inactivados por un calentamiento, los taninos se unen a las proteínas de las leguminosas y a las enzimas digestivas y así se reduce la digestibilidad de las proteínas y la disponibilidad de aminoácidos (10).

En general las lectinas y los inhibidores de proteasas se inactivan por tratamientos con calor. Pero en Inglaterra, el Public Health Laboratory Services (PHLS) de Colinde, ha reportado incidentes de intoxicación con lectinas, debido al consumo de frijoles de la variedad *Phaseolus vulgaris*, crudos o con un subcocimiento; los síntomas que se presentan son náuseas, seguido de vómito; después se desarrolla diarrea. Algunas personas han sido hospitalizadas y su recuperación es rápida (3-4 horas después del inicio de los síntomas). Este laboratorio ha demostrado que calentando a 80°C los frijoles (cocimiento inadecuado), la toxicidad de las lectinas se puede potenciar siendo los frijoles cocidos más tóxicos que incluso si son consumidos crudos.

Por lo que este laboratorio recomienda remojar los frijoles en agua 5 horas, remover el agua y hervir al menos por 10 minutos para que puedan ser consumidas estas leguminosas sin riesgos a la salud (11).

También hay casos específicos de tóxicos en ciertas leguminosas, como es el caso particular de la presencia de glucósidos cianogénicos (linamarina) en las semillas del frijol de lima (*Phaseolus lunatus*), que le imparten un sabor característico (12). La concentración del glucósido, medida por la cantidad de HCN liberado en la hidrólisis, varía desde 10 hasta más de 300 mg/100g de frijol (13,14,15).

Por su modo de acción, las sustancias nocivas de los alimentos pueden clasificarse en dos grandes grupos:

1.- Factores tóxicos.

2.- Factores antinutricionales.

1.2- Factores tóxicos

Los factores tóxicos son las sustancias capaces de producir una anormalidad fisiológica a corto plazo, que no puede ser atenuado por una suplementación del alimento que lo contiene.

Su modo de acción puede explicarse, sea por su particular reactividad, por un mimetismo molecular de las hormonas, aminoácidos, o, en ciertos casos, por la existencia de una información genética que favorezca la aparición de una determinada patología (3,7).

El grado de toxicidad se expresa en términos de Dosis Letal media (DL₅₀) que es la dosis en que causa la muerte del 50% de los animales en estudio (7).

1.2.1-Lectinas

Las fitohemaglutininas (sustancias peptídicas con efectos hemoaglutinantes) se han encontrado en las leguminosas (3,16).

Las lectinas o hemaglutininas son proteínas de alto peso molecular, que poseen una afinidad específica con los residuos glucosídicos presentes en la superficie de los glóbulos rojos. Contienen glúcidos y en algunas aglutininas se presentan también lípidos (16).

Son glicoproteínas que contienen azúcares unidos covalentemente. En muchas lectinas, la estructura consiste en 2 a 4 subunidades y contienen metales iónicos bivalentes.

Las lectinas pueden ser caracterizadas y detectadas por su acción en los eritrocitos y se clasifican como aglutinantes específicos y no específicos de sangre. La mayoría de las hemaglutininas se encuentran en las semillas de leguminosas, también se puede encontrar en tallo, savia y hojas; la presencia de estos factores termolábiles, los hace un alimento no apto para humanos a menos que sean cocinados apropiadamente.

Por otro lado esta afinidad con moléculas de azúcar, está asociada a una gran especificidad según la fuente vegetal o de los eritrocitos, propiedad que se utiliza para diferenciar los grupos sanguíneos humanos y que queda reflejada en su nombre "lectinas" (del latín "legere", elegir).

Todas las lectinas producen síntomas parecidos, de mayor a menor gravedad, entre los que resalta en primer lugar la intensa inflamación de la mucosa intestinal, con la posterior destrucción de los epitelios y el edema y la hemorragia del tejido linfático. Esto se debe a que las lectinas se unen a las microvellosidades de los enterocitos del yeyuno y obstaculizan su función; con lo que se eleva la descamación de las células de la mucosa y las vellosidades disminuyen en tamaño y disminuye también la superficie de absorción de nutrientes, y se observa un decremento de la actividad de enzimas. Las lesiones que ocasionan parecen favorecer la proliferación de bacterias y su fijación a la superficie del epitelio (3,7).

La lectina del frijol de lima tiene especificidad para la sangre A humana.

1.2.2- Glucósidos cianogénicos

El cianuro en trazas es ampliamente distribuido en la naturaleza y ocurre principalmente en forma de glucósidos cianogénicos. Sólo 4 tienen importancia en la toxicidad humana: amigdalina, durrina, linamarina y lotaustralina.

Los glucósidos cianogénicos se encuentran en los frutos de numerosas especies de plantas pertenecientes a diversas familias. Algunas de estas plantas son utilizadas frecuentemente como fuente de alimento para el hombre (3,7).

El responsable de la toxicidad de los glucósidos cianogénicos es el ácido cianhídrico. Algunas bacterias intestinales del cuerpo humano pueden descomponer el glucósido, dejando en libertad el ácido cianhídrico (16).

La liberación de ácido cianhídrico es máxima después de 45 minutos de remojo en agua a 37°C después de ser triturado (7).

Está reportado que 10mg de ácido cianhídrico en 100 g de muestra causan daño en humanos (17), mientras que 3 mg del ácido causa problemas en aves, que son hipersensibles a estos glucósidos (18).

La dosis letal media (DL₅₀) de ácido cianhídrico en ratones está estimada entre 0,5 y 3 mg/kg del peso corporal. Sobrevivientes han descrito síntomas iniciales de adormecimiento, dolor de cabeza, seguido por confusión mental, cianosis, contracciones, convulsiones y termina en coma (7).

Los métodos usuales de preparación mediante trituración, remojo en agua, cocer y tirar el agua, tienden a eliminar el ácido cianhídrico. La cocción destruye también la glucosidasa (enzima que hidroliza al glucósido cianogénico) (16).

La liberación espontánea de ácido cianhídrico de la planta depende de la presencia de glucósidos específicos y agua; en consecuencia depende de las condiciones físicas. Por ejemplo, frijoles cocidos si son mezclados con vegetales frescos, crudos, pueden ser sujetos de autólisis, por lo que no deben ser mezclados. El glucósido cianogénico intacto es termoestable (7).

El cianuro liberado a partir de los glucósidos cianogénicos puede ejercer una acción anoxiante al combinarse con la citocromo oxidasa, porque tiene una alta afinidad formando un enlace que resulta en una inhibición inmediata de la respiración celular (3,16).

El frijol de lima (*Phaseolus lunatus*) contiene ácido cianhídrico, ninguna variedad de este frijol puede ser producida libre totalmente del cianógeno. Específicamente contiene como glucósido cianogénico a la faseolulinina (linamarina) (16). Las variedades negras son las que más contienen ácido cianhídrico y de las variedades blancas se han reportado valores entre 10 y 14.4-16.7 mg HCN/100g de frijol (1,7).

1.3- Factores antinutricionales

Las sustancias antinutricionales, son sustancias que disminuyen la disponibilidad o provocan una pérdida suplementaria de los nutrientes esenciales. Estas sustancias provocan un desequilibrio, que se compensa por un aporte suplementario de los nutrientes implicados, y a la larga determinan la aparición de una patología particular. El aporte suplementario del nutriente neutralizado permite restablecer el valor de los alimentos (3, 19).

Durante la cocción de los alimentos se pierden algunos factores antinutricionales (6).

Los factores antinutricionales se clasifican en función del tipo de nutrimentos con los que interfieren:

- 1.- Inhibidores de enzimas.- son las sustancias que afectan la utilización digestiva o metabólica de las proteínas.
- 2.- Antivitaminas.- son las sustancias que inactivan o aumentan el requerimiento en vitaminas.
- 3.- Agentes ligantes de minerales.- son las sustancias que interfieren en la asimilación de los minerales.

1.3.1- Inhibidores de enzimas

1.3.1.1- Inhibidores de tripsina

Los inhibidores de proteasas son sustancias que tienen la habilidad de inhibir la actividad proteolítica de ciertas enzimas (tripsina, quimotripsina, amilasa y carboxipeptidasa) que se encuentran en el reino vegetal, sobre todo localizados en los órganos reproductores de los vegetales y están ampliamente distribuidas en muchas leguminosas.

Los inhibidores enzimáticos son muy frecuentes dentro de la alimentación humana. Se trata concretamente de sustancias que interfieren con la actividad de las proteasas o de las carbohidratas de los vegetales, con una función protectora, inhibiendo los sistemas enzimáticos de sus depredadores, o con una función reguladora, interviniendo en procesos de almacenamiento del organismo (3).

La inhibición de la tripsina estimula al páncreas a secretar en exceso, lo que lo agranda e incrementa la demanda de aminoácidos para este órgano. Al mismo tiempo el inhibidor es relativamente rico en aminoácidos sulfurados que no son biológicamente disponibles, (hasta que el inhibidor se inactiva por calor), por lo que la calidad de la proteína de la leguminosa es menor que la esperada de su composición de aminoácidos (3,20).

Son sustancias de naturaleza proteica y por ello son termolábiles, es decir, mediante calentamiento apropiado puede destruirse el efecto de los principales inhibidores de las proteasas o al menos disminuirlo en gran parte (19); de esta forma se ha hecho posible utilizar los frijoles para la alimentación. El grado de destrucción de los inhibidores depende de la temperatura, de la duración del calentamiento, del volumen del alimento y de su contenido de agua.

Las leguminosas, como las especies de *Phaseolus* contienen tales sustancias. Estas sustancias son sobre todo inhibidores de la tripsina, aunque pueden coexistir en la misma planta con inhibidores de la quimotripsina (1,16).

1.3.2- Agentes ligantes de minerales

1.3.2.1- Taninos

Los taninos son sustancias polifenólicas que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, son muy termoestables y pueden ser clasificados como hidrolizables (degradables por enzimas para conseguir un residuo de azúcar y un ácido fenolcarboxílico) y taninos condensados (7,21).

Tienen poca especificidad y se localizan a nivel del tegumento de los vegetales, su actividad deriva de su capacidad de ligarse a las proteínas y a desnaturalizarlas, formando complejos estables (3).

Entre los compuestos polifenólicos de los alimentos, los taninos constituyen un grupo caracterizado por su facultad de combinarse con las proteínas. Esta reactividad particular, en la que se basa el curtido de pieles, que presentan los taninos hidrolizables y los taninos condensados, define también su actividad biológica, que se manifiesta por su gusto astringente.

La presencia de estos polifenoles en los alimentos determina una disminución del valor biológico de éstos, debido, en gran parte, a una interferencia con la utilización digestiva de las proteínas. Es decir, son compuestos que se han relacionado con la baja digestibilidad de las proteínas y de la inhibición de la absorción intestinal de aminoácidos.

La actividad antinutritiva de los taninos puede manifestarse por la aptitud que tienen estos polifenoles a asociarse a los iones di y trivalentes, y por lo tanto pueden disminuir la disponibilidad de calcio, de hierro, de cobre, entre otros; los taninos actúan principalmente aumentando las necesidades de proteínas, y también contribuyen a aumentar los requerimientos en vitaminas disminuyendo las reservas hepáticas de vitamina A y la disponibilidad digestiva de la vitamina B₁₂.

La astringencia es el factor determinante de una reducida ingestión de los alimentos demasiado ricos en taninos.

Los taninos contenidos en el café y en el té negro impiden la reabsorción del hierro, con el que forman un complejo difícilmente soluble. En cambio, la formación de complejos con el plomo y los metales pesados puede tener una función protectora impidiendo su absorción. El ácido tánico, al combinarse con

la vitamina B₁₂ y al factor intrínseco, disminuye la disponibilidad de esta vitamina. Por otro lado, la vitamina B₁ puede ser destruida por los taninos del té y las reservas hepáticas de vitamina A disminuyen en presencia de determinados taninos en la dieta (3).

Los fenoles, precursores del tanino, presentes en las verduras, frutas, café y té, se han descrito como antimutágenos y anticancerígenos.

Los taninos forman puentes de oxígeno entre los hidróxilos fenólicos y los grupos peptídicos de las fibrillas de colágeno, estableciendo enlaces cruzados entre las cadenas peptídicas vecinas. La oxidación de los grupos fenólicos de los taninos a quinonas puede formar enlaces covalentes entre los grupos amino épsilon de las lisinas y de las argininas en las cadenas peptídicas. Así se precipitan las proteínas. Para la formación del complejo proteína-tanino es necesaria la presencia de grupos O-dihidroxifenol, que forman enlaces hidrófobos. La unión de los taninos a las enzimas digestivas impide su acción; la unión con las proteínas del alimento dificulta su digestión. La unión con las proteínas de la mucosa intestinal estorba la absorción de las materias alimenticias (16).

El remojo y la cocción extraen una proporción importante de taninos y reducen su efecto (22).

Su dosis diaria admisible (DDA) es de 500mg/día (3).

Los taninos retardan el crecimiento en animales y reducen la calidad de las proteínas. El problema de los taninos en sorgo y frijoles se complica por las toxinas que llevan, por lo que cuando efectos adversos son reportados, no es claro que tanto los taninos están implicados (20).

1.3.2.2- Fitatos

El ácido fítico es el éster hexafosfórico del ciclohexanol (ácido inositol hexafosfórico) (7).

Debido a que la molécula de ácido fítico está altamente cargada con seis grupos fosfato, es un excelente agente quelante, que forma complejos con

caciones minerales y que interactúa con las proteínas disminuyendo su solubilidad y disponibilidad (23).

El ácido fítico se encuentra naturalmente en concentraciones del orden de 2 a 5 g/kg de semillas, de leguminosas, cereales y oleaginosas en forma de sal de potasio, calcio o magnesio, o formando complejos con proteínas y minerales, se localiza principalmente en el pericarpio (3,24).

Es un compuesto común en los tejidos de las plantas que debido a su habilidad para quelar metales iónicos divalentes y trivalentes como calcio, magnesio, zinc, cobre y hierro a formas complejas insolubles que no son absorbidos en el tracto intestinal, es responsable de las interferencias comúnmente observadas que muchas fuentes de proteína en plantas tienen en su dieta de minerales (20,25).

La significancia nutricional de los fitatos en la dieta humana tiene mucha importancia por las implicaciones de deficiencia de minerales que prevalece en muchas partes del mundo, ya que reduce la biodisponibilidad de los minerales y las proteínas.

Para el hombre, el ácido fítico se considera como una mala fuente de fosfato, porque se encuentra en forma de sales insolubles (3).

La presencia del ácido fítico facilita la formación de diversas sales; las sales de metales alcalinos son solubles en agua, mientras que la de los metales divalentes son casi insolubles. Un gramo de ácido fítico secuestra irreversiblemente un gramo de calcio (3). Pero cuando el fitato se administra durante largos períodos de tiempo no se observa ningún retroceso en el balance negativo de calcio ni en el de zinc. También cualquier alimento rico en fibra disminuye la resorción de minerales. Las plantas que contienen fitatos poseen también fitasas que los destruyen y también sustancias inhibitorias de las fitasas (16).

Por tratamiento con ácidos y calor o por la acción de una enzima, la fitasa o fosfatasa presente en los alimentos ricos en ácido fítico, éste se hidroliza liberando inositol y ácido fosfórico. Esta fitasa presenta una actividad máxima a pH 5.5 y a 60°C. La cocción inhibe rápidamente la enzima e impide la hidrólisis (3). El frijol de lima tiene 0.840% de fitatos (26).

1.4- Frijol Comba

El frijol Comba es una subvariedad del frijol lima, de la especie botánica *Phaseolus lunatus*, que es de la familia de las fabáceas.

El frijol de lima es una antigua leguminosa de grano americana, domesticada en Mesoamérica y Perú. Actualmente se mantiene como cultivo tradicional en el Caribe, México, Sudamérica, Oeste de África y Sudeste Asiático. Se siembra intensivamente en el suroeste de E.U.A., costa peruana e isla de Madagascar. Es importante pues es el frijol del género *Phaseolus* mejor adaptado a las zonas bajas tropicales y subtropicales; 100g de frijol de lima seco proporcionan 347 Kcalorías, 20.2g de proteínas, 158 mg de calcio, 10 mg de hierro, 0.5 mg de tiamina y 0.32mg de riboflavina. Además esta especie es resistente a la mayoría de las enfermedades y plagas que limitan la expansión del frijol común (*P. Vulgaris*) hacia el trópico (27). En Perú hay hallazgos arqueológicos que datan de hace 8000 años, mientras que la antigüedad de la semilla en Mesoamérica es de sólo 1200 años (13).

El frijol Comba (*Phaseolus lunatus*) es una leguminosa consumida en la región de Tierra Caliente en las inmediaciones del río Balsas entre los estados de Michoacán y Guerrero (28,29). Su consumo es a nivel regional.

1.5- Frijol común

En México, el frijol conocido en todo el país corresponde a *Phaseolus vulgaris* L. del que se conocen numerosas variedades.

El frijol común es de origen americano, se cree que es nativo de la zona ubicada entre México y Guatemala. Su cultivo se practica desde hace 9,000 a 4,000 años y el cultivo más antiguo se sitúa en el Valle de Tehuacán, Puebla, México (30).

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es ampliamente cultivado en áreas templadas de regiones semitropicales del mundo (31).

Las semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) son un elemento importante de consumo para las poblaciones de México, centro y Sudamérica, y África central y oriental; donde las proteínas animales son limitadas y los frijoles son consumidos en grandes cantidades (32).

El consumo aparente per capita por año en la década de los ochenta, era de 18.5 Kg en México (32). México es el mayor productor de América Central y del Norte con un promedio anual de 968,000 toneladas y 1,800,000 hectáreas en los últimos cinco años.

La semilla seca del frijol común es apreciada en todas partes del mundo donde se cultiva el frijol, debido a su larga vida de almacén, buenas propiedades nutritivas, facilidad de almacenar y preparación para el consumo (22).

Muchos reportes hablan de los efectos tóxicos que acompaña la ingestión de frijoles crudos de *Phaseolus vulgaris* (7).

En cuanto a los tóxicos y factores antinutricionales que se encuentran en el *Phaseolus vulgaris* se tiene la siguiente información:

Contiene lectinas no específicas que actúa en todos los tipos de sangre animal, incluyendo la humana, éstas, son destruidas por cocimiento prolongado (33). En las semillas se encuentran inhibidores de tripsina, quimotripsina y elastasa, su peso molecular oscila entre 10,000 y 15,000, presentan un alto contenido en cistina (14%) (7,16); son termolábiles y la cocción habitual destruye hasta el 80% de éstos. En las semillas de color oscuro del frijol común son abundantes los taninos, encontrándose hasta 2% de éstos. El remojo y la cocción extraen una proporción importante de taninos y reducen su efecto. Las sales de magnesio y calcio del ácido fítico, representan una gran proporción del fósforo total del *Phaseolus vulgaris* (1) y se le ha relacionado con el endurecimiento del frijol (22).

El frijol común que se consume en San Miguel Totolapan, Guerrero, es el frijol amarillo, que ellos llaman peruano y también se le conoce como Mayocoba.

1.6- Digestibilidad *in vitro*

Los aminoácidos presentes en las proteínas no están siempre disponibles de forma total, porque la digestión de la proteína o la absorción de los aminoácidos puede ser incompleta.

Las proteínas de origen animal son altamente digestibles, mientras que las proteínas de origen vegetal pueden tener una digestibilidad mucho menor.

Generalmente los aminoácidos de las proteínas vegetales sólo pueden ser liberadas y absorbidas en 60-70%.

En circunstancias normales, la mayor parte de los residuos indigeribles consta de celulosa, pectinas y otros carbohidratos complejos, presentes en alimentos de origen vegetal, que no pueden ser degradados por las enzimas digestivas del hombre (34). La digestibilidad de las proteínas de los alimentos está relacionada con su contenido de fibra dietética, lo que aumenta la excreción de nitrógeno en el excremento y reduce por consiguiente la digestibilidad (35).

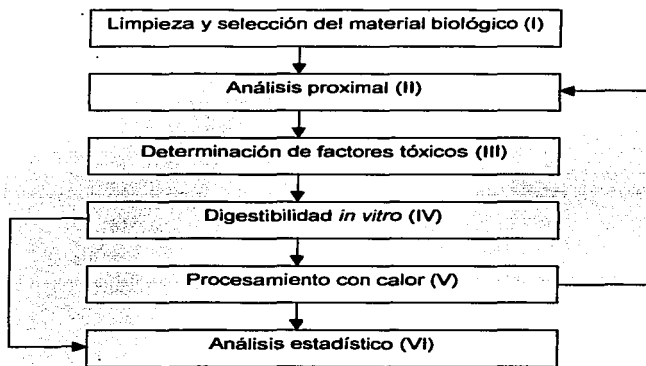
La baja digestibilidad de aminoácidos y proteína en granos de leguminosas son atribuidos a la presencia de fracciones proteínicas menos digeribles, niveles residuales de factores antinutricionales y altas concentraciones de carbohidratos indigeribles y taninos (36).

En la actualidad se han desarrollado y tratado de establecer procedimientos *in vitro* capaces de sustituir a los procedimientos *in vivo*, los cuales tratan de igualar las condiciones de digestión para determinar la biodisponibilidad de las proteínas (2,37).

Durante la proteólisis, protones son liberados por la ruptura de enlaces peptídicos, resultando en un decremento del pH en una suspensión. Asumiendo una correlación entre la liberación peptídica y la digestibilidad de la proteína, ésta última puede ser evaluada por el registro de la disminución del pH (37).

CAPÍTULO 2.- METODOLOGÍA

Contando con suficiente material biológico (grano seco de frijol Comba y peruano), se procedió a trabajar de acuerdo al siguiente diagrama de trabajo, a continuación se menciona en forma breve algunos detalles relevantes de cada uno de los bloques del diagrama.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I Limpieza y selección

Las muestras fueron el frijol Comba blanco tardío (*Phaseolus lunatus*) y el frijol común, variedad peruano (*Phaseolus vulgaris*), colectados en mayo del 2000, consumidos por los habitantes de las comunidades del municipio de San Miguel Totolapan, en Guerrero.

El material biológico se seleccionó, separando material extraño, así como los granos dañados.

Ambos frijoles se analizaron:

- a) Sin ningún tratamiento
- b) Cocidos por el método recomendado por Los Servicios de Laboratorio de Salud Pública de Colinde, Inglaterra (PHLS) que consiste en remojar los frijoles en agua por lo menos 5 horas, remover el agua y hervir al menos por 10 minutos, en una relación grano:agua de 1:3 para que las lectinas se inactiven. Se le adicionó por cada 0.5 Kg de frijoles, 5 gramos de sal.
- c) Cocidos por 1 hora, a presión atmosférica con una relación semilla:agua de 1:3 que es el proceso tradicional de calentamiento que se realiza en las comunidades donde se consumen estos frijoles, que consiste en hervir por 1 hora los frijoles, con 5 gramos de sal y una ramita de epazote.

Para el caso de las semillas cocidas, fue necesario acondicionar las muestras en forma de harina. Se secaron los frijoles ya cocidos en una estufa de circulación forzada Lab-line Imperial III a 55-60°C, y se molieron en el molino Thomas-Wiley hasta obtener la harina, con malla de 5 y 2 mm. Para el caso de los frijoles PHLS, donde sobró agua de cocción, esta agua fue liofilizada en una liofilizadora, marca Labconco.

II Análisis Proximal

Tanto al material crudo como procesado con calor se le determinó la composición de macronutrientes.

Las determinaciones se hicieron con las técnicas de la AOAC (37), donde se lleva a cabo el análisis proximal o sistema analítico Weende.

III Determinación de factores tóxicos

La determinación de los factores tóxicos y antinutricionales más comunes en frijoles, se realizaron tanto en el material crudo como cocido.

Para poder evaluar el proceso de destoxificación, se determinó el contenido de fitohemaglutininas o lectinas, se cuantificó el contenido de inhibidores de tripsina, de taninos, de fitatos y de glucósidos cianogénicos.

La determinación de los factores tóxicos implican métodos especiales, que a continuación se describen.

III.1.-Determinación cuantitativa de Hemaqlutininas (38,39)

Una manera de detectar la presencia de hemaglutininas en extractos de plantas es con una técnica de diluciones seriadas de un extracto salino de la muestra, en la cual se determina el punto final de la aglutinación de los glóbulos rojos en estudio por una estimación visual.

La metodología utilizada es la técnica de Jaffe, en donde se detecta la presencia de lectinas aprovechando la capacidad de aglutinación de los eritrocitos de hámster y se expresa los resultados en forma cuantitativa, ya que se ha encontrado una adecuada correlación en la toxicidad de las lectinas del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) con el método de microtitulación.

MATERIAL Y REACTIVOS:

Agitador magnético con tacómetro, multi-stir plate "4", marca Thermolyne.

Centrífuga para tubos marca Dynac CL.

Tubos de centrifuga de 15 mL con graduación.

Jeringa de 5 mL.

Incubadora marca BLUE-M. "Dry type bacteriological incubator"

Espectofotómetro Sequoia-Turner, modelo 340.

Adaptador para celdas de 10 X 75 mm.

Microtiter Kit (Cook Eng-Alexander Virginia USA).

Filtro de vidrio poroso (poro grueso).

Sangre de hámster dorado.

Solución anticoagulante: heparina

Solución salina al 1%

Solución salina al 0.9%

Solución de pronasa al 0.2% en solución salina.

Lectina de *Phaseolus vulgaris* (SIGMA L-8754)

PROCEDIMIENTO:

a) Preparación del extracto:

Se muele la muestra finamente, se suspende 0.1 gramos en 10 mL de solución salina al 1%, se efectúa una extracción con agitación magnética durante dos horas a 300 r.p.m. a la temperatura ambiente.

Se centrifuga a 1,400 r.p.m. durante 15 minutos para eliminar el residuo insoluble; el sobrenadante se filtra a través del filtro de vidrio y de ser necesario se puede lavar el residuo con más solución salina al 1% para llevar el extracto filtrado al volumen inicial de 10 mL.

b) Preparación de la sangre:

Se sangra por vía ocular a un hámster y la sangre se coloca en un matraz pequeño que contenga solución anticoagulante, se agita suavemente y se trasvasa a tubos de centrifuga para lavarla 3 veces con solución salina al 0.9%. La relación sangre:solución salina es aproximadamente 1:5. Se centrifuga a 1500 r.p.m. durante 10 minutos. Después del último lavado, se mide en el tubo, la cantidad de paquete de eritrocitos y se diluyen al 4% para lo cual se agregan por cada 1.0 mL de glóbulos rojos 24 mL de solución salina al 0.9%

c) Sensibilización de los glóbulos rojos:

A cada 10 mL de suspensión de glóbulos rojos al 4% se les agrega 1 mL de solución de pronasa al 0.2% y se coloca en la incubadora por espacio de 1

hora a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$. Después del tiempo estipulado, se centrifuga, se lava 3 veces con solución salina al 0.9%. Después del último lavado se resuspende el paquete de glóbulos rojos al 4% (por cada 1mL de paquete de eritrocitos se adiciona 24 mL de solución salina al 0.9%).

d) Ajuste de la suspensión de glóbulos rojos:

Se toma 0.1 mL de la suspensión de glóbulos rojos ya sensibilizados y se agregan 4.9 mL de solución salina al 0.9%. se lee en el espectrofotómetro a 620 nm, usando un adaptador de celdas que permita el paso de solo 1 cm^2 de luz y para ajustar el espectrofotómetro al 100%T se usa como blanco, solución salina al 0.9%. La lectura que se debe obtener es de $25\% \pm 1$ de transmitancia.

e) Microtitulación:

En las placas tipo "V" del microtiter , colocar, en cada pozo de una hilera 100 μL de solución salina al 0.9% con la micropipeta multicanales evitando tocar las paredes del pozo.

Se llena el microdilutor de 50 μlitros por contacto con la superficie del extracto problema y se procede a realizar las diluciones sucesivas en la hilera escogida, introduciendo el microdilutor en el pozo y rotándolo sin excesiva presión, para realizar una microdilución seriada. Lo anterior también se realiza para la solución diluida (1:100) de la lectina comercial que servirá de referencia para la determinación cuantitativa.

Con un pipetero de gota se coloca en cada pozo 50 μlitros de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizados. Luego se rota la placa en forma circular y se lleva a la incubadora que está a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 1 hora.

f) Lectura:

Se coloca la microplaca de plástico sobre el dispositivo de lectura y se observa a través del espejo el fondo de los pozos de cada hilera de prueba.

Se reporta la máxima dilución que presente aglutinación.

CÁLCULOS:

La máxima dilución que presenta aglutinación se denomina como título (t) de la muestra. La prueba debe efectuarse varias veces para mayor representación y confiabilidad de la determinación (mínimo 3). Se saca el promedio de los títulos de las diferentes lecturas y se redondea al número entero más cercano.

1.- Se calcula el límite de detección del método usando como referencia la faseolotoxina (SIGMA L-8754); para lo cual, primero se necesita es necesario conocer la cantidad de lectina que se utiliza realmente en la determinación y se calcula de la siguiente forma:

$$E = M \times D$$

$$0.001 \mu\text{g} / \mu\text{L} \times 50 \mu\text{L} = 0.05 \mu\text{g de lectina} = E$$

Donde:

E = Cantidad de lectina para el primer pozo de la hilera respectiva (expresada en μg)

M = Concentración de lectina en la solución diluida (expresada en $\mu\text{g}/\text{mL}$)

D = Cantidad de muestra tomada por el microdilutor (μL)

Conociendo este dato se procede a efectuar el cálculo para el límite de detección del método:

$$L = 2 (E / 3^t)$$

Donde:

L = Límite de detección, cantidad mínima de lectina que produce prueba positiva de aglutinación (expresado en μg)

t = Título o el promedio de los títulos redondeado al entero inmediato

b) Con el resultado del límite de detección, se calculan las unidades hemaglutinantes (UHG) de la muestra problema, para lo cual es necesario

calcular la cantidad utilizada realmente de la muestra problema en el primer pozo de la hilera respectiva como se hizo anteriormente, pero expresada en miligramos; a su vez, se calcula la cantidad mínima de muestra que produce prueba positiva de aglutinación (título de la muestra problema)

$$MA = 2 (e / 3^t)$$

Donde:

e = Cantidad de muestra en el primer pozo (expresado en mg)

t = Título o promedio de los títulos redondeado al entero inmediato

MA = Cantidad mínima de muestra que produce aglutinación (expresada en mg).

L = Límite de detección (μg)

Con los datos anteriores se puede determinar la concentración equivalente de lectina que tiene la muestra problema de acuerdo a la siguiente expresión:

$$LE = L / MA$$

Donde:

LE = cantidad de lectina de referencia expresada en μg / mg de muestra que también equivale a 1 mg de lectina / g de muestra.

Si por definición establecemos que 1 unidad de hemaglutinación (UHG) es equivalente a 1 mg de faseolotoxina bajo las condiciones establecidas, podemos expresar nuestros resultados en UHG / g de muestra.

III.2.- Determinación de glucósidos cianogénicos (38)

Un método para detectar la presencia del ácido cianhídrico en un material biológico es la reacción de Guignard, que consiste en hacer reaccionar picrato de sodio con el HCN para producir isopurpurina (compuesto colorido).

Para ello se prepara un papel con picrato de sodio en una solución del 1% de ácido pícrico. El papel cambia de color de naranja a rojo. Este prueba es positiva con material que tenga aproximadamente 50 microgramos de ácido cianhídrico por gramo.

Para poder cuantificar el HCN total que se libera se adiciona una β -glucosidasa exógena para la hidrólisis del correspondiente glucósido cianogénico. Este método puede detectar hasta 5.0 microgramos de HCN, equivalente a 46.0 microgramos de glucósido cianogénico (expresado como linamarina). Es importante la extracción y los procedimientos para evitar errores.

MATERIAL Y REACTIVOS:

Incubadora marca BLUE-M

Congelador comercial

Espectrofotómetro Sequoia – Torner mod 340

Baño de agua con agitación marca LAB-LINE INSTRUMENT

Tubos de cultivo con tapón de rosca PYREX #9825 y 9826

Micromolino marca TECATOR mod CYCLO-TEC

Solución de beta-glucosidasa con activador (a)

Solución de KCN equivalente a 100 microgramos

HCN/mililitro (24.1 mg/100ml)

HCl 0.5 N

Fécula de maíz marca Maicena

Buffer de fosfatos pH = 7.0 (b)

Solución de picrato de sodio alcalinizada (c)

Papel indicador de HCN (d)

- a) Disolver 0.25 g de β -glucosidasa (250 mg) en solución buffer de fosfatos pH 7.0 teniendo la precaución de agitar suavemente (de lo contrario se formará una gran cantidad de espuma). Una vez disuelta la enzima, adicionar 1.7 g NaNO_3 que actúa como activador de dicha enzima; todo lo anterior se lleva a un volumen de 250 ml con el mismo buffer y así tenemos una concentración de 1 mg de β -glucosidasa/ml y 0.08 M de NaNO_3 .
- b) 39 mL de solución A (se diluye 27.8g de fosfato de sodio monobásico en 1000 mL de agua para tener una concentración 0.2M) y 61 mL de solución B (se diluye 53.65g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ó 71.7g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en 1 litro de agua para tener una solución 0.2M de fosfato de sodio dibásico) se diluyen en agua destilada a un total de 200 mL.
- c) Se disuelve en agua destilada 2.5g de ácido pícrico y a continuación 12.5g de carbonato de sodio, llevándose a un volumen de 500 mL con agua destilada.
- d) El papel Whatman del #2 se empapa en una solución de picrato de sodio alcalinizada, se deja escurrir y se pone a secar en una estufa a temperatura de 55-60°C por 30 minutos. A continuación se cortan tiras de 2 X 10 cm.

PROCEDIMIENTO:

Curva Estandar. Para la elaboración de la curva estándar de referencia, se usa una solución de cianuro de potasio con una concentración de 100 microgramos HCN/mililitro. Además con el fin de simular la interacción muestra –HCN liberada, se introduce en la curva estándar la llamada matriz alimenticia, que en este caso es fécula de maíz comercial.

Tubos para la curva estándar:

mL solución estándar	Matriz alimenticia	pH=7	→	HCl 0.5 N (en frío)	Concentración de HCN (µg)
			40°C / 4 hrs		
0	500 mg	5.0 mL		1.0 mL	Blanco
0.05	500 mg	5.0 mL		1.0 mL	5
0.2	500 mg	5.0 mL		1.0 mL	20
0.4	500 mg	5.0 mL		1.0 mL	40
0.6	500 mg	5.0 mL		1.0 mL	60

a) Preparación de la muestra

Cuando se requiere determinar con suma precisión el contenido de HCN en una muestra fresca, es necesario partir del material íntegro; para lo cual, el material se sometió a una molienda fina e inmediatamente se pasó a un frasco que cierre perfectamente y si no se va a realizar en ese momento la determinación, se procede a colocar la muestra ya molida en el congelador.

b) Procedimiento de análisis

Liberación del HCN de la muestra. Se colocó en un tubo de cultivo Pyrex # 9826 de 20 – 500 mg de muestra, dependiendo de su contenido aproximado de glucósidos cianogénicos (cuando no se tiene información se coloca la cantidad máxima de 500 mg); a continuación se le adicionaron 5.0 mL de solución de beta-glucosidasa (fría), se homogenizó y se procedió a colocar la tira de papel indicador humedecida (aproximadamente con ocho gotas de agua) en la boca del tubo y se cerró perfectamente con un tapón de rosca.

Una vez que se tuvo el anterior dispositivo se colocó en el baño María que estaba a una temperatura de $40^{\circ}\text{C} \pm 1$, con el control de velocidad de agitación ajustado a 3.5 oscilaciones/minuto, durante 4 horas. Al final de dicho tiempo se sacó el tubo y se colocó en el congelador por 30 minutos.

Transcurrido el anterior tiempo se sacó el tubo y se destapó para adicionarle 1.0 mL de HCl 0.5 N (frío); es importante que se usen los tapones adecuados, de esta forma la tira de papel indicador queda adherida a dicho tapón y se

evitarán problemas de manipulación en este paso.

Una vez adicionado el HCl, se vuelve a cerrar nuevamente, se homogeniza teniendo la precaución de que el líquido no toque el papel indicador y se coloca en la incubadora por espacio de 15 minutos a la temperatura de 60°C. Transcurrido ese tiempo, se saca de la incubadora y en ese momento se procede a realizar visualmente la detección cualitativa, aquellos tubos que no muestren ni siquiera ligera coloración café-rojiza en el papel indicador, se consideran negativos; en tanto aquellos que sí la muestren, se considerarán positivos y se procede a su determinación cuantitativa.

c) Determinación cuantitativa

Con cuidado se procede a recuperar el papel indicador y se coloca en un tubo de cultivo Pyrex # 9895, se le adicionan 20 mL de agua destilada (medidos con bureta) se tapa y se agita vigorosamente con el fin de extraer el pigmento de isopurpurina del papel indicador en el agua. Después de extraer el pigmento (aproximadamente de 2-5 minutos) se filtra el extracto acuoso con papel de filtración rápida. El filtrado se colocó en la fotocelda para su lectura con el espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm; previamente ajustado a 100% T con el blanco correspondiente (todos los reactivos, excepto la muestra).

CÁLCULOS:

Trazar la curva patrón usando los valores de absorbancia en el eje de las ordenadas y las correspondientes concentraciones de HCN en μg en el eje de las abscisas. Interpolarse el valor de absorbancia de la muestra en la gráfica para obtener el contenido de HCN liberado en μg . Para obtener el contenido de HCN en la muestra:

$$X \cdot D \cdot 100/M = \text{mg HCN}/100 \text{ g de muestra.}$$

X = μg de HCN.

D = número de veces de adición de 20 ml de agua (dilución), que solamente debe ser una vez.

M = mg de muestra.

$\mu\text{g HCN} \cdot D/\text{mg muestra} \cdot 1 \text{ mg HCN}/1000 \mu\text{g HCN} \cdot 1000 \text{ mg muestra}/1 \text{ g muestra} = \text{mg HCN}/\text{g muestra}$

mg HCN --- g muestra

x --- 100 g muestra

mg HCN/g muestra $\cdot 100 = \text{mg HCN}/100 \text{ g muestra}$

III.3 - Determinación de inhibidores de tripsina (40)

Una forma de evaluar los inhibidores de tripsina es la técnica utilizada por Kakade y colaboradores, la cual se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso de la muestra sobre una solución estándar de tripsina. El extracto directo o diluido se pone en contacto con una solución estandarizada de tripsina, y después de cierto tiempo se determina la actividad proteolítica remanente, por medio de un sustrato sintético (BAPNA), el cual produce una coloración que se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm. Dicha coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de la muestra (40).

MATERIAL Y REACTIVOS:

Potenciometro CORNING, mod 10

Parrilla con agitación magnética THERMOLINE, mod SP-13025

Baño maría GRANT, mod SE 10

Espectrofotómetro COLEMAN, mod. Junior II-A

Mezclador de tubos LAB-LINE, mod. Super-mixer

NaOH 0.01N

Solución amortiguadora de TRIS (hidroximetil-amino-metano) pH 8.2 y 0.05 M
(a)

Solución BAPNA (benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida-HCl)(SIGMA B-4875) (b)
Acido acético al 30%

Solución estándar de tripsina bovina (SIGMA # T-8253) (c)

HCl 0.001 N

- Se pesan 6.05g de TRIS y 2.94g de cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), se disuelven en 900mL de agua destilada, se ajusta el pH a 8.2 y se afora a un volumen de 1 litro.
- 100mg de BAPNA se disuelven en 2.5mL de dimetilsulfóxido y se diluye a 250mL con amortiguador TRIS previamente calentado a 37°C.
- Se pesan 4mg de tripsina bovina y se disuelven en 200mL de HCl 0.001N

PROCEDIMIENTO:

a) Preparación del extracto

Se pesa 1 gramo de muestra finamente molida en un vaso de precipitado y se le adiciona 45 mL de NaOH 0.01 N, se ajusta el pH de esta suspensión a 9.6± 0.2 y se afora con NaOH 0.01N a 50 mL. A continuación se transvasa a un vaso que contenga un magneto, para poder agitar la suspensión mecánicamente en la Parrilla de agitación por espacio de 2 ½ horas a 300 r.p.m.. Después de dicho tiempo se quita el magneto y se deja ½ hora en reposo, y por simple decantación se obtiene el sobrenadante eliminando el residuo insoluble. El sobrenadante debe ser diluido hasta el punto de que 1 mL produzca una inhibición de 40-60%; este requisito es indispensable para reducir la desviación estándar relativa.

b) Determinación de la actividad

Porciones de 0.0, 0.6, 1.0, 1.4 y 1.8 ml de extracto directo o diluido son pipeteados a tubos de ensayo por duplicado y ajustado el volumen a 2.0 mL con agua destilada, se introducen al baño maría a 37°C. Se adicionan 2.0 mL

de solución estándar de tripsina (previamente mantenida a 37°C) y se mantiene en contacto inhibidor-tripsina por espacio de 10 min. A continuación se adicionan 5 mL de solución BAPNA (a 37°C) a cada tubo y se mantiene dicha mezcla de reacción por 10 minutos exactos (con cronómetro). La reacción enzimática se detiene por la adición de 1 ml de ácido acético al 30%; el cual debe homogenizarse inmediatamente.

A continuación se presenta la tabla que muestra la serie de tubos que se deben preparar para poder determinar la actividad inhibitoria de la muestra:

CLAVE	mL extracto	mL agua	mL STD tripsina	10 min →	mL BAPNA	10 min →	mL Δ
Blanco 1 (B)	1.8	0.2	2.0 +1 Δ		5		-
1	1.8	0.2	2.0		5		1
B2	1.4	0.6	2.0 +1 Δ		5		-
2	1.4	0.6	2.0		5		1
B3	1.0	1.0	2.0 +1 Δ		5		-
3	1.0	1.0	2.0		5		1
B4	0.6	1.4	2.0 +1 Δ		5		-
4	0.6	1.4	2.0		5		1
B referencia (tripsina)	0.0	2.0	2.0 +1 Δ		5		-
Referencia (tripsina)	0.0	2.0	2.0		5		1

Donde Δ es ácido acético al 30%

La lectura en el espectrofotómetro se realiza a 410 nm y es necesario para cada una de las alícuotas del extracto, primeramente ajustar el aparato a 100% de transmitancia con su respectivo blanco. Hay que recordar que el tubo que no lleva extracto es la referencia (40 microgramos tripsina/10 mililitros), sobre el cual se basarán los cálculos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CÁLCULOS:

Una unidad de tripsina (U.T.) es arbitrariamente definida como un incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm por 10 ml de mezcla de reacción. Así la lectura de absorbancia (A) se puede pasar directamente a unidades de tripsina (U.T): $U.T. = A * 100$.

Debido a que se tienen una serie de alícuotas del extracto, se tendrán entonces una serie de valores de U.T. Estos valores de U.T. deben ser restados al valor de referencia: 0.0 ml de extracto, 40 μ g tripsina/10 ml para así obtener el valor de unidades de tripsina inhibida: U.T.I. Después calcular el valor de U.T.I./ml de cada una de las alícuotas tomadas del extracto y calcular el promedio de U.T.I./ml. La actividad de inhibidores de tripsina se expresa en términos de unidades de tripsina inhibida (U.T.I.), con respecto a 1 g de muestra:

$$B * F * (50/1000) = U.T.I./mg \text{ de muestra.}$$

Donde:

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

F = factor de dilución, cuando se trabaja el extracto directo F = 1.

$$F = A_1/a_1 * A_2/a_2$$

Donde:

A_i = Aforo (s)

a_i = alícuota (s)

50 = de 50 ml de extracto acuoso de la muestra que se prepararon.

1000 = de 1000 mg = 1 g de muestra que se toma para preparar 50 ml de extracto.

III.4.- Determinación de taninos (ISO) (41)

Uno de los métodos para determinar taninos es el método para fenoles totales complejos ión metal-fenol (método ISO 96 48:1988), que se basa en la reducción del ión férrico debida a los polifenoles con la posterior formación de un compuesto colorido en condiciones alcalinas, cuantificado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 525 nm.

MATERIAL Y REACTIVOS:

Agitador magnética con tacómetro marca Thermolyne.

Centrífuga para tubos marca Dynac CL.

Tubos de centrifuga de 15 mL.

Baño de agua con agitación marca LAB-LINE INSTRUMENT

Espectrofotómetro Sequoia-Turner, modelo 340.

Adaptador para celdas de 10*75mm.

Dimetilformamida (DMF) al 75% v/v

Citrato férrico de amonio (3.5g / L de Aldrich Chemical Company Inc.)

Amoniaco

Ácido tánico 0.2g/100mL (SIGMA T-0125)

PROCEDIMIENTO:

Se pesa 0.5 a 1 gramo de muestra, se pone en un vaso de precipitados, se le adiciona 18 mililitros de DMF, se agita 1 hora a 500 r.p.m. Se centrifuga 10 minutos a 3000 r.p.m. y se afora a 25 mililitros con DMF.

De ahí se toma 1 mL y se deposita en un tubo de ensayo, se le adiciona 5 mL de agua destilada, 1 mL del citrato férrico y 1 mL del amoniaco; se agitan y se dejan por 10 minutos en el baño a 30°C. El blanco en lugar de citrato, lleva 1mL más de agua. Se lee a 525nm.

Para la curva de calibración, se coloca en siete matraces volumétricos de 25 ml: 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 y 7.0 ml de solución de ácido tánico (2 mg/ml) tomados con pipeta graduada. Se lleva hasta la línea de graduación del

matraz de 25 ml con solución de dimetilformamida. La escala de la curva patrón que se obtiene corresponde al contenido de ácido tánico de 0.00 mg/ml, 0.08 mg/ml, 0.16 mg/ml, 0.24 mg/ml, 0.32 mg/ml, 0.40 mg/ml, 0.48 mg/ml y 0.56 mg/ml respectivamente. Se toma con pipeta 1 ml de cada una de las soluciones y colocarlo en un tubo de ensayo (8 tubos de ensayo en total). Se adiciona 5 ml de agua y 1 ml de solución de citrato férrico de amonio, agitar por unos segundos en el vortex. Se adiciona 1 ml de amoníaco, agitar por unos segundos en el vortex. Se transfiere las soluciones obtenidas a celdas y después de 10 ± 1 minutos medir absorbancia a 525 nm usando agua como blanco.

CÁLCULOS:

Se traza la curva patrón usando los valores de absorbancia en el eje de las ordenadas y las correspondientes concentraciones de ácido tánico en mg/ml en el eje de las abscisas. Se interpola el valor de absorbancia de la muestra (diferencia de las dos absorbancias medidas: muestra – blanco) en la gráfica para obtener el contenido de taninos en mg ácido tánico/ml.

Conociendo la concentración de ácido tánico, se puede reportar el porcentaje de ácido tánico a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ ácido tánico} = C \times (VF/P)$$

Donde:

% ácido tánico = g de ácido tánico en 100g de muestra

VF = Volumen final al que se lleva la muestra para obtener el extracto (25 mL)

P = peso de la muestra (mg)

C = concentración de ácido tánico (mg/mL)

III.5.- Determinación de fitatos (42)

Una forma de evidenciar y cuantificar este tipo de factores antinutricionales es a través del método Haug and Lantzsch, que es un método comparativo que se basa en la determinación colorimétrica indirecta del fósforo del fitato en la muestra. El extracto de la muestra es calentado con una solución acidificada de concentración conocida de Fe (III) en exceso, el cual forma un complejo con el fitato. Se cuantifica el hierro residual que el ácido fítico no alcanza a acomplejar mediante la reacción colorida que se produce con la 2,2-bipiridina y que es fácilmente medible espectrofotométricamente.

MATERIAL Y REACTIVOS:

Agitador magnética con tacómetro marca Thermolyne.

Centrífuga para tubos marca Dynac CL.

Tubos de centrifuga de 15 mL.

Espectrofotómetro Sequoia-Turner, modelo 340.

Canicas

Baño maría

Sal sódica del ácido fítico (SIGMA P-3168)

Solución de referencia de fitatos (a)

HCl 0.2 N

Sulfato férrico de amonio-12 H₂O

Solución férrica (b)

2,2-bipiridina (c)

Ácido tioglicólico

a) Para la preparación de la solución de referencia de fitatos, se utiliza la sal sódica del ácido fítico la cual tiene una pureza del 94%, y una humedad del 8.3%. La solución de referencia (patrón) se prepara de tal manera que contenga 1.5mg/mL de fitato en agua desionizada.

b) Solución férrica : pesar 0.2g de sulfato férrico de amonio-12 H₂O, disolver en 100mL de HCl 0.2N y aforar a 1000mL con agua desionizada.

c) Solución de 2,2-bipiridina : pesar 1g de 2,2-bipiridina, llevar 1 mL de ácido tioglicólico y aforar a 100 mL con agua desionizada. Requiere agitación constante para completa solubilización de la bipiridina. Se prepara en la campana.

Las soluciones son estables por varios meses en refrigeración.

Las soluciones para la curva patrón : éstas se preparan diluyendo la solución de referencia de fitato con HCl 0.2N en un intervalo de 3 a 30 μg de fósforo fítico/mL.

La solución patrón contiene 1.5mg/mL de fitato, es decir : $1500\mu\text{g}$ fitato de sodio/mL \times (185.82 μgP / 923.8 μg fitato de sodio) = 301.72 μgP /mL

PROCEDIMIENTO:

Se pesan de 0.040-0.120g de muestra y se colocan en un vaso de precipitado de 50 mL, se le adicionan 20mL de HCl 0.2N y se somete a agitación con magneto a temperatura ambiente durante 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se centrifuga el extracto a 1200r.p.m. durante 15 minutos a temperatura ambiente, se colecta el sobrenadante y se toman tres alícuotas de 0.5mL y se colocan en tubos de ensayo, se les adiciona a cada una 1mL de la solución férrica y se tapan con una canica, de manera que queden cubiertas completamente. Los tubos se colocan en una gradilla y se ponen en un baño de agua a ebullición por 30 minutos cuidando que el agua cubra el nivel del líquido dentro de los tubos. Transcurridos los 30 minutos esperar a que estos se enfríen. Una vez que los tubos han alcanzado la temperatura ambiente se les agregan 2 mL de solución 2,2-bipiridina y se mezcla el contenido. Se mide la absorbancia a 519 nm a los 30 segundos exactos después de haber agregado la 2,2-bipiridina a cada tubo.

El blanco lleva 0.5mL de agua en lugar de muestra. De los estándares también se toma una alícuota de 0.5mL y se le adiciona 1mL de solución férrica y se sigue con el análisis, de la misma manera que las muestras.

Se utiliza una celda con agua desionizada para calibrar el espectrofotómetro en cero. Se lee la absorbancia del blanco, las muestras problema y los estándares, cada una de estas se le resta por separado al blanco para así obtener la absorbancia corregida respectiva.

Realizar la curva patrón, regresión lineal, interpolar los datos y obtener la concentración de analito presente en las muestras.

CÁLCULOS:

Se elabora una curva patrón con los datos de absorbancia contra concentración de los estándares (3-30 μ gPfitico/mL), calculando la regresión lineal y obteniendo la ecuación de la recta para que con estos datos se pueda interpolar el valor de absorbancia obtenido para cada problema, y así conocer el valor correspondiente de concentración.

Fórmula de la ecuación de la recta: $y = mx + b$
 $X = (y-b) / m$

Donde:

x = fósforo del ácido fitico (μ g/mL)

y = absorbancia de la muestra

b = ordenada al origen

m = pendiente de la recta

$$\% \text{ ácido fitico} = ((\text{PM ácido fitico} \times \text{P del ácido fitico})/6P) / (\text{peso muestra} \times 1000)$$

Donde:

% ácido fitico = gramos de ácido fitico en 100g de muestra

P.M. del ácido fitico = 660.08 μ g/mol

P del ácido fitico = fósforo del ácido fitico (μ g/mL)

6P = 185.82 μ g/mol (equivale a 6 veces el peso de la molécula del fósforo)

Peso de la muestra = gramos de muestra

IV Digestibilidad *in vitro*

Un método para determinar digestibilidad *in vitro* es el que se describe en el AOAC (37), que utiliza enzimas proteolíticas: tripsina, quimotripsina y peptidasa, y proteasa bacterial. Se mide el pH al final del experimento y se determina el % de digestibilidad con el dato proporcionado por el potenciómetro.

MATERIAL Y REACTIVOS:

Baños de agua con agitación marca LAB-LINE INSTRUMENT a 37 y 55°C, conectados por medio de mangueras.

Potenciómetro CORNING, mod 10.

Solución A: disolver 227040 BAEE unidades de tripsina (SIGMA T-0134) (1) + 1860 BAEE unidades de α quimotripsina (SIGMA C-4129) (2) + 0.520 unidades de peptidasa L-Leucina β naftilamina (SIMGA P-7500) (3) en 10 mL de agua.

Solución B: disolver 65 unidades de caseína de proteasa bacterial (SIGMA P-5147) (4) en 10 mL de agua.

Donde:

BAEE es el sustrato N - α - benzoil - L - arginina etil ester.

(1) Una unidad de tripsina produce un ΔA_{253} de 0.001 por minuto a pH 7.6 a 25°C, usando BAEE como sustrato.

Contiene 16,700 BAEE unidades por mg de proteína. Por lo tanto para disolver 227040 BAEE unidades de tripsina, se requiere:

$$\frac{1 \text{ mg proteína}}{16,700 \text{ unidades BAEE}} \times 227040 \text{ unidades BAEE} = 13.59 \text{ mg de proteína}$$

y debido a que 100mg de tripsina equivalen a 100mg de proteína, se requiere:

100mg tripsina

----- X 13.59 mg proteína = 13.59 mg de tripsina

100 mg proteína

(2) Una unidad de α quimotripsina hidroliza 1.0 μ mol de BTEE (N – benzoil – L – Tirosina etil ester) por minuto a pH 7.8 a 25°C.

Contiene 54 BAEE unidades por mg de α quimotripsina. Por lo tanto para disolver 1860 BAEE unidades de α quimotripsina, se requiere:

1mg α quimotripsina

----- X 1860 unidades BAEE = 34.44 mg quimotripsina

54 unidades BAEE

(3) Una unidad libera 1.0 μ mol de β -naftilamina de L-Leucina β -naftilamida por minuto a pH 7.1 a 37°C.

Contiene 102 unidades por g de peptidasa. Por lo tanto para disolver 0.520 unidades de peptidasa L-Leucina β -naftilamina, se requiere:

1000mg peptidasa

----- X 0.520 unidades = 5.09 mg peptidasa

102 unidades

(4) Una unidad hidroliza caseína para producir color equivalente a 1.0 μ mol (181 1.0 μ g) de tirosina por minuto a pH 7.5 a 37°C.

Contiene 5.5 unidades por mg de sólido. Por lo tanto para disolver 65 unidades de caseína de proteasa bacterial, se requiere:

1mg proteasa

----- X 65 unidades = 11.81 mg proteasa

5.5 unidades

PROCEDIMIENTO:

Se parte de 10 mg de nitrógeno de la proteína de referencia (caseína) o muestra según sea el caso, a la cual se le añaden 10 mL de agua destilada en agitación a una temperatura de 37°C durante 1 hora, a continuación se mide el pH el cual se ajusta a 8.0 ± 0.3 con HCl o NaOH 0.1N según sea necesario.

Inmediatamente se le adicionan 1.0mL de solución A, la cual debe permanecer 10 minutos exactamente en agitación a una temperatura de 37°C, transcurrido el tiempo, se añade 1 mL de solución B, permaneciendo en agitación 9 minutos a una temperatura de 55°C, una vez que se acabó el tiempo, se coloca la muestra a 37°C durante 1 minuto y a los 20 minutos exactos de haber adicionado la solución A, se mide el pH.

El pH para la caseína control o referencia deberá ser de 6.42 ± 0.05 y sólo hasta que se obtiene este pH en la caseína de referencia, se podrá realizar la determinación de las muestras a ensayar.

CÁLCULOS:

El porcentaje de digestibilidad se obtiene al sustituir el pH en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ digestibilidad} = 234.84 - 22.56 (\text{pH})$$

Reunida la condición de que la referencia de caseína muestre un pH que sea igual a 6.42 ± 0.05 .

V Procesamiento con calor

Es del dominio popular y con base científica, que los frijoles se tienen que procesar con suficiente calor húmedo (cocer) para que se puedan consumir sin ningún riesgo aparente a la salud (7). Por lo cual, tanto al frijol Comba como al peruano, se les aplicó el proceso tradicional de calentamiento que se realiza en las comunidades donde se consumen estos frijoles, que consiste en hervir por 1 hora los frijoles a fuego directo, en una relación 1:3 con agua, una cucharada de sal y una ramita de epazote.

A este proceso para fines prácticos se le llamó: "casero".

También se llevó a cabo el método recomendado por el Public Health Laboratory Services (PHLS) de Colinde, Inglaterra, que en español se llama Los Servicios de Laboratorio de Salud Pública de Colinde, Inglaterra y que consiste en remojar en agua por lo menos 5 horas, remover el agua y hervir al menos por 10 minutos, para que las lectinas se inactiven. La temperatura a la que se llegó en el laboratorio durante la ebullición fue de 93°C. A este proceso para fines prácticos se le llamó: "PHLS".

Se debe de considerar que con el tratamiento PHLS, sobra agua de cocción, que se eliminó.

VI Análisis estadístico

Con el apoyo del paquete estadístico STAGRAPHS se pudo realizar el análisis estadístico (análisis de varianza "ANOVA") para poder observar si existía diferencia significativa (DSE) entre el frijol Comba y el frijol peruano que se consumen en San Miguel Totolapan, Gro. También se pudo comparar el proceso de destoxificación de ambos frijoles con los dos procesos de cocimiento que se llevaron a cabo.

Las variables que se analizaron estadísticamente fueron: contenido de fibra, de proteína, lectinas, glucósidos cianogénicos, inhibidores de tripsina, taninos y ñitatos.

Se utilizó la prueba de Rango Múltiple (Duncan) con un 95% de confianza.

CAPÍTULO 3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ANÁLISIS PROXIMAL

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En las tablas 1, 2 y 3 se muestran los resultados del análisis proximal del frijol peruano crudo y cocido con los dos tratamientos propuestos (PHLS y casero). Se observa que tanto en el frijol crudo, como en el tratado por el método PHLS y el cocido por el método casero, presentan una composición bromatológica muy similar entre sí. Además los valores obtenidos caen dentro del intervalo informado por otros autores para otras variedades del frijol común. Debido a la adición de sal, la cantidad de minerales en el frijol peruano casero es mayor a lo informado para otras variedades de *Phaseolus vulgaris* (22).

Tabla 1.- Análisis proximal del frijol *Phaseolus vulgaris* de la variedad peruano en forma de harina.

Componente ^a (g/100g M)	frijol crudo	frijol PHLS	frijol casero	Valores reportados ^b
Humedad	6.11±0.10	5.97±0.09	6.21±0.12	10.06-12.39
Proteína NX6.25	23.18±1.70	21.14±0.35	21.48±2.06	18.81-25.33
Grasa	0.58±0.01	0.79±0.20	0.77±0.12	0.25-2.66
Cenizas	3.72±0.19	3.69±0.07	4.96±0.28	3.37-4.30
Fibra	5.90±0.09	5.05±0.30	5.25±0.26	2.49-6.23
Carbohidratos (por diferencia)	60.51	63.36	61.33	58.33-64.19

^a El dato anotado es el valor promedio ± desviación estándar (n=3).

^b Rango reportado en Composition of food: Legumes and legume products. U.S. Department of Agriculture (43)

Tabla 2.- Análisis proximal del frijol peruano (*Phaseolus vulgaris*) en base seca.

Componente* (g/100g M)	frijol crudo	frijol PHLS	frijol casero
Humedad	6.11	5.97	6.21
Proteína NX6.25	24.68 ± 1.81	22.48 ± 0.38	22.90 ± 2.20
Grasa	0.61 ± 0.01	0.83 ± 0.02	0.81 ± 0.13
Cenizas	3.96 ± 0.20	3.92 ± 0.07	5.28 ± 0.30
Fibra	6.28 ± 0.10	5.37 ± 0.32	6.49 ± 0.14
Carbohidratos (por diferencia)	58.36	61.43	58.31

Tabla 3.- Análisis proximal del frijol peruano (*Phaseolus vulgaris*) recién cocido (en base húmeda).

Componente* (g/100g M)	frijol PHLS	frijol casero
Humedad	40.56	37.50
Proteína NX6.25	13.36 ± 0.22	14.31 ± 1.37
Grasa	0.49 ± 0.01	0.50 ± 0.08
Cenizas	2.32 ± 0.04	3.30 ± 0.18
Fibra	3.19 ± 0.19	3.49 ± 0.18
Carbohidratos (por diferencia)	40.08	40.90

En las tablas 4, 5 y 6 se presentan los resultados del análisis proximal del frijol Comba y se observa que la composición bromatológica es muy similar entre el frijol crudo, el PHLS y el casero.

Tabla 4.- Análisis proximal del frijol Comba (*Phaseolus lunatus*) en forma de harina.

Componente ^a (g/100g M)	frijol crudo	Frijol PHLS	frijol casero
Humedad	4.71 ± 0.13	4.79 ± 0.26	4.84 ± 0.01
Proteína NX6.25	22.99 ± 0.78	24.30 ± 0.24	21.67 ± 0.10
Grasa	0.32 ± 0.07	0.38 ± 0.16	0.48 ± 0.07
Cenizas	3.24 ± 0.16	3.05 ± 0.05	4.80 ± 0.22
Fibra	7.23 ± 0.83	6.09 ± 0.14	6.77 ± 0.20
Carbohidratos (por diferencia)	61.51	61.39	61.44

^a El dato anotado es el valor promedio ± desviación estándar (n=3).

Tabla 5.- Análisis proximal del frijol Comba (*Phaseolus lunatus*) en base seca.

Componente ^a (g/100g M)	frijol crudo	Frijol PHLS	frijol casero
Humedad	4.71	4.79	4.84
Proteína NX6.25	24.12 ± 0.82	25.51 ± 0.25	22.77 ± 0.11
Grasa	0.33 ± 0.07	0.39 ± 0.16	0.50 ± 0.07
Cenizas	3.40 ± 0.16	3.20 ± 0.05	5.04 ± 0.23
Fibra	7.58 ± 0.87	6.39 ± 0.15	7.11 ± 0.21
Carbohidratos (por diferencia)	59.86	59.72	59.74

Tabla 6.- Análisis proximal del frijol Comba cocido (*Phaseolus lunatus*) (en base húmeda).

Componente ^a (g/100g M)	Frijol PHLS	frijol casero
Humedad	50.63	45.28
Proteína NX6.25	12.59 ± 0.12	12.46 ± 0.06
Grasa	0.19 ± 0.08	0.27 ± 0.04
Cenizas	1.58 ± 0.02	2.75 ± 0.13
Fibra	3.15 ± 0.07	3.89 ± 0.11
Carbohidratos (por diferencia)	31.86	35.35

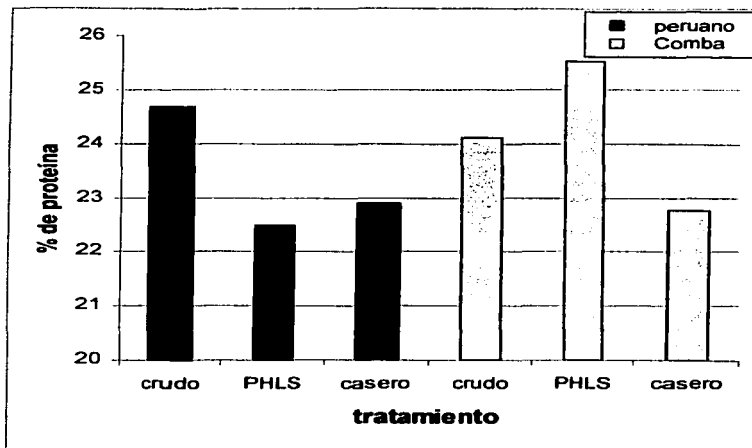
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Al comparar la composición bromatológica de ambos frijoles (peruano y Comba) se observa que el porcentaje de cenizas del frijol Comba es menor que el del frijol peruano y que el frijol Comba contiene más fibra que el frijol peruano.

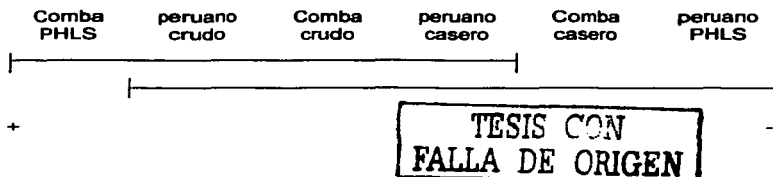
Los carbohidratos son el principal componente de los frijoles, y el contenido de grasa de ambos frijoles es muy pequeño, menor al 1%.

En la gráfica 1 se puede comparar el contenido de proteína de los diferentes frijoles y se observa que ambos frijoles al ser cocinados por el método casero, causan una pérdida de nitrógeno total. Pero mientras en el frijol peruano se observa que al ser tratado térmicamente por el método PHLS disminuye el porcentaje de proteína, en el frijol Comba se observa un aumento.

Gráfica 1.- Cantidad de proteína por 100 gramos de muestra de los frijoles en base seca.

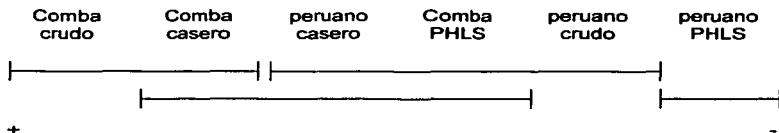


Al realizar el estudio estadístico del porcentaje de proteínas de las muestras en base seca, la prueba de análisis de varianza indica con un 95% de confianza que hay diferencia significativa (DSE) en los diferentes preparados; posteriormente se complementó con la prueba de rango múltiple (prueba de Duncan) en donde se presentaron las siguientes diferencias:



En donde se observa que ambos frijoles crudos contienen más proteína que los frijoles procesados, excepto el frijol Comba tratado por el método PHLS, que muestra una igualdad estadística con ambos frijoles en crudo; y lo interesante es observar que este frijol presenta en el análisis estadístico un mayor porcentaje de proteínas que las otras muestras y justamente el frijol peruano cocido por el método PHLS es la muestra con menor contenido de proteína, aunque no muestra diferencia significativa.

Debido a que la fibra dietética puede interferir en la digestibilidad de las proteínas, a continuación se muestra el análisis estadístico del porcentaje de fibra de los diferentes frijoles en base seca:



Con lo que se puede observar que el frijol Comba contiene más fibra que el frijol peruano. Y aunque se esperaría que el frijol peruano crudo tuviera más fibra que cuando es cocido como ocurre con el frijol Comba; y a pesar que ambos frijoles tratados por el método PHLS contienen menos fibra que cuando están crudos debido a una disolución parcial de este componente; se debe recordar que con el método PHLS se separó el agua remanente; mientras que cuando fueron cocidos por el método casero, se consumió toda el agua de cocción, por lo que de no haber disolución de la fibra, se debe esperar un contenido estadísticamente igual de fibra entre los frijoles crudos y los frijoles cocidos por el método casero, mientras que podría haberse perdido fibra en los frijoles cocidos por el método PHLS en el agua remanente y esto podría corroborarse si se analizara esta agua de cocción liofilizada.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FACTORES TÓXICOS Y ANTINUTRICIONALES

En las tablas 7, 8 y 9 se muestran los promedios de los factores tóxicos y antinutricionales del frijol Comba y del frijol peruano, en forma de harina, en base seca y en base húmeda, respectivamente.

Tabla 7.- Factores tóxicos y antinutricionales en forma de harina del frijol Comba y del frijol peruano.

Frijoles ^a	Lectinas (UH/g) ^b	Inhibidores de tripsina (UTI/mg) ^c	% Taninos	% Fitatos	Glucósidos cianogénicos (mg HCN/100g)
P. crudo	70.01 ± 34.62	29.05 ± 5.11	0.54 ± 0.00	0.51 ± 0.09	No detectable
P. PHLS	209.49 ± 103.42	4.27 ± 1.82	0.53 ± 0.00	0.52 ± 0.02	No detectable
P. casero	4.45 ± 3.07	2.65 ± 0.89	0.42 ± 0.00	0.41 ± 0.10	No detectable
C. crudo	8.98 ± 0.01	90.93 ± 9.78	0.69 ± 0.00	0.61 ± 0.04	3.19 ± 0.19
C. PHLS	2.32 ± 1.15	20.44 ± 2.32	0.58 ± 0.01	0.67 ± 0.05	2.54 ± 0.33
C. casero	0.29 ± 0.00	8.33 ± 1.22	0.36 ± 0.00	0.65 ± 0.03	1.44 ± 0.20

^a Promedio ± desviación estándar, donde n=3

^b Expresado en UH/g muestra, donde UH es unidad hemaglutinante y equivale a 1mg de faseolotoxina SIGMA L-8754

^c Expresado en UTI/mg, que son unidades de tripsina inhibida por miligramo de muestra.

Tabla 8.- Factores tóxicos y antinutricionales en base seca del frijol Comba y del frijol peruano.

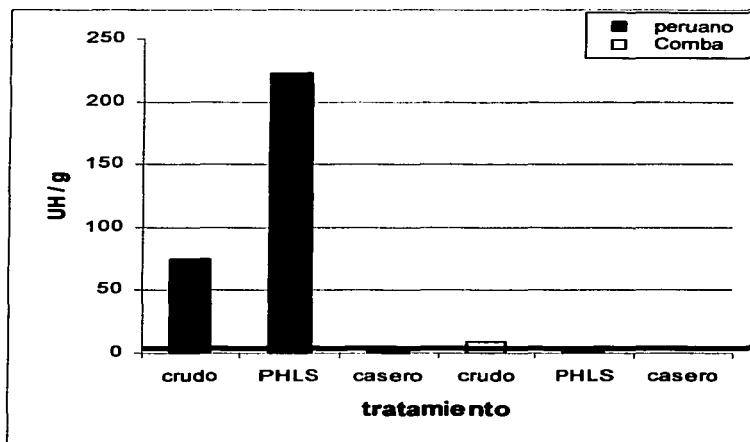
Frijoles *	Lectinas (UH/g) ^b	Inhibidores de tripsina (UTI/mg) ^c	% Taninos	% Fitatos	Glucósidos cianogénicos (mg HCN /100g)
P. crudo	74.56 ± 36.87	30.93 ± 5,44	0.57 ± 0.01	0.54 ± 0.10	No detectable
P. PHLS	222.78 ±109.97	4.53 ± 1.93	0.56 ± 0.01	0.55 ± 0.02	No detectable
P. casero	4.74 ± 3.28	2.81 ± 0.95	0.44 ± 0.01	0.43 ± 0.11	No detectable
C. crudo	9.42 ± 0.01	95.42 ±10.26	0.72 ± 0.01	0.63 ± 0.05	3.34 ± 0.20
C. PHLS	2.42 ± 1.20	21.46 ± 2.43	0.60 ± 0.01	0.69 ± 0.05	2.65 ± 0.34
C. casero	0.30 ± 0.00	8.74 ± 1.28	0.33 ± 0.00	0.68 ± 0.04	1.51 ± 0.21

Tabla 9.- Factores tóxicos y antinutricionales en base húmeda del frijol Comba y del frijol peruano.

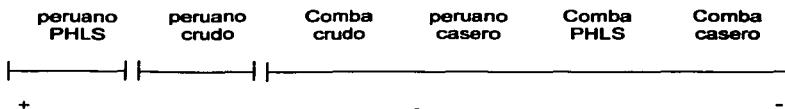
Frijoles *	Lectinas (UH/g) ^b	Inhibidores de tripsina (UTI/mg) ^a	% Taninos	% Fitatos	Glucósidos cianogénicos (mg HCN /100g)
P. crudo	70.01 ± 34.62	29.05 ± 5.11	0.54 ± 0.00	0.51 ± 0.09	No detectable
P. PHLS	132.42 ± 65.37	2.70 ± 1.15	0.33 ± 0.00	0.33 ± 0.01	No detectable
P. casero	2.96 ± 2.04	1.76 ± 0.59	0.28 ± 0.00	0.27 ± 0.07	No detectable
C. crudo	8.98 ± 0.01	90.93 ± 9.78	0.69 ± 0.00	0.61 ± 0.04	3.19 ± 0.19
C. PHLS	1.20 ± 0.59	10.59 ± 1.20	0.30 ± 0.00	0.34 ± 0.02	1.31 ± 0.17
C. casero	0.16 ± 0.00	4.78 ± 0.70	0.20 ± 0.00	0.37 ± 0.02	0.82 ± 0.11

En la gráfica 2 se muestra el contenido de lectinas de los frijoles y se observa, que el contenido en el frijol peruano es mucho mayor que en el Comba.

Gráfica 2.- Unidades de aglutinación de lectinas por gramo de muestra de los frijoles en base seca.



Al realizar el estudio estadístico de lectinas en los diferentes preparados en base seca, las pruebas de análisis de varianza indican que había DSE y con la prueba de Duncan se encontró lo siguiente:



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la gráfica 2 se observa que el frijol peruano crudo y el peruano PHLS presentan alta toxicidad de lectinas.

A pesar de que el coeficiente de variación reportado es muy alto, con la ayuda de la estadística se pueden comparar ambos frijoles bajo los distintos tratamientos y se observa que el frijol peruano PHLS contiene más lectinas que el mismo frijol crudo, por lo que el tratamiento que propone el laboratorio de Salud Pública en Colinde, Inglaterra, no es suficiente para inactivar las lectinas de los frijoles; por el contrario, aumenta el contenido de éstas, lo que se podría explicar como una consecuencia de un calentamiento leve que logra abrir las cadenas de proteínas de las lectinas, aumentando la superficie de contacto y por lo tanto causando una mayor aglutinación de los eritrocitos. En el frijol Comba no se observa este aumento, tal vez debido a su bajo nivel de este tóxico, y al ser cocinado por el método casero, se logra destoxificar satisfactoriamente.

Por lo que podemos suponer que el laboratorio de Salud Pública en Colinde, Inglaterra estudió frijoles con un contenido de lectinas no tan alto como el que presenta el frijol peruano.

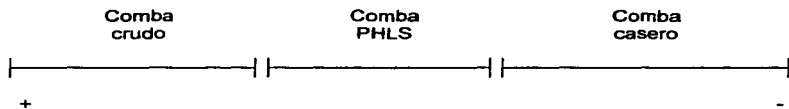
La tabla 8 muestra que el frijol de la variedad peruano, no presenta glucósidos cianogénicos y que los mg de HCN del frijol Comba se reduce al incrementar el tratamiento térmico.

Tabla 8.- Glucósidos cianogénicos en los frijoles en base seca

Frijoles	mg de HCN / 100g
Peruano	No detectable
Comba crudo	3.34
Comba PHLS	2.65
Comba casero	1.51

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El análisis estadístico de glucósidos cianogénicos en los diferentes preparados en base seca, indica que había DSE y con la prueba de Duncan se encontró lo siguiente:



El frijol peruano no presenta glucósidos cianogénicos, lo que es de esperar ya que se trata de un *Phaseolus vulgaris*.

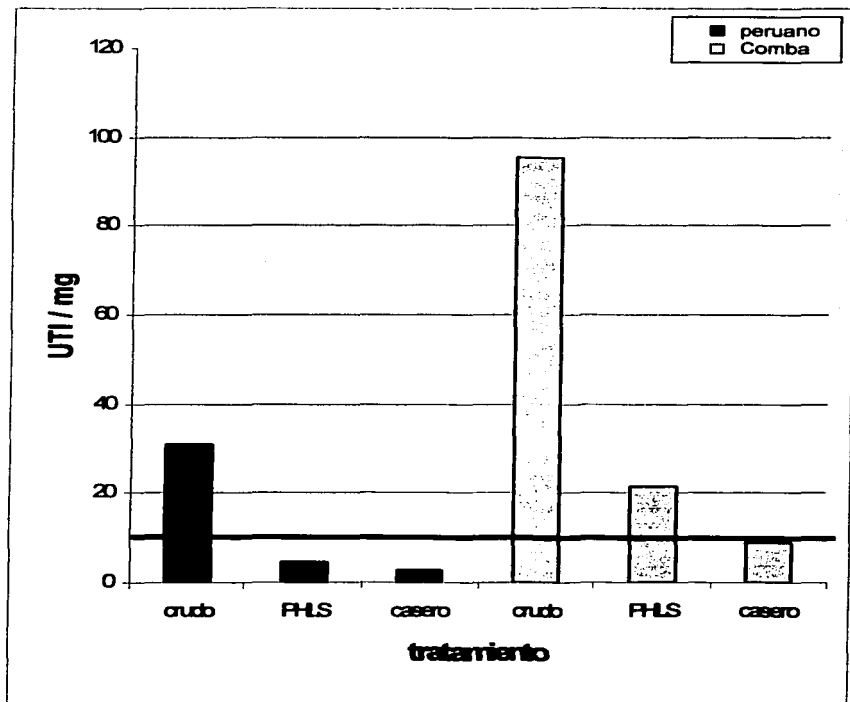
El frijol Comba si presenta glucósidos cianogénicos, estando crudo 3.34mg de ácido cianhídrico en 100 gramos de muestra, cocido por el método PHLS 2.65mgHCN/100g y el casero 1.51mgHCN/100g de muestra. Estadísticamente estos valores son diferentes entre sí. Pero ninguno de los 3 valores alcanza los 10mg que causan daño en humanos, y los tres superan el miligramo del ácido en 100 gramos de muestra que causa problema en aves, que son hipersensibles a los glucósidos.

El frijol Comba en estudio es una variedad cultivada y el contenido de ácido cianhídrico encontrado va de acuerdo a los estudios de De la Vega y Sotelo (44), que estudiaron las diferencias en cuanto al análisis proximal, contenido de inhibidores de tripsina, de hemaglutininas y ácido cianhídrico generado por glucósidos cianogénicos, entre variedades silvestres y cultivadas de *Phaseolus lunatus*; donde encontraron que la diferencia más notoria era la alta concentración de ácido cianhídrico en las variedades silvestres.

En la gráfica 3 se observa que el frijol Comba presenta un alto nivel de inhibidores de tripsina y que éste se ve reducido al ser tratado térmicamente.

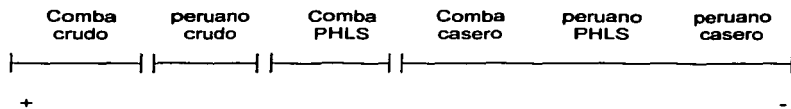
También el frijol peruano contiene más de 10 unidades de tripsina inhibida en su forma cruda.

Gráfica 3.- Inhibidores de tripsina en los frijoles en base seca.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El análisis estadístico de los frijoles en base seca muestra lo siguiente:



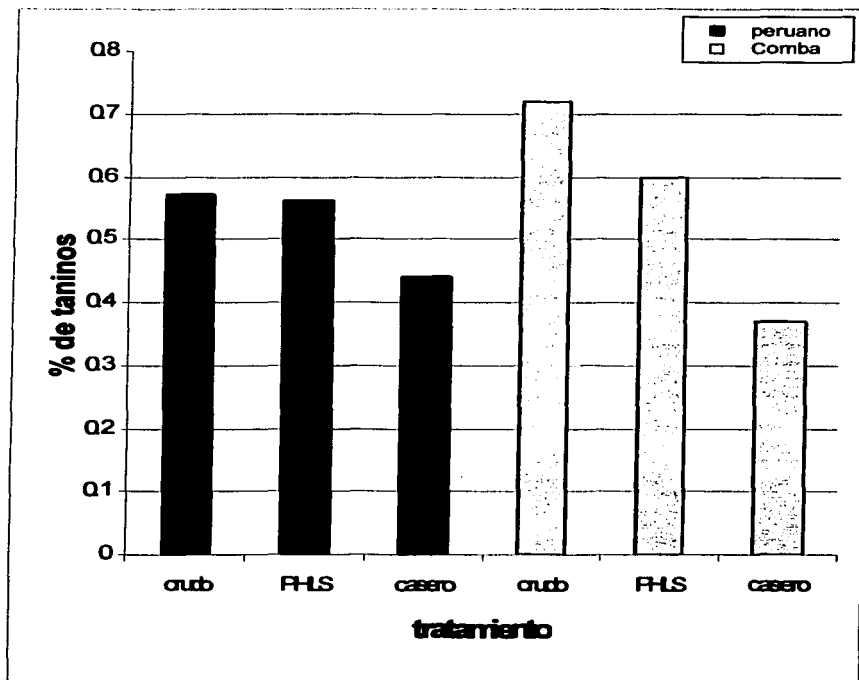
El frijol Comba crudo contiene significativamente más inhibidores de tripsina que los demás frijoles, su contenido es de 95.42 UTI/mg, mientras que la técnica establece que para que sean comestibles los frijoles deben contener menos de 10 UTI/mg. Al cocerlo por el método PHLS, presenta 21.46 UTI/mg, es decir, no logra ese cocimiento destoxificar adecuadamente al frijol.

El frijol peruano crudo rebasa el límite máximo para que sea apto para ser consumido. Así es que tanto el frijol Comba como el peruano en crudo presentan mayor actividad de inhibición de tripsina que al ser procesados.

El frijol Comba casero, el peruano PHLS y el peruano casero contienen menos de 10 UTI/mg, por lo que pueden ser consumido sin causar problemas.

En la gráfica 4 se observa que el frijol Comba crudo y el frijol peruano crudo son los que más contienen taninos. Y como está reportado en la literatura, el remojo y la cocción extraen una proporción importante de taninos y reducen su efecto (21).

Gráfica 4.- Porcentaje de taninos en los frijoles en base seca.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Todos los frijoles presentan diferencias significativa entre sí, en cuanto al porcentaje de taninos, en el análisis estadístico de los frijoles en base seca; excepto el frijol peruano crudo y el PHLS, como se puede observar en la siguiente representación:

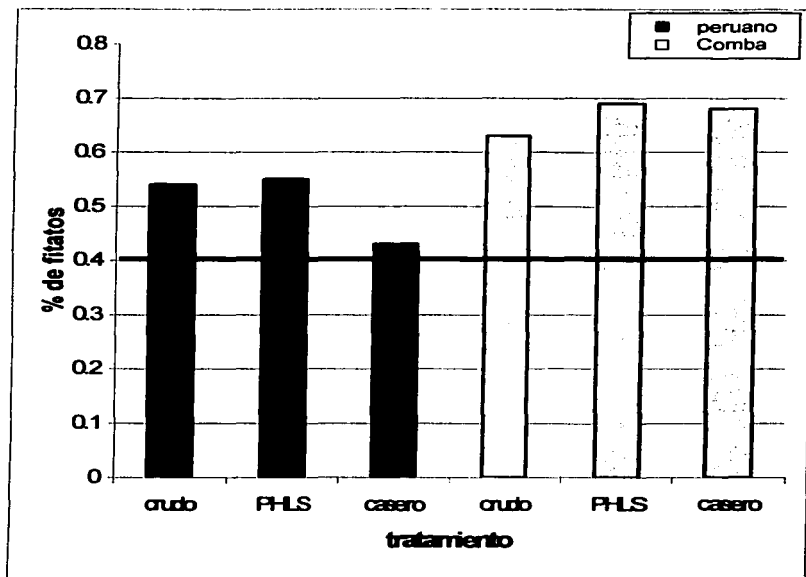


El que contiene mayor porcentaje de taninos es el frijol Comba crudo (0.72%), luego el peruano crudo, el peruano PHLS, el Comba PHLS, peruano casero y finalmente el Comba casero (0.37%).

La ingesta diaria admisible es de 500mg/Kg p.c. por día. Por lo que un hombre mexicano de 60Kg, tendría que consumir alrededor de 30g diarios de taninos para que le produjeran daño; el frijol Comba PHLS en base húmeda como es consumido, tiene 0.30% de taninos, por lo que este hombre tendría que consumir 10 Kg de frijoles en un día, por lo que se observa que no se ve afectada la biodisponibilidad de las proteínas de los frijoles por la cantidad de taninos presentes en estos frijoles.

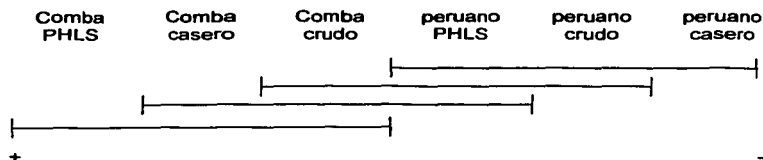
En la gráfica 5 se observa que tanto el frijol Comba como el peruano, contienen más de 0.4% de fitatos que es el porcentaje que se considera desmineralizante, pero nadie los consume crudos y en base seca, y ambos frijoles cocidos no presentan problemas porque están por debajo del valor recomendado como máximo.

Gráfica 5.- Porcentaje de fitatos en los frijoles en base seca.



Al realizar el estudio estadístico de fitatos de las muestras en base seca, las pruebas de análisis de varianza indican que había DSE y con la prueba de Duncan se encontró lo siguiente:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



El frijol Comba contiene mayor contenido de fitatos que el frijol peruano. Todas las muestras en base seca sobrepasan el 0.4% de fitatos, por lo que se les considera que contienen un porcentaje de fitatos desmineralizante.

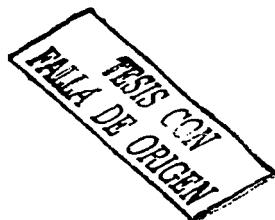
Ambos frijoles al cocerlos por los dos métodos tratados, en base húmeda presentan menos del 0.4%, por lo que no presentan problemas para ser consumidos.

En la tabla 9 se observa que todos los frijoles presentan una digestibilidad *in vitro* parecida.

Tabla 9.- Digestibilidad *in vitro* del frijol Comba y del frijol peruano.

Frijoles	Digestibilidad <i>in vitro</i>
P. crudo	75.41% \pm 1.58
P. PHLS	78.57 % \pm 1.45
P. casero	78.95 % \pm 0.39
C. crudo	77.22 % \pm 0.85
C. PHLS	77.89 % \pm 1.04
C. casero	80.30 % \pm 1.47

Promedio \pm desviación estándar, donde n=3.



El análisis estadístico de los frijoles en forma de harina muestra lo siguiente:

CONCLUSIONES

- ◆ Ambas especies no presentan diferencia significativa en el contenido de proteína.
- ◆ El frijol peruano cocido por el método casero no presenta ningún riesgo para ser consumido.
- ◆ El tratamiento PHLS presenta una inadecuada destoxicación del frijol peruano, ya que deja un nivel de lectinas significativo.
- ◆ El frijol Comba cocido con ambos tratamientos presenta en general valores bajos de los tóxicos analizados por lo que su ingesta es segura y presenta ventajas sobre el frijol peruano.

RECOMENDACIÓN: Confirmar con ensayos biológicos, la información química e *in vitro* presentada en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Cubero, J.I., Moreno M.T. Leguminosas de grano, editorial Acribia, pág 15-19, 218-254, Zaragoza (1983).
- (2) Robinson, D.S. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Ed. Acribia, S.A. pág 107-141, Zaragoza (1991).
- (3) Derache, R. Toxicología y seguridad de los alimentos, ediciones Omega, Zaragoza pág 24, 111-130, 483-485, (1990)
- (4) Sinha, S.K. Las leguminosas alimenticias (su distribución, su capacidad de adaptación y biología de sus rendimientos). FAO: colección producción y protección vegetal #3, pág 1-12, 19-79, Roma (1978).
- (5) Harlan, J.R. Las plantas y animales que alimentan al hombre. Revista Investigación y Ciencia No. 2, 64-75 (1976).
- (6) Carmona, A., Borgoudd, L., Borges, G., and Jevy-Bashimol, A. Effect of blackbean tannins on *in vitro* carbohydrate digestion and absorption. J. Nutr. Biochem. 7, 445-450, (1996).
- (7) Liener, I.E., Toxic constituents of plant foodstuffs, 2ª edición Academic Press, pp 3-7, 12, 23, 24, 73-96, 143-157, 452, 453 (1980).
- (8) Ferrando, R. Alimentos tradicionales y no tradicionales. FAO: colección alimentación y nutrición 2, pág v-vii, 3-60, 83-130, Roma (1980).
- (9) Huisman, J. van der Poel, T.F.B. y Liener, J.E. Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds. Pudoc Wageningen Pers pág 285-296, Wageningen (1988).
- (10) Cost 98, Effects of antinutrients on the nutritional value of legume diets, 3, 65 (1998).
- (11) Página WEB: <http://vm.cfsan.fda.gov/%7Emow/chap43.html> Consultada a las 17:11 hrs. Del 24 de noviembre de 1997. U.S. Food & Drug Administration, "Phytohaemagglutinin". Center for Food Safety and Applied Nutrition.
- (12) Mackie W.W. Origin, dispersal, and variability of the lima bean, *Phaseolus lunatus*. Journal of Agriculture Science (California Agricultural Experiment Station), Vol 15, No 1. pág 13, 17 (1943).

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- (13) Hernández, J.E y León, C. Cultivos marginados (otra perspectiva de 1492). FAO: colección de alimentación y nutrición #2, pág 52, 54-55, Roma (1992).
- (14) Kay, D. Legumbres alimenticias, Ed. Acribia, pág 233-234, 243, Zaragoza (1985).
- (15) Aguilar, A. y Zollo, C. Plantas tóxicas de México. Publicación del IMSS, 1ª edición, pág 167-168, México, D.F. (1982).
- (16) Lindner, E. Toxicología de los Alimentos, 2ª edición, editorial Acribia, Zaragoza pág 1-17, 82-84 (1995)
- (17) Contreras, S. Araya, H., Pak, N. y Tagle, M.A. Factores tóxicos de leguminosas cultivadas en Chile. Glucósidos cianogénicos. Arch. Lat. Nutr. (1973).
- (18) Harris, J. Merson, G. Hardy, M. and Curtis, D. Determination of cyanide in animal feeding stuffs Analyst 105, 974-980 (1980).
- (19) Adrian, J., Potus, J. Poiffait, A., Dauvillier, P. Análisis nutricional de los alimentos. Ed. Acribia S.A. Zaragoza, pág. 209-212, (2000).
- (20) Watson, D.H. Natural Toxicants in Food, Ellis Horwood, Chichester, pág 111-119 (1987).
- (21) Desphande S.S., Cheyran M. Evaluation of vanillin assay for tannin analysis of dry bean. J. Food. Sci, 50, 905-910 (1985).
- (22) Fernández Jiménez, H. A.- Determinación de las condiciones óptimas de almacenamiento de cuatro variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Tesis de maestría en Ciencia de los Alimentos Universidad Iberoamericana (1999).
- (23) Concon, J. Food toxicology Part A: principles and concepts. Marcel Dekker, Inc., pp 411-416, N.Y., (1988).
- (24) Dintzis, F.R., Lehrfeld, J., Nelsen, T.c., Finney, P.L. Phytate content of soft wheat brans as related to kernel size, cultivar, location and milling and flour quality parameters, Cereal Chem. 69 (5) 577-581 (1992).
- (25) Lolas, C.M. y Markakis, P. Phytic acid and other phosphorus compounds of beans (*Phaseolus vulgaris*). J. Agr. Food Chem.23:13 (1975).
- (26) Kasim, A.B., Edwards H.M. The Analysis for inositol phosphate forms infeed ingredients. J. Sci. Food Agric. 76, 1-9 (1998).

- (27) Ballesteros G, Evolución del frijol Lima (*Phaseolus lunatus* L.), colegio de postgraduados Montecillo, pág 1, 48, Texcoco (1990).
- (28) Flores, N (editor) ¿Producir para la desnutrición? Centro de Ecodesarrollo, pág 13-34, 243-266, México, D.F. (1988).
- (29) Avila, M, Suárez, M. Osorio, R. y Velasco, O. Análisis proximal de algunos constituyentes de la dieta complementaria de los tenek de Aquismán, S.L.P. En: Ruvalcaba, J y Alcalá, G. Huasteca: prácticas agrícolas y medicina tradicional. SEP-CIESAS, 1ª edición, pág 25-39, México, D.F. (1992).
- (30) Reyes Moreno, C., Paredes López, O. Endurecimiento del frijol común. Cuadernos de nutrición. 15 (2) 17-32 (1992).
- (31) Salunkhe, D.K., Kadam, S.S., Chavan, J.K. Postharvest Biotechnology of food legumes. CRC Press, Inc., pág 11-13, 39-42, N.Y., (1985).
- (32) Dessert, S.K.C., Bliss, A.F.- Genetic improvement of food quality factors. Academic Press, pag 105-107, N.Y., (1985).
- (33) Burano, C., Muzquiz M., Ayet, G., Cuadrado, C. y Pedrosa M.M., Evaluation of antinutritional factors of selected varieties of *Phaseolus vulgaris*, J. Sc. Food Agric. 79: 1468-1472 (1999).
- (34) Mitchell H. Nutrición y dieta Interamericana, 16 edición, pág 129-130, (1978).
- (35) Fox, B. A., Cameron, A. G. Ciencia de los alimentos, Nutrición y Salud. Limusa Noriega Editores. 5ª edición, pág. 198 (1997).
- (36) Sarwar, G. Y McDonough, F. Evaluating of protein digestibility-corrected amino acid score method for assessing protein quality of foods. J. Assoc. Anal. Chem. 73, 347-356 (1990).
- (37) Official methods of analysis of AOAC, Herlich, K. (Ed.) Published by AOAC Press, 15a edición, Vol I pp 17-18, 40-62, 69-83, Vol II pp 1095-1098, Arlington (1990).
- (38) Lucas, B y Sotelo A. A useful modification of the haemagglutination method for screening of lectin in legume seeds. Second International Workshop on ANF's in legume seed. EAPP Publication No. 70, pág 71-74, Wageningen (1993).

- (39) Jaffé, B. Nutritional aspect of common beans and other legume seeds on animal and human foods. Published by Arch. Lat. Nutr., pág 81-119, 217-238, Caracas (1973).
- (40) Kakade, M.I. Rackis, J.J. Maghee, J.E. and Puski, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products Cereal Chem. 51, 376-382 (1974).
- (41) ISO 9648 "Determinación del contenido de taninos en sorgo", International Organization of Standardization (1988).
- (42) Haug, W., Lantzsck, H.J. Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. J. Sci. Food Agric. 34, 1423-1426 (1983).
- (43) Haytowitz, D. y Matthews, R., Composition of food: Legumes and legume products. Nutrition Monitoring Division, pp 24-72 U.S. Department of Agriculture (1986).
- (44) De la Vega, A. y Sotelo, A. The nutritional quality and toxin content of wild and cultivated lima beans (*Phaseolus lunatus*). Qual Plant Plant Foods Hum Nutr 36, 75-83 (1986).