



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“NIVEL DE PROTEÍNA Y FACTORES TÓXICOS
INTRÍNSECOS EN DIFERENTES FASES
DEL DESARROLLO DE DOS
VARIEDADES DE FRIJOL COMBA
(*Phaseolus lunatus*)”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

SOLÍS CANO JOSÉ ALFONSO



MÉXICO, D. F.



2004

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

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

NOMBRE:

J. Alfonso Solís Cano

FECHA:

27-Ago-2004

FIRMA:



Jurado asignado:

Presidente.	Prof. Bernardo Lucas Florentino
Vocal.	Prof. Lucia Gabriela Bascuñan Termini
Secretario.	Prof. Lucia Cornejo Barrera
1er. Suplente	Prof. Ines Miranda Martínez
2º. Suplente	Prof. Rosa Maria Argote Espinosa

Sitio donde se desarrollo el tema: Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

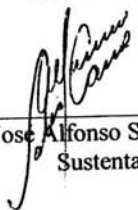
Conjunto E. Laboratorio 111.
Departamento de Farmacia



M. en C. Bernardo Lucas Florentino
Asesor



Q.F.B. Leticia Gil Vieyra
Asesor Técnico



Jose Alfonso Solís Cano
Sustentante

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de sentir el orgullo de ser universitario, que es la experiencia mas grande que puede vivir un estudiante.

Por que en ella viví los años mas felices de mi vida y logre cumplir muchos de mis mas grandes sueños *Gooooya! Universidad!*

Al profesor Bernardo Lucas Florentino por haberme brindado la oportunidad de desarrollar esta tesis, por haber confiado en mi, por su ayuda en todo momento, por sus consejos, por su paciencia, pero principalmente por ser siempre un ejemplo de trabajo y dedicación.

A la maestra Lety Gil porque gracias a su gran ayuda a lo largo de toda la investigación tanto en las determinaciones analíticas como en las cuestiones teóricas, fue posible la culminación de este trabajo. Pero principalmente por su amistad.

A la maestra Rosa Ma. Por su ayuda y sus consejos en las determinaciones analíticas, por su amistad y su ejemplo.

A la maestra Angela por ser un ejemplo de trabajo y superación, por haberme permitido trabajar en su laboratorio y por su forma de ser con todos nosotros.

A la maestra Lucia Cornejo y a todos los profesores de la facultad de química que participaron en mi formación profesional.

A Gabriela López por ayudarme en todo momento a lo largo del proyecto, por creer en mi, por apoyarme y alentarme a seguir adelante. Muchas gracias!

A Carlos romero por su ayuda y consejos dentro del laboratorio.

A Saarka Nutricion y Tecnología, por la donación de un reactivo esencial para la culminación de este trabajo.

A Iliana y Argelia por su ayuda y consejos en la elaboración de este trabajo. Por la convivencia que vivimos desde el principio

Adriana Ibarra, por su ayuda y por estar a mi lado en los momentos difíciles, ya que eso permitió la culminación de esta meta.

A la señora Vicky por su apoyo en todo momento, por preocuparse por mi

A todos los miembros de laboratorio 111, a Gabys, Carlitos, Ili, Arge, Nor, Fer, Fer C. Hector, Sandra, Juan, Anita, Millet por la amistad que me brindaron durante mi estancia en el laboratorio. Nunca los olvidare...

DEDICATORIAS

A mi padre. Por que has sido siempre un ejemplo de trabajo, de responsabilidad, de honestidad. Por que gracias a los valores que me has inculcado con tu ejemplo he logrado muchas de mis metas, por ser mi amigo, por apoyarme en todos los momentos que han sido importantes en mi vida, por tus consejos, por impulsarme a ser mejor en cada momento.

A mi madre. Por tu confianza, por que has sido siempre un ejemplo de fortaleza, de superración, por enseñarme que no hay algo lo suficientemente grande para rendirse, por los momentos tan felices que hemos pasados juntos y que nunca olvidare. Gracias mamá.

Mamá Trini. No tengo las suficientes palabras para agradecerte todo y decirte lo que representas para mi. Por estar a mi lado siempre, por tu cariño, por tus cuidados, por tu compañía.

A mi tía Chela, por permitirme ser yo mismo, por estar siempre ahí, por tu apoyo y comprensión, por ser como eres, gracias!. A Tere, por tu ejemplo de dedicación; a Trini, por tu ejemplo de responsabilidad; a Pepe, por tu ejemplo de profesionalismo; a Jaime, Mario y Rocío por haber estado siempre conmigo, pero principalmente por ser la familia unida que siempre hemos sido.

A mi hermana Ale. Por los momentos que hemos compartido, por los recuerdos, por que gracias a ti comprendí que con esfuerzo se puede llegar tan lejos como uno quiera.

A mi compadre Rock. Por todo lo que hemos vivido juntos, por los momentos alegres y difíciles, de los cuales hemos aprendido, pero en primer lugar por ser como un hermano.

Adriana Ibarra. Por ser la persona que eres, por estar a mi lado a pesar de todo, por lo que hemos vivido y compartido, por tu cariño, por tu confianza.

A mis primos Clau, Ari, Daf, José Alonso y Memo. Por que están dentro de mis mas felices recuerdos.

A la memoria de Don Elfego Solís †. Por su ejemplo de rectitud y esfuerzo, por su gran corazón. Nunca te olvidare abue.

A la memoria de Gervasio Cano [†].

A mi abue Soco, mis tías, tíos, y toda la familia Cano Gutiérrez

A Jorge. Por enseñarme que la grandeza de un hombre esta en función de su pensamiento y que a partir de este se puede lograr lo que se proponga. Por enseñarme también que la libertad esta después de las berreras que nosotros mismos nos imponemos. Por haberme hecho recordar cuando había olvidado. Por ayudarme a ser un individuo pleno.

A mis amigos: Omar, Adrián, David, Alex, Gaby, Fidel, Sandra, Carlitos, Darío, Yuyis, Fer, Sofia, Lilzáhira שופיא, Joaquín, Angèlica, Adonai, Jesusu, Javo, Gus, Juan, Macias, Leets, los Robertos, Lau, Eva, Ken, y a todos mis amigos voleibolistas de la UNAM. Por la amistad que hemos compartido, por que son parte importante en mi vida, por que han llenado mi camino de alegría y Luz, por los recuerdos y lo que podemos vivir juntos todavía. A Mario y Torres por que me enseñaron a luchar y que nada es imposible cuando se tiene voluntad.



*¡He aquí, pues, dijo Satán, mi nueva patria!
¡Que clima, que lugar!...
¡Adiós campos de luz, adiós lugares de paz!...
Negro infierno, ábreme tus abismos más sombríos...
¡Eh! ¡Que importa una tierra alegre o maldita!
No son los lugares sino su corazón donde habitamos;
¡El corazón! De nuestra suerte árbitro eterno
Hace del cielo un infierno y del infierno un cielo...
Todos los lugares son iguales cuando el alma es la misma.
¡Ven! Te traigo un corazón que nada puede cambiar,
Ni los lugares ni los tiempos, ni tormento o peligro.
Recibe a un desdichado que se resuelve a ser
Indigno de perdón y rebelde de un señor.*

*Aquí abajo soy libre; es suficiente; prefiero
Un trono en el infierno que cadenas en el cielo.*

J. MILTON, *El paraíso perdido*

לוייתו
יהודה

**INDICE GENERAL**

	Página
<u>Introducción</u>	1
<u>Objetivo general</u>	2
<u>Objetivos específicos</u>	2
<u>Antecedentes</u>	
1. Importancia del frijol	3
2. Factores tóxicos y antinutrimientales presentes en los alimentos	9
3. Factores tóxicos en las leguminosas	10
4. Inhibidores de tripsina	11
4.1 Efectos antinutrimientales de los inhibidores de tripsina	12
4.2 Presencia de los inhibidores de tripsina en las leguminosas	13
5. Lectinas	14
5.1 Efecto toxico de las lectinas	16
5.2 Presencia de las lectinas en leguminosas	17
6. Glucósidos cianogénicos	18
6.1 Liberación del HCN	19
6.2 Toxicidad del cianuro	20
6.3 Metabolismo del cianuro	20
6.4 Intoxicación por cianuro	21
7. Taninos	22
7.1 Efectos antinutricionales de los taninos	23



7.2 Efectos de la germinación sobre los taninos	24
7.3 Presencia de los taninos en las leguminosas	25

Metodología

1. Descripción	26
2. Diagrama general	27
3. Determinaciones	
• Humedad	28
• Proteína	29
• Inhibidores de tripsina	32
• Lectinas	36
• Glucósidos cianogénicos	42
• Taninos	46

Resultados y discusión

Ciclo biológico del frijol comba	49
Humedad	50
Ponderación de las diferentes fracciones en la fase madurez fisiológica	52
Porcentajes de humedad y pesos de los diferentes componentes de las fases floración y ejote	55
Proteína	60
Glucósidos cianogénicos	61
Inhibidores de tripsina	62



Lectinas (cuantitativo)	63
Taninos	65
Análisis estadístico	66
Conclusiones	74
Recomendaciones	76
Bibliografía	78
Anexo	82

INDICE DE TABLAS

Tabla	Titulo	Página
1.	Composición promedio del frijol de lima comercial	7
2.	Composición química del promedio de todas las variedades del frijol común.	8
3.	Composición química promedio del frijol de lima variedad <i>Baby Beans</i>	9
4.	Inhibidores de proteasas en plantas comestibles	14
5.	Tipos de lectinas presentes en las semillas de algunas plantas comestibles	17
6.	Reducción de la actividad hemaglutinante durante la fase de germinación de algunas leguminosas	18
7.	Contenido de ácido cianhidrico de diversas plantas	22
8.	Porcentajes de humedad y peso de los diferentes componentes de la planta en fase floración para ambas variedades	56



9.	Porcentajes de humedad y peso de los diferentes componentes de la planta en fase ejote para ambas variedades	57
10.	Resultados de las determinaciones de proteína, factores tóxicos y antinutrimientales para la variedad pinto violento	58
11.	Resultados de las determinaciones de proteína, factores tóxicos y antinutrimientales para la variedad blanco tardío	59
12.	Resultados de la prueba estadística Tukey-Kramer para Proteína	66
13.	Resultados de la prueba estadística Tukey-Kramer para Glucósidos cianogénicos	67
14.	Resultados de la prueba estadística Tukey-Kramer para Inhibidores de tripsina	68
15.	Resultados de la prueba estadística Tukey-Kramer para Taninos	69
16.	Resultados prueba t para Proteína	70
17.	Resultados prueba t para Glucósidos cianogénicos	71
18.	Resultados prueba t para Inhibidores de tripsina	72
19.	Resultados prueba t para Taninos	73

INDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1.	Frijol comba, fruto y semilla cosechada	26
2.	Diagrama General	27
3.	Ciclo biológico del frijol comba pinto	49
4.	Ciclo biológico del frijol comba blanco tardío	49



5.	Semillas del frijol comba pinto violento	50
6.	Gráfica de % de humedad en las diferentes fases del frijol pinto violento	51
7.	Gráfica de % de humedad en las diferentes fases del frijol blanco tardío	51
8.	Gráficas de pastel para las proporciones de la planta madura en ambas variedades	52
9.	Gráficas de pastel para las proporciones de la planta en fase floración en ambas variedades	53
10.	Fase floración ambas variedades	54
11.	Gráficas de pastel para las proporciones de la planta en fase ejote en ambas variedades	55
12.	Gráfica de líneas con desviación estándar del nivel de proteína	60
13.	Gráfica de líneas con desviación estándar del nivel de glucósidos cianogénicos	61
14.	Gráfica de líneas con desviación estándar del nivel de inhibidores de tripsina	62
15.	Gráfica de líneas con desviación estándar del nivel de lectinas	64
16.	Gráfica de barras y de líneas con desviación estándar del nivel de taninos	65



INTRODUCCIÓN

En el continente americano existen varias especies de frijoles silvestres del género *Phaseolus* de las cuales solo cuatro de estas especies fueron domesticadas: *P. vulgaris* (frijol negro, bayo, flor de mayo etc.), *P. coccineus* (ayoçote, gordo, frijolón etc.); *P. lunatus* (frijol de lima); y *P. acutifolius* (tepari, escumite etc.) además de múltiples variedades de cada una de ellas.

En México el cultivo de leguminosas es de suma importancia, destacando el frijol común (*Phaseolus vulgaris*), sin embargo también se cultivan otras especies de *Phaseolus* como lo son *P. lunatus* y *P. acutifolius*.

El frijol común al igual que otras leguminosas contiene factores tóxicos y antinutrimientales intrínsecos, destacando el alto contenido de hemaglutininas y de inhibidores de tripsina. En las variedades de *P. lunatus* se encuentran también estos factores tóxicos, además de la presencia del glucósido cianogénico linamarina. La mayoría de los estudios sobre factores tóxicos en *P. lunatus* se han realizado en variedades comerciales mejoradas, sin embargo, no existen datos específicos sobre el caso del frijol comba que se consume en la región de Tierra Caliente del estado de Guerrero, México.

En el municipio de San Miguel Totolapan, Guerrero, el consumo del frijol comba es muy importante, debido a que se consume como sustituto del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) ya que este no produce buenos rendimientos agrícolas. Se cuantifico el contenido de proteína, inhibidores de tripsina, hemaglutininas, glucósidos cianogénicos y taninos en las fases de semilla, germinado, plántula, planta con madurez fisiológica, floración, ejote y semilla cosechada.

El conocer el contenido de estos factores tóxicos permitirá saber si en alguna o algunas fases del desarrollo de esta planta funcionan como protección hacia los depredadores naturales y también saber que riesgo implica su consumo en otra fase diferente a la semilla madura.



OBJETIVO GENERAL

- Determinar el contenido de los factores tóxicos intrínsecos (glucósidos cianogénicos, inhibidores de tripsina, hemaglutininas y taninos) en dos variedades de frijol comba (*Phaseolus lunatus*), con el fin de evaluar el contenido de dichos factores a lo largo del ciclo de desarrollo y determinar si alguno o algunos de estos funcionan como mecanismo de defensa contra sus depredadores naturales.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar el ciclo biológico de dos variedades de frijol comba (blanco tardío y pinto violento) desde la germinación hasta la obtención de la semilla madura y seca.
- Llevar un control físico y biológico y tomar muestras a las diferentes fases de su desarrollo desde la semilla inicial, germinado, plántula, planta madura, floración, ejote y semilla cosechada.
- Determinar en cada una de las fases: humedad gruesa, humedad analítica, proteína, glucósidos cianogénicos, inhibidores de tripsina, hemaglutininas y taninos.



ANTECEDENTES

1. Importancia del frijol

De origen americano, el cultivo de los frijoles se ha generalizado sobre todo como consecuencia del elevado valor nutritivo de sus frutos, ricos en proteínas y por su capacidad de adaptación a diferentes condiciones del país. Los frijoles son plantas de la familia de las leguminosas, por lo general anuales (su ciclo de vida dura una estación). Algunas son trepadoras y alcanzan hasta tres metros de altura. Debido a que sus tallos son relativamente endebles, es necesario entutorarlas cuando su tamaño es muy grande (varas que proporcionan apoyo a la planta) (1).

Las hojas son compuestas y están integradas por tres folíolos de borde entero y forma ovalada. Las flores tienen pétalos cuyo aspecto recuerda las alas de una mariposa, por lo que a la familia se le denomina también papilionáceas. El color varía según la especie. El fruto es una legumbre de vaina alargada en cuyo interior se disponen varias semillas de forma arriñonada. Los frijoles constituyen una de las principales plantas de huerta por el alto valor alimenticio de sus vainas y semillas. Se utilizan también como forraje y para enriquecer el suelo ya que gracias a unos pequeños nódulos de bacterias del género *Rhizobium*, contenidas en las raíces, son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico y transformarlo posteriormente en compuestos necesarios para la planta (1).

En Iberoamérica, donde constituyen uno de los alimentos básicos de las clases populares y son apreciados por todas las clases sociales, son importante fuente de proteína vegetal y base de numerosos platos típicos de gran consumo (1).

Existen cuatro especies de frijol domesticado (*Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus coccineus*, *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus acutifolius*) que han venido proporcionando alimento a los pueblos de América desde la antigüedad, y en la actualidad se cultivan en forma extensiva en todo el mundo y siguen constituyendo junto con el maíz, el alimento básico de gran parte de



mesoamérica. El número de especies que pertenecen al género *Phaseolus* es desconocido, sin embargo, algunos investigadores consideran que podrían contener alrededor de 150 especies. Las especies más importantes en la alimentación del pueblo mexicano son las dos primeras.

En México el número de especies fluctúa alrededor de 50, y entre ellas figuran las cuatro especies mencionadas, que han sido domesticadas por el hombre. Las leguminosas, los cereales, las raíces y tubérculos son componentes importantes de las dietas de países subdesarrollados. En general, cuando una comunidad tiene acceso a productos de leguminosas y cereales de buena calidad en cantidad suficiente para satisfacer sus necesidades de energía suele estar muy cerca de satisfacer también las de proteína. La eficiencia nutricional de una proteína depende de su composición y estructura; varias proteínas de distintas fuentes pueden reforzarse entre sí, y cuando se consumen juntos cereales y leguminosas en la misma dieta, su porcentaje de proteína utilizable puede elevarse considerablemente.

Cada cultura ha elaborado su propia combinación de proteínas complementarias. Los árabes comen pan ácimo, bajo en lisina, junto con queso, rico en lisina, en África Occidental se consume arroz con estofado de maní, en Oriente arroz con soya, en mesoamérica frijol con maíz. Todas estas combinaciones se basan en cereales; sin embargo en muchas zonas la producción de estos no basta para satisfacer las necesidades alimentarias de la comunidad. Las raíces y tubérculos tienen un contenido proteínico muy inferior al de los cereales, por lo general del uno o dos por ciento, y debe añadirse a la dieta otras fuentes de proteína para satisfacer los requerimientos. Las leguminosas de grano o legumbres contienen aproximadamente diez veces más proteínas que las raíces y tubérculos. Además, desempeñan un papel esencial en la agricultura y la nutrición de muchas comunidades de países subdesarrollados. Las proteínas del frijol son, por lo general, ricas en lisina, aminoácido en el que suelen ser deficientes los cereales. Este es un factor importante en relación con el empleo de proteínas de leguminosas para complementar las dietas basadas en cereales (2).

La búsqueda de material con potencial energético-proteínico, no es nuevo ni difícil de implantar como recurso agroalimentario, ya que el país cuenta con una gran biodiversidad debido al amplio



mosaico de ecosistemas que lo componen. Así tenemos que en la vasta flora mexicana existen diversas especies de leguminosas que pueden ser una buena fuente de proteína para la alimentación humana y animal; sin embargo muchas de estas están infrautilizadas.

Como caso concreto se tiene al frijol comba que es una variedad de *Phaseolus lunatus* que se cultiva en la región del balsas de nuestro país donde es un grano básico de autoconsumo (3, 4, 5).

El frijol comba, cuya variedad de mayor conocimiento es 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 o sudeste de Asia. Se siembra intensivamente en el suroeste de Estados Unidos de América, costa peruana e isla de Madagascar (7).

Este frijol es una leguminosa de importancia considerable en los trópicos, sobre todo en las zonas bajas subhúmedas de África, en donde se consume como legumbre y como grano cocido y seco, aun cuando el tiempo de cocción es largo. Dentro de los países que componen a este grupo se encuentran Tanzania Uganda y Malawi. En las zonas bajas de los trópicos, el frijol de lima esta ampliamente libre de plagas y enfermedades y puede producir altos rendimientos de granos secos (mas de 3 000 Kg/ha) usando semillas mejoradas y bajo condiciones climatológicas adecuadas.

Algunos investigadores han dividido a este frijol en dos especies separadas: los tipos de semilla grande *Phaseolus limensis* (de 2.5 cm de longitud y peso de 54 a 289 g/100 semillas) y los de semillas pequeñas *Phaseolus lunatus* (de 1 cm de longitud y peso de 24 a 70 g/100 semillas). Sin embargo hay evidencia a favor de colocarlos a ambos en una única especie: *Phaseolus lunatus*. Según Mackie, el frijol de lima se origino en Guatemala, aunque investigaciones mas recientes sugieren que los tipos de semillas pequeñas se originaron en las colinas del Pacifico Mexicano y los de semilla grande en Perú. Ambas subespecies se dispersaron desde estas zonas a los trópicos y actualmente se encuentran en Sur y Centroamérica, Estados Unidos de América y de Canadá; sin embargo, al parecer, el frijol comba es una diferente variedad ya que sus parámetros físicos no coinciden con las variedades antes mencionadas (2, 6, 7, 8).



Existen dos variedades de frijol comba; el pinto violento y el blanco tardío. Reciben estos nombres debido a sus características físicas (pinto y blanco) y por la rapidez con la que la planta crece.

La variedad pinto recibe el nombre violento debido a que crece rápidamente en comparación con la variedad blanco, a la cual se le da el nombre de tardío por su lentitud en el desarrollo.

El *Phaseolus lunatus* es una especie generalmente rustica, que prefiere climas secos y profundos de carácter neutro (pH 6.0 a 7.2) con buen drenaje. Esta planta puede ser anual o perenne y tiene un periodo de maduración de 4 a 6 meses. Si bien es cierto que algunas formas toleran bien el clima del trópico bajo, cabe mencionar el rango excepcional de distribución de altitud (de 50 a 2 750 m sobre el nivel del mar), particularmente en el Perú, donde algunas formas incluso resisten temperaturas bajas (8).

Este frijol es susceptible a daño por heladas y requiere un periodo sin ellas que varíe aproximadamente 100 días para los cultivos de corto ciclo biológico de Estados Unidos de América y 200 días para los cultivos de semillas grandes del Perú y Madagascar (2).

La composición promedio general del frijol de lima comercial se presenta en la tabla 1 apreciándose un contenido elevado de proteína lo que justifica la utilización de este alimento como fuente de proteína, así mismo el contenido de hidratos de carbono también es adecuado para el aporte calórico que se busca al consumir este alimento más aún si se considera el contenido de minerales y vitaminas, este alimento bien podría considerarse como un producto de buena calidad nutricia.



Tabla 1. Composición química promedio del frijol de lima comercial (32)

Componente	En 100 g de muestra
Hidratos de carbono	63.38 g
Proteína	21.46 g
Lípidos	0.69 g
Agua	10.17 g
Fibra cruda	6.34 g
Cenizas	4.3 g
Hierro	7.51 mg
Sodio	18 mg
Potasio	1,724 mg
Calcio	81 mg
Fósforo	385 mg
Tiamina	0.506 mg
Riboflavina	0.202 mg
Niacina	1.537 mg
Ácido pantoténico	1.355 mg
Piridoxina	0.511 mg
Ácido fólico	395.1 µg

Con el aumento de la madurez, el contenido proteínico se eleva y la concentración de hidratos de carbono disminuye. La calidad nutricia de las proteínas del frijol seco crudo, las hace poco digeribles, mejorándose esta con el cocimiento, como muchas de las semillas de leguminosas (2).



Para fines de comparación, se muestran en las tablas 2 y 3 la composición química de las semillas crudas del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) a partir de un promedio de todas las variedades de esta especie, y una variedad de frijol de lima conocida en Norteamérica como *Baby Bean*, debido a que es mas pequeña.

Tabla 2. Composición química promedio del frijol común (todas las variedades) (32)

Componente	En 100 g de muestra
Hidratos de carbono	60.01 g
Proteína	23.58 g
Lípidos	0.83 g
Agua	11.75 g
Fibra cruda	6.23 g
Cenizas	3.83 g
Hierro	8.20 mg
Sodio	24 mg
Potasio	1,406 mg
Calcio	143 mg
Fósforo	407 mg
Tiamina	0.529 mg
Riboflavina	0.219 mg
Niacina	2.060 mg
Ácido pantoténico	0.780 mg
Piridoxina	0.511 mg
Ácido fólico	394.1 µg

Tabla 3. Composición química promedio del frijol de lima variedad *Baby Bean* (32)

Componente	En 100 g de muestra
Hidratos de carbono	62.83 g
Proteína	20.62 g
Lípidos	0.93 g
Agua	12.07 g
Fibra cruda	5.71 g
Cenizas	3.55 g
Hierro	6.19 mg
Sodio	13 mg
Potasio	1,403 mg
Calcio	81 mg
Fósforo	370 mg
Tiamina	0.574 mg
Riboflavina	0.218 mg
Niacina	1.712 mg
Ácido pantoténico	1.265 mg
Piridoxina	0.327 mg
Ácido fólico	400.2 µg

2. Factores antinutrimientales y factores tóxicos presentes en los alimentos.

La mayoría de los alimentos de la dieta humana, además de nutrientes contienen sustancias sin valor nutritivo y algunos de estos pueden causar daño en el organismo. Estas sustancias pueden clasificarse en dos tipos:



Las sustancias antinutrimientales, las cuales disminuyen la disponibilidad de los nutrimentos o provocan una pérdida suplementaria de los nutrimentos esenciales. Estas sustancias provocan un desequilibrio, que se compensa por un aporte suplementario de los nutrimentos implicados. Pertenecen a este grupo los inhibidores de enzimas digestivas, que afectan la actividad catalítica de enzimas proteolíticas que disminuyen la utilización eficiente de las proteínas, tal es el caso de los inhibidores de tripsina. Las sustancias que intervienen negativamente en la asimilación de los minerales, como es el caso de los fitatos y por último, las sustancias que inactivan o aumentan el requerimiento de vitaminas. Algunos factores antinutrimientales pueden interferir con varios de estos elementos, como es el caso de los taninos que interfieren con el metabolismo de las proteínas, con la asimilación de los minerales y afectan las reservas de vitamina A y B₁₂ (10).

Los factores tóxicos, son compuestos que tienen un efecto negativo directo e inmediato sobre el organismo. Su mecanismo de acción se debe a su particular reactividad. Sus efectos no pueden compensarse por aporte suplementario. Las lectinas de frijol, consideradas enterotoxinas y los glucósidos cianogénicos pertenecen a este grupo.

Al estar implicados los factores antinutrimientales y los tóxicos con muchas de las leguminosas que son fundamentales en la alimentación humana, es necesario el desarrollo de investigación para asegurar el consumo de las especies o variedades más adecuadas (10).

En este estudio nos enfocaremos únicamente a los glucósidos cianogénicos, lectinas, inhibidores de tripsina y taninos

3. Factores tóxicos en las leguminosas

Dentro de las características de las leguminosas se encuentran que son buena fuente de energía, tienen un alto contenido de proteína, contienen diversos minerales y vitaminas, tienen la capacidad de adaptarse a diversos climas y enriquecen el suelo de cultivo gracias a que las bacterias que se alojan en los nódulos de sus raíces fijan el nitrógeno atmosférico entre otras cualidades.



Sin embargo son portadores de factores tóxicos intrínsecos que limitan su aprovechamiento.

Algunos de estos compuestos son: las lectinas o hemaglutininas (enterotoxinas,) inhibidores de tripsina, los glucósidos cianogénicos, los taninos y las saponinas entre otros. Los factores que se presentan con mayor frecuencia son los inhibidores de tripsina, las lectinas los glucósidos cianogénicos, los taninos y los fitatos.

Los frijoles de lima contienen entre otros factores tóxicos: lectinas, inhibidores de tripsina y un glucósido cianogénico llamado faseolunatina o linamarina, junto con la enzima linamarasa, que lo hidroliza en presencia de humedad a HCN, acetona y glucosa. Este HCN se encuentra en un amplio rango que va de 10 a 300 mg HCN /100 g de frijol (10, 11, 12).

4. Inhibidores de tripsina

La presencia de inhibidores enzimáticos en los alimentos que están comprendidos dentro de la dieta humana es muy frecuente. Se trata en un sentido estricto de sustancias que interfieren con la actividad de las enzimas que digieren a las proteínas. El aporte principal de los inhibidores de las enzimas proteasas en la alimentación humana proviene de los granos de leguminosas y cereales. Los inhibidores son proteínas de bajo peso molecular y son muy específicos. Los inhibidores de proteasas presentes en las semillas afectan negativamente la calidad nutricional de los alimentos.

La mayoría de los inhibidores de proteasas de las plantas son destruidos por calentamiento (como es el caso de los inhibidores de tripsina), lo que causa un incremento general del valor nutritivo de

las proteínas de las semillas de leguminosas y cereales. El grado de destrucción de los inhibidores depende de la temperatura, del tiempo de calentamiento, del volumen de agua empleada, de la cantidad de alimento y el contenido de humedad del grano (13, 14).



Se han propuesto un gran número de funciones de los inhibidores de proteasas en las plantas, dentro de los cuales se incluye una función reguladora al controlar a las proteasas endógenas, particularmente durante la maduración y la dormancia de las semillas.

Tiene también una función protectora de las reservas nutricias del embrión, contra los ataques que puedan venir del medio externo, ya que los inhibidores de proteasas pueden desenvolverse como parte de los mecanismos de defensa hacia la invasión de microorganismos e insectos (10, 15).

4.1 Efectos antiniutricionales de los inhibidores de tripsina

Los inhibidores de tripsina causan retardo en el crecimiento en animales de experimentación tales como ratas. Esto se debe en primer lugar a la obvia interferencia que ejercen sobre la digestión de las proteínas y, en segundo lugar, porque al inhibir a la tripsina se ven desarrollados una serie de eventos que se tratan de explicar por medio de una retroalimentación negativa que se da por la secreción de la hormona colecistoquinina por parte de la mucosa intestinal, que a su vez estimula al páncreas a producir más tripsina. Esta producción de tripsina requiere más cisteína, que esta formada a partir de metionina. Así la pérdida endógena de estos dos aminoácidos agudiza la deficiencia (en el caso de las leguminosas) de estos dos aminoácidos en la proteína. Por lo anterior se da una pérdida de proteína exógena y de aminoácidos azufrados endógenos que se ve reflejado en el contenido de nitrógeno en las heces de las ratas y en el aumento en el tamaño del páncreas debido a la hiperactividad que este experimenta. El aumento de tamaño del páncreas es el resultado del incremento del tamaño de las células (hipertrofia) y del incremento en el número de las células (hiperplasia) (13, 16, 17).



Así, los inhibidores de tripsina causan hipersecreción de las enzimas pancreáticas, lo que conduce a una excreción fecal de nitrógeno y a un aumento pancreático. Estos factores dan como resultado la inhibición del crecimiento, pero solo un 30-60% de esta acción es debida a los inhibidores de tripsina, ya que también las lectinas se ven involucradas en la inhibición del crecimiento (11).

4.2 Presencia de los inhibidores de tripsina en las leguminosas

En las leguminosas, como son los géneros *Phaseolus*, *Glycine* y *Vicia*, los inhibidores de proteasas se encuentran en gran cantidad. Se localizan sobre todo en las partes comestibles de las plantas, como son las semillas. El frijol comba *Phaseolus lunatus* contiene inhibidores de tripsina y también inhibidores de quimiotripsina. Se ha estimado que los inhibidores de proteasas comprenden aproximadamente el 2.5% de la proteína de los frijoles.

En la variedad de *Phaseolus lunatus* se han determinado 6 inhibidores de tripsina, que son resistentes al calor, ácidos y álcalis. Su peso molecular está comprendido entre 8 000 y 10 000 Da. Estos inhibidores contienen del 17-20% de cisteína, y esta contribuye con el 32% del total de cisteína en la proteína del frijol comba. Estos inhibidores se unen a la tripsina en proporción 1:1; también inhiben a la quimiotripsina, aunque en menor grado. Dentro de los principales efectos observados ha sido la hipertrofia pancreática en ratas alimentadas con inhibidores de tripsina aislados del frijol de lima (11, 13).

En la tabla 4 se presentan los inhibidores de tripsina presentes en algunas plantas comestibles.



Tabla 4. Inhibidores de proteasas en plantas comestibles (33)

Nombre científico	Nombre común	Parte de la planta	Enzima inhibido
Araquis hipogea	Cacahuatē, maní	nuez o semilla	T, Q, PL
Avena sativa	Avena	endospermo	T
Beta vulgaris	Remolacha roja	tubérculo	T
Brassica rapa	Colza o nabo	semilla	T
Cicer arietinum	Garbanzo	semilla	T
Glicine max	Soya	semilla	T, Q, E, PL
Oryza sativa	Arroz	semilla	T, S
Phaseolus coccineus	Frijol frances, ayocote	semilla	T, Q
Phaseolus lunatus	Frijol de lima	semilla	T, Q
Phaseolus vulgaris	Frijol común	semilla	T, Q, E
Pisum sativum	Chicharo, guisante	semilla	T, PL
Solanum tuberosum	Papa	tubérculo	T, Q, E, PL
Vicia faba	Haba	semilla	T, Q, PL
Zea mays	Maíz	semilla	T

5. Lectinas

La característica que tienen en común las lectinas de las plantas es que todas son proteínas. La mayoría de ellas tienen enlaces covalentes con hidratos de carbono por lo que son clasificadas como glicoproteínas. Poseen una afinidad específica por ciertas moléculas de hidratos de carbono y se encuentran en numerosos alimentos consumidos por el hombre. Se enlazan con los residuos



glucosídicos presentes en las superficies de los glóbulos rojos y causan su aglutinación. Las lectinas pueden ser detectadas, caracterizadas y purificadas por su acción sobre los eritrocitos.

Las lectinas muestran la mayor parte una especificidad de grupo frente a los diferentes tipos sanguíneos; pero además existen en las plantas lectinas inespecíficas que aglutinan a los eritrocitos humanos no importando el grupo sanguíneo, y presentan diferencias en cuanto a la aglutinación de los eritrocitos de distintas especies animales. Por ejemplo, *Phaseolus vulgaris* posee lectinas con actividad sobre los eritrocitos de los grupos sanguíneos humanos A y B, junto con las lectinas inespecíficas. *Phaseolus lunatus* contiene una lectina específica para el grupo sanguíneo humano A (11).

Células del intestino que presentan residuos glucosídicos en las superficies de las microvellosidades, pueden reaccionar también con las lectinas. En este caso el enlace ocurre sin que exista aglutinación visible, y esto interfiere con la absorción de vitaminas, aminoácidos, lípidos y glucosa (10, 18).

Las lectinas están muy difundidas en la naturaleza. Se ha encontrado actividad aglutinante en extractos de unas 800 especies vegetales. Son de especial interés las lectinas de diversas leguminosas empleadas como alimento humano o como pienso. Las lectinas también han sido encontradas en animales como esponjas, crustáceos, moluscos como los caracoles, en el suero sanguíneo de peces, en huevos de anfibios e incluso en tejidos de mamíferos.

Debido a la naturaleza proteínica de las lectinas, estas se desnaturalizan con calor. La destoxificación de los alimentos que las contienen (principalmente las leguminosas), es usualmente realizada, aunque no de manera completa, por el método de cocción casera. Un remojo preliminar a la cocción incrementa la eliminación de las lectinas. Las lectinas son resistentes al calentamiento en seco.

Las posibles funciones de las lectinas en la planta son que actúan como anticuerpos contra las bacterias presentes en el abono, protegen a las plantas contra el ataque de hongos, juegan un papel en el desarrollo, son participes en la diferenciación de células embrionarias y transportan hidratos de carbono de almacenamiento (13, 17).



5.1 Efecto toxico de las lectinas

Se ha estudiado el efecto que tienen las lectinas en animales de experimentación como ratas. La acción que tienen las lectinas al combinarse con las células de la pared intestinal, causa interferencia no específica en la absorción de nutrimentos. Mientras dosis elevadas de determinadas lectinas destruyen las células de la mucosa intestinal, dosis menores producen descamación de las células de la mucosa y las vellosidades disminuyen de tamaño, con lo que disminuye también la superficie de absorción y la actividad enzimática (19, 20).

Esto da como resultado una intensa disminución en la absorción de los lípidos, aminoácidos, glucosa y de vitamina B₁₂. Debido al incremento de la producción de mucosa en el intestino delgado se induce a hiperplasia celular, por lo que hay un incremento en el peso seco del intestino delgado de las ratas. En el hígado se observa degeneración de grasa y necrosis. También el miocardio sufre alteraciones degenerativas. La existencia simultánea de inhibidores de proteasas en las leguminosas y su estimulación sobre la secreción de enzimas pancreáticas permite una excesiva pérdida de proteína, que se suma al efecto de las lectinas sobre la acción intestinal. El resultado es un empleo ineficiente de los nutrimentos que explica por sí mismo el pobre crecimiento así como la inflamación, edema y necrosis del epitelio intestinal promovido por las raciones ricas en leguminosas crudas (19, 20).

No todas las lectinas producen los mismos efectos tóxicos en animales de experimentación. Además la toxicidad también depende de la especie animal e incluso de la raza utilizada. Antes de concluir si una semilla en particular es tóxica o no, es necesario realizar ensayos de la actividad aglutinante de las lectinas presentes contra muchos tipos de células sanguíneas. En el hombre los resultados sobre la toxicidad digestiva de las lectinas de los alimentos no son definitivos. Esta relacionada con determinadas alteraciones digestivas observadas después de la ingestión de leguminosas crudas o poco cocidas (10).



5.2 Presencia de lectinas en leguminosas

En las leguminosas las lectinas están ampliamente distribuidas y es raro que alguna leguminosa no contenga este tipo de tóxicos. Las lectinas son sintetizadas durante la maduración como cadenas de polipéptidos con peso molecular de aproximadamente 30 000 Da por subunidad. La estructura de lectinas de leguminosas son similares, ya que estas consisten de 2-4 subunidades y contienen iones metálicos divalentes (calcio, manganeso).

Se sabe que todas las especies domesticadas de *Phaseolus* (*P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. lunatus* y *P. acutifolius*) contienen lectinas, localizadas sobre todo en las semillas. En las variedades del frijol común (*Phaseolus vulgaris*), la lectina es llamada faseolotoxina o faseína y en algunos puede llegar a representar hasta 10% de la proteína.

El hombre crea anticuerpos contra la faseína, que hace posible que el organismo se acostumbre a la ingestión crónica de pequeñas cantidades (21).

En la tabla 5 se muestran el tipo de lectinas presentes en semillas de algunas plantas (33).

Tabla 5. Tipo de lectinas presentes en la semilla de algunas plantas.

Carbohidrato específico unido a la lectina	Ejemplo de alimento vegetal que lo contiene
D-manosa, D-glucosa	Haba, Lenteja, Chicharo
D-galactosa	Ricino
Acido N-acetilneurámico	Frijol común
2, N-Acetilgalactosamina	Frijol de lima
2, N-Acetilglucosamina	Papa
2, N-Acetilgalactosamina	Soya



Se ha observado que el proceso de germinación puede disminuir significativamente el contenido de estos tóxicos en algunas leguminosas, como puede observarse en la tabla 6 en la cual se presentan los datos para el frijol común entre otras semillas (33).

Tabla 6. Reducción de la actividad hemaglutinante durante la fase de germinación de algunas leguminosas

Leguminosa	Semilla no germinada (HA/g harina)*	Tiempo de germinación (días)	Reducción de lectinas (%)
<i>Dolichos biflorus</i>	2, 600	3	77
<i>Glycine max</i>	12, 800	3	96
<i>Vigna radiata</i>	1, 600	4	100
<i>Phaseolus vulgaris</i>	12, 800	4	100
<i>Vicia faba</i>	3, 200	6	89

*Actividad hemaglutinante por el método de Liener (13)

6. Glucósidos cianogénicos

El cianuro está ampliamente distribuido en el reino vegetal en cantidades traza y se presenta principalmente como glucósidos cianogénicos. Existen alimentos de empleo muy difundido, sobre todo en los trópicos, que contienen glucósidos cianogénicos, por ejemplo: la mandioca, el ñame, el sorgo, el bambú, la semilla de lino, el frijol de lima (*Phaseolus lunatus*). También las semillas de limón, melocotón, albaricoque, cereza, manzana, pera, ciruela y las almendras amargas contienen glucósidos cianogénicos.

Algunas variedades de frijol y guisantes contienen pequeñas cantidades de HCN (aproximadamente 2 mg/100 g). En la planta inmadura del sorgo el contenido de HCN varía alrededor de 250 mg/100 g. En *Phaseolus lunatus* el contenido de HCN varía entre 10-312 mg/100 g dependiendo de la variedad, esta es muy consumida en África donde se llegan a ingerir hasta 300 g al día por persona.



La presencia de los glucósidos cianogénicos en las plantas conduce a una ventaja biológica evolutiva al ofrecer una defensa contra sus depredadores naturales (11, 13).

6.1 Liberación del HCN

Las plantas comestibles contienen tres principales glucósidos cianogénicos: la amigdalina, presente en las almendras amargas y semillas de otras frutas; la durrina, presente en el sorgo y otras gramíneas, y la linamarina, presente en la mandioca, lino y frijol de lima.

Los glucósidos cianogénicos originan por hidrólisis una cetona o un aldehído y el ion cianuro que es muy tóxico. La toxicidad de estos glucósidos se debe a la liberación de ácido cianhídrico que se produce al masticar las plantas frescas que contienen glucósidos. En el proceso enzimático intervienen dos enzimas, el primer paso consiste en la liberación del hidrato de carbono, catalizado por la β -glucosidasa, que produce una cianohidrina y un azúcar.

La mayoría de las cianohidrinas son inestables y se descomponen espontáneamente a la correspondiente cetona o aldehído y ácido cianhídrico (HCN). Tal descomposición se acelera por la acción de la enzima hidroxinitril-liasa. Así por la separación del carbohidrato y separación del HCN, se obtiene de la amigdalina, benzaldehído; de la durrina, p-hidroxibenzaldehído; y de la linamarina, acetona.

En las plantas que contienen estos glucósidos cianogénicos, la β -glucosidasa es extracelular y solamente por destrucción física como cuando se maceran (masticación), se rompe la pared celular lo suficiente para permitir el contacto de las enzimas y los glucósidos y que se libere el HCN. Se piensa que este es el principal mecanismo de la intoxicación por cianuro debido al consumo de vegetales frescos. Se han desarrollado diversos métodos de destoxicación de los productos alimenticios que contienen glucósidos cianogénicos, entre ellos la trituración, la molienda, el remojo en agua y cocción (con la posterior eliminación del agua de cocción) son los principales (11, 17).



6.2 Toxicidad del cianuro

Se ha encontrado que la cantidad de HCN liberado por hidrólisis va de un rango de 10-300 mg/100 g de frijol de lima. Un contenido dentro del rango de 10-20 mg de HCN/100 g de frijol es estimado como seguro y dentro del límite legal establecido en Estados Unidos.

El HCN ejerce su acción tóxica bloqueando a la citocromo oxidasa de las mitocondrias al unirse al ion férrico, impidiendo así la respiración celular y produciendo la muerte por anoxia. El cerebro y el corazón son muy sensibles a la interrupción de la respiración celular. Además del peligro de envenenamiento agudo hay que considerar el envenenamiento crónico. Se ha demostrado que la ingestión continua de las sustancias que contienen cianuro pueden producir trastornos graves tales como convulsiones y asfixia, lo que puede producir daño cerebral, además de daños en el nervio óptico.

La destrucción neurológica inducida por el cianuro solo se aprecia generalmente en poblaciones con deficiencias en la nutrición. El consumo crónico del cianuro con dietas marginalmente deficientes en proteína aumenta la deficiencia de azufre de tales dietas, ya que este es requerido para metabolizar el HCN liberado. Por tanto el consumo de alimentos que contienen glucósidos cianogénicos además de los efectos tóxicos atribuidos directamente al cianuro, también promueven directamente los efectos característicos de la desnutrición proteínica.

En países como Nigeria, Zaire y Camerún donde el consumo de mandioca es fuerte, son frecuentes los casos de bocio. La actividad antitiroidea no es debida al cianuro sino al ión tiocianato, que es producto de su metabolismo. El bocio inducido por cianuro no se observa si la dieta tiene concentraciones adecuadas de yodo (10, 17, 22).

6.3 Metabolismo del cianuro

El cianuro liberado por la ingestión de alimentos que contienen glucósidos cianogénicos es rápidamente absorbido en la parte alta del tracto intestinal. El organismo dispone de varias rutas metabólicas para la destoxificación, así el ión cianuro se metaboliza siendo el principal producto de excreción el tiocianato.



La reacción del HCN con el tiosulfato, sintetizado en el hígado, forma sulfito y tiocianato, que es eliminado por la orina. Dicha producción de tiocianato está catalizada por la rodonasa, enzima que esta ampliamente distribuida en la mayoría de los tejidos de los mamíferos. En una segunda vía metabólica hacia el tiocianato, el cianuro reacciona con el ácido 3-mercaptopiruvico, con lo que se forma tiocianato y ácido piruvico. Estas reacciones requieren de la presencia en concentraciones adecuadas de cisteína como un donador de azufre. La cisteína puede reaccionar directamente con el cianuro para producir tiazolina.

Otras rutas metabólicas menores incluyen una ruta oxidativa que rinde finalmente dióxido de carbono y formiato, y su combinación con la hidroxycobalamina para dar cianocobalamina (vitamina B₁₂). La mortalidad de los ratones a causa del HCN puede evitarse con inyecciones de hidroxycobalamina (11, 13, 17).

6.4 Intoxicación por cianuro

Es difícil predecir la dimensión del envenenamiento por HCN, ya que la sensibilidad a este entre los individuos es muy variable. La dosis letal mínima de HCN por vía oral ha sido estimada entre 0.5-3.5 mg/Kg de peso corporal. También es variable el contenido de HCN en los alimentos, éste se ve influido por la variedad y la preparación previa. Ha habido casos de envenenamiento con frijol de lima y sorgo, en África, India, Sudamérica, Birmania e Indonesia. Durante la primera guerra mundial se registraron en Europa, muchos casos de muerte por ingestión de variedades de frijol de lima ricas en ácido cianhídrico. Los síntomas que se presentan son entorpecimiento, seguido por confusión mental, estupor, cianosis, crispamiento y convulsiones. En dosis pequeñas y no fatales producen dolores de cabeza, dolor en la respiración, palpitaciones y debilidad muscular. En animales de experimentación las principales manifestaciones de toxicidad son estupor y convulsiones.

Se ha propuesto que la unión del cianuro con la hidroxycobalamina puede ser un método usual para la disposición de trazas de HCN en el organismo. Los envenenamientos de HCN se tratan también con tiosulfato sodico, muy eficaz e inofensivo, pero cuya acción tarda mas en



manifestarse. Si la capacidad antitóxica no es suficiente se aplica también cobalhistidina, de acción más rápida (11, 13).

A continuación se presenta la tabla 7, en la que se muestra el contenido de ácido cianhídrico en diversas plantas, incluyendo variedades del frijol de lima comercial (11).

Tabla 7. Contenido de ácido cianhídrico de diversas plantas (11)

Planta	Contenido en HCN (mg / 100 g)
Almendra amarga	250
Sorgo planta entera	250
Bambú	800
Frijol de lima:	
Variedad coloreada de Java	312
Variedad negra de Puerto Rico	300
Variedad blanca de Burna	210
Variedad coloreada de Arizona	17
Variedad blanca americana	10

7. Taninos

La inhibición de las enzimas digestivas proteolíticas no es debida únicamente a los inhibidores de proteasas proteínicos, como los inhibidores de tripsina, sino también a la inhibición no específica de los taninos.

Los taninos están presentes en las semillas de cereales y leguminosas que tienen revestimientos pigmentados, por lo que con el descascarado de las semillas se elimina del 83-97 % del contenido



de estos compuestos polifenólicos. Se sabe que afectan la digestibilidad de las proteínas, hidratos de carbono y lípidos, y la biodisponibilidad de vitaminas y minerales.

Los taninos son compuestos fenólicos naturales y son los causantes de la pérdida de lubricación en la boca (astringencia) producida al ingerir fruta verde, debido a la unión de las proteínas de la saliva y la mucosa bucal. Con la maduración de las frutas se polimerizan los taninos y pierden su acción astringente y su sabor amargo. En los frutos, los taninos están presentes en un rango de 0.2-1.0 g / 100 g de peso fresco, en las verduras de 0.5-2.0 g / 100 g de peso fresco (21, 23).

Los taninos son compuestos solubles en agua con un peso molecular de 500-3000, pueden ser divididos en dos grupos: hidrolizados y condensados. Los taninos hidrolizados son poliésteres y son fácilmente hidrolizados por ácidos o enzimas en azúcares o alcoholes polihídricos y ácido fenolcarboxílico. Los taninos condensados sufren una progresiva polimerización y se basan en núcleos de flavan-3-ol y flavan-3, 4-diol. Estos últimos no pueden ser divididos como los hidrolizados, y son los más ampliamente distribuidos en las plantas.

En la industria alimenticia los taninos se usan como aditivos en la elaboración de vino, sidra y cerveza, contribuyendo al sabor y ayudando a la clarificación. También son usados en la industria de conservas. Su dosis diaria admitida es de 500 mg / Kg p.c.-día.

Los taninos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, especialmente entre las plantas leñosas, en las que se supone tienen una función protectora frente a los hongos patógenos (10).

7.1 Efectos antinutrimientales de los taninos

Se manifiestan principalmente por el aumento de la excreción fecal del nitrógeno y retardo en el crecimiento de animales de experimentación, como pollos. Esto se explica debido a la oxidación de los grupos fenólicos de los taninos con lo que forman quinonas, estas pueden formar enlaces covalentes con los grupos amino de la lisina y la arginina de las cadenas peptídicas, dichos complejos proteína-taninos son difícilmente hidrolizables por las proteasas. Por otro lado los taninos libres de los alimentos se encuentran en el tubo digestivo con los enzimas digestivos y las glucoproteínas de secreción.



Como la unión inespecífica de los taninos a las enzimas digestivas impide su acción y la unión con las glucoproteínas de la mucosa intestinal interfiere con la absorción de los nutrimentos se da un pobre crecimiento en los animales alimentados con dietas ricas en taninos (10, 11).

La actividad antinutricional de los taninos puede manifestarse también por la habilidad que tienen estos polifenoles de asociarse a los iones di y trivalentes lo que disminuye la disponibilidad del calcio, hierro, cobre, etc; sin embargo, la formación de complejos con el plomo y los metales pesados pueden tener una función protectora impidiendo su absorción. Además los taninos contribuyen a aumentar los requerimientos en vitaminas disminuyendo la reserva hepática de vitamina A, la disponibilidad digestiva de la vitamina B₁₂ al combinarse con esta y, la vitamina B₁ puede ser destruida por los taninos de té (10, 11).

La cantidad mínima de taninos en la dieta que es necesaria para provocar una respuesta de crecimiento negativa no ha sido establecida; sin embargo, se encontró que el 0.1 % de ácido tánico (un tanino hidrolizable) en dietas de pollos no tiene ningún efecto, pero que el 0.5 y 2.0 % causan a las siete semanas retardos en el crecimiento del 3 y 32 % respectivamente.

Además hubo un 70 % de mortalidad en pollos alimentados con una dieta que contenía el 5 % de ácido tánico. Respuestas similares han sido encontradas en ratas, pero en estas el nivel de proteína en la dieta es crítico, ya que se encontró una disminución severa en el crecimiento de ratas con dietas del 4 % de ácido tánico y limitantes de proteína, pero con una dieta alta en proteínas (40 % de caseínas) las dietas con un 5 % de ácido tánico no causaron disminución en el crecimiento (24).

7.2 Efecto de la germinación sobre los taninos.

Durante la germinación de las semillas de cereales y leguminosas hay una disminución en el contenido de taninos: después de dos días de germinación disminuyó de 1.6 % a 1.1 % en garbanzo y hubo una disminución del 60 % en chícharos.



Después de un día de germinación en frijol hubo un 23 % de disminución y en frijol moth disminuyó de 1.3 % a 1.0 % el contenido de taninos. La degradación enzimática es responsable de la pérdida de los taninos durante la germinación.

En células de animales y de plantas la enzima polifenol-oxidasa (PPO) está presente y cataliza la hidroxilación de varios monofenoles y la oxidación aeróbica de los difenoles. La actividad de la PPO en semillas de leguminosas que fueron germinadas incrementa mientras que el contenido de taninos disminuye (21).

7.3 Presencia de los taninos en las leguminosas

No es claro si el nivel de taninos es notablemente dañino para el valor nutricional de las leguminosas destinadas a consumo humano, ya que tienen alto contenido de proteína. Se esperaría una analogía con los ensayos de alimentación con ratas. Así los taninos de leguminosas serían de menor importancia que, por ejemplo, los taninos en cereales como el sorgo. Por otra parte la ingesta total de proteína en la dieta de varias partes del mundo es baja, donde las leguminosas son un componente principal, lo que incrementaría el efecto de los taninos.



METODOLOGÍA

1. Selección y limpieza de las muestras que se van a utilizar, ya sea para el análisis o para inducir la germinación y la recolección de muestras a lo largo del desarrollo de la planta.
2. Las muestras son:
Leguminosas: *Phaseolus lunatus*, dos variedades:
-Frijol comba pinto violento
-Frijol comba blanco tardío. El diagrama se muestra en la figura 2
3. Las semillas de ambas variedades se molieron en un mortero para reducir lo mas posible el tamaño de las mismas y posteriormente trasladarlas a un molino cyclotec para tener una harina fina y homogénea, las harinas se guardaron en frascos etiquetados para su posterior análisis. En la figura 1 se presentan las semillas del frijol pinto violento que sometieron al proceso de análisis. Cabe señalar que las semillas del frijol blanco tardío tienen dimensiones físicas similares.

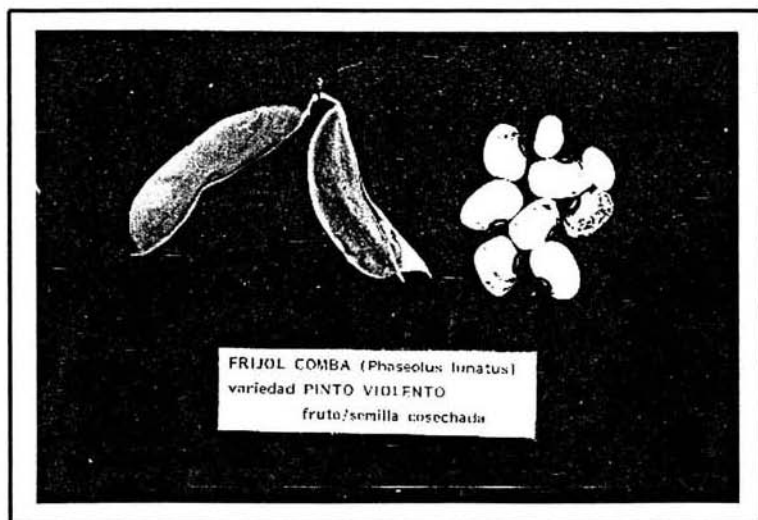
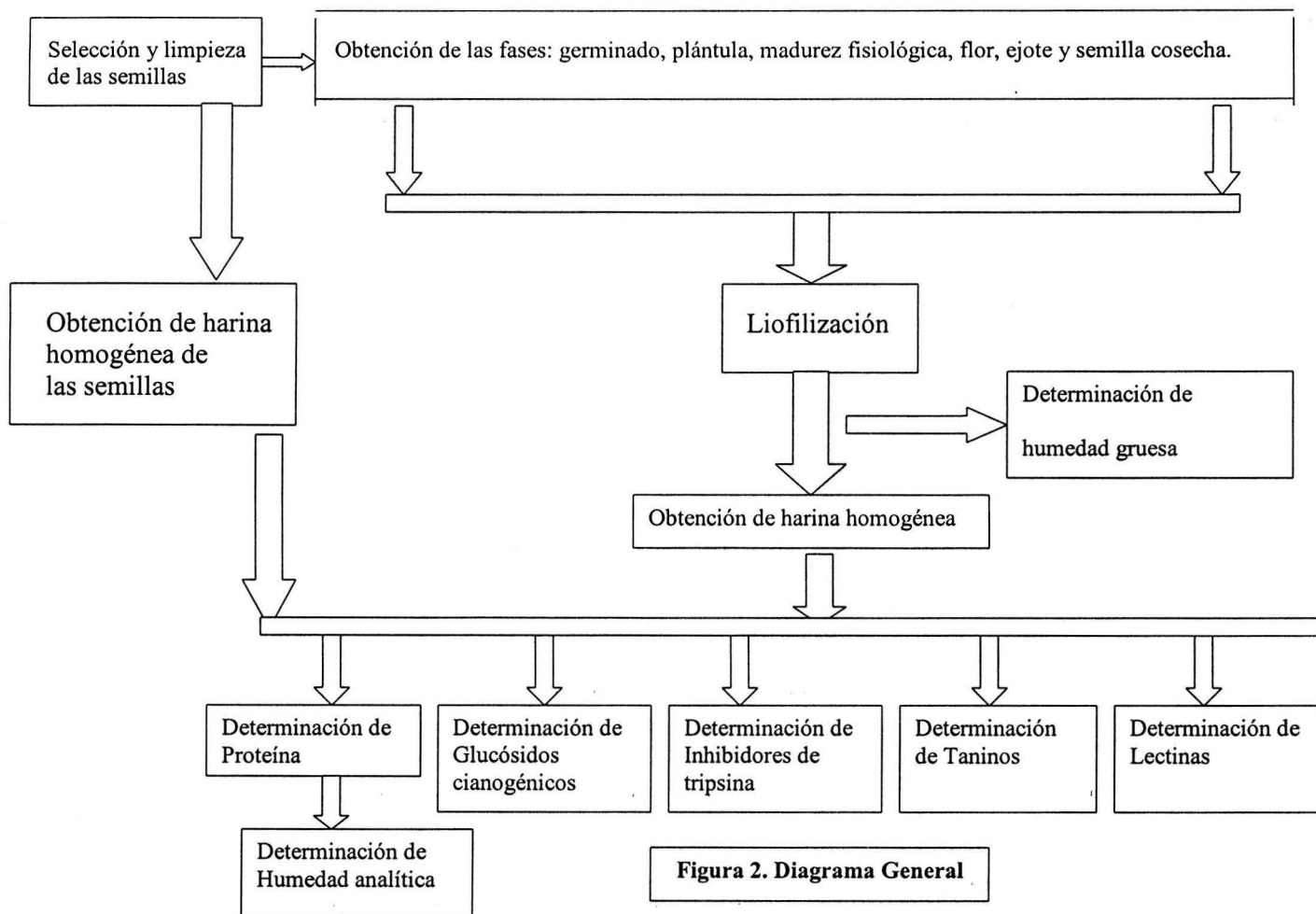


Figura 1. Frijol comba pinto violento (fruto y semilla cosechada)





HUMEDAD

Fundamento.

El método de secado en horno es un método gravimétrico, es decir, que cuantifica el agua presente en las muestras por la pérdida de peso de éstas.

Equipo.

- Estufa de vacío LAB-LINE mod. 3620.
- Balanza analítica.
- Estufa con corriente forzada LAB-LINE, modelo Imperial III.

Procedimiento.

- 1) Poner a peso constante charolas de aluminio (la determinación se realiza por triplicado), colocándolas de 2-4 horas en la estufa.
- 2) Colocar en la charola de 2-5 g de muestra
- 3) Introducir las charolas en la estufa de vacío a 60-65°C a 25 mm Hg, por 24-48 horas.
- 4) Sacar las charolas y colocarlas en el desecador hasta que alcancen la temperatura ambiente.
- 5) Pesar las charolas. Si aún no alcanzan peso constante, introducir las en la estufa de vacío por unas horas más. La determinación es completa cuando las charolas alcanzan peso constante.

**Cálculos.**

El contenido de humedad se obtiene:

$$\% \text{ Humedad} = (P_i - P_f) / m \times 100$$

Donde:

P_i = Peso de la charola con muestra antes de secada (en gramos).

P_f = Peso de la charola con muestra después de secada (en gramos).

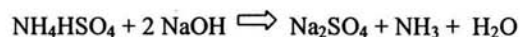
m = peso de la muestra (en gramos)

PROTEÍNA**Fundamento.**

Para la determinación de proteína es comúnmente utilizado el metodo Kjeldahl, que en realidad determina el nitrógeno total contenido en una matriz alimenticia. Este método se basa en la combustión en humedo de la muestra por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado en presencia de catalizadores metalicos y de otro tipo para reducir el nitrogeno orgánico de la muestra hasta nitrogeno inorgánico en forma de amoniaco, el cual queda en disolución en forma de sulfato de amonio. El digerido, una vez alcalinizado, se destila directamente o por arrastre con vapor para desprender el amoniaco, el cual es atrapado en una disolución de ácido bórico y posteriormente titulado.

El contenido de proteína es 6.25 veces el contenido de Nitrógeno, pues, por lo general, las proteínas tiene 16% de nitrógeno.

Las reacciones antes descritas se muestran a continuación:





Equipo.

- Digestor TECATOR, modelo ab-20/40.
- Equipo automático para determinación de proteína Auto Analyzer Kjeltec, modelo 1030.
- Tubos de digestión TECATOR de 75 ml.
- Balanza analítica.

Reactivos.

- Peróxido de hidrógeno al 30%.
- Sulfato de potasio (R.A.).
- Solución de NaOH al 40%.
- Solución de HCl 0.01 N valorada.
- Mezcla digestiva (a).
- Solución de ácido bórico con indicadores (b).

(a) Disolver 3 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 20 ml de agua destilada, a continuación se agrega 50 ml de ácido ortofosfórico (H_3PO_4) y una vez que este bien disuelta la sal, se adiciona con mucho cuidado y resbalando por la pared del recipiente 430 ml de ácido sulfúrico concentrado.

(b) Se pesan 10 g de ácido bórico, se adicionan 10 mL de verde de bromocresol (100 mg en 100 mL de CH_3OH), posteriormente se adicionan 7 mL de rojo de metilo (100 mg en 100 mL de CH_3OH)

Procedimiento.

*Digestión de la muestra:

- 1) Pesar de 10-100 mg de la muestra (dependiendo del contenido de proteína esperado) y colocarlos en el tubo de digestión.
- 2) Adicionar aproximadamente 0.5 g de K_2SO_4



- 3) Adicionar 3 ml de mezcla digestiva.
- 4) Colocar el tubo en el digestor por 15 minutos a una temperatura menor de 370°C
- 5) Sacar el tubo del digestor y dejarlo enfriar.
- 6) Adicionar 1.5 ml de H₂O₂ al 30% y nuevamente colocar el tubo en el digestor que se encuentre a 370°C hasta que la digestión termine (cuando el tubo no muestre manchas ni puntos negros y además la mezcla de digestión sea incolora, translúcida o verde-azuloso traslúcido).
- 7) Dejar enfriar el tubo antes de destilar.

***Destilación y titulación:**

Se lleva a cabo en el equipo Auto Analyzer Kjeltex, modelo 1030 de manera automática. La destilación se lleva a cabo por arrastre de vapor por acción de NaOH al 40%, se recibe el amoníaco liberado en ácido bórico y se titula con HCl 0.01 N valorada.

Se debe correr un blanco en donde se sustituye la muestra por el equivalente en peso de glucosa o sacarosa, trabajándose en la misma forma.

Cálculos.

Para obtener el contenido de nitrógeno de la muestra:

$$\%N_2 = (P-B) \times N \times \text{meq} \times 100 / m$$

Donde:

P = ml de la titulación de la muestra.

B = ml de la titulación del blanco.

N = normalidad de la solución de HCl .

meq = miliequivalentes de nitrógeno (0.014).

m = peso de la muestra (en gramos).



Para obtener el contenido de proteína de la muestra se relaciona el contenido de nitrógeno determinado que está presente en la proteína de la muestra por medio de un factor:

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ N}_2 \times F$$

F = factor de conversión (6.25).

INHIBIDORES DE TRIPSINA (28)

Fundamento.

La metodología se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso (solución de NaOH 0.01 N) de la muestra sobre una solución estándar de tripsina. El extracto directo o diluido de la muestra se pone en contacto con una solución estandarizada de tripsina y después de un cierto tiempo se determina la actividad proteolítica remanente por medio de un sustrato sintético: Benzoil-arginina-p-nitroanilida (BAPNA), el cual al ser hidrolizado por la tripsina remanente producirá una coloración amarilla proveniente de uno de los dos compuestos de hidrólisis (p-nitroanilina) que se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm, Dicha coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de tripsina de la muestra.

Equipo

- Potenciómetro CORNING, mod.430.
- Espectrofotómetro COLEMAN, mod. Sequoia-Turner
- Mezclador de tubos LAB-LINE, mod. Super-mixer.
- Parrilla con agitación magnética.
- Baño María GRANT, mod. SE 10.
- Balanza analítica. Sartorius Analytic

Reactivos.

- Solución de NaOH 0.01 N.
- HCl 0.001N.



-Ácido acético al 30%.

-Solución amortiguadora TRIS, pH 8.2 y 0.05 M (a).

-Solución de benzoil-arginina-p-nitroanilida (BAPNA, SIGMA No. B-4875) (b).

-Solución estándar de tripsina (SIGMA No. T-8253) (c).

- (a) Disolver 6.05 g de tris (hidroximetil-amino-metano) y 2.94 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 900 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8.2 y se afora a un volumen de 1 litro.
- (b) Disolver 100 mg de benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida-HCl (BAPNA) en 2.5 ml de dimetil-sulfóxido. Diluir a 250 ml con amortiguador TRIS previamente calentado a 37°C. Esta solución debe ser preparada el mismo día de su uso y mantenerse a 37°C.
- (c) Pesar con exactitud 4 mg de tripsina bovina (SIGMA No. T-8253) y disolverla en 200 ml de HCl 0.001 N. Esta solución contiene 20 µg de tripsina/ml. Guardar en refrigeración, donde puede permanecer de 2-3 semanas sin pérdida apreciable de actividad

Procedimiento.

*Preparación del extracto:

- 1) Pesar 1 g de muestra finamente molida en un vaso de precipitados.
- 2) Adicionar 45 ml de NaOH 0.01N.
- 3) Ajustar el pH de esta suspensión a 9.6 ± 0.2 .
- 4) Aforar con NaOH 0.01N a 50 ml.
- 5) Transferir a un vaso con magneto para agitar la suspensión mecánicamente en la parrilla de agitación por 2 horas y media a 300 rpm.
- 6) Quitar el magneto y dejar media hora en reposo.
- 7) Obtener el sobrenadante por decantación, se elimina el residuo insoluble.
- 8) El sobrenadante debe ser diluido hasta el punto que 1 ml produzca una inhibición de 40-60%, este requisito es indispensable para reducir la desviación estándar relativa.



***Determinación de la actividad:**

Cuando se trabaja con el extracto directo, es común que se arrastren coloraciones indeseables que pueden interferir en la determinación, por lo que es conveniente tomar una alícuota más de cada uno de los volúmenes que a continuación se describen, las cuales servirán como sus respectivos blancos.

- 1) Tomar con pipeta volúmenes (por duplicado: alícuota y respectivo blanco) de 0.0, 0.6, 1.0, 1.4 y 1.8 ml de extracto de la muestra y colocarlas en tubos de ensaye.
- 2) Ajustar el volumen a 2.0 ml con agua destilada.
- 3) Adicionar 2.0 ml de solución estándar de tripsina (previamente preparada y mantenida a 37°C). A los blancos de las alícuotas adicionar además 1.0 ml de ácido acético al 30%. Mantener el contacto inhibidor-tripsina por 10 minutos (en el caso de los blancos de las alícuotas no es necesario llevar un control del tiempo).
- 4) Adicionar 5 ml de la solución de benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (a 37°C) a cada tubo. Mantener la mezcla de reacción por 10 minutos exactos (usar cronómetro).
- 5) Detener la reacción enzimática adicionando 1 ml de ácido acético al 30% y homogeneizar inmediatamente.
- 6) Dejar en reposo aproximadamente por 15 minutos y si la mezcla de reacción se enturbia o forma un precipitado, debido a la adición del ácido acético, filtrar el contenido a través de papel filtro Whatman #1. Hay que asegurarse de que el filtrado sea transparente.
- 7) Leer en el espectrofotómetro a 410 nm ajustando el aparato a 100% de transmitancia con su respectivo blanco para cada una de las alícuotas. El tubo con 0.0 ml de extracto de la muestra es la referencia sobre la cual se basan los cálculos ya que este tubo contiene 40µg de tripsina/10 ml.



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

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, 40µg 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:

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

Donde:

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

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

$$F = A_1/a_1 \times A_2/a_2$$

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 .



LECTINAS (cuantitativo)(29)

Fundamento.

Se determina la cantidad mínima de extracto acuoso de una muestra vegetal, que produce prueba positiva de aglutinación con eritrocitos de hámster y este valor se relaciona con la cantidad mínima de faseolotoxina que produce prueba positiva de aglutinación definiéndose como 1 unidad hemaglutinante (UHG) el equivalente a 1 mg de dicha lectina.

Material y reactivos

Agitador magnético

Centrífuga para tubos marca DINAC

Tubos de centrifuga de 15 mL con graduación

Incubadora marca BUE- M

Espectrofotómetro Sequoia-Turner (o Coleman Junior IIA)

Adaptador para celdas de 12 x 80 mm (condicionado a una abertura de 1 cm²)

Microtiter Kit (Cook Eng-alexander Virginia USA)

Sangre de hámster desfibrinada y lavada

Solución anticoagulante (a)

Solución salina al 0.9%

Solución salina al 1 %

Proteasa (SIGMA P-5147)

Solución de proteasa al 0.2% en solución salina

Lectina purificada de frijol (*Phaseolus vulgaris*) faseolotoxina (SIGMA L-8754)

Solución de lectina de referencia (b)

- a) Cuando la sangre se va a trabajar inmediatamente se puede utilizar ya sea solución de heparina o citrato, las cuales se usan en la siguiente relación:

Solución de heparina: dependiendo de su actividad (expresada en UI) se usa en proporción de 15 a 20 UI de actividad por mL de sangre



Solución de citrato de sodio 3.8 % (m/v): por cada 1 mL de sangre se adiciona 0.1 mL de esta solución anticoagulante

- b) Pesar con la mayor exactitud posible 1 mg de faseolotoxina (SIGMA –L8754) en un tarador y pasarla a un matraz aforado de 10 mL; a continuación aforar con solución isotónica (0.9%). De esta solución (0.1 mg/mL) se realiza una disolución 1:100 para ocuparla en la placa de microtitulación tipo “V” con la finalidad de definir la cantidad mínima de faseolotoxina que produce prueba positiva de aglutinación (L).

Metodología

Preparación del extracto:

Moler finamente la muestra vegetal (con un contenido menor al 5% de grasa) y suspender 0.1 g de material en 10 mL de solución salina al 1%, efectuar la extracción con agitación mecánica durante 2 horas a 300 r.p.m. a temperatura ambiente.

Después del tiempo indicado se centrifuga el extracto a 1400 r.p.m., durante 15 minutos para eliminar el residuo insoluble; el sobrenadante se filtra a través de un filtro de vidrio de porosidad gruesa y de ser necesario se puede lavar el residuo con mas solución salina al 1%, para llevar el extracto filtrado al volumen inicial (10 mL).

Preparación de la sangre

Una vez que se sangra el hámster por vía ocular, se recoge ésta en un matraz pequeño que contenga solución anticoagulante. Agitar suavemente para la completa homogenización de la sangre y la solución anticoagulante. Para evitar al máximo la coagulación de la sangre, se debe diluir esta con solución salina isotónica (lavar la sangre lo mas rápido posible para evitar coagulación y hemólisis).

La sangre con anticoagulante 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 1 500 r.p.m. durante 10 min. Después del ultimo lavado, se mide en el tubo de centrifuga el volumen de



paquete de eritrocitos y se diluye al 4%. Para lo anterior, se agrega por cada 1.0 mL de glóbulos rojos compactados 24.0 mL de solución salina al 0.9%.

Sensibilización de los eritrocitos

A cada 10 mL de suspensión de glóbulos rojos al 4% agregarles 1 mL de solución de pronasa al 0.2% y se colocan en incubación por espacio de 1 hora a 36.5 ± 0.5 °C, resuspendiendo los eritrocitos cada 15 minutos por rotación suave del recipiente que los contiene.

Después del tiempo estipulado, centrifugar para eliminar la enzima sobrenadante y lavar 3 veces con solución salina al 0.9%. Después del último lavado resuspender el paquete de glóbulos rojos al 3% para lo cual, por cada 1.0 mL de paquete de eritrocitos se adicionan 32 mL de solución salina 0.9%.

Cuando se observa que la suspensión de eritrocitos tiene algunos pequeños coágulos, es necesario filtrar esta suspensión, lo cual se puede hacer a través de un pequeño trozo de gasa, colocado dentro de un tubo de cuello corto.

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 la solución salina 0.9%. Se lee en el espectrofotómetro a 620 nm, usando un adaptador de celdas que permita el paso de solo 1 cm² de luz y como blanco solución salina al 0.9%.

La lectura que se debe obtener es de 26.5 ± 2.5 (24 a 29) de transmitancia, en caso contrario se realizara la dilución o concentración necesaria para que la suspensión de glóbulos quede dentro de dicho rango.

Microtitulación

En las placas tipo "V" del microtiter colocar en cada pozo de las hileras que se van a utilizar, 100 µL de la solución salina al 0.9% con la pipeta automática multicanales evitando tocar las paredes



del pozo y adicionando con precaución para que no se desfase el volumen de adición. A continuación llenar el microdilutor con 50 μ L introduciéndolo en el extracto problema y al sacarlo absorber con mucho cuidado la solución adherida en el vástago del microdilutor, posteriormente se introduce en el primer pozo de la hilera escogida girándolo sin excesiva presión y se pasa con mucho cuidado al siguiente pozo y así sucesivamente hasta completar una hilera para obtener la dilución seriada. lo anterior se realiza para la solución diluida (1:100) de la faseolotoxina que servirá como referencia para la determinación cuantitativa. Por ultimo, con un pipetero de gota colocar en cada pozo 50 μ L de la suspensión de glóbulos rojos, en cada pozo de una placa. Luego se gira en forma circular y se coloca en la incubadora a $36.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante una hora.

Lectura

Una vez transcurrido el tiempo estipulado se coloca sobre el dispositivo de lectura. Se observa a través del espejo el fondo de los pozos de cada hilera de prueba y se reporta la máxima dilución que presenta prueba positiva de aglutinación, tanto del extracto de la muestra a ensayar como de la solución de faseolotoxina.

Recomendaciones

Se debe realizar la dilución necesaria para que el extracto produzca un título dentro de los primeros 10 pozos de una hilera.

Se debe cuidar el rango de temperatura establecida y todo el material que se utilice debe estar perfectamente limpio.

Cálculos

La máxima dilución que presenta aglutinación se denomina como título de ensayo de la muestra y la prueba debe efectuarse como mínimo por triplicado. Con los datos individuales de los títulos se



obtiene el promedio y se redondea al número entero más cercano y este es el título (t) que se usa para los cálculos.

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

$$E = M \times D$$

Donde:

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

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

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

$$E = 0.01 \mu\text{g}/\mu\text{L} \times 50 \mu\text{L} = 0.05 \mu\text{g de lectina}$$

Conociendo este dato (E), se procede a calcular el límite de detección del método, para lo cual es necesario tener el título t, de la solución diluida de faseolotoxina. El límite de detección (L) se obtiene a la siguiente fórmula:

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

Donde:

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

t = Título (promedio de los títulos individuales redondeados al entero inmediato)

2. Para el extracto de la muestra, se requiere obtener la máxima dilución que produce prueba positiva de aglutinación, para lo cual es necesario calcular la cantidad equivalente de muestra problema en el pozo (e), como se hizo anteriormente para la solución de faseolotoxina, pero expresada en mg. Lo anterior se obtiene de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$e = m \times D$$



Donde:

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

m = Concentración equivalente de muestra en el extracto (expresada en mg/ μ L).

D = Cantidad de extracto tomada por el microdilutor (μ L)

Conociendo la cantidad equivalente de muestra en el primer pozo, se debe de obtener la cantidad mínima de que produce prueba positiva de aglutinación, la cual se obtiene con la siguiente fórmula:

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

MA = Cantidad mínima equivalente de muestra que produce prueba positiva de aglutinación (expresada en mg)

t = Titulo (promedio de los títulos individuales redondeado al entero inmediato)

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

$$LE = L / MA$$

Donde:

LE = cantidad de lectina expresada en μ g, que se presenta en un mg de muestra de material vegetal ensayado. Dicho valor también equivale a 1 mg de lectina / g de muestra. Si por definición, se establece que una unidad de hemaglutinación (UHG) es equivalente a 1 mg de faseolotoxina bajo las condiciones establecidas en esta metodología, podemos expresar nuestros resultados en **UHG / g de muestra**.



GLUCÓSIDOS CIANOGENICOS (30)

Fundamento.

El presente método aprovecha la reacción sensible y específica de Guignard, la cual es ampliamente utilizada en pruebas cualitativas para la detección tanto de glucósidos cianogénicos como del propio HCN.

Para poder cuantificar el HCN total que potencialmente puede ser liberado se hace uso de una hidrólisis enzimática (por medio de una β -glucosidasa), del correspondiente glucósido cianogénico; y para poder cuantificar en forma precisa el HCN liberado, es conveniente trabajar algunos pasos de la determinación a temperaturas bajas. Dicho HCN liberado reacciona con el ácido pícrico contenido en una tira de papel produciendo una coloración visible café-rojiza debido a la isopurpurina formada. Con este método se puede detectar hasta cantidades del orden de 5 μ g de HCN, equivalentes a 46 μ g de glucósidos cianogénicos (referido con linamarina).

Equipo.

- Espectrofotómetro Sequoia-Turner Mod., 340
- Celdas para el espectrofotómetro.
- Estufa.
- Congelador comercial.
- Baño de agua con agitación marca LAB-LINE.
- Balanza analítica.
- Tubos de cultivo con tapón rosca PIREX #9825 y #9826.

Reactivos.

- Solución de HCl 0.5N.
- Solución buffer de fosfatos pH 7.0.
- Solución de KCN equivalente a 100 μ g HCN/ml (24.1 mg KCN/100 ml).
- Solución de picrato de sodio alcalinizada (a).
- Solución de β -glucosidasa con activador (b).
- Papel indicador de HCN (c).



- (a) Disolver en agua destilada 2.5 g de ácido pícrico y a continuación 12.5 g de carbonato de sodio, aforar a un volumen de 500 ml con agua destilada.
- (b) 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 .
- (c) 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.

Determinación cualitativa:

- 1) Colocar en un tubo de cultivo Pyrex de 20-500 mg de muestra, dependiendo de su contenido aproximado de glucósidos cianogénicos (cuando no se tiene la información se coloca la cantidad máxima de 500 mg).
- 2) Adicionar 5.0 ml de la solución de β -glucosidasa (fría).
- 3) Homogeneizar y colocar la tira de papel indicador humedecida (aproximadamente con 8 gotas de agua) en la boca del tubo y cerrar herméticamente con un tapón de rosca.
- 4) Colocar en el baño maría a la temperatura de $40 \pm 1^\circ\text{C}$ por 4 horas con el control de velocidad de agitación ajustado a 3.5.
- 5) Sacar los tubos y colocarlos en el congelador por 30 minutos.
- 6) Sacar el tubo y destapar para adicionarle 1 ml de HCl 0.5 N (frío). La tira de papel debe quedar adherida al tapón para evitar problemas de manipulación.
- 7) Volver a cerrar perfectamente.
- 8) Homogeneizar teniendo la precaución de que el líquido no toque el papel indicador.



- 9) Colocar en la estufa por 15 minutos a la temperatura de 60°C.
- 10) Sacar de la estufa y realizar visualmente la detección cualitativa, ya que aquellos tubos que no muestren por lo menos una ligera coloración café-rojiza en el papel indicador, se consideran negativos; en tanto que aquellos que si muestran aunque sea una tenue coloración se consideran positivos y se procede a su determinación cuantitativa.

Determinación cuantitativa:

- 11) Recuperar el papel indicador y colocarlo en un tubo de cultivo Pyrex .
- 12) Adicionar 20 ml de agua destilada (medidos con bureta).
- 13) Tapar y agitar vigorosamente con el fin de extraer el pigmento de isopurpurina del papel indicador en el agua.
- 14) Después de extraer el pigmento (aproximadamente 2-5 minutos) recuperar el solvente (agua), eliminando los residuos del papel por una simple filtración con papel de filtración rápida.
- 15) Colocar la solución filtrada en la celda para su lectura en el espectrofotómetro a 520 nm, ajustando previamente a 100% de transmitancia con el blanco de la muestra.

***Curva patrón:**

- 1) Tomar 0.0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 ml de la solución estándar de KCN cuya concentración es equivalente a 100 µg HCN/ml y colocarlos en tubos de cultivo Pyrex . Las concentraciones de HCN son: 0.0 (blanco), 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0 µg HCN, respectivamente. Entonces la curva estándar va de 5.0 a 60.0 µg HCN, ya que fue el rango óptimo encontrado donde se cumple la ley de Lambert-Beer.
- 2) Adicionar 500 mg de fécula de maíz comercial, llamada también matriz alimenticia, con el propósito de simular la interacción muestra-HCN liberado.
- 3) Adicionar 5.0 ml de solución buffer pH 7.0.
- 4) Homogeneizar y colocar la tira de papel indicador humedecida (aproximadamente con 8 gotas de agua) en la boca del tubo y cerrar herméticamente con un tapón de rosca.



- 5) Colocar en un baño maría a la temperatura de $40 \pm 1^\circ\text{C}$ por 4 horas con el control de velocidad de agitación ajustado a 3.5.
- 6) Sacar los tubos y colocar en el congelador por 30 minutos.
- 7) Sacar el tubo y destapar para adicionarle 1 ml de HCl 0.5 N (frío). La tira de papel debe quedar adherida al tapón para evitar problemas de manipulación.
- 8) Volver a cerrar perfectamente.
- 9) Homogeneizar teniendo la precaución de que el líquido no toque el papel indicador.
- 10) Colocar en la estufa por 15 minutos a la temperatura de 60°C .
- 11) Sacar de la estufa y recuperar el papel indicador y colocar en un tubo de cultivo Pirex .
- 12) Adicionar 20 ml de agua destilada (medidos con bureta).
- 13) Tapar y agitar vigorosamente con el fin de extraer el pigmento de isopurpurina del papel indicador en el agua.
- 14) Después de extraer el pigmento (aproximadamente 2-5 minutos) recuperar el solvente (agua), eliminando los residuos del papel por una simple filtración con papel de filtración rápida. Cuando se requiera se puede hacer otra adición de agua (20 ml) para extraer completamente el pigmento (dilución).
- 15) Colocar la solución filtrada en la celda para su lectura en el espectrofotómetro a 520 nm, ajustando previamente a 100% de transmitancia con el blanco de la curva patrón (0.0 ml de la solución estándar de KCN).

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. Interpolar 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:

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

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



D = número de veces de adición de 20 ml de agua (dilución).

M = mg de muestra.

TANINOS.

Fundamento.

El método se basa en la extracción de taninos por agitación con dimetilformamida y la determinación espectrofotométrica a 525 nm después de la centrifugación y adición de citrato férrico de amonio y amoniaco al líquido sobrenadante. El contenido de taninos de la muestra se obtiene mediante una curva patrón usando ácido tánico.

Equipo.

- Espectrofotómetro Sequoia-Turner Mod. 340
- Celdas para el espectrofotómetro.
- Centrífuga para tubos marca DINAC.
- Tubos de centrifuga de 50 ml con tapas que sellen herméticamente.
- Agitador magnético.
- Agitador mecánico, tipo vortex.
- Balanza analítica.
- Pipetas graduadas de 1, 5, y 10 ml.
- Tubos de ensayo de 140 X 14 mm.

Reactivos.

- Solución de dimetilformamida al 75%.
 - Solución de ácido tánico (Merck No.773), 2 mg/ml.
 - Solución de amoniaco, 8.0 g NH_3 /1 litro (a)
 - Solución de citrato férrico de amonio, 3.5 g/1litro (b).
- (a) Tomar 30.79 ml de hidróxido de amonio (NH_4OH) y aforar a 1 litro con agua destilada.
- (b) Esta solución debe ser preparada 24 horas antes de su uso. Debe contener entre 17% y 20% de hierro.



Procedimiento.

- 1) Pesar 1 g de muestra
- 2) Adicionar aproximadamente 20 ml de solución de dimetilformamida al 75% en un vaso de pp de 50 mL.
- 3) Tapar y agitar durante 1 hora.
- 4) Centrifugar por 10 minutos a 3000 rpm

***Para el blanco:**

- 1) Tomar 1 ml del líquido sobrenadante y colocarlo en un tubo de ensayo.
- 2) Adicionar 6 ml de agua y 1 ml de amoníaco, agitar por unos segundos en el vortex.
- 3) Después de 10 minutos a temperatura de 30 °C en baño de agua, transferir la solución a una celda leer la absorbancia a 525 nm, usando agua como blanco.

***Para la muestra:**

- 1) Tomar 1 ml del líquido sobrenadante y colocarlo en un tubo de ensayo (por triplicado).
- 2) Adicionar 5 ml de agua y 1 ml de la solución de citrato férrico de amonio, agitar por unos segundos en el vortex.
- 3) Adicionar 1 ml de amoníaco, agitar por unos segundos en el vortex.
- 4) Después de 10 minutos en baño de agua a 30 °C, transferir la solución a una celda y leer la absorbancia a 525 nm, usando agua como blanco.

***Curva patrón:**

- 1) Colocar en seis 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. Llevar 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.



- 2) Tomar con pipeta 1 ml de cada una de las soluciones y colocarlo en un tubo de ensayo (8 tubos de ensayo en total).
- 3) Adicionar 5 ml de agua y 1 ml de solución de citrato férrico de amonio, agitar por unos segundos en el vortex.
- 4) Adicionar 1 ml de amoníaco, agitar por unos segundos en el vortex.
- 5) Transferir las soluciones obtenidas a celdas y después de 10 minutos medir absorbancia a 525 nm usando agua como blanco.

Cálculos.

Trazar 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. Interpolar 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.

El contenido de taninos, expresado como un porcentaje en masa de ácido tánico en relación a la materia seca es:

$$\frac{\text{mg ácido tánico /ml} \times 25 \text{ ml extracto}}{1 \text{ g muestra}} \times \frac{1 \text{ g ácido tánico}}{1000 \text{ mg ácido tánico}} \times 100 = \frac{\text{g ácido tánico}}{100 \text{ g muestra}}$$



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ciclo biológico del frijol comba

El ciclo biológico del frijol comba se determinó registrando la duración de cada una de las fases después de dar inicio a la germinación. pinto violento en días es: 15 días para el germinado, 28 para plántula, 67 madurez fisiológica, 50 floración y 158 ejote; teniéndose un total de 318 días. Para el blanco es de: 14 días para el germinado, 31 para la plántula, 75 madurez fisiológica, 67 floración y 165 ejote; teniéndose un total de 352 días. Lo anterior se aprecia en las figuras 3 y 4 respectivamente.

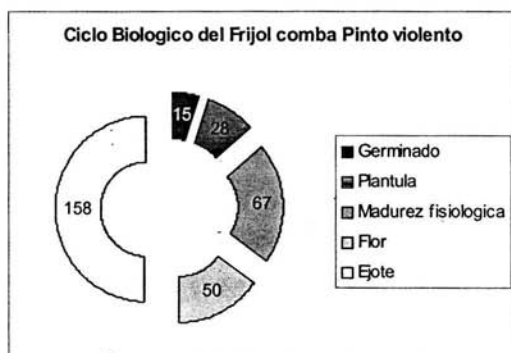


Figura 3. Ciclo biológico del frijol pinto violento (días).

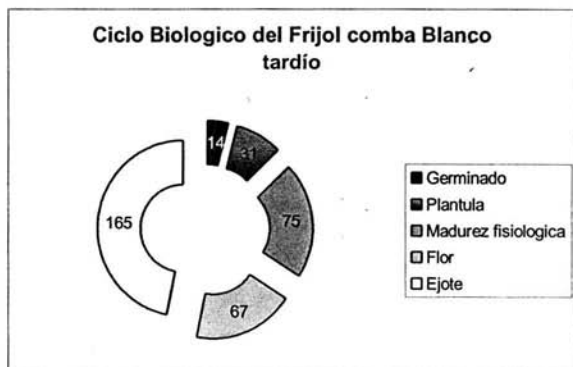


Figura 4. Ciclo biológico del frijol blanco tardío (días).



El ciclo del frijol se estableció a partir de la inducción a la germinación de la semilla inicial. En la figura 5 se ilustra la semilla inicial en comparación con la semilla final con la que se cierra el ciclo de desarrollo. La semilla inicial con fecha de julio 2002 y final con fecha de recolección mayo 2003 se muestran en la figura 4. Se observa que presentan las mismas características físicas y en las tablas de resultados que se muestran posteriormente se aprecia que también presentan similitudes en las determinaciones analíticas.

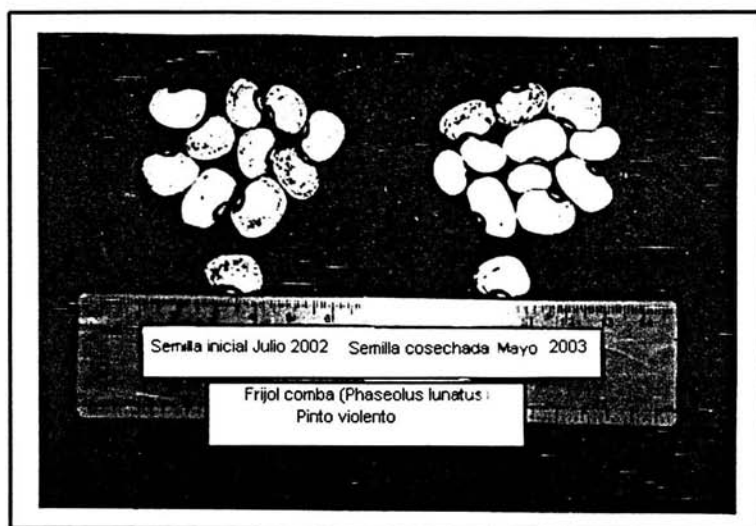


Figura 5. Semillas de frijol comba pinto violento

Humedad del frijol comba

La determinación de humedad es importante para poder expresar los resultados de las determinaciones de los factores tóxicos. En esta determinación, se observa que la estructura con mayor humedad es la plántula en la variedad pinto.

Lo anterior se aprecia en la figura 6 que es la respectiva para esta determinación. En la figura 7, que corresponde a la variedad blanco, observamos que la estructura con un contenido mayor de



humedad es la plántula, al igual que en la variedad pinto. La estructura que presenta una menor humedad en la variedad pinto es la raíz y la flor en la variedad blanco

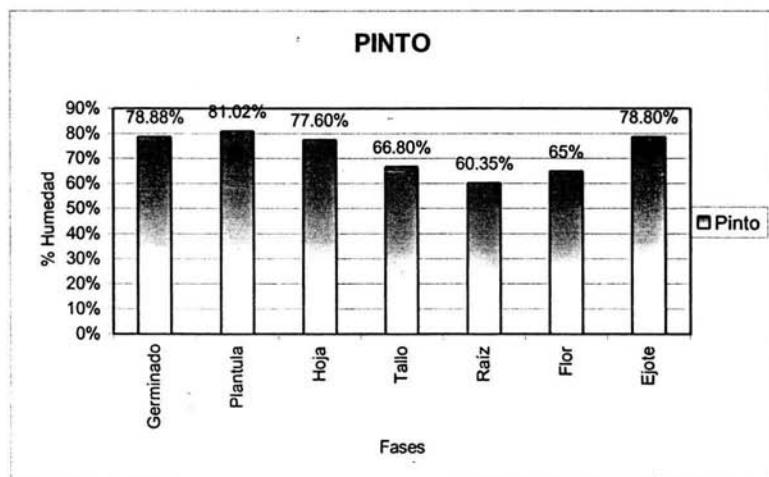


Figura 6. Grafica de % de humedad gruesa en las diferentes fases del frijol pinto violento

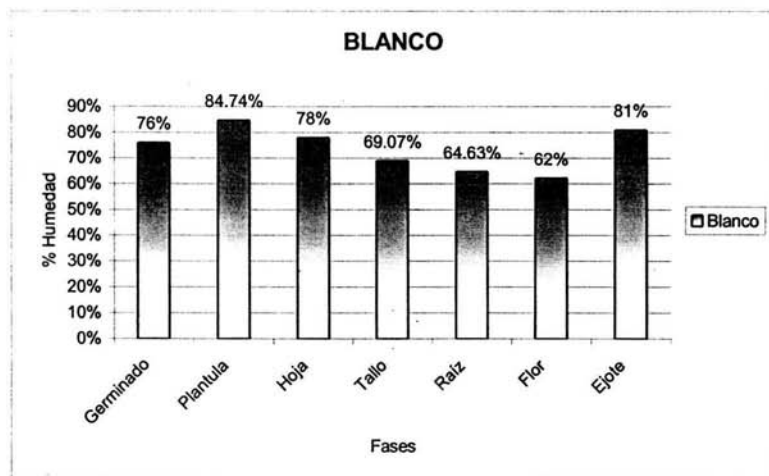


Figura 7. Grafica de % de humedad gruesa en las diferentes fases del frijol blanco tardío



Ponderación de las diferentes partes en la fase madurez fisiológica

La fracción de mayor proporción en la fase madurez fisiológica le corresponde a la hoja en ambas variedades. Por ultimo la fracción con menos proporción en la planta le corresponde a la raíz con aproximadamente 6% del peso total de la planta. Lo anterior se puede apreciar con mayor claridad en la figura 8.

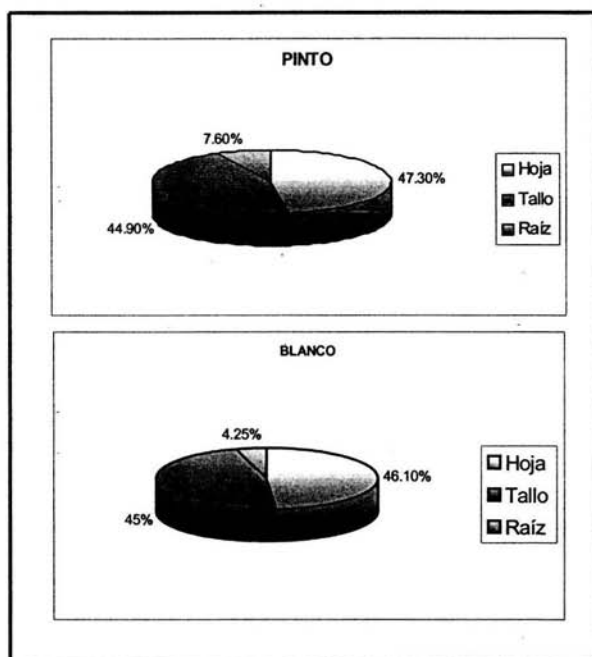


Figura 8. Graficas de pastel que representan la ponderación de las diferentes partes en la fase madurez fisiológica.



En cuanto a la ponderación en la fase floración, se observa que la mayor proporción le corresponde al tallo, seguida de las hojas, la raíz y por ultimo la flor. La flor es la parte de la planta que menos contribuye al total, teniendo alrededor de un 2% del peso total de la planta. Lo anterior se aprecia en la figura 9 que corresponde a las gráficas de pastel de las fracciones en la fase floración.

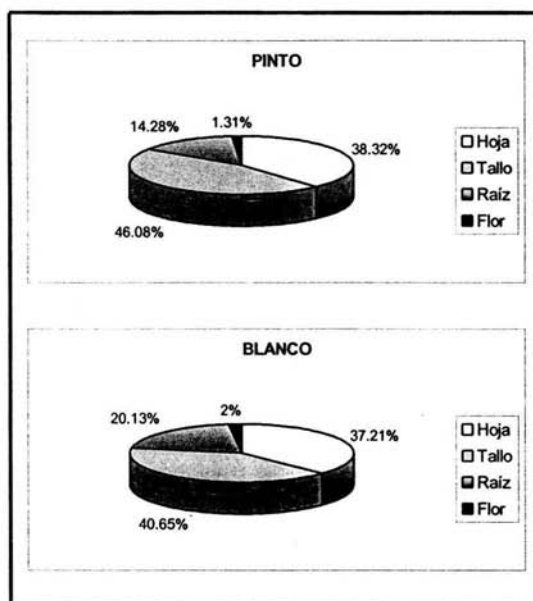


Figura 9. Gráficas de pastel que ilustran la ponderación de las diferentes partes en la fase floración.

En la figura 10 se ilustran las plantas de ambas variedades de frijol en la fase floración. Como puede observarse las flores de estas variedades son muy pequeñas en comparación con el resto de las estructuras lo que nos permite entender los resultados de las ponderaciones y la complejidad en las determinaciones analíticas.

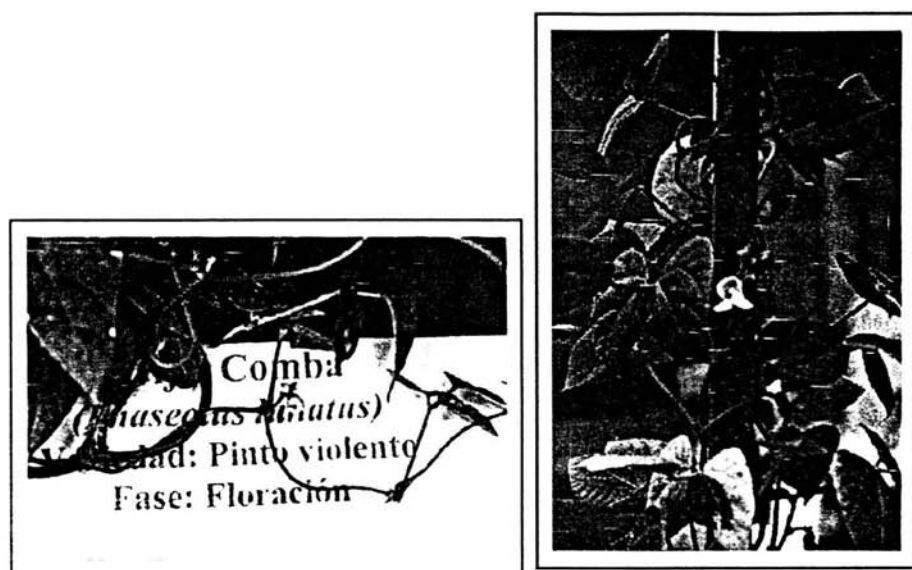


Figura 10. Flor de frijol comba pinto violento (izquierda) y blanco tardío (derecha)

Por ultimo se tiene la ponderación de las fracciones en la fase ejote en la cual se observa que la mayor proporción le corresponde al ejote en ambas variedades a diferencia de la fase anterior en la que la mayor proporción le pertenecía a las hojas.

La fracción que ocupa la siguiente proporción es el tallo, seguida de la hoja. La menor proporción le corresponde a la raíz. Puede observarse como cambian las proporciones de los diferentes componentes de una fase a otra.

Lo anterior se ilustra en la figura 11.

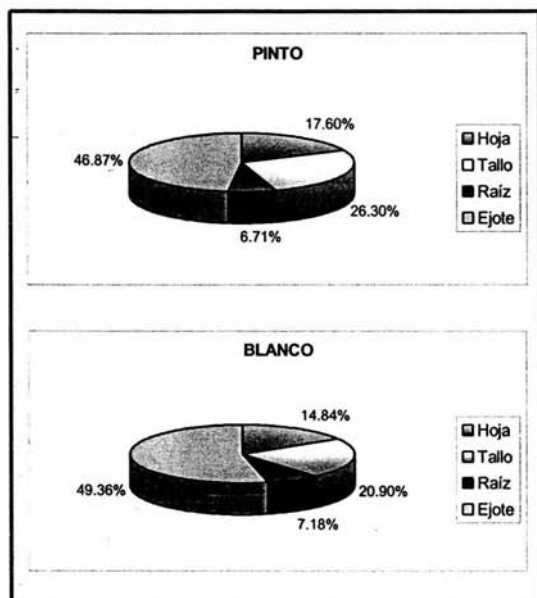


Figura 11. Gráficas de pastel que representan las proporciones la planta en fase ejote para ambas variedades.

Porcentajes de humedad y pesos de los diferentes componentes de la planta en las fases floración y ejote

La estructura que presentan el mayor porcentaje de humedad es la hoja, para ambas variedades, seguida de la raíz en el pinto y el tallo en el blanco. La estructura que presenta la mayor proporción con respecto al peso total de la planta es el tallo con 46.08% para el pinto y 40.65% para el blanco. La flor es la estructura que presenta la menor proporción con respecto al total de la planta en esta fase, aunque el contenido de humedad es elevado al igual que los otros componentes.



Cabe mencionar que cada parte de la planta en esta fase representa proporciones muy similares para ambas variedades. La tabla 8 muestra los resultados antes mencionados.

Tabla 8. Porcentajes de humedad y peso de los diferentes componentes de la planta en fase floración para ambas variedades

Pinto			Blanco	
Humedad (%)	Proporción (%)	Estructura	Proporción (%)	Humedad (%)
76.6	38.32	Hoja	37.21	77.3
60	46.08	Tallo	40.65	67
65.1	14.28	Raíz	20.13	65.3
65	1.31	Flor	2.0	62

El ejote es la estructura que presenta un mayor porcentaje de humedad con respecto al resto de las estructuras, seguida por la hoja y el tallo. La raíz es la estructura con menor proporción de humedad. Se observa que las estructuras tienen valores similares a los que se presentan en la fase de floración. Por otro lado, la variación en los pesos de los diferentes componentes de una fase a otra puede deberse al hecho de que la planta construye el ejote, lo que ocasiona una disminución proporcional del peso del resto de las estructuras.



Tabla 9. Porcentajes de humedad y peso de los diferentes componentes de la planta en fase ejote para ambas variedades

Pinto			Blanco	
Humedad (%)	Proporción (%)	Estructura	Proporción (%)	Humedad (%)
75	17.6	Hoja	14.84	78
66	26.3	Tallo	20.9	71
60.4	6.71	Raíz	7.18	63.6
78	6.87	Ejote	49.36	79

RESULTADOS DE LAS DETERMINACIONES

Los resultados que se muestran en las tablas 10 y 11 son los obtenidos para la muestra biológica en forma de harina (base seca) ya que el contenido de agua fluctúa mucho en las diferentes fases. Cabe señalar que en la fase de madurez fisiológica se separaron las hojas, el tallo y la raíz y se realizaron todas las determinaciones por separado.

El análisis de los resultados obtenidos se describe después de la grafica correspondiente de cada determinación.



Tabla 10 . Resultados de las determinaciones para el frijol comba Pinto violento

Fase	Proteína g/100g muestra	Glucósidos cianogénicos mg de HCN/100g	Inhibidores de tripsina UTI/mg muestra	Lectinas UHM	Taninos g/100g muestra
Semilla	20.90 ± 0.77	4.03 ± 0.49	118.46 ± 6.33	0.9005	0.836 ± 0.005
Germinado	26.97 ± 1.36	6.89 ± 0.69	80.58 ± 4.71	0.897	0.576 ± 0.007
Plántula	28.29 ± 0.11	3.11 ± 0.53	4.35 ± 0.20	0.3	0.806 ± 0.021
Hoja	24.35 ± 0.26	8.01 ± 0.96	Nd	0.0024	0.879 ± 0.012
Tallo	10.51 ± 0.07	8.88 ± 1.95	Nd	Neg	0.559 ± 0.002
Raíz	11.86 ± 0.93	5.27 ± 0.36	Nd	0.02933	0.531 ± 0.003
Flor	19.35 ± 0.22	11.65 ± 0.45	Nd	Neg	0.358 ± 0.001
Ejote	16.06 ± 0.50	26.90 ± 3.24	2.62 ± 0.23	0.29	0.620 ± 0.006
Semilla cosechada	21.54 ± 0.12	6.12 ± 0.09	104.05 ± 5.64	0.895	0.857 ± 0.012



Tabla 11. Resultados de las determinaciones para el frijol Blanco tardío

Fase	Proteína G/100g muestra	Glucósidos cianogénicos mg de HCN/100g g	Inhibidores de tripsina UTI/mg muestra	Lectinas UHM	Taninos g/100g muestra
Semilla	24.69 ± 3.10	4.39 ± 0.29	95.93 ± 8.23	0.9732	0.612 ± 0.002
Germinado	27.67 ± 0.74	5.12 ± 0.45	84.01 ± 2.37	0.699 ± 0.345	0.482 ± 0.004
Plántula	34.03 ± 0.64	2.18 ± 0.14	7.04 ± 0.36	0.29	0.512 ± 0.001
Hoja	25.65 ± 2.36	12.40 ± 0.40	Nd	Neg	1.05 ± 0.008
Tallo	14.53 ± 0.10	6.18 ± 1.33	Nd	0.00736	0.508 ± 0.0
Raíz	14.07 ± 0.04	1.38 ± 0.10	Nd	Neg	0.564 ± 0.001
Flor	19.50 ± 0.25	7.80 ± 0.46	Nd	0.027 ± 0.283	0.366 ± 0.001
Ejote	20.70 ± 0.03	36.37 ± 3.32	30.37 ± 6.37	0.226 ± 0.111	0.75 ± 0.005
Semilla cosechada	24.55 ± 4.10	6.28 ± 0.56	108.40 ± 12.34	0.897	0.93 ± 0.007



Concentración de proteína

La figura 12 es la correspondiente a la determinación del nivel de proteína en la que se observa un aumento en el contenido la misma en cada una de las fases teniendo su mayor valor en la plántula. Lo anterior se debe a que la planta sintetiza proteínas estructurales y enzimas. Sin embargo éste nivel de proteína disminuye en la fase madurez fisiológica presentando su menor valor en el tallo en variedad pinto y en raíz en variedad blanco. Se tiene un nuevo aumento en el nivel de proteína en la semilla cosechada, siendo similar este valor al de la semilla inicial.

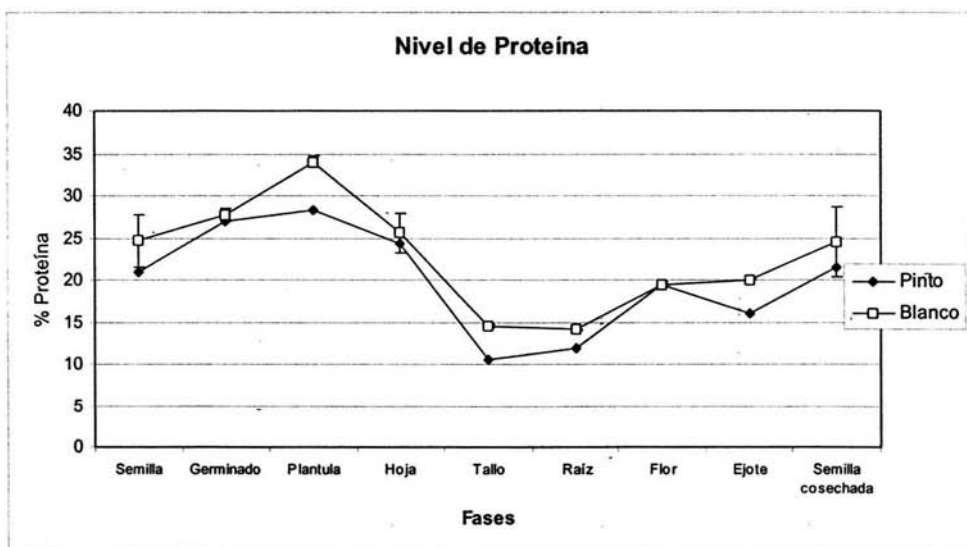


Figura 12. Graficas de líneas con desviación estándar para Proteína. (NOTA. Las grafica de líneas se realizó con cada valor obtenido en todas las determinaciones y su respectiva desviación estándar. Hay algunos puntos en los que no se perciben las líneas de desviación, lo cual se debe a que es tan pequeña que no se registra en el grafico).



Nivel de Glucósidos cianogénicos

Los glucósidos cianogénicos presentan un aumento en el germinado y disminuyen en la plántula como se observa en la grafica correspondiente (figura 13), pero muestran un nuevo aumento en la fase madurez fisiológica, registrando el mayor valor en la hoja. Esto probablemente indica que tiene como mecanismo de defensa contra sus depredadores el aumento de los glucósidos cianogénicos y siendo la hoja la estructura que tiene mayores componentes metabólicos y es mas susceptible al ataque de los depredadores registra la mayor concentración de este toxico. A pesar de que se esperaba un aumento de este toxico en cada una de las fases, se encontró que en la fase plántula hay una disminución del contenido del mismo por lo cual no se tiene explicación precisa para este fenómeno. Sin embargo, en la fase ejote se tiene el máximo de concentración del toxico, lo cual indica que efectivamente es este aumento lo que le permite concluir su ciclo biológico satisfactoriamente. Cabe mencionar que el nivel máximo considerado como seguro contra posible intoxicación es de 20 mg HCN/ 10 g muestra, que es rebasado en ambas variedades en la fase ejote; sin embargo, el nivel de estos tóxicos disminuye en la semilla cosechada.

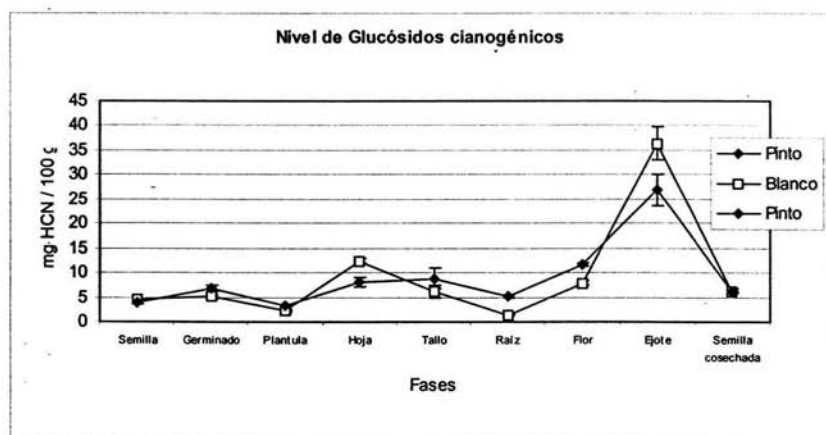


Figura 13. Graficas de líneas con desviación estándar para Glucósidos cianogénicos. (NOTA. Las graficas de líneas se realizó con cada valor obtenido en todas las determinaciones y su respectiva desviación estándar. Hay algunos puntos en los que no se perciben las líneas de desviación, lo cual se debe a que es tan pequeña que no se registra en el grafico).



Nivel de Inhibidores de Tripsina

El contenido de inhibidores de tripsina disminuye considerablemente en el germinado y presenta una mayor disminución en la plántula como podemos ver en la gráfica correspondiente para éste factor antinutricional. Esta variación se debe a que los inhibidores de tripsina tienen un control sobre la actividad de las proteasas endógenas de la semilla. Cuando la semilla germina, necesita nitrógeno, así la disminución de los inhibidores de tripsina permiten que las proteasas lleven a cabo su acción hidrolítica sobre las proteínas. Este resultado era de esperarse ya que es esta tendencia se presenta en otras semillas de leguminosas como es el caso de frijol común (*P. vulgaris*) (21).

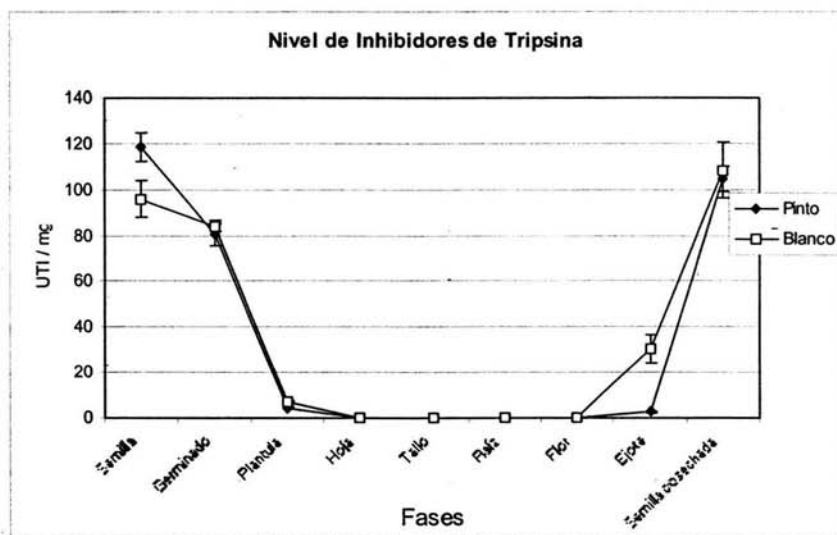


Figura 14. Gráficas de líneas con desviación estándar para Inhibidores de Tripsina. (NOTA. Las gráficas de líneas se realizaron con cada valor obtenido en todas las determinaciones y su respectiva desviación estándar. Hay algunos puntos en los que no se perciben las líneas de desviación, lo cual se debe a que es tan pequeña que no se registra en el gráfico).



Nivel de Lectinas

La grafica anterior corresponde a la determinación de las lectinas. Debido a la técnica para su determinación (ver pagina 34) solo fue posible realizar análisis estadístico en las fases semilla, flor y ejote de la variedad blanco tardío y raíz en pinto violento. Para hacer un análisis estadístico como el que se realizo en todo el experimento es necesario tener por lo menos 3 valores, por lo que se realizan por triplicado todas las determinaciones. La determinación de lectinas no fue la excepción sin embargo al realizar el calculo correspondiente (ver pagina 37) se reduce a un valor final (con unidades de hemaglutinacion), cuando el titulo de aglutinación fue el mismo en la serie de tres ensayos. Solamente cuando se tienen títulos diferentes o un titulo diferente por lo menos es posible realizar el análisis estadístico usado en este experimento. Para el caso del frijol pinto, se tuvo una sola fase con triplicado lo que imposibilita el análisis estadístico. Sin embargo se puede discutir una tendencia que se presenta en la figura 15. Dicha tendencia es muy similar a la que produce el frijol común (18), ya que se tiene datos sobre la disminución de la actividad hemaglutinante en estas leguminosas (33) como se puede observar en la tabla 7. Al iniciarse la germinación, se presenta una disminución considerable en la actividad hemaglutinante, aunque esta actividad tiene su minimo en la fase hoja. La actividad aumenta nuevamente en la fase ejote, teniendo el máximo en la semilla cosechada, como era de esperarse. Estos valores son similares a los presentes en la fase semilla inicial.

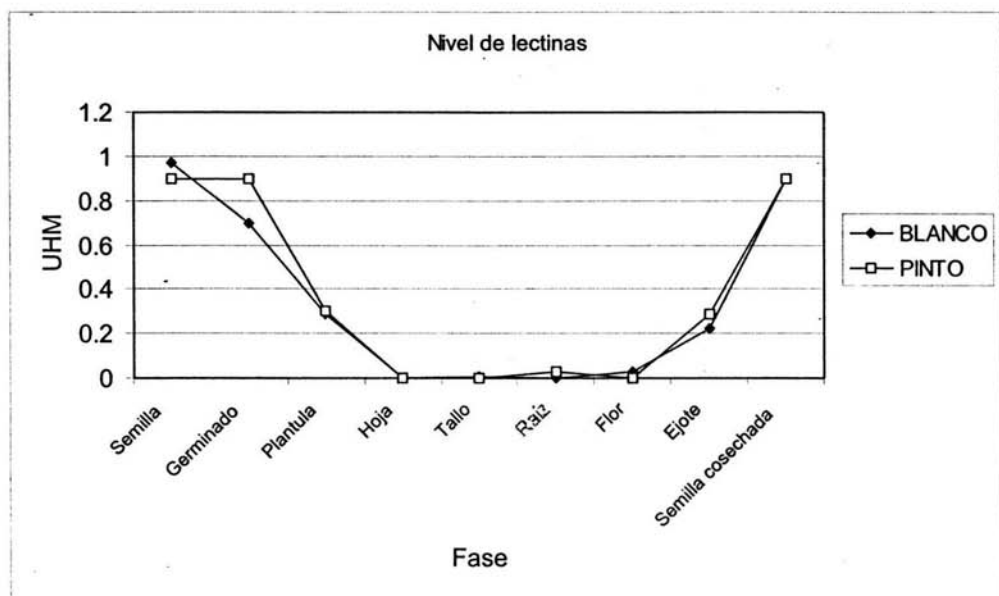


Figura 15. Graficas de líneas para Lectinas (UHM en eritrocitos de hamster) (NOTA. Las grafica de líneas se realizó con cada valor obtenido en todas las determinaciones y su respectiva desviación estándar. Hay algunos puntos en los que no se perciben las líneas de desviación, lo cual se debe a que es tan pequeña que no se registra en el grafico).



Nivel de Taninos

En la grafica anterior (figura 16), se muestra que a pesar de tener una disminuci3n de la concentraci3n de taninos en la fase del germinado, aumenta nuevamente, teniendo el m3ximo del valor en la fase madurez fisiol3gica. Lo anterior corrobora que la planta utiliza estos factores como mecanismo de protecci3n contra sus depredadores al igual que los gluc3sidos cianog3nicos.

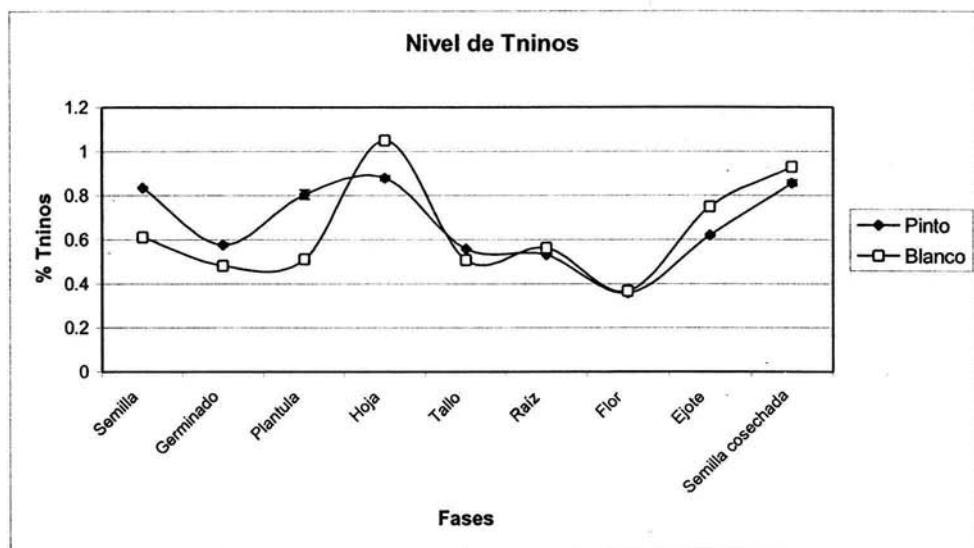


Figura 16. Graficas de lneas con desviaci3n est3ndar para Taninos. (NOTA. Las grafica de lneas se realiz3 con cada valor obtenido en todas las determinaciones y su respectiva desviaci3n est3ndar. Hay algunos puntos en los que no se perciben las lneas de desviaci3n, lo cual se debe a que es tan peque1a que no se registra en el grafico).



ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó el análisis de varianza para determinar si existe diferencia significativa estadísticamente para cada determinación en las diferentes fases del desarrollo. Una vez encontradas las diferencias entre las muestras es importante identificar que determinaciones son diferentes en cada una de las fases. El procedimiento Tukey Kramer permite examinar, en forma simultanea, las comparaciones entre todos los pares de grupos (31). Los resultados de este procedimiento se muestran en las tablas siguientes. Cabe mencionar que debido a la naturaleza del método para la determinación de lectinas (ver página 36) solamente fue posible realizar el análisis de varianza y Tukey-Kramer para las fases germinado, flor y ejote

Tabla 12. Análisis de Tukey-Kramer para Proteína.

Fase	Pinto	Blanco
Semilla	20.9 ^{cd}	24.69 ^{bcd}
Germinado	26.97 ^f	27.67 ^d
Plántula	28.29 ^f	34.03 ^e
Hoja	24.35 ^e	25.65 ^{cd}
Tallo	10.51 ^a	14.53 ^a
Raíz	11.86 ^a	14.07 ^a
Flor	19.35 ^c	19.50 ^{ab}
Ejote	16.06 ^b	20.70 ^{bc}
Semilla cosechada	21.54 ^d	24.55 ^{bcd}

NOTA. Letras iguales representa igualdad estadística



En la tabla 12 se observa que no existe diferencia significativa en la determinación de proteína en las fases: semilla y flor; semilla y semilla cosechada; germinado y plántula; tallo y raíz en la variedad pinto violento. Por otro lado, en la variedad blanco tardío las fases que no presentan diferencia significativa son: semilla, flor, ejote y semilla cosechada; semilla, hoja, ejote y semilla cosechada; semilla germinado, hoja y semilla cosechada; tallo, raíz y flor.

Tabla 13. Análisis de Tukey-Kramer para Glucósidos cianogénicos.

Fase	Pinto	Blanco
Semilla	4.03 ^a	4.39 ^{abc}
Germinado	6.89 ^{ab}	5.12 ^{cd}
Plántula	3.11 ^a	2.18 ^{ab}
Hoja	8.01 ^{bc}	12.4 ^e
Tallo	8.88 ^{bc}	6.18 ^d
Raíz	5.27 ^{ab}	1.38 ^a
Flor	11.65 ^c	7.80 ^d
Ejote	26.9 ^d	36.37 ^f
Semilla cosechada	6.12 ^{ab}	6.28 ^d

NOTA: Letras iguales representa igualdad estadística



En la tabla 13 (anterior), correspondiente para los glucósidos cianogénicos se aprecia que no existe diferencia significativa para la variedad pinto violento en las fases: semilla, germinado, plántula, raíz, semilla cosechada; germinado, hoja, tallo, raíz, semilla cosechada; hoja, tallo y flor. En cuanto a la fase blanco tardío tenemos que no hay diferencia en: semilla, plántula, raíz; semilla, plántula; semilla, germinado; tallo, flor, semilla cosechada.

Tabla 14. Análisis de Tukey-Kramer para Inhibidores de tripsina.

Fase	Pinto	Blanco
Semilla	118.46 ^d	95.93 ^{cd}
Germinado	80.58 ^b	84.01 ^c
Plántula	4.35 ^a	7.04 ^a
Hoja	Nd ^a	Nd ^a
Tallo	Nd ^a	Nd ^a
Raíz	Nd ^a	Nd ^a
Flor	Nd ^a	Nd ^a
Ejote	2.62 ^a	30.37 ^b
Semilla cosechada	104.05 ^c	0.897 ^d

NOTA: Letras iguales representa igualdad estadística



Las fases que no presentan diferencia significativa en la determinación de los inhibidores de tripsina para la variedad pinto violento son: plántula, hoja, tallo, raíz y ejote. Para la variedad blanco tardío son: plántula, hoja, tallo, raíz y flor; semilla germinado; semilla y semilla cosechada. En la discusión de este componente es mas relevante destacar el alto nivel de Glucósidos cianogénicos en la fase ejote, diferente estadísticamente de las otras fases de desarrollo.

Tabla 15. Análisis de Tukey-Kramer para Taninos

Fase	Pinto	Blanco
Semilla	0.836 ^f	0.612 ^e
Germinado	0.576 ^c	0.482 ^b
Plántula	0.806 ^e	0.512 ^c
Hoja	0.879 ^g	1.05 ^g
Tallo	0.559 ^c	0.508 ^c
Raíz	0.531 ^b	0.564 ^d
Flor	0.358 ^a	0.366 ^a
Ejote	0.620 ^d	0.75 ^f
Semilla cosechada	0.857 ^{fg}	0.93 ^d

NOTA: Letras iguales representa igualdad estadística



No existe diferencia significativa en el nivel de taninos para la variedad pinto en las fases: semilla, semilla cosechada; germinado y tallo; hoja y semilla cosechada.

Para la variedad blanco no se encontro diferencia en las fases: plántula y tallo; raíz y semilla cosechada. Lo anterior se observa en la tabla 15.

Después de determinar cuales variedades no presentan diferencia estadística se realizo la prueba t de student para verificar si existe diferencia significativa entre variedades para cada determinación. Los resultados de esta determinación se muestran en las tablas siguientes.

Tabla 16. Resultados prueba t para Proteína

Fase	Resultado de la prueba
Semilla	NSED
Germinado	SED
Plántula	SED
Hoja	NSED
Tallo	SED
Raíz	SED
Flor	NSED
Ejote	SED
Semilla cosechada	NSED

NOTA. NSED = no se encontró evidencia suficiente para afirmar que existe diferencia significativa con los datos que se tienen disponibles.

SED = se encontró evidencia de que existe diferencia significativa con los datos que se tienen disponibles



- No hay diferencia significativa en el nivel de proteína entre ambas variedades en las fases: semilla, hoja, flor y semilla cosechada.

Tabla 17. Resultados prueba t para Glucósidos cianogénicos

Variedad Pinto violento	Resultado de la prueba
Semilla	NSED
Germinado	SED
Plántula	SED
Hoja	SED
Tallo	NSED
Raíz	SED
Flor	SED
Ejote	SED
Semilla cosechada	NSED

NOTA. NSED = no se encontró evidencia suficiente para afirmar que existe diferencia significativa con los datos que se tienen disponibles.

SED = se encontró evidencia de que existe diferencia significativa con los datos que se tienen disponibles

- No hay diferencia significativa en el nivel de glucósidos cianogénicos entre ambas variedades en las fases: semilla, tallo y semilla cosechada.



Tabla 18. Resultados prueba t para Inhibidores de tripsina

Variedad Pinto violento	Resultado de la prueba
Semilla	SED
Germinado	NSED
Plántula	SED
Hoja	NSED
Tallo	NSED
Raíz	NSED
Flor	NSED
Ejote	SED
Semilla cosechada	NSED

NOTA. NSED = no se encontró evidencia suficiente para afirmar que existe diferencia significativa con los datos que se tienen disponibles.

SED = se encontro evidencia de que existe diferencia significativa con los datos que se tienen disponibles

➤ No hay diferencia significativa en el nivel de inhibidores de tripsina entre ambas variedades en las fases: germinado, hoja, tallo, raíz, flor y semilla cosechada.

En la fase semilla se encontró diferencia significativa, sin embargo en la fase semilla cosechada el resultado fue diferente. El resultado numérico de esta determinación para la fase semilla fue 118.46 para pinto y 95.93 para blanco, mientras que para variedad blanco fue de 104.05 y 108.40 respectivamente. Con lo anterior podemos entender el hecho de tener diferentes resultados en la prueba t en las fases semilla y semilla cosechada, los



cuales se esperaba fueran iguales. A grandes rasgos, los inhibidores de tripsina fueron altos en estas fases. Un valor de 95.93 contra uno de 118.46 es similar para efectos prácticos, no importando que en la prueba estadística sean diferentes. La tendencia fue la esperada.

Tabla 19. Resultados prueba t para Taninos

Variedad Pinto violento	Resultado de la prueba
Semilla	SED
Germinado	SED
Plántula	SED
Hoja	SED
Tallo	NSED
Raíz	NSED
Flor	NSED
Ejote	SED
Semilla cosechada	SED

NOTA. NSED = no se encontró evidencia suficiente para afirmar que existe diferencia significativa con los datos que se tienen disponibles.

SED = se encontro evidencia de que existe diferencia significativa con los datos que se tienen disponibles

➤ No hay diferencia significativa en el nivel de taninos entre ambas variedades en las fases: tallo, raíz y flor



CONCLUSIONES

- Se determinó el ciclo biológico para el desarrollo del frijol comba donde se obtuvo la duración en días de cada fase de crecimiento con un total de 313 y 342 días para el frijol pinto y blanco respectivamente. Así mismo se determinaron los rangos de humedad entre los que fluctúa durante dicho periodo.
- Fue posible estimar la proporción de cada estructura (hoja, tallo, raíz, flor y ejote) que se forma durante el desarrollo de la planta.
- El nivel de proteína para ambas variedades aumenta en el germinado, se tiene un máximo valor en la fase plántula y los valores en la fase semilla cosechada son similares a los de la semilla inicial no obstante que se modificaron las condiciones climatológicas.
- El nivel de los inhibidores de tripsina disminuye en la germinación, presentando el mínimo en la plántula con un decremento de 96% para el pinto y 92.66% para el blanco, muy similar al comportamiento del frijol común (*P. vulgaris*)
- El nivel de las lectinas disminuye en ambas variedades. En la fase semilla cosechada el nivel de lectinas aumenta nuevamente hasta valores cercanos a los de la semilla inicial como era de esperarse.
- El nivel de los glucósidos cianogénicos aumenta en la germinación y tiene un aumento considerable en la fase ejote. De la misma manera el nivel de taninos aumenta a partir de la germinación, lo que en ambos puede indicar que es por medio de este fenómeno que el frijol comba logra concluir con éxito su ciclo biológico en lugares donde el frijol común no lo ha conseguido.



- En la fase ejote el contenido de glucósidos cianogénicos de ambas variedades rebasa el límite considerado como seguro, representando un riesgo para la salud si es consumido. Los otros factores se encuentran dentro de los límites permisibles.
- No hay diferencia significativa en el nivel de proteína entre ambas variedades en las fases: semilla, germinado, hoja, flor y semilla cosechada.
- No hay diferencia significativa en el nivel de inhibidores de tripsina entre ambas variedades en las fases: germinado, hoja, tallo, raíz, flor y semilla cosechada.
- No hay diferencia significativa en el nivel de glucósidos cianogénicos entre ambas variedades en las fases: semilla, tallo y semilla cosechada.
- No hay diferencia significativa en el nivel de taninos entre ambas variedades en las fases: tallo, raíz y flor.
- Después de realizar todas las determinaciones se observa que el ejote es la única fracción de la planta que no es segura para el consumo humano ya que rebasa el límite de glucósidos cianogénicos considerado como relativamente inócuo.
- El frijol comba presenta un aumento del nivel de los factores tóxicos en fases preliminares a la formación del grano maduro y seco, lo que encierta forma le permite concluir su ciclo biológico.



RECOMENDACIONES:

Debido a la resistencia que presenta este frijol a los depredadores naturales y su alto valor nutritivo constituye una valiosa opción para mejorar la alimentación de personas de escasos recursos, por lo que es necesario fomentar su cultivo en otras regiones con condiciones de suelo y clima similares. Actualmente este frijol se consume exclusivamente en las regiones donde se produce; por lo tanto se requiere realizar una campaña para promoverlo en las zonas de mayor concentración de población.

Para lograr un mayor impacto en el consumo del frijol, se recomienda fomentar la producción y el consumo del mismo comba, aprovechando las ventajas de la coordinación de esfuerzos con las que cuenta el Programa de Microrregiones de SEDESOL (34); En virtud de que San Miguel Totolapan lugar de producción natural del frijol comba, esta integrado al Programa de Microrregiones en el estado de Guerrero se podría, con la participación de autoridades federales, estatales, municipales y con la participación de la sociedad civil, establecer un proyecto para difundir las ventajas que representa su producción entre los agricultores de la región y de otras con características naturales similares. Así, será posible abrir nuevos mercados en otras regiones de cultivo.

La organización que ha generado el Programa de Microrregiones en donde participan SEDESOL, SAGARPA, SEMARNAT, SEP y SSA, favorecerá el incremento de la producción del frijol comba, si la población que habita en la zona de influencia del centro estratégico comunitario conoce las características nutrimentales de este frijol y lo consume en mayor cantidad. Al poseer un alto contenido de proteína es posible dirigirlo a un nicho de mercado donde se aprecie su contenido nutrimental logrando así mayor demanda que genere mayor beneficio para los productores y por lo tanto estos acepten producirlo. En este aspecto, la participación del personal de salud y educación de la región será de suma importancia.

Para cumplir con las finalidades de los centros estratégicos comunitarios (CEC), mismos que se proponen lograr el desarrollo local con la participación de las instancias municipales



y federales podría promoverse que para mejorar la nutrición de los niños mexicanos del medio rural, que según los datos de las encuestas oficiales tienen índices elevados de desnutrición, lo que genera problemas en su crecimiento y desarrollo cognoscitivo; se sugiere también promover acciones que diversifiquen el acceso a alimentos con alto contenido proteínico fomentando el consumo del frijol comba. Esto requiere de un estudio de aplicación tecnológica para diversificar el consumo de este frijol no solo como grano cocido y seco sino por ejemplo como un alimento suplementado con cereales.

El problema de la desnutrición en el medio rural requiere tanto de acciones de investigación para detectar los alimentos inocuos, seguros, resistentes y con alto valor nutricional y la organización del gobierno y de la sociedad civil con el fin de unir esfuerzos para combatir este problema tan importante en México.



BIBLIOGRAFÍA

- 1) Enciclopedia Hispánica Ilustrada. Volumen 6. 1994. Páginas 374-375.
- 2) Kay D. Legumbres alimenticias. Editorial Acribia, Zaragoza 1991. Páginas 233-234, 243
- 3) FAO. Utilización de alimentos tropicales: frijoles tropicales. FAO; 1990. #54. Roma
- 4) Granados D. y López G. Agroecología. U. A. Chapingo, Texcoco; 1996, Páginas 37-166
- 5) Villela O., Gerez P. Biodiversidad y conservación en México. 2ª edición, Editorial Técnico científica, México; 1994. Páginas 7-34, 269-276.
- 6) Sotelo A. Leguminosas silvestres, reserva de proteína para la alimentación del futuro. Rev. IC y T(México) 1981. 29-32.
- 7) Ballesteros-Patrón, G. Evolución del frijol de lima. Montecillo, Estado de México: Colegio de Postgraduados de la Universidad de Chapingo Texcoco; 1990. Páginas 39-40
- 8) Hernández B., León J. Cultivos marginados (Otra perspectiva de 1492). FAO; 1992, Pág. 54-55.
- 10) Derache, R. Toxicología y seguridad de los alimentos. Ed Omega, Zaragoza; 1990. Páginas 109-130.



- 11) Lindner, E. Toxicología de los alimentos. Ed. Acribia, Zaragoza España. 1990. Páginas 1-10, 14-19, 82-84.
- 12) Muller, H. Y Tobin, G. Nutrición y ciencia de los alimentos. Ed. Acribia, Zaragoza; 1990. Páginas 119-125, 137-145.
- 13) Liener, I. Toxic constituents of plant foodstuffs. 2nd Ed. Academic, Press, New York; 1980. Páginas 7-56, 73-98, 143-157, 452-455.
- 14) Khokhar, S. and Chauhan, B. Antinutritional factors in moth bean (*Vigna aconitifolia*): varietal differences and effects of methods of domestic processing and cooking. J. Food. 1986Sci. 51 (3): Páginas 591-594.
- 15) Tan-Wilson, A. and Righmire, B. Different rates of metabolism of soybean proteinase inhibitors during germination. Plan Physiol. 1982. 70: Páginas 493-497.
- 16) Chen, L. and Wells, C. Germinated seeds for human consumption. 1975. J. Food Sci. 40: Páginas 1290-1294.
- 17) Shibamoto, T. y Bieldanes, L. Introducción a la toxicología de los alimentos. Ed. Acribia, Zaragoza. 1996 Pag. 66-70, 73-77.
- 18) Chen, L. and Tracker, R. Effect of germination on hemagglutinating activity of pea and bean seeds. 1977. J. Food Sci. 42: Páginas 1666-1668.
- 19) Bau, H. and Villaume, C. Effect of germination on chemical composition, biochemical constituents and antinutritional factors of Soya bean (*Glicine max*) seeds. 1997 J. Sci Food. Agric73:1-9.



- 20) Armour, J. and Chanaka, R. Protease inhibitors and lectins in soya beans and effects of aqueous heat-treatment. 1998. J. Sci. Food Agric. 78: 225-231.
- 21) Savelkoul, F. and Tamminga, S. The presence and inactivation of trypsin inhibitors, tannins, lectins and amylase inhibitors in legume seeds during germination. Plant Foods. 1992. Hum. Nutr. 42: 71-85.
- 22) Smartt, J. Grain legumes, evolution and genetic resources. Cambridge University Press. Cambridge. 1990. Pag. 19, 105-127.
- 23) Khokhar, S. and Chauhan, B. Antinutritional factors in Moth bean (*Vigna aconitifolia*): varietal differences and effects of methods of domestic processing and cooking. 1986. J. Food Sci. 51 (3): 591-594.
- 24) Price, M. and Hagerman, A. Tannin content of cowpeas, chickpeas, pigeon pears and mung beans. 1980. J. Agric. Food Chem. 28: 459-461.
- 25) Mulimani, V. and Vadiraj, S. Effects of the heat treatment and germination on trypsin and chymotrypsin inhibitors activities in sorghum (*Sorghum bicolor*) seeds. 1993. Plant Foods Hum. Nutr. 44: 221-226.
- 26) Métodos Oficiales de Análisis de la AOAC Internacional. 16ª Edición, Volumen II, 1997. Sección 45.4.07, Método 985.29.
- 27) Métodos Oficiales de Análisis de la AOAC Internacional. 16ª Edición, Volumen I, 1997 Sección 12.1.07, Método 960.52.

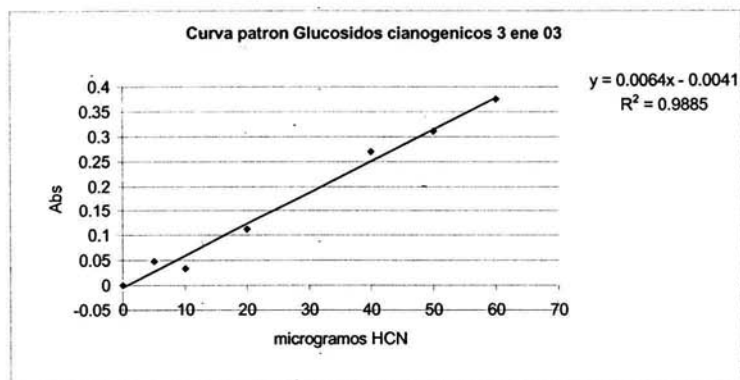
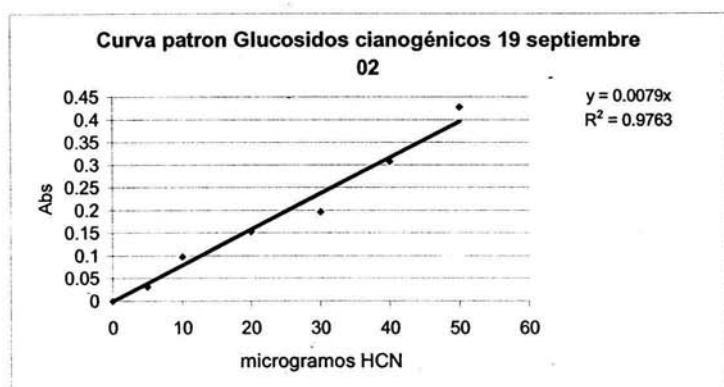


- 28) Kakade, M.L., Rackis, J.J., Mcghee, J.E.; Puski, J. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products, 1974. *Cereal Chem.* 51: 376-382.
- 29) Jaffé, G., Brucher, O. Toxicidad y especificidad de diferentes fitohemaglutininas de frijoles. 1972. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 22: 267-281.
- 30) Lucas B. And Sotelo A. A simplified test for the quantification of cyanogenic glucosides in wild and cultivated seeds. 1984. *Nutr. Rep. Int.* 29: 711-719.
- 31) Berenson M., Levine D. Estadística para administración. Editorial Prentice may. 2001 Segunda edición.
- 32) Haytowitz, D and Matthews, R. Composition of foods: legumes and leguma products. 1986. *Agriculture Handbook N° 8*, USDA. Washington, D.C.
- 33) Valle P., Lucas B. Toxicología de los alimentos. Instituto Nacional de Salud Pública, Centro Nacional de Salud Ambiental. 2000
- 34) www.microrregiones.gob.mx/gro/mapa_gro.htm



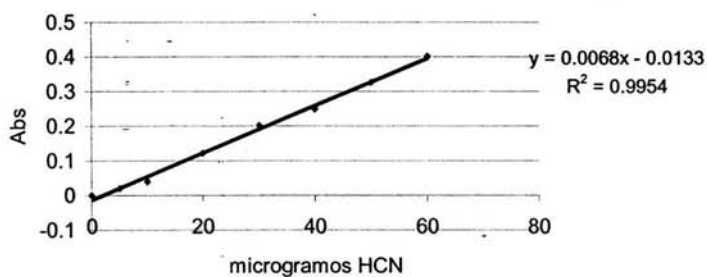
ANEXO

A continuación se muestran las curvas patrón utilizadas en las determinaciones de los factores tóxicos

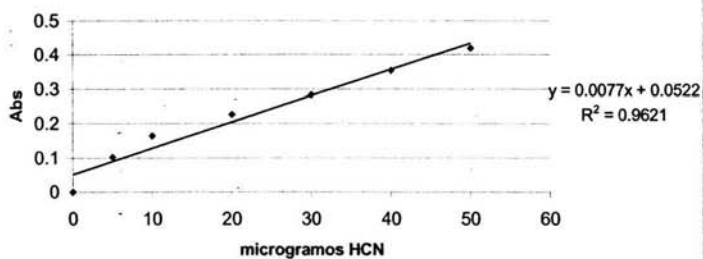




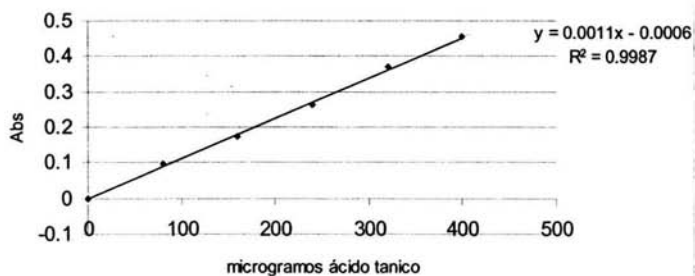
Curva patrón Glucosidos cianogenicos 10 marzo 03



Curva patrón Glucosidos cianogenicos 14 julio 03

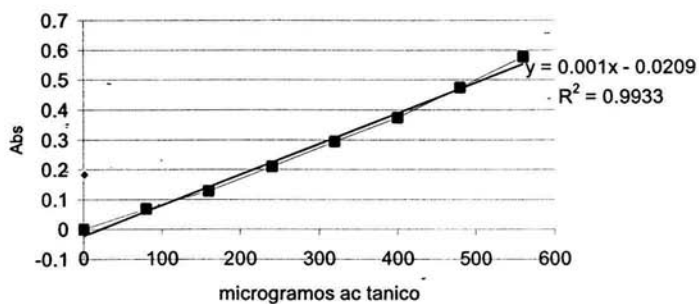


Curva patrón Taninos 27 nov 02

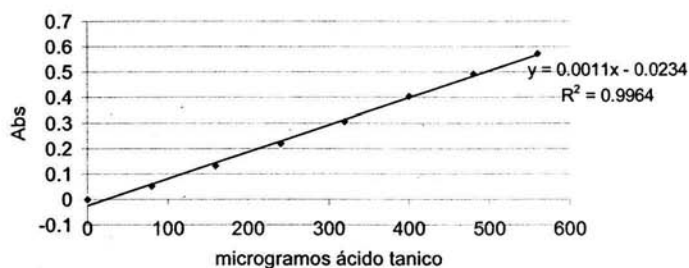




Curva patrón Taninos 4 Dic 02



Curva patrón Taninos 7 Ene 03



Curva patrón Taninos 22 Abr 03

