



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

“RELACIÓN ENTRE EL DETERIORO DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*)
PROVOCADO POR UN ALMACENAMIENTO INADECUADO Y LA
GENERACIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

JOSE LUIS CADENA CRISÓSTOMO

ASESOR: M. en C. ENRIQUE MARTÍNEZ MANRIQUE.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A Dios por caminar a mi lado y nunca dejarme solo, por permitirme cumplir mis metas y dejarme conocer lo maravillosa que es la vida.

A mi mamá por haberme dado la vida, por haberme enseñado a crecer y estar junto a mí en momentos difíciles sin dejarme caer, te admiro y no podré agradecerte todo lo que me has brindado, te amo.

A mi papá gracias por mostrar interés en mis estudios y estar al pendiente de mí.

A mis hermanos:

A Carmen por enseñarme a disfrutar mi niñez, por darme su cariño y por ser una guía en mi camino de lucha, esfuerzos y superación. Te quiero mucho.

A Toña por que aún cuando no me conocía me ha dado su cariño, muchas gracias por apoyarme en momentos difíciles y por soportar mi mal carácter, te quiero mucho.

A Carlos por que siempre has estado conmigo, porque podemos compartir pláticas y ser amigos, te quiero mucho hermanito.

A mis sobrinos consentidos: Toñito y David por su cariño, inocencia y porque me han hecho sonreír, participar en sus juegos y travesuras, los quiero muchísimo.

A mis cuñados por el apoyo brindado en éste trabajo y amistad.

A mi abuelita Eloisa y familia Crisóstomo, por estar siempre al pendiente de mí, y brindarme su cariño sincero. Los quiero mucho. A Miguel, Ely y Chayo por su amistad y cariño, los quiero primos.

A M. en C. Enrique Martínez Manrique por la oportunidad que me brindo de formar parte de su equipo de trabajo, la confianza que puso en mí para lograr éste proyecto, por ser parte de mi enseñanza, por brindarme las herramientas necesarias, su tiempo y amistad.

A Marisol y Anallely por ser mis mejores amigas, por sus consejos y apoyo, espero siempre conservar su amistad y cariño, gracias por los momentos agradables que vivimos.

A Oscar J. G. Z. por ser un gran amigo, por brindarme sus buenos consejos y amistad.

A la generación 26 de IA, en especial a mis amigos con los que compartí momentos agradables y me brindaron su tiempo y apoyo; Jessy, Claudia, Nohemi, Marlen, Yami, Brenda, César, Karla y Paco.

A los integrantes de la Unidad de Granos y semillas de FES-C, a MM Gabriela Sánchez, MM Josefina Moreno, MC Ma. Cristina Pérez, MC Juan Carlos del Río por el apoyo brindado en la elaboración de éste proyecto.

A Ignacio Olvera por su apoyo y contribución en éste trabajo.

A Laurita Archeita por su tiempo, apoyo y amistad brindada durante mi estancia en UNIGRAS.

A mis compañeros de laboratorio de bioquímica y fisiología de granos y semillas por su amistad y hacer la estancia más placentera; Claudia Cabrera, Viridiana Moreno, Oscar, Gualberto, Selina y Rebeca.

A IBQ Leticia, MC Carolina, MC Carmen y Dr. Sergio por dedicar su tiempo en la revisión, por los consejos y su contribución realizada en ésta tesis.

Y a todas las personas que por algún motivo no están nombradas y en su momento han contribuido con consejos, palabras de aliento y amistad, les agradezco y los tengo presentes en el corazón.

A la UNAM, por ser haberme dado la oportunidad de aprender y superarme en sus aulas.

“En las mejores tierras que son la escuela
y el deporte se siembra la mejor semilla
que es la juventud”
Álvarez G.

ÌNDICE GENERAL

	Páginas
RESUMEN.....	i
INTRODUCCIÓN.....	iii
JUSTIFICACIÓN.....	v
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	1
1.1. Origen del frijol.....	1
1.2. Taxonomía.....	1
1.3. Morfología.....	2
1.4. Estructura del frijol.....	4
1.5. Composición química y valor nutrimental.....	6
1.6. Características de calidad del frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	10
1.7. Producción de frijol en México.....	11
1.8. Sistemas de comercialización del frijol.....	13
1.9. Problemas de deterioro del grano durante el almacenamiento.....	15
1.10. Estrés oxidativo en semillas.....	20
1.10.1. Relación entre radicales libres y estrés oxidativo.....	22
1.10.2. Alteraciones causadas por radicales libres.....	25
1.10.2.1. Peroxidación lipídica.....	25
1.10.2.2. Daño en proteínas.....	27
CAPÍTULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	30
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1. Cuadro metodológico.....	31
3.2. Metodología.....	32

3.3. Parámetros de deterioro	32
3.3.1. Determinación de tiempos de cocción	32
3.3.2. Pruebas de germinación	34
3.4. Análisis bioquímico	35
3.4.1. Escape de electrolitos.....	35
3.4.2. Producción de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	36
3.4.3. Producción de Malondialdehído.....	38
3.4.4. Determinación de carbonilos	39
3.5. Actividad enzimática	41
3.5.1. Determinación de peroxidasa (POX)	41
3.5.2. Determinación de catalasa (CAT)	42
3.5.3. Determinación de Superóxido dismutasa (SOD)	42
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
CONCLUSIONES	66
REFERENCIAS.....	67
ANEXOS	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Ejemplos de variedades de frijol por tipo de hábito de crecimiento.....	4
2.	Composición química promedio del frijol.....	7
3.	Composición química de diferentes variedades de frijol.	8
4.	Composición de aminoácidos de diferentes semillas	9
5.	Producción nacional de frijol hasta septiembre de 2006, incluye los ciclos otoño-invierno (2005-2006) y Primavera-verano (2006-2006)...	12
6.	Principales estados productores de frijol en el ciclo otoño-invierno 2005/2006	13
7.	Principales estados productores de frijol en el ciclo primavera-verano 2006/2006	13
8.	Tiempos de cocción (TC50) de frijol Flor de Mayo almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano	44
9.	Efecto del almacenamiento inadecuado sobre la germinación del frijol Flor de Mayo almacenadas a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano	45
10.	Escape de electrolitos de cotiledones de frijol Flor de Mayo almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano	47
11.	Concentración de peróxido de hidrogeno en frijol Flor de Mayo almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano	50

12.	Concentración de Malondialdehido en frijol Flor de Mayo almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano	52
13.	Proteína dañada en frijol Flor de Mayo secos y embebidos, almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano	55
14.	Actividad de la peroxidasa en frijol Flor de Mayo secos y embebidos, almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano	57
15.	Actividad de Catalasa en frijol Flor de Mayo secos y embebidos, almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano	59
16.	Actividad de la SOD en frijol Flor de Mayo secos y embebidos, almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano	61

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figuras	
1. Clasificación de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) por hábito de crecimiento	3
2. Corte longitudinal que muestra la estructura de la semilla de frijol ..	5
3. Sistemas de comercialización del frijol en México	14
4. Sistemas de almacenamiento de granos	16
5. Mecanismos de deterioro de semillas provocado por almacenamiento inadecuado y estrés oxidativo	21
6. Sistema supresor de EROs	23
7. Localización en la célula de las enzimas de defensa contra la oxidación	25
8. Peroxidación de ácidos grasos insaturados	26
9. Cocinador Mattson.....	33
10. Cinética de cocimiento de frijol	34
11. Germinación de frijol.....	35
12. Conductímetro (Concuctronic -PC45-).....	36
13. Fluorómetro Vicam V2.0	37
14. Espectrofotómetro Beckman DU-450	39
15. Espectrofotómetro Sequoia-Turner-340	41
16. Daño de membranas de frijol Flor de Mayo almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano	48
17. Concentración de peróxido de hidrógeno en frijol Flor de Mayo almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano	51

18.	Efecto de la lipoperoxidación en la estabilidad de la membrana durante la imbibición de frijol Flor de Mayo almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano	53
19.	Contenido de carbonilos de proteínas solubles de frijol Flor de Mayo almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano	56
20.	Actividad de la peroxidasa en frijol Flor de Mayo almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano.....	58
21.	Actividad de Catalasa en frijol Flor de Mayo almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano	60
22.	Actividad de SOD en frijol Flor de Mayo secos y embebidos, almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano	62
23.	Efecto de la acumulación de peróxido de hidrógeno sobre la actividad de la POX, SOD y CAT en frijol Flor de Mayo secas, almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano	65



RESUMEN

El frijol es una de las principales fuentes de consumo y de ingresos económicos para los productores mexicanos. La disponibilidad de esta leguminosa no solamente depende de la producción, sino también del manejo poscosecha; pues lo que se ha producido puede perderse por deficiencias en los sistemas de almacenamiento. Las pérdidas varían de región a región, de acuerdo a la situación geográfica, situación económica y avance tecnológico (Moreno, 1995).

El almacenamiento inadecuado de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) provoca reacciones de deterioro, las cuales afectan la calidad culinaria y agronómica de los granos y semillas respectivamente. El conocimiento sobre las bases moleculares que lo provocan, no están bien estudiados. Una posibilidad es que estas reacciones de deterioro sean provocadas, al menos en parte, por estrés oxidativo. El estrés oxidativo es un fenómeno en el cual se observa una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno, las cuales llegan a provocar daño celular en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.

En este trabajo, se estudió la generación de estrés oxidativo y la actividad del sistema enzimático de defensa contra la oxidación en frijol Flor de Mayo deteriorado, con la finalidad de identificar una posible relación entre el deterioro y éstos dos fenómenos.

Para ello se almacenaron semillas de frijol bajo condiciones inadecuadas con un contenido de humedad en la semilla de 15%, temperatura de 30°C y una atmósfera con el 21% de oxígeno en el almacén, durante 71, 103, 134 y 210 días de almacenamiento. Se evaluó la calidad del frijol determinándose sus tiempos de cocción y poder germinativo. Obteniendo como resultado el endurecimiento de cotiledones y con ello el incremento del tiempo de cocción, así como, la disminución del poder germinativo.



También se cuantificó escape de electrolitos, producción de peróxido de hidrógeno, oxidación de lípidos y daño en proteínas.

Lo que se encontró fue un incremento en la lixiviación de electrolitos y peroxidación de lípidos que indican un posible daño en membranas celulares de cotiledones del frijol. También se obtuvo un incremento de peróxido de hidrógeno y daño oxidativo en proteínas. Todo esto nos indicó la generación de estrés oxidativo en el frijol Flor de Mayo deteriorado.

Por último, se midió la actividad del sistema enzimático de defensa contra estrés oxidativo; catalasa (CAT), peroxidasa (POX) y superóxido dismutasa (SOD) y se encontró una disminución en su actividad en relación directa al grado de deterioro.



INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) a lo largo de la historia se ha convertido no sólo en un alimento tradicional, sino también en un aspecto de identificación cultural. Representa uno de los alimentos de importancia en México, ya que junto con el maíz aporta un gran porcentaje de las proteínas vegetales que consumen los estratos sociales de ingresos bajos, medios y en algunos casos hasta superiores.

El frijol representa para la economía de los productores una fuente importante de ocupación e ingreso, a la vez que es una garantía de seguridad alimentaria. El 68 por ciento de su producción se destina en forma directa al consumo final. Esta leguminosa representa una de las principales fuentes nutrimentales, ya que entre sus componentes mayoritarios se encuentran carbohidratos y proteínas, estas últimas destacan por su alto contenido en Lisina (aminoácido esencial del cual carecen los cereales).

Las semillas se deterioran durante períodos de almacenamiento inadecuado prolongado, se refiere a condiciones con temperaturas arriba de los 20°C, contenido de humedad del grano mayores al 12%, humedades relativas mayores a 65% y la presencia de oxígeno, así como tiempo de almacenamiento prolongado. Todos estos factores influyen en el deterioro de las semillas. El almacenamiento inadecuado reduce la viabilidad de las semillas, así como también, el grano pierde su calidad culinaria (sensorial y nutritiva) (Elías, 1982).

La presencia del oxígeno en el almacén puede promover la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) como radicales libres que pueden provocar reacciones indeseables en granos y semillas provocando su deterioro. Las especies reactivas dañan las células. Las ERO son formadas durante reacciones de óxido-reducción y durante la reducción incompleta del oxígeno o la oxidación del agua. Ejemplos de estas ERO son el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), los



radicales hidroxilo ($\text{OH}\bullet$) y perhidroxilo ($\text{O}_2\text{H}\bullet$). Estas moléculas reactivas son altamente destructivas para lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

A este conjunto de reacciones y compuestos generados por presencia de oxígeno se conoce como estrés oxidativo.

Las semillas poseen mecanismos de protección que se deshacen de estas moléculas reactivas de oxígeno mediante el uso de sistemas de defensa con antioxidantes. El sistema antioxidante de defensa incluye antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Entre las enzimas antioxidantes se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y peroxidasa (POX). La susceptibilidad a estrés oxidativo depende en general del balance entre la producción de oxidantes y la capacidad antioxidante de la célula.

Se han realizado estudios en granos de soya y maíz, en los cuales se ha observado que su deterioro está relacionado con la presencia de estrés oxidativo, pero esto no se ha estudiado en granos de frijol, el cual también sufre deterioro en condiciones inadecuadas de almacenamiento.

El objetivo de este trabajo, fue determinar si existe una relación entre el deterioro de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y la generación de estrés oxidativo, provocado por un almacenamiento inadecuado, mediante la determinación de reacciones de deterioro como peroxidación de lípidos, daño en proteínas, daño en membranas, así como también el efecto sobre la actividad del sistema enzimático de defensa, Catalasa (CAT), Peroxidasa (POD) y Superóxido Dismutasa (SOD).



JUSTIFICACIÓN

El frijol es una de las principales leguminosas que se consumen en nuestro país, se considera básica en la dieta del pueblo mexicano, así como, la principal fuente de ingresos para los campesinos, además aporta una gran parte de las proteínas, carbohidratos, minerales y fibra en su dieta. Ésta leguminosa puede ser preparada en una gran variedad de formas y platillos.

En México no existen datos estadísticos precisos sobre las pérdidas poscosecha de los granos por lo que sólo existen estimaciones, sin embargo se reportan pérdidas a niveles anuales en granos almacenados fluctuando en el orden de 30% o superiores, y a nivel mundial se estima alrededor del 5-10% de la producción de granos (Moreno, 1995). Estas cifras incluyen las pérdidas del frijol por almacenamiento inadecuado.

Por lo que se sabe, durante el almacenamiento el frijol está sujeto a sufrir cierto deterioro, teniendo como consecuencia el incremento en el tiempo de cocción de dicho grano. El endurecimiento de las semillas se debe a que hay modificaciones en la pared celular que provocan el aumento en el tiempo de cocción del frijol. Una posible explicación de estas modificaciones en pared celular podría ser la generación de estrés oxidativo en las células del frijol deteriorado.

Por lo tanto, el conocimiento de las reacciones generadas por estrés oxidativo y los mecanismos de deterioro que éste provoca, nos proporcionaría el conocimiento necesario para tratar de esclarecer el daño provocado durante el almacenamiento del frijol y tratar de eliminar o al menos disminuir las pérdidas por almacenamiento inadecuado de esta leguminosa tan importante en nuestro país.



CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. Origen del frijol

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es una planta anual, herbácea, cultivada intensamente desde el trópico hasta las zonas templadas, no soporta heladas.

El frijol es una leguminosa originaria de América. Su producción se ha extendido desde los 52° latitud Norte hasta los 32° latitud Sur y desde el nivel del mar en América y Europa hasta altitudes a más de 3000 m snm en los Andes Sudamericanos. El frijol fue domesticado en las tierras altas de Latinoamérica hace más de 7000 años, identificándose dos puntos separados en los cuales se comenzaron a cultivar, uno en el altiplano Mexicano (Valle de Tehuacan, Puebla) y en los Andes Sudamericanos en Perú (Blancas, 2001).

La dispersión del frijol alrededor del mundo aparentemente siguió diferentes rutas. Los frijoles del altiplano se dispersaron a Centro América, norte de Brasil y en menor medida en el sudoeste de los Estados Unidos. Los Españoles y Portugueses se llevaron al frijol común de su centro de origen a Europa, África y otras partes del nuevo mundo (Martínez, 2003).

1.2. Taxonomía

El género *Phaseolus* tiene unas 180 especies aproximadamente y de ellas el 70% son originarias de América y el 20% de Asia y África.

Desde el punto de vista taxonómico esta especie es prototipo del género *Phaseolus* (Solórzano, 1998).



Reino	<i>Plantae</i>
Orden	<i>Leguminosa</i>
Familia	<i>Papilionaceae</i>
Tribu	<i>Phaseoloideae</i>
Subtribu	<i>Phaseolina</i>
Género	<i>Phaseolus</i>
Especie	<i>Phaseolus vulgaris L.</i>

Su nombre científico es *Phaseolus vulgaris*. Algunos de sus nombres comunes son: frijol, habichuela, judía común, alubia, cholo, ayote, french bean, entre otros.

1.3. Morfología

El frijol *Phaseolus vulgaris*, es una leguminosa anual con período vegetativo entre 75 días para las variedades precoces del clima cálido moderado, a 270 días para las de tipo de enrame o volubles tardías de los climas fríos (Solorzano, 1998).

Existen más de doscientas variedades de frijol, de diferentes colores, volumen, sabor y composición química. Existen de acuerdo a norma tres grados de calidad en los que se encuentra la categoría extra, primera y segunda categoría. El frijol en todos sus grados de calidad se designan de acuerdo a su coloración en las siguientes clases: negros, en los que se encuentran las variedades de jamapa, querétaro y san luis, entre los claros se encuentran: azufrado, alubia, amarillo mostaza, flor de Mayo, flor de junio, bayo, peruano y garbancillo y entre otras clases se encuentran bayo berrendo, bayo blanco, flor de abril, manzano y pinto delicias (NMX-FF-038-SCFI-2002).

Los más consumidos son generalmente de color rosa, negro, café o blanco, y sus nombres como se conocen en el mercado son: azufrados, bayo gordo, blanco, canelo, cócona, mexicano, negro, ojos de liebre, palacio, rosita, flor de mayo, peruano, negro jamapa, xinacalteca, etcétera.

El frijol se puede clasificar de acuerdo a su tamaño: chicos (< 25 g / 100 semillas), medianos (25 a 40 g / 100 semillas) y grandes (> 40 g / 100 semillas).

También existe una clasificación por hábito de crecimiento (Tabla 1), en los que se consideran:

Tipo I. De mata; generalmente poseen pocos nudos; terminan en inflorescencia; permanecen erectas; tienden a ser de semilla grande, precoces, con período de floración corto, de bajo potencial de rendimiento, de madurez más uniforme, tallo fuerte y grueso, vainas relativamente altas, largas y suaves a la cocción (Figura 1).

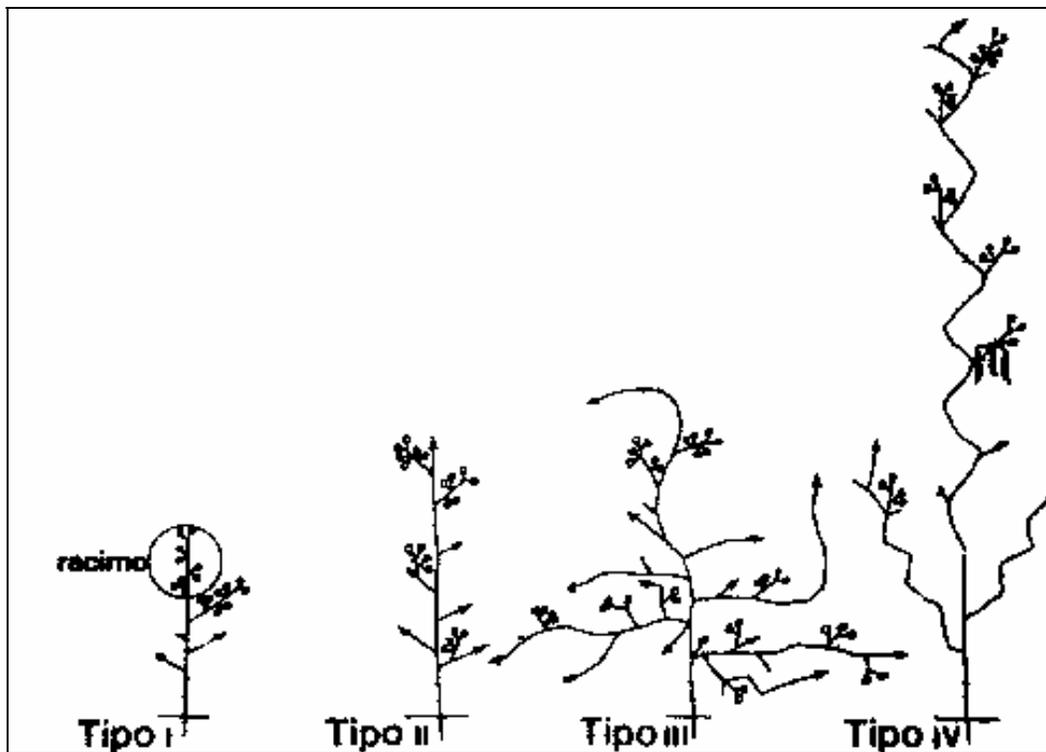


FIGURA 1. Clasificación de frijol (*Phaseolus vulgaris*) por hábito de crecimiento.

FUENTE: Obrador, 1984.



Tipo II. Presentan guía en el tallo principal y las ramas no producen guías, de mayor potencial de rendimiento, mayor número de nudos (11 a 14), tienden a ser vainas y semillas chicas.

Tipo III. Son de alto potencial de rendimiento, mayor número de nudos y ramas (12 a 16), de varios colores y tamaños de grano.

Tipo IV. Tienden a trepar, existen de varios colores, con alto potencial de rendimiento, con 14 a 18 nudos.

Tipo V. De alto potencial de rendimiento, de 16 a 30 nudos, de varios colores y tamaño de semilla, generalmente en lugares donde llueve bien (Manual del Participante Producción Frijol).

TABLA 1. Ejemplos de variedades de frijol por tipo de hábito de crecimiento.

Tipo de hábito de crecimiento	Variedades
I	Bayomex, Canario 107, Flor de Durazno, Negro Perla y Peruano 87
II	Variedad como Jamapa
III	Bayo Mecentral, Flor de Mayo , Azufrado, Tapatío, Negro otomí y Negro
IV	Negro puebla, Amarillo, San Francisco, Garbancillo
V	Garbancillo Zarco, Rosa de Castilla, Morado de agua y Cejita

FUENTE: INIFAP, 1993.

1.4. Estructura del frijol

La semilla madura de *Phaseolus vulgaris* consta de dos estructuras principales, embrión (Cotiledones) y cubierta de la semilla o testa. En la figura 2 se muestra la estructura de la semilla de frijol (Blancas, 2001).

a) La testa o cáscara es la estructura externa que envuelve la semilla y puede estar constituida por hilio, que es una cicatriz ovalada que aparece en el lugar donde la semilla estaba unida al funículo. A un lado del hilio se localiza una abertura, el micrópilo y al otro lado se localiza un borde llamado rafe.

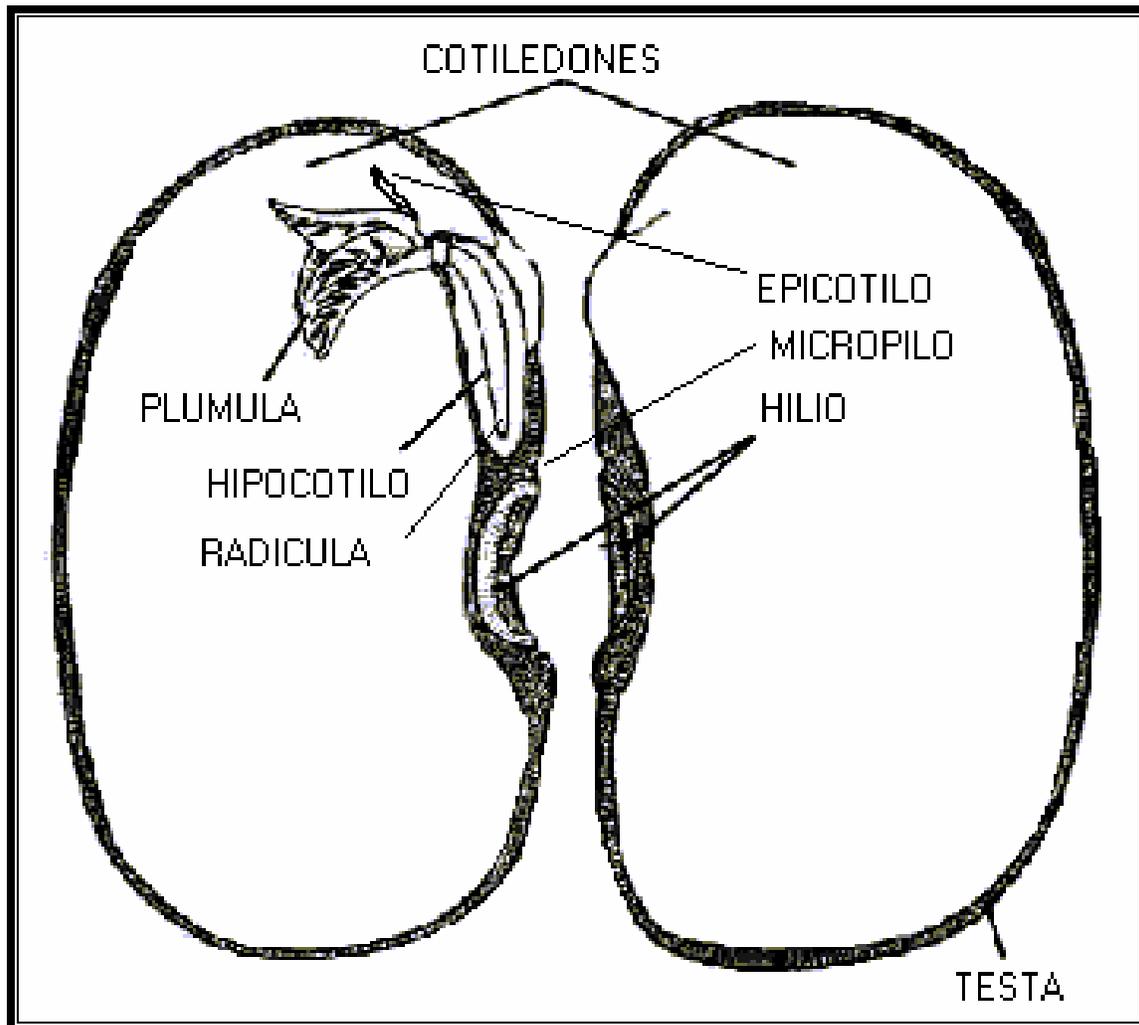


FIGURA 2. Corte longitudinal que muestra la estructura de la semilla de frijol.

FUENTE: D'Antonino, 1993.

La testa tiene como funciones:

- ❖ Mantener unidas las partes internas de las semillas.
- ❖ Proteger las partes internas contra choques y abrasiones.



- ❖ Servir como barrera a la entrada de microorganismos en la semilla.
- ❖ Regular la velocidad de rehidratación de la semilla, evitando o disminuyendo posibles daños causados por las presiones desarrolladas durante la absorción.
- ❖ Regular la velocidad de los cambios gaseosos (oxígeno y gas carbónico).
- ❖ Regular la germinación.

b) El embrión consiste de un eje embrionario con dos cotiledones, la radícula y la plúmula, tiene función reproductiva con capacidad para iniciar divisiones celulares y crecer. Se trata de un eje porque inicia el crecimiento en dos direcciones; hacia las raíces y tallo. Generalmente, el eje embrionario es pequeño con respecto a las demás partes de la semilla.

Los cotiledones son abultados y constituyen el 90% de la masa de la semilla, exhiben una estructura altamente organizada, contienen células parenquimatosas unidas por una pared celular distinta (Liu, 1995).

Estas células, contienen gránulos de almidón elípticos embebidos en una matriz proteínica consistente de cuerpos proteínicos esféricos y relativamente menores que los gránulos de almidón, están rodeados por una membrana lipoproteíca.

1.5. Composición química y valor nutrimental

Respecto a la importancia nutricional, el frijol esta constituido de carbohidratos, proteínas, lípidos y minerales, entre sus componentes mayoritarios están los carbohidratos y las proteínas que son de buena calidad nutrimental, como se observa en la tabla 2.

Existen pequeñas diferencias en su composición, dependiendo de la variedad (tabla 3), entre las características más importantes de su composición se encuentran las siguientes:

Carbohidratos: el 57 % de los glúcidos está formado por almidón y el 40% restante son pentosas, gomas, dextrinas, sacarosa y galactosa.

Una pequeña cantidad de los monosacáridos están presentes en forma libre y el resto se encuentra como componente de glucósidos o como unidades en varios oligosacáridos o polisacáridos. La D-glucosa, D-manosa, D-galactosa y D-fructuosa, son los monosacáridos más comunes en el frijol (Cornejo, 1993).

TABLA 2. Composición química promedio del frijol.

Nutrientes	%
Humedad	10.4
Proteínas	22.6
Lípidos	1.5
Carbohidratos	57.6
Celulosa	4.73
Minerales	3.7

FUENTE: James, 1981.

Oligosacáridos: son polímeros de azúcar con menos de diez monosacáridos en una molécula, pueden ser reductores o no-reductores. Los oligosacáridos no reductores más abundantes son la rafinosa, estaquiosa y verbascosa, éstos son importantes por que provocan un mal estomacal conocido como flatulencia.

La celulosa es el polisacárido estructural que le imparte mayor rigidez y fuerza al grano (Cornejo, 1993).



TABLA 3. Composición química de diferentes variedades de frijol.

Especie	Agua %	Proteína (g)	Lípidos (g)	Carbohidratos		Cenizas (g)
				Total (g)	Fibra (g)	
Fríjol blanco	10,9	22,3	1,6	61,3	4,3	3,9
Fríjol rojo	10,4	22,5	1,5	61,9	4,2	3,7
Fríjol negro y castaño	11,2	22,3	1,5	61,2	4,4	3,8

FUENTE: D'Antonio, 1993.

La pared celular tiene un papel importante en actividades como la absorción, transpiración, translocación, secreción y reacciones de reconocimiento. En las células del cotiledón encontramos:

- ❖ Lámina media, es una zona libre de celulosa y se compone principalmente de pectina.
- ❖ Pared primaria se forma después de la división celular, antes de que la célula complete su crecimiento, es una estructura que se expande y se acomoda durante el crecimiento de la célula.
- ❖ Pared secundaria tiene una alta proporción de celulosa (Martínez, 2003).

Lípidos: la mayor fracción la representa los triglicéridos neutros y los principales ácidos grasos saturados presentes en el grano son: palmítico, esteárico, y los ácidos grasos insaturados comunes son el oleico, linoleico y linolénico que son esenciales y por lo tanto de gran valor nutrimental (Méndez, 2002).

Proteína: tiene alto contenido de proteína, es un alimento con un alto contenido de Lisina. Contiene gran cantidad de proteína soluble, las proteínas son pobres en aminoácidos azufrados.



La composición de aminoácidos del frijol, maíz, avena y arroz mostradas en la tabla 4, demuestran que esta leguminosa es de gran importancia en la dieta de la población, ya que contiene mayor cantidad en lisina a diferencia de los cereales, sin embargo, se complementan incrementando su aporte nutrimental.

Los estudios indican que la mayor parte de las proteínas del grano son globulinas (75%) y albúminas (Moreno Pérez, 1995).

TABLA 4. Composición de aminoácidos de diferentes semillas.

Alimento	Maíz	Avena	Arroz	Frijol
Aminoácidos (mg / 100 mg de alimento)				
Isoleucina	350	526	296	927
Leucina	1190	1012	581	1685
Lisina	254	517	255	1593
Metionina	182	234	150	234
Cisteina	147	372	108	188
Fenilalanina	464	698	342	1154
Tirosina	363	459	226	559
Treonina	342	462	234	878
Valina	461	711	408	1016

FUENTE: FAO, 1970.

El frijol contiene caroteno, vitaminas como: tiamina, riboflavina, ácido nicotínico (Cornejo, 1993), Niacina y Vitamina B₆. Contiene una gran cantidad de minerales como: Calcio, Hierro, Cobre, Zinc, Potasio, fósforo y Magnesio (Méndez, 2002). En 100 gramos de frijoles crudos hay cerca de 5 miligramos de vitamina C.



1.6. Características de calidad del frijol (*Phaseolus vulgaris*)

La calidad de las semillas es una serie de cualidades que deben reunir en conjunto y no en forma aislada; en general las semillas que poseen alta calidad presentan alto grado de pureza botánica, bajo contenido de humedad, alta sanidad, alta viabilidad, alto vigor, bajo nivel de daño mecánico, buen tamaño, color, buen peso, alto grado de uniformidad, buena apariencia y el tiempo de cocción.

Una de las principales características de la calidad es la germinación, la cual se define como la etapa que comprende desde la emergencia y desarrollo de una plántula, hasta que el aspecto de las estructuras esenciales reflejen su capacidad para originar una planta normal, bajo condiciones favorables de temperatura, humedad relativa y luz (Smith y Berjak, 1995).

La germinación de las semillas, como atributo de calidad, por mucho tiempo ha sido una característica importante: como unidad de reproducción, se espera que produzcan plantas sanas y vigorosas en campo y, para ello, deben germinar. La máxima germinación se expresa como porcentaje del total de semillas que germinan, hecho por el que se le conoce como porcentaje de germinación o poder germinativo. La calidad de una semilla se mide como aquella que germina o no, ya que si no germina pierde su importancia agronómica para los productores (Camacho, 1994).

Entre los diferentes factores que influyen en la germinación y vigor de las semillas se consideran: 1) factores genéticos, 2) efectos de maduración y tiempo de cosecha, 3) daños mecánicos, 4) condiciones de almacenamiento (temperatura y humedad relativa) y 5) factores intrínsecos (cambios en macromoléculas y acumulación de sustancias tóxicas). Entre los cambios que ocurren asociados con el deterioro de semillas y pérdida de germinación como consecuencia de los factores anteriores se encuentran: 1) la anormalidad de cromosomas y daño de DNA, 2) cambio en la síntesis de RNA y proteínas, 3) cambio en actividad



enzimática y reservas, 4) diferencia en actividad respiratoria y producción de ATP y 5) alteración de membranas (Smith y Berjak, 1995).

La calidad del grano también está asociado a características como el tiempo de cocción, sabor y su valor nutricional determinados por el contenido de proteína y su digestibilidad (Pérez, *et al*, 2002).

Una de las características de aceptabilidad más importante que determina la calidad de cocción de los granos de leguminosas es el tiempo que se necesita para suavizarlo durante el proceso de cocción, un ejemplo importante es que en frijol con buena calidad de cocción adquiere un grado de suavidad aceptable para el consumidor en un tiempo aproximado de 40 minutos (Martínez, 2003). Esta característica es muy apreciada por el consumidor ya que tiene repercusiones a nivel económico y sensorial, en el caso de, económicas porque a mayor tiempo de cocción se requiere de mayor combustible para el proceso de cocción y sensorial porque el sabor y textura del grano sufren un deterioro notable (Elías, 1982).

También para mejorar los tiempos de cocción se sabe que el remojo de las semillas mejora su calidad de cocción, de igual manera si el remojo se realiza con soluciones salinas de hidróxido de sodio, carbonato de sodio o bicarbonato de sodio se favorece la absorción de agua y se reduce los tiempos de cocción (Martínez, 2003).

1.7. Producción de frijol en México

México es el cuarto país productor de frijol del mundo, después de La India, Brasil y China (Cámara de diputados, 2000). El cultivo del frijol junto con el de maíz, representa toda una tradición productiva y de consumo, cumpliendo diversas funciones de carácter alimentario y socioeconómico que le han permitido trascender hasta la actualidad.



El frijol representa para los productores una fuente importante de ocupación e ingreso, a la vez que es una garantía de seguridad alimentaria. El 68 por ciento de su producción se destina en forma directa al consumo final, representando una de las principales fuentes de proteína para amplias capas de la población mexicana. Asimismo, su consumo es generalizado (SAGARPA, 2000). Por esto, la importancia de este grano en la dieta actual del país es fundamental. Se puede observar en la tabla 5, la producción de frijol a nivel nacional hasta septiembre de 2006, para los ciclos otoño-invierno (2005-2006) y primavera-verano (2006-2006) (SAGARPA, 2006).

TABLA 5. Producción nacional de frijol hasta septiembre de 2006, incluye los ciclos otoño-invierno (2005-2006) y primavera-verano (2006-2006).

Producto.	Producción (Toneladas)
FRIJOL	395,532

FUENTE: SAGARPA. Servicio de información y estadísticas agroalimentaria y pesquera (SIAP), con información de las delegaciones de la SAGARPA en los Estados.

El frijol ocupa el segundo lugar en importancia dentro de la superficie de los diez cultivos principales del país. La cosecha de frijol, depende de manera predominante de los volúmenes que se obtienen en la superficie de temporal y cubren aproximadamente tres cuartas partes del total de la oferta nacional de este producto. La producción de frijol es muy vulnerable a las condiciones climatológicas que prevalecen durante el ciclo productivo, debido a que aproximadamente el 87% de la superficie destinada a este cultivo se ubica en áreas de temporal. Por lo que la principal limitante en su producción, la constituye sin duda la escasa disponibilidad de agua, fenómeno que se agudiza en regiones con bajo régimen pluvial (SAGARPA, 2000). En las tablas 6 y 7 se muestran los principales Estados productores de frijol a nivel nacional.



TABLA 6. Principales Estados productores de frijol en el ciclo otoño-invierno 2005/2006.

Entidad federativa	Producción (Toneladas)
Sinaloa	164,781
Nayarit	75,160
Chiapas	28,152

FUENTE: SAGARPA. Servicio de información y estadísticas agroalimentaria y pesquera (SIAP), con información de las delegaciones de la SAGARPA en los Estados.

La producción de frijol está orientada a satisfacer la demanda de la población, principalmente el autoconsumo; debido a que esta leguminosa ocupa un lugar importante dentro de su dieta, por ser uno de los alimentos básicos de los estratos sociales de menores ingresos de la ciudad y el campo.

TABLA 7. Principales Estados productores de frijol en el ciclo primavera-verano 2006/2006.

Entidad federativa	Producción (Toneladas)
Zacatecas	22,871
Chiapas	13,135
San Luis Potosí	10,853

FUENTE: SAGARPA. Servicio de información y estadísticas agroalimentaria y pesquera (SIAP), con información de las delegaciones de la SAGARPA en los Estados.

1.8. Sistemas de comercialización de frijol

La comercialización del frijol se realiza de manera ineficiente desde varias décadas atrás, debido a la falta de información y alternativas que plantean los diferentes mercados regionales, así como, a la falta de conocimiento relacionado con los hábitos de consumo de nuestra población, la baja calidad en la presentación del producto, deficiencia en procesos de transformación, deficientes métodos de almacenamiento, la falta de estrategias para una mejor comercialización y distribución del mismo, todo esto repercute negativamente en el precio pagado al productor por su grano.

La forma en que se comercializa la mayor parte de la producción de frijol (figura 3), es a granel, en costales, sin que tenga alguna clasificación o limpieza, además, no recibe un adecuado transporte, almacenamiento y proceso de transformación, por lo cual al final de todo el sistema de comercialización se obtiene un producto de baja calidad y por ello es castigado vía precio (SAGARPA, 2000).

Entre los principales canales de comercialización del frijol en el mercado nacional se mencionan los siguientes:

1. La venta del grano por parte del productor a los intermediarios locales o foráneos.

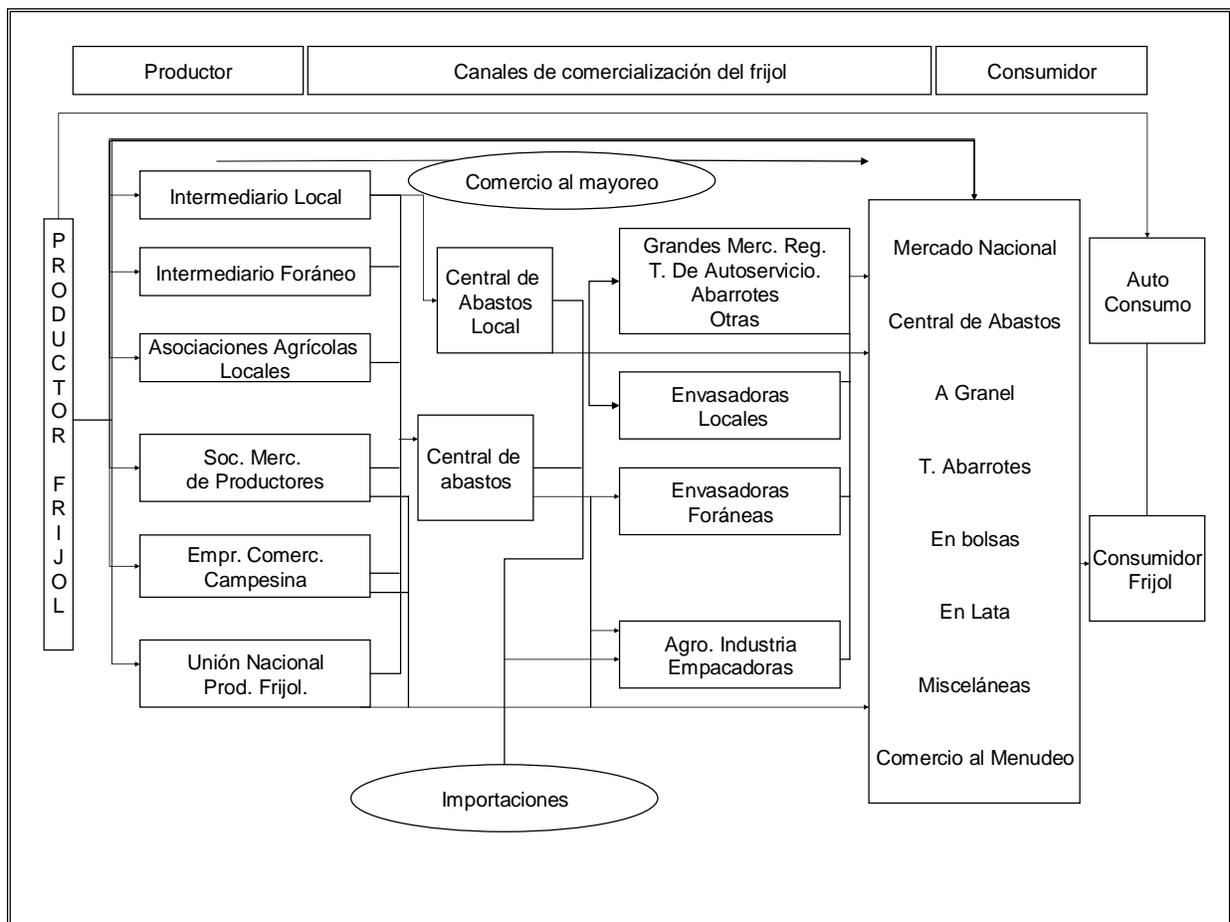


FIGURA 3. Sistemas de comercialización del frijol en México.

FUENTE: SAGARPA, 2000.



2. La venta del grano a asociaciones agrícolas locales. Su finalidad es regular la oferta de este grano, para que de este modo, puedan obtener mejores precios en el mercado nacional.

3. La venta a través de sociedades mercantiles, integrados por los mismos productores, constituyen canales de comercialización que aún no tienen gran presencia, debido a los volúmenes poco representativos que mueven la compra y venta del producto (SAGARPA, 2000).

Desde el punto de vista de comercialización de frijol, hay una gran variedad de canales por los que se puede adquirir y consumir frijol, la problemática que ocurre después de la cosecha y durante la comercialización de los granos es que es necesario llevar a cabo un adecuado almacenamiento.

1.9. Problemas de deterioro del grano durante el almacenamiento

El almacenamiento es una de las operaciones más importantes que hay que cuidar en los granos, ya que las leguminosas se pueden conservar durante bastante tiempo, sin embargo es recomendable mantener las más estrictas condiciones de almacenamiento, ya que el no realizarlas puede provocar su pérdida y repercutir en la economía de los productores. Un deficiente almacenamiento (Figura 4) se puede observar en regiones de escasos recursos económicos, principalmente lugares en los que la producción de frijol se destina para el autoconsumo y con esto hay pérdidas considerables por el almacenamiento inadecuado.

Entre las principales causas de pérdidas cualitativas y cuantitativas de las semillas almacenadas se consideran a los hongos, insectos y roedores, además del excesivo contenido de humedad en la semilla, la alta temperatura y la alta humedad relativa (Moreno, 1995).



Una adecuada conservación de granos y semillas dependen esencialmente de la ecología de la región considerada; del tipo de troje, bodega o almacén disponible; del tipo y condiciones del grano o semilla por almacenar y de la duración del almacenamiento.

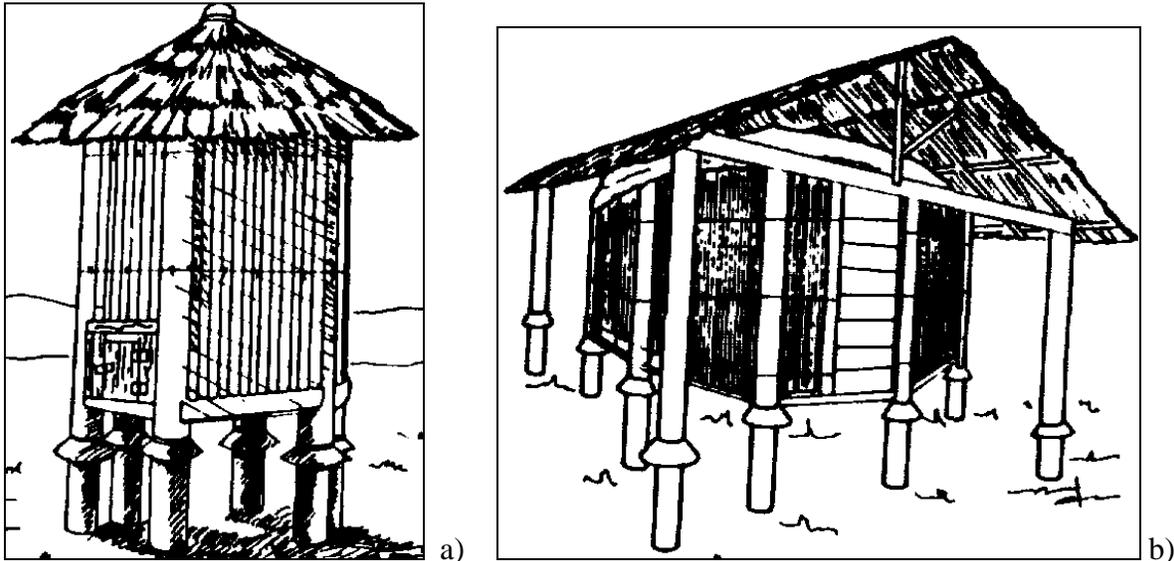


FIGURA 4. Sistemas de almacenamiento de granos.

a) Troje y b) Bodegas tradicionales.

FUENTE: D'Antonino (1993).

Los factores físicos más favorables para el deterioro de granos y semillas en el almacenamiento, son humedad del grano, temperatura y humedad relativa (Elías, 1982).

El deterioro de los granos se incrementa mucho más cuando estos factores físicos actúan al mismo tiempo y en el mismo sentido; cuando solamente uno de ellos es favorable, el otro se convierte entonces en un factor limitante en el proceso que, finalmente determinará la conservación del grano o semilla.

La humedad es el factor más importante en la conservación de los granos, ya que la disponibilidad de agua es determinante en el desarrollo de los insectos y de hongos de almacén (Moreno, 1995).



Las altas humedades relativas, ocasionan que el contenido de humedad en los granos y semillas se equilibre en porcentajes de humedad muy peligrosos para su conservación, aún tratándose de cortos periodos de almacenamiento. Por ejemplo, en 25°C de temperatura y un 75% de humedad relativa en el medio ambiente, el grano de maíz alcanza con facilidad un equilibrio dinámico de casi 15% de contenido de humedad. (Ramírez, 1981). Esta condición contribuye y acelera el deterioro del grano.

La conservación de granos y semillas es un problema complicado y difícil de resolver, debido a la concurrencia de diversos factores que influyen en ella y que producen pérdidas durante su almacenamiento.

Los principales factores, en orden de importancia que determinan y acentúan las pérdidas de los granos que se almacenan son:

- La carencia de almacenes adecuados para el manejo del grano.
- El alto contenido de humedad e impurezas del grano en el momento de almacenar.
- La presencia de plagas.
- El manejo deficiente de granos o semillas.
- El desconocimiento de los principios de conservación de granos.

De estos factores, los más importantes son: la carencia de almacenes adecuados, el alto contenido de humedad de los granos y la atmósfera de almacenamiento.

a) La carencia de almacenes adecuados.

El almacén, bodega, bidones, cuescomate o troje (Moreno, 1995), es el lugar que determina, en gran parte, con que seguridad se conservarán los granos. Este tipo de construcción, su localización y funcionamiento deben ser planeados



específicamente, atendiendo a las necesidades regionales o nacionales con respecto al volumen de producción y a las condiciones climáticas.

La función de un almacén, es proporcionar a los granos toda la protección posible contra los factores adversos del medio ambiente, para garantizar su conservación adecuada a corto y largo plazo. El almacén debe proteger a los granos y semillas de los factores físicos del medio ambiente, como la excesiva humedad o las temperaturas extremas que los perjudican, así como, los factores bióticos como las plagas de insectos, hongos, bacterias, ratas y aves (Ramírez, 1981).

Además al momento de iniciar el almacenamiento es importante la limpieza del almacén y verificar como llega el grano del campo (Moreno, 1995). Cuando los granos y semillas se almacenan en bodegas sin protección adecuada, no se asegura la conservación de la calidad de los granos y de esta manera perderá su valor económico inicial, debido al mal almacenamiento.

La disponibilidad de buenos almacenes y el manejo de los granos es un factor muy deseable que sin duda disminuye las pérdidas mundiales de granos, y permite disponer de mayores volúmenes alimenticios para las necesidades de la población.

b) Alto contenido de humedad en el momento de almacenarlo.

Cuando los granos son almacenados con alto contenido de humedad, automáticamente se predispone a un metabolismo alto y calentamiento excesivo o espontáneo, debido a su alto rango respiratorio. Entre más seco se encuentre el grano almacenado y más baja sea la temperatura en el almacén, la conservación de éste será mucho mejor.



Las condiciones ecológicas en el área de almacenamiento, tienen una influencia decisiva sobre los granos que allí se van a depositar, porque este grano forzosamente tienen que alcanzar un equilibrio de humedad con la humedad relativa del aire.

El contenido de humedad para almacenar con seguridad al frijol se encuentra en 11%, y con un 65% de humedad relativa, ya que esta humedad es límite en la cual los factores bióticos del medio ambiente empiezan a ser desfavorables a la conservación del grano almacenado (Ramírez, 1981).

En México, no se ha dado gran importancia al almacenamiento de granos, ya que un almacén bien equipado tiene costos muy elevados y éste tendría que ser agregado al valor económico de los granos, por ello los granos y semillas en nuestro país pueden sufrir pérdidas y deterioro por las condiciones de temperatura y humedad relativa altas que tenemos en las zonas productoras más importantes. Además, la carencia de equipo para secar, limpiar y mantener los granos en buen estado durante su transporte y almacenamiento hacen su conservación lo más desfavorable posible y por lo tanto, vulnerables al ataque por roedores y aves que merman las cosechas de manera cualitativa y cuantitativa (Moreno, 1995).

C) Atmósfera de almacenamiento.

Los sistemas de almacenamiento tradicionales son en presencia de aire, tal y como se encuentra en el medio ambiente (Figura 4). El 21% se compone de oxígeno, el 78% de nitrógeno, el resto son algunos otros elementos químicos en menor proporción. Las semillas son organismos conformados por células vivas que respiran para producir la energía necesaria para sus procesos metabólicos y requieren la presencia de oxígeno. La presencia de oxígeno en almacén promueve procesos de respiración y con ello reacciones bioquímicas de deterioro que pueden provocar daño de semillas por la formación de especies reactivas de oxígeno, las cuales provocan daño celular (Ramírez, 1981).



1.10. Estrés oxidativo en semillas

Existen diferentes investigaciones que tratan de explicar el deterioro de granos y semillas, principalmente leguminosas, en las cuales, se habla del defecto de Hard to cook (HTC) conocido como endurecimiento a la cocción. Esto se refiere al defecto en textura de leguminosas ya que se requiere de un tiempo mayor para lograr suavizar la semilla (Liu, 1995). Algunas teorías involucran y asocian el endurecimiento a factores como el grado de hidratación, grado de cocción, tiempo, temperatura y humedad de almacenamiento, cambios químicos y enzimáticos ocurridos en cotiledones durante el almacenamiento (Figura 5). Así como también la formación de pectatos insolubles en la lámina media de la pared celular, la lignificación de la lámina media y cambios en los compuestos fenólicos provocando reacciones entre proteína-lignina (Martínez, 2003).

El deterioro que se pretende explicar con mayor detalle, es el que se produce en leguminosas por condiciones inadecuadas de almacenamiento, las que se consideran son: temperaturas superiores a los 20°C, contenidos de humedad del grano mayor al 12%, humedad relativa mayor a 65%, así como tiempos de almacenamiento prolongado. Con estas características de almacenamiento inadecuado y la presencia de oxígeno durante el almacenamiento se puede inducir el estrés oxidativo, el cual se conoce como aquel proceso en el que la presencia de oxígeno puede generar especies reactivas de oxígeno (ERO) como radicales libres, los cuales, llegan a provocar reacciones de deterioro en los granos y semillas, este deterioro por presencia de oxígeno termina disminuyendo la calidad culinaria y nutrimental, así como, la calidad agronómica de los granos y semillas respectivamente, haciéndolas un alimento de baja calidad e inviables para la producción.

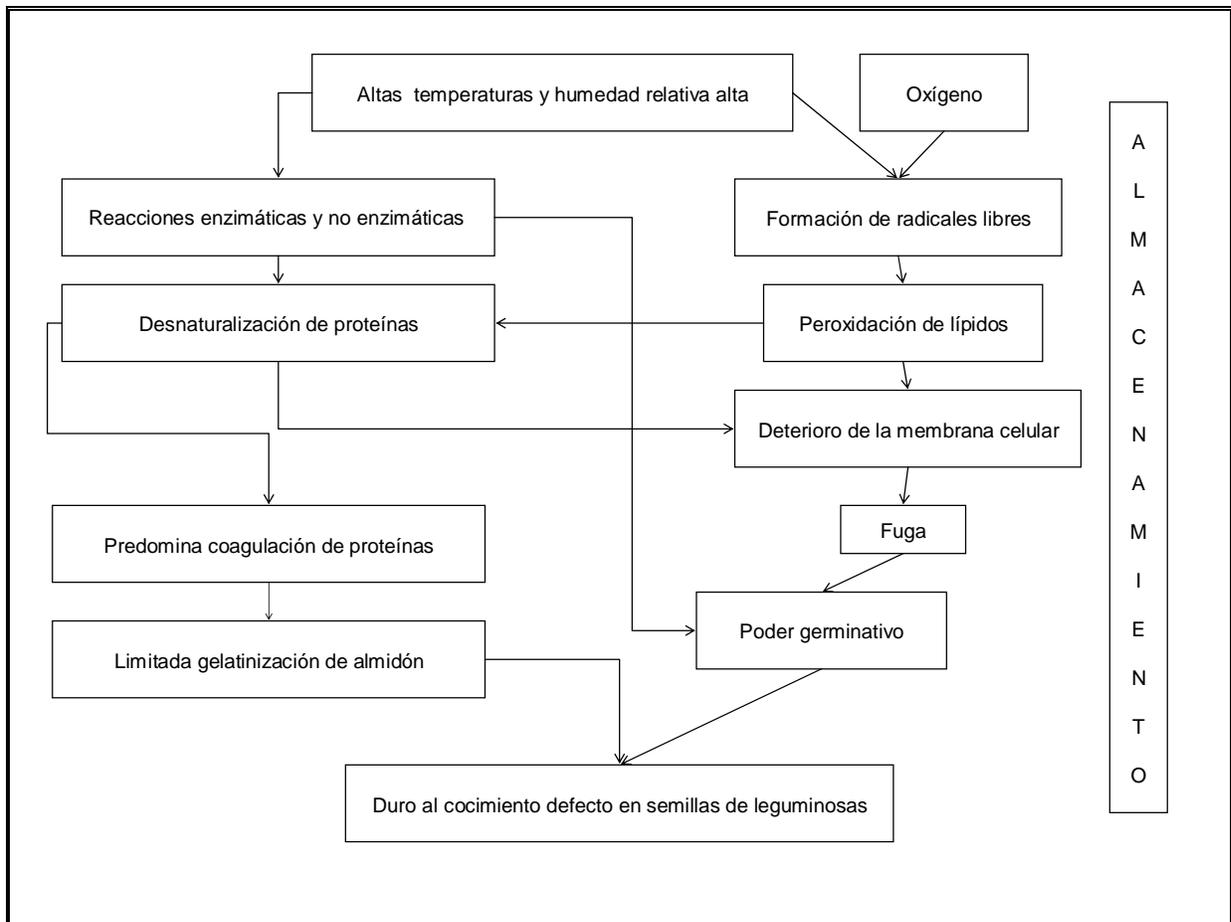


FIGURA 5. Mecanismos de deterioro de semillas provocado por almacenamiento inadecuado y estrés oxidativo.

FUENTE: Liu, 1995.

Se conocen mecanismos de protección que desechan las especies reactivas de oxígeno con la finalidad de proteger las células. Entre estos mecanismos de defensa antioxidante se encuentran los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Las enzimas antioxidantes eliminan el O_2^- y el H_2O_2 evitando así la formación de 1O_2 y OH^* . Esto para mantener el estado redox celular. Entre las enzimas antioxidantes en la célula se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y peroxidasa (POX). Entre los no enzimáticos se encuentran: vitamina C, α -tocoferol (vitamina E), carotenos y fenoles (Hansberg, 2002), todos estos mecanismos se encargan de protección celular contrarrestando el daño provocado por ERO.



1.10.1. Relación entre radicales libres y estrés oxidativo

Los radicales libres son cualquier especie atómica o molecular que tenga uno o más electrones no apareados, es decir, un número total impar de electrones.

Los radicales libres pueden ser derivados de muchos elementos químicos, sin embargo, los de mayor importancia desde el punto de vista biológico son los derivados de hidrógeno, oxígeno, carbono y nitrógeno.

El oxígeno molecular, al sufrir diferentes modificaciones o en el curso de su metabolismo da origen a radicales. Los radicales de oxígeno se denominan especies reactivas de oxígeno (ERO) (Camacho, 1999). Los ERO (radical anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo) se forman cuando una molécula de oxígeno acepta un electrón y se convierte en un radical con carga negativa, formando el anión superóxido (O_2^-); el segundo producto H_2O_2 no es realmente un radical, pero su importancia radica en que por captación de un electrón y de un protón puede dar lugar a la formación de una molécula de agua y a un radical hidroxilo (OH) (Bohinski, 1998), el cual tiene una alta velocidad de reacción con azúcares, aminoácidos, fosfolípidos y ácidos nucleicos, este compuesto se encuentra en células normales en concentraciones que pueden variar de nanomoles hasta cerca de 500 mMolar de su producción, dependiendo del sitio donde se produzca y de la célula (Hansberg, 2002).

Los radicales de oxígeno pueden destruir bacterias, lisar células, iniciar la peroxidación de lípidos de las membranas, atacar proteínas, inactivar enzimas y atacar ácidos nucleicos (Camacho, 1999). El radical superóxido puede reaccionar con complejos de metales de transición Fe-Cu, afectando la actividad de enzimas que contienen estos metales (Camarena, 2006).

Dentro de las células se generan ERO, que en condiciones normales son transformadas en especies de baja reactividad o no dañinas, mediante

mecanismos antioxidantes. La mitocondria se considera la principal fuente generadora de ERO, debido a que en la cadena respiratoria siempre se generan radicales superóxido como subproducto de la actividad de la misma. Existen dos sitios potenciales de generación de radicales superóxido en la cadena mitocondrial de transporte de electrones, estos son al nivel de la NADH deshidrogenasa y al nivel de la poza de quinonas. El transporte de electrones en la mitocondria también parece ser la fuente principal de peróxido de hidrógeno citoplásmico vía el O_2^- generado en la cadena transportadora de electrones (Camacho, 1999). El metabolismo celular aeróbico, al utilizar dioxígeno como último aceptor de electrones en la cadena respiratoria causa inevitablemente la producción de ERO (Díaz, 2006).

Existen, sistemas de defensa naturales contra radicales libres dentro de los sistemas biológicos por ejemplo: enzimas, entre las que se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), Peroxidasa (POD) y Catalasa (CAT) (Figura 6).

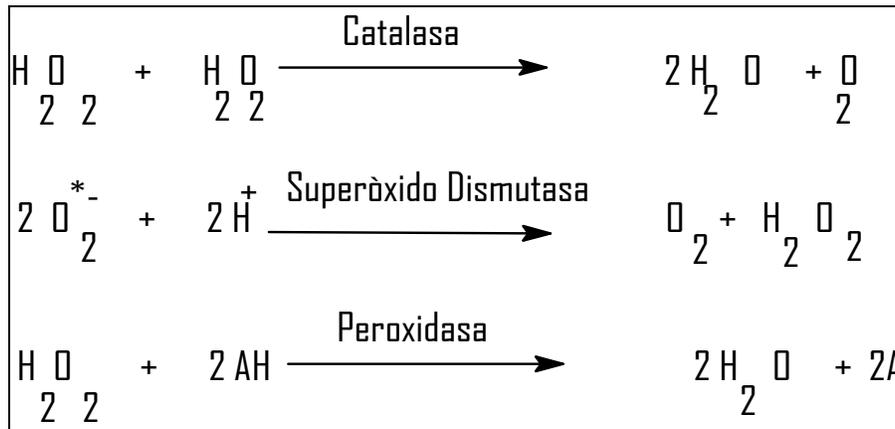


FIGURA 6. Sistema supresor de EROs.

FUENTE: Bohinski, 1998.



La superóxido dismutasa (SOD), son enzimas que catalizan la dismutación del radical anión superóxido (O_2^-) para dar oxígeno molecular (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (McCord y Fridovich, 1969), esta dismutación puede realizarse a una velocidad de $10^9 M^{-1} s^{-1}$ (Hansberg, 2002). La SOD se encuentra en la mitocondria (figura 7) en el espacio formado entre la membrana y la matriz.

Las peroxidasas (POD), que catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno por diversos donadores de electrones, realizándola a una velocidad del orden de $10^7 M^{-1} s^{-1}$ (Hansberg, 2002). Son proteínas pequeñas, ubícuas, que tienen una cisteína conservada en el sitio activo. La unidad funcional es el dímero, pero muchas son capaces de agruparse en decámeros de dímeros, se encuentran en concentraciones relativamente altas dentro de las células, algunas se encuentran en mitocondria y otras en cloroplastos, es aquí donde se degradan moléculas orgánicas liberando la energía química contenida en sus enlaces mediante un proceso que consume oxígeno, estas enzimas son activas a bajas concentraciones de peróxidos (< 0.1 mM) (Hansberg, 2002).

La catalasa (CAT) se encarga de catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno que se produce durante la respiración en H_2O y O_2 (Metzler, 1981), en un orden de 2 a $4 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ (Hansberg, 2002). Son homotetrámeros u homodímeros de subunidades de aproximadamente 60 kDa o de 80 kDa. Cada subunidad contiene una ferro-protoporfirina-IX (hemo b) o derivados del mismo como características estructurales, esta enzima se localiza en peroxisomas y mitocondrias de las células (Hansberg, 2002).

Si la actividad del sistema enzimático de defensa es insuficiente o se ve dañado, no se lleva a cabo la descomposición del ERO, o en el caso del peróxido de hidrógeno, este compuesto se puede ver catalizado por iones metálicos para formar el ion hidroxilo, que es un radical muy tóxico (Berlett y Stadtman, 1997).

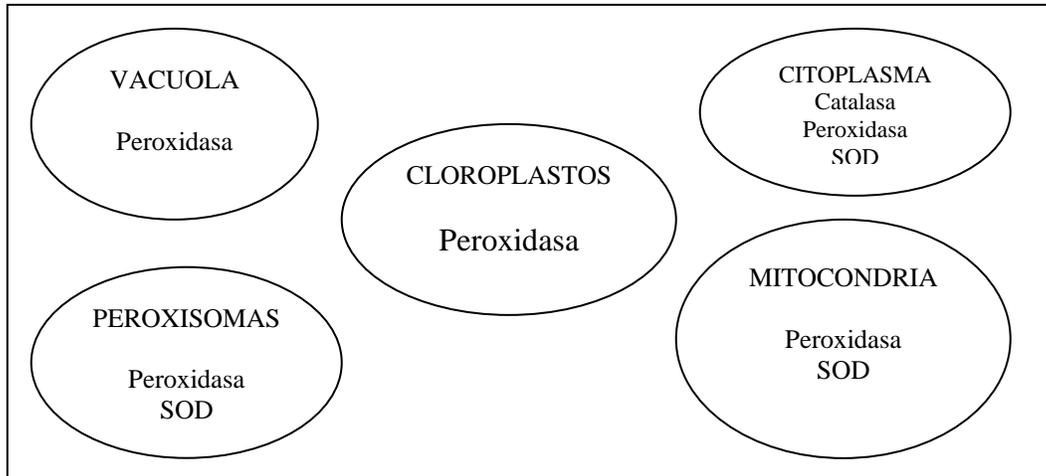


FIGURA 7. Localización en la célula de las enzimas de defensa contra la oxidación.

FUENTE: Camarena, 2006.

1.10.2. Alteraciones causadas por radicales libres

Si el balance en las células de radicales libres se modifica y los mecanismos de defensa son alterados, ya sea por incremento de radicales libres o debilitamiento de los mecanismos de defensa, los radicales libres pueden inducir reacciones que dañan moléculas de gran importancia biológica, como son: proteínas, procesos de síntesis de proteínas, enzimas, lípidos, lisis celular, etc.

1.10.2.1. Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica es un proceso en el cual los ácidos grasos insaturados son atacados por radicales libres que provocan la abstracción de un hidrógeno, formándose hidroperóxidos.

Los enlaces de las cadenas de los ácidos grasos son muy vulnerables a reacciones con agentes oxidantes fuertes como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical aniónico superóxido ($O_2^{\bullet-}$) o el radical hidroxilo ($\bullet OH$). La reacción de oxidación convierte el ácido graso en un hidroperóxido ($ROOH$) (Figura 8).



Los lípidos más propensos a la formación de hidróperóxido son los presentes en membranas biológicas, principalmente los que son ricos en ácidos grasos insaturados (García, *et al.* 1994).

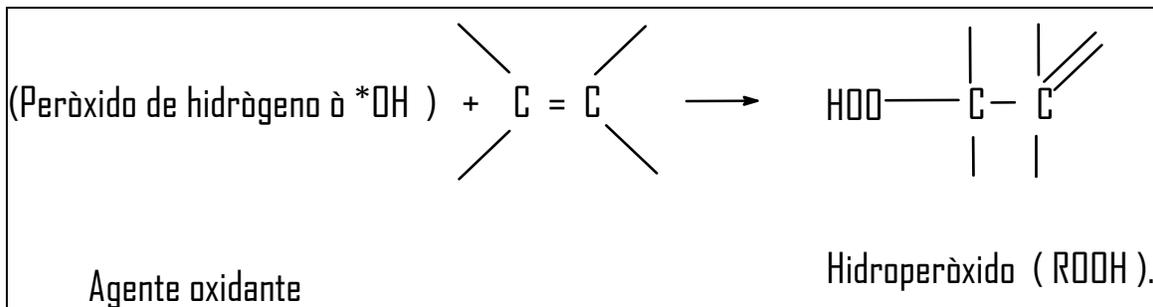


FIGURA 8. Peroxidación de ácidos grasos insaturados.

FUENTE: Bohinski, 1998.

Para medir el daño provocado por oxidación en lípidos, se puede hacer uso de aquellos métodos que nos ayuden a identificar productos terminales de la acción oxidante, en este caso, la cuantificación de malondialdehído (MDA), al ser este el más abundante de los aldehídos resultante de la peroxidación de lípidos (Pérez, 2000).

Smith y Berjal (1995), mencionan que Koastra y Harrington en 1969 fueron los primeros en proponer que la oxidación de membranas es un mecanismo de deterioro de las semillas, llevando a cabo dicho experimento en semillas de pepino, el cual lo asociaron al mismo tiempo con la pérdida de la viabilidad de dichas semillas. La oxidación puede ser en ácidos grasos poliinsaturados localizados en membrana plasmática, y además que estas reacciones se pueden realizar por vía de los radicales libres (Wilson y McDonald, 1985). Es por ello que se puede asociar el deterioro de semillas con el cambio en el contenido de fosfolípidos, midiendo la formación de malondialdehído como un producto secundario de la peroxidación.



La peroxidación de los lípidos es un proceso normal de deterioro de la membrana, que puede causar a su vez, la oxidación de sus proteínas, éstas alteraciones tienen efecto sobre la estructura y funcionamiento de la misma. Se ha demostrado que en semillas de maíz, hay un decremento en fosfolípidos de membrana que puede ser atribuido a su peroxidación, así mismo se encontró que el malondialdehído (MDA) incrementa con el envejecimiento de semillas de maíz (Basavarajappa, 1991). Por otra parte, también se encontró que el deterioro en Soya ocurre vía peroxidación de ácidos grasos insaturados de membrana, incrementando el contenido de MDA con respecto al tiempo y condiciones de almacenamiento, y al mismo tiempo puede estar asociado con la pérdida de la viabilidad y vigor (Sung y Chiu, 1995).

El daño se atribuye a la conversión de los hidróperóxidos de lípidos en radicales peróxido, los cuales son agentes oxidantes muy reactivos (Bohinski, 1998).

El daño que ocurre en la integridad membranal posiblemente ocasionada por la oxidación de ácidos grasos, es posible cuantificarla de manera indirecta mediante la prueba de conductividad eléctrica, la que nos indica que entre mayor sea la conductividad eléctrica, existe mayor lixiviación de electrolitos y por lo tanto, indica que el deterioro se lleva a cabo en membranas celulares (McDonald, 1999).

1.10.2.2. Daño en proteínas

Al ser las proteínas las que llevan a cabo la mayoría de las funciones celulares, es de importancia general el conocimiento del daño que se produce en éstas a causa del deterioro. Como lo señala Hansberg (2002), el grado de deterioro de las proteínas de una célula se puede medir detectando carbonilos en la proteína total purificada, los carbonilos se forman por la oxidación de la prolina y la arginina en semialdehído de glutamato y por ruptura de la cadena peptídica.



Muchas proteínas son capaces de sufrir daño oxidativo, sin que aparentemente se vea afectada su función. Sin embargo, es indudable que las consecuencias en alteraciones de sus funciones serían en la recepción y transmisión de señales, el transporte de iones, la duplicación y replicación del ADN, las respuestas a condiciones de tensión y el metabolismo energético (Hansberg, 2002).

Las proteínas pueden ser atacadas a niveles de sus aminoácidos susceptibles: cistina, cisteína, histidina, metionina, triptofano y tirosina. Los efectos fundamentales son: alteraciones directas de la estructura y la función, aceleración de la proteólisis, así como del incremento de la función enzimática (activación), también los radicales pueden dañar procesos como la síntesis de proteína, al actuar sobre la cadena del DNA que codifica la información correspondiente a esa proteína (García, 1994).

Algunas enzimas se inactivan o se activan con el O_2^- y el H_2O_2 cuando interaccionan con metioninas o cisteínas susceptibles.

Investigaciones reportan que en semillas de maíz hay un 50% en el decremento de proteínas solubles durante periodos de almacenamiento acelerado, lo cual puede estar relacionado con la desnaturalización de proteínas durante el almacenamiento, así como la presencia de aminoácidos libres en el medio de imbibición después de un tratamiento de envejecimiento (Basavarajappa, 1991).

Datos experimentales de Sun y Carl (1995) reportan que el cambio en el contenido de grupos carbonilos en cotiledones y ejes embrionarios de Soya, con diferentes períodos de almacenamiento es muy bajo, argumentan que los cambios más notorios por estrés oxidativo se realizan durante los primeros pasos de la germinación.

Entre los métodos analíticos para cuantificar grupos carbonilos encontramos la fluoresceína hidracida o tiosemicarbazida, fluoresceinamina o bien,

midiendo la incorporación de tritio después de la reducción con borohidruro titriado y la cuantificación por conjugación de las entidades carbonilo con 2,4-dinitrofenilhidrazina, éste último se realiza espectrofotométricamente (Díaz, 2006).



CAPÍTULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general. Evaluar el deterioro de frijol provocado por un almacenamiento inadecuado y la generación de estrés oxidativo, para determinar si existe una relación entre ambos mecanismos sobre la calidad del frijol.

Objetivo particular 1. Obtener frijol deteriorado provocado por almacenamiento inadecuado para evaluar su calidad mediante el tiempo de cocción y poder germinativo.

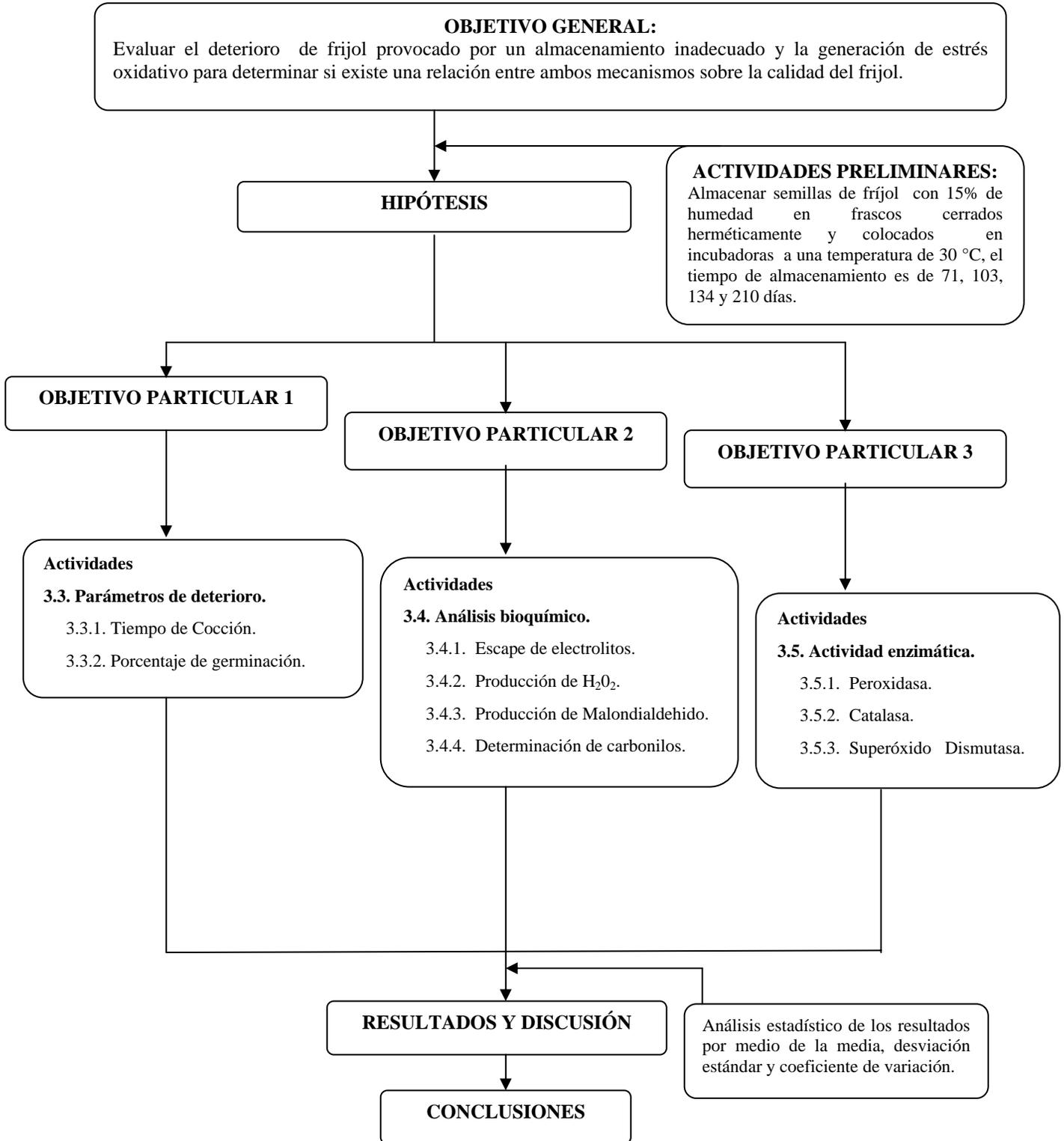
Objetivo particular 2. Evaluar daños en: membrana celular, lípidos y proteínas, así como, la producción de peróxido de hidrógeno en cotiledones de frijol deteriorado para determinar la existencia de estrés oxidativo.

Objetivo particular 3. Evaluar el sistema enzimático de defensa contra el estrés oxidativo para poder determinar si existe una relación entre el grado de deterioro y la actividad enzimática.

Hipótesis. Durante el deterioro de frijol, provocado por un almacenamiento inadecuado en presencia de oxígeno debe haber formación de especies reactivas a oxígeno que provoquen estrés oxidativo, el cual genera reacciones de deterioro que afectan la calidad del frijol.

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cuadro metodológico





3.2. Metodología

Material biológico

En el presente trabajo se empleó la variedad de frijol Flor de Mayo, cosecha primavera-verano 2000. El frijol se obtuvo de la Productora Nacional de Semillas (PRONASE). La muestra fue de 10 Kg., de la cual se empleó 1 Kg., de frijol para la realización de la siguiente investigación.

Para observar experimentalmente el deterioro de granos de frijol, se colocaron en almacenamiento inadecuado, semillas con un contenido de humedad de 15% en frascos de vidrio de 250 ml. con tapa roscada, sellado de tapa con parafina con una atmósfera de aire (21% de O₂). Los frascos se colocaron a una temperatura de 30°C, por diferentes períodos de tiempo: 71, 103, 134 y 210 días, se trabajó un control con contenido de humedad de 15%, el cual tuvo 0 días de almacenamiento. Para cada período de almacenamiento se colocaron 3 frascos. Al concluir dicho almacenamiento las muestras se refrigeraron hasta su uso.

Se ajustó la humedad del frijol a 15% colocándolo en un recipiente con dos compartimentos y una separación física permeable a la humedad. Se colocó en la parte de abajo una solución saturada de NaCl y en la parte de arriba se colocaron las semillas cuidando que estas no se mojaran con la solución salina y se cerró. Los recipientes se colocaron en una incubadora a 25°C, durante 15 días.

3.3. Parámetros de deterioro

3.3.1. Determinación de tiempos de cocción

Remojo de las semillas

Se colocaron 25 semillas de frijol Flor de Mayo en 20 ml. de agua desionizada, durante 18 horas en una incubadora a 30°C. (Shomer, *et al*, 1990), mismas que se ocuparon para determinar los tiempos de cocción.



Tiempos de cocción

El tiempo de cocción se determinó usando el método de Mattson modificado (Jackson y Variano, 1981).

El material empleado en este método consta de: 25 varillas, igual número de pesas (de 200 gramos cada una), una olla y tapa de aluminio (Figura 9).



FIGURA 9. Cocinador Mattson.

Este método consiste en colocar una semilla previamente remojada dentro de cada depresión del plato y sobre ésta una varilla con una pesa (siendo la varilla sostenida verticalmente por las perforaciones de los dos platos superiores). Todo este sistema se colocó en la olla con agua hirviendo, cuidando que las semillas siempre se encuentren sumergidas en el agua en ebullición. Cuando las semillas alcanzan cierta textura son atravesadas por las varillas (Méndez, 2002). Se tomó el tiempo en que cada varilla perforó la semilla de frijol. Se realizó un gráfico de número de frijoles cocidos contra tiempo, al gráfico se le realizó un ajuste estadístico a una sigmoidea y del gráfico se obtuvo el tiempo de cocción medio

(TC₅₀) determinado como los minutos en los que el 50% de las semillas de frijol se cocieron (Figura 10). Las pruebas de cocción de frijol se realizaron por triplicado y el resultado se expresó en minutos (Martínez, 2003).

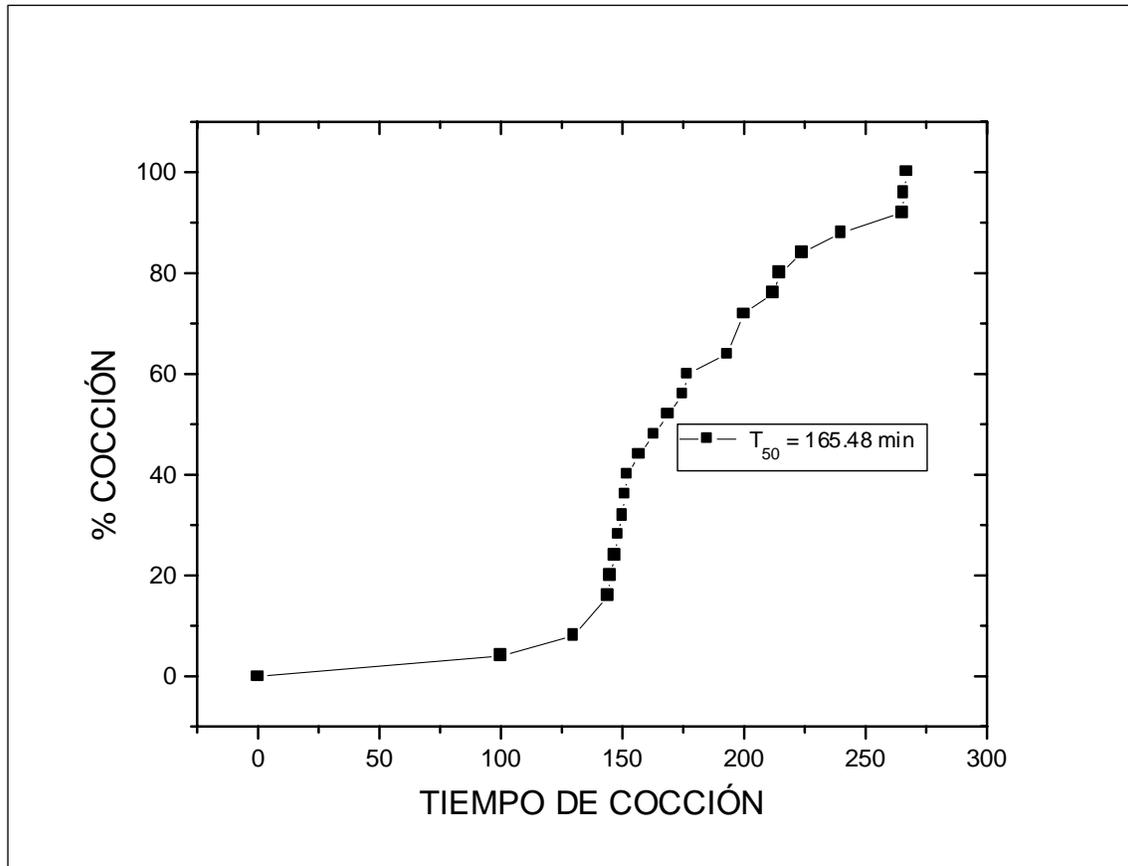


FIGURA 10. Cinética de cocimiento de frijol.

3.3.2. Pruebas de germinación

Se determinó la germinación de semillas de frijol Flor de Mayo (Figura 11), para lo cual se ocuparon 200 semillas. Se colocaron 50 semillas en una toalla de papel previamente humedecida y posteriormente se cubrieron con otra hoja de papel húmedo, se enrollaron las hojas de papel para formar un taco, se colocaron dentro de una bolsa de plástico para mantener la humedad, posteriormente se incubaron durante 7 días a 27°C, las evaluaciones se realizaron a los 4 días primer conteo y a los 7 días el segundo conteo, evaluando solamente la

emergencia de la plántula (Moreno, 1984). Las pruebas se realizaron por triplicado y el resultado se expresó en porcentaje de germinación.



FIGURA 11. Germinación de frijol.

3.4. Análisis bioquímico

3.4.1. Escape de electrolitos

Para determinar el escape de electrolitos, se colocaron 5 semillas de frijol con testa o en su defecto se colocaron sin testa en 20 ml. de agua destilada que posteriormente se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 30°C. La cuantificación se realizó determinando la conductividad del agua de remojo de las semillas en un conductímetro (Figura 12) marca conductronic (PC45). (Stewart y Bewley, 1980). La prueba se realizó por triplicado y el resultado se expresó en $\mu\text{S}/\text{cm g}$ de cotiledón.



FIGURA 12. Conductímetro (Conductronic PC45).

3.4.2. Producción de Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂)

Obtención del extracto para prueba

Del frijol almacenado en los frascos con diferentes períodos de almacenamiento se preparó una harina ocupando solamente los cotiledones a los cuales se les fue retirada la testa.

Se pesó 0.5 g de harina de cotiledón de frijol y con ayuda de un mortero se homogenizó con 5 ml. de ácido tricloroacético (20 % v/v), posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm durante 20 minutos, se ocupó una centrifuga Micro-120 Itettich (Sung and Chiu, 1995). El sobrenadante se ocupó para determinar MDA y H₂O₂.



Cuantificación de Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂)

El método está basado en el decremento de fluorescencia de la escopoletina en presencia de peróxido de hidrógeno y peroxidasa. Se construyó una curva patrón preparando tubos con 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 μ l de H₂O₂ 1 μ M, a los cuales se les agregó solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7.0, suficiente para obtener un volumen de 250 μ l, luego se adicionó a cada tubo 250 μ l de escopoletina 25 μ M y 40 unidades de peroxidasa de rábano (Sigma, P6140). Se mantuvo la reacción durante 5 minutos en agitación constante con ayuda de un vortex a velocidad 5 (Vortex Fisher Scientific) y se detuvo con tetraborato de sodio 0.15 M pH 10.3 (Hildebrandt *et al*, 1978).

La fluorescencia se determinó en un fluorómetro Vicam V2.0, λ EXC 350 nm y λ EM 460 nm (Figura 13). La prueba se determinó por triplicado y el resultado se expresó en Mol de peróxido de hidrógeno / g cotiledón.



FIGURA 13. Fluorómetro Vicam V2.0.



3.4.3. Producción de Malondialdehído

La formación de Malondialdehído (MDA) es el fundamento del conocido método de medir la peroxidación lipídica. La mayoría de los aldehídos que reaccionan con tiobarbitúrico (TBA) son derivados de ácidos grasos insaturados. Se tomó una alícuota del sobrenadante preparado como se menciona en el apartado 3.4.2., y se adicionó una alícuota igual de TBA al 0.5 % en ácido tricloroacético al 20%, la muestra se calentó a 95°C en una placa de calentamiento (Multi-blok Heater-2050. Lab-line) durante 30 minutos, posteriormente se enfriaron las muestras y se centrifugaron a 7000 rpm (centrifuga Micro-120 Itettich) durante 3 minutos para eliminar impurezas.

La cuantificación de MDA se llevó a cabo determinando la diferencia de absorbancia a una longitud de onda de $\lambda = 532$ nm menos la inespecífica a $\lambda = 600$ nm de los productos generados después de dejar reaccionar el TBA durante 30 minutos y usando el coeficiente de extinción molar del MDA ($\epsilon = 155$ mM⁻¹ cm⁻¹) (Heath y Packer 1968; Cafaro, 2005). Para ello se utilizó un espectrofotómetro Beckman DU-450 (Figura 14). La prueba se realizó por triplicado y el resultado se expresó en Mol de MDA / g de cotiledón.



FIGURA 14. Espectrofotómetro Beckman DU-450.

3.4.4. Determinación de carbonilos

Obtención del extracto para la determinación de proteína soluble y de grupos carbonilos.

La extracción de proteína soluble se realizó, Se homogenizó con un vortex a velocidad 5 (Vortex Fisher Scientific) 30 mg de harina de cotiledón de frijol con 0.6 ml. de amortiguador de fosfatos 5 mM, pH 7.5 que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas. Al homogenizado se adicionó 0.8 ml de amortiguador de fosfatos 5 mM, pH 7.5. Los ácidos nucleicos se precipitaron con 2% de sulfato de estreptomicina, al mezclar el homogenizado con 156 μ l de sulfato de estreptomicina al 10% en 50 mM de HEPES pH 7.2. Se agitó la mezcla y se centrifugó a 14 000 rpm por 15 minutos (centrifuga Micro-120 Ittetch). Al sobrenadante se adicionó 156 μ l de sulfato de estreptomicina y se centrifugó otra vez. El segundo sobrenadante se utilizó para determinar el contenido de proteína



soluble y contenido de carbonilos procedentes de proteínas dañadas (Sun y Carl. 1995).

Cuantificación de proteína

Las proteínas reaccionan con los iones cobre en medio alcalino, con la reducción del reactivo Fenol-Follin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdico-fosfotungstico) por la tirosina y el triptófano. Para determinar el contenido de proteína se construyó una curva de calibración utilizando Albúmina Bovina a una concentración de 1 mg/ ml como estándar y se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de $\lambda = 750 \text{ nm}$.

La concentración de proteína se midió de acuerdo al método de Lowry (Becker, 1999) utilizando Albúmina Bovina como estándar. Para la construcción de la curva estándar con 30, 60, 90, 120 y 180 μl de albúmina bobina (1 mg/ml), a los cuales se les agregó agua desionizada suficiente para obtener un volumen de 1000 μl , posteriormente se agregó 1000 μl de de reactivo "A" que contiene NaOH 0.8 N, Dodecil sulfato sódico 10%, CuSO_4 0.1%, Tartrato de sodio y potasio 0.2% y Na_2CO_3 10%. Después se adicionó 500 μl de reactivo "B" que contiene Follin-Ciocalteu (1:5). Se dejó reaccionar durante 30 minutos y posteriormente se leyó la absorbancia a una longitud de onda de $\lambda = 750 \text{ nm}$ en un espectrofotómetro Sequoia-Turner Modelo 340 con longitud de onda de 420-890 nm (Figura 15).



FIGURA 15. Espectrofotómetro Sequoia-Turner-340.

Determinación de carbonilos

El contenido de carbonilos de proteínas dañadas se midió por la reactividad de éstos con 2,4-dinitrofenilhidracina. Se colocaron 100 μ l de extracto de proteína cruda en tubos de ensayo y se dejó reaccionar con el mismo volumen de 2,4-dinitrofenilhidracina 10 mM en HCl 2 M. La reacción fue colocada por 60 minutos a temperatura ambiente. Las muestras tratadas con HCl 2 M sólo se usaron como control. Al término de la reacción las proteínas fueron precipitadas con ácido tricloroacético al 10% y se centrifugó a 14 000 rpm por 4 minutos (centrifuga Micro-120 Itettich). Los pellets se lavaron tres veces con 800 μ l de etanol: acetato de etilo (1:1) para remover impurezas, después se centrifugó a 14 000 rpm por 4 minutos. El sobrenadante fue desechado después de cada lavado. La proteína fue disuelta en 1.5 ml de Guanidina 6 M en amortiguador de fosfato 20 mM pH 2.5 durante 15 minutos a 37 °C. Se centrifugó la solución. La absorbancia se midió a una longitud de onda de $\lambda = 366$ nm contra la muestra control tratada con HCl 2 M sin hidracina en un espectrofotómetro Beckman DU-450 (Levine *et al*, 1990).



El contenido de carbonilos de proteínas se determinó utilizando un coeficiente de extinción molar de $22\ 000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$. La prueba se realizó por triplicado por cada frasco almacenado y el resultado se expresó en Mol de carbonilos / mg de proteína.

3.5. Actividad enzimática

Obtención de extracto enzimático

El extracto enzimático se obtuvo de harina de cotiledón de frijol. Se tomaron 0.3 g de harina de cotiledón y se homogenizó en un vortex a velocidad 5 (Vortex Fisher Scientific) con solución amortiguadora de fosfatos de potasio 5 mM pH 7.5. El homogenizado se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 minutos (centrifuga Micro-120 Ittettich). Se recuperó el sobrenadante y se guardó en tubos eppendorf, para ser ocupado en la determinación de enzimas como: peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa.

3.5.1. Determinación de Peroxidasa (POX)

La actividad de la peroxidasa se determinó por el método de Chance y Maehly (1955). La actividad de la POX se evaluó mediante la oxidación del guaiacol ($\epsilon = 26.6\ \text{mM}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$). La mezcla de reacción contenía solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 6.7, guaiacol 50 mM y peróxido de hidrógeno 10 mM. El volumen final de reacción correspondió a 1 ml. Se registraron los cambios de absorbancia a una longitud de onda de $\lambda = 470\ \text{nm}$ durante 5 minutos a intervalos de 5 segundos en un espectrofotómetro Beckman DU-450. La prueba se realizó por triplicado por cada frasco almacenado y el resultado se expresó como Mol de H_2O_2 / min. g. cotiledón.

3.5.2. Determinación de Catalasa (CAT)

La actividad de la CAT se midió registrando la desaparición de H_2O_2 ($\epsilon = 40\ \text{mM}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$). La mezcla de reacción consistió en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0, H_2O_2 30 mM y extracto de prueba. Se preparó un blanco de agua



desionizada y un control de H₂O₂ 30 mM que contenía amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0, H₂O₂ 30 mM y agua desionizada. La reacción se registró por el cambio de absorbancia a una longitud de onda de $\lambda = 240$ nm durante 3 minutos, a intervalos de 20 segundos en un espectrofotómetro Beckman DU-450 (Aebi, 1984). La prueba se realizó por triplicado por cada frasco almacenado y el resultado se expresó como Mol de H₂O₂ consumido / min. g. cotiledón.

3.5.3. Determinación de Superóxido Dismutasa (SOD)

La actividad de la SOD (Misra y Fridovich, 1972) se determinó registrando la auto-oxidación de la epinefrina a adrenocromo ($\varepsilon = 4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La mezcla de reacción consistió de solución amortiguadora de carbonatos 50 mM pH 10.2, EDTA 0.5 mM y epinefrina 12.5 mM (disuelta en HCl 10 mM pH 2.0) para iniciar la reacción, el volumen final de reacción correspondió a 1 ml. Se registraron los cambios de absorbancia a una longitud de onda de $\lambda = 480$ nm durante 10 minutos a intervalos de 10 segundos, en un espectrofotómetro Beckman DU-450. La prueba se realizó por triplicado por cada frasco almacenado y el resultado se expresó en Mol de adrenocromo / min. g cotiledón.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos, se analizaron utilizando la prueba de comparación de medias T-student, usando el programa Origin V. 4.0. Todas las pruebas se realizaron por triplicado, obteniéndose promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.



CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3. Parámetros de deterioro

3.3.1. Tiempo de cocción

El tiempo de cocción y el poder germinativo del frijol constituyen las características más importantes que determinan la calidad y aceptación de las leguminosas por el consumidor. El tiempo de cocción se ve afectado por diversos factores entre los cuales se encuentran las condiciones de cultivo, cosecha, manejo poscosecha, así como, el tiempo y condiciones de almacenamiento.

En el presente trabajo se observó que el tiempo de cocción del frijol aumentó en relación con el grado de deterioro. Es decir, a mayor tiempo de almacenamiento bajo las condiciones experimentales mayor fue el tiempo de cocción (Tabla 8). Por otra parte, los TC_{50} de cada período de almacenamiento del frijol deteriorado fueron estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$) al control. A los 71 días de almacenamiento el grano duplicó su TC_{50} y al cabo de 210 días lo aumentó 3.4 veces respecto al control aproximadamente.

TABLA 8. Tiempos de cocción (TC_{50}) de frijol Flor de Mayo almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano.

Tiempo de almacenamiento (Días)	Control 0	71	103	134	210
Tiempo de cocción T_{50} (min)	63.96 $\pm 3.7^a$	133.68 $\pm 8.3^b$	155.55 $\pm 14^b$	197.85 $\pm 14.4^c$	218 $\pm 23^c$

* Diferentes letras entre columnas indican diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$).

El incremento en el tiempo de cocción es considerado una de las consecuencias de deterioro provocado por factores como la humedad del grano, humedad relativa del ambiente, temperatura y tiempo de almacenamiento (Elías,



1982), por lo tanto, se puede concluir que el almacenamiento inadecuado sí provocó la disminución de la calidad culinaria del frijol y bajo las condiciones de almacenamiento, se obtuvieron materiales con diferente grado de deterioro.

3.3.2. Porcentaje de germinación

Una vez que se observó que el almacenamiento inadecuado afectó la calidad de cocción del frijol, se procedió a observar que relación tenía con la germinación, como otro parámetro para evaluar el deterioro de las semillas. El almacenamiento inadecuado provocó la pérdida de la germinación de las semillas (Tabla 9). A mayor tiempo de almacenamiento el porcentaje de germinación disminuyó hasta perderse totalmente a los 210 días de almacenamiento.

Las semillas pueden ser capaces de germinar y originar nuevas plantas, aún cuando no están maduras. Sin embargo, por un inadecuado almacenamiento se puede inducir la activación del metabolismo provocando procesos bioquímicos-fisiológicos que generan productos tóxicos capaces de dañar las semillas hasta lograr la pérdida de su poder germinativo (Camacho, 1994).

TABLA 9. Efecto del almacenamiento inadecuado sobre la germinación del frijol Flor de Mayo almacenados a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano.

Tiempo de almacenamiento (Días)	Control 0	71	103	134	210
Germinación (%)	100 ^a	85.3 ^b	40.7 ^c	4 ^d	0 ^e

* Diferentes letras entre columnas indican diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$).



Por lo tanto, los resultados de tiempos de cocción y germinación indicaron que el almacenamiento prolongado bajo las condiciones de almacenamiento utilizadas en este trabajo (30°C, presencia de aire y humedad del grano de 15%) se consideran factores intrínsecos que provocaron el deterioro de la calidad del frijol Flor de Mayo, reflejado en la pérdida del poder germinativo e incrementando sus tiempos de cocción.

Una vez obtenidos los materiales deteriorados, se procedió a evaluar si había generación de estrés oxidativo en ellos.

3.4. Análisis bioquímico

3.4.1. Escape de electrolitos

La determinación de escape de electrolitos tiene la finalidad de observar el posible daño o cambios que ocurren en la organización de las membranas celulares, ya que la membrana celular controla el transporte existente del interior al exterior de la célula o viceversa para mantener un equilibrio. Por otra parte, se habla de daño en membranas porque, se ha reportado que la integridad de las membranas celulares está determinada por los cambios bioquímicos deteriorativos, que son cuantificables en forma indirecta a través de la lixiviación de electrolitos mediante la prueba de conductividad eléctrica. Cuando la conductividad eléctrica aumenta se considerada indicativo de daño en membranas celulares (Powell, 1988).

En primer lugar, se determinó la conductividad eléctrica en cotiledones sin testa, es decir, se trabajó con el cotiledón de la leguminosa y lo que se observó fue que aumentó 1.6 veces en los primeros 71 días de almacenamiento, mientras que a los 210 días se incrementó 4.58 veces con respecto al control (tabla 10), lo que indica que existen membranas celulares dañadas en los cotiledones del frijol Flor de Mayo.

TABLA 10. Escape de electrolitos de cotiledones de frijol Flor de Mayo almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano.

Escape de electrolitos ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)					
Tiempo de almacenamiento (Días)	Control 0	71	103	134	210
Cotiledones de semilla sin testa	449.32 ^a	753.86 ^b	1177.12 ^c	1513.02 ^d	2061.07 ^e
Semilla con testa	224.17 ^a	328.17 ^b	391.35 ^c	353.88 ^{bc}	1005.33 ^d

* Diferentes letras entre columnas indican diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$).

Por otra parte, al relacionar la conductividad de los cotiledones de frijol con el tiempo de almacenamiento se encontró una correlación positiva ($r^2 = 0.97$) con el tiempo de almacenamiento (figura 16). Esto refuerza la existencia de una relación directa entre el deterioro del frijol y el daño en membranas celulares.

Con el objetivo de corroborar en cual de las estructuras del de frijol (testa o cotiledón) se observaba el daño, se procedió a determinar la conductividad eléctrica del frijol con testa. En estas muestras se observó que la conductividad eléctrica aumentó 1.4 veces a los 71 días y a los 210 días de almacenamiento 4.4 veces con respecto al control, es decir, se observó un aumento similar a los cotiledones sin testa, pero el valor absoluto de conductividad del frijol con testa fue aproximadamente la mitad con respecto a los cotiledones (cotiledones sin testa). Lo que posiblemente está ocurriendo es que en el espacio que hay entre los cotiledones y la testa se encuentra la diferencia de electrolitos que no salen y que se están cuantificando en cotiledones sin testa, por lo tanto, la testa funciona como una barrera en la salida de electrolitos, por que el daño se está generando en el cotiledón.

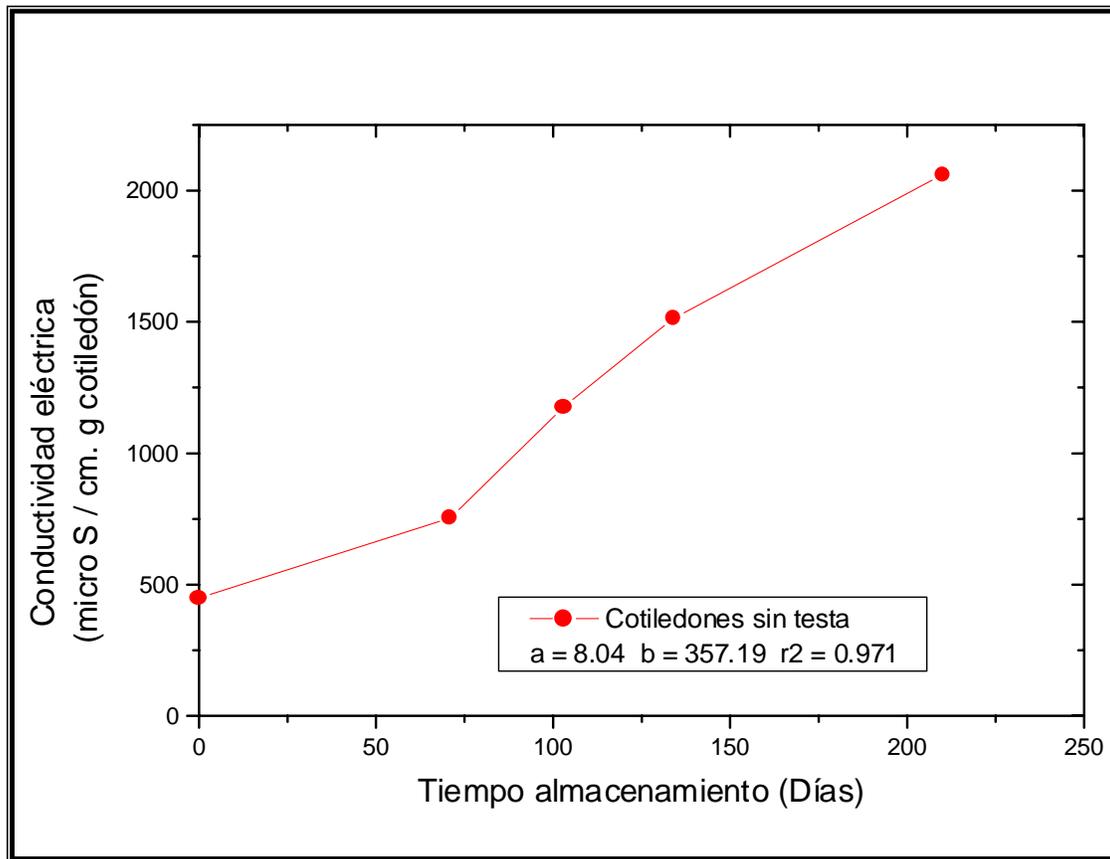


FIGURA 16. Daño de membranas de frijol Flor de Mayo almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano.

Esto es algo que se esperaba porque en otros trabajos se ha demostrado que el daño por almacenamiento inadecuado ocurre en cotiledones (Blancas, 2001 y Méndez, 2002), pero se necesitaba corroborar para definir como se trabajará el grano. Para los experimentos posteriores se procedió a ocupar sólo la parte del frijol que sufría deterioro, como es el caso de los cotiledones y seguir con los objetivos planteados.



3.4.2. Producción de H₂O₂

Se cuantificó el contenido de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en cotiledones de frijol Flor de Mayo con la finalidad de observar si durante el deterioro de los cotiledones se induce tensión oxidativa, teniendo como un parámetro de comparación las concentraciones de agua oxigenada reportadas para granos y semillas frescos que indican que pueden variar de nanomoles hasta cerca de 500 mM, dependiendo del sitio donde se produzca y de la célula o tejido (Hansberg, 2002). Las concentraciones de peróxido de hidrógeno presentes en cotiledones de frijol Flor de Mayo que se muestran en la tabla 11, se encuentran dentro del rango normal que enuncia Hansberg (2002) y Sagisaka (1976) indica concentraciones de milimolares son niveles no aceptables en la célula, pero lo interesante es que van en aumento en los granos secos, en relación directa ($r^2 = 0.97$) con el tiempo de almacenamiento (Figura 17), alcanzando un incremento de 6.8 veces a los 210 días comparados con el control. Por otra parte, también Hansberg (2002) consideran que concentraciones de peróxido de hidrógeno entre 10 a 100 μ M pueden ser tóxicas para las células, siempre y cuando éste compuesto sea generador de radicales libres, como es el caso del radical hidroxilo y éste sea ocupado en reacciones de deterioro transformándose en un riesgo para las leguminosas. Por lo antes mencionado, se puede concluir que la presencia de peróxido de hidrógeno en los cotiledones es un riesgo ya que puede generar parte de los compuestos capaces de provocar el deterioro.

Posteriormente el frijol deteriorado de cada período de almacenamiento se colocó en remojo (imbibición) durante 18 horas a 30°C con la finalidad de observar lo que posiblemente pudiera ocurrir con el peróxido de hidrógeno durante las primeras horas de imbibición. Se observó que a medida que el tiempo de almacenamiento aumenta, la concentración de peróxido de hidrógeno disminuyó 5.5 veces con respecto al control, posiblemente esto se deba a que durante la imbibición se incrementa el metabolismo por el inicio de la germinación y se reblandecen tejidos, ocurre la activación de enzimas y las sustancias de reserva se transforman en sustancias más simples (Brandbeer, 1992). Esto las hace más

susceptibles a daño por radicales libres y la transformación de estos radicales por la actividad de enzimas en donde el peróxido de hidrógeno puede servir como sustrato y por lo tanto, disminuye la concentración del agua oxigenada durante la imbibición.

Por otra parte, en los cotiledones control embebidos, se obtuvo la mayor concentración de peróxido de hidrógeno, esto podría deberse a que es más fácil de cuantificar por su alta solubilidad, aunque también, cabe mencionar, que durante las primeras etapas de imbibición se produjo un incremento de actividad metabólica que pueden generar mayor acumulación de este compuesto dentro de los tejidos, pues se pueden generar en la cadena respiratoria.

TABLA 11. Concentración de peróxido de hidrogeno en frijol Flor de Mayo almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano.

Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) (mM. g cotiledón ⁻¹)					
Tiempo de almacenamiento (Días)	Control 0	71	103	134	210
Secos	0.764 ^a	2.481 ^b	3.576 ^c	4.093 ^c	5.230 ^d
Remojados	6.432 ^a	6.400 ^a	3.440 ^b	4.026 ^b	1.155 ^c

* Diferentes letras entre columnas indican diferencia estadísticamente significativa (P ≤ 0.05)

Algo importante que se observó fue que este compuesto a través del tiempo de almacenamiento fue disminuyendo, una posible explicación de la disminución de peróxido de hidrógeno en cotiledones remojados podría ser que el peróxido de hidrógeno se va perdiendo por difusión en el agua de remojo, pero al cuantificarse en donde disminuyó en mayor cantidad, es decir, a los 210 días de deterioro, se encontró una concentración de 1.127 mM de H₂O₂. g cotiledón⁻¹ en el agua de remojo, es decir, que la suma de las dos determinaciones (agua de remojo y

extracto a 210 días) es menos de la mitad de peróxido de hidrógeno que se encuentra en cotiledones secos, por lo que podemos decir que no toda el agua oxigenada se pierde por difusión, en el agua de remojo, sino que el peróxido de hidrógeno es usado como sustrato o se transforma en compuestos tóxicos. Pues se sabe que el agua oxigenada es poco reactiva, sin embargo, es un compuesto que es sustrato para enzimas antioxidantes y además puede ser transformado en radicales hidroxilo y el ión hidroxilo, los cuales son capaces de reaccionar con compuestos como lípidos o aminoácidos. Estas reacciones sobre tejidos vegetales se llevan a cabo si el sistema de defensa antioxidante falla y sobreviene la muerte celular, que trae como consecuencia el deterioro (Prochazkova, *et al.* 2001).

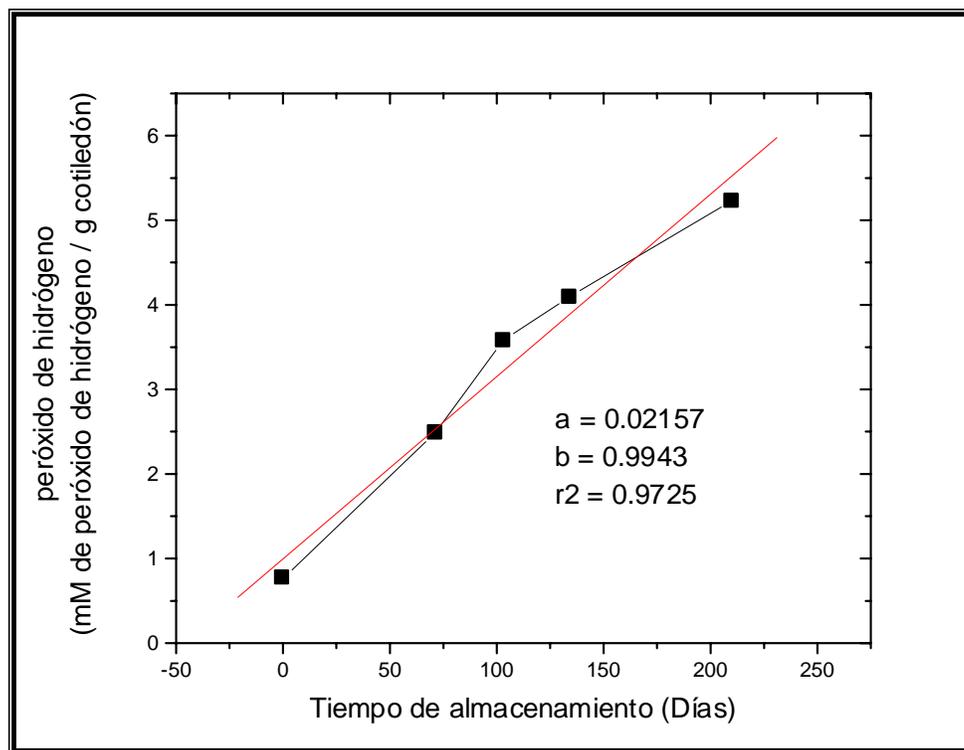


FIGURA 17. Concentración de peróxido de hidrógeno en frijol Flor de Mayo almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano.

3.4.3. Producción de Malondialdehído

La lipoperoxidación, es un proceso de oxidación de ácidos grasos poliinsaturados vía radicales libres, el cual se considera por Wilson y McDonald (1985) como la base de la pérdida del poder germinativo y viabilidad.

En cotiledones secos de frijol se observó que el contenido de MDA aumentó, pero en concentraciones muy pequeñas y que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes materiales deteriorados (Tabla 12). Posiblemente esto se deba a que durante el almacenamiento bajo las condiciones trabajadas, la peroxidación de lípidos es muy lenta, pero se dá, pues se ha reportado que la primera causa de oxidación de lípidos es el envejecimiento de las semillas generado por el alto contenido de humedad del grano, así como , elevadas temperaturas de almacenamiento (Wilson y McDonald, 1986). Al mismo tiempo Smith y Berjak (1995) concluyeron que es necesario combinar elevadas temperaturas y alta humedad relativa para observar cambios significativos de lipoperoxidación. Las condiciones mencionadas anteriormente, fueron las condiciones de almacenamiento usadas en este trabajo, por lo tanto, podemos decir que si hubo lipoperoxidación en cotiledones deteriorados.

TABLA 12. Concentración de Malondialdehido en frijol Flor de Mayo almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano.

Lipoperoxidación (μM de MDA. g cotiledón⁻¹)

Tiempo de almacenamiento (Días)	Control 0	71	103	134	210
Secos	214 ^a	214.1 ^a	218.2 ^a	219.9 ^a	236.67 ^a
Remojados	192.47 ^a	199.53 ^{ab}	205.26 ^{ab}	226.24 ^{cb}	241.92 ^c

* Diferentes letras entre columnas indican diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$).

Además, en frijol embebido (Tabla 12) se observó que para el periodo que corresponde hasta los 103 días de almacenamiento no hay diferencia estadísticamente significativa en los contenidos de productos de lipoperoxidación con respecto al control, mientras que a los 134 días de almacenamiento aumentó

17.5% y a los 210 días aumentó 25.7% el contenido de estos productos y son diferencias estadísticamente significativas con el control.

Stewart y Bewley (1981) reportaron que el MDA es soluble en agua y sobre todo en las primeras etapas de germinación de semillas de Soya.

Por lo tanto, se puede pensar que durante la imbibición de frijol, se llevaron a cabo reacciones de lipoperóxidación con mayor facilidad, ya que el agua que entra en los cotiledones facilita el movimiento de sustancias susceptibles a reaccionar como son las ERO. Esto sería una posible explicación al aumento en la lipoperoxidación cuando se remojan los cotiledones, cabe aclarar también, que se solubilizan agentes antioxidantes (Badui, 1999), los cuales disminuyen la velocidad de reacciones de oxidación, pero si estos agentes antioxidantes son dañados durante el almacenamiento, no existe un adecuado sistema de defensa contra el deterioro por ERO y se produce la oxidación.

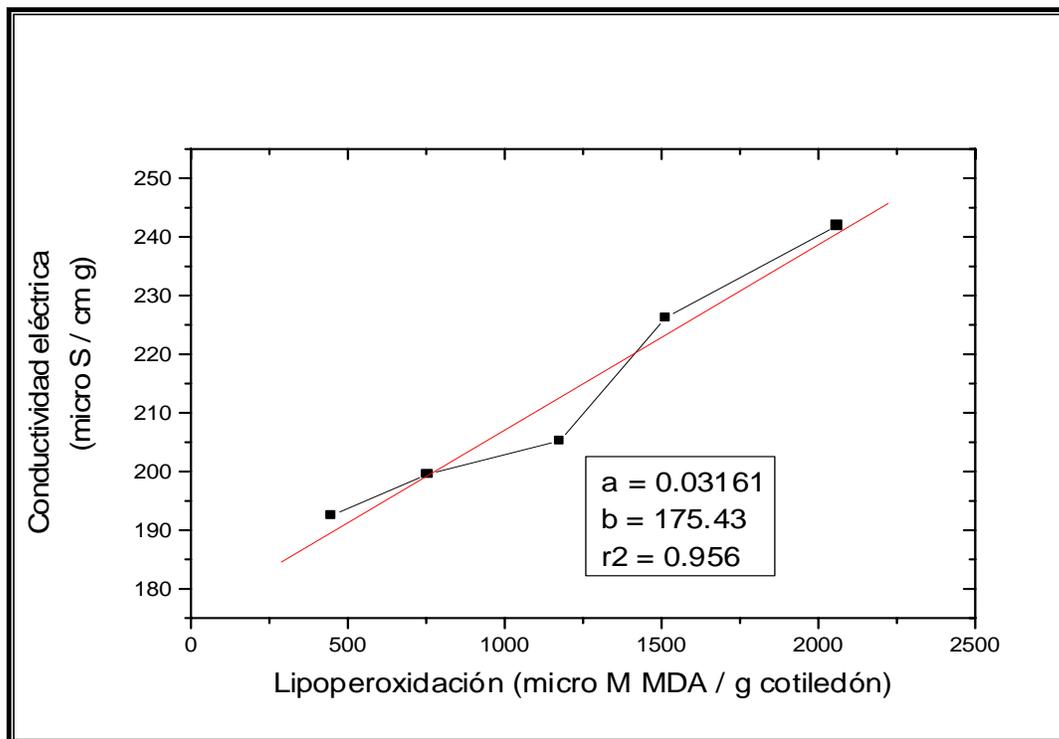


FIGURA 18. Efecto de la lipoperoxidación en la estabilidad de la membrana durante la imbibición de frijol Flor de Mayo almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano.



También es posible que durante las extracciones de muestra el MDA en cotiledones embebidos sea más fácil de ser extraído, mientras que en cotiledones secos se dificulta su extracción y cuantificación, pero la lipoperoxidación ya sucedió durante el período de almacenamiento.

Con el objetivo de obtener una prueba que nos ayude a elucidar si el deterioro se produjo en membranas celulares, se determinó la relación existente entre la lixiviación de electrolitos y la lipoperoxidación, y se observó en la figura 18 una correlación positiva ($r^2 = 0.95$) mostrando un incremento en conductividad en función directa con el incremento de la peroxidación de lípidos. Esto nos lleva a reforzar la idea de que sí existió daño en membranas celulares por lipoperoxidación.

3.4.4. Determinación de carbonilos

La determinación de proteína oxidada se realizó mediante la determinación de grupos carbonilos cuantificados por la reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina. Se reportó la presencia de grupos carbonilos que indicaron modificaciones en las cadenas laterales de las proteínas, producto de la oxidación, provocado por daño en lisina, argininas, prolinas o treoninas ocasionada posiblemente por las ERO (Díaz, 2006).

Al determinar el daño por oxidación en proteínas de cotiledones secos de frijol Flor de Mayo se pudo observar el incremento en el contenido de grupos carbonilos, este incremento fue del doble a los primeros 71 días de almacenamiento y 5.19 veces más a los 210 días con respecto al control (tabla 13). Se encontró una correlación positiva ($r^2=0.988$) entre el tiempo de almacenamiento y el contenido de grupos carbonilo de proteínas solubles (Figura 19). Esto nos sugiere que se llevó a cabo daño oxidativo de proteínas durante el almacenamiento inadecuado y que puede estar involucrada en el deterioro del frijol.



TABLA 13. Proteína dañada en frijol Flor de Mayo secas y embebidas, almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano.

Proteínas oxidadas ($\mu\text{moles de carbonilos mg proteína}^{-1}$)

Tiempo de almacenamiento (Días)	0	71	103	134	210
Secos	4.46 ^a	9.26 ^b	12.92 ^c	17.0 ^d	23.18 ^e
Remojados	11.85 ^a	14.25 ^b	19.34 ^c	15.58 ^b	23.75 ^d

* Diferentes letras entre columnas indican diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$).

Por otra parte, se observó una diferencia estadísticamente significativa, tanto en cotiledones secos como embebidos, con respecto al incremento de grupos carbonilos a los diferentes tiempos de almacenamiento, lo cual indica que el deterioro de proteínas se está llevando a cabo.

Con respecto al daño oxidativo en proteínas durante la imbibición se observó que la hidratación incrementa la acumulación de grupos carbonilos, pues en frijol control se cuantificó 11.85 $\mu\text{moles de carbonilos. mg. proteína}^{-1}$ misma concentración que se observó en cotiledones secos a los 103 días de almacenamiento. Pero a los 210 días tanto los cotiledones secos como los embebidos llegan a la misma concentración de carbonilos. En cotiledones embebidos aumentó el doble de carbonilos con respecto a las muestras control, mientras que en cotiledones secos aumentó 5 veces.

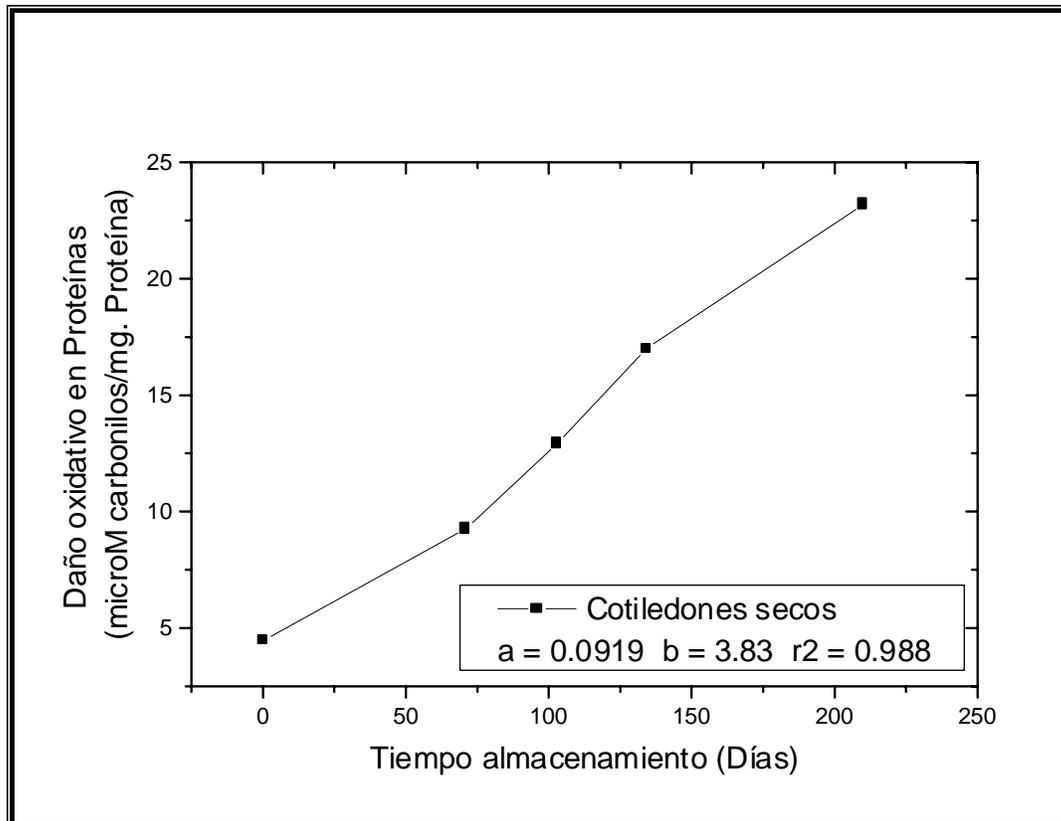


FIGURA 19. Contenido de carbonilos de proteínas solubles de frijol Flor de Mayo almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano.

El grado de daño oxidativo en proteínas es ocasionada por reacciones de proteínas con las ERO y al mismo tiempo el daño en membranas o peroxidación de lípidos de membranas genera reacciones en cadena que posiblemente provocan daño oxidativo de proteínas (Díaz, 2006). De lo anterior podemos concluir que el grado de deterioro que se observó en cotiledones de frijol Flor de Mayo tiene una relación directa con la concentración de grupos carbonilos cuantificados. Por lo tanto, la oxidación de la estructura de las proteínas se llevó a cabo durante el almacenamiento, tanto en muestras secas como embebidas.



3.5. Actividad enzimática

3.5.1. Peroxidasa

El comportamiento del sistema supresor de especies reactivas de oxígeno se cuantificó mediante la actividad de las enzimas Peroxidasa, Catalasa y Superóxido Dismutasa con el objetivo de conocer de que manera influye el almacenamiento inadecuado y el estrés oxidativo sobre estos mecanismos de defensa.

La actividad de la peroxidasa en frijol no embebido mostró un decremento al aumentar el tiempo de almacenamiento. En la tabla 14 se observa que durante los primeros 71 días de almacenamiento el decremento de la actividad no es estadísticamente significativa con respecto al control, sin embargo a los 103 días de almacenamiento la actividad de la peroxidasa decrece un 31.7 % con respecto a los cotiledones control, esta pérdida sigue hasta llegar a decaer la actividad un 57% a los 210 días de almacenamiento, siendo estos decrementos estadísticamente significativos.

TABLA 14. Actividad de la peroxidasa en frijol Flor de Mayo secas y embebidas, almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano.

Peroxidasa (mM de H₂O₂ min⁻¹ g cotiledón⁻¹)

Tiempo de almacenamiento (Días)	Control 0	71	103	134	210
Secos	16.00 ^a	15.89 ^a	10.92 ^b	8.72 ^c	6.88 ^d
Remojados	17.84 ^a	13.82 ^b	12.09 ^b	7.44 ^c	4.82 ^d

* Diferentes letras entre columnas indican diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$).

Los cotiledones embebidos muestran un mismo comportamiento en actividad enzimática que los cotiledones secos, en ambas decae la actividad de la peroxidasa, sin embargo, en embebidas la disminución de la actividad es más rápida y muestra una diferencia estadísticamente significativa entre todos los tiempos de almacenamiento.

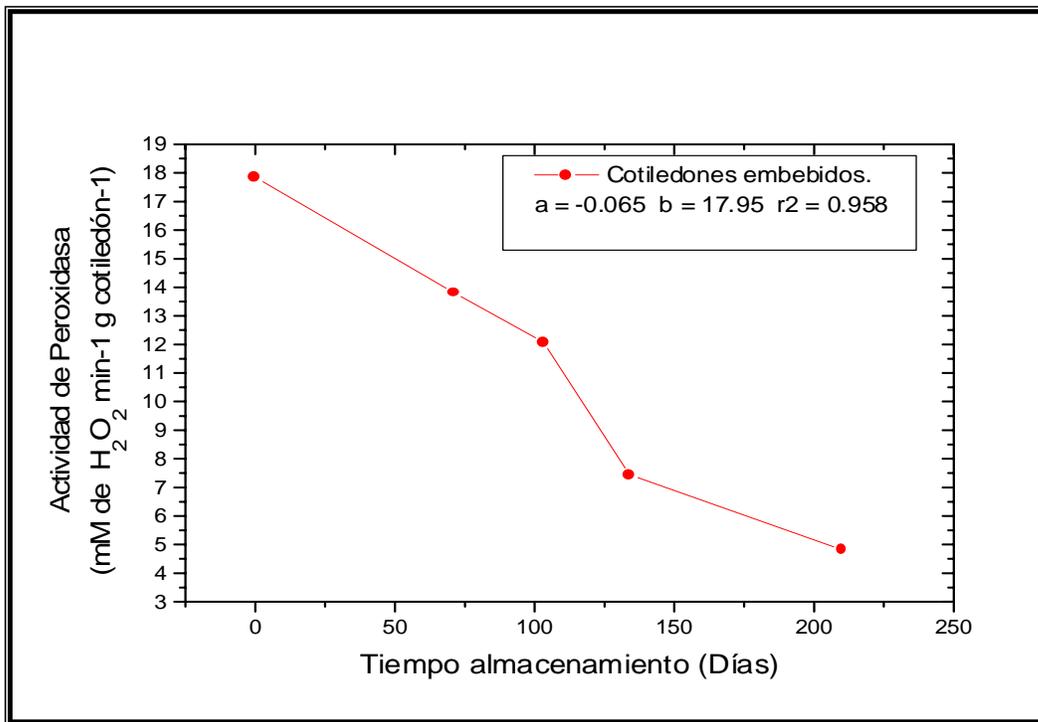


FIGURA 20. Actividad de la peroxidasa en frijol Flor de Mayo almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano.

Para los primeros 71 días de almacenamiento la actividad de la enzima en cotiledones embebidos decae un 22.53%, hasta llegar a 72.98 % en el decremento de la actividad de la enzima a los 210 días de almacenamiento, presentando una correlación positiva ($r^2 = 0.95$) entre el tiempo de almacenamiento y el decremento de la actividad de la enzima (Figura 20). Esta disminución en la actividad puede deberse a un posible daño de la proteína provocado por oxidación.



3.5.2. Catalasa

La actividad de la Catalasa en frijol Flor de Mayo a diferentes tiempos de almacenamiento inadecuado mostró un decremento tanto en cotiledones secos, como en embebidos. En la tabla 15 se muestra que la actividad de catalasa disminuyó a los 134 días de almacenamiento 1.87 veces. También se pudo observar que en el último periodo de almacenamiento la actividad no disminuyó, observándose una ligera recuperación de la actividad enzimática a los 210 días que puede deberse a que el contenido de humedad de los cotiledones a los 134 días de almacenamiento es menor que los otros tiempos de almacenamiento, posiblemente los contenidos de humedad mayores permiten que la actividad enzimática sea mayor, mientras que a contenidos de humedad menores esta actividad puede disminuir. Los contenidos de humedad de frijol Flor de Mayo se presentan en el anexo 1.

TABLA 15. Actividad de Catalasa en frijol Flor de Mayo secas y embebidas, almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano.

Catalasa (μM de H_2O_2 . min^{-1} g cotiledón $^{-1}$)					
Tiempo de almacenamiento (Días)	Control 0	71	103	134	210
Secos	129.5 ^a	132.3 ^a	127.05 ^a	69.03 ^b	87.85 ^c
Remojadas	208.42 ^a	151.34 ^b	149.19 ^{cb}	97.86 ^d	98.7 ^{ed}

* Diferentes letras entre columnas indican diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$).

En cotiledones embebidos es mayor la actividad de catalasa pues en muestras control la actividad aumentó 60.9% con respecto a las semillas control secas. Esto puede deberse a que, durante la etapa de imbibición se aumenta la actividad metabólica incluida la actividad enzimática.



Por otra parte, al comparar la actividad de catalasa en cotiledones embebidos control con los deteriorados tuvo un decremento de 27.14% a los 103 días de almacenamiento y a los 210 días 52.6% de decremento en su actividad.

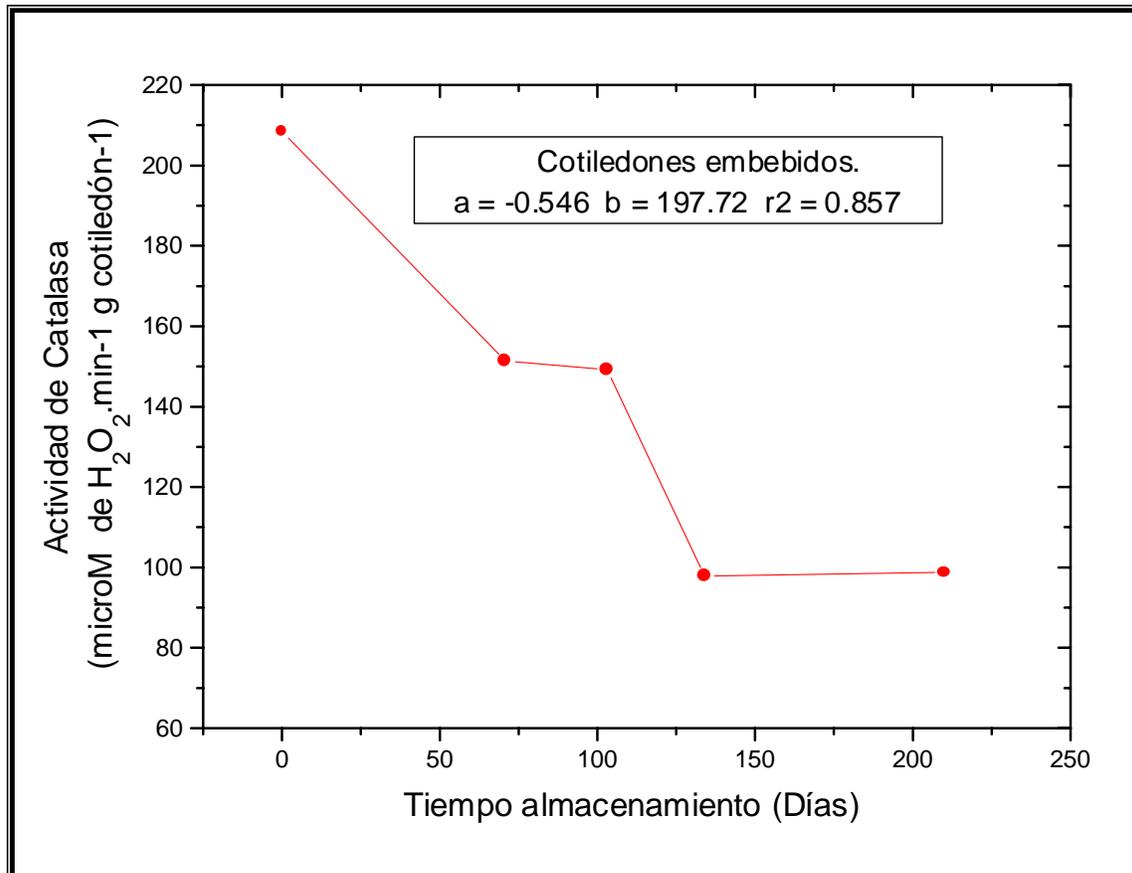


FIGURA 21. Actividad de Catalasa en frijol Flor de Mayo almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano.

Las semillas embebidas muestran una correlación ($r^2 = 0.85$) con respecto al grado de deterioro del frijol, lo que nos está indicando que el deterioro del frijol si afectó la actividad de la catalasa (Figura 21).

3.5.3. Superóxido dismutasa

Como puede observarse (tabla 16), la actividad de la superóxido dismutasa, enzima capaz de dismutar el superóxido (O_2^-) en agua oxigenada y oxígeno molecular pierde actividad a medida que el tiempo de almacenamiento se incrementa. En la tabla 16 podemos verificar que el almacenamiento inadecuado



reduce la actividad de la SOD en cotiledones secos en un 25.7 % a los 71 días de almacenamiento y 77.6 % a los 210 días con respecto al control, encontrando una correlación positiva para este comportamiento ($r^2 = 0.95$) con el grado de deterioro (Figura 22).

TABLA 16. Actividad de la SOD en frijol Flor de Mayo secas y embebidas, almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano.

Superóxido Dismutasa (SOD) (μM de adrenocromo min^{-1} g cotiledón $^{-1}$)

Tiempo de almacenamiento (Días)	0	71	103	134	210
Secos	71.52 ^a	53.07 ^b	48.70 ^{cb}	27.62 ^d	15.98 ^e
Remojadas	46.90 ^a	49.09 ^a	29.80 ^b	28.19 ^b	33.88 ^c

* Diferentes letras entre columnas indican diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$).

El efecto de la imbibición sobre la actividad de la SOD no muestra un comportamiento constante pues mantiene su actividad hasta los 71 días de almacenamiento y luego empieza a decaer hasta los 210 días de almacenamiento en la cual ya no recuperó su actividad. Si comparamos los cotiledones control observamos que la actividad en cotiledones embebidos es 1.5 veces menor que en secos.

Stewart y Bewley (1980), reportaron que durante la imbibición de semillas de Soya, en ejes embrionarios la actividad de la SOD se incrementó durante las primeras 5 horas de imbibición y sugieren que el incremento de la SOD puede representar una forma de recuperación del sistema de defensa ante el efecto del almacenamiento y envejecimiento. Lo cual puede estar ocurriendo con la SOD de frijol Flor de Mayo, ya que durante la imbibición presenta etapas en las que se mantiene la actividad y luego tiende a recuperarse (Figura 22).

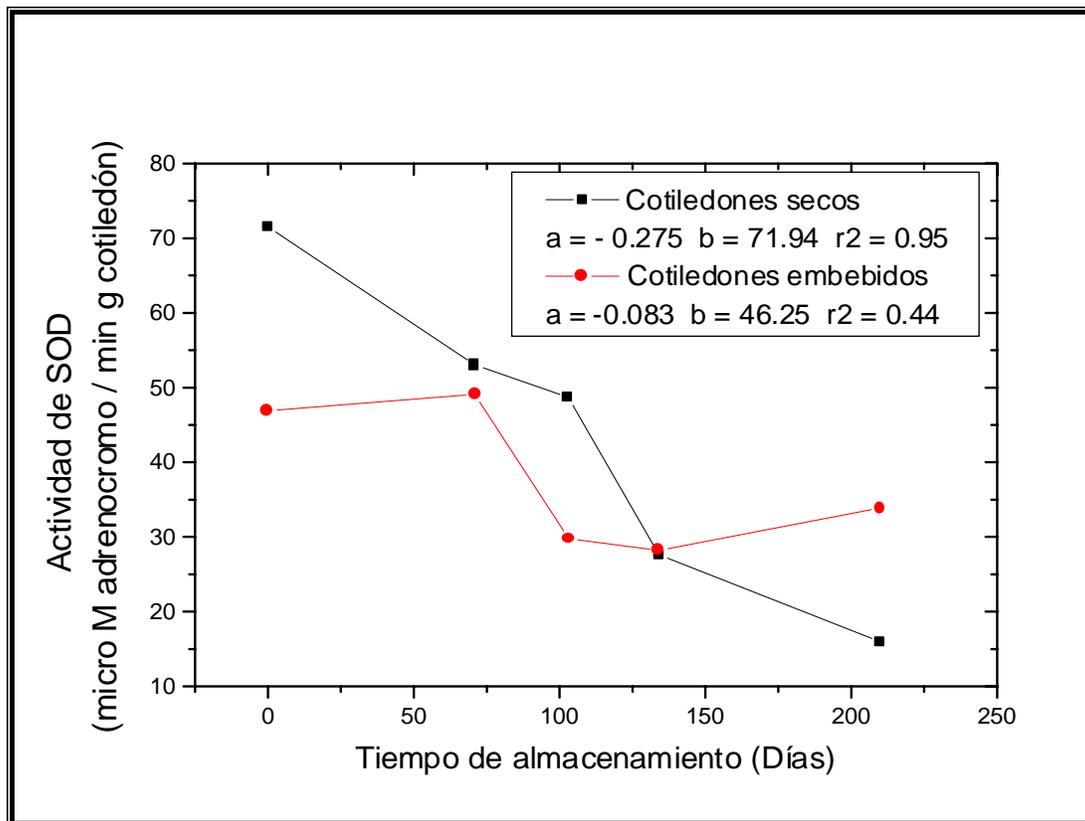


FIGURA 22. Actividad de SOD en frijol Flor de Mayo secas y embebidas, almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano.

Como se puede observar el sistema enzimático de defensa contra especies reactivas de oxígeno mostró, bajo las condiciones de almacenamiento inadecuado, que la actividad de las enzimas disminuyó, tal es el caso de la peroxidasa que llega a decaer hasta un 72.9% su actividad con respecto a la obtenida en el control. La catalasa de la misma forma decae su actividad 52.6% comparado con el control, así también la actividad de la SOD disminuyó 77.6%. Durante la imbibición la actividad de estas enzimas también decreció, pero la imbibición favoreció a la catalasa que mostró un ligero incremento de actividad con respecto a las semillas no embebidas.

El decremento de la actividad del sistema enzimático de defensa, peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa puede deberse a que las enzimas



sufren daño por oxidación provocado por estrés oxidativo, la cual se incrementa con el deterioro del frijol.

McDonald (1999), reportó que los cambios fisiológicos que ocurren durante el deterioro de las semillas en especial de cacahuate hay decremento de actividad de enzimas como: catalasa, superóxido dismutasa y peroxidasa, así como también, en alubias la actividad de la superóxido dismutasa incrementa su actividad.

También en semillas de arroz, Kar y Mishra (1975), reportaron que la actividad de la catalasa decrece con el deterioro, sin embargo, la actividad de la actividad de peroxidasa incrementa, posiblemente esto ocurre por tratarse de diferentes semillas y además de las condiciones a las que se someten dichas semillas, ya que el deterioro no es igual en todos los granos.

Otra posible explicación de la disminución de la actividad del sistema enzimático, puede ser la presencia de radicales libres generados por peróxido de hidrógeno. Lo anterior se puede inferir de la figura 23, en donde se puede observar una correlación positiva en el decremento de la actividad de la peroxidasa con respecto a la acumulación de peróxido de hidrógeno ($r^2 = 0.869$) (Figura 23 A).

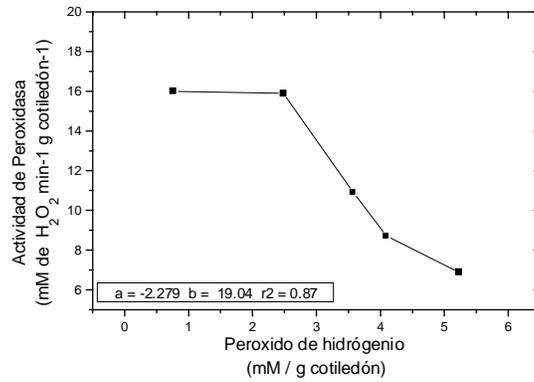
En la actividad de la catalasa no se encontró una buena correlación (Figura 23 B), pero si se observó que la actividad disminuyó con el grado de deterioro, es decir, que a mayor grado de deterioro la actividad fue menor.

Conociendo el mecanismo de la enzima SOD que es la que genera el peróxido de hidrógeno se puede observar que hay una correlación positiva entre la acumulación de peróxido de hidrógeno y el decremento de la actividad de esta enzima ($r^2 = 0.93$) (Figura 23 C) con lo que podemos decir que posiblemente no todo el peróxido de hidrógeno que se está acumulando lo genera la SOD, si no

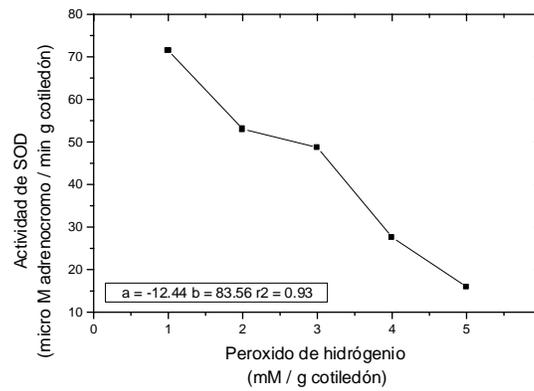


que la generación de este compuesto es de los procesos propios del metabolismo, así también podemos observar que concentraciones elevadas pueden inhibir la actividad de ésta enzima como lo indica Camarena (2006) que indica que el peróxido de hidrógeno puede inactivar enzimas oxidando los grupos tiol, e indica dos enzimas que se inactivan como son la Cu-Zn superóxido dismutasa y la Fe-superóxido dismutasa.

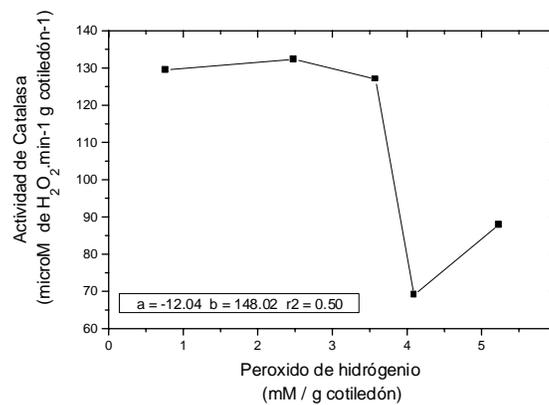
El incremento de agua oxigenada en las semillas puede observarse que no es controlada por las enzimas de defensa y por ello la existencia del daño provocado posiblemente por estrés oxidativo que es reflejado en la oxidación de lípidos, daño en proteínas por acumulación de grupos carbonilos, así como, el daño que posiblemente ocurre en membranas celulares.



A)



B)



C)

FIGURA 23. Efecto de la acumulación de peróxido de hidrógeno sobre la actividad de la POX, SOD y CAT en frijol Flor de Mayo secas, almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano.



CONCLUSIONES

El almacenamiento inadecuado representado por las condiciones bajo estudio en frijol Flor de Mayo generó el deterioro de su calidad culinaria y agronómica, pues provocó el aumento del tiempo de cocción y la pérdida de la germinación del frijol.

Durante el almacenamiento inadecuado se generó la producción de peróxido de hidrógeno compuesto capaz de generar una serie de reacciones que promueven la producción de especies reactivas de oxígeno que conducen al deterioro de la calidad del frijol Flor de Mayo.

El deterioro provocado en la calidad del frijol Flor de Mayo fue el siguiente:

Daño en membranas celulares determinado por un incremento en la conductividad eléctrica debida a la lixiviación de electrolitos, también, se encontró una relación directa con la oxidación de ácidos grasos, cuantificada como acumulación de MDA, que ocurre por consecuencia de la presencia de ERO.

Además se observó la existencia de daño de proteínas en cotiledones de frijol deteriorado, por la acumulación de grupos carbonilos que son productos de reacciones de oxidación, durante los diferentes períodos de almacenamiento inadecuado del frijol Flor de Mayo.

Todos estos resultados mostraron que sí se generó estrés oxidativo en frijoles deteriorados.

Por último, encontramos que el deterioro del frijol afectó el sistema enzimático de defensa antioxidante (CAT, POX y SOD), pues la actividad de éstas enzimas disminuyó en relación directa con el tiempo de almacenamiento inadecuado.



REFERENCIAS

- Aebi**, Hugo (1984). "Catalase in vitro". *Methods in Enzymology*. 105:121-126.
- Basavarajappa**, B. S, Shetty H. S. Prakash H. S. (1991). "Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds". *Seed Sci. and Technology*. 19:279-286.
- Badui**, Dergal Salvador (1999). "Química de los alimentos". Ed. Pearson educación. Tercera edición. México. p. 28-36.
- Becker**, J. M. (1999). "Biotecnología: cursos de prácticas de laboratorio". Ed. Acribia. España. p. 103-106.
- Berlett**, B. S. Y Stadtman E. R. (1997). "Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress". *J. Biol. Chem.* Vol. 272, No. 33. p. 20313-20316.
- Blancas**, Morales Victor H. (2001). "Estudio de las modificaciones en la pectina que ocurren durante el remojo de las semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*)". Tesis. Facultad de Química. UNAM. pp. 52.
- Bohinski**, Robert C. (1998). "Bioquímica". Quinta edición. Pearson educación. México. p. 421 – 422.
- Bradbeer**, J. W. (1992). "Seed Dormancy and Germination". Blackie Academic and Profesional. Great Britain. p. 18-109.
- Cafaro**, María de Jesús. (2005). "Inducción de la senescencia en plantas de trigo y arroz". Universidad de Belgrano. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Argentina. Tesina. p. 1-28.
- Camacho**, Morfín Francisco (1994). "Dormición de semillas, causas y tratamientos". Editorial Trillas. Primera edición. México.
- Camacho**, Villanueva Adriana (1999). "Producción y detoxificación enzimática de especies reactivas de oxígeno en semillas de maíz con distinta sensibilidad al envejecimiento". Tesis maestría. Facultad de Química. UNAM. México. pp. 55.
- Cámara de Diputados** (2000). "Proposición de puntos de acuerdo para que la cámara de diputados solicite al ejecutivo federal, se incluya en el presupuesto de egresos de la federación para el 2001 al producto frijol en el programa de apoyo a la comercialización y desarrollo de mercados regionales".
<http://www.cddhcu.gob.mx/comisiones/camagr/pa6.htm> 30-octubre-00.



Camarena, Gutiérrez G. (2006). "Las especies reactivas de oxígeno en defensa de las plantas contra patógenos". Universidad Autónoma Chapingo, Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. 12(1):5-30.

Chance, B. y Maehly, A. C. (1955). "Assay of catalase and peroxidase". Methods in Enzymology. 11:764-775.

Cornejo, Villegas (1993). "Alternativas en la producción de tempeh con diferentes variedades de frijol de consumo nacional". Tesis. FES Cuautitlán UNAM.

Curtis, Helena. Barnes, N. Sue (2001). "Biología". Editorial Medica Panamericana. 6a. Edición. Madrid, España. pp. 142.

D'Antonino, Faroni, L. R., Martin, Teixeira M. Marques, Pereira J. A., Marques Pereira, A. L. R., Pereira da Silva, F. A. (1993). "Manual de manejo poscosecha de granos a nivel rural". Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile. www.fao.org/docrep/X5027S/x5027S01.htm

Díaz, Acosta Alondra E. Membrillo Hernández Jorge (2006). "Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonización en diversos sistemas biológicos". Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. 9(001):34-44.

Elías, Luiz G. (1982). "Conocimientos actuales sobre el proceso de endurecimiento del frijol". Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), Guatemala, Guatemala, C. A. Vol. XXXII, No. 2: 233-257.

FAO. Almacenamiento de granos en propiedades rurales.
www.fao.org/docrep/X5027S/x5027S0d.htm#Almacenamiento%20de%20granos%20a%20granel

FAO (1970). "Contenido de aminoácidos de los alimentos y datos biológicos sobre las proteínas". Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

García, Piñeiro, J.C. García, Triana B. Morín, Suárez Ma. A. Céspedes, Miranda M. Clapes Hernández S. Olembe Etienne S. (1994). "Radicales libres: Impacto medico". Instituto Superior de Ciencias Médicas de la Habana. MINSAP. Vol.13 No. 3: 77-81.

Hansberg, Wilhelm Torres (2002). "Biología de las Especies de Oxígeno Reactivas". Instituto de Fisiología Celular, Mensaje Bioquímico, Vol. XXVI. Depto. Bioquímica, UNAM. México D.F.

Heath, L. y Packer L. (1968). "Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation". Archives of Biochemistry and Biophysics. 125;189-198.



Hildebrant, AG, Roots I. Tjoe, M y Heinermeier, G. (1978). "Hydrogen peroxide in hepatic microsomes". *Methods in Enzymology*. 52:342-350.

INIFAP (1993). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (1993). "Como producir frijol de riego en los distritos de desarrollo rural de Ojinaga, Delicias y Jiménez, Chihuahua". Centro de Investigación Regional del Norte Centro, Campo Experimental Delicias.

ISTA (International Seed Testing Association), (1993). "International Rules for Seed Testing". *Seed Science and Technology*, 21:1-288.

Jackson, G. M. y Variano, Marston E. (1981). "Hard to cook phenomenon in beans: effects of accelerated storage on water absorption and cooking time". *J. Food sci.* 46(3):799.

James, Aduke (1981). "Handbook of legumes of world economic importance", Plenum Press, N.Y.

Kar, M. y D, Mishra (1976). "Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence". *Plant physiology*. 57;315-319.

Liu, Keshun (1995). "Cellular, Biological, and Physicochemical Basis for the Hard-To-Cook Defect in Legume Seeds". *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*. 35:263-298.

Levine, RL., Garland D, Oliver C. N, Amici S, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman E. R. (1990). "Determination of carbonyl content in oxidatively modified protein". *Methods in Enzymology*. 186:464-478.

Manual del Participante Producción Frijol.

www.sra.gob.mx/internet/informacion_general/programas/fondo_tierras/manuales/Producci_n_Frijol.pdf

Martínez, Silva Ana V. (2003). "Relación entre la actividad de poligalacturonasa y la calidad de cocción del frijol". Tesis. Facultad de Química. UNAM. México. pp. 51.

McCord, Joe. M. And Fridovich Irwin (1969). "Superoxide Dismutase, an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)". *The journal of Biological Chemistry*. Vol. 244 No. 22 p. 6049-6055.

McDonald, M. B. (1999). "Seed deterioration: physiology, repair and assessment". *Seed Sci. And Technol.* 27:177-237.

Méndez, Vega Roberto F. (2002). "Influencia del remojo en las pectinas de la lámina media del cotiledón de los frijoles (*Phaseolus vulgaris*)". Tesis. Facultad de Química. UNAM. México. pp. 63.



Metzler, David E. (1981). "Bioquímica, las reacciones químicas en las células vivas". Ediciones Omega. Barcelona. p. 585-586.

Misra, H. P. and Fridovich I. (1972). "Importance of glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress". Free Rad. Biol. Med. 17:235-248.

Moreno, M. Ernesto (1984). "Análisis Físico y Biológico de Semillas Agrícolas". Instituto de Biología. UNAM. p. 103-119.

Moreno, M. Ernesto (1995). "Almacenamiento y Conservación de Granos en el Medio Rural". Notitec-PUAL. Aguascalientes, México. Volumen 5-3:20-25.

Moreno, Pérez Jesus (1995). "Diversidad genética y patología del frijol". Colegio de postgraduados en ciencias agrícolas. XXXV Aniversario 1959-1994. México.

NMX-FF-038-SCFI-2002. Productos alimenticios no industrializados para consumo humano – Fabaceas – Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) – Especificaciones y métodos de prueba.

Obrador, Rousseau J. (1984). "Cosecha de Granos Trigo, Maíz, Frijol y Soya". Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile. www.fao.org/DOCREP/X5051S/x5051s04.

Pérez, Gastell Pedro Luis. Pérez, de Alejo José Luis (2000). "Métodos para medir el daño oxidativo". Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto". La Habana, Cuba. Revista Cubana. 29(3):192-198.

Pérez, H. Patricia, Esquivel E. G. Rosales S. R. Acosta G. Jorge A. (2002). "Caracterización física, culinaria y nutricional de frijol del altiplano subhúmedo de México". Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 52; 172-180.

Powell, A. A. 1988. "Seed vigour and field establishment". Advances in Research and Technology of Seeds, Wageningen, Vol. 11, No. 1, p. 29-61.

Prochazkova, D. R. K. Sairam, G. C. Srivastava and D. V. Singh (2001). "Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves". Plant Science 16:765-771.

Ramírez, Genel M. (1981). "Almacenamiento y conservación de granos y semillas". Compañía editorial continental S. A. Octava impresión. México. p. 36-66.

SAGARPA (2000). "Situación actual y perspectiva de la producción del frijol en México 1990-2000". www.siea.sagarpa.gob.mx/publicaciones/archivos/frijol90-00.pdf



SAGARPA (2006). Servicio de información y estadísticas agroalimentaria y pesquera (SIAP), con información de las delegaciones de la SAGARPA en los estados 2006. <http://www.sagarpa.gob.mx>.

Sagisaka, Shonosuke (1976). "The Occurrence of Peroxide in a Perennial Plant, *Populus gelrica*". *Plant Physiology*. 57:308-309.

Shomer, I. Paster N. Linder P y Vasilver R. (1990). "The role of cell wall structure in hard to cook phenomenon in beans (*Phaseolus vulgaris* L.)". *Foods Structure* 9:139-149.

Smith, T. Michael y Berjak Patricia. (1995). "Deteriorative Changes Associated with the Loss of Viability of stored Desiccation-Tolerance and Desiccation-Sensitive Seeds". En "Seed Development and Germination". Publisher Kigel Jaime y Galili Gad. Ed. Marcel Dekker Inc. USA. 26:701-728.

Solórzano, Castro Diana B. (1998). "Evaluación de Perdidas Poscosecha de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)". Universidad Sur Colombia. Facultad de Ingeniería. Programa de Ingeniería Agrícola.

Stewart, R. C. Robert y Bewley J. Derek (1980). "Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes". *Plant Physiol*. 65:245-248.

Sung, J. M. and Chiu C.C. (1995). "Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes of naturally aged soybean seed". *Plant Science*. 110:45-52.

Sun, Wendell Q. y Carl Leopold (1995). "The Maillard reaction and oxidative stress during aging of soybean seeds". *Physiologia Plantarum* 94:94-105.

Wilson, D. O. jr. y McDonald M. B. jr. (1985). "The lipid peroxidation of seed ageing". *Seed Science and Technology*, 14:269-300.

ANEXOS

ANEXO 1.- Contenido de humedad de semillas de frijol Flor de Mayo almacenadas a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano.

El contenido de humedad se determinó mediante el método de secado por estufa (ISTA, 1993).

Contenido de humedad

Tiempo de almacenamiento (Días)	0	71	103	134	210
Humedad (%)	14.79 ± 0.25a	13.91 ± 0.39a	14.57 ± 0.32a	12.49 ± 0.47ba	14.28 ± 0.57ba

* Diferentes letras entre columnas indican diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$).

ANEXO 2.- Contenido de proteína de frijol Flor de Mayo almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano, en extracto para proteína dañada.

Proteínas solubles (mg proteína /g cotiledón)

Tiempo de almacenamiento (Días)	0	71	103	134	210
Secos	130.7 ^a	158.9 ^b	158.3 ^{cb}	150.7 ^{ab}	143.1 ^{ab}
Remojados	134.2 ^a	132.68 ^{ab}	154.8 ^{bc}	138.0 ^{abc}	88.6 ^e

* Diferentes letras entre columnas indican diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$).

ANEXO 3.- Contenido de proteína de frijol Flor de Mayo almacenado a 30°C en atmósfera de aire y con 15% de contenido de humedad del grano, en extracto para actividad enzimática.

Proteínas solubles totales_(mg proteína /g Cotiledón)

Tiempo de almacenamiento (Días)	0	71	103	134	210
Secos	145.7 ^a	132.3 ^a	114 ^b	128.2 ^a	101.93 ^c
Remojados	141.2 ^a	161.3 ^a	153.6 ^a	149.2 ^a	112.1 ^b

* Diferentes letras entre columnas indican diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$).