



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“PROCESAMIENTO TÉRMICO ÓPTIMO SOBRE LA CALIDAD
NUTRITIVA DE UNA VARIEDAD DE FRIJOL COMÚN
(*Phaseolus vulgaris*)”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO EN ALIMENTOS

P R E S E N T A :

RUBÉN ÁNGEL ALBOR AVENDAÑO



MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Bernardo Lucas Florentino

VOCAL: Profesora: Luz Sandra Sánchez Del Ángel

SECRETARIO: Profesora: Inés Miranda Martínez

1er SUPLENTE: Profesora: Karla Mercedes Díaz Gutiérrez

2do SUPLENTE: Profesora: Leticia Gil Vieyra

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio 111, Departamento de Farmacia, Conjunto E Facultad de Química.

ASESOR DEL TEMA: M en C Bernardo Lucas Florentino _____

SUPERVISOR TÉCNICO: Q.F.B. Leticia Gil Vieyra _____

SUSTENTANTE: Rubén Ángel Albor Avendaño _____

Dedicada a Rosalía Margarita Avendaño Salazar quien en todo momento me ha brindado su apoyo, comprensión y cariño. Quien con su ejemplo me alienta todos los días para ser una mejor persona.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Profesores y la Sección 024 del AAPAUNAM por haber sido ganador de la Cátedra Fernando Orozco Díaz (2008-1) en el año 2007. Quienes gracias a su apoyo fue posible la realización e impresión de ésta tesis.

A mi papá Rubén por su guía, paciencia y cariño a lo largo de toda mi vida. Esperando llegar a ser el hombre recto y responsable que espera.

Al M en C Bernardo Lucas Florentino, por su esfuerzo y dedicación en la elaboración de esta tesis, pero sobre todo por el entusiasmo y compromiso en todo lo que realiza para él mi admiración y respeto.

En especial a la Profesora Leticia Gil por brindarme su apoyo incondicional, pero sobre todo por brindarme su tiempo y amistad.

A Verónica por ser mi compañera y alegría a lo largo de este tiempo en mi vida, esperando seguir juntos por muchísimo tiempo más.

A mis hermanas en especial a Margarita por su respaldo y consejo.

A mis compañeros por brindarme su apoyo en los momentos más difíciles, por estar ahí siempre. Gracias: Adriana, Fabiola, Isabel, Jessica, Margarita, Mónica, Paulina, Javier, José Luis, Luís Alvarado, Luís, Naholi, Ulises.

A las Profesoras: Inés Mercedes Díaz Gutiérrez y Luz Sandra Sánchez del Ángel por su valiosa colaboración y por el tiempo que dedicaron en la revisión de ésta tesis

Al Laboratorio 111, a la Profesora Rosita por su alegría ante la vida, a los compañeros y en especial a Enrique, por su apoyo y dedicación.

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVO GENERAL	7
OBJETIVOS PARTICULARES	7
1. ANTECEDENTES	8
1.1 FUENTES DE PROTEÍNAS	8
1.2. LEGUMINOSAS	8
1.3 EL FRÍJOL	10
1.3.1 GENERALIDADES	10
1.3.2 APORTE NUTRICIONAL	13
1.3.3 FACTORES TOXICOS	15
1.4 HEMAGLUTININAS (LECTINAS)	16
1.4.1 DEFINICIÓN, DISTRIBUCIÓN Y ESTRUCTURA	16
1.4.2 FUNCIÓN	19
1.4.3 EFECTO TOXICO	21
1.4.4 INACTIVACIÓN	24
1.4.5 APLICACIÓN	25
1.4.6 DETERMINACIÓN	26
1.5 METIONINA	27
2. MATERIALES Y MÉTODOS	28
2.1 ADIESTRAMIENTO EN EL MÉTODO CUANTITATIVO PARA DETERMINAR LECTINAS	29

2.2	OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	29
2.3	ORIGEN	30
2.3.1	PREPARACIÓN DEL MATERIAL	33
2.4	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA CRUDA EN LAS MUESTRAS	33
2.5	DETERMINACIÓN SEMI-CUANTITATIVA DE LECTINAS	35
2.6	DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE HEMAGLUTININAS	39
2.7	CUANTIFICACIÓN DE METIONINA	44
2.8	PROCESAMIENTO CON CALOR HÚMEDO	46
2.9	DETERMINACIÓN DEL PUNTO ÓPTIMO DE PROCESAMIENTO TÉRMICO	48
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
3.1	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA EN LAS MUESTRAS	49
3.2	DETERMINACIÓN SEMICUANTITATIVA DE LECTINAS	51
3.3	DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LECTINAS	54
3.4	SELECCIÓN DE LA MUESTRA	57
3.5	SEGUIMIENTO DEL PROCESAMIENTO TÉRMICO	58
3.6	SELECCIÓN DEL PROCESAMIENTO TÉRMICO ÓPTIMO	62
4	CONCLUSIONES	63
	RECOMENDACIONES	64
	BIBLIOGRAFÍA	65
	ANEXOS	70

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS, DIAGRAMAS

	Título	Página
FIGURA 1	Representación esquemática de la estructura tetraédrica de las cinco isolectinas en <i>Phaseolus vulgaris</i>	18
FIGURA 2	Diagrama general de trabajo	28
FIGURA 3	Campos de cultivo del Colegio de Post-graduados	30
FIGURA 4	Fotografías de las muestras con las que se trabajo	31
FIGURA 5	Fotografías de placas y solución de eritrocitos	39
FIGURA 6	Polígono de frecuencia del contenido de proteínas en las 50 variedades	50
FIGURA 7	Polígono de frecuencia con la tendencia del contenido de lectinas en las 50 variedades	53
FIGURA 8	Presentación de barras del contenido de lectinas en las veinte muestras seleccionadas	56
FIGURA 9	Presentación simultánea del descenso del nivel de lectinas y contenido de metionina bajo los diferentes procesamientos térmicos del grano de frijol seleccionado	60

TABLA 1	Proteínas de almacenamiento, lípidos y carbohidratos en distintas semillas y tubérculos.	10
TABLA 2	Propiedades y azúcar específico de algunas lectinas.	19
TABLA 3	Requerimientos de metionina	27
TABLA 4	Variedades de frijol evaluadas	32
TABLA 5	Contenido de proteína en las 50 variedades	49
TABLA 6	Valor semi-cuantitativo del nivel de lectinas.	52
TABLA 7	Contenido de lectinas y rendimiento de las veinte variedades seleccionadas	55
TABLA 8	Contenido de lectinas en frijol CP MEX 05A-28 crudo y procesado	58
TABLA 9	Determinación de metionina en frijol CP MEX 05A-28 crudo y procesado	59
TABLA 10	Resultados del ANDEVA	61
TABLA 11	Resultados de la prueba de rango múltiple de Duncan.	62

INTRODUCCIÓN

Entre las leguminosas, el frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es la especie más cultivada y conocida del género *Phaseolus*.

El frijol es fuente de proteínas y de hidratos de carbono complejos, es también una fuente razonablemente buena de algunas vitaminas (tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B₆, ácido fólico) y ciertos nutrientes inorgánicos (calcio, hierro, cobre, cinc, fósforo, potasio, magnesio); además es una excelente fuente de ácidos grasos poliinsaturados.(1)

No obstante a todo lo antes mencionado; siendo el frijol una leguminosa, este recurso alimenticio no se escapa de la regla de contener factores tóxicos y antinutricionales en sus semillas, como son inhibidores de proteasas, saponinas, latirógenos y hemaglutininas. (2)

Las hemaglutininas son un grupo importante de proteínas y glucoproteínas que tienen la propiedad de ligar ciertos carbohidratos. Cuando estos carbohidratos forman parte de las paredes celulares las lectinas causan la aglutinación de las células que los contienen (3). Además actúan reduciendo la capacidad de absorción intestinal, ya que pueden destruir el epitelio del tracto gastrointestinal, interfiriendo con la mitosis y causando hemorragias locales, produciendo retraso en el crecimiento e incluso la muerte de algunos animales de experimentación. (4,5)

Al ser de naturaleza proteica, el hombre por conocimiento adquirido de manera empírica las ha inactivado al someterlas a diversos tratamientos térmicos, sin embargo, si el calentamiento es exagerado se puede dañar la calidad nutritiva de la proteína en especial algunos aminoácidos esenciales.

En el presente estudio se trabajó con 50 variedades de frijol común¹ (*Phaseolus vulgaris*) a las cuales se les determinó la proteína cruda por el método del Kjeldahl (6), además se le realizó a cada variedad la determinación de lectinas por medio del método semicuantitativo que aprovecha la capacidad hemaglutinante de este tipo de enterotoxinas y que hace uso de un sistema de microtitulación seriada (7).

¹ Aportadas por el Dr Porfirio Ramírez Vallejo y el Mtro en C Mario Rocandio Rodríguez del Colegio de Postgraduados campus "Montecillo" Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México.

Con estos datos se seleccionaron 20 variedades para realizar la determinación cuantitativa de lectinas y de este último grupo se seleccionó la muestra cuyo valor de enterotoxina fue el más alto y paralelamente presentara un buen rendimiento (g de frijol/planta)¹.

Posteriormente por medio de distintos tratamientos térmicos se inactivaron las lectinas de manera gradual, lo que se pudo observar mediante el seguimiento de cada tratamiento térmico con la medición de lectinas y a la vez se determinó el contenido de metionina **(8)** (ya que es el aminoácido esencial limitante en las leguminosas). Con el anterior seguimiento se pudo seleccionar el punto de procesamiento térmico óptimo, el cual mantenga la calidad nutritiva de la muestra reduciendo al mínimo el principal factor tóxico que son las lectinas.

¹ Rendimientos aportados por el Colegio de Postgraduados campus “Montecillo” de la Universidad Autónoma Chapingo.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar el procesamiento térmico óptimo sobre la calidad nutritiva de la fracción proteínica en una variedad de frijol común criollo (*Phaseolus vulgaris*).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener el mayor numero de muestras representativas de distintas variedades de frijol criollo (*Phaseolus vulgaris*).
- Determinar el contenido de proteína cruda en las cincuenta variedades de frijol criollo.
- Determinar a estas muestras, de manera semi-cuantitativa y cuantitativa su contenido de hemaglutininas.
- Determinar el contenido de metionina biodisponible sobre una variedad de frijol seleccionada.
- Realizar un procesamiento térmico a la muestra seleccionada a diferentes tiempos y temperaturas
- Cuantificar las lectinas y la metionina biodisponible a la muestras sometida a tratamiento térmico, con el fin de obtener el punto de procesamiento térmico óptimo

1. ANTECEDENTES

1.1 Fuentes de proteínas

Las proporciones relativas de proteínas alimentarias de origen animal y vegetal que existen en la dieta difieren de acuerdo con la región geográfica y otros factores socioeconómicos y geográfico. En sentido amplio, los alimentos de origen animal proteínicos suponen hasta el 60-70% de la ingesta total de proteínas en las regiones desarrolladas. Por el contrario, las proteínas de origen vegetal constituyen el 60-80% de la ingesta total de proteínas en las regiones en vías de desarrollo. En vista de las diferencias existentes en el consumo aminoacídico de las proteínas alimentarias citadas, no es de sorprender que haya diferencias en las ingesta de aminoácidos indispensables en los diferentes grupos de población en todo el mundo **(9)**

Sin embargo si se consumen juntos cereales y leguminosas en la misma comida, 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, que tiene mucha lisina; los mexicanos comen frijoles altos en lisina con maíz alto en metionina. Entonces 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 **(10)**

1.2. Leguminosas

Los cereales y las leguminosas han sido a través de la historia componentes principales en la dieta de una buena parte de la población mundial, ya que como mencionamos anteriormente se complementan en cuanto a calidad proteínica. En el caso de las leguminosas éstas tienen un elevado contenido de proteínas, siendo como media, del doble de la contenida en los cereales y su contenido en aceite puede llegar a ser superior al 30% **(11)**.

Las leguminosas, constituyen un extraordinario grupo de plantas con flor. Son de distribución universal y en cada zona o región existe un representante de dicha grupo. En cuanto a su composición, existen básicamente dos grupos de leguminosas. En primer lugar un grupo rico en proteína y aceite, en el que figuran el cacahuate, la soya y otras. Estas leguminosas se utilizan en su mayoría procesadas. El contenido de proteína se eleva al 35% y el contenido de aceite varía entre un 15 y 45%. El segundo grupo comprende tipos de leguminosas con un contenido medio de proteína y bajo de aceite. Las leguminosas representativas de este grupo son muy importantes como alimento humano. Entre ellas están el capuí, grama, guisante, lenteja y el grupo de los frijoles el cual comprende la judía común, el frijón y la habichuela, su contenido de proteína es del 17-30% aproximadamente y poseen el 1% o menos de aceite **(12)**.

Al igual que los cereales las leguminosas tienden a dar un elevado rendimiento, a costa de un bajo o mediano contenido de proteína y viceversa. Se ha sugerido que el bajo contenido de metionina y cistina está además relacionado con el elevado contenido de proteína, que al parecer son las de reserva (cuando las proteínas suelen acumularse en proporciones importantes suelen denominarse proteínas de almacenamiento **(11)**), y no las estructurales.

Un aspecto adicional de las leguminosas lo constituye el hecho de que albergan bacterias simbióticas que fijan el nitrógeno del aire. Las raíces poseen nódulos típicos, visibles a simple vista, que contienen *Rhizobium leguminosarium* **(2)**.

En la **Tabla 1** se muestra el contenido de proteína lípidos y carbohidratos en distintas semillas, donde se puede observar a los representantes de los dos grupos anteriormente mencionados, el cacahuate y la soya por un lado y la alubia y las lentejas por el otro.

Tabla 1 Proteínas, lípidos y carbohidratos en semillas y tubérculos

Grupo	Ejemplo	Proteína %	Carbohidratos %	Lípidos %
Alto contenido en carbohidratos	Trigo	12.0	80.0	2.0
	Maíz	12.0	79.0	6.5
	Arroz	9.0	82.0	2.0
	Patata	9.0	82.0	0.4
	Ñame	9.0	82.0	1.0
	Mandioca	4.0	85.0	1.0
Alto contenido en proteínas	Habas	26.0	57.0	1.5
	Alubias	21.0	58.0	1.5
	Lentejas	26.0	54.0	1.0
	Guisantes	25.0	70.0	2.0
	Garbanzos	21.0	71.0	5.0
Alto contenido en proteínas y lípidos	Cacahuete	28.0	15.0	50.0
	Colza	30.0	20.0	40.0
	Soya	35.0	25.0	21.0
	Girasol	35.0	5.0	45.0
	Algodón	50.0	12.0	30.0

Nota: Los valores se expresan como porcentaje sobre extracto seco y pueden variar en los distintos cultivares

Fuente (11)

1.3 El Fríjol

1.3.1 Generalidades

El género *Phaseolus* pertenece a la familia *Leguminosae*, sub-familia *Papilionoideae*, tribu *Phaseoleae* y subtribu *Phaseolinae*. El número de especies que pertenecen al género *Phaseolus* es desconocido. En México el número de especies fluctúa alrededor de 50 y entre ellas figuran las cuatro especies que se ha domesticado el hombre, como son *Phaseolus vulgaris*, *P. coccineus*, *P. lunatus* y *P. acutifolius*. *P. vulgaris*, es una planta herbácea que de forma silvestre se comporta principalmente como plantas anuales y duran alrededor de seis meses entre la germinación y la madurez; sin embargo, las variedades cultivadas muestran ciclos vegetativos que varían entre tres y nueve meses. Esta leguminosa muestra una gran variación en

costumbres, caracteres vegetativos, color de las flores y en el tamaño, forma y color de las vainas y semillas. Hay tipos trepadores o erguidos y también arbustos enanos. Las hojillas son ovaladas, enteras, acuminadas, las flores nacen sobre racimos auxiliares, de pocas flores, la **alubia** normalmente se autofertiliza, teniendo lugar la polinización en el momento de la apertura de la flor. Las vainas de las semillas son finas, largas o ligeramente curvadas. El color puede variar desde amarillo hasta verde oscuro, teniendo a veces, manchas rosa o púrpura. El número de semillas puede oscilar entre 1 y 12, mostrando variación importante en su color, tamaño y medida **(12)**.

El frijol es nativo de América, probablemente del Centro de México y Guatemala; en México, y más específicamente en el Valle de Tehuacan, estado de Puebla, se han encontrado evidencias de su existencia desde hace por lo menos 5000 años. Las formas silvestres de ***Phaseolus vulgaris*** se han localizado en las partes occidental y sur de México, en Guatemala y en Honduras, a lo largo de una franja de transición ecológica localizada entre unos 500 y 1,800 metros sobre el nivel del mar (msnm). También se han encontrado en la parte oriental de la Cordillera Andina, en América del sur **(12)**. Estos hechos indican que ***P. vulgaris*** se originó muy probablemente en la parte occidental del área México-Guatemala, a una altura aproximada de 1,200 msnm **(1)**.

En el México precolombino su consumo era parte fundamental de la dieta, ejemplo de ello se puede ver en algunos códices y en general en las reseñas de la Nueva España, los cuales hacen referencias a los tributos otorgados a los aztecas, tributos que arrojan la cantidad calculada de 5,280 toneladas de grano de frijol al año. Los frijoles se comían como ejotes, en tamales con maíz y que en las casas de los señores se guardaban en trojones mucha cantidad de frijoles. La Conquista española resulto en la introducción de nuevos cultivos, ganado domesticado, implementos agrícolas, sistemas de producción y cambios en los valores sociales sobre la alimentación. Los españoles preferían trigo en lugar de maíz; haba, garbanzo y arvejón en lugar de frijol; ajonjolí y coco en lugar de calabaza para aceite **(12)**.

Para el crecimiento óptimo se requieren temperaturas medias entre 16-24°C creciendo mejor en los trópicos y subtrópicos bajo condiciones de temperaturas decrecientes. El crecimiento se detiene con temperaturas inferiores a los 10°C, muriendo la planta con heladas. Solo puede crecer en zonas en las que el periodo de heladas va de 105-120 días. Una temperatura de 30°C parece marcar el límite superior para un cultivo satisfactorio. Requiere además crecer como cosecha de lluvia en zonas con un promedio de lluvias que oscila entre los 500 y 1500mm **(12,13)**.

Actualmente el frijol constituye un alimento importante de la dieta de la población mexicana como fuente de proteína, minerales y vitaminas. Gracias a su amplia adaptación el frijol se puede producir en todas las regiones agrícolas del país en diversos sistemas de producción y épocas del año. Tan solo en el año 2006 el cultivo se encontró en el 2do lugar de superficie sembrada con un total de 1, 809,679.78 Ha, lo que coloca a nuestro país como el quinto productor mundial detrás de Brasil, India, China y Myanmar. Se estima que en el cultivo del frijol participa alrededor de medio millón de productores quienes, en promedio de la última década, han cosechado 1.2 millones de toneladas en un superficie de 2.2 millones de hectáreas **(14,15)**.

En diversas regiones agrícolas de México existen distintas preferencias de consumo por varios tipo de frijol, basados principalmente en costumbres y usos tradicionales, a la vez, en las áreas de mayor producción el producto se orienta a las demandas de los grandes centros urbanos de población. Debido a la presión de las grandes masas urbanas, la cantidad de variedades que domina el mercado nacional es reducida. Esto ha provocado la siembra de grandes extensiones con un reducido número de variedades en los principales estado productores del país, con el subsecuente riesgo de perdida de producción por patógenos que atacan al cultivo o factores climáticos impredecibles. Sin embargo aún en ciertas zonas rurales se cultivan múltiples variedades criollas o locales del frijol común (*Phaseolus vulgaris*), con gran diversidad morfológica y genética; El valor de las variedades criollas reside, por una parte, en que desde los inicios del mejoramiento sistemático de las especies en México han sido la base para el desarrollo de las variedades modernas. Por otra parte, es en las

variedades criollas donde se encuentra la información genética relacionada con la adaptación a las diversas condiciones y factores ambientales adversos para una adecuada producción. **(16)**.

1.3.2 Aporte nutricional

Se puede consumir como una verdura fresca con la vaina (ejote), o más frecuentemente, como semilla seca. En este último caso la semilla se tiene en remojo que va de 12 a 24 horas y luego se cuece antes de consumirla. Es una fuente de proteína especialmente importante para los miembros más pobres de la sociedad. El frijol contiene aproximadamente el 20% de proteínas, 1.5% de grasa, 4% de fibra bruta y 4% de cenizas (Existiendo sin embargo, notable variación en la composición bajo diferentes condiciones ambientales). Adicional a esto su contenido de fibras solubles lo hace especialmente interesante en relación con el control de la colesterolemia; además, la fibra insoluble contribuye al desplazamiento de los alimentos a través del sistema digestivo, siendo además fuente de vitaminas y minerales como: tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B6, ácido fólico, calcio, hierro, cobre, cinc, fósforo, potasio, magnesio. **(1)**

Los componentes más importantes de las proteínas son: faseolina(20% del peso seco de la semilla), faselina (2%) y cofaseolina (0.35-0.4%). Los hidratos de carbono que componen al frijol son los siguientes: azúcares 1.6%, dextrinas 3.7%, almidón 35.2%, pentosas 8.4%, galactosa 1.3%, celulosa 3.1%. Además hay un 0.7% de pectinas **(12)**.

El frijol es entonces un alimento que proporciona una muy buena cantidad de nutrimentos entre los que destacan las proteínas, sin embargo hay que tener en cuenta que se necesita un mayor aporte de algunas proteínas que de otras para el mantenimiento del balance de nitrógeno. Esto es así porque las distintas proteínas contienen diferentes cantidades de los diversos aminoácidos. El requerimiento de nuestro organismo no es solo de proteína como de los aminoácidos que forman las proteínas, en las proporciones correctas para reemplazar las proteínas corporales que

están siendo catabolizadas. Los aminoácidos que pueden omitirse en la dieta se denominan aminoácidos no indispensables, o no esenciales. La razón por la que no tienen que suministrarse con la dieta se debe a que pueden sintetizarse fácilmente en el organismo, a partir de una variedad de intermediarios metabólicos usuales, siempre que exista suficiente proteína total en la dieta **(17)**.

Ocho aminoácidos no pueden sintetizarse en el organismo, pero pueden suministrarse preformados en la dieta (Lisina, Metionina, Treonina, Leucina, Isoleucina, Valina, Fenilalanina, Triptófano, Histidina¹ y Arginina¹). A éstos se les denomina aminoácidos esenciales o indispensables. Si alguno de ellos falta o se suministra en cantidad inadecuada entonces, independientemente de la ingesta total de proteínas o aminoácidos, no sería posible mantener el balance de nitrógeno, ya que no existiría una fuente del aminoácido para la síntesis de proteína a reemplazar. El aminoácido limitante de una proteína es el aminoácido esencial que está presente en la cantidad más baja con relación al requerimiento par ese aminoácido. **(17)**

El conocimiento de los requerimientos de cada aminoácido indispensable y de la proteína total proporciona la base para evaluar la calidad relativa de cada alimento.

No todas las proteínas tienen la misma capacidad de satisfacer los requerimientos fisiológicos de nitrógeno total y de aminoácidos indispensables. La calidad proteínica es la expresión utilizada para expresar la eficacia de una proteína como promotora del crecimiento. Está sometida a diversos factores, el principal de los cuales es si la proteína contiene los aminoácidos esenciales en cantidad suficiente para satisfacer las necesidades humanas **(9)**.

La calidad proteínica suele medirse determinando la composición química de una determinada fuente de proteínas. Para llevar a cabo esa valoración se mide el tipo y la cantidad de cada aminoácido esencial presente en la proteína Para el caso de las

¹ Aunque la histidina puede sintetizarse en el organismo, la cantidad que puede ser sintetizada no es la adecuada para satisfacer los requerimientos La capacidad para sintetizar Arginina en los niños es baja y no resulta adecuada para satisfacer los requerimientos del crecimiento.

leguminosas, el aminoácido limitante en las proteínas es la Metionina (De forma más correcta, la suma de metionina y cisteína, puesto que, la cisteína se sintetiza a partir de la metionina y la existencia de cisteína reduce los requerimiento de metionina), lo que hace indispensable complementar la dieta con otras fuentes de proteínas ricas en metionina. Lo anterior fue resuelto de manera empírica por las poblaciones locales al consumir maíz que al ser un cereal presenta un elevado contenido de metionina y un bajo contenido de lisina, aminoácido que el frijol tiene en cantidad suficiente para cubrir las necesidades diarias. Sin embargo el cambio en las costumbres sobre la dieta ha socavado de manera importante esta complementación en las fuentes de proteína **(10)**.

1.3.3 Factores tóxicos y antinutricionales

En conjunto las leguminosas presentan algunos inconvenientes desde el punto de vista nutritivo. Además de su deficiencia de metionina y cistina, su digestibilidad es baja, por lo que las dietas con elevada proporción de leguminosas producen flatulencia. Otro inconveniente significativo es su toxicidad. Las leguminosas pueden contener factores tóxicos del tipo de inhibidores de proteasa, saponinas, ácido fítico y hemaglutininas entre otros.

Inhibidores de proteasa

Las proteasas son enzimas naturales que hidrolizan las proteínas, se clasifican en función de la naturaleza del aminoácido que controla el centro activo, existiendo proteasas serinas (tripsina, quimiotripsina), las sulfodrilproteinasas (papaína, bromelina y ficina), las carboxi-peptidasas (A y B), aminopeptidasas y las carboxi acídicas proteinasas (pepsina y renina) **(2)** .

Los inhibidores de proteasas se encuentran distribuidos en gran parte de las plantas consideradas como hortalizas, en *Phaseolus vulgaris* se hayan localizadas principalmente en las semillas encontrándose del tipo de inhibidores de tripsina,

elastasa y plasmitta. El inhibidor proteásico es inactivado mediante tratamiento térmico adecuado **(4)**.

Saponinas

Son glucósidos de tipo esteroide o de triterpenoide, cada molécula está constituida por un elemento esteroide o el triterpenoide (aglucon) y un elemento soluble en agua (el azúcar), Las saponinas son tóxicas, se cree que su toxicidad proviene de su habilidad para formar complejos con esteroides: Las saponinas podrían interferir en la asimilación de esteroides por el sistema digestivo, o romper las membranas de las células luego de ser absorbidas hacia la corriente sanguínea **(18)**.

Ácido fítico

Es el ácido inositol-hexafosfórico. Su acción fundamental es disminuir la absorción o biodisponibilidad de minerales divalentes, como el calcio, magnesio, hierro, cinc, cobre y molibdenos, por formar sales insolubles. Se encuentra en cereales, leguminosas, oleaginosas, zanahorias, etc. El ácido fítico se inactiva con calor **(4)**.

1.4 Hemaglutininas (Lectinas)

1.4.1 Definición, distribución y estructura

Las lectinas constituyen una interesante clase de proteínas las cuales están ampliamente distribuidas en la naturaleza, incluyendo plantas de consumo común en la dieta del hombre y animales (frijoles, soya, lentejas, guisantes, etc.), estas glicoproteínas tienen la capacidad de unir carbohidratos complejos con una alta especificidad (esta especificidad fue lo que condujo a la acuñación del término "Lectina")

el cuál deriva del latín **legere** (*preferir*) lo que les confiere a las lectinas la propiedad de aglutinar los eritrocitos en la sangre, lo que puede ser observado **in vitro** (*latín*) **(19,20)**.

Las lectinas más conocidas son: la ricina, concanavalina A, la hemaglutinina del frijol de soya, la curcina, la lectina de pera y la favina. La primera de estas sustancias que fue descrita como de una alta toxicidad fue la ricina de la semilla de castor (***Ricinus communis***) y la primera aglutinina obtenida y purificada de una planta fue concanavalin A, a partir de las semillas de ***Canavalina ensiformis*** **(21,22)**.

Las lectinas se han encontrado en diferentes especies y en diferentes órganos y tejidos de plantas como: raíces, tallos y semillas, siendo especialmente abundantes en éstas últimas donde pueden llegar a constituir hasta un 20% de la proteína. En ***Phaseolus vulgaris*** y ***Pisum sativum*** bajas cantidades de lectinas, las cuales son casi idénticas a las de las semillas, se han encontrado a través del ciclo de vida de la planta en todos sus tejidos, siendo de especial interés la raíz por las repercusiones que estas pueden tener en el establecimiento de la relación simbiótica con bacterias del género ***Rhizobium*** **(23,24)**.

Las lectinas son sintetizadas como prolectinas en el retículo endoplasmático para después pasar al aparato de Golgi donde finalmente son liberadas. Durante este viaje sufrirá modificaciones como la mayor parte de las proteínas para posteriormente ocupar su sitio en los tejidos donde la distribución varía dentro de representantes de varias familias de plantas **(25)**.

La estructura primaria de numerosas lectinas de leguminosas han sido bien elucidadas mediante degradación de Edman y mediante el análisis de su secuencia de genes, encontrando que dicha secuencia es muy similar, lo que hace evidente que las lectinas de leguminosas constituyen un grupo de proteínas que muestran propiedades homólogas **(24)**.

El dato que sobresale de sus estructuras es el hecho que contiene 2 o 4 subunidades, cada una de las cuales tiene un sitio de unión de carbohidratos específicos. Esta propiedad de multivalencia es lo que otorga a las lectinas la capacidad de precipitar glicoproteínas y aglutinar a los eritrocitos en la sangre uniéndose a los carbohidratos localizados en la superficie de la membrana de forma no covalente **(19)**.

La lectina del frijol esta compuesta por 4 subunidades las cuales no son idénticas, pues existen isómeros **E** y **L**, (los que se pueden distinguir en base a su afinidad, ya que la subunidad **E** tiene una alta afinidad por los eritrocitos, mientras que la subunidad **L** la tiene por los linfocitos) **(20)**.

Lo anteriormente mencionado nos da la posibilidad de encontrar cinco combinaciones de estas cuatro subunidades : **E₄**, **E₃L**, **E₂L₂**, **EL₃**, **L₄**, que a continuación se muestran en la **Figura 1**

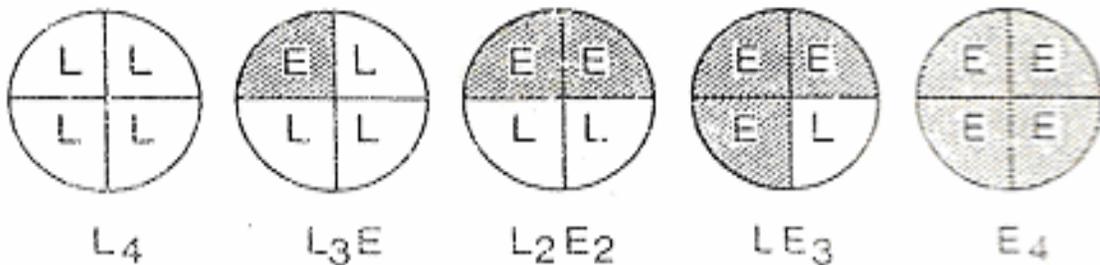


Figura 1 Representación esquemática de la estructura tetraédrica de las cinco isolectinas en *Phaseolus vulgaris* .

Fuente: **(19)**

Una observación interesante es el hecho de que la actividad hemaglutinante de las lectinas puede ser inhibida mediante la adición de azúcares. En el simple caso de aquella lectina que reacciona con un monosacárido en particular, esta puede ser fuertemente inhibida por concentraciones bajas del azúcar libre apropiada. En el modo más complejo de reconocimiento la lectina reacciona solo con una secuencia específica

de carbohidratos y ningún azúcar individual juega un papel predominante en el proceso de unión. Para inhibir estas lectinas se requieren oligosacáridos con una secuencia similar o idéntica de carbohidratos **(20)**.

En la **Tabla 2**, se muestran las propiedades de algunas lectinas con su peso molecular, el número de subunidades que las componen así como al azúcar a la que son específicas

Tabla 2 Propiedades y azúcar específico de algunas lectinas

Nombre Botánico	Nombre común	Peso molecular (kD)	Número de subunidades	Carbohidratos específico
<i>Arachis hypogaeae</i>	Cacahuete	110,000	4	GalNAc
<i>Canavalina ensiformis</i>	Jack bean	105,000	4	Man
<i>Dolichos biflorus</i>	Caupí	110,000	4	GalNAc
<i>Glicina max</i>	Frijol de soya	120,000	4	GalNAc
<i>Lathyrus odoratus</i>	Guisante dulce	52,000	4	Man
<i>Lathyrus sativus</i>	Alverjón	49,000	4	Man
<i>Lens esculenta</i>	Lenteja	46,000	4	Man
<i>Phaseolus lunatus</i>	Fríjol de lima	60,000	2	GalNAc
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fríjol común	126,000	4	GalNAc
<i>Pisum sativum</i>	Guisante	49,000	4	Man
<i>Vicia faba</i>	Haba	52,500	4	Man

a) GalNAc = N-acetilgalactosamina; Man = manosa

Fuente: **(19)**

1.4.2 Función

La presencia de las lectinas en varios tejidos de un amplio número de plantas y las diferencias en su localización subcelular así como las propiedades que se han encontrado en ellas, sugieren que pueden estar implicadas en muchas diferentes funciones de diversos tejidos. Los avances en el aislamiento e identificación de lectinas en suficientes cantidades a partir de diversos tejidos permiten la comparación de sus propiedades y su estudio **(23)**.

A continuación se mencionan algunas de las funciones en las que podrían estar involucradas las lectinas:

Como sustancia de defensa contra depredadores naturales ya que un rasgo esencial en cualquier mecanismo de defensa en un sistema biológico es la habilidad de reconocer específicamente al agente dañino y responder a su presencia, Las lectinas y su capacidad para combinarse de forma multivalente con carbohidratos y glicoproteínas en la superficie de las membranas biológicas y las propiedades que esto les confiere sugieren el papel que juegan estas en los sistemas de defensa de las plantas **(25)**.

Se encontró evidencia que las lectinas de la papa inhiben el crecimiento de las hifas del hongo *Botrytis cinerea*. En el caso del trigo la protección contra hongos patógenos durante las primeras etapas de la germinación esta soportada en datos que muestran que su lectina inhibe el crecimiento de las hifas de *Aspergillus Níger* y *Stemphylium botryosum*, además de estar localizada sobre la superficie de sitios potenciales de infección. Adicionalmente se encontró que la lectina semi-purificada se *Vicia cracca* inhibe el crecimiento de bacterias **(22)**.

Todo esto ha mostrado entonces un sin número de caminos mediante los cuales las lectinas pueden intervenir en la defensa de las plantas.

Primero, cuando la semilla seca absorbe agua, proteínas vacuolares y en especial las lectinas son liberadas. Esto resulta en la presencia de lectinas en la vecindad de la semilla en germinación. Donde está puede interactuar con patógenos potenciales.

Segundo, cuando la semilla u otro órgano es ingerido por depredadores, la lectina puede ser liberada desde las estructuras celulares dañadas, permitiéndole entrar en contacto con las glicoproteínas en las células del tracto intestinal inhibiendo la absorción de nutrientes.

Tercero, cuando una hifa de un hongo crece dentro de los tejidos, esta puede causar la ruptura de las células liberando a las lectinas, las que inhiben su crecimiento futuro **(23)**.

La simbiosis existente entre las leguminosas y bacterias fijadoras de nitrógeno (*Rhizobium sp* y *Brodyrhizobium sp*) comienza con una serie de pasos que van

desde la adhesión de la bacteria a la raíz, su internación y subsecuente nodulación que culmina con la capacidad de la planta para proveerse de nitrógeno. Esta asociación requiere de un alto grado de especificidad evento en el que puede estar involucrada la lectina dada su capacidad de aglutinar e inmovilizar bacteria **(19)**.

Dicha inquietud nace cuando dos investigadores (Hamblin y Kent 1973) reportaron la aglutinación de bacterias del género *Rhizobium phaseoli* por parte de lectinas de extractos de *Phaseolus vulgaris* adicionalmente estudios posteriores introdujeron el gen de la lectina de pera en semillas de trébol, el cual al crecer fue blanco de infecciones por bacteria del género *Rhizobium* específicas para la pera, a las cuales es normalmente resistente el trébol. El mecanismo de acción todavía no se encuentra muy bien elucidado sin embargo existen hipótesis (Dazzo y Hubbell 1975) que colocan a las lectinas como una especie de puentes entre las bacterias y la superficie de la raíz de las leguminosas **(25,26)**.

Existen otras líneas de investigación de las funciones de las lectinas en las plantas que las contienen, como aquella que indica la posible relación de las lectinas con el inicio de la germinación en las semillas. Adicionalmente su localización en tejidos como el tallo ha motivado a la investigación que las liga con la elongación de las paredes celulares actuando como una especie de pegamento entre células permitiendo la extensión y reajuste en los componentes de las paredes en el tallo **(25)**.

1.4.3 Efecto toxico y antinutricional

Las lectinas tienen una alta toxicidad en humanos, insectos, puercos, pollos y ratas Se ha encontrado que alimentando animales con dietas que contengan menos del 0.5% de lectinas el crecimiento es muy lento o se detiene, mientras que al aumentar la dosis por encima de este nivel los efectos (en un rango de 2 semanas) no solo son la ausencia de crecimiento, sino, la muerte **(23,26)**.

Diversas investigaciones han demostrado que las fitohemaglutininas se unen a la mucosa del intestino, lo que se puede atribuir a su capacidad de unirse en sitios receptores específicos en la superficie del intestino, donde provoca lesiones y disrupciones, además de un crecimiento anormal en las vellosidades intestinales. Una proporción de las lectinas adheridas son introducidas a los enterocitos, conservando aún su actividad y son posteriormente liberadas. Este proceso es rápido resultando en una cantidad significativa de lectinas dentro de la circulación por espacio de 1 hora, causando daño directo sobre los tejidos del cuerpo **(22,24)**.

Una de las mayores consecuencias del daño infligido a la mucosa del intestino es el severo debilitamiento en la absorción de nutrientes a través de las paredes intestinales. Mediante el uso de la técnica conocida como Perfusión Vascular Intestinal fue posible demostrar que las lectinas interfieren en la absorción de nutrientes como la glucosa. Capacidad que no está restringida a carbohidratos, sino, también sobre aminoácidos como la histidina, lípidos y vitaminas del grupo B₁₂, además de interferir en el transporte de iones **(27)**.

Adicionalmente cabe la posibilidad que las lectinas puedan inhibir la actividad de ciertas enzimas intestinales que participan en la degradación de proteínas como la enteroquinasa. No obstante la interferencia de la lectina en el sistema intestinal, la respuesta tóxica (pérdida de peso y alta mortalidad) es debida principalmente a los cambios estimulados por ésta en el sistema metabólico. La ingesta de altas dosis de lectina en la dieta produce un incremento en el recambio de las células epiteliales (debido a una posible activación hormonal), lo que produce un crecimiento del intestino delgado, así como también en el páncreas lo que puede llevar a que dupliquen su tamaño en un periodo de 10 días. Este desarrollo produce un desajuste entre la síntesis y el consumo de proteínas el cuál se ve reflejado en una alta excreción de urea por la orina **(19)**.

Las lectinas también interfieren en la secreción pancreática de insulina, resultando en una pérdida rápida en las reservas del cuerpo. A pesar de los bajos niveles de insulina en el cuerpo esto no genera una diabetes. Los cambios que prosiguen a una ingesta

más prolongada sugieren la pérdida de hasta el 25% del músculo esquelético debido a la activación del sistema catabólico, lo que lleva a la pérdida total de las reservas y por ende los niveles de glucosa caen vertiginosamente produciendo una hipoglucemia y posteriormente la muerte del animal **(24)**.

Otro factor que contribuye al efecto de las lectinas es el hecho que en animales libres de gérmenes aumenta la tolerancia hacia dietas con altos niveles de lectinas con respecto a animales normales. Esto va acompañado del dato de un crecimiento o colonización de bacterias coliformes en el intestino de ratas y pollos alimentados con frijoles crudos. La explicación para lo anterior no está completamente clara, pero es probable la actuación de las lectinas facilitando la unión de las bacterias a las paredes intestinales actuando como una especie de pegamento entre las bacterias y las membranas **(22)**.

En la dieta humana se han reportado casos de intoxicación por el consumo de frijoles: por ejemplo: en Inglaterra (1976) en una fiesta niños ingirieron una ensalada con frijoles remojados en agua pero no cocidos, causando náuseas y vómito dentro de la primera hora además de dolores abdominales, dos niños fueron llevados al hospital, donde la recuperación fue rápida. **(19)**.

La mayor parte de las poblaciones que consumen leguminosas han aprendido de manera empírica que su consumo requiere de un tratamiento térmico para la inactivación de los factores antinutricionales y tóxicos, sin embargo existen reportes alrededor de todo el mundo de casos en los que los frijoles son ingeridos parcialmente cocidos en ensaladas (la mayor parte en países Europeos) por ignorancia en su consumo o en poblaciones con escasos recursos debido a que la cocción no es la adecuada por falta de combustibles con los cuales propiciar el calentamiento o por el mal estado de los utensilios que se requieren (cacerolas, estufas, etc.) **(19)**.

1.4.4 Inactivación

Los efectos nocivos de las lectinas pueden ser inactivados mediante la desnaturalización de las mismas. Existe sin embargo una relativa resistencia de las lectinas al calor seco, ya que diversas semillas de leguminosas fueron expuestas al calor seco (80-90°C) por varias horas encontrándose posteriormente ciertos niveles detectables de actividad **(28)**.

Un gran número de investigaciones proponen la Inactivación de los factores tóxicos y antinutrimientales en las leguminosas mediante el uso del calor húmedo, encontrando serias divergencias, ya que existen diversos tratamientos térmicos como son: ebullición por un tiempo de 10 minutos a 100°C, 1 hora a 80°C, mientras que otros estudios (Bender y Reaidi 1982) revelan que un calentamiento a 80°C por un tiempo de 15-45 minutos incrementa la actividad hemaglutinante de las lectinas **(24)**.

Estos resultado en apariencia contradictorios, nos podrían estar hablando de la amplia variación de este factor tóxico (lectinas) dentro de las semillas de leguminosas y dentro de un mismo género ya que adicionalmente, se ha encontrado que existen variedades de *Phaseolus vulgaris* que no contienen ninguna aglutinina **(21)**.

El problema con un inadecuado tratamiento térmico es una sobre exposición al calor, lo que, además de significar un gasto innecesario de energía puede afectar de manera significativa la calidad de la proteína disminuyendo su aprovechamiento **(10)**.

En otras investigaciones que utilizan la germinación de las semillas como medio de desactivación de los factores tóxicos, se ha observado un decremento en la actividad de: lectina, inhibidores de tripsina, etc. Esto también se ha comprobado mediante la digestión *in Vitro* de estos metabolitos por diversos juegos de enzimas. Sin embargo el grado de germinación no esta bien determinado ya que existen investigaciones que aseguran el descenso en el valor proteínico de las semillas a los 2-3 días de iniciada la

germinación siendo este tiempo insuficiente para darle tiempo a la semilla de inactivar los factores tóxicos **(20)**.

1.4.5 Aplicación

Como mencionamos en la definición, las lectinas tienen la capacidad de unirse a diferentes carbohidratos con alta especificidad. Si tomamos en cuenta que Polisacáridos con cadenas pequeñas, unidos de manera covalente con enlaces glicosídicos a los grupos hidroxilo de las proteínas (glicoproteínas), actúan como marcadores bioquímicos sobre la superficie de las células, podemos darnos una muy buena idea del porque en 1945, de un extracto de *Phaseolus lunatus* se encontró una reactividad especial hacia eritrocitos del grupo A en sangre humana, pero no fue reportado sino hasta 1949 **(29)**.

El primer reporte de grupo sanguíneo fue hecho en 1948 por Renkonen. Se encontró entonces que distintas hemaglutininas son selectivas al aglutinar eritrocitos de diferentes grupos sanguíneos. Eritrocitos de varias especies animales pueden ser distinguidos por su reacción de aglutinación con ciertas lectinas, las cuales en este contexto pueden ser clasificadas como específicas. *Phaseolus vulgaris* contiene lectinas anti A y anti B junto con otras inespecíficas **(30)**.

Debido a sus propiedades únicas las lectinas están siendo aprovechadas ampliamente en investigación médica y bioquímica como:

- Moléculas de identificación de diversos carbohidratos y glicoproteínas
- Identificación de grupos sanguíneos
- Identificación de células malignas
- Identificación de receptores de membrana
- Bloqueo de la proliferación de bacterias nocivas en el intestino delgado como *Salmonella sp*.
- Moléculas que faciliten el anclaje de bacterias benéficas o probióticas

Adicionalmente se esta buscando aplicaciones médicas con el fin de que las lectinas prevengan el rechazo hacia transplantes de médula ósea y para retardar el crecimiento de tumores cancerigenos **(19,31)**.

Aprovechando la toxicidad de las lectinas hacia los insectos, se ha pensado en su uso, desarrollando plantas transgénicas mediante ingeniería genética, sin embargo su uso como insecticida en plantas con modificaciones genéticas no esta todavía bien desarrollada debido a que se requiere de una legislación e cada país para que las lectinas presentes en dichos cultivos no sean perjudiciales para los seres humanos y se encuentren en suficiente cantidad para cumplir con su función insecticida **(24)**.

1.4.6 Determinación de lectinas

Actualmente la determinación de lectinas se puede realizar por diversos métodos como son los cromatográficos hasta los ensayos que se basan en aprovechar la capacidad de las lectinas de aglutinar células, esos últimos debido a su bajo costo y alta especificidad son los más utilizados, existiendo metodologías que van desde la aglutinación de perlas de látex recubiertas con ovoalbumina hasta los que aprovechan la capacidad de aglutinar los eritrocitos de ciertas especies de animales. Este último es el método de microtitulación, usando tripsina o pronasa para mejorar la sensibilidad del ensayo **(21, 28,32)**

En el Departamento de farmacia se cuenta con una metodología que aprovecha la capacidad de aglutinación de los eritrocitos de hámster, los cuales son sumamente sensibles a este tipo de glicoproteínas. Este método además de detectar la presencia de lectinas expresa sus resultados de forma cuantitativa **(7)**.

1.5 Metionina

La metionina y la cisteína son las principales fuentes de azufre en la dieta, como se menciona anteriormente, el cuerpo puede sintetizar cisteína a partir de la metionina pero no viceversa. Esto hace que la metionina sea esencial en la dieta, ya que tiene muchas funciones en el cuerpo, su rol multifuncional incluye su participación en la síntesis de carnitina, creatina, glutatión catecolaminas y como sustrato para la síntesis de proteínas, las consecuencias metabólicas de su deficiencia pueden ser muy variadas. La deficiencia de metionina ha sido también relacionada con efectos adversos en los niveles de colesterol pudiendo incrementar la circulación del mismo en sangre **(33)**.

El bajo contenido del aminoácido esencial metionina limita el valor nutritivo de muchas proteínas en alimentos de origen vegetal, como las leguminosas, debido principalmente a dos factores: Primero, durante el procesado y almacenamiento del alimento la metionina, como otros aminoácidos, es químicamente modificada, reduciendo su calidad nutritiva. Tales modificaciones incluyen la oxidación a metionina-sulfoxido, metionina-sulfona y la racemización a la forma D-metionina, además de la degradación de ciertos componentes que producen sabores indeseables. Segundo, la metionina que forma parte de las proteínas en algunos alimentos es pobremente utilizada debido a su pobre digestibilidad **(34)**.

En la **Tabla 3** se presentan los requerimientos de metionina en niños, adultos y ratas.

Tabla 3 Estimado de requerimiento de aminoácidos (mg/g Proteína)

Aminoácido	Niño (a) 2-3 años	Adultos \geq 18 años	Ratas
Arginina	-	-	50
Histidina	19	16	25
Isoleucina	28	13	46
Leucina	66	19	62
Lisina	58	16	75
Metionina y cisteína	25	17	50
Fenilalanina y Tirosina	63	19	67
Treonina	34	9	42
Triptófano	11	5	12
Valina	35	13	50
Total	339	127	479

Fuente **(35)**

2 MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación en la **Figura 2** se presenta el diagrama de trabajo de la metodología que se siguió en el presente trabajo y posteriormente se describe cada una de las actividades desarrolladas.

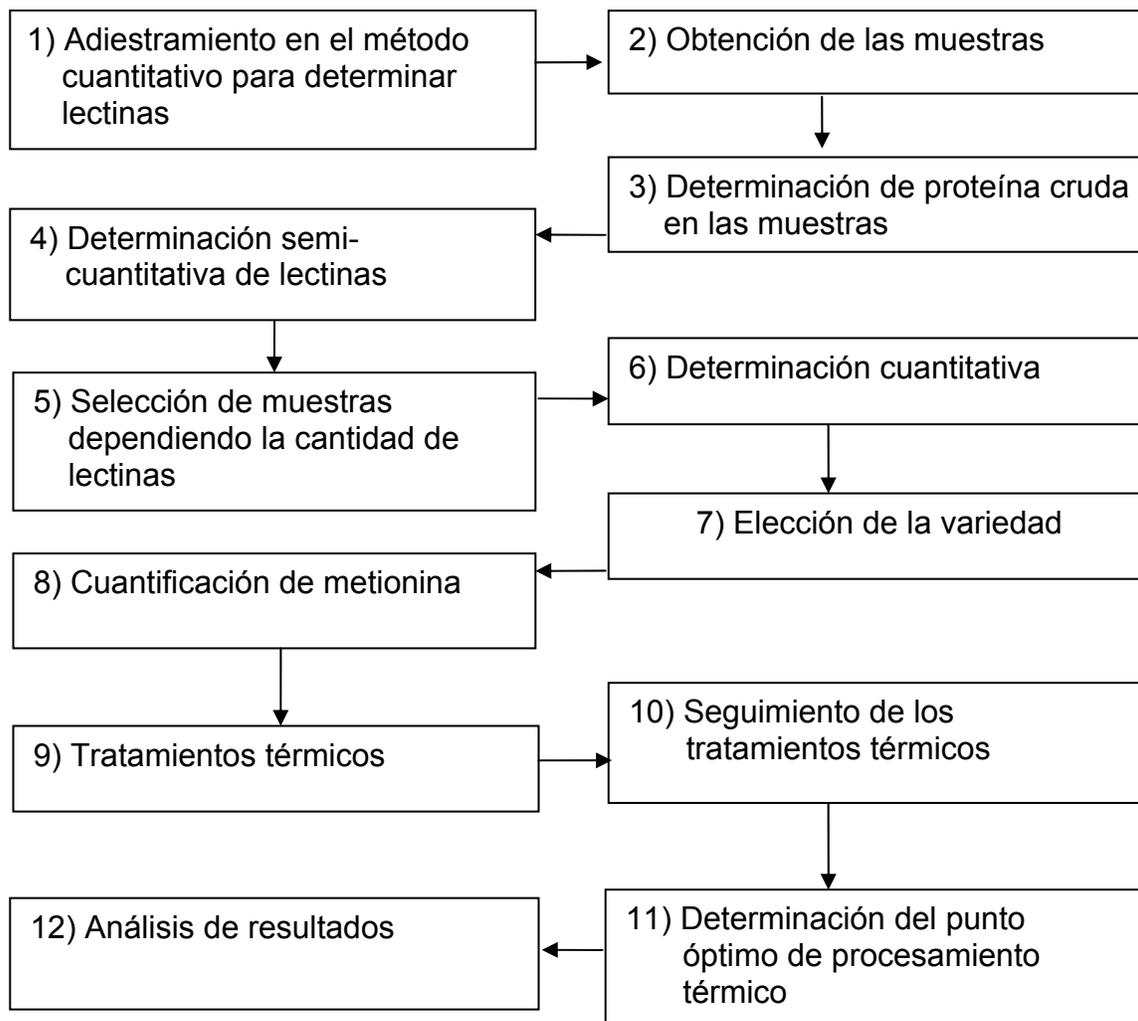


Figura 2 DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO

2.1 Adiestramiento en el método cuantitativo para determinar lectinas

Como parte de la preparación para la cuantificación de lectinas, se realizaron tres sesiones de entrenamiento en el uso tanto de materiales como de animales utilizados en esta metodología en las cuales se realizó la determinación semicuantitativa de variedades de frijol Negro Jamapa y de frijol Azufre de Nayarit con los cuales contaba el laboratorio.

Para la realización de estas pruebas se obtuvo la donación de 3 Hámster macho de 3 meses de edad del bioterio de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

2.2 Obtención de las muestras

Para obtener la mayor cantidad de muestras de las distintas variedades de frijol, se programó una entrevista con el Doctor Porfirio Ramírez V y el Mtro en C Mario Rocandio Rodríguez del Colegio de Post-graduados en la Universidad Autónoma Chapingo, en el municipio de Chapingo, Estado de México. De esta entrevista se obtuvo su cooperación mediante la entrega de 100 gramos de 50 variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*) mismas a las que se les realizó el presente estudio. Las 50 muestras obtenidas del Colegio de Postgraduados, provienen de una siembra realizada en sus campos, lo que garantiza que factores como el tipo de suelo, temperaturas, lluvias, horas de sol, etc. fueron exactamente las mismas para cada una de las 50 variedades, de esta manera se reduce al mínimo las posibilidades de que la composición química varíe por los factores ambientales, ya que se tiene conocimiento, de que variando la cantidad de abono o la exposición al sol así como ciertas condiciones de “stress”, las cantidades de aglutininas en los frijoles pueden variar de forma considerable (21).

Con esto entonces nos aseguramos que las variaciones en el contenido de lectinas (enterotoxinas), obedecen en mayor medida a la diversidad genética de las variedades de frijol estudiadas.

2.3 Origen de las muestras

El origen de las semillas con las cuales se sembraron estas variedades, bajo el concepto de asociación maíz- frijol (en la que el maíz sirve de soporte a la planta del frijol) proviene de una serie de estudios que el Dr Ramírez comenzó desde hace varios años (“Diversidad morfológica de poblaciones nativas de frijol común y frijol ayocote del oriente del estado de México”), (36) que involucra una mayor cantidad de variedades de *Phaseolus vulgaris* y de *Phaseolus coccineus*. De este estudio se obtuvieron gran parte de las semillas que, se evaluaron en el presente trabajo.

En la **Figura 3** se muestran los campos de cultivo donde se sembraron las 50 variedades, donde se aprecia el tipo de siembra maíz-frijol mencionado anteriormente,



Figura: 3 Campos de cultivo del Colegios de Post-graduados.

La importancia que tiene este grupo de 50 variedades de frijol no solo radica en que sus condiciones de cultivo hayan sido las mismas (factores ambientales), también resalta la diversidad genética inherente a su recolección, recordando que la gran mayoría provienen de semillas de consumo local en la zona centro del país (Estado de México, Morelos y Puebla). Si tomamos en cuenta que el fin principal de su recolección fue el estudio mismo de la diversidad morfológica, se tiene entonces la oportunidad de comprobar aquellos datos que, como respuesta a las contradicciones que se han encontrado al tratar de encontrar un tratamiento térmico general para la Inactivación de los factores tóxicos en los frijoles, han postulado la existencia de un amplio rango de valores en cuanto a la cantidad de lectinas existentes dentro del género *Phaseolus vulgais*.

En la **Figura 4** se muestran algunas de las variedades de frijoles con las que se trabajó, el total de las muestras se podrán observar en la sección de **Anexos I**



Figura 4 Cuatro de las cincuenta muestras con las que se trabajó. De izquierda a derecha y de arriba abajo: Torito, Vaquita, Coconita, Criollo amarillo

En la **Tabla 4** se presenta la asignación, nombre vulgar y origen de las 50 variedades con las que se trabajó.

Tabla 4 Variedades de frijol evaluadas

Clave ¹	Nombre común ¹	Origen	Clave	Nombre común	Origen
CPMEX02-11	Vaquita	Jumiltepec, Morelos.	CPMEX05A-8	Coconita	Juchitepec, México.
CPMEX02-22	Rosita	Tepetlixpa, México.	CPMEX05A-12	Revuelto	Ozumba, México.
CPMEX02-30	Cocona	Juchitepec, México.	CPMEX05A-14	Amarillo pequeño	Ozumba, México.
CPMEX02-32	Rosita	Juchitepec, México.	CPMEX05A-15	Rojo	Amecameca, México.
CPMEX02-34	Apetito	Atlautla, México.	CPMEX05A-17	Coconita	Amecameca, México.
CPMEX02-39	Rojito	Tepetlixpa, México.	CPMEX05A-18	(rojo y coconita)	Amecameca, México.
CPMEX02-51	Moro	Tlalmanalco, México.	CPMEX05A-22	Torito	Tepetlixpa, México.
CPMEX02-55	Yacapaxtle	Tlaltelco, Morelos.	CPMEX05A-24	Amarillo grande	Ozumba, México.
CPMEX02-52	Amarillo	Tlalmanalco, México.	CPMEX05A-26	Moro	Ozumba, México.
CPMEX03-14	Cocona	Nepantla, México.	CPMEX05A-28	Coconita	Tepetlixpa, México.
CPMEX03-16	Negro bola	Atlautla, México.	CPMEX05A-30	Moro	Atlautla, México.
CPMEX03-20	Coconita	Tepetlixpa, México.	CPMEX05A-32	Rojo	Nepantla, México.
CPMEX03-22	Amarillo enredador	Tepetlixpa, México.	CPMEX05B-19	Frijol negro	Chalco, México.
CPMEX03-24	Criollo amarillo	Tepetlixpa, México.	CPMEX05B-20	Frijol crema	Chalco, Méx.
CPMEX03-26	Cocona	Atlautla, México.	CPMEX05B-26	Frijol crema	Chalco, México.
CPMEX03-29	Garrapato	Atlautla, México.	CPMEX05B-48	Apetito	Chalco, México.
CPMEX03-30	Amarillo revuelto	Atlautla, México.			
CPMEX03-32	Coconita rosa	Juchitepec, México.	MICH-06-1	----- ²	Michoacán
CPMEX03-38	Flor de mayo	Juchitepec, México.	MICH-06-2	----- ³	Michoacán
CPMEX03-48	Frijol crema	Juchitepec, México.	MICH-06-3	----- ³	Michoacán
CPMEX03-63	Bola palacio	Ocuituco, Morelos.			
CPMEX03-66	Bola palacio	Yecapixtla, Morelos.	CPOAX05-1	Negro pequeño	Etla, Oaxaca.
CPMEX03-68	Flor de mayo	Atlautlan, Morelos.	CPOAX05-3	Rojito	Etla, Oaxaca.
CPMEX03-72	Bola palacio	Yecapixtla, Morelos.			
CPMEX04-99	Amarillo pequeño	Chalco, México	MONTO DE BORDO	----- ³	----- ³
CPMEX04-100	Moro	Chalco, México.			
CPMEX04-122	Ojo de liebre	Tlalmanalco, México.			
CPMEX05A-7	Amarillo grande	Atlautla, México.			

¹ Clave asignada a la variedad en el laboratorio de genética del Colegio de Post-graduados.

¹ Nombre "común" asignado en el lugar de origen.

² No se cuenta con el dato

2.3.1 Preparación del material

De cada muestra representativa y homogénea de las diferentes variedades de frijol, se tomo una fracción y se fraccionó a través de un molino de laboratorio que permito obtener una harina con un tamaño de partícula ≤ 1 mm de diámetro. Contando con la harina de frijol, se realizo la determinación de proteína por el método del Kjeldahl **(6)**, además se realizo a cada variedad la determinación de lectinas por medio del método semicuantitativo que aprovecha la capacidad hemaglutinante de este tipo de enterotoxinas y que hace uso de un sistema de microtitulación seriada **(7)**.

2.4 Determinación de proteína cruda en las muestras

FUNDAMENTO

La determinación se realizó según el método Kjeldahl, el cual se basa en las oxidación de la materia orgánica mediante una mezcla digestiva (H_2SO_4 , H_3PO_4 y $CuSO_4 \cdot 5H_2O$) formándose una sal fija de sulfato ácido de amonio (NH_4HSO_4). Posteriormente se realizó una destilación durante la cual se liberó amoniaco de dicha sal, mediante la adición del NaOH al 40% el amoniaco fue recibido por el ácido bórico (H_3BO_4) para formar borato de aluminio el cual se titulo con ácido clorhídrico 0.01N. De esta forma se obtuvo el porciento de nitrógeno de la muestra, el cual al multiplicarlo por el factor 6.25, nos dio el porciento de proteína cruda.

MATERIALES Y REACTIVOS:

- Digestor TECATOR, Mod. Ab 20/40
- Microdestilador TECATOR AUTO KJELTEC, No. 1030
- Tubos de digestión de 75mL
- Mezcla digestiva **(a)**
- Peróxido de hidrógeno al 30%

- Sulfato de potasio RA
- Solución de NaOH al 40%
- Solución de ácido bórico con indicador **(b)**
- Solución de ácido clorhídrico 0.01N valorada

Preparación de reactivos:

(a) Mezcla digestiva: Se disolvieron 3g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 20mL de agua destilada, se agregaron 50mL de ácido ortofosfórico (H_3PO_4), y se adicionaron con cuidado resbalando por las paredes 430mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Se dejó agitando la muestra durante 30 minutos aproximadamente.

(b) Solución de ácido bórico con indicadores: Se pesaron 20g de ácido bórico y fueron colocados en un matraz aforado de dos litros, se adiciono agua destilada hasta disolver y se agregaron 20 mL de verde de bromocresol (100 mg en 100 mL de CH_3OH) y 14 mL de rojo de metilo (10 me en 100mL de CH_3OH), se mezclaron vigorosamente.

Nota: Se utilizó metanol (CH_3OH) debido a que el equipo de destilación lo especifica en el manual de operación.

PROCEDIMIENTO:

Se pesaron de 20 a 80 mg de muestra (dependiendo del contenido de proteína) en papel de copia y se introdujeron en el tubo de digestión, se adicionaron aproximadamente 0.5g de K_2SO_4 , y se agregaron 3mL de mezcla digestiva, posteriormente se colocaron en el digestor a una temperatura de 370°C durante 15 minutos; pasado este tiempo, se sacaron, se dejaron enfriar y se agregó 1.5mL de H_2O_2 (al 30%); se volvió a colocar el tubo en el digestor hasta que la digestión terminó, esto fue, cuando el contenido fue translúcido o incoloro.

Terminada la digestión se dejó enfriar, se agregaron 25mL de H_2O destilada y se colocó en el equipo AutoKjeldahl; el cual dio la lectura de los mililitros gastados en la titulación de la muestra, los cuales sirvieron para conocer el % de nitrógeno, contenido en la misma. Además de introducir los tubos conteniendo la muestra se debió de

preparar de igual manera un blanco, donde se sustituyó la muestra por 70 mg de glucosa o sacarosa.

CÁLCULOS:

$$\% \text{ Nitrógeno} = (\text{ mL muestra} - \text{ mL blanco}) \times \text{ N} \times \text{ Meq} \times 100 / \text{ m}$$

$$\% \text{ Proteína cruda} = \% \text{ Nitrógeno} \times 6.25 \text{ (Factor)}$$

Donde:

N = Normalidad de la solución de HCl

meq = Miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m = Peso de la muestra (g)

2.5 Determinación semi-cuantitativa de lectinas

FUNDAMENTO

Se determino la cantidad mínima del extracto acuoso de una muestra vegetal, que produce prueba positiva de aglutinación con eritrocitos de hámster y este valor toma el nombre de "título"el valor que indica la máxima dilución de extracto que provoca prueba positiva de aglutinación con los eritrocitos del ensayo.

MATERIAL/REACTIVOS

- Parrilla de múltiple agitación marca CORNING STIRRER
- Centrífuga EPPENDORF 5702 para tubos.
- Tubos de centrífuga de 15 mL con graduación.
- Jeringa de 5 ó 10 ml.
- Incubadora marca BLUE-M.

- Espectrofotómetro Sequoia-Turner
- Adaptador para celdas de 12 x 80 mm (acondicionado a una abertura de 1 cm²).
- Microtiter Kit (Cook Eng-alexander Virginia USA).
- Embudos pequeños
- Fibra de vidrio
- Sangre lavada de hámster (machos de tres meses de edad)
- Solución anticoagulante... (Heparina 1000 UI)
- Solución salina (NaCl₂) al 1%.
- Solución salina (NaCl₂) al 0.9%.
- Proteasa (SIGMA P-5147).
- Solución de proteasa al 0.2% en solución salina 0.9%

METODOLOGÍA

Preparación del extracto:

Se molió finamente la muestra vegetal (con un contenido < 5% de grasa) y se suspendió 1 g de material en 10 mL de solución salina al 1%, efectuando la extracción con agitación mecánica durante 2 horas a 300 r.p.m. a temperatura ambiente.

Después del tiempo indicado se centrifugó el extracto a 3000 r.p.m., durante 10 minutos para eliminar el residuo insoluble; el sobrenadante se filtro a través de un filtro de vidrio de porosidad gruesa y de ser necesario se puede lavar el residuo con más solución salina al 1%, para llevar el extracto filtrado al volumen inicial (10 ml.)

Preparación de la sangre:

Una vez que se sangro al hamster (previamente anestesiado) por vía ocular, la sangre se recogió en un matraz pequeño que contenía solución anticoagulante, se agito suavemente para la completa homogenización de la sangre con la solución anticoagulante. Para evitar al máximo la coagulación de la sangre, se diluyó esta con

solución salina isotónica (de preferencia se lavo la sangre lo más rápido posible para evitar coagulación y hemólisis de esta).

La sangre con anticoagulante se transvaso a tubos de centrifuga para lavarla (3 veces) con sol. Salina al 0.9%. La relación sangre: solución salina fue aproximadamente 1:13, se centrifugo a 3,000 r.p.m. durante 10 minutos. Después del último lavado, se midió en el tubo de centrifuga el volumen de paquete de eritrocitos y se diluyo al 4%. Para lo anterior, se agrego por cada 1.0 ml de glóbulos rojos compactados 24.0 mL de sol. salina al 0.9%.

Sensibilización de los glóbulos rojos:

A cada 10 mL. de suspensión de glóbulos rojos al 4% se le agrego 1 mL de solución de pronasa al 0.2% y se colocaron en incubadora 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, se centrifugaron para eliminar la enzima sobrenadante y se les dio 3 lavados con solución salina 0.9%. Después del último lavado se resuspendió el paquete de glóbulos rojos al 3 %, para lo cual, por cada 1.0 ml de paquete de eritrocitos se adicionaron 32 ml de solución salina al 0.9%.

Ajuste de la suspensión de glóbulos rojos:

Se tomo 0.1 ml de la suspensión de glóbulos rojos ya sensibilizados y se agrego 4.9 ml de solución salina al 0.9 %. Se leyó en el espectrofotómetro a 620 nm, usando un adaptador de celdas que permite el paso de solo 1 cm² de luz y como blanco solución salina al 0.9%.

La lectura que se obtuvo fue de 26.5 ± 2.5 (24 a 29) de transmitancia, en caso contrario se realizó la dilución o concentración necesaria para que la suspensión de glóbulos quedará dentro de dicho rango.

Microtitulación:

En las placas tipo “V” del microtiter se colocó en cada pozo de las hileras que se utilizaron, 50 μ L de solución salina al 0.9% con la pipeta automática multicanal evitando tocar las paredes del pozo y adicionando con precaución para que no se fuera a desfasar el volumen de adición. A continuación se llenó el microdilutor con 50 μ L introduciéndolo en el extracto problema y al sacarlo se absorbió con mucho cuidado la solución adherida en el vástago del microdilutor, posteriormente se introdujo en el primer pozo de la hilera escogida girándolo sin excesiva presión y se pasó con mucho cuidado al siguiente pozo y así sucesivamente hasta completar una hilera, donde al terminar se descendió al siguiente pozo y completó la hilera, hasta completar 3 hileras en forma de culebra. Por último, con un pipetero de gota se colocó en cada pozo 50 μ L de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizados y ajustados, teniendo la precaución de resuspender los glóbulos rojos, en cada adición a una placa. Luego se giró la placa en forma circular y se colocó en la incubadora a 36.5 ± 0.5 °C durante 1 hora.

Lectura:

Una vez transcurrido el tiempo estipulado se colocó la placa sobre el dispositivo de lectura. Se observó a través del espejo el fondo de los pozos de cada hilera de prueba y se reportó la máxima dilución que presentó prueba positiva de aglutinación (“título”). La máxima dilución que presenta aglutinación se denomina como título del ensayo de la muestra y la prueba se efectuó como mínimo por triplicado. Con los datos individuales de los títulos se obtiene la mediana (debido a que es un método semicuantitativo, los resultados se expresan en títulos que son valores enteros y el valor central entero representa mejor el resultado que usando la media, además de evitar deformaciones

por la variabilidad inherente a los sistemas biológicos sobre los que se efectuó la semicuantificación) y se redondea al número entero más cercano y este fue el título (t).

En la **Figura 5** se pueden observar dos placas mostrando los resultados de la prueba junto con otras imágenes que ilustran lo anteriormente señalado.

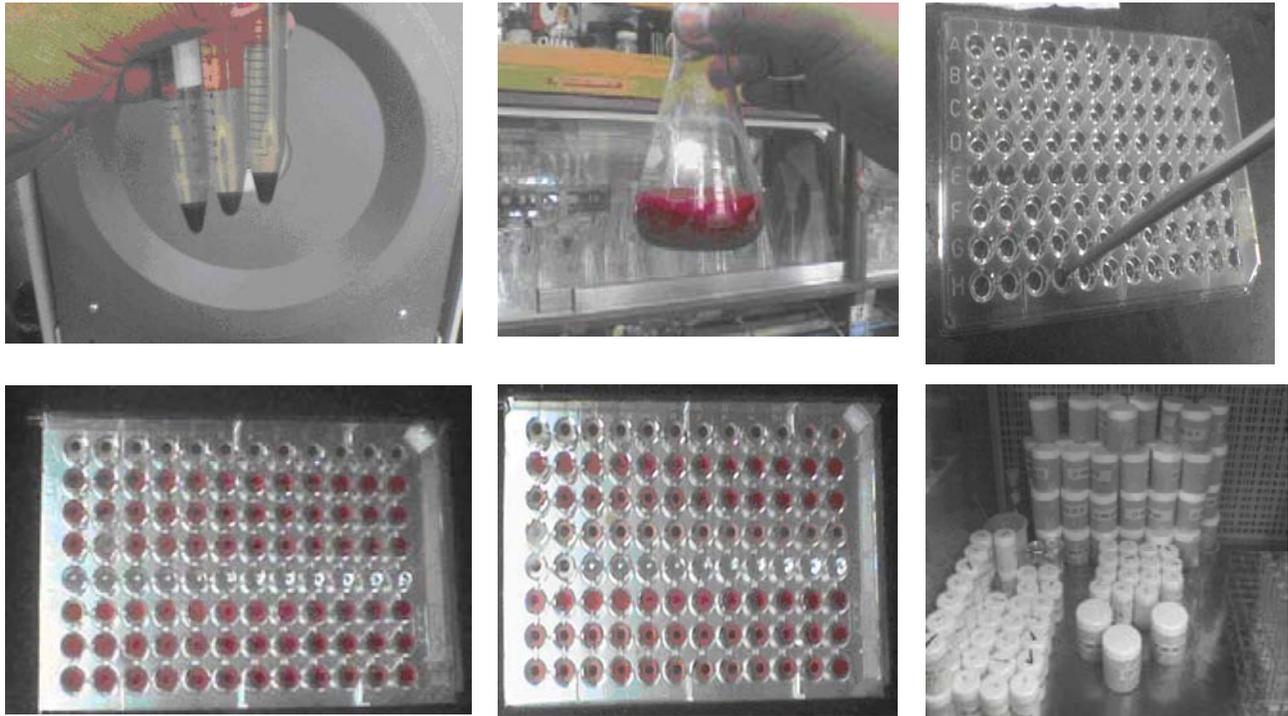


Figura 5 De izquierda a derecha y de arriba a bajo: Lavados de sangre (centrifugación), Suspensión de eritrocitos ajustada, Diluciones seriadas, Placas tipo “V” del microtiter listas para su lectura, Muestras etiquetadas con sus harinas respectivas.

2.6 Determinación cuantitativa de hemaglutininas

FUNDAMENTO

Se determinó la cantidad mínima del extracto acuoso de una muestra vegetal, que produce prueba positiva de aglutinación con eritrocitos de hámster y este valor se relaciono con la cantidad mínima de faseolotoxina SIGMA # L-8754 (nuestro estándar de referencia en cada placa) que produce prueba positiva de aglutinación, definiéndose

como 1 unidad hemaglutinante (UHG) el equivalente a 1 mg de faseolotoxina (SIGMA # L-8754).

El procedimiento, materiales y reactivos utilizados son los mismos que para la determinación semicuantitativa, sin embargo al ser más sensible la determinación cuantitativa se requieren materiales y reactivos adicionales, los cuales serán nombrados a continuación.

MATERIAL/REACTIVOS

Los materiales empleados fueron los mismos de la determinación semicuantitativa más los siguientes:

- Lectina purificada de frijol (*Phaseolus vulgaris*) faseolotoxina (SIGMA L-8754) (PHT).
- Solución de lectina de referencia (b)

b) Se pesaron con la mayor exactitud posible 1 mg de faseolotoxina (SIGMA L-8754) en un tarador y se trasvaso a un matraz aforado de 10 mL; a continuación se aforo con solución isotónica (0.9%). De esta solución (0.1 mg/mL) se realizó una dilución 1:100 para ocuparla en la placa de micridilución tipo "V", con la finalidad de definir la cantidad mínima de faseolotoxina que produce prueba positiva de aglutinación (L).

METODOLOGÍA

Se molió finamente la muestra vegetal (con un contenido < 5% de grasa) y se suspendió 0.1 g de material en 10 mL de solución salina al 1%, efectuando la extracción con agitación mecánica durante 2 horas a 300 r.p.m. a temperatura ambiente.

Después del tiempo indicado se centrifugo el extracto a 3000 r.p.m., durante 10 minutos para eliminar el residuo insoluble; el sobrenadante se filtro a través de un filtro de vidrio de porosidad gruesa y de ser necesario se puede lavo el residuo con más solución salina al 1%, para llevar el extracto filtrado al volumen inicial (10 ml.)

La obtención y lavado de la sangre; sensibilización de los glóbulos rojos y el ajuste de esta suspensión, se realizo de manera similar a la determinación semi-cuantitativa descrita anteriormente.

Microtitulación:

En las placas tipo "V" del microtiter se coloco en cada pozo de las hileras que se utilizaron, 100 μ L de solución salina al 0.9% con la pipeta automática multicanales evitando tocar las paredes del pozo y adicionando con precaución para que no se fuera a desfasar el volumen de adición. A continuación se lleno el microdilutor con 50 μ L introduciéndolo en el extracto problema y al sacarlo se absorbió con mucho cuidado la solución adherida en el vástago del microdilutor, posteriormente se introdujo en el primer pozo de la hilera escogida girándolo sin excesiva presión y se pasó con mucho cuidado al siguiente pozo y así sucesivamente hasta completar una hilera para obtener la dilución seriada. Lo anterior también se realizó para la solución diluída (1:100) de la faseolotoxina que sirve como referencia para la determinación cuantitativa, por cada placa debe haber una hilera para la solución de PHT; además por cada placa se debe dejar una hilera que corresponde a las pruebas negativas de hemaglutinina, la cual se obtiene al agregar simplemente la cantidad correspondiente de suspensión de eritrocitos a cada pozo.

Por último, con un pipetero de gota se coloco en cada pozo 50 μ L de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizados y ajustados, teniendo la precaución de resuspender los glóbulos rojos, en cada adición a una placa. Luego se giro la placa en forma circular y se coloca en la incubadora a 36.5 ± 0.5 °C durante 1 hora.

Lectura:

Una vez transcurrido el tiempo estipulado se colocó la placa sobre el dispositivo de lectura. Se observó a través del espejo el fondo de los pozos de cada hilera de prueba y se reportó la máxima dilución que presentó prueba positiva de aglutinación tanto del extracto de la muestra a ensayar como de la solución de faseolotoxina, que nos servirá como referencia para hacer los cálculos de la respectiva placa.

RECOMENDACIONES

Se realizó la dilución necesaria para que el extracto produjera un título dentro de los primeros 10 pozos de una hilera; de lo contrario se debe realizar la dilución necesaria del extracto hasta que se cumplió este requerimiento.

Se cuidó el rango de temperatura establecida y todo el material que se utilizó estaba perfectamente limpio.

CÁLCULOS

La máxima dilución que presenta aglutinación visual se denomina como título del ensayo tanto de la muestra como de la solución diluida de PHT. Por cada extracto de la muestra, el ensayo de hemaglutinación seriado antes descrito, se debe realizar mínimo por triplicado, recomendándose hacer esta determinación en tres placas para el mismo extracto y realizar los cálculos en forma individual, para que al final se reporte el resultado, dando el valor promedio \pm su desviación estándar.

1.- Se calcula el límite de detección para cada placa 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 lectina en la solución diluida (expresada en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

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

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

Conociendo este dato de **E**, se procede 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 de acuerdo a la siguiente formula:

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

Donde:

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

t = Título (valor que indica la máxima dilución de extracto que provoca prueba positiva de aglutinación con los eritrocitos del ensayo)

$$\text{Ejemplo: } L = 2(0.05/3^4) = 1.234 \times 10^{-3} \mu\text{g} \quad \text{donde } t = 4$$

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 primer pozo (**e**), como se hizo anteriormente para la solución de faseolotoxina, pero expresada en miligramos. Lo anterior se obtiene de acuerdo a la siguiente formula:

$$e = m \times D$$

Donde:

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

m = Concentración equivalente de muestra en el extracto (expresada en $\text{mg}/\mu\text{L}$).

D = Cantidad de extracto tomado por el microdilutor (μL).

Ejemplo: $m = (100\text{mg muestra} / 10\,000\mu\text{L s.s}) \times (1000\mu\text{L} / 10\,000\mu\text{L}) = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mg}/\mu\text{L}$

$$e = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mg}/\mu\text{L} \times 50\mu\text{L} = 0.05 \text{ mg}$$

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 formula:

$$\mathbf{MA = 2 (e / 3^t)}$$

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

t = Título

Ejemplo: $\mathbf{MA = 2(0.05/3^6) = 1.3717 \cdot 10^{-4}}$

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

$$\mathbf{LE = L / MA}$$

Ejemplo: $\mathbf{LE = 1.234 \cdot 10^{-3} \mu\text{g} / 1.3717 \cdot 10^{-4} \text{mg} = 9 \mu\text{g} / \text{mg} = 9 \text{ UHG/g de Muestra.}}$

Donde:

LE = cantidad de lectina de referencia expresada en μg , 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 1 unidad de hemaglutinación (**UHG**) es equivalente a 1 mg de faseolotoxina (SIGMA # L-8754), bajo las condiciones establecidas en esta metodología, podemos expresar nuestros resultados en **UHG/g de Muestra**.

2.7 Cuantificación de metionina

FUNDAMENTO

La determinación cuantitativa de metionina se basa en la reacción de oxidoreducción que se efectúa entre el sulfuro y el ión yodoplatinato; el platino es reducido y

el sulfuro presente es oxidado a sulfoxido. Se forma un complejo, que presenta una menor absorción a una mayor concentración de metionina, debido a la decoloración que sufre el ión yodoplatinato. El complejo es medido a una longitud de onda de 505nm

MATERIAL/REACTIVOS

Solución estándar de metionina (5mM)	Agua destilada
Solución Buffer de fosfatos	Acetato de cadmio
Solución de Hexayodoplatinato (a)	Gas nitrógeno
BaCl ₂ 0.53M	HCl concentrado
Na ₂ SO ₄ 0.56M	Ácido acético (1M)
Hidróxido de bario BaOH	

Preparación de reactivos.

a.- Se pesaron 50mg de Hexacloroplatinato y se aforaron a 1ml, de esta solución se tomaron 100µL y se pusieron en un matraz aforado de 50mL junto con 2mL de yoduro de potasio (0.66M) y 2mL de agua destilada, se dejaron reposar toda la noche al abrigo de la luz y se aforaron con ácido acético glacial (1M)

METODOLOGÍA

Elaboración de la curva patrón.

Se partió de una concentración conocida de metionina (5mM) y se tomaron los volúmenes necesarios hacer la curva. Se agregaron los siguientes volúmenes 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1ml, de los cuales se obtuvo valores de concentración de metionina que fueron desde 5.0-30.0 µg aproximadamente.

Se colocó en matraces aforados de 25ml, en donde se le adicionaron 3ml de BaCl_2 0.53M, 3ml de Na_2SO_4 0.56M y se aforo con buffer de fosfatos pH = 7; después de lo anterior se filtró con ayuda de vacío para eliminar cualquier precipitado formado, a partir de esto se tomó 1ml de cada una y se colocó en tubos a los que se les adicionó 1ml de hexayodoplatinato (preparado a partir de hexacloroplatinato) y 2ml de buffer de fosfatos pH=7; y se mezcló.

Se pusieron los tubos en un baño maría a 30°C durante 10min; después se tomó la lectura en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 505nm (se ajustó primero a 100% de transmitancia con buffer de fosfatos pH=7). Luego de haber obtenido las lecturas, se calculó la ecuación de la recta mediante una regresión lineal.

Hidrólisis de la proteína de la muestra.

Se pesaron 200mg de proteína y se colocaron en tubos con tapón de rosca y se le adicionaron 4.2g de hidróxido de bario, después se le añadió 7.5ml de agua destilada y 0.5ml de acetato de cadmio; una vez realizado lo anterior, a los tubos con la mezcla de reacción se les insufló gas nitrógeno y luego de esto, se cerraron adecuadamente los tubos.

Los tubos ya preparados se colocaron en una estufa durante 10h a 120°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), después de haber transcurrido el tiempo, se sacaron los tubos y una vez atemperados; a los hidrolizados obtenidos se le ajustó el pH (3.5 ± 0.3) con H_2SO_4 (ó con HCl); los hidrolizados se depositarán en matraces aforados de 25ml y se aforaron con agua destilada y luego se filtraron con ayuda de vacío.

Método del yodoplatinato, para la determinación de metionina

Se tomaron 3ml del hidrolizado y se colocaron en un matraz aforado de 25ml, al cual se le adicionó 3ml de sulfato de sodio 0.56M, 3ml de cloruro de bario 0.53M y se aforo con buffer de fosfatos pH=7. Se filtró con ayuda de vacío y se tomó 1ml el cual se

coloco en tubos, a los que se les adiciono 2ml de buffer de fosfatos pH=7 y 1ml de hexayodoplatinato. Después se colocaron los tubos en un baño María a 30°C durante 10min y al último tomo la lectura en el espectrofotómetro a 505nm.

2.8 PROCESAMIENTO CON CALOR HÚMEDO

Una vez seleccionada la variedad de fríjol con mayor contenido de lectinas se seleccionaron diferentes tratamientos térmicos con el fin de eliminar las hemaglutininas de forma gradual.

De esta manera se seleccionaron los siguientes seis tratamientos térmicos los cuales se citan a continuación:

1) Sin remojo cocción 1 minuto (SRC1M)

Se tomaron 20 gramos de fríjol en un vaso de precipitado y se agregó 40ml de agua destilada (relación 1:2), se puso en una parilla eléctrica y el tiempo se comenzó a tomar a partir de la ebullición del agua manteniendo siempre el nivel de la misma, después de lo cual se elimino está última y dejo enfriar los fríjoles.

2) Sin remojo cocción 15 minutos (SRC15M)

Se tomaron 20 gramos de fríjol en un vaso de precipitado y se agregó 80ml de agua destilada (relación 1:4), se puso en una parilla eléctrica y el tiempo se comenzó a tomar a partir de la ebullición del agua manteniendo siempre el nivel de la misma, después de lo cual se elimino está última y se dejo enfriar a los fríjoles.

3) Sin remojo cocción 30 minutos (SRC30M)

Se tomaron 20 gramos de fríjol en un vaso de precipitado y se agregó 80ml de agua destilada (relación 1:4), se puso en una parilla eléctrica y el tiempo se comenzó a tomar a partir de la ebullición del agua manteniendo siempre el nivel de la misma, después de lo cual se elimino está última y dejo se enfriar a los fríjoles.

4) Remojo previo de 5horas y cocción 10 minutos (R5HC10M)

Se tomaron 20 gramos de frijol en un vaso de precipitado y se agregó 60ml de agua destilada (relación 1:3), se puso a reposar por espacio de 5 horas y al finalizar este se cambio el agua agregando 40ml (relación 1:2) al vaso, poniéndolo en la parilla eléctrica y el tiempo se comenzó a tomar a partir de la ebullición del agua manteniendo siempre el nivel de la misma, después de lo cual se elimino está última y se dejo enfriar a los frijoles.

5) Remojo previo de 12horas y cocción 15 minutos en autoclave (R12HA15M)

Se tomaron 20 gramos de frijol en un vaso de precipitado y se agregó 60ml de agua destilada (relación 1:3), se puso a reposar por espacio de 12 horas y al finalizar este se cambio el agua agregando 80ml (relación 1:4) al vaso, poniéndolo en la autoclave a 121°C (15 PSI de presión de vapor), el tiempo se comenzó a tomar a partir de alcanzadas estas condiciones.

6) Remojo previo de 12horas y cocción 30 minutos en autoclave (R12HA30M)

Se tomaron 20 gramos de frijol en un vaso de precipitado y se agregó 60ml de agua destilada (relación 1:3), se puso a reposar por espacio de 12 horas y al finalizar este se cambio el agua agregando 80ml (relación 1:4) al vaso, poniéndolo en la autoclave a 121°C (15 PSI de presión de vapor), el tiempo se comenzó a tomar a partir de alcanzadas estas condiciones.

2.8 Determinación del punto óptimo de procesamiento térmico

Como último paso de esta investigación se procedió a determinar aquél procesamiento térmico teórico optimo. Para poder determinarlo, se realizó un seguimiento en el contenido residual de lectinas sobre las muestras después de los tratamientos térmicos así como también de la metionina existente en los mismos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Determinación de proteína en las muestras

La determinación de proteína en las muestras se realizó por triplicado a cada una de ellas y en la **Tabla 5** se presenta el promedio de cada una. Con el conjunto de promedios se elaboro el polígono de frecuencia correspondiente, que muestra la tendencia encontrada en las 50 variedades (**Figura 6**).

Tabla 5 Contenido de proteína en las 50 variedades

MUESTRA	% PROTEINA	MUESTRA	% PROTEINA	MUESTRA	% PROTEINA
CPMEX02-11	18.63	CPMEX03-32	21.47	CPMEX05A-24	20.28
CPMEX02-22	19.77	CPMEX03-38	22.07	CPMEX05A-26	19.54
CPMEX02-30	20.81	CPMEX03-48	18.21	CPMEX05A-28	20.15
CPMEX02-32	19.29	CPMEX03-63	18.66	CPMEX05A-30	21.60
CPMEX02-34	21.24	CPMEX03-66	19.08	CPMEX05A-32	19.63
CPMEX02-39	19.85	CPMEX03-68	21.43	CPMEX05B-19	20.12
CPMEX02-51	20.20	CPMEX03-72	19.02	CPMEX05B-26	20.49
CPMEX02-52	21.81	CPMEX04-99	17.79	CPMEX05B-20	21.12
CPMEX02-55	19.00	CPMEX04-100	17.64	CPMEX05B-48	21.61
CPMEX03-14	17.97	CPMEX04-122	19.32	MICH06-2	18.93
CPMEX03-16	19.97	CPMEX05A-07	22.70	MICH06-3	17.65
CPMEX03-20	19.00	CPMEX05A-08	17.26	MICH06-1	18.61
CPMEX03-22	19.43	CPMEX05A-12	22.29	OAX05-1	18.17
CPMEX03-24	19.53	CPMEX05A-14	17.94	OAX05-3	19.78
CPMEX03-26	19.01	CPMEX05A-15	18.73	MONTO DE	21.31
CPMEX03-29	18.36	CPMEX05A-17	20.38	BORDO	
CPMEX03-30	21.33	CPMEX05A-18	18.72		

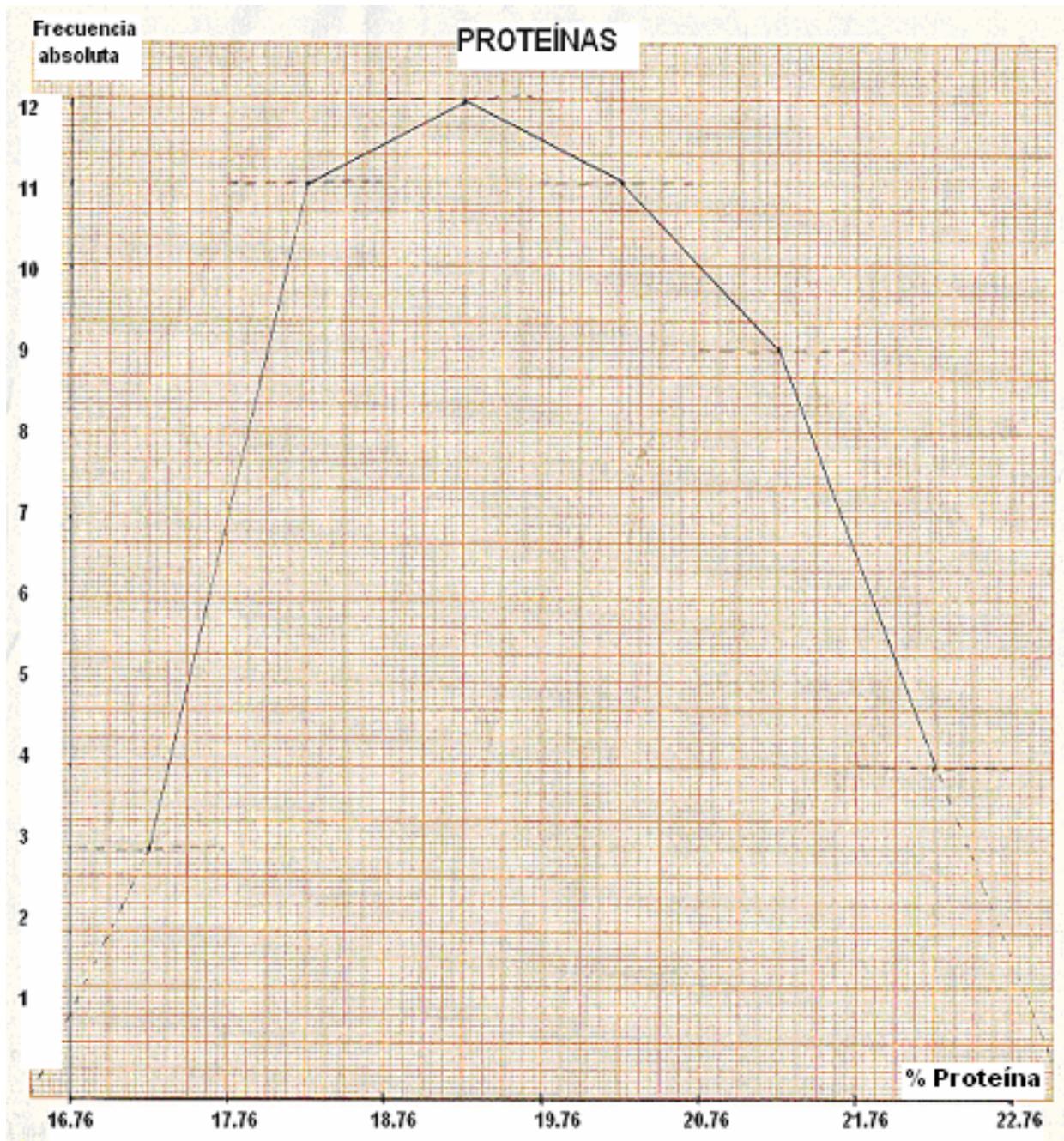


Figura 6 Polígono de frecuencia del contenido de proteínas en las 50 variedades.

En este polígono de frecuencia se puede observar que el contenido de proteína en el grupo, muestra una distribución normal (donde la mayoría de la población se encuentra en un valor central), con estos datos podemos entonces afirmar que la proteína a lo

largo de la población de frijol criollo común (*Phaseolus vulgaris*) varia siempre dentro de un rango estrecho y que en el caso de esta población esté fue de: 17.26% a 22.70%.

Lo anterior entonces muestra que el contenido de proteína en las 50 variedades de frijol (19.73% en promedio) se encuentra muy cerca del valor encontrado en tablas, que es de 20%. Lo anterior es de sumo interés al revelar el comportamiento homogéneo que muestra el grupo con respecto a un parámetro previamente establecido (proteína cruda). La ausencia de variaciones importantes puede deberse, a la igualdad de condiciones ambientales en su desarrollo.

3.2 Determinación semicuantitativa de lectinas

Posterior a la determinación de proteína cruda se realizó la determinación semicuantitativa de lectinas, como mínimo por triplicado para cada muestra. La determinación semicuantitativa, requiere menos tiempo para su desarrollo, lo que permite manejar un gran número de muestras y sus repeticiones, lo anterior permitió obtener un panorama general en cuanto al contenido de hemaglutininas en el grupo de frijoles criollos, que además de ser de gran interés permitió descartar seleccionar para su análisis cuantitativo a un grupo representativo del total de muestras.

Con estos datos se obtuvo la mediana¹. Los títulos del análisis semi cuantitativo de lectinas de las 50 variedades de frijol criollo y las determinaciones realizadas en cada muestra se muestra en la **Tabla 6**.

Con la finalidad de observar el comportamiento que muestra este factor tóxico (Lectinas) a lo largo del grupo de una forma gráfica, se elaboro de nuevo un polígono de frecuencia, que se muestra en la **Figura 7**.

¹ Que es el dato que corresponde al título que se presenta en la **Tabla 6**.

TABLA 6 Valor semi-cuantitativo del nivel de lectinas.

DETERMINACIÓN					DETERMINACIÓN						
MUESTRA	1	2	3	4	TITULO ¹	MUESTRA	1	2	3	4	TITULO
CP MEX-02-11	16	17	16		16	CP MEX-04-99	36	36	36		36
CP MEX-02-22	18	22	23		22	CP MEX-04100	19	18	17		18
CP MEX-02-30	21	20	21		21	CP MEX-04-122	28	30	30	32	30
CP MEX-02-32	21	19	19		19	CP MEX-05-A-07	16	16	16	17	16
CP MEX-02-34	19	21	20		20	CP MEX-05-A-08	36	36	36		36
CP MEX-02-39	25	28	26		26	CP MEX-05-A012	22	22	23		22
CP MEX-02-51	19	19	23		19	CP MEX-05-A-14	31	26	28		28
CP MEX-02-55	28	32	29		29	CP MEX-05-A-15	30	32	29		30
CP MEX-02-52	17	18	16		17	CP MEX-05-A-17	19	22	17		19
CP MEX-03-14	16	16	23		16	CP MEX-05-A-18	36	36	33		36
CP MEX-03-16	18	21	19	19	19	CP MEX-05-A-22	30	30	33		30
CP MEX-03-20	26	25	27		26	CP MEX-05-A-24	36	36	36		36
CP MEX-03-22	18	18	17	18	18	CP MEX-05-A-26	17	16	17		17
CP MEX-03-24	36	32	36		36	CP MEX-05-A-28	36	36	35		36
CP MEX-03-26	24	25	27		25	CP MEX-05-A-30	18	19	21		19
CP MEX-03-29	30	30	30		30	CP MEX-05-A-32	15	20	15	20	17
CP MEX-03-30	24	24	24	24	24	CP MEX-05-B-19	36	36	36	36	36
CP MEX-03-32	36	36	36		36	CP MEX-05-B-20	36	36	36	27	36
CP MEX-03-38	36	36	36		36	CP MEX-05-B-26	23	20	19		20
CP MEX-03-48	18	21	17	17	18	CP MEX-05-B-48	30	28	24		28
CP MEX-03-63	36	36	36		36	MICH-06-1	21	19	23		21
CP MEX-03-66	33	32	36	36	34	MICH-06-2	24	25	24		24
CP MEX-03-68	20	18	20		20	MICH-06-3	17	16	15		16
CP MEX-03-72	21	20	20		20	OAX-05-1	20	21	19		20
MONTO DE BORDO	20	17	17		17	OAX-05-3	16	19	21		19

¹ Valor de la máxima dilución que manifiesta prueba positiva de hemaglutinación, expresado como la mediana de la determinación.

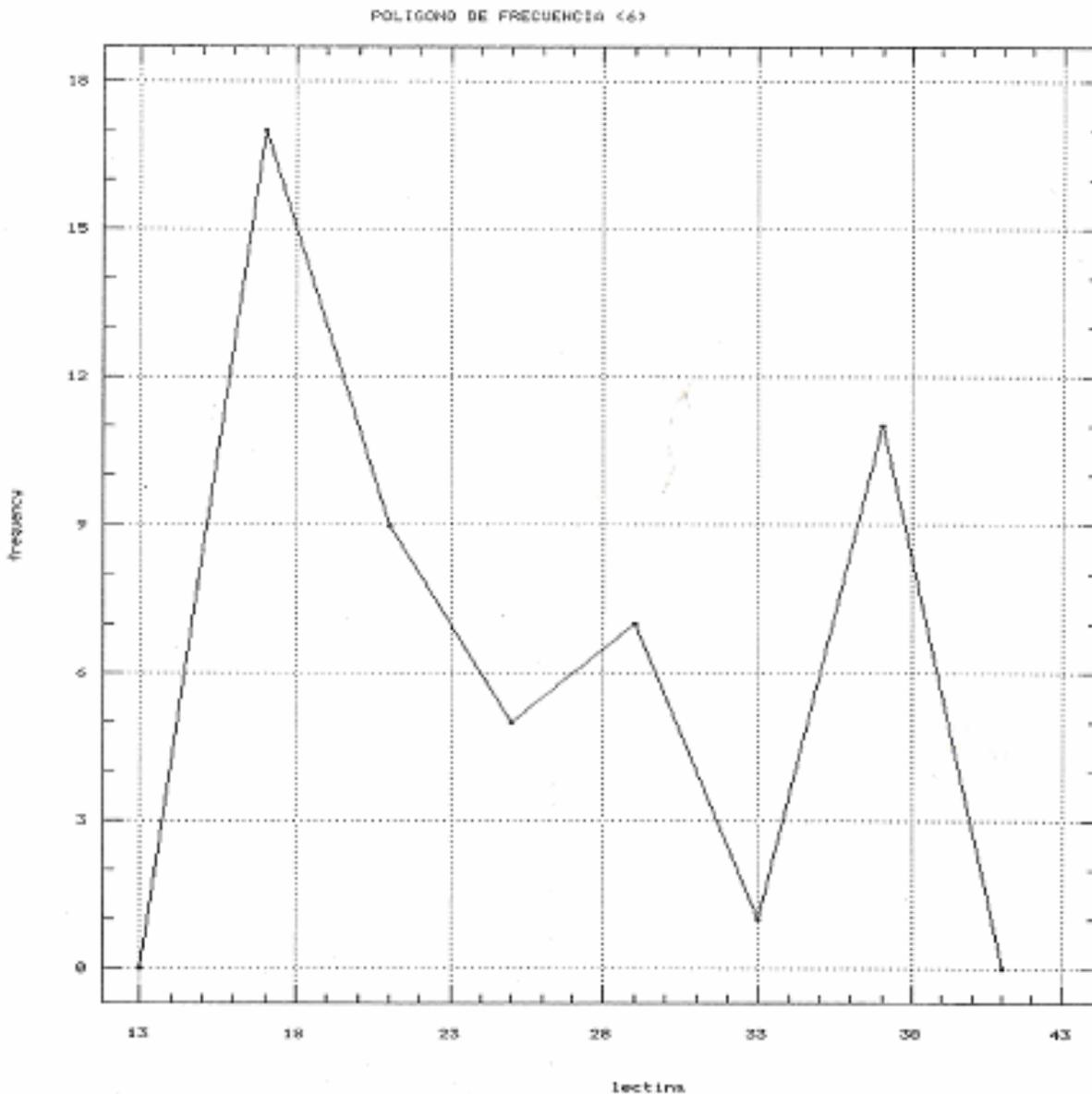


Figura 7 Polígono de frecuencia con la tendencia del contenido de lectinas en las 50 variedades.

Del polígono de frecuencia presentado en la **Figura 7** se observa entonces la presencia de tres grupos, que contienen distintos niveles de lectinas: bajo, mediano y alto nivel de este factor tóxico.

La **Figura 7** revela entonces que, las cincuenta muestras presentan una amplia variabilidad de este metabolito tóxico dentro del grupo, aún y cuando las condiciones

ambientales en las que se desarrollaron fueron las mismas, lo que excluye a dichos factores como fuente de variación.

Esto aunado a los resultados homogéneos de la proteína cruda sugieren que la existencia de estos tres grupos son el resultado de una variación debida principalmente a factores genéticos propios de cada variedad dentro de la misma especie de leguminosas, en este caso *Phaseolus vulgaris*.

Los resultados obtenidos en la determinación semi-cuantitativa proporcionaron la oportunidad de elegir muestras de cada grupo con la finalidad de poder expresar el contenido de esta fitotoxina en términos cuantitativos.

Para realizar el estudio cuantitativo se seleccionaron 20 muestras tomando 10 muestras de bajo, 5 de mediano y 5 de alto nivel de lectinas y a continuación se presentan los resultados.

3.3 Determinación cuantitativa de lectinas en las 20 muestras seleccionadas

La cuantificación de hemaglutininas se realizó por triplicado en cada una de las 20 muestras seleccionadas, estos resultados reflejaron de forma más precisa el contenido real de lectinas y se presenta en la **Tabla 7**, expresado en unidades de hemaglutinación por gramo de muestra (UHG/g M), donde 1UH es equivalente a 1mg de faseolotoxina (SIGMA # L-8754).

La **Tabla 7** que a continuación se presenta muestran además los rendimientos de cada una de las veinte variedades a las que se les determino las lectinas de manera cuantitativa (con esta información y con la información de la determinación de lectinas se elaboro una gráfica conjunta que muestra por un lado la presentación de barras del contenido cuantitativo junto con el rendimiento¹ representado con una gráfica lineal y que se ilustra en la **Figura 8**).

¹ Rendimientos de todas las muestras en Anexos II

Tabla 7 Contenido de lectinas y rendimiento de las veinte variedades seleccionadas

Clave	Nombre común	Lectinas expresado en		Rendimiento ²
		UHG/g muestra ¹		
		Promedio ± Desviación		
		Estándar		
CP OAX 05-1	Negro pequeño	1.83	± 1.37	79.8
CP MEX 05 A 14	Amarillo pequeño	2.77	± 1.92	60.7
CP MEX 05 A 26	Moro	3.00	± 1.15	59.6
CP MEX 02 11	Vaquita	4.99	± 3.46	61.6
CP MEX 03 22	Amarillo enredador	9.00	± 4.00	81.4
CP MEX 05 A 7	Amarillo grande	9.00	± 5.20	76.9
CP MEX 05 B 26	Fríjol crema	9.00	± 0.00	80.4
CP MEX 03 30	Amarillo revuelto	10.00	± 3.86	70.4
CP MEX 04 122	Ojo de liebre	11.66	± 3.33	70.9
CP MEX 05 A 15	Rojo	11.66	± 5.77	58.3
CP MEX 03 29	Garrapato	11.66	± 5.77	62.3
CP MEX 03 48	Fríjol crema	18.33	± 8.67	61.6
CP MEX 05 A 30	Moro	21.00	± 6.00	60.7
CP MEX 03 16	Negro bola	21.60	± 4.60	56.8
CP OAX 05-3	Rojito	27.00	± 5.99	57.5
CP MEX 03 66	Bola palacio	63.33	± 26.66	64.6
CP MEX 03 38	Flor de mayo	69.99	± 34.64	58.4
CP MEX 03 32	Coconita rosa	89.99	± 40.00	68.2
CP MEX 03 63	Bola palacio	149.99	± 60.00	71.6
CP MEX 05 A 28	Coconita	450.00	± 180.00	85.0

¹ Valor expresado en unidades de hemaglutinación(UHG) / g muestra 1UHG el equivalente a 1 mg de faseolotoxina (SIGMA # L-8754).

² Rendimiento dado en gramos de producto (semilla) por planta sembrada.

UHG/g Muestra

LECTINAS CUANTITATIVO Y RENDIMIENTOS

g Frijol/planta

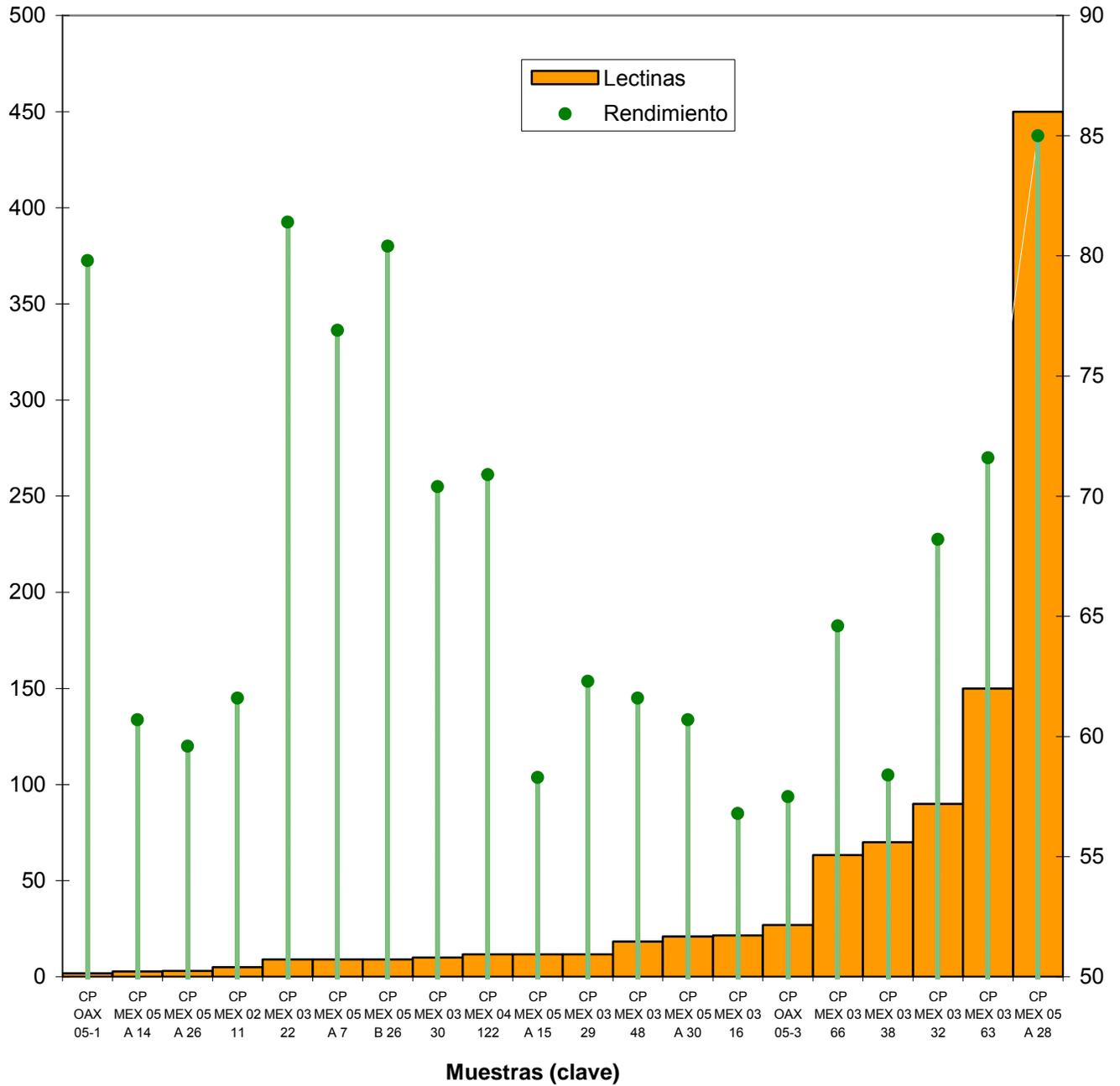


Figura 8 Presentación de barras del contenido de lectinas en las veinte muestras seleccionadas, ordenadas en orden ascendente y rendimiento de cada una de las veinte variedades.

En la **Figura 8** podemos observar la amplia variación existente entre las muestras del grupo de bajo contenido de lectinas, con un valor mínimo de 1.83 UHG/g M y el grupo de alto contenido de lectinas con un valor máximo de 450 UHG/g M; las diferencias existentes son representación de lo obtenido en el polígono de frecuencia en la determinación semi-cuantitativa. El rendimiento presenta una amplia variación, lo que sugiere que ambas características se deben principalmente a la herencia genética

3.4 Selección de la muestra

Para seleccionar la muestra se tomo en cuenta la cantidad de lectinas encontrada, seleccionando aquella muestra cuyo valor expresado en UHG/g de muestra fue el mayor, de forma que al aplicar los tratamientos térmicos se tuviera el mayor rango para poder ir disminuyendo gradualmente el contenido de lectinas.

A la par dicha muestra presenta el mayor rendimiento dentro de las veinte variedades seleccionadas, este rendimiento alto le confiere entonces un interés agronómico y toxicológico adicional, al representar esta muestra un cultivo con buenas expectativas de uso intensivo para la alimentación humana o animal.

Dicho lo anterior entonces la muestra sobre la que se realizaron los tratamientos térmicos fue:

Clave	Nombre común	UHG/g muestra	Origen
CP MEX 05 A 28	Coconita	450	Tepetlixpa, México.

3.5 Seguimiento del procesamiento térmico

Una vez realizados los tratamientos citados anteriormente las muestras fueron secadas en una estufa de circulación forzada a una temperatura de 55°C por espacio de 12-16horas, tiempo después del cual las muestras fueron molidas hasta obtener una harina fina para poder realizar sobre ellas la determinación cuantitativa siguiendo el sistema de micro titulación seriada (9) y los resultados reunidos se presentan en la **Tabla 8**.

Tabla 8 Contenido de lectinas en frijol CP MEX 05A-28 crudo y procesado

TRATAMIENTO	SIGLAS	UHG/g M ¹
Muestra cruda	MC	450.00 ±180.00
Sin remojo cocción 1 minuto	SRC1M	89.99 ±52.90
Sin remojo cocción 15 minutos	SRC15M	29.99 ±11.55
Sin remojo cocción 30 minutos	SRC30M	5.00 ±3.20
Remojo previo de 5horas y cocción 10 minutos	R5HC10M	1.10 ±0.24
Remojo previo de 12horas y cocción 15 minutos en autoclave	R12HCA15M	0.166 ±0.11
Remojo previo de 12horas y cocción 30 minutos en autoclave	R12HCA30M	0.139 ±0.08

¹ Valor expresado en unidades de hemaglutinación(UHG) / g muestra 1UHG el equivalente a 1 mg de faseolotoxina (SIGMA # L-8754)..

En el seguimiento se encuentra la evaluación de la calidad nutritiva, la cual fue medida en base al contenido de metionina biodisponible (8), el resultado de esta determinación se muestra en la **Tabla 9** (Curva de calibración en **Anexos III**)

Tabla 9 Contenido de metionina en fríjol CP MEX 05A-28 crudo y procesado

Muestra	Siglas	g Metionina/100g Muestra	g Metionina/100g Proteína
Muestra cruda	MC	0.515 $\pm 6.2 \cdot 10^{-3}$	2.55 $\pm 3.0 \cdot 10^{-2}$
Sin remojo			
cocción 1 minuto	SRC1M	0.517 $\pm 1.0 \cdot 10^{-2}$	2.56 $\pm 5.0 \cdot 10^{-2}$
Sin remojo			
cocción 15 minutos	SRC15M	0.516 $\pm 1.8 \cdot 10^{-2}$	2.56 $\pm 9.0 \cdot 10^{-2}$
Sin remojo			
cocción 30 minutos	SRC30M	0.508 $\pm 4.9 \cdot 10^{-2}$	2.52 ± 0.24
Remojo previo de 5 horas y			
cocción 10 minutos	R5HC10M	0.500 $\pm 3.4 \cdot 10^{-2}$	2.48 ± 0.16
Remojo previo de 12 horas y			
cocción 15 minutos en			
autoclave	R12HCA15M	0.500 $\pm 9.7 \cdot 10^{-3}$	2.45 $\pm 4.8 \cdot 10^{-2}$
Remojo previo de 12 horas y			
cocción 30 minutos en			
autoclave	R12HCA30M	0.500 $\pm 1.9 \cdot 10^{-2}$	2.34 $\pm 9.5 \cdot 10^{-2}$

Como parte final de este trabajo se presenta en la **Figura 9** la gráfica sobrepuesta con los valores de lectinas (**Tabla 8**) y su seguimiento sobre la fracción proteínica medida en base a la metionina (**Tabla 9**) para cada uno de los seis tratamientos térmicos, de esta forma se aprecia de manera mucho más clara la forma en que los mismos afectan tanto a los factores tóxicos como a la calidad proteínica y se engloban los datos necesarios para seleccionar al tratamiento térmico teórico óptimo.

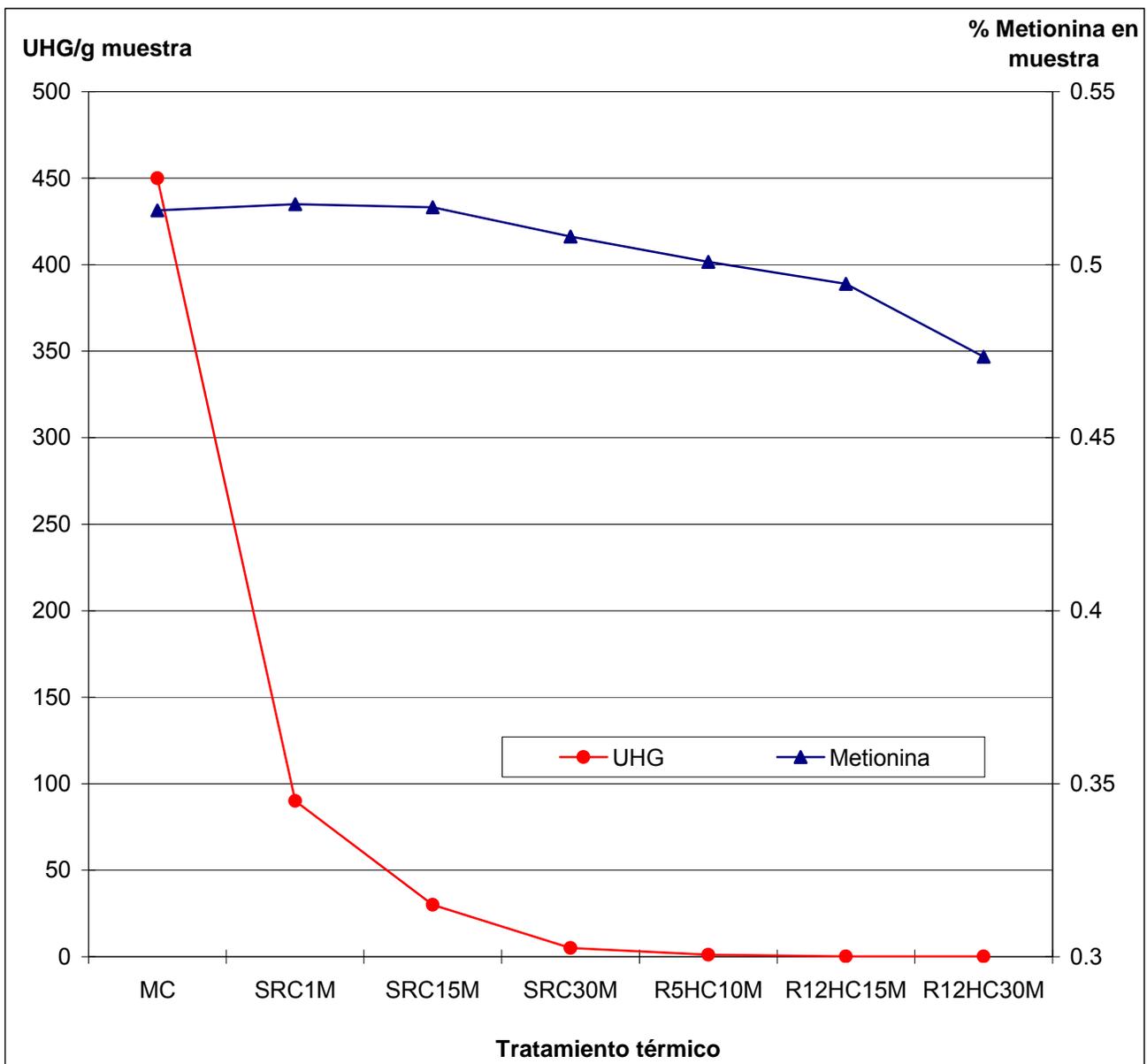


Figura 9 Presentación simultánea del descenso del nivel de lectinas y contenido de metionina bajo los diferentes procesamientos del grano de frijol seleccionado.

De esta gráfica se puede seleccionar aquel tratamiento térmico que presente el menor contenido de hemaglutinina y la mayor calidad proteínica medida por la cantidad de metionina biodisponible.

Para poder observar si existieron variaciones importantes respecto al contenido de metionina se realizó un Análisis de Varianza (ANDEVA) sobre las muestras representativas para cada uno de los seis tratamientos térmicos y la muestra cruda obteniendo los siguientes resultados:

Donde

Ho: No existe diferencia significativa respecto al contenido de metionina en los seis tratamientos y la muestra sin tratar.

Hi: Existe diferencia significativa respecto al contenido de metionina en los seis tratamientos y la muestra sin tratar.

En la **Tabla 10** se presenta n los resultados de dicho análisis estadístico (datos de cálculos en **Anexos IV**).

Tabla 10 Resultados del ANDEVA

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado medio	Fo	Fo tablas
% Metionina	0.007377853	6	0.001229642	2.1329	1.5
Error	0.008071313	14	0.000576522		
Total	0.015449167	20			

$\alpha=0.25$

Como Fo es mayor que F de tablas Ho se rechaza, por lo que una prueba de rango múltiple de Duncan nos informara sobre en cuáles tratamientos existe una diferencia significativa con respecto a la muestra original o sin tratamiento.

En la **Tabla 11** se presentan los resultados de las comparaciones de los seis tratamientos térmicos con la muestra original y se concluye si existe o no una diferencia significativa (resultados de todas las posibles combinaciones en **Anexos V**).

Tabla 11 Resultados de la prueba de Rango múltiple de Duncan .

Muestra original		Tratamiento térmico	Diferencia existente		Rangos de significación mínima	¿Diferencia significativa?
MC	vs.	SRC1M	$1.6 \cdot 10^{-3}$	<	0.04421	No
MC	vs.	SRC15M	$2.7 \cdot 10^{-3}$	<	0.04546	No
MC	vs.	SRC30M	$2.2 \cdot 10^{-3}$	<	0.04421	No
MC	vs.	R5HC10M	$7.8 \cdot 10^{-3}$	<	0.04630	No
MC	vs.	R12HCA15M	0.0251	<	0.04686	No
MC	vs.	R12HCA30M	0.0527	>	0.04713	Si

$\alpha = 0.05$ Resultado de las diferencias existentes en todas las combinaciones en los **Anexos V**.

3.6 Selección del procesamiento térmico óptimo

Para poder seleccionar el procesamiento térmico óptimo debemos seleccionar aquel tratamiento que, presente el mayor grado de inactivación de las aglutininas presentes en la muestra original (estudios anteriores han determinado como nivel mínimo de lectinas que no producen daños clínicos, ni subclínicos valores menores de 1UHG/g M (**21**)). A la par dicho tratamiento debe de mantener en la muestra una buena calidad proteínica, que en este estudio se midió en base al contenido del aminoácido limitante (metionina). Tomando en cuenta estos dos factores principalmente se tiene que los tratamientos con un nivel bajo de lectinas fueron: **R5HC10M** con 1.1UHG/g de M y **R12HCA15M** y **R12HCA30M** con 0.16 UHG/g de M y 0.13 UHG/g de M.

Con estos resultados y tomando en cuenta que la única muestra que presento una diferencia significativa con referencia a la muestra cruda o sin tratamiento fue la muestra **R12HCA30M**, se propone como aquel tratamiento que elimina las lectinas de manera importante (99.96%), a niveles aceptables (<1UHG/g de M) y mantiene un nivel aceptable con respecto a la calidad de la proteína original al tratamiento **R12HCA15M**.

CONCLUSIONES

- El contenido de proteína en las muestras es muy homogéneo encontrándose en un rango de 17.2-22.7, con un valor promedio de 19.7 el cuál es muy similar al reportado en literatura (20%)
- Con la cantidad de variedades trabajadas, de acuerdo a los resultados obtenidos, se esta en condiciones de establecer que el nivel de lectinas es variable y puede haber variedades con alto, mediano y bajo nivel de estas enterotoxinas. Debido a la igualdad de condiciones climatologicas, estos datos entonces responden a la variabilidad genética de las lectinas dentro de una misma especie (***Phaseolus vulgaris***).
- Con las determinaciones cuantitativas se pudo observar que dichas diferencias en el contenido de aglutininas es muy amplia al encontrarse como mínimo 1.8UHG/g de M y como máximo 450 UHG/g de M
- Se selecciono la muestra CP MEX 05A-28 cuyo contenido de lectinas fue el más alto 450UHG/g de M y al mismo tiempo, presento el mayor rendimiento de las veinte variedades evaluadas (85 g de semilla/planta).
- Se obtuvo la Inactivación de las lectinas presente en la muestra de forma gradual, con lo que se tuvo la oportunidad de evaluar la eficacia de Inactivación de cada uno de los 6 tratamientos térmicos.
- Un ANDEVA mostró la existencia de diferencias significativas en cuanto al contenido de metionina existente en las muestras de cada tratamiento térmico y gracias a una prueba de Rango Múltiple de Duncan se encontró que el tratamiento **R12HCA30M** daña de manera significativa la calidad proteínica en la muestra
- Se selecciono al tratamiento **R12HCA15M** ya que este mostró un menor nivel de lectinas sin presentar una disminución significativa de la calidad proteínica (medida como una disminución no significativa en el contenido de metionina).

RECOMENDACIONES

Hay que considerar que la propuesta anterior no toma en cuenta factores del tipo sensorial, ya que el fin principal fue encontrar aquel tratamiento que disminuyera el principal factor tóxico en la muestra seleccionada y conservara la calidad proteínica de la misma.

Es importante mencionar que este estudio solo propone un tratamiento térmico tomando como base las dos variables evaluadas; sin embargo, para confirmar el proceso óptimo desde el punto de vista nutritivo de la calidad de la proteína, es necesario realizar los ensayos biológicos respectivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Reyes, C. y López, O. (1992) "Endurecimiento del frijol común. Estrategias para su prevención y alternativas tecnológicas para su utilización". Cuadernos de nutrición. Volumen 15 Número 2. México D.F pp 20
2. Muller, H. y Tubin, G. (1998) "Nutrición y ciencia de los alimentos" (Traducción por Barrado, A. Aguilera, M.) Editorial Acribia S.A Zaragoza pp 143-271
3. Shibamoto, T. Bjeldanes, L. (1996) "Introducción a la toxicología de los alimentos". Editorial Acribia S.A Zaragoza pp 71-75
4. Silvestre, A. (1993) "Toxicología de los Alimentos" Editorial Hemisferio sur Buenos Aires 2da edición pp 74-78
5. Altug, T. (2003) "Introduction to toxicology and Food" CRE Press Boca Ratón, Florida pp 47,48
6. AOAC (1995). Method official 981.10. "Crude protein in meat. Block digestion method". Official methods of AOAC international, 16° edition. Cunnif, P.-
7. Lucas, B. and Sotelo, A. (1993) "A useful modification of the haemagglutination method for screening of lectins in legume seeds". 2th International Workshop on ANFs. in legume seeds. EAAP Publication No. 70, Wageningen , pp.71-74
8. Njaa, A. (1980) "Method for determination of unoxidized and total methionine in protein concentrates, with especial referente to fish meals". (Britanic. Journal. Nutrition). 43, 339-342
9. Gibney, M. Vorster, H. Kok, F. (2005) "Introducción a la Nutrición Humana" Editorial Acribia S.A Zaragoza pp 68-73

10. Estudio FAO Alimentación y nutrición (1990) "Utilización de alimentos tropicales" Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación Roma 47/4 pp 1,2,
11. Fennema, O. (2000)."Química de Alimentos" 2da edición Editorial Acribia Zaragoza pp 1120
12. Engleman, M. Editor (1991) "Contribuciones al conocimiento del Fríjol (*Phaseolus*) en México". Colegio de Postgraduados, Texcoco pp 83-92, 101-111, 113-119
13. <http://www.siap.gob.mx/> Anuario Estadístico de la Producción Agrícola SAGARPA. Actualización a Febrero 2008 Buscador Google
14. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/modelos/Cadenas/frijol/prodint.pdf> SAGARPA. Actualización a Febrero 2008 Buscador Google
15. Vargas, M. Muragia, J. Martínez. Acosta, J. (2006) "Colección Núcleo de *Phaseolus vulgaris*" INIFAP. Catalogo de accesiones de la forma domesticada. Centro de Investigaciones Regionales del Centro Campo Experimental Valle de México Libro técnico No 10. México, D.F Pp 1-7
16. Kay, D. (1979) "Legumbres Alimenticias". traducido por María Paz Nava Hidalgo, Editorial Acribia S.A Zaragoza pp 136-139
17. Bender, D. (1995) " Introducción a la Nutrición y el Metabolismo" Editorial Acribia S.A Zaragoza pp 204-207
18. Lincoln y Eduardo Zeiger (2006) "Secondary Metabolites and Plant Defense". Plant Physiology, Fourth Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland pp 352

19. Shahidi, F. Editor (1997) "Antinutrients and phytochemicals in food" American Chemical Society, Washinton D.C pp 30-44.
20. Savelkoul, F. (1994) Thesis "Effect of Bioprocessed antinutritional factors on bean protein quality". Departmant of Animal Nutrition, Netherlands. Pp 7-14,31,69-77
21. González, P. (2001) Tesis "Efecto del procesamiento con calor sobre la cuantificación de lectinas de frijol y su toxicidad remanente". Facultad de Química UNAM , México D.F. pp 3,9,10,11,18,116
22. Lis, H. Sharon, N. (1981) "The biochemistry of plant. A comprehensive trestise" Academic Press, New York. pp 372-431
23. Maarten, J. and Raikhel, N. (1991) Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. The plant cell, Vol 3, 1-9, January (American Society of plant Physiologists.) pp 1-7
24. Grant, G., Van Driessche, E. (1993) "Legume lectins: physicochemical and nutritional properties " Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds' (A.F.B. Van der Poel, J. Huisman, H.S. Saini, eds.) (Wageningen Pers), pp. 219-234
25. Liener, I. Sharon, N. Goldstein, I. (1986)."The letins: properties, funtions and aplicaciones in biology and medicine " Acedemic Press, New York pp 266-285, 371-414, 527-547
26. Irvin E. Liener (1964) "Seed Hemagglutinins".(Economic Botanic . Box 299, St. Louis) pp. 27-33.

27. Donatucci, D. Liener, I. and Gross, C. (1987) "Binding of Navy Bean (*Phaseolus vulgaris*) Lectin to the intestinal cell of rat and its effect on the absorption of glucose". (Journal. Nutrition.) 117, 2154-2160
28. Nelson G. Almeida, A. (1991) "Effect of Different Heat Treatments on the Antinutritional Activity of *Phaseolus vulgaris* (Variedad Ojo de Cabra) (Agricultural Food Chemistry) . 34 pp 1627-1630
29. Mc Murry, J. (2004) Química orgánica. traducción Jorge Alberto Velazquez y Eloy Pineda Sexta edición. Editorial Thomson México, D.F pp 973
30. Harbone, J. Boutler ,D. And Turner, B. (1971) Chemotaxonomy of the leguminosae Academic Press, New York pp 367-462
31. Effects of antinutriments on the nutritional value of legume diets (1996) COST 98. Office for official publications of the european communities luxemburgo Volumen 3 pp: 5,86-90
32. Aregheore, E. Makkar, H. (1998) "Assessment of Lectin Activity in a Toxic and a Non- toxic Variety of *Jatropha curcas* using Latex Agglutination and Hemagglutination Methods and Inactivation of Lectin by Heat Treatments" (J Sci Food Agric.) 77, 349-352
33. Pasquale, M. (1997) "Amino acids and Proteins for the Athlete : The Anabolic" CRE Press Boca Ratón, Florida pp 119
34. Friedman, M. (1989) "Absorption and utilization of Amino Acids" CRE Press Boca Ratón, Florida pp 189

35. Liu, K. (1997) "Soybeans: Chemistry, technology and utilization." Editorial Springer, Filadelfia pp 509

36. Castillo, M. Ramírez, P. Castillo, F. y Miranda, S. (2006) "Diversidad morfológica de poblaciones nativas de frijol común y frijol ayocote del oriente del estado de México". *Fitotecnia Mexicana*, 29(2) pp 111-199

ANEXOS I

Fotografías de las 50 variedades de *Phaseolus vulgaris*



CP MEX 02 11



CP MEX 02 22



CP MEX 02 30



CP MEX 02 32



CP MEX 02 34



CP MEX 02 39



CP MEX 02 52



CP MEX 02 51



CP MEX 02 55



CP MEX 03 14



CP MEX 03 16



CP MEX 03 20



CP MEX 03 22



CP MEX 03 24



CP MEX 03 26



CP MEX 03 29



CP MEX 03 30



CP MEX 03 32



CP MEX 03 38



CP MEX 03 48



CP MEX 03 63



CP MEX 03 66



CP MEX 03 68



CP MEX 03 72



CP MEX 04 99



CP MEX 04 100



CP MEX 04 122



CP MEX 05 A 07



CP MEX 05 A 08



CP MEX 05 A 12



CP MEX 05 A 14



CP MEX 05 A 15



CP MEX 05 A 17



CP MEX 05 A 18



CP MEX 05 A 22



CP MEX 05 A 24



CP MEX 05 26



CP MEX 05 A 28



CP MEX 05 A 30



CP MEX 05 A 32



CP MEX 05 B 19



CP MEX 05 B 20



CP MEX 05 B 26



MICH 06 2



CP MEX 05 B 48



MICH 06 1



MONTO DE BORDO



MICH 06 3



OAX 05 1



OAX 05 2

Anexos II

Tabla Rendimiento en las 50 variedades

MUESTRA	RENDIMIENTO ¹	MUESTRA	MUESTRA	MUESTRA	
CPMEX02-11	61.63	CPMEX03-32	68.21	CPMEX05A-24	50.17
CPMEX02-22	48.30	CPMEX03-38	58.40	CPMEX05A-26	59.61
CPMEX02-30	52.54	CPMEX03-48	61.68	CPMEX05A-28	85.00
CPMEX02-32	55.40	CPMEX03-63	71.64	CPMEX05A-30	60.70
CPMEX02-34	50.50	CPMEX03-66	64.60	CPMEX05A-32	50.08
CPMEX02-39	53.64	CPMEX03-68	49.7	CPMEX05B-19	--- ²
CPMEX02-51	51.78	CPMEX03-72	51.51	CPMEX05B-26	80.80
CPMEX02-52	53.73	CPMEX04-99	49.45	CPMEX05B-20	--- ²
CPMEX02-55	48.83	CPMEX04-100	54.58	CPMEX05B-48	43.20
CPMEX03-14	52.45	CPMEX04-122	70.90	MICH06-2	--- ²
CPMEX03-16	56.83	CPMEX05A-07	76.9	MICH06-3	--- ²
CPMEX03-20	114.26	CPMEX05A-08	47.58	MICH06-1	--- ²
CPMEX03-22	81.40	CPMEX05A-12	53.00	OAX05-1	79.8
CPMEX03-24	45.17	CPMEX05A-14	60.7	OAX05-3	57.51
CPMEX03-26	44.18	CPMEX05A-15	58.34	MONTO DE BORDO	--- ²
CPMEX03-29	62.33	CPMEX05A-17	52.18		
CPMEX03-30	70.47	CPMEX05A-18	53.45		

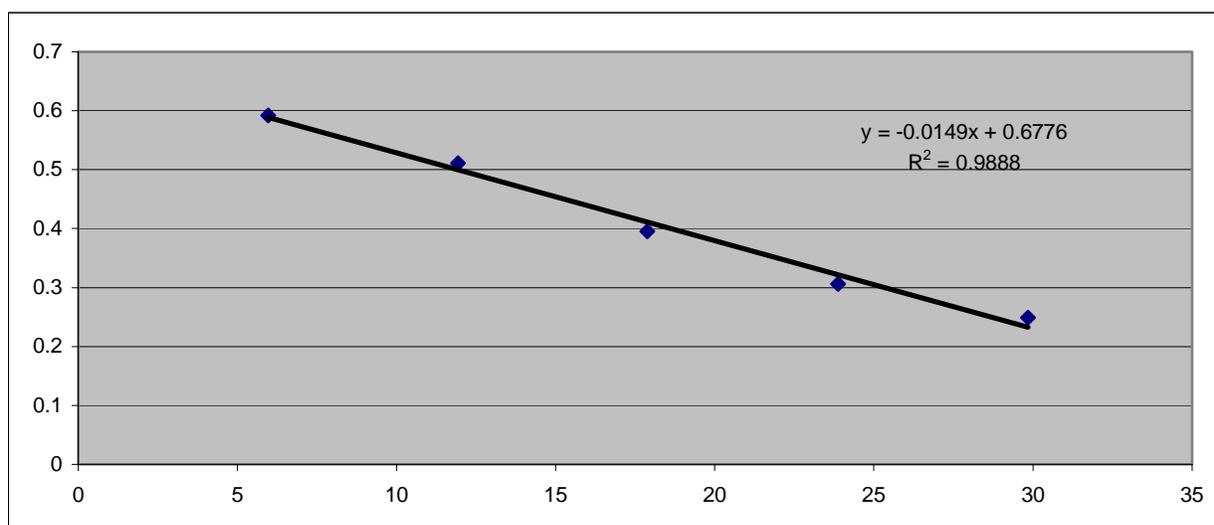
¹ g de semilla/ planta

² Dato no reportado

Anexos III

Curva patrón de metionina

Curva patrón ABS							
muestra/repeticiones	1	2	3	4	5	6	promedios
Blanco	0.7	0.677	0.675	0.682	0.714	0.72	0.694667
0.2	0.605	0.603	0.584	0.593	0.579	0.587	0.591833
0.4	0.508	0.508	0.498	0.524	0.499	0.528	0.510833
0.6	0.394	0.384	0.387	0.4	0.407	0.4	0.395333
0.8	0.301	0.334	0.289	0.31	0.303	0.3	0.306167
1	0.24	0.236	0.234	0.256	0.267	0.262	0.249167



Con teorica		Conc µg/ml	ABS	Conc
5.75	-0.085	5.96	0.591	0.2
11.19	-0.166	11.93	0.510	0.4
18.94	-0.282	17.88	0.395	0.6
24.92	-0.371	23.87	0.306	0.8
28.753	-0.428	29.84	0.249	1

Anexos IV

Tabla ANDEVA y datos de origen con los que se realizo

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado medio	Fo	Fo tablas			
					0.25	0.1	0.05	0.025
% Metionina	0.0073	6	0.00123	2.13	1.5	2.24	2.85	3.5
Error	0.0080	14	0.00058					
Total	0.0154	20						

Calculada + gradnde que de tablas Ho se rechaza

Repeticiones	g Metionina en 100g muestra			Totales	Promedio		
	1	2	3				
Tratamientos térmicos							
MC	0.522	0.510	0.515	0.798	1.547	0.515	2.395
SRC1M	0.507	0.516	0.528	0.803	1.552	0.517	2.409
SRC15M	0.480	0.531	0.528	0.791	1.539	0.513	2.370
SRC30M	0.528	0.500	0.526	0.805	1.554	0.518	2.415
R5hC10M	0.454	0.517	0.551	0.779	1.524	0.508	2.320
R12hA15MA	0.496	0.481	0.494	0.722	1.472	0.490	2.167
R12hA30MA	0.479	0.467	0.443	0.644	1.389	0.463	1.931
			Total		10.58	111.95	16.01
						5.33	5.33
			Suma cuadrados			5.346	
			SST			0.0154	
			Sstrat			0.0074	
			SS error			0.0081	

Anexos V

Tabla Resultados de la prueba de Rango múltiple de Duncan para todas las posibles combinaciones

Muestra original		Tratamiento térmico	Diferencia existente		Rangos de significación mínima	¿Diferencia significativa?
MC	vs.	SRC1M	$1.6 \cdot 10^{-3}$	<	0.04421	No
MC	vs.	SRC15M	$2.7 \cdot 10^{-3}$	<	0.04546	No
MC	vs.	SRC30M	$2.2 \cdot 10^{-3}$	<	0.04421	No
MC	vs.	R5hC10M	$7.8 \cdot 10^{-3}$	<	0.04630	No
MC	vs.	R12hCA15M	0.0251	<	0.04686	No
MC	vs.	R12hCA30M	0.0527	>	0.04713	Si
SRC1M	vs.	SRC15M	$4.3 \cdot 10^{-3}$	<	0.04546	No
SRC1M	vs.	SRC30M	$6.4 \cdot 10^{-3}$	<	0.04213	No
SRC1M	vs.	R5hC10M	$9.4 \cdot 10^{-3}$	<	0.04630	No
SRC1M	vs.	R12hCA15M	0.0267	<	0.04686	No
SRC1M	vs.	R12hCA30M	0.0543	>	0.04713	Si
SRC15M	vs.	SRC30M	$4.9 \cdot 10^{-3}$	<	0.04546	No
SRC15M	vs.	R5hC10M	$5.1 \cdot 10^{-3}$	<	0.04630	No
SRC15M	vs.	R12hCA15M	0.0224	<	0.04686	No
SRC15M	vs.	R12hCA30M	0.05	>	0.047136	Si
SRC30M	vs.	R5hC10M	0.01	<	0.04630	No
SRC30M	vs.	R12hCA15M	0.0273	<	0.04686	No
SRC30M	vs.	R12hCA30M	0.0549	>	0.04713	Si
R5hC10M	vs.	R12hCA15M	0.0173	<	0.04686	No
R5hC10M	vs.	R12hCA30M	0.0449	<	0.04713	No
R12hCA15M	vs.	R12hCA30M	0.0276	<	0.04713	No