



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

“EVALUACIÓN BROMATOLÓGICA Y DETERMINACIÓN DE  
LOS FACTORES TÓXICOS NATURALES EN EL GRANO DE  
FRIJOL GORDO (*Phaseolus polyanthus*) VERDE Y SECO,  
CONSUMIDOS EN EL MUNICIPIO DE CUETZALAN, PUEBLA”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

BEATRIZ ALEJANDRA RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ



MÉXICO, D.F.

2010



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.

## **JURADO ASIGNADO**

PRESIDENTE:            Profesor Bernardo Lucas Florentino

VOCAL:                   Profesora Lucia Cornejo Barrera

SECRETARIO:           Profesora Inocencia María de Lourdes Flores Téllez

1er. SUPLENTE:        Profesora Karla Mercedes Díaz Gutiérrez

2° SUPLENTE:          Profesor Armando Conca Torres

## **LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA**

Laboratorio 111 del Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química, Ciudad Universitaria, México, D.F.

## **ASESOR DEL TEMA**

M. en C. Bernardo Lucas Florentino

\_\_\_\_\_

## **SUSTENTANTE**

Beatriz Alejandra Rodríguez Rodríguez

\_\_\_\_\_

---

Esta tesis fue elaborada con el apoyo brindado por Colegio de Profesores a través de la cátedra ***Jacobo Gómez Lara***.

Mi más sincero agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme formar parte de ella y dejarme explotar un trozo de los recursos que nos brinda a sus alumnos.

Agradezco al Maestro en Ciencias Bernardo Lucas Florentino por permitirme realizar ésta tesis en su laboratorio e instruirme más en el campo de la toxicología de alimentos y la nutrición.

Agradezco al Químico Pedro Villanueva González por darme luz en la obscuridad alentándome en mi vocación, y por apoyarme a lo largo de mi carrera.

A todos mis profesores de la facultad de Química que siempre tuvieron algo que enseñarme.

A todos mis amigos y compañeros de la facultad de Química con los que compartí equipos, trabajos, reportes de laboratorio... y desvelos.

Avalos Cañada Ileri, Cabanetos Renaud Alexis, Calderón Oliver Mariel, Campos Quintana Itzia, Cervantes Salinas Ania, Coahuila Carmona Alejandra, Dergal Dergal Zaine, Díaz Flores Alejandro, Felipe Cruz Rubén, Gutiérrez Zúñiga Cinthya, Sánchez Cerón Rocío.

También aprendí mucho de ustedes.

A Dios, por regalarme la vida, por permitirme vivir éste momento y porque lo que fui, soy y seré está en sus manos.

A mis padres, por su amor, comprensión, y paciencia, por su apoyo incondicional y por esa fe ciega en mí.

A mis hermanas:

- A Pily por su confianza y lealtad, por comprenderme, inspirarme y organizarme, y porque fuimos mutua compañía durante muchas noches de desvelos.
- A Angeles que supo escucharme y por ayudarme cuando estaba sobrecargada de trabajo.
- A Gloria por esa chispa suya tan peculiar que me hace reír cuando más lo necesito.

A mis abuelos, por su cariño y por dejarme vivir un tiempo con ellos a pesar de las impertinencias e inquietudes que esto conllevaba.

A Rodrigo, Aline y Martha porque siempre tienen algo que decir, por su optimismo, y por poner siempre mis pies sobre la tierra.

**ÍNDICE**

	Página
Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
2. Objetivos.....	4
2.1 Objetivo general.....	4
2.2 Objetivos particulares.....	4
3. Antecedentes.....	5
3.1 Frijol; género <i>Phaseolus</i> .....	5
3.1.1 Phaseolus polyanthus.....	7
3.2 Composición química de los alimentos y su importancia.....	9
3.2.1 Agua.....	9
3.2.2 Hidratos de carbono .....	10
3.2.2.1 Fibra .....	10
3.2.2.2 Hidratos de carbono digeribles (Polisacáridos y azúcares simples).....	11
3.2.3 Proteínas .....	12
3.2.3.1 Metionina.....	13
3.2.4 Grasas.....	13
3.2.5 Otros componentes bromatológicos.....	14
3.2.5.1 Digestibilidad proteínica <i>in vitro</i> .....	14
3.2.5.2 Densidad energética .....	15
3.3 Factores tóxicos y antinutricionales.....	16
3.3.1 Ácido Fítico.....	17
3.3.2 Taninos.....	17

	Página
3.3.3 Fitohemaglutininas.....	19
3.3.4 Inhibidores enzimáticos.....	20
3.3.4.1 Inhibidores de tripsina.....	20
3.3.4.2 Inhibidores de $\alpha$ -Amilasa.....	21
4. Material y métodos.....	22
4.1 Material.....	22
4.1.1 Información de la muestra biológica.....	22
4.1.2 Conservación de la muestra.....	22
4.2 Tratamiento térmico.....	23
4.3 Métodos.....	23
<u>DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO</u> .....	24
4.4 Análisis bromatológico.....	25
4.4.1 Análisis proximal.....	25
4.4.1.1 Humedad.....	25
4.4.1.2 Cenizas.....	26
4.4.1.3 Grasa.....	27
4.4.1.4 Fibra cruda.....	29
4.4.1.5 Proteína cruda.....	32
4.4.2 Metionina.....	36
4.4.3 Digestibilidad proteínica <i>in vitro</i> .....	41
4.4.4 Densidad energética.....	42
4.5 Análisis toxicológico.....	44
4.5.1 Ácido fítico.....	44



	Página
4.5.2 Taninos.....	50
4.5.3 Fitohemaglutininas.....	53
4.5.4 Inhibidores de tripsina.....	60
4.5.5 Inhibidores de $\alpha$ -Amilasa.....	66
5. Resultados y Discusión.....	70
5.1 Análisis Bromatológico.....	70
5.1.1 Análisis proximal.....	70
5.1.2 Otros componentes bromatológicos.....	77
5.2 Análisis Toxicológico.....	81
6. Conclusiones.....	88
7. Bibliografía.....	90
8. Anexos.....	95
8.1 Anexo 1. Municipio de Cuetzalán, Puebla.....	95
8.2 Anexo 2. Mercado del domingo.....	98
8.3 Anexo 3. Frijol gordo.....	102

## RESUMEN

El frijol gordo, nombre vulgar que se le da en el municipio de Cuetzalan Puebla a éste grano de leguminosa, cuyo nombre científico es *Phaseolus polyanthus* es poco conocido, por lo que casi no hay información sobre su aspecto químico y mucho menos nutritivo.

En el presente trabajo se muestra el análisis realizado a éste frijol tanto en su forma seca y verde (fresca); así como después de haberlas sometido a un tratamiento térmico, imitando las condiciones de cocción que llevan a cabo en el lugar de procedencia. Para esto se realizó un análisis bromatológico, que incluye el análisis proximal, la determinación del contenido de metionina, medición de la densidad calórica y digestibilidad *in vitro*; también se realizó un análisis de factores tóxicos y antinutricionales que contiene la determinación de hemaglutininas, ácido fítico, taninos, inhibidores de tripsina e inhibidores de  $\alpha$ -amilasa.

Al realizar el análisis proximal se vio que la composición en base seca del frijol gordo en general tiene como componente mayoritario a los hidratos de carbono digeribles, seguido por la proteína, la fibra cruda, las cenizas y finalmente la grasa. Con respecto a los otros parámetros bromatológicos determinados, el contenido de metionina es mayor en el frijol gordo fresco que en el seco, este valor no cambió con la cocción; la digestibilidad de ambos frijoles crudos es baja, sin embargo ésta aumentó después de la cocción; el contenido energético también es igual en los dos frijoles y no varió después del tratamiento térmico.

Referente a la determinación de los factores tóxicos naturales se encontró que en ambos frijoles crudos el contenido de fitohemaglutininas, inhibidores de tripsina e inhibidores de  $\alpha$ -Amilasa es alto, por lo que tienen un alto riesgo toxicológico; sin embargo tras el tratamiento térmico las fitohemaglutininas se hicieron nulas; y los inhibidores de tripsina disminuyeron a un valor por debajo del límite máximo permitido; conservándose solo el alto contenido de inhibidores de  $\alpha$ -Amilasa. En cuanto al contenido de ácido fítico y taninos, los valores encontrados fueron pequeños e irrelevantes; después del tratamiento térmico estos disminuyeron aún más.

El tratamiento térmico realizado es adecuado para el consumo de ambos frijoles (seco y fresco), y solo habría que tener en cuenta el riesgo por el alto contenido de inhibidores de  $\alpha$ -Amilasa.

## 1. INTRODUCCIÓN

No obstante, que todavía hay duda del lugar o centro de origen del género *Phaseolus*, se acepta normalmente que éste fue en Mesoamérica y en la mayor parte de América Latina. El frijol se viene cultivando desde hace alrededor de 8 mil años, desarrollándose una gran diversidad. Se considera que existen alrededor de 150 especies, aunque en México éstas van de 47 a 60. Las cinco especies más conocidas que el hombre ha domesticado son: *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común), *Phaseolus acutifolius* (frijol tépari), *Phaseolus lunatus* L. (frijol de lima), *Phaseolus coccineus* L. (frijol escarlata o ayocote), y *Phaseolus polyanthus* (frijol botil). En nuestro país las especies más importantes en cuanto a superficie sembrada y producción son *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus coccineus*. (SIAP 2008; Paredes O. et al 2006; Hernández, J. E. y León, J. 1992)

En México el frijol tiene gran importancia desde diversos puntos de vista: económico, alimenticio, biológico y cultural. Por su gran importancia económica y social, es un producto estratégico dentro del desarrollo rural del país, ya que ocupa el segundo lugar en cuanto a superficie sembrada nacional y representa además la segunda actividad agrícola más importante por el número de productores dedicados a su cultivo. Asimismo, es un alimento fundamental en la dieta de la población mexicana, sobre todo para las clases más desprotegidas, ya que constituye la fuente principal de proteínas para dicho sector, siendo un alimento que no puede sustituirse con el consumo de algún otro. Adicionalmente, la importancia ancestral de su cultivo en el campo mexicano radica en que forma parte de la cultura gastronómica de México. (SIAP 2008; SDR 2008) Lamentablemente los frijoles han sido desplazados hasta constituir en la actualidad un elemento característico en la alimentación de grupos de escasos recursos. (Basurto F. 2000)

El género *Phaseolus* es un grupo muy distinguido y natural con una base geográfica claramente definida. Las especies del género *Phaseolus* son las más estudiadas en comparación

con cualquier otro tipo de leguminosa, pero actualmente su estudio se ha restringido de manera muy particular hacia el frijol común (*Phaseolus vulgaris*). (Smartt J. 1990)

Los frijoles que pertenecen a la especie de *Phaseolus polyanthus* presentan una gran dificultad taxonómica, ya que son híbridos generados a partir de las especies *Phaseolus coccineus* y *Phaseolus vulgaris* que muestran niveles altos de fertilidad (Smartt J. 1990). Su cultivo es muy antiguo en nuestro país y se señala que sus formas silvestres son las menos evolucionadas, lo que indica que es la variedad con domesticación mas reciente y en consecuencia tiene un alto potencial de desarrollo, incluso actualmente existen genotipos listos para utilizarse en aquellos lugares donde las condiciones son adversas para el crecimiento del frijol común, así como también se menciona que tiene potencial en agrosilvicultura (fertilización del suelo, prevención de la erosión de éste, entre otros); sin embargo, en las regiones en que se cultiva este frijol su producción se ha reducido notoriamente, debido a la expansión de las plantaciones de café o de la ganadería, y en el caso de que el campesino se vea obligado a dejar de cultivar una especie de frijol, conserva el frijol común ya que con éste obtiene un mejor precio. (Hernández, J. E. y León, J. 1992)

En el municipio de Cuetzalan, Puebla (**ver anexo 1**), se acostumbra cultivar una especie de *Ph. Polyanthus*, conocido vulgarmente como frijol gordo, el cual se consume en forma seca, pero más comúnmente como grano verde o fresco. Si bien en dichas comunidades es apreciado este grano de leguminosa, en realidad es poco conocido fuera de ésta región y en consecuencia casi no hay información sobre su aspecto nutritivo; además, como leguminosa tiene una alta probabilidad de contener factores tóxicos naturales, por lo que es importante la detección y cuantificación de estas sustancias indeseables, para establecer la seguridad alimenticia para el consumo de este alimento de origen vegetal.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

Determinar la composición bromatológica y el contenido de los factores tóxicos que se presentan con mayor frecuencia en las leguminosas, tanto en el grano seco como fresco del frijol gordo (*Phaseolus polyanthus*); así como realizar el tratamiento térmico que se utiliza para el consumo de éstos y hacer un seguimiento de la composición bromatológica y el contenido residual de los factores tóxicos más importantes.

### 2. 2 Objetivos particulares

- ✓ Obtener suficiente cantidad de las dos formas de consumo del frijol gordo en el municipio de Cuetzalan, Puebla; así como recabar la información de la forma de cocción de esta leguminosa.
- ✓ Realizar la determinación del análisis proximal; así como el contenido de metionina, digestibilidad *in vitro* y contenido energético a las dos fases del frijol gordo, para una mejor caracterización bromatológica
- ✓ Determinar la presencia y cuantificación de los siguientes factores tóxicos: fitohemaglutininas, inhibidores de tripsina, taninos, ácido fítico e inhibidores de  $\alpha$ -amilasa en las dos fases de desarrollo del frijol gordo..
- ✓ Realizar el seguimiento de la composición de macronutrientes y factores tóxicos residuales, después de someter los granos de frijol gordo de ambas fases de desarrollo, al tratamiento térmico que se acostumbra realizar para el consumo de éstos.

### 3. ANTECEDENTES

Las leguminosas o legumbres son las semillas secas de las plantas separadas de su vaina y pertenecen a la familia *Leguminosae* de donde proviene el nombre. Aportan el 20% de la proteína consumida en todo el mundo y contienen aproximadamente dos veces más proteína que los cereales en una porción. Todas las legumbres son muy similares en cuanto a sus características nutricionales; son muy ricas en proteínas, hidratos de carbono y fibras, mientras que el contenido de lípidos es relativamente bajo y los ácidos grasos que lo componen son insaturados. (Charley H. 2004)

Entre los factores positivos de las leguminosas en la nutrición humana, se puede citar su alta concentración en proteína con alto contenido en lisina, que hace a las leguminosas un complemento proteínico excelente para los cereales. Son también una buena fuente de algunos minerales como calcio, hierro, zinc, fósforo, potasio y magnesio, así como de algunas vitaminas hidrosolubles, especialmente tiamina, riboflavina y niacina; Entre los factores negativos se puede detallar la deficiencia en aminoácidos azufrados y la presencia de ciertos factores tóxicos que influyen en la digestibilidad proteínica y de hidratos de carbono. (Charley H. 2004)

#### 3.1 Frijol; género *Phaseolus*

Los frijoles son uno de los alimentos más antiguos que el hombre conoce; han formado parte de la dieta humana desde hace miles de años, los restos más antiguos de frijol en México datan de hace 10000 años y corresponden a *P. coccineus* (Hernández X. et al, 1979)

Las especies cultivadas del género *Phaseolus* han estado en contacto y han sido manipulados por el hombre desde hace varios milenios, hecho que ha influido en la distribución actual de estas plantas, así como en su evolución (Delgado, 1985). Existe una gran variabilidad genética en la

especie del género *Phaseolus*, más la fuente para el incremento en los tipos de semillas es un gran debate ya que dos fuentes pueden haber proveído genes que incrementen los tipos de semillas (Schoonhoven A. and Voysest O. 1991); así también la acción del hombre ha influido en la dispersión de algunas (Delgado, 1985). Sólo tres especies tienen una distribución tan amplia como el género: *Ph. vulgaris*, *Ph. lunatus* y *Ph. coccineus*, todas cultivadas y con sus contrapartes silvestres. (Basurto F. 2000)

Para conocer el número exacto de todas las especies de *Phaseolus*, uno esperaría ver la definición presente y disponible del gen aplicado para éstas. Pero la tarea no es simple, ya que para estudiarlas es necesario tener acceso a los especímenes, revisar el gen al que pertenecen y repasar los sinónimos ya que varias variedades pueden ser la misma especie, tal comparación debe hacerse con los primeros en los cuales las descripciones originales fueron hechas. Para juntar esta información no convencional el acceso al material vivo es esencial, pero desafortunadamente no es tan común. (Schoonhoven A. and Voysest A. 1991)

En general los frijoles del género *Phaseolus* son ricos en proteína, son buenas fuentes de vitaminas, tales como tiamina, riboflamina, niacina, y vitamina C; en la fracción de cenizas se pueden encontrar componentes minerales como potasio, calcio, magnesio, fósforo, y zinc; el porcentaje de hidratos de carbono es relativamente elevado y son fácilmente absorbidos; el contenido de grasa o lípidos es relativamente bajo, pero la fracción es rica en ácidos grasos esenciales; tienen un alto contenido de fibra cruda, lo cual sirve como prebiótico y puede reducir la digestibilidad del frijol. (Basurto F. 2000)

Parte de las desventajas de los frijoles como alimento para el hombre, además del bajo contenido de aminoácidos azufrados, son su baja digestibilidad y la presencia de factores tóxicos y antinutricionales, como inhibidores de tripsina, fitohemaglutininas, y taninos. (Arteaga M. 1976; Hernández I. y Sotelo A. 1980).

Los frijoles son consumidos en México bajo diferentes formas; pero en todos los casos estos requieren de su cocción, la cual gelatiniza el almidón, aumenta la disponibilidad de las proteínas, altera la textura y mejora el sabor, haciéndolos más apetecibles. (Charley H. 2004)

Este tratamiento térmico consiste en diferentes grados de calentamiento, con la finalidad de eliminar o disminuir los factores tóxicos naturales termolábiles que normalmente contienen las semillas de leguminosas, en particular la inactivación de las fitohemaglutininas o lectinas, las cuales son consideradas auténticas enterotoxinas y en menor extensión la presencia de inhibidores de tripsina; situación que no es la excepción para el caso del frijol (Liener, I. 1997; Van der Poel et al, 1990).

Adicionalmente, en una planta superior como es el frijol, la composición química y en particular el contenido de ciertos metabolitos secundarios, que pueden funcionar como factores tóxicos, puede variar notoriamente en las diferentes fases de desarrollo; así se reporta que para ciertas semillas de leguminosas, el contenido de factores tóxicos cambia significativamente en las diferentes etapas de su desarrollo, por lo cual, es de suma trascendencia poder conocer dicha variación (Sotelo A. y Lucas B. 1998; Orúe E. et al, 1998).

### **3.1.1 *Phaseolus polyanthus***

En México las investigaciones sobre el frijol se iniciaron alrededor de 1936 y de 1942 a 1944 los estudios se concentraron en el mejoramiento genético, entre 1945 y 1955 se continuaron los estudios sobre fitomejoramiento, y resistencia a plagas y enfermedades, con investigación de los ciclos biológicos de las plagas y con la realización de cruzas entre *Ph. vulgaris* y *Ph. coccineus* buscando recombinaciones resistentes; en 1957 se iniciaron los estudios sobre infiltración genética entre *P. vulgaris* y *P. coccineus*, que condujeron en 1959 a la descripción de la subespecie *Ph. coccineus L. ssp darwinianus* por Hernandez, et al; también denominadas *Ph. polyanthus*



**Greenman**; en 1972 se inician de manera sistemática y coordinada estudios sobre el frijol en el colegio de Postgraduados, Chapingo y en 1976 en el instituto de biología en la UNAM (Engleman, 1979. Basurto F. 2000)

En el ámbito mundial, México se encuentra entre los cinco principales productores de frijol conjuntamente con la India, Brasil, China y los Estados Unidos de América (Paredes O. et al 2006). El género **Phaseolus** se distribuye principalmente en zonas cálidas y templadas, y en particular la especie **Phaseolus polyanthus** se encuentra en Puebla, Veracruz, Oaxaca y Chiapas (México); en Guatemala, en Perú, en las Cordilleras Occidental y Central de Colombia, Ecuador, Costa Rica y por las partes altas del Caribe (Jamaica, República Dominicana). La forma silvestre se ha encontrado sólo en la parte centro-occidental de Guatemala, donde es un bejuco que crece en el bosque húmedo; y aún no se descarta la posibilidad de que aparezca también en la zona montañosa del límite Jalisco-Michoacán, México. (Hernández, J. E. y León, J. 1992)

A **Phaseolus polyanthus** se le conoce como una subespecie de **Ph. coccineus**, o **Phaseolus darwinianus** (Hernández X. et al, 1959). Ésta debe ser considerada como estrechamente relacionada con **Ph. coccineus**, ya que el material es un descendiente de esta última; o según Pinero y Eguiarte (1988) podría existir un ancestro taxonómico común (aun no descubierto) entre ambas variedades. También ésta variedad crece todo el año, con lo que se puede hacer una distinción oficial de verdad, ya que esto no sucede con **Ph. coccineus**. No se han hecho distinciones entre el tipo cultivado y su progenitor salvaje, y no vale la pena mencionar el comportamiento ambivalente de estos. Podría ser cultivado en asociación con el maíz como una cosecha completa, pero también puede escalar en arboles en las vegetaciones abiertas sin necesidad de cuidados humanos. (Schoonhoven A. and Voysest O. 1991)

Un factor limitante del **Phaseolus polyanthus** parece ser la menor digestibilidad que se ha comprobado en ciertas zonas. La documentación de las prácticas actuales de consumo en

comunidades campesinas, así como la investigación de su calidad nutritiva debe considerarse como prioritaria ya que hay que tener en cuenta que en un pasado muy reciente estos frijoles eran consumidos varias veces por semana. Tradicionalmente se prefiere el grano verde o fresco (por mejor digestibilidad o tegumento más tierno) cuando la vaina llega a la madurez fisiológica, y menos el grano seco; se consume en sopa, guiso o inclusive en dulce. (Hernández, J. E. y León, J. 1992)

### **3.2 Composición química de los alimentos y su importancia**

Probablemente no haya nada que sea más esencial al estudio de la ciencia de los alimentos que el conocimiento de sus componentes y sus propiedades. Las diferentes partes de las plantas, como ocurre en todos los seres vivos, contienen una gran cantidad de sustancias químicas distintas. (Norman N. and Potter Ph. D. 1973; Fennema O. 2006)

Los alimentos se integran de tres principales grupos de componentes: los hidratos de carbono, las proteínas y las grasas; así como los derivados de los mismos. Hay además un grupo de elementos inorgánicos y un grupo diversificado de sustancias orgánicas presentes en proporciones relativamente pequeñas; estas incluyen sustancias como las vitaminas, las enzimas, los emulsificantes, los ácidos, los oxidantes, los antioxidantes, los pigmentos, y los sabores. Hay también un componente siempre presente y muy importante: el agua. Todos estos compuestos están dispuestos de tal forma en los diferentes alimentos como para dar a éstos su estructura, textura, sabor, color, y valor nutritivo. (Norman N. and Potter Ph. D. 1973)

#### **3.2.1 Agua**

La mayoría de las funciones biológicas del agua están relacionadas con su propiedad de actuar como disolvente de numerosos compuestos.

El contenido máximo de agua para un determinado tejido vegetal depende de sus características químicas y estructurales, así como de diversos factores extrínsecos. La susceptibilidad de un producto vegetal a la deshidratación es función de la humedad relativa del ambiente y de las modificaciones estructurales y químicas con las que responde el producto para reducir la transpiración (pérdida de agua). El agua supone generalmente el 80-90% del peso fresco en las plantas jugosas y menos del 20% en los vegetales secos como cereales, frutos secos y legumbres. Las pérdidas de agua provocan el marchitamiento y la pérdida de peso y además, el balance hídrico puede originar cambios fisiológicos deseables o indeseables en los vegetales. (Fennema O. 2006)

### **3.2.2 Hidratos de carbono**

Los hidratos de carbono constituyen una de las tres principales partes nutrimentales y suelen proporcionar la mayor parte de energía en las dietas. (Fischer P. B. 2000). Los hidratos de carbono componen aproximadamente el 75% del extracto seco de los vegetales. El contenido total es muy variable y alcanza un 60% o más en cereales y legumbres. En general se consideran hidratos de carbono totales principalmente los azúcares sencillos y los polisacáridos, que en realidad incluyen también las sustancias pécticas y la lignina. Los hidratos de carbono se localizan en la pared de las células vegetales e intracelularmente en los plastidios, vacuolas o en el citoplasma. (Fennema O. 2006)

#### **3.2.2.1 Fibra**

La fibra la integran los componentes principales de la pared celular que son la celulosa, las hemicelulosas, las pectinas y las ligninas. La celulosa es una de las sustancias más abundantes en la biosfera y un hidrato de carbono muy insoluble que el hombre no puede digerir. Las hemicelulosas

son un grupo heterogéneo de polisacáridos constituido por diversos tipos de hexosas y pentosas, que algunas veces contienen residuos de ácidos urónicos. La pectina está formada por residuos de ácido galacturónico unidos por enlaces  $\alpha$ -1,4 y presenta distintos grados de esterificación con el metanol. La lignina, asociada siempre a los hidratos de carbono de la pared celular, es un polímero tridimensional formado por unidades de fenilpropano unidas mediante cadenas laterales alifáticas de tres carbonos.

Algunas plantas contienen también gomas y mucílagos que se obtienen en forma de exudados de árboles, gomas de semillas o extractos de algas. Estos hidratos de carbono son químicamente semejantes a las hemicelulosas.

El contenido total y la proporción relativa de los componentes de la pared celular varían considerablemente de una especie vegetal a otra, entre los distintos tipos de células, dependiendo del grado de madurez en el momento de la recolección y en función de la duración y las condiciones del almacenamiento postcosecha. (Fennema O. 2006)

### **3.2.2.2 Hidratos de carbono digeribles (Polisacáridos y azúcares simples)**

El principal hidrato de carbono de los tejidos vegetales que no está asociado a la pared celular es el almidón, un polímero lineal ( $\alpha$ -1,4) o ramificado ( $\alpha$ -1,4;1,6) de la D-glucosa. En las plantas adultas el almidón se localiza en los plastidios intercelulares o gránulos que tienen formas, tamaños, y propiedades ópticas específicas para cada especie. La cantidad de polisacáridos no amiláceos en las plantas comestibles no se conoce con exactitud debido a las limitaciones de los métodos analíticos, mas algunos de éstos son los pentosanos (fructanos), las liqueninas y la inulina. (Fennema O. 2006)

Los azúcares más abundantes en casi todos los productos vegetales son sacarosa, glucosa, y fructuosa; sin embargo las legumbres suelen contener bastante cantidad (1-3%) de rafinosa y

estaquiosa, con enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,6 entre la galactosa y la glucosa. Estos oligosacáridos producen flatulencia porque los humanos no sintetizan la enzima  $\alpha$ -galactosidasa necesaria para hidrolizar el enlace galactosa-glucosa. El ácido fítico forma complejos con los iones metálicos divalentes, reduciendo la biodisponibilidad de estos nutrientes en muchos cereales y leguminosas. (Fennema O. 2006)

### 3.2.3 Proteínas

Las proteínas son moléculas complejas compuestas por aminoácidos unidos a través de un enlace peptídico, que contienen un grupo carboxílico y un grupo amino en posición  $\alpha$  y un grupo R que varía en los distintos aminoácidos. Existen aminoácidos que el organismo no puede sintetizar y por ende son “indispensables” en la alimentación; el contenido de éstos determina la calidad de una proteína. Se consideran aminoácidos indispensables: leucina, isoleucina, lisina, metionina, valina, treonina, triptófano, fenilalanina e histidina. (Fennema O. 2006)

El contenido proteínico varía mucho en las distintas frutas y hortalizas, pero generalmente sólo representa un pequeño porcentaje sobre el peso fresco. Algunos cultivos, como cereales, legumbres, tubérculos y bulbos, pueden contener una gran cantidad de proteínas. Estos componentes tienen mucha importancia por su gran contribución al valor nutritivo del producto y por sus interesantes propiedades funcionales. Las semillas de las leguminosas contienen cantidades relativamente elevadas de proteínas (20-40%) El aminoácido esencial limitante de las legumbres es la metionina, aunque también tiene un bajo contenido de cisteína (aminoácido no esencial). Las legumbres contienen también proteínas y glicoproteínas llamadas hemaglutininas o lectinas. (Fennema O. 2006)

### 3.2.3.1 Metionina

La metionina es uno de los aminoácidos esenciales, lo que significa que no se puede sintetizar en el organismo y debe obtenerse a través de la dieta. Aporta azufre y otros compuestos que necesita el organismo para un metabolismo y un crecimiento normales. La metionina pertenece también a un grupo de compuestos llamados lipotrópicos, o sustancias químicas que ayudan al hígado a procesar las grasas (lípidos). Otras sustancias de este grupo son la colina, el inositol y la betaína (trimetilglicina). (Derache R. 1990)

### 3.2.4 Grasas

Las grasas son sustancias insolubles en agua y son un importante combustible contenido en los alimentos debido al alto aporte calórico que suministran y representan una reserva importante de energía.

Los lípidos representan menos del 1% del peso fresco en casi todas las frutas y hortalizas. Los cereales y las legumbres pueden almacenar cantidades importantes de lípidos, especialmente en su endospermo. Los triglicéridos de la fracción lipídica neutra son el principal material de reserva en productos vegetales como nueces, semillas oleaginosas, legumbres y cereales; éstos se encuentran en forma de gotitas lipídicas en el germen y en el salvado. En los lípidos de los granos de cereales y legumbres los ácidos grasos son el linoleico (C18:2), oleico (C18:1) y palmítico (C16).

Los lípidos insaponificables de los aceites de las semillas están constituidos por esteroides, alcoholes superiores e hidrocarburos como el escualeno. Los fitoesteroides son compuestos estructuralmente parecidos al colesterol. Otros lípidos o sustancias lipófilas que se encuentran solamente en cantidades traza pueden tener una contribución importante en el sabor característico de los productos vegetales. (Fennema O. 2006)

### 3.2.5 Otros componentes bromatológicos

El análisis bromatológico determina la calidad de los alimentos por sus componentes nutricionales, así como por su digestibilidad y contenido energético.

#### 3.2.5.1 Digestibilidad proteínica “*in vitro*”

La digestibilidad es una forma de medir el aprovechamiento de un alimento, es decir, la facilidad con que es convertido en el aparato digestivo en sustancias útiles para la nutrición. Constituye un indicador de la calidad de la materia prima que a veces varía notablemente, de una especie a otra; así como antes y después de someterlo a tratamientos tecnológicos como el procesamiento térmico. (Manríquez J.A. y Romero J.J. 1993)

La digestibilidad proteínica es uno de parámetros utilizados para medir el valor nutricional debido a que no basta que la proteína se encuentre en altos porcentajes en el alimento sino que debe ser digerible para que pueda ser asimilado y, por consecuencia, aprovechado por el organismo que lo ingiere. Por lo tanto, la digestibilidad constituye una excelente medida de calidad y ello ha suscitado la idea de medirla de diferentes formas, *in vitro* simulando las condiciones y reacciones fisiológicas que se llevan a cabo dentro del organismo al someter a las proteínas a una digestión artificial mediante el uso de enzimas proteolíticas; o *in vivo* que se basa esencialmente en el establecimiento de un balance apropiado entre los nutrientes que entran a partir de los alimentos y de los que salen a través de las heces. El inconveniente de la digestibilidad *in vitro* es que aunque este tipo de métodos son más precisos y reproducibles, pueden dar resultados inexactos, y en cambio los ensayos *in vivo* son más confiables (Manríquez J.A. y Romero J.J. 1993)

Las proteínas de origen animal son más digeribles (95-100%) que las de origen vegetal (60-85%). Un decremento en la digestibilidad de las proteínas puede ser debido a su contenido de

fibra, que actúa como una barrera física para la difusión enzimática, además hace que el paso por el intestino sea más rápido por lo que disminuye el tiempo de absorción. La digestibilidad proteínica en las leguminosas también puede verse afectada por factores tóxicos, los cuales disminuyen la absorción de la mucosa intestinal, así como factores antinutricionales que disminuyen la acción de las enzimas digestivas.

Mediante el remojo se puede mejorar significativamente la digestibilidad, ya que el ácido fítico, los inhibidores de tripsina, y los taninos pueden lixiviarse en el agua de remojo y la reducción de éstos se incrementa, aumentando la digestibilidad. La cocción también mejora la digestibilidad, siendo mayor si hay un remojo previo, destruyendo factores antinutricionales lábiles, y dejando las proteínas más accesibles para la acción enzimática. (Kataria, et al, 1992)

### **3.2.5.2 Densidad energética**

La estimación del contenido calórico en los alimentos es indispensable para estudios de metabolismo y balance de energía. Los nutrimentos se requieren en primera instancia para aportar la energía necesaria y se pueda mantener las funciones vitales. Los organismos vivos necesitan energía para desempeñar sus actividades diarias aún estando en reposo absoluto como dormir. Así, los requerimientos energéticos deben cubrir las necesidades para mantener a un individuo sano y con esto pueda realizar su vida activa en forma normal. (Bowman B. A. y Russell R. M. 2003)

Una forma práctica de obtener el contenido energético o densidad calórica de un alimento es utilizando el método directo con una bomba calorimétrica; sin embargo, hay que tomar en cuenta que este dispositivo determina la energía liberada por la oxidación completa del alimento, mientras que el cuerpo humano realiza la oxidación incompleta. Por lo tanto, se puede asumir que la energía determinada en la bomba calorimétrica, da el máximo potencial energético de un



alimento (calor de combustión), que por convención se conoce como “Energía Gruesa (EG) o bruta”. (Bowman B. A. y Russell R. M. 2003)

### **3.3 Factores tóxicos y antinutricionales.**

Efectivamente, algunos alimentos habituales en la dieta, además de nutrientes, contienen proporciones variables de sustancias sin valor nutritivo o incluso peligrosas para el organismo; de este modo, las manifestaciones tóxicas debidas a sustancias naturales pueden persistir siempre en forma endémica en ciertas regiones, debido a costumbres alimentarias particulares. (Derache R. 1990)

La elección de las especies útiles, dentro de las posibilidades que ofrece el medio ecológico, forma parte del comportamiento alimentario del hombre. Durante ésta selección, los alimentos que presentaban un cierto interés nutricional pero que incluían una toxicidad intrínseca elevada fueron mayoritariamente eliminados, pero dentro del legado cultural transmitido de generación en generación, se encuentran técnicas de maduración, conservación e incluso de cocción que han sido a menudo adoptadas empíricamente para mejorar la digestibilidad de los alimentos. Sabemos hoy en día que esta transformación de los alimentos es debida en parte a una metabolización, eliminación, o neutralización de los tóxicos naturales o de los inhibidores metabólicos. (Derache R. 1990)

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

- Las sustancias antinutritivas, el efecto de las cuales se basa en disminuir la disponibilidad o provocar una pérdida suplementaria de los nutrientes esenciales.
- Los tóxicos de los alimentos, como el nombre lo indica son compuestos que tienen un efecto nocivo sobre el organismo; su modo de acción puede explicarse, sea por su

particular reactividad, por un mimetismo molecular de las hormonas, aminoácidos, o, en ciertos casos, por la existencia de una información genética que favorezca la aparición de una determinada patología.

### **3.3.1 Ácido Fítico**

El ácido fítico es el éster hexafosfórico del ciclohexanol (ácido inositol hexafosfórico). Es una molécula altamente reactiva, debido a que posee varios grupos fosfatos; la presencia de estos grupos facilita la formación de complejos con cationes. Su acción principal es la disminución de la biodisponibilidad de minerales divalentes como Ca, Co, Cu, Mg, Mo, Mn, Fe, y Zn con los que forma sales insolubles; un gramo de ácido fítico secuestra irreversiblemente un gramo de calcio.

El ácido fítico se encuentra en concentraciones del orden de 2 a 5 g/kg en los cereales, leguminosas, u oleaginosas. Se localiza principalmente en el pericarpio.

Para el hombre, el ácido fítico se considera como una mala fuente de fosfato, porque no se libera o porque se encuentra en forma de sales insolubles; por otro lado el ácido fítico aumenta la pérdida de calcio y contribuye a la descalcificación del organismo, incluso con un aporte normal de calcio y vitamina D. (Derache R. 1990)

### **3.3.2 Taninos**

Entre los compuestos polifenólicos de los alimentos, los taninos constituyen un grupo caracterizado por su facultad de combinarse al grupo carboxilo de las proteínas mediante puentes de hidrogeno; son solubles en agua y se clasifican en condensados o hidrolizables, en base a su tipo estructural y su reactividad contra agentes hidrolíticos (particularmente ácidos). La presencia de estos polifenoles en los alimentos determina una disminución del valor biológico de éstos, debido, en gran parte, a una interferencia con la utilización digestiva de las proteínas.

Los taninos también se utilizan como aditivos en enología, cervecería, y en la industria de conservas, su dosis diaria admitida es de 500mg/día; esta dosis es fácilmente superada en dietas alimentarias que se consideran normales.

Los efectos antinutritivos de estos polifenoles se manifiestan principalmente por un aumento de la excreción fecal de nitrógeno debido a: la presencia de complejos tanino-proteínas resistentes al ataque de enzimas digestivas (la unión de los taninos con las enzimas de la saliva y mucosa bucal causan el efecto astringente); la inhibición no específica de las enzimas digestivas por taninos libres; y la acción directa de los taninos sobre la mucosa digestiva que estimula las secreciones.

La actividad antinutritiva de los taninos puede manifestarse también por la aptitud que tienen estos polímeros a asociarse a los iones di- y trivalentes. El ácido tánico disminuye la biodisponibilidad de la vitamina B<sub>12</sub>, al combinarse con ésta y a su factor intrínseco; por otro lado, la vitamina B<sub>1</sub> puede ser destruida por algunos taninos y las reservas hepáticas de vitamina A disminuyen en presencia de determinados taninos en la dieta. (Derache R. 1990)

La deshidratación y otros tratamientos tecnológicos pueden favorecer la oxidación de los taninos. Para ver el efecto del remojo y la cocción sobre los taninos (factores antinutricionales de naturaleza no proteínica) se han realizado estudios en diferentes leguminosas, por ejemplo: en **vicia faba** se observó que con el remojo hay una reducción de taninos en un rango del 42 al 51%; con remojo y descascarillado hay una reducción del 70-73%, debido a que la mayoría de los taninos se encuentran en la testa. Con una cocción seguida de un descascarillado se puede reducir el contenido de taninos de un 76 a un 81% y la cocción en autoclave los elimina completamente. (Sharma y Seghal, 1992)

### 3.3.3 Fitohemaglutininas

Las fitohemaglutininas, conocidas también como lectinas, causan la aglomeración de los glóbulos rojos de la sangre y a veces de los leucocitos; células como el enterocito, que presentan los mismos residuos glucídicos en la superficie de las membranas de las microvellosidades, fijan también a las lectinas. (Derache R. 1990; Robinson D. S.1991)

Las lectinas son proteínas de naturaleza no inmunoglobulínica capaces de reconocer específicamente y de unirse de forma reversible a algunos restos de los hidratos de carbono complejos sin alterar la estructura covalente del ligando glicosilo reconocido. En las leguminosas, aproximadamente unas 600 especies contienen lectinas que representan el 2% al 10% de la proteína total en la legumbre seca y suelen destruirse por métodos de calentamiento como el secado y la cocción. (Robinson D. S.1991)

La importancia del daño está relacionada con la concentración y la especificidad de las lectinas en el alimento: todas ellas producen síntomas parecidos entre los que resalta la intensa inflamación de la mucosa intestinal, con la posterior destrucción de los epitelios, edema y de la hemorragia del tejido linfático; estas lesiones parecen favorecer la proliferación de bacterias y su fijación a la superficie del epitelio. Hay entonces una destrucción de las células de la mucosa, disminución de la actividad enzimática y superficie de absorción (Robinson D. S.1991)

Dada la naturaleza proteínica de las lectinas, pueden ser destruidas mediante el calor con métodos tradicionales de cocción. Comúnmente altas temperaturas (con o sin cocción) pueden destruir efectivamente la actividad hemaglutinante de las leguminosas; en diversos estudios realizados se ha encontrado que cuando el frijol es inconsistente (cuando se presiona con un tenedor, y es blando para su consumo), ya no presenta ésta actividad. (Thompson, 1983)

### **3.3.4 Inhibidores enzimáticos**

Los inhibidores enzimáticos son muy frecuentes dentro de la alimentación humana. Se trata concretamente de sustancias que interfieren con la actividad de las proteasas o de las carbohidratasas de los vegetales, con una función protectora, inhibiendo sistemas enzimáticos de sus depredadores, o con una función reguladora, interviniendo en procesos de almacenamiento del organismo. (Derache R. 1990)

#### **3.3.4.1 Inhibidores de tripsina**

Existen varias corrientes entre los investigadores en cuanto al papel biológico preciso de los inhibidores de proteasas de las plantas: los inhibidores de enzimas proteolíticas forman fuertes complejos con las enzimas que inhiben, la enzima e inhibidor experimentan algún tipo de interacción enzima-sustrato, los inhibidores son resistentes a la proteólisis; sin embargo se ve claramente que impiden la digestión de las proteínas de las semillas por los animales o los insectos. Los inhibidores de proteasas representan del 0.2 al 2 % en peso de las proteínas solubles de las legumbres.

Los inhibidores de tripsina son sustancias que tienen la capacidad de inhibir la actividad proteolítica de la tripsina. Se han encontrado en todas las leguminosas, de las cuales un número muy elevado poseen también inhibidores de quimotripsina.

El calentamiento de leguminosas puede mejorar el valor nutritivo y producir un suplemento proteínico de mayor calidad, no obstante en algunas legumbres puede detectarse actividad inhibidora de la tripsina después de haberlas calentado. Con esto se recomienda buscar un equilibrio de tiempo y temperatura con el fin de que no se dañen las sustancias nutritivas sensibles al calor. (Robinson D. S.1991)

### **3.3.4.2 Inhibidores de $\alpha$ -Amilasa**

Los productos vegetales contienen una gran variedad de inhibidores de carbohidratasa; los que actúan contra la celulosa o la pectinasa tienen poco interés en la nutrición humana; en cambio, la presencia de antiamilasas o antiinvertasas en las dietas puede ocasionar problemas nutricionales. Estos inhibidores son, además, bastante termoestables.

Las leguminosas y el trigo contienen inhibidores de amilasas muy activos sobre las enzimas digestivas. Estas sustancias actúan de forma no competitiva y han sido propuestas para el tratamiento de la diabetes y de la obesidad. (Derache R. 1990)

#### 4. MATERIAL Y MÉTODOS

##### 4.1 Material

###### 4.1.1 Información de la muestra biológica

Procedencia de la muestra: Municipio de Cuetzalán, Puebla (**ver anexo 1**).

Transporte de la muestra: Los 6kg de frijol seco se trasladaron en bolsas de polietileno, mientras que los 25kg frijol fresco en vaina dentro de costales de rafia. (**ver anexo 2**)

###### 4.1.2 Conservación de la muestra

El frijol seco (**ver anexo 3**) no necesito ningún tratamiento para su conservación; en cambio el frijol fresco (**ver anexo 3**) se retiro de la vaina y se secó en una estufa de circulación forzada labLine modelo Imperial III a 57 °C (55 °C ± 3) durante 2 días, calculando la humedad gruesa del producto para al final poder referir los resultados en base original.

Una pequeña muestra de éste frijol fresco se liofilizó en un equipo Labconco modelo FreeZone 4.5 a - 45º C y vacío de 0.05 mBar con el fin de ver durante el análisis de factores tóxicos termosensibles si se alteraron estos componentes con el calor de la estufa de circulación forzada. Al realizar éste análisis no hubo diferencia significativa con los resultados obtenidos de las muestras en ambos tratamientos, por lo que no se afectó el contenido de estos compuestos con el calor y se puede utilizar indistintamente la muestra deshidratada en la estufa.

Almacenamiento: El frijol seco y el frijol fresco deshidratado se guardaron en contenedores plásticos herméticos.

Operaciones de reducción de tamaño (molienda): Se tomó una muestra significativa de 100 g para ambas muestras, y se molieron en molino Tomas Wiley Laboratory Hill Mod. 4, hasta que pasaban a través de una malla de 1.0 mm de diámetro.

## 4.2 Tratamiento térmico

Para esto se investigó en el lugar de procedencia (municipio de Cuetzalan, Puebla) la forma en que cocen los frijoles para su consumo, los habitantes de ésta comunidad.

Como era de esperar no se obtuvo una temperatura de cocción específica pero se recabo información que indica que en las comunidades de origen para el consumo de este frijol, se coloca sobre un anafre utilizando una olla de barro donde se pone el frijol con agua y algunos condimentos (como el epazote, o un tallo verde llamado xocoyolin) por un tiempo promedio de seis horas.

En el laboratorio se procuró seguir todas estas pautas a excepción de que en lugar del anafre se utilizó un tripie y mechero Fisher a flama baja, cociendo 150 g de cada frijol en una olla de barro por separado. Al cabo de las 6 horas, el frijol se dejó atemperar y se decantó el agua de cocción, pasando el frijol cocido a charolas de aluminio y se secó en la estufa de circulación forzada labLine modelo imperial III a una temperatura de  $55 \pm 3$  °C.; mientras que el agua de cocción remanente (caldo), se liofilizó en un equipo Labconco modelo FreeZone 4.5 a  $-45^{\circ}$  C y vacío de 0.05 mBar.

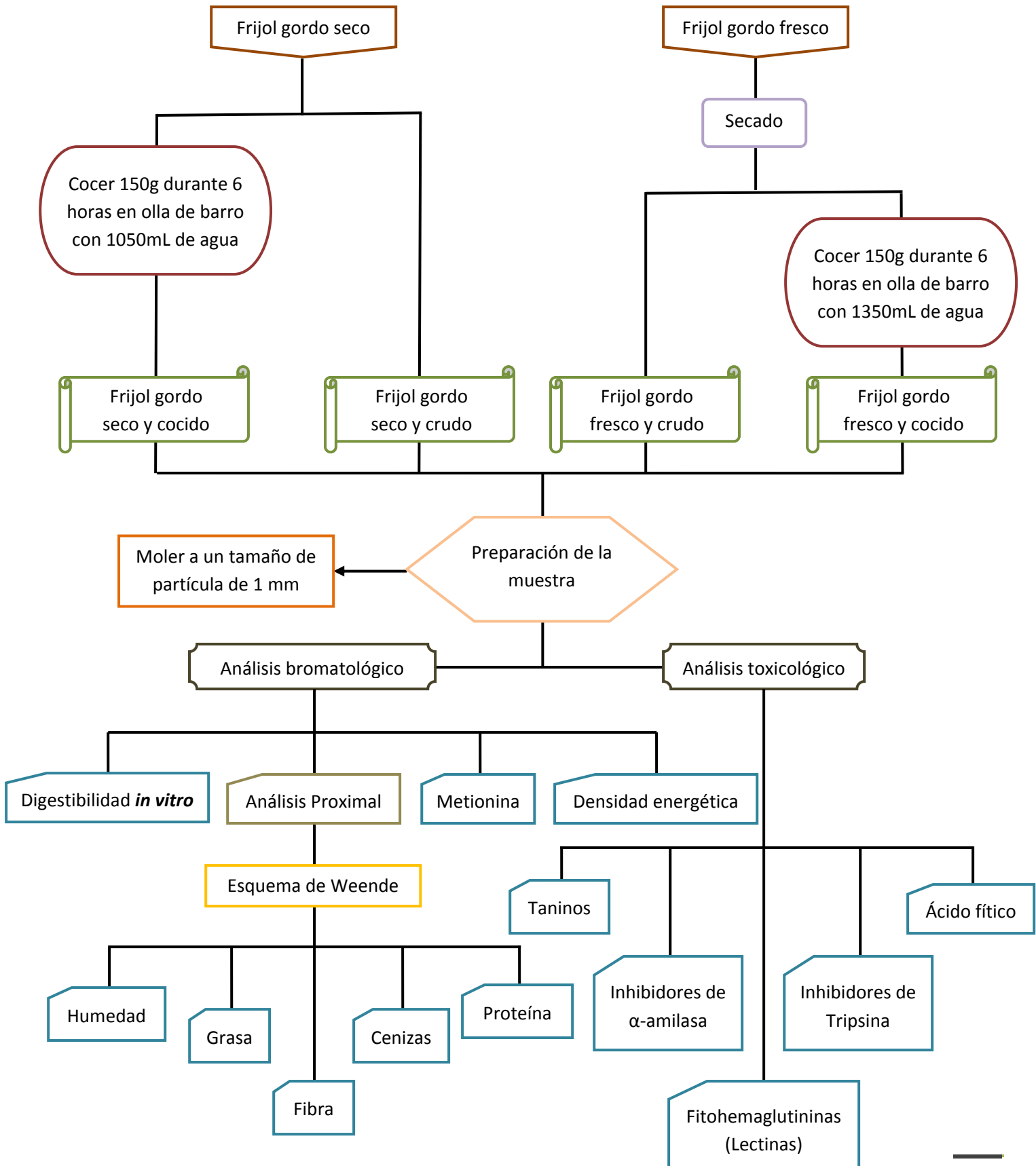
El frijol cocido una vez seco se fraccionó a un tamaño de partícula de 1.0 mm de diámetro en un molino de laboratorio Thomas Wiley modelo 4 y se junto con el liofilizado del caldo para su homogeneización. Lo anterior se realizó ya que es costumbre ingerir el frijol con su caldo y el anterior preparado es lo más similar posible a como se dispone para su consumo.

## 4.3 Métodos

A continuación se muestra un diagrama de flujo que ilustra de manera general el desarrollo experimental del presente trabajo.



DIAGRAMA GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN:



#### 4.4 Análisis bromatológico

El análisis bromatológico pretende determinar la cantidad de los principios inmediatos o macronutrientes.

##### 4.4.1 Análisis proximal (Helrich, K, 1990. Pearson, D, 1976; Winton, A.L. y Winton K.B. 1957)

Basado en el esquema de Weende:

Principio inmediato	Principio nutritivo	Observaciones
Agua	Humedad	65 °C estufa con vacío.
Minerales	Cenizas	550 °C (mufla)
Lípidos	Extracto etéreo	Soluble en éter de petróleo a 40-60°C
Prótidos	Proteína bruta Kjeldahl	Nitrógeno total.
Hidratos de carbono	Asimilables	Por diferencia
	Fibra cruda	Hidrólisis alcalina, hidrólisis ácida, calcinación.

##### 4.4.1.1 Humedad

✿ Fundamento: Método de determinación directa por gravimetría. Mide la diferencia de masa, al pesar la muestra después de retirada el agua mediante evaporación, por lo que se requiere material de peso conocido.

✿ Material y reactivos:

- ⊕ Balanza analítica Sartorius modelo A-210-P
- ⊕ Estufa de vacío labLine modelo 3620
- ⊕ Desecador
- ⊕ Pesafiltros o charolas de aluminio

✿ Procedimiento:

- ⊕ Poner a peso constante el pesafiltro en donde se va a efectuar la determinación.

- ⊕ Adicionar aproximadamente 4 gramos de muestra.
- ⊕ Introducir en la estufa a presión reducida, considerando que la línea de vacío debe dar por lo menos 25 mm de Hg. Y que la temperatura de secado sea de 60-65 °C.
- ⊕ Se considera peso constante cuando al pesar una muestra en la balanza analítica solo se presente variación en la cuarta cifra decimal.
- ⊕ Efectuar todas las pesadas inmediatamente después de sacarlas del desecador.

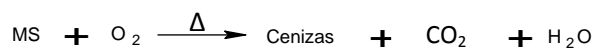
#### ☼ Cálculos

*Muestra seca = Muestra seca a peso constante – Charola a peso constante*

$$\%Humedad = 100 - \left( \frac{Muestra\ seca}{Muestra} 100 \right)$$

#### 4.4.1.2 Cenizas

☼ Fundamento: Eliminación por combustión a temperaturas superiores de 550 °C.



☼ Material y reactivos:

- ⊕ Balanza analítica Sartorius modelo A-210-P
- ⊕ Mufla Thermolyne modelo 1500
- ⊕ Campana de extracción
- ⊕ Mechero Fisher
- ⊕ Crisoles de porcelana
- ⊕ Desecador

☼ Procedimiento:

- ⊕ Poner a peso constante los crisoles, colocándolos en la mufla a 550 °C.

- ✦ Colocar de 2 a 3 gramos de muestra aproximadamente en cada crisol.
- ✦ Poner a carbonizar la muestra a la flama del mechero bajo una campana, ya que se desprenderá una gran cantidad de humo.
- ✦ Cuando ya no se desprenda humo, introducir el crisol a la mufla, la cual debe encontrarse entre 500-550 °C hasta obtener unas cenizas grisáceas o blancas homogéneas.
- ✦ Si después de la incineración se obtienen cenizas con manchas negras es conveniente adicionarle unas gotas de agua destilada una vez que estén frías, y meterlas de nuevo a la mufla.
- ✦ Pesar las cenizas a peso constante.

#### ✦ Cálculos

*Cenizas = Cenizas a peso constante con el crisol – Crisol a peso constante*

$$\%Cenizas = \frac{Cenizas}{Muestra} 100$$

#### 4.4.1.3 Grasa

##### ✦ Fundamento: Método de extracción.

Determinación del extracto etéreo, que incluye una gran variedad de compuestos orgánicos, únicamente unos pocos de ellos tienen interés nutricional; aquellos que se encuentran en gran cantidad incluyen la grasa verdadera, ácidos grasos y sus ésteres, vitaminas liposolubles y provitaminas tales como son los carotenoides.

Al escoger el disolvente de extracción (éter etílico, éter de petróleo o hexano), se deben tomar en cuenta sus ventajas y desventajas. El éter de petróleo es el solvente más eficaz y se utiliza en el establecimiento de las normas existentes. La

desventaja es que el material debe de estar libre de agua o alcohol, ya que el éter húmedo disuelve el azúcar y algunos otros hidratos de carbono; por lo general es indispensable que la muestra esté seca.

La primera razón por la cual es importante determinar el dato de grasa o extracto etéreo, es poder aislar la fracción alta en contenido energético.

✿ Material y reactivos:

- ✦ Balanza analítica Sartorius modelo A-210-P
- ✦ Aparato de extracción Goldfish labconco
- ✦ Bomba de recirculación Little-giant modelo 1-AA
- ✦ Estufa de vacío LabLine modelo 3620
- ✦ Cartuchos de celulosa de 22x80 mm.
- ✦ Vasos de borde esmerilado KIMAX
- ✦ Porta dedales de vidrio
- ✦ Anillos metálicos para extracción Goldfish
- ✦ Tubos recuperadores de disolvente
- ✦ Éter etílico (anhidro)

✿ Procedimiento:

- ✦ Trabajar con la muestra previamente seca (se recomienda la muestra utilizada en la determinación de humedad).
- ✦ Colocar la muestra dentro de un cartucho de celulosa
- ✦ Tapar con un pedazo de algodón y colocar en el portadedal, y este a su vez en el seguro metálico del aparato.

- ✦ Colocar 50 mL de éter de petróleo sobre el vaso de borde esmerilado, y éste con la ayuda del anillo metálico con rosca se asegura al aparato de extracción.
- ✦ Subir la parrilla del aparato, hasta que esté en contacto con el vaso.
- ✦ Abrir la llave del agua para que ésta circule sobre los refrigerantes.
- ✦ Al trabajar con éter, es conveniente colocar el control de calentamiento en LOW.
- ✦ Una vez transcurrido el tiempo de extracción (4 horas, o que al poner una gota en un pedazo de papel filtro esta al secarse deje el papel limpio), bajar las parrillas de calentamiento, y colocar los platillos de seguridad.
- ✦ Quitar el anillo de rosca y sacar el portadetal con el cartucho, sustituyéndose por el tubo recuperador, volviéndose nuevamente a colocar el vaso para proceder a calentar nuevamente.
- ✦ En cuanto el vaso esté libre de disolvente, colocarlo en la estufa de vacío para la completa eliminación de humedad, hasta peso constante.

#### ✦ Cálculos

*Grasa = Grasa a peso constante con el vaso – Vaso a peso constante*

$$\%Grasa = \frac{Grasa}{Muestra} 100$$

#### 4.4.1.4 Fibra cruda

- ✦ Fundamento: La determinación de fibra o fibra cruda, se refiere a las partes de la pared celular de los tejidos vegetales, las cuales no pueden ser digeridas por las enzimas del intestino. Durante el paso a través del tracto digestivo, la fibra se

hincha y forma una masa gelatinosa, con una muy alta capacidad de retención de agua; con lo cual se facilita el transporte del bolo alimenticio en el tracto digestivo. Dentro del interés analítico de un alimento, se pueden dividir los hidratos de carbono de origen vegetal en dos partes: por un lado los hidratos de carbono no-estructurales como son los almidones, azúcares y fructosanas; y por otro lado los hidratos de carbono estructurales, tales como la celulosa y hemicelulosa, que viene a corresponder lo que se denomina como fibra cruda.

Para la determinación de fibra es necesario trabajar con una muestra desengrasada y someterla a una hidrólisis ácida seguida de una hidrólisis alcalina con una posterior incineración del material insoluble para que por diferencia sacar el contenido de hidratos de carbono no-degradables.

Por definición de acuerdo al método Weende, la fibra cruda es la perdida por ignición, del residuo seco remanente después de la digestión de la muestra con ácido sulfúrico al 1.25% y NaOH al 1.25% bajo las condiciones bien especificadas, de una muestra previamente desengrasada.

🌟 Material y reactivos:

- ⊕ Balanza analítica Sartorius modelo A-210-P
- ⊕ Aparato de digestión Fibertec marca Tecator modelo 1010
- ⊕ Estufa de vacío LabLine modelo 3620
- ⊕ Mufla Heraew
- ⊕ Vasos de Berzelius de 600 mL
- ⊕ Mechero de Bunsen
- ⊕ Crisoles de porcelana
- ⊕ Matraces de vidrio Kitasato

- ⊕ Embudo buchner tipo california (malla de 200 mesh)
- ⊕ Filtro de lino o papel
- ⊕ Solución de  $H_2SO_4$  al 1.25% (m/v)
- ⊕ Solución de NaOH al 1.25% (m/v)
- ⊕ Antiespumante
- ⊕ Alcohol etílico
- ⊕ Silicato de aluminio

#### 🔬 Procedimiento

- ⊕ Pesar de 3 a 5 g de muestra desengrasada sobre un vaso Berzalius que contenga 0.5 g de silicato de aluminio (limpio y calcinado) y unas perlas de vidrio.
- ⊕ Adicionar 200 mL de ácido sulfúrico al 1.25% hirviendo, y unas gotas de antiespumante.
- ⊕ Colocar inmediatamente en el aparato de digestión, el cual debe estar previamente caliente y dejar digerir por espacio de 30 minutos exactos.
- ⊕ Lavar con agua caliente hasta eliminar el ácido, filtrando al vacío.
- ⊕ Una vez lavado el residuo transferir nuevamente al vaso Berzelius y adicionar 200 mL de NaOH al 1.25% y unas gotas de antiespumante.
- ⊕ De nuevo, colocar inmediatamente en el aparato de digestión, el cual debe estar previamente caliente y dejar digerir por espacio de 30 minutos exactos.
- ⊕ Trascorrido ese tiempo, vaciar nuevamente al filtro de lino y filtrarlo.



- ✦ Lavar el residuo con agua caliente hasta eliminar el álcali y también quitar las perlas de vidrio lavándolas con agua para recuperar el material adherido.
- ✦ Por último adicionar al residuo 25 mL de alcohol etílico.
- ✦ Pasar el residuo a un crisol de porcelana (a peso constante) con cuidado.
- ✦ Colocar en la estufa de vacío para su secado, y después pesarlo.
- ✦ Carbonizar e introducir el residuo en la mufla para su incineración
- ✦ Pesarse el crisol con las cenizas residuales y por diferencia obtener el contenido de fibra.

#### ✦ Cálculos

*Residuo seco = Residuo seco en estufa a peso constante mas crisol – crisol a peso constante*

*Residuo calcinado = Residuo calcinado a peso constante mas crisol – crisol a peso constante*

*Fibra total = Residuo seco – Residuo calcinado*

$$\%Fibra\ total = \frac{Fibra\ total}{Muestra} 100$$

#### 4.4.1.5 Proteína cruda

- ✦ Fundamento: Considerando que el nitrógeno solo proviene de las proteínas, se puede tener un estimado de su concentración, ya que se encuentra en una concentración constante para cada una de ellas. La mayoría de las proteínas tiene una concentración del 16% de nitrógeno

$$\frac{100g\ de\ proteína}{16g\ de\ nitrógeno} = factor = 6.25$$

$$\% de\ proteína\ cruda = \%N_2 * factor$$

El método empleado usualmente para la determinación de nitrógeno en alimentos, es el método Kjeldahl. El procedimiento consiste en una oxidación de la

materia orgánica por acción del ácido sulfúrico para formar dióxido de carbono, agua y liberar el nitrógeno como amoníaco; el amoníaco existe en la solución ácida como sulfato ácido de amonio, debido a que en la mezcla de reacción siempre hay un exceso ácido.

La digestión de la muestra para formar el sulfato de amonio, es la parte más difícil de la operación. Muchos agentes catalizadores han sido usados para aumentar la velocidad de digestión de la muestra; como son el cobre, mercurio y el selenio entre otros. Se han usado con mucha efectividad la combinación de catalizadores como es el uso de cobre-mercurio y mercurio-selenio.

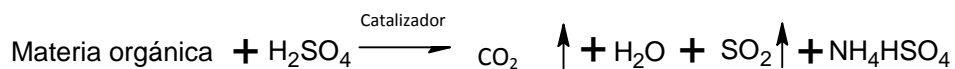
Numerosos agentes oxidantes han sido adicionados al final del período de digestión para obtener una completa oxidación; en varios tipos de muestras la pérdida de nitrógeno a través de la formación de aminas o de nitrógeno libre se ha presentado por el uso de estos agentes a excepción del uso del peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno debe ser usado cuidadosamente ya que es común preservarlo con acetanilida para reducir la formación de oxígeno y agua.

Sales como sulfato de potasio o de sodio son comúnmente adicionadas para aumentar el punto de ebullición de la mezcla de digestión, sin embargo la relación sal/ácido no debe ser muy alta, ya que se podría presentar la pérdida de amoníaco de la sal de amonio.

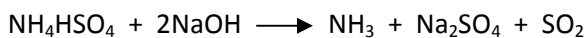
El amoníaco obtenido después de la digestión, es liberado por una gran variedad de métodos; siendo el más usado por acción de un álcali y atrapando el amoníaco liberado en una cantidad conocida de ácido valorado.

Las reacciones antes descritas se muestran a continuación:

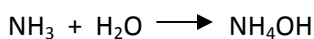
Digestión:



Liberación del NH<sub>3</sub>:



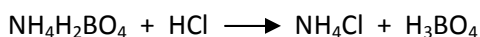
Arrastre con vapor:



Recolección:



Titulación:



☀ Material y reactivos:

- ⊕ Balanza analítica Sartorius modelo A-210-P
- ⊕ Digestor tecator instrument modelo ab-20/40
- ⊕ Dispositivo de microdestilación tecator Kjeltec Auto
- ⊕ Tubos de digestión
- ⊕ Mezcla digestiva (a)
- ⊕ Peróxido de hidrógeno al 30%
- ⊕ Sulfato de potasio (R.A.)
- ⊕ Solución de NaOH al 40%
- ⊕ Solución de ácido bórico con indicadores (b)
- ⊕ Solución de HCl 0.01N valorada

(a) Disolver 3 g de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O) en 20 mL de agua destilada; a continuación agregar 50 mL de ácido ortofosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) y una vez que esté

bien disuelta la sal, adicionar con mucho cuidado y resbalando por la pared del recipiente 430 mL de ácido sulfúrico concentrado.

- (b) Pesar 20 g de ácido bórico para preparar 2 litros del reactivo, aforar con agua destilada, incluyendo 20 mL de verde de bromocresol (100 mg en 100 mL de metanol), y 14 mL de rojo de metilo (100 mg en 100 mL de metanol). Si 25 mL de la solución más 100 mL de agua da un tono rojo-grisáceo, está bien. Si persiste el color rojo, ajustar con NaOH 0.1N hasta que el color rojo-grisáceo aparezca; calcular la cantidad de álcali necesario para ajustar el ácido bórico. Si se pesan bien los reactivos no es necesario ajustar.

🔬 Procedimiento:

- ⊕ Pesar alrededor de 70 mg de muestra y colocarlos en el tubo de digestión.
- ⊕ Usar como blanco dextrosa, y pesar sobre 80 mg de éste.
- ⊕ Usar como control caseína, y pesar sobre 20 mg de ésta.
- ⊕ Agregar aproximadamente 0.5 g de  $K_2SO_4$  y 3 mL de mezcla de digestión.
- ⊕ Poner el tubo en el digestor por espacio de 15 minutos.
- ⊕ Sacar del digestor hasta enfriar un poco, para adicionar 1.5 mL de  $H_2O_2$  y colocar nuevamente en el digestor que se encuentre a 370 °C.
- ⊕ Cuando el tubo no muestre manchas, puntos negros, y además la mezcla se encuentre transparente; considerar que la digestión esta realizada.
- ⊕ Una vez efectuada la digestión, enfriar y realizar la digestión en el microdestilador, dejar destilar la muestra en donde el mismo aparato atrapa el nitrógeno en forma de amonio en el ácido bórico.
- ⊕ Finalmente el aparato titula la muestra con ácido clorhídrico 0.01N, por lo que hay que anotar los mililitros de ácido utilizados en la valoración.

✿ Cálculos

Control de caseína:

$$\%Nitrógeno = \frac{(mL \text{ caseína} - mL \text{ blanco}) * Normalidad \text{ del HCl} * \text{ miliequivalentes de } N_2}{\text{gramos de caseína}} 100$$

$$\%Proteína = \%Nitrógeno * \text{Factor de conversión para caseína}$$

Del resultado de caseína, vemos si el equipo está funcionando correctamente y si podemos confiar en el resultado para nuestra muestra.

Muestra:

$$\%Nitrógeno = \frac{(mL \text{ muestra} - mL \text{ blanco}) * Normalidad \text{ del HCl} * \text{ miliequivalentes de } N_2}{\text{gramos de muestra}} 100$$

$$\%Proteína = \%Nitrógeno * \text{Factor de conversión para la muestra (Frijol} = 5.71)$$

#### 4.4.2 Metionina (Horn M. J. et al. 1946)

✿ Fundamento: Método colorimétrico de McCarthy y Sullivan que se basa en la determinación de la metionina liberada de la proteína por medio de la hidrólisis ácida con HCl. Propone que las proteínas que contienen metionina reaccionan con el nitroprusiato de sodio, cuya fórmula es:  $Na_2Fe(CN)_5NO \cdot 2H_2O$ , en solución básica, tomando una coloración rojiza; además de que el nitroprusiato inhibe el color azul característico de los hidratos de carbono. También se utiliza glicina para reducir la intensidad del color de los demás aminoácidos presentes.

✿ Material y reactivos:

- ✦ Balanza analítica Sartorius modelo A-210-P
- ✦ Digestor tecator instrument modelo ab-20/40
- ✦ Congelador Revco ULT390-3-A32
- ✦ Rotavapor Buchi 461 modelo R
- ✦ Bomba de vacío para rotavapor

- ✦ Potenciómetro Corning pH-meter modelo 10, con electrodo de Calomel
- ✦ Baño de agua polystat
- ✦ Vortex labLine modelo super-mixer 1290
- ✦ Espectrofotómetro Thermo-Scientific Genesys 10-S
- ✦ Campana de extracción
- ✦ Matraz de bola de 50 mL para rotavapor
- ✦ Tubos con tapón de rosca y cubierta de teflón
- ✦ Tubos de ensaye de 16 x 150
- ✦ Tanque de nitrógeno para insuflar
- ✦ Solución A (a)
- ✦ NaOH 5N
- ✦ HCl 6N
- ✦ Solución lavadora 3:1 (Agua/Etanol)
- ✦ Nitroprusiato de Sodio 10%
- ✦ Glicina 3%
- ✦ Acido ortofosfórico concentrado
- ✦ Metionina 1 mg/mL (b)

(a) Pesar lo siguiente y posteriormente aforar a 100 mL con agua destilada

Aminoácido	Pesar (mg)
Alanina	20
Asparagina	48
Ácido Aspártico	60
Cistina	10
Glicina	5
Ácido Glutámico	210
Histidina	30
Hidroxipolina	100
Isoleucina	50
Leucina	100
Lisina	60
Fenilalanina	40
Serina	60
Treonina	45
Triptófano	12
Valina	60

(b) Pesar 100 mg de l-metionina y aforar a 100 mL con agua destilada.

#### ✦ Procedimiento

##### Digestión:

- ✦ Pesar los gramos de muestra de acuerdo con el contenido de proteína de la muestra siguiendo la siguiente fórmula

$$gM = \frac{0.1 (100)}{\% \text{ Proteína}}$$

- ✦ Poner la muestra en un tubo con tapón de rosca.
- ✦ Adicionar ácido clorhídrico 6N de acuerdo con el contenido de proteína de la muestra siguiendo la siguiente fórmula

$$mL \text{ HCl } 6N = \frac{4 (100)}{\% \text{ Proteína}}$$

- ✦ Insuflar N<sub>2</sub> para eliminar el oxígeno y evitar al máximo la oxidación de la metionina.
- ✦ Tapar el tubo utilizando el tapón de rosca procurando que esté completamente hermético.

- Trata de eliminar bien el oxígeno
- ✦ Calentar a  $145\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  durante 4 horas en el digestor.
  - La solución puede ebullición los primeros 15 minutos, pero después debe quedarse quieta, de lo contrario el tubo no está hermético y tiene una fuga.
- ✦ Atemperar el hidrolizado en la campana media hora
  - Poner en el congelador si se determinará el contenido de metionina al día siguiente

Extracción:

- ✦ Agregar la solución a un matraz bola de 50 mL para rotavapor
- ✦ Adicionar solución lavadora para arrastrar todo lo posible del tubo.
- ✦ Poner en el rotavapor a  $80\text{-}85\text{ }^{\circ}\text{C}$  a sequedad, máximo 30 minutos
- ✦ Adicionar 20 mL de agua destilada caliente y filtrar con 2 papeles No. 50 a vacío.
- ✦ Ajustar la solución en un pH entre 6.5 a 7 con NaOH.
- ✦ Aforar a 25 mL

Determinación (por duplicado):

- ✦ En un tubo de ensayo poner 4 mL del extracto de muestra, 1 mL de agua destilada, 1 mL de NaOH 5N, y 0.1 mL de nitroprusiato de sodio al 10%
- ✦ Poner en un baño maría de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos
- ✦ Adicionar 2 mL de glicina al 3%
- ✦ Volver a sumergir en un baño maría de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos.
- ✦ Agregar 2 mL de ácido ortofosfórico concentrado
- ✦ Leer Absorbancia en una longitud de onda de 510 nm.



- ✦ Utilizar como blanco un tubo con 4 mL del extracto de muestra, 1 mL de agua destilada y 1 mL de NaOH 5N.

✦ Curva patrón:

- ✦ Hacer lecturas en rangos de concentración de 0.1-2 mg de metionina.
- ✦ De la solución estándar de metionina tomar 0.0 (blanco), 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1, 1.5 y 2 mililitros; y colocarlos en 8 tubos de ensayo respectivamente.
- ✦ Adicionar a cada matraz 3.0, 2.9, 2.7, 2.5, 2.2, 2, 1.5, y 1 mililitros de agua destilada respectivamente, completando así 3 mL de solución en cada tubo.
- ✦ Agregar 2 mL de solución A, 1 mL de NaOH 5N, y 0.1 mL de nitroprusiato de sodio al 10% a cada tubo.
- ✦ Poner en un baño maría de 30 °C durante 10 minutos
- ✦ Adicionar 2 mL de glicina al 3%
- ✦ Volver a sumergir en un baño maría de 30 °C durante 10 minutos.
- ✦ Agregar 2 mL de ácido ortofosfórico concentrado
- ✦ Leer Absorbancia en una longitud de onda de 510 nm.
- ✦ Utilizar como blanco un tubo con 4 mL del extracto de muestra, 1 mL de agua destilada y 1 mL de NaOH 5N.

✦ Cálculos

Hacer la curva patrón de metionina: mg de metionina vs absorbancia

$$mg \text{ de metionina en muestra} = \frac{\text{Absorbancia} - b}{\text{pendiente}}$$

$$\frac{g \text{ metionina}}{100g \text{ proteína}} = \left( \frac{mg \text{ de metionina en muestra}}{4mL} \right) \left( \frac{25mL}{g \text{ Muestra}} \right) \left( \frac{100g \text{ Muestra}}{\% \text{ de proteína}} \right) \left( \frac{1 g \text{ metionina}}{1000mg \text{ de metionina}} \right) 100g \text{ proteína}$$

#### 4.4.3 Digestibilidad proteínica “*in vitro*” (Horwitz, W. and Latimer, E. 2006)

✿ Fundamento: método que mide la digestibilidad de proteínas mediante el uso de enzimas proteolíticas; al utilizar como proteína patrón a la caseína.

✿ Material y reactivos:

- ✦ Balanza analítica Sartorius modelo A-210-P
- ✦ Baño de agua Grant modelo 5E-10 a 37 °C
- ✦ Baño de agua Polystat a 55 °C
- ✦ Potenciómetro Corning pHmeter modelo 10, con electrodo de Calomel
- ✦ 2 agitadores Corning PC-310
- ✦ 2 vasos especiales para al cambio de baños
- ✦ Solución enzimática A (a)
- ✦ Solución enzimática B (b)

(a) Aforar a 10 mL con agua destilada

- Tripsina pancreática porcina (Tipo IX) **227040** unidades BAEE de tripsina.
- Peptidasa intestinal porcina (Grado I) **0.520** unidades de peptidasa.
- $\alpha$ -quimotripsina pancreática bovina (Tipo II) **1860** unidades BAEE de  $\alpha$ -quimotripsina.

(b) Aforar a 10 mL con agua destilada

- Proteasa bacteriana (**65** unidades de caseína de proteasa)

✿ Procedimiento:

- ✦ Pesar la muestra que contenga 10 mg de N<sub>2</sub>. Utilizar como control cuantitativo caseína liofilizada
- ✦ Adicionar 10 mL de agua destilada.

- ⊕ Equilibrar el pH a  $8 \pm 0.03$  utilizando HCl y NaOH diluido.
- ⊕ Dejar una hora remojando y en agitación en un baño de  $37\text{ }^\circ\text{C}$
- ⊕ Equilibrar las soluciones enzimáticas a pH de  $8 \pm 0.03$  y  $37\text{ }^\circ\text{C}$
- ⊕ Añadir 1 mL de solución A mientras se agita
- ⊕ Exactamente 10 minutos después de añadida la solución A, adicionar 1 mL de la solución B y al mismo tiempo transferir el vial a un baño de  $55\text{ }^\circ\text{C}$ .
- ⊕ Exactamente 19 minutos después de añadida la solución A, transferir el vial al baño de  $37\text{ }^\circ\text{C}$ .
- ⊕ A los 20 minutos después de añadida la solución A medir el pH con el electrodo y leer.
- ⊕ El pH del control de caseína debe ser de  $6.42 \pm 0.05$
- ⊕ Calcular el % de proteína digerida o % de digestibilidad

$$\% \text{Digestibilidad} = 234.84 - 22.56(\text{lectura de pH})$$

#### ✿ Cálculos

Probar el método con caseína liofilizada, en el que se debe de tener un rango teórico de pH de  $6.42 \pm 0.05$

$$\% \text{Digestibilidad} = 234.84 - 22.56(\text{lectura de pH})$$

#### 4.4.4 Densidad energética (Bowman B.A. y Russell R. M. 2003; Miller D.S. y Payne P.R. 1959)

- ✿ Fundamento: El método consiste en la combustión por ignición eléctrica de una muestra de peso conocido en una atmósfera de oxígeno y la energía producida en forma de calor que se transmite a la bomba, la cual se conecta a su vez a un detector del cambio de temperatura. El aumento de temperatura producido después de la combustión de la muestra se compara con el cambio que se

produce con una cantidad conocida de ácido benzoico que es el estándar de referencia con contenido calórico certificado.

☀ Material y reactivos:

- ⊕ Balanza analítica Sartorius modelo A-210-P
- ⊕ Estufa de secado a presión reducida Blue M modelo SW-17TA
- ⊕ Bomba calorimetría balística GALLENKAMP
- ⊕ Crisoles de acero inoxidable de 25.4 mm de diámetro
- ⊕ Desecador de vidrio
- ⊕ Mecha de algodón de 75 mm de longitud
- ⊕ Mango metálico compactador
- ⊕ Ácido benzoico (contenido calórico certificado)

☀ Procedimiento:

- ⊕ Se recomienda tener una muestra bien homogénea, finamente molida, y con una humedad menor a 10%
- ⊕ Poner los crisoles en la estufa a peso constante
- ⊕ Colocar la mecha dentro del crisol
- ⊕ Pesar alrededor de 0.7 g de muestra
- ⊕ Compactar la muestra con el mango metálico compactador
- ⊕ Llevar a cabo la combustión en la bomba calorimétrica balística y medir el contenido calórico.

☀ Curva de calibración:

- ⊕ Realizar la combustión a diferentes pesos de ácido benzoico
- ⊕ Anotar la respectiva lectura obtenida de la escala del galvanómetro
- ⊕ Se recomienda pesar entre 0.1 y 0.8 gramos de ácido benzoico

- ⊕ Es necesario llevar a cabo la combustión exclusiva de la mecha de algodón, ya que el valor obtenido se deberá restar.
- ⊕ Una vez obtenidas las lecturas, se debe convertir los gramos de ácido benzoico a contenido calórico expresado en KJ.

$$1g \text{ de ácido benzoico} = 26454.3 \text{ Joules} = 26.45 \text{ kJ}$$

#### ✿ Cálculos

Lectura del galvanómetro de la mecha: "0.2". A las siguientes lecturas del galvanómetro restar éste valor.

Hacer la curva de calibración: kJ del ácido benzoico vs Lectura del galvanómetro

$$1g \text{ de ácido benzoico} = 26.45 \text{ kJ}$$

$$kJ = \text{gramos de ácido benzoico} * 26.45$$

$$kJ \text{ en muestra} = \frac{\text{Lectura del galvanómetro} - b}{\text{pendiente}}$$

$$\frac{kJ}{g \text{ muestra}} = \frac{kJ \text{ en muestra}}{g \text{ muestra}}$$

## 4.5 Análisis toxicológico

El análisis toxicológico pretende identificar, cuantificar y controlar los agentes tóxicos y antinutricionales, teniendo en cuenta las propiedades químicas, físicas y biológicas de la sustancia estudiada.

### 4.5.1 Ácido fítico (Fruhbeck G. et al 1995)

- ✿ Fundamento: Método de Fruhbeck (1995). Este método emplea una columna de intercambio iónico con el fin de purificar los extractos del ácido fítico, eliminando las fracciones menores de fosfatos de inositol que comúnmente se incluyen en

otros métodos, permitiendo una cuantificación real del ácido fítico. La determinación colorimétrica se basa en la medida de la disminución de la absorbancia del complejo  $\text{FeCl}_3$  – ac. Sulfosalicílico (Reactivo de Wade) debido al enlace del  $\text{Fe(III)}$  con el ácido fítico.

🔧 Material y reactivos:

- ✦ Balanza analítica Sartorius modelo A-210-P
- ✦ Potenciómetro Corning pHmeter modelo 10, con electrodo de Calomel
- ✦ Agitador magnético multiple Corning Stirrer modelo 440825
- ✦ Centrifuga sorvall modelo RC-5B (17,300 g)
- ✦ Vortex labLine modelo super-mixer 1290
- ✦ Espectrofotómetro Thermo-Scientific Genesys 10-S
- ✦ Vasos de precipitado
- ✦ Tubos de ensaye
- ✦ Columnas de intercambio iónico (a)
- ✦ Solución de HCl 0.65N
- ✦ Solución de NaOH 1N
- ✦ Solución de NaCl 0.1N
- ✦ Solución de NaCl 0.7N
- ✦ Estándares (b)
- ✦ Reactivo de Wave (c)

(a) Preparación de columnas de intercambio iónico:

- 🔧 Pesar aproximadamente 0.5 g de resina de intercambio aniónico e hidratarla con 0.6 mL de agua desionizada.

- ✚ Al mismo tiempo preparar las “columnas” utilizando jeringas de 3 mL e introduciéndole en el fondo de la misma un tapón de fibra de vidrio (cuidando de no poner en exceso) y colocarla sobre un soporte.
- ✚ Agregar a la columna la resina hidratada cuidando que quede asentada uniformemente.
- ✚ Una vez que la resina esté bien empacada en la columna, adicionarle 15 mL de NaCl 0.7 N
- ✚ Posteriormente lavar con 30 mL de agua desionizada, cuidando de dejar liquido en la superficie (aproximadamente 0.5 cm de altura arriba de la resina empacada) para que no se seque la resina y quede lista para usarse.

(b) Preparación de los estándares:

- ✚ Preparar una solución concentrada de ácido fítico que contenga 1 mg del ácido por mililitro.
- ✚ Pesar exactamente 0.080 g de la sal de fitato de sodio (de arroz), considerando la pureza y humedad del reactivo.
- ✚ Aforar con agua desionizada hasta un volumen de 50 mL
- ✚ A partir de la solución concentrada preparar las soluciones de los estándares de 5, 10, 20, 30, 40, y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$

Tabla. Muestra de los distintos estándares.

Mililitros de solución concentrada (1000µg ácido fítico / mL)	Agua desionizada c.s.p (mililitros)	Concentración final (µg ácido fítico/ mL)
0.125	25	5
0.250	25	10
0.500	25	20
0.750	25	30
1.000	25	40
1.250	25	50

## (c) Preparación del reactivo de Wade:

- ✚ Pesar 0.03 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y 0.3 g de ácido sulfosalicílico, y disolverlos en agua desionizada hasta un volumen de 100 mL.
- ✚ El reactivo debe ser preparado en el momento de hacer la determinación espectrofotométrica.
- ✚ Una vez adicionado a las muestras debe leerse en menos de 30 minutos.

## ✚ Procedimiento:

## ✚ Extracción del ácido fítico:

- ✚ Pesar 1 g de alimento (el cual debe contener menos de 5% de grasa)
- ✚ Colocar la muestra dentro de un vaso de precipitado de 50 mL y adicionarle 20 mL de HCl 2.4% (0.65N), el pH de la suspensión debe estar entre 0 y 1; esto es necesario para disociar al fitato de complejos minerales y proteínas.
- ✚ Someter a agitación vigorosa durante 2 horas a temperatura ambiente.



- ✚ Transferir cuantitativamente el extracto obtenido a unos tubos de centrífuga para centrifugarlos a 17,300 g (12000 rpm) a temperatura ambiente.
- ✚ Una vez transcurrido este tiempo colectar el sobrenadante.
- ✚ Purificación por columna de intercambio iónico:
  - ✚ Tomar una alícuota de los sobrenadantes colectados y diluir con agua desionizada para disminuir la concentración total del anión. Se recomienda la dilución de 1:25 para alimentos que contengan 1% o más de ácido fítico, y la dilución de 5:25 en caso de contener menos.
    - Para obtener mejores recuperaciones ajustar el pH de la alícuota diluida a 6 (superior al punto isoeléctrico de las proteínas) con NaOH 1N.
  - ✚ Posteriormente tomar 10 mL de la alícuota diluida y transferir cuantitativamente a la columna (previamente preparada).
  - ✚ Lavar la columna con 15 mL de NaCl 0.1N (para eliminar el fosfato inorgánico y fracciones menores de inositol).
  - ✚ Desechar el agua de lavado.
  - ✚ Eluir al fitato con 15 mL de NaCl 0.7N y colectar el extracto purificado.
- ✚ Determinación espectrofotométrica:
  - ✚ Tomar 3 mL de agua desionizada (utilizada como blanco), y 3 mL de los estándares (soluciones de fitato de sodio conteniendo de 5 a 50 µg/mL en agua desionizada), además, 3 mL de los extractos

purificados a través de la columna, los cuales fueron previamente ajustados a pH 3

- ✚ Adicionarles 1 mL de Reactivo de Wade (0.03% de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  + 0.3% ácido sulfosalicílico en agua desionizada)
- ✚ Someter a agitación en un vortex por 5 segundos.
- ✚ Leer la absorbancia a 500 nm.
- ✚ Utilizar una celda con agua desionizada para calibrar el espectrofotómetro en cero, se lee la absorbancia del blanco, las muestras problema y los estándares, a cada una de estas se le resta por separado al blanco para así obtener la absorbancia corregida respectiva.
- ✚ Realizar la curva patrón con regresión lineal.
- ✚ Interpolar los datos y obtener la concentración de ácido fítico presente en las muestras.

#### ✚ Cálculos

Obtener el promedio de la absorbancia del blanco

Hacer la curva de calibración:  $\mu\text{g}$  de ácido fítico sobre mililitro vs Absorbancia corregida

*Absorbancia corregida = Absorbancia blanco – Absorbancia blanco*

$$\frac{g \text{ Muestra}}{mL \text{ NaCl}} = \left( \frac{g \text{ Muestra}}{20mL \text{ HCl}} \right) \left( \frac{2mL \text{ HCl}}{25mL \text{ H}_2\text{O}} \right) \left( \frac{10mL \text{ H}_2\text{O}}{15mL \text{ NaCl}} \right)$$

$$\frac{\mu\text{g} \text{ á c fítico}}{mL \text{ NaCl}} = \frac{\text{Absorbancia corregida} - b}{\text{pendiente}}$$

$$\% \text{ á c fítico} = \left( \frac{\mu\text{g} \text{ á c fítico}}{mL \text{ NaCl}} \right) \left( \frac{1g}{1000000\mu\text{g}} \right) \left( \frac{mL \text{ NaCl}}{g \text{ Muestra}} \right) 100$$

#### 4.5.2 Taninos (ISO 9648-1988, 1988)

✿ Fundamento: Metodología que corresponde al método de determinación de contenido de taninos en sorgo ISO 9648-1988. Dicha técnica se basa en la reducción del ión férrico debido a los polifenoles con la posterior formación de un complejo colorido en condiciones alcalinas, el cual es cuantificado espectrofotométricamente a una  $\lambda=525$  nm.

Químicamente los taninos son compuestos orgánicos, no nitrogenados heterogéneos, que van desde monómeros hasta polímeros, que contienen una gran cantidad de grupos hidroxilos (polifenoles), los cuales son los responsables de su interacción con proteínas y otras moléculas.

✿ Material y reactivos:

- ✦ Balanza analítica Sartorius modelo A-210-P
- ✦ Agitador magnético múltiple Corning Stirrer modelo 440825
- ✦ Centrifuga eppendorf 5702
- ✦ Baño de agua polystat
- ✦ Vortex labLine modelo super-mixer 1290
- ✦ Espectrofotómetro Thermo-Scientific Genesys 10-S
- ✦ Vasos de precipitados
- ✦ Tubos de ensaye
- ✦ Dimetil-formamida (DMF) 75%
- ✦ Ácido tánico 0.2/100 mL
- ✦ Citrato férrico amoniacal 3.5g/L
- ✦ Hidróxido de amonio 0.8g  $\text{NH}_3$ /100 mL (a)

- (a) De una botella de hidróxido de amonio de peso molecular 35.05g/mol y con un 29%NH<sub>3</sub>.

$$g \text{ NH}_3\text{OH} = \frac{0.8g \text{ NH}_3 * 100g\text{NH}_3\text{OH}}{29g \text{ NH}_3}$$

$$g \text{ NH}_3\text{OH} = 2.7586$$

$$2.7586g \text{ NH}_3\text{OH} \left( \frac{mL}{0.8928g} \right) = \frac{3.0899mL}{100mL \text{ H}_2\text{O}}$$

☀ Procedimiento:

- ⊕ Pesar 0.5-1 g de muestra y ponerlos en un vaso de precipitados.
- ⊕ Agregar 18 mL de dimetilformamida al 75% y agitar durante una hora a 500rpm.
- ⊕ Centrifugar 10 minutos a 3000 rpm
- ⊕ Aforar el sobrenadante a 25 mL con dimetilformamida al 75%.
- ⊕ Tomar 1 mL del extracto anterior y depositar en un tubo de ensayo
- ⊕ Adicionar 5 mL de agua destilada.
- ⊕ Adicionar 1 mL de citrato férrico amoniacal
- ⊕ Adicionar 1 mL de solución de amoniaco
- ⊕ Agitar y dejar reposar los tubos durante 10 minutos en un baño a 30 °C.
- ⊕ Leer la absorbancia a 525 nm, elaborando un blanco de la misma manera, pero sustituyendo el mililitro de la solución de citrato férrico amoniacal por agua destilada.

✚ Elaborar una curva patrón

- ✚ Preparar 8 soluciones agregando 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, y 7 mL de la solución de ácido tánico y aforando a 25 mL dimetilformamida al 75%.
- ✚ Tomar 1 mL del extracto anterior y depositar en un tubo de ensayo
- ✚ Adicionar 5 mL de agua destilada.
- ✚ Adicionar 1 mL de citrato férrico amoniacal
- ✚ Adicionar 1 mL de solución de amoniaco
- ✚ Agitar y dejar reposar los tubos durante 10 minutos en un baño a 30 °C.
- ✚ Leer la absorbancia a 525 nm, y utilizar como blanco al tubo que con 0 mL de ácido tánico.

✚ Cálculos

Hacer la curva de calibración: mg ácido tánico sobre mililitro vs absorbancia

$$\frac{mg \text{ ácido tánico}}{mL} = \frac{\frac{2mg \text{ ácido tánico}}{mL} * 1mL}{25mL}$$

$$\frac{mg \text{ ácido tánico}}{mL} = \frac{Absorbancia - b}{pendiente}$$

$$\%Taninos = \left(\frac{mg \text{ ácido tánico}}{1mL}\right) \left(\frac{25mL}{g \text{ Muestra}}\right) \left(\frac{1g}{1000mg}\right) 100$$

#### 4.5.3 Fitohemagglutininas (método cuantitativo) (García D. 1998; Lucas B. y Sotelo A. 1993)

✿ Fundamento: La técnica se basa en la capacidad de aglutinar los eritrocitos por efecto de la cantidad de hemagglutininas presentes. Consiste en hacer diluciones seriadas de las cuales se determina el punto final de la aglutinación de los glóbulos rojos de hamster lavados y sensibilizados con solución de proteasa para mejorar la sensibilidad; además se realiza mediante el método de microtitulación que es rápido y requiere una mínima cantidad de muestra.

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

✿ Material y reactivos

- ✦ Balanza analítica Sartorius modelo A-210-P
- ✦ Agitador magnético múltiple Corning Stirrer modelo 440825
- ✦ Centrífuga eppendorf 5702
- ✦ Incubadora Blue M
- ✦ Espectrofotómetro Sequoia-turner modelo 340
- ✦ Adaptador para celdas de 12 x 80 mm (acondicionado a una abertura de 1 cm<sup>2</sup>)
- ✦ Vasos de precipitados
- ✦ Tubos de centrífuga de 15 mL con graduación.
- ✦ Microtiter Kit. Microdilutor 50µL
- ✦ Embudos pequeños

- ✦ Pipeta automática multicanales
- ✦ Dispositivo de lectura de placas
- ✦ Fibra limpia de vidrio
- ✦ Solución anticoagulante (Heparina 1000 UI)
- ✦ Solución salina (NaCl) al 1%.
- ✦ Solución salina (NaCl) al 0.9%.
- ✦ Solución de lectina purificada de frijol *Phaseolus vulgaris* (PHT) al 0.2% en solución salina 0.9 %. (a)
- ✦ Proteasa 0.2% en solución salina al 0.9% (SIGMA P-5147)

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

#### ✦ Procedimiento

- ✦ Preparación del extracto.
  - ✦ Moler finamente la muestra vegetal (con un contenido < 5% de grasa)
  - ✦ Suspender 0.1 g de material en 10 mL de solución salina al 1%, y efectuar la extracción con agitación mecánica durante 2 horas a 300 rpm. a temperatura ambiente.
  - ✦ Después del tiempo indicado centrifugar el extracto a 3000 rpm., durante 10 minutos para eliminar el residuo insoluble; filtrar el

sobrenadante a través de un filtro de vidrio de porosidad gruesa y de ser necesario se puede lavar el residuo con más solución salina al 1%, para llevar el extracto filtrado al volumen inicial (10 mL)

✦ Preparación de la sangre.

✦ Una vez que se sangra al hámster (anestesiado) por vía ocular, colocar la sangre en un matraz pequeño que contenga solución anticoagulante

✦ Agitar suavemente para la completa homogeneización de la sangre con la solución anticoagulante.

✦ Para evitar al máximo la coagulación, se puede diluir esta con solución salina isotónica (de preferencia lavar la sangre lo más rápido posible para evitar la hemólisis).

✦ Transvasar la sangre con anticoagulante a tubos de centrifuga para lavarla (3 veces) con solución salina al 0.9%. La relación “sangre:solución salina” es aproximadamente 1:13 y se centrifuga a 3000 rpm. durante 10 minutos.

✦ Después del último lavado, medir en el tubo de centrifuga la cantidad de paquete de eritrocitos, y diluir al 4% para lo cual se agrega por cada 1 mL de glóbulos rojos 24 mL de solución salina al 0.9%.

✦ Sensibilización de los glóbulos rojos

✦ A cada 10 ml. de suspensión de glóbulos rojos al 4% agregarles 1 mL de solución de pronasa al 0.2% y colocarlos en incubadora por



espacio de 1 hora a  $36.5 \pm 0.5$  °C, resuspendiendo los eritrocitos por lo menos dos veces.

📌 Después del tiempo estipulado, centrifugar para eliminar la enzima sobrenadante y dar 3 lavados con solución salina al 0.9%.

📌 Después del último lavado resuspender el paquete de glóbulos rojos al 4 %, para lo cual, por cada mililitro del paquete de eritrocitos se adiciona 24 mL de solución salina al 0.9%.

⊕ Ajuste de la suspensión de glóbulos rojos.

📌 Se toma 0.1 mL de la suspensión de glóbulos rojos ya sensibilizados y agregarles 4.9 mL de solución salina al 0.9 %.

📌 Leer en el espectrofotómetro a 620 nm, usando un adaptador de celdas que permita el paso de solo 1 cm<sup>2</sup> de luz y como blanco solución salina al 0.9%.

📌 La lectura que se debe obtener es de  $26.5 \pm 2.5\%$  (24-29) de transmitancia, en caso contrario se realizará la dilución necesaria para que la suspensión de glóbulos quede dentro de dicho rango.

⊕ Microtitulación.

📌 Utilizando las placas tipo “V” del microtiter colocar en cada pozo de las hileras que se van a usar 100µL de solución salina al 0.9% con la pipeta automática multicanales evitando tocar las paredes del pozo y adicionando con precaución para que no se desfase el volumen de adición.

- ✚ A continuación llenar el microdilutor con 50 $\mu$ L introduciéndolo en el extracto problema y al sacarlo absorber con mucho cuidado la solución adherida en el vástago del microdilutor.
  - ✚ Posteriormente Introducirlo en el primer pozo de la hilera, girándolo sin excesiva presión y pasarlo con mucho cuidado al siguiente pozo y así sucesivamente hasta completar una hilera para obtener las diluciones seriadas.
  - ✚ También realizar lo anterior para la solución diluida (1:100) de la faseolotoxina que servirá como referencia para la determinación cuantitativa.
  - ✚ Por cada placa debe haber una hilera para la solución de PHT; y además se debe dejar una hilera para las prueba negativa de hemaglutininas, la cual solo tendrá la solución salina isotónica.
  - ✚ Por último, con un pipetero de gota colocar en cada pozo 50  $\mu$ L de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizados y ajustados, teniendo la precaución de resuspender los glóbulos rojos, en cada adición a una placa.
  - ✚ Gira la placa en forma circular y colocarla en la incubadora a 36.5  $\pm$  0.5  $^{\circ}$ C durante 1 hora.
- ✚ Lectura
- ✚ Una vez transcurrido el tiempo estipulado colocar la placa sobre el dispositivo de lectura.
  - ✚ Observar a través del espejo el fondo de los pozos de cada hilera de prueba.

Reportar la máxima dilución que presenta prueba positiva de aglutinación, tanto del extracto de la muestra a ensayar como de la solución de faseolotoxina.

#### Recomendaciones

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

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

#### Cálculos

##### Limite de detección del método (L)

A. Cantidad de lectina que realmente se coloca en el primer pozo para hacer la dilución seriada (E)

$$E = M * D$$

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

D: Cantidad de muestra tomada por el microtitulador ( $50\mu\text{L}$ )

$$E = \left(\frac{1\mu\text{g}}{\text{mL}}\right) (50\mu\text{L}) \left(\frac{1\text{mL}}{1000\mu\text{L}}\right)$$

$$E = 0.05\mu\text{g}$$

B. Limite de detección del método (L)

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

Unidades hemaglutinantes

- A. Cantidad utilizada realmente de la muestra problema en el primer pozo de la hilera respectiva (e)

$$e = M * D$$

M: Concentración de muestra en la solución diluida (mg/ mL)

D: Cantidad de muestra tomada por el microtitulador (50µL)

$$M = \left( \frac{g \text{ de muestra}}{10mL} \right) \left( \frac{1000mg}{1g} \right) F$$

$$F = \text{factor de dilución} = \frac{\text{aliquota}}{\text{aforo}}$$

- B. Cantidad mínima de muestra que produce prueba positiva de aglutinación (título de la muestra problema) (MA)

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

- C. Cantidad de lectina de referencia expresada en µg sobre mg de muestra, que también equivale a 1 mg de lectina sobre 1g de muestra (LE)

$$LE = L/MA$$

- D. Unidades hemaglutinantes (UHG)

UNG = 1 mg faseolotoxina

Resultados expresados en UHG/g muestra

$$\left( \frac{\mu g}{mg} \right) \left( \frac{1mg}{1000\mu g} \right) \left( \frac{1000mg}{1g} \right) = \frac{mg}{g}$$

$$\frac{\mu g}{mg} = \frac{mg}{g}$$

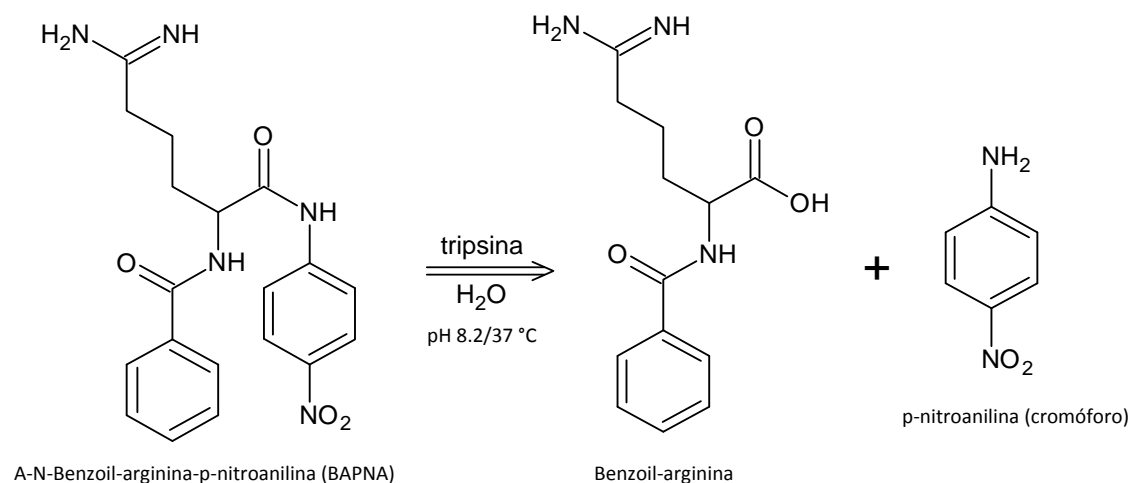
$$\frac{mg}{g \text{ Muestra}} = \frac{UHG}{g \text{ Muestra}}$$

$$\left( \frac{LEmg}{g \text{ Muestra}} \right) \left( \frac{1 UHG}{1mg \text{ lectina}} \right) = \frac{UHG}{g \text{ Muestra}}$$

#### 4.5.4 Inhibidores de tripsina (Kakade, M.L. et al, 1973. Kakade, M.L. et al, 1974. Kakade, M.L. et al, 1969)

☀ Fundamento: La técnica es la utilizada por Kakade y colaboradores, la cual se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso (solución de NaOH 0.01N) de la muestra sobre una solución estándar de tripsina.

El extracto directo o diluido se pone en contacto con una solución estandarizada de tripsina (40 µg/10 mL), y después de un cierto tiempo se determina la actividad proteolítica remanente, por medio de un sustrato sintético (BAPNA), el cual producirá una coloración que se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm. Dicha coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de la muestra.



Una unidad de tripsina (U.T.) es arbitrariamente definida como un incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm. Por 10 mL de mezcla de reacción descritas por Kakade y colaboradores. La actividad de inhibidores de tripsina se expresa en términos de unidades de tripsina inhibida (U.T.I.)

🌟 Material y reactivos:

- ⊕ Balanza analítica Sartorius modelo A-210-P
- ⊕ Potenciómetro Corning pHmeter modelo 10, con electrodo de Calomel
- ⊕ Agitador magnético multiple Corning Stirrer modelo 440825
- ⊕ Baño de agua Grant modelo 5E-10, a 37 °C
- ⊕ Vortex labLine modelo super-mixer 1290
- ⊕ Espectrofotómetro Thermo-Scientific Genesys 10-S
- ⊕ Vasos de precipitados
- ⊕ Tubos de ensaye
- ⊕ NaOH 0.01N
- ⊕ Solución amortiguadora de TRIS, pH 8.2 y 0.05M (a).
- ⊕ Solución BAPNA (b).
- ⊕ Ácido acético al 30%.
- ⊕ Solución estándar de tripsina (c)
- ⊕ HCl 0.001N.
- ⊕ Soya desengrasada como control

(a) Pesar 6.05 g de tris (hidrocimetil-amino-metano) y 2.94 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .  
Disolver en 900 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 8.2 y aforar a un volumen de 1L.

(b) Pesar 100 mg de benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida-HCl (BAPNA). Disolver en 2.5 mL de dimetil-sulfóxido y diluir a 250 mL con amortiguador TRIS previamente calentado a 37 °C (ésta solución debe ser preparada el mismo día y cuando este en uso debe mantenerse a 37 °C)

- (c) Pesar con mucha exactitud 4 mg de tripsina bovina y disolver en 200 mL de HCl 0.001N. Ésta solución contiene 20 µg de tripsina por mililitro y debe ser almacenada en refrigeración donde puede durar de 2 a 3 semanas sin pérdida apreciable de actividad.

☀ Procedimiento:

⊕ Preparación del extracto:

- ✚ Pesar 1 g de muestra finamente molida de un vaso de precipitado.
- ✚ Adicionar 45 mL de NaOH 0.01N
- ✚ Ajustar el pH de esta suspensión a  $9.6 \pm 0.2$  y se afora a 50 mL.
- ✚ A continuación transvasar a un vaso que contenga un magneto, para poder agitar la suspensión mecánicamente en la perilla de agitación por espacio de 2 horas y media a 300 rpm.
- ✚ Después de dicho tiempo quitar el magneto y dejar media hora en reposo.
- ✚ Por simple decantación obtener el sobrenadante eliminando el residuo insoluble.
- ✚ El sobrenadante debe diluirse hasta el punto de que 1 mL produzca una inhibición de 40 a 60%; este requisito es indispensable para reducir la desviación estándar relativa.

⊕ Determinación de la actividad:

- ✚ Pipetear porciones de 0.0, 0.6, 1.0, 1.4, y 1.8 mL de extracto directo o diluido a tubos de ensaye por duplicado y ajustando el volumen a 2.0 mL con agua destilada.
- ✚ Introducir a baño-maría a 37 °C.

- ✚ Adicionar 2.0 mL de solución estándar de tripsina (previamente mantenida a 37 °C) y mantener en contacto inhibidor-tripsina por espacio de 10 minutos.
- ✚ A continuación adicionar 5 mL de solución BAPNA (a 37 °C) a cada tubo y mantener dicha mezcla de reacción por 10 minutos exactos (con cronómetro).
- ✚ Detener la reacción enzimática por la adición de 1 mL de ácido acético al 30%; el cual debe homogeneizarse inmediatamente.
- ✚ Cuando por la adición del ácido acético el tubo de reacción se enturbie o forme un precipitado, será necesario filtrar el contenido a través de papel filtro (Whatman #1); para ello es conveniente dejar el tubo en reposo por 15 minutos (aproximadamente) para después filtrar primeramente el sobrenadante.
- ✚ Por último filtrar la porción del precipitado gelatinoso. Sin embargo es necesario cerciorarse que el filtrado este transparente.
- ✚ Medir la absorbancia a 410 nm.
- ✚ Expresar el resultado en U.T.I./mg de muestra.



Tabla. Muestra de la adición de los reactivos a los diferentes tubos.

	Mililitros de extracto	Mililitros de agua	Mililitros de tripsina $\xrightarrow{10\text{min}}$	Mililitros de BAPNA $\xrightarrow{10\text{min}}$	Mililitros de ácido acético
<b>1B</b>	1.8	0.2	2*	5	----
<b>1</b>	1.8	0.2	2	5	1
<b>2B</b>	1.4	0.6	2*	5	----
<b>2</b>	1.4	0.6	2	5	1
<b>3B</b>	1	1	2*	5	----
<b>3</b>	1	1	2	5	1
<b>4B</b>	0.6	1.4	2*	5	----
<b>4</b>	0.6	1.4	2	5	1
<b>RB</b>	0	2	2*	5	----
<b>R</b>	0	2	2	5	1

\*Más un mililitro de ácido acético

 Cálculos

Control de soya

1.0003g

Dilución del extracto 1:50

Tabla. Datos y resultados de la determinación de Inhibidores de tripsina del control de soya.

	Mililitros de extracto	Absorbancia	UT	UTI	UTI/mL
<b>R</b>	0	0.458	45.8	----	----
<b>4</b>	0.6	0.308	30.8	15	25
<b>3</b>	1	0.215	21.5	24.3	24.3
<b>2</b>	1.4	0.147	14.7	31.1	22.21
<b>1</b>	1.8	0.083	8.3	37.5	20.83

$$UT = Absorbancia * 100$$

$$UT = 0.458 * 100$$

$$UT = 45.8$$

$$UTI = UT referencia - UTmuestra$$

$$UTI = 45.8 - 30.8$$

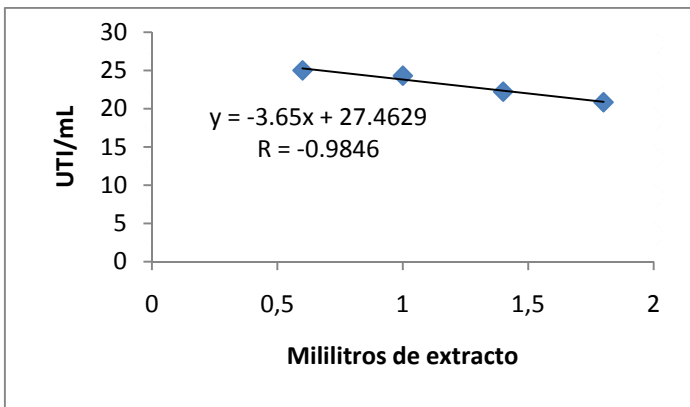
$$UTI = 15$$

$$\frac{UTI}{mL} = \frac{UTI}{mL \text{ de extracto}}$$

$$\frac{UTI}{mL} = \frac{15}{0.6}$$

Porcentaje de inhibición: 46.94%, está dentro del rango (40-60)

Gráfica. Curva para Inhibidores de tripsina tipo Kunitz



F: Factor de dilución (A:aforo; a:alícuota)

B: Valor de la ordenada de la curva

En caso de que no sean inhibidores tipo Kunitz se utiliza el promedio de los UTI/mL como B

#### 4.5.5 Inhibidores de $\alpha$ -Amilasa (Piergiovanni A.R. 1992; Piergiovanni A.R. 1974; Varner J.E. et al 1967)

##### Método de Varner y Chrispeels (Yodo):

✿ Fundamento: El almidón forma un compuesto colorido con el yodo, donde la coloración es directamente proporcional a la concentración de almidón y se puede cuantificar espectrofotométricamente a 620 nm.

✿ Material y reactivos:

- ✦ Balanza analítica Sartorius modelo A-210-P
- ✦ Potenciómetro Corning pHmeter con electrodo de Calomel
- ✦ Espectrofotómetro Thermo-Scientific Genesys 10-S
- ✦ Agitador magnético multiple Corning Stirrer modelo 440825
- ✦ Baño de agua polystat a 30 °C
- ✦ Vortex labLine modelo super-mixer 1290
- ✦ Pipetas automáticas de 1 mL y de 5 mL
- ✦ Vasos de precipitados
- ✦ Tubos de ensaye
- ✦ Papel filtro No. 50
- ✦ Enzima  $\alpha$ -amilasa Sigma A-0273 (A)
- ✦ Almidón soluble (B)
- ✦ Acetato de calcio 1.3M pH 6.0 (C)
- ✦ Solución de Yodo-Yoduro de Potasio al 6% p/v (D)
- ✦ NaCl 0.1M
- ✦ HCl 0.05M
- ✦ Solución de NaCl 0.9% (E)

- (A) Solución de enzima: Pesar 1 mg de enzima  $\alpha$ -amilasa [(EC 3.2.1.1) Sigma A-0273] y aforar a 5 mL con agua destilada. De esta solución tomar 1 mL y aforar a 100 mL con agua destilada, por lo tanto, se tiene una concentración de enzima de 0.002 mg/mL.
- (B) Solución de Almidón (sustrato): Calentar a ebullición 0.05 g de almidón con 5 mL de agua desionizada durante 1.5 minutos, agregar 0.5 mL de acetato de calcio 1.3M (pH 6.0) y 0.5 mL de NaCl 0.1M. Ajustar el pH a 6.0 con ácido acético glacial y aforar a 100 mL con agua desionizada.
- (C) Acetato de Calcio 1.3M (pH 6.0): Pesar 5.726 g de acetato de calcio monohidratado  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}\cdot\text{H}_2\text{O}$ , ajustar el pH a 6.0 con ácido acético glacial (el necesario para llegar al pH indicado) y aforar a 25 mL con agua destilada.
- (D) Solución de Yodo-Yoduro al 6% p/v: Pesar 3 g de Yoduro de Potasio (KI) y disolver en 10 mL de agua destilada, agregar 0.3 g de Yodo metálico sublimado ( $\text{I}_2$ ) y disolverlo con el KI, aforar a 50 mL con agua destilada. En el momento de realizar el ensayo para la determinación de la actividad de  $\alpha$ -amilasa elaborar una solución al 1% (v/v) de yodo-yoduro en HCl 0.05M.
- (E) Solución de NaCl al 0.9% p/v: Pesar 0.9 g de NaCl, disolver en agua destilada y aforar a 100 mL.

☀ Procedimiento:

⊕ Medición de la actividad enzimática:

- ⊕ Colocar 4 mL de la solución de enzima estandarizada y 4 mL de agua destilada en un tubo de ensaye y agitar en el vórtex.
- ⊕ Dejar este sistema en un baño a 30 °C durante 10 minutos.

- ✚ Tomar 2 mL de la mezcla anterior y añadirlos a otro tubo de ensaye que contenga 2 mL de la solución de almidón
- ✚ Incubar a 30 °C durante 15 minutos
- ✚ Detener la reacción con 2 mL de solución de yodo-yoduro
- ✚ Preparar el blanco con 2 mL de agua destilada, 2 mL de solución de almidón y 2 mL de solución de yodo-yoduro (BM)
- ✚ Para ajustar el espectrofotómetro se prepara un blanco con 4 mL de agua destilada y 2 mL de solución de yodo-yoduro (BE)

#### ✚ Cuantificación de $\alpha$ -amilasa

##### ✚ Método de extracción:

- ✚ Pesar 1 g de harina de cereal o de leguminosa en un vaso de precipitados de 25 mL
- ✚ Agregar 25 mL de solución de NaCl al 0.9% p/v y una barra magnética, sellar el vaso con parafilm.
- ✚ Agitar (aproximadamente a 400rpm) durante 2 horas en refrigeración a 4 °C.
- ✚ Detener la agitación y dejar el extracto a que se atempere (aproximadamente 30 minutos)
- ✚ Filtrar al vacío (utilizando un papel filtro del número 50)
- ✚ Aforar a 25 mL con NaCl 0.9% p/v

##### ✚ Cuantificación de $\alpha$ -amilasa

- ✚ Colocar 4 mL de la solución de enzima estandarizada y 4 mL de la solución del extracto preparado (cereal o leguminosa) en un tubo de ensaye y agitar en el vórtex

- ✚ Dejar en contacto a la enzima con el extracto en un baño a 30 °C durante 10 minutos
- ✚ Tomar 2 mL de la mezcla anterior y añadirlos a otro tubo de ensaye que contenga 2 mL de la solución de almidón
- ✚ Incubar a 30 °C durante 15 minutos
- ✚ Detener la reacción con 2 mL de solución de yodo-yoduro
- ✚ Preparar el blanco con 1 mL de solución de extracto, 1 mL de agua destilada, 2 mL de solución de almidón y 2 mL de solución de yodo-yoduro (BM)
- ✚ Para ajustar el espectrofotómetro se prepara un blanco con 4 mL de agua destilada y 2 mL de solución de yodo-yoduro (BE)
- ✚ Medir absorbancia a 620 nm

✚ Cálculos

Actividad de la enzima

$$\text{Absorbancia corregida} = \text{Absorbancia del BM} - \text{Absorbancia de la muestra}$$

$$\% \text{Actividad} = \frac{\text{Absorbancia corregida}}{\text{Absorbancia del BM}} 100$$

$$\% \text{Inhibición} = \% \text{Actividad de la enzima} - \% \text{Actividad del sistema}$$

Para poder aplicar el % de inhibición anterior, es necesario que la actividad enzimática del sistema permanezca en el rango de la mitad de la actividad originalmente obtenida + 10% de ésta.

$$\frac{UIA}{g \text{ muestra}} = \% \text{Inhibición} * F * \frac{25mL}{g \text{ Muestra}}$$

F: Factor de dilución (a:aforo; A:alícuota)

$$F = \frac{a}{A}$$

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez contando con la harina homogénea de las 4 muestras del frijol *Phaseolus polyanthus* a analizar: frijol gordo seco crudo, frijol gordo seco cocido, frijol gordo fresco crudo, y frijol gordo fresco cocido; se realizó su análisis tal y como se muestra en el diagrama general de trabajo (pág. 24).

### 5.1 Análisis Bromatológico

Para saber la calidad de éste frijol como alimento se realizó el análisis proximal, así como la determinación de otros componentes bromatológicos que son: el contenido de metionina, la digestibilidad *in vitro* de la proteína y la cuantificación de su contenido energético.

#### 5.1.1 Análisis proximal

Para el caso del frijol gordo seco y crudo en la **Tabla 1** se presentan los resultados obtenidos tanto en base húmeda como en base seca. Cabe mencionar que en estos resultados se obtuvo un coeficiente de variación menor al 5%; habiendo una excepción en el contenido de grasa, donde se obtuvo una variación de 7.86% en base húmeda y de 8.96% en base seca; ésta fue debida a que el contenido de grasa en la muestra es muy pequeño, en este caso aceptamos un coeficiente de variación menor al 10% para así hacer de nuestro valor promedio, un valor confiable.

**Tabla 1. Análisis Proximal del frijol gordo seco y crudo.** <sup>a</sup>

DETERMINACIONES	BASE HUMEDA <sup>b</sup>	BASE SECA <sup>b</sup>
Humedad	4.59 ± 0.144	-----
Cenizas	4.35 ± 0.077	4.56 ± 0.078
Grasa	0.53 ± 0.042	0.55 ± 0.049
Fibra cruda	5.13 ± 0.164	5.37 ± 0.176
Proteína cruda	21.02 ± 0.273	22.03 ± 0.282
Hidratos de carbono digeribles <sup>c</sup>	64.38	67.49

<sup>a</sup> Se muestran los valores promedio ± desviación estándar (n=3)

<sup>b</sup> Resultados expresados en g del componente por 100 g de muestra (%)

<sup>c</sup> Los hidratos de carbono se calcularon por diferencia

Para el caso del frijol gordo en fase inmadura (denominado para este trabajo como fresco o verde), debido a su alto contenido de agua, fue necesario someter el material biológico a una deshidratación controlada con la finalidad de eliminar la gran cantidad de agua y a la vez no dañar los factores tóxicos termolábiles, para su posterior cuantificación. Adicionalmente, con el paso anterior se determinó la humedad original, con el propósito de expresar los resultados obtenidos tanto en base seca como en la muestra original. Los resultados del análisis proximal para el frijol gordo fresco crudo se presentan en la **Tabla 2**, donde también está anotada la humedad original que fue mayor del 60% como era de esperarse. Es importante mencionar también que en estos resultados se obtuvo un coeficiente de variación menor al 5%; con la excepción del contenido de fibra cruda, donde se obtuvo una variación de 5.63% en base húmeda y de 5.61% en base seca; ésta fue debida a que en éste método hay demasiada manipulación de la muestra, y por lo tanto se puede perder material al pasar la muestra del vaso Berzelius al embudo, y viceversa; de igual manera en este caso se acepta un coeficiente de variación menor al 10% para así hacer del valor promedio, un valor confiable.

**Tabla 2. Análisis Proximal del frijol gordo fresco y crudo. <sup>a</sup>**

DETERMINACIONES	BASE HUMEDA <sup>b</sup>	BASE SECA <sup>b</sup>
Humedad	64.17	-----
Cenizas	1.64 ± 0.042	4.57 ± 0.112
Grasa	0.46 ± 0.021	1.29 ± 0.056
Fibra cruda	4.20 ± 0.236	11.73 ± 0.658
Proteína cruda	7.82 ± 0.277	21.83 ± 0.783
Hidratos de carbono digeribles <sup>c</sup>	21.71	60.58

<sup>a</sup> Se muestran los valores promedio ± desviación estándar (n=3)

<sup>b</sup> Resultados expresados en g del componente por 100 g de muestra (%)

<sup>c</sup> Los hidratos de carbono se calcularon por diferencia

En la **Tabla 3** se muestran los resultados obtenidos en base seca tanto del frijol gordo seco y crudo, como del frijol gordo fresco y crudo; con el fin de efectuar una comparación en la



composición química de éstos granos y ver si existe diferencia entre estas diferentes etapas de crecimiento del frijol. Para cotejar de forma adecuada éstos datos primero es necesario expresarlos en base seca con el fin de que la gran diferencia de humedad que hay entre estos no interfiera; con esto solo se compara el contenido de nutrientes, que es lo importante.

La comparación se realizó mediante un análisis estadístico, utilizando la prueba “t de student” que es una distribución de probabilidad que surge del problema de estimar la media de una población cuando el tamaño de la muestra es pequeño. Sirve para determinar si hay diferencias entre dos medias muestrales, construyendo un intervalo de confianza entre las medias de dos poblaciones; si la diferencia entre el valor promedio de las muestras entra dentro de éste intervalo se considera que no hay diferencia significativa entre estas; pero en caso de que éste valor no quede dentro del intervalo, las muestras son significativamente diferentes.

En la misma **Tabla 3** se muestran los resultados de la distribución t de student realizada a cada valor, mostrando así si los parámetros son estadísticamente iguales o no. Como se puede ver no se realizó comparación alguna en el contenido de humedad, debido a que para el valor de humedad del frijol gordo fresco no se tiene la desviación estándar ya que ésta humedad considera tanto la humedad gruesa del grano, como la humedad analítica de la harina; además es obvia la diferencia. Tampoco se cotejó el contenido de hidratos de carbono asimilables, debido a que el análisis proximal se basó en el esquema de Weende, donde se obtuvo éste valor por diferencia y por lo tanto no se tiene desviación estándar. En cuanto a los demás parámetros se puede ver que no existe diferencia significativa en el contenido de cenizas y de proteína, en cambio el contenido de grasa y fibra cruda si varia; de hecho estos valores se duplican en el frijol gordo fresco; el cambio en estos dos componentes es debido a la diferencia que tiene cada semilla en su fase de maduración.

**Tabla 3. Comparación estadística entre el frijol gordo crudo en sus distintas fases.** <sup>a, b</sup>

DETERMINACIONES	FRIJOL GORDO SECO <sup>c</sup>	FRIJOL GORDO FRESCO <sup>c</sup>	Distribución "t de student"
Cenizas	4.56 ± 0.078	4.57 ± 0.112	Significativamente iguales
Grasa	0.55 ± 0.049	1.29 ± 0.056	Significativamente diferentes
Fibra cruda	5.37 ± 0.176	11.73 ± 0.658	Significativamente diferentes
Proteína cruda	22.03 ± 0.282	21.83 ± 0.783	Significativamente iguales

<sup>a</sup> Se muestran los valores promedio ± desviación estándar (n=3)

<sup>b</sup> Resultados expresados en base seca.

<sup>c</sup> Resultados expresados en g del componente por 100 g de muestra (%)

Después del proceso de cocción se separó el caldo para liofilizarlo y el grano para secarlo en la estufa de circulación forzada para así eliminar toda el agua y tampoco dañar los factores tóxicos termolábiles; Tras obtener la harina del grano se le incorporo el caldo deshidratado con el fin de considerar todos aquellos nutrientes que se van con el caldo. En el lugar de procedencia éste grano se consume con su caldo; por lo que en lo anterior se determinó la humedad original con el propósito de expresar los resultados obtenidos tanto en base seca como en la muestra tal y como se consume.

Los resultados del análisis proximal del frijol gordo seco y cocido se pueden apreciar en la **Tabla 4**, igualmente expresados tanto en base húmeda (la muestra como se consume) como en base seca. En todos estos resultados se obtuvo un coeficiente de variación menor al 5%, por lo que en sí nuestro valor promedio es un valor confiable.

**Tabla 4. Análisis Proximal del frijol gordo seco y cocido.** <sup>a</sup>

DETERMINACIONES	BASE HUMEDA <sup>b</sup>	BASE SECA <sup>b</sup>
Humedad	75.37	-----
Cenizas	1.19 ± 0.01	4.85 ± 0.04
Grasa	0.13 ± 0	0.52 ± 0.006
Fibra cruda	1.24 ± 0.006	5.02 ± 0.021
Proteína cruda	5.49 ± 0.068	22.30 ± 0.272
Hidratos de carbono digeribles <sup>c</sup>	16.58	67.31

<sup>a</sup> Se muestran los valores promedio ± desviación estándar (n=3)

<sup>b</sup> Resultados expresados en g del componente por 100 g de muestra (%)

<sup>c</sup> Los hidratos de carbono se calcularon por diferencia

Ahora en la **Tabla 5** se muestran los resultados obtenidos en base seca tanto del frijol gordo seco y crudo, como del frijol gordo seco y cocido; con el fin de saber si hubo una variación en la composición química del grano en ésta fase después del tratamiento térmico. Igualmente se utilizaron los resultados expresados en base seca para hacer una comparación adecuada sin que la diferencia de humedad que hay entre estos interfiera, y así solo cotejar el contenido de nutrientes.

También se realizó la comparación mediante la prueba “t de student”, y los resultados que arrojó se muestran igualmente en la **Tabla 5**. No se realizó comparación en el contenido de humedad debido a que para el valor de humedad del frijol gordo seco y cocido no se tiene la desviación estándar, puesto que ésta humedad considera tanto la humedad gruesa del caldo, y del grano, así como la humedad analítica de la harina; de igual manera la diferencia que hay en ésta es bastante obvia. El contenido de hidratos de carbono asimilables tampoco se pudo comparar por la misma razón ya mencionada anteriormente. En cuanto a los otros parámetros se puede ver que no hay variación alguna en el contenido de grasa, fibra cruda, y proteína durante el proceso de cocción, sin embargo el contenido de cenizas es significativamente diferente, y aumentó después del tratamiento térmico; la diferencia está en que 100 g de frijol cocido tienen 0.29 g más de cenizas que 100 g del grano crudo, éstas cenizas las pudo aportar la olla de barro en la que se realizó la cocción.

**Tabla 5. Comparación estadística entre el frijol gordo seco crudo y cocido.** <sup>a, b</sup>

DETERMINACIONES	FRIJOL GORDO CRUDO <sup>c</sup>	FRIJOL GORDO COCIDO <sup>c</sup>	Distribución “t de student”
Cenizas	4.56 ± 0.078	4.85 ± 0.04	Significativamente diferentes
Grasa	0.55 ± 0.049	0.52 ± 0.006	Significativamente iguales
Fibra cruda	5.37 ± 0.176	5.02 ± 0.021	Significativamente iguales
Proteína cruda	22.03 ± 0.282	22.30 ± 0.272	Significativamente iguales

<sup>a</sup> Se muestran los valores promedio ± desviación estándar (n=3)

<sup>b</sup> Resultados expresados en base seca.

<sup>c</sup> Resultados expresados en g del componente por 100 g de muestra (%)

Con respecto a los resultados del análisis proximal del frijol gordo fresco y cocido, los cuales se pueden apreciar en la **Tabla 6** expresados tanto en base húmeda (tal y como se consumen el lugar de origen) como en base seca; Se obtuvo un coeficiente de variación menor al 5%, por lo tanto nuestro valor promedio es un valor confiable.

**Tabla 6. Análisis Proximal del frijol gordo fresco y cocido.** <sup>a</sup>

DETERMINACIONES	BASE HUMEDA <sup>b</sup>	BASE SECA <sup>b</sup>
Humedad	82.26	-----
Cenizas	0.91 ± 0.006	5.14 ± 0.044
Grasa	0.25 ± 0	1.41 ± 0.017
Fibra cruda	1.85 ± 0.050	10.41 ± 0.281
Proteína cruda	3.93 ± 0.061	22.15 ± 0.324
Hidratos de carbono digeribles <sup>c</sup>	10.80	60.89

<sup>a</sup> Se muestran los valores promedio ± desviación estándar (n=3)

<sup>b</sup> Resultados expresados en g del componente por 100 g de muestra (%)

<sup>c</sup> Los hidratos de carbono se calcularon por diferencia

A continuación en la **Tabla 7** se muestran los resultados obtenidos en base seca tanto del frijol gordo fresco y crudo, como del frijol gordo fresco y cocido; con el propósito de saber si hubo un cambio en la composición química del grano en ésta fase de maduración, después del tratamiento térmico. De igual manera se utilizaron los resultados expresados en base seca con el fin de hacer una comparación adecuada, y que no interfiera la diferencia de humedad que hay entre estas semillas, comparando así solamente el contenido de nutrientes.

La comparación se realizó utilizando la misma herramienta estadística; la distribución “t de student”, y los resultados que arrojó también se muestran en la **Tabla 7**. No se cotejó el contenido de humedad por la misma razón ya mencionada en la comparación del frijol gordo seco y crudo con el frijol gordo seco y cocido; siendo también la diferencia más que obvia. El contenido de hidratos de carbono asimilables tampoco se comparó debido a lo que se indicó anteriormente. Observando los otros parámetros no se encontró variación alguna en el contenido de grasa, fibra

cruda, y proteína durante el proceso de cocción, sin embargo al igual que en el frijol seco se observa que el contenido de cenizas es significativamente diferente, y aumentó después del tratamiento térmico; la diferencia aquí fue mayor y se ve que 100 g de frijol cocido tienen 0.57 g más de cenizas que 100 g del grano crudo, éstas cenizas también las pudo aportar la olla de barro en la que se realizó la cocción.

**Tabla 7. Comparación estadística entre el frijol gordo fresco crudo y cocido.** <sup>a, b</sup>

DETERMINACIONES	FRIJOL GORDO CRUDO <sup>c</sup>	FRIJOL GORDO COCIDO <sup>c</sup>	Distribución "t de student"
Cenizas	4.57 ± 0.112	5.14 ± 0.044	Significativamente diferentes
Grasa	1.29 ± 0.056	1.41 ± 0.017	Significativamente iguales
Fibra cruda	11.73 ± 0.658	10.41 ± 0.281	Significativamente iguales
Proteína cruda	21.83 ± 0.783	22.15 ± 0.324	Significativamente iguales

<sup>a</sup> Se muestran los valores promedio ± desviación estándar (n=3)

<sup>b</sup> Resultados expresados en base seca.

<sup>c</sup> Resultados expresados en g del componente por 100 g de muestra (%)

Como se puede observar tanto en las **Tablas 1, 2, 4, y 6**; la composición en base seca del frijol gordo en general tiene como componente mayoritario a los hidratos de carbono digeribles; seguido por las proteínas, lo cual indica que éste frijol es una buena fuente de proteína vegetal; después sigue con el contenido de fibra cruda, que aunque varíe entre el frijol fresco y seco muestra un contenido significativo de materia insoluble y resistente a la degradación por enzimas digestivas; posteriormente están las cenizas, que hacen referencia a un alto contenido de minerales; y finalmente el contenido de grasa que aunque es relativamente bajo, esta porción es rica en ácidos grasos esenciales.

Es importante mencionar que no existe información bibliográfica que hable de la composición bromatológica de esta variedad de frijol (*Phaseolus polyanthus*), por lo tanto no hay referencia de comparación.

### 5.1.2 Otros componentes bromatológicos

Debido a que se cuenta con poca información química sobre esta especie de frijol se realizó una complementación bromatológica determinando algunos parámetros alimenticios de interés nutricional como son el contenido de metionina, la digestibilidad *in vitro* de la proteína y la cuantificación de su contenido energético.

En las **Tablas 8 y 9** se menciona el valor de metionina (aminoácido indispensable limitante de la calidad nutritiva de los granos de leguminosas), expresándose por 100 gramos de proteína por lo que éste valor no está afectado por el contenido de agua en la muestra; lo mismo se puede mencionar para el caso de la digestibilidad *in vitro*, ya que éste parámetro nutritivo, es un indicador que predice la biodisponibilidad de la proteína en cuestión y su valor no varía al mostrarse en base seca o húmeda; sin embargo, no se puede decir lo mismo para la determinación de la densidad energética o energía gruesa, ya que como se debe expresar por gramo de muestra, este valor si estará influido por la cantidad de sólidos totales que tenga ésta, como se puede ver claramente en estas tablas.

En la determinación de metionina y la cuantificación de la densidad energética de las muestras se tiene un coeficiente de variación menor al 5%, por lo que el valor promedio se puede considerar un valor confiable. En cuanto al análisis de la digestibilidad *in vitro* no se pudo realizar la técnica por triplicado por cuestiones de material y equipo disponible en el laboratorio, así que solo se realizó por duplicado; con solo dos datos el valor de desviación estándar no es un valor muy confiable, aunque se menciona en las tablas con el fin de dar a conocer el intervalo en el que se encuentra este parámetro; se calculó tanto el porcentaje de error, como el coeficiente de variación que hay entre los datos y también se busco que no dieran mayor a un 5%, para así poder confiar en el resultado.

**Tabla 8. Cuantificación de otros componentes bromatológicos del frijol gordo crudo. <sup>a</sup>**

DETERMINACIONES	Tamaño de la muestra	Frijol gordo seco y crudo		Frijol gordo fresco y crudo	
		BASE HUMEDA	BASE SECA	BASE HUMEDA	BASE SECA
Metionina <sup>b</sup>	6	1.60 ± 0.066		1.81 ± 0.077	
Digestibilidad “ <i>in vitro</i> ” <sup>c</sup>	2	79.40 ± 0.319		76.92 ± 0	
Densidad energética <sup>d</sup>	4	20.05 ± 0.452	21.02 ± 0.476	7.50 ± 0.090	20.92 ± 0.244

<sup>a</sup> Se muestran los valores promedio ± desviación estándar

<sup>b</sup> Resultados expresados en g del aminoácido por 100 g de proteína (%)

<sup>c</sup> Resultados expresados en g de proteína digerida por 100 g de proteína total (%)

<sup>d</sup> Resultados expresados en kJ por gramo de muestra.

**Tabla 9. Cuantificación de otros componentes bromatológicos del frijol gordo cocido. <sup>a</sup>**

DETERMINACIONES	Tamaño de la muestra	Frijol gordo seco y cocido		Frijol gordo fresco y cocido	
		BASE HUMEDA	BASE SECA	BASE HUMEDA	BASE SECA
Metionina <sup>b</sup>	6	1.58 ± 0.055		1.80 ± 0.090	
Digestibilidad “ <i>in vitro</i> ” <sup>c</sup>	2	85.82 ± 0.638		86.51 ± 0.160	
Densidad energética <sup>d</sup>	4	5.23 ± 0.073	21.24 ± 0.304	3.74 ± 0.067	21.06 ± 0.381

<sup>a</sup> Se muestran los valores promedio ± desviación estándar

<sup>b</sup> Resultados expresados en g del aminoácido por 100 g de proteína (%)

<sup>c</sup> Resultados expresados en g de proteína digerida por 100 g de proteína total (%)

<sup>d</sup> Resultados expresados en kJ por gramo de muestra.

En la **Tabla 10** se muestran los resultados obtenidos en base seca tanto del frijol gordo seco y crudo, como del frijol gordo fresco y crudo; con el fin de efectuar una comparación en cuanto a estos otros parámetros analizados mediante el uso de la herramienta estadística de “t de student”, tal y como se hizo con el análisis proximal. Como se puede ver el contenido de metionina es significativamente diferente en las distintas fases del frijol, esto nos dice que las proteínas cambian en composición durante la maduración de la semilla, siendo mejor consumir el frijol gordo fresco que el seco, ya que tiene un mayor contenido de éste aminoácido limitante. En cuanto a la digestibilidad *in vitro* se puede observar que ambos valores se consideran estadísticamente iguales, aunque cabe mencionar que para garantizar está semejanza conviene realizar más repeticiones de la determinación, debido a que al ser el tamaño de muestra tan pequeño, la distribución estadística es más amplia y consecuentemente se aceptan resultados con una mayor diferencia entre ellos; aparte de esto ambos resultados muestran una baja

digestibilidad del grano, está puede deberse al alto contenido de fibra, lo cual se corrobora al ver que el valor del frijol fresco (que tiene el doble de fibra que el seco) es menor que el del frijol seco. Con respecto a la densidad energética de cada frijol el análisis estadístico arroja que estos valores son significativamente iguales.

**Tabla 10. Comparación estadística entre el frijol gordo crudo en sus distintas fases.** <sup>a, b</sup>

DETERMINACIONES	Tamaño de la muestra	FRIJOL GORDO SECO	FRIJOL GORDO FRESCO	Distribución "t de student"
Metionina <sup>c</sup>	6	1.60 ± 0.066	1.81 ± 0.077	Significativamente diferentes
Digestibilidad "in vitro" <sup>d</sup>	2	79.40 ± 0.319	76.92 ± 0	Significativamente iguales
Densidad energética <sup>e</sup>	4	21.02 ± 0.476	20.92 ± 0.244	Significativamente iguales

<sup>a</sup> Se muestran los valores promedio ± desviación estándar

<sup>b</sup> Resultados expresados en base seca.

<sup>c</sup> Resultados expresados en g del aminoácido por 100 g de proteína (%)

<sup>d</sup> Resultados expresados en g de proteína digerida por 100 g de proteína total (%)

<sup>e</sup> Resultados expresados en kJ por gramo de muestra.

Los resultados obtenidos en base seca para el frijol seco gordo crudo y cocido se muestran en la **Tabla 11**, y también los datos derivados en base seca para el frijol gordo fresco seco y cocido se muestran en la **Tabla 12**, ordenados de forma en que se pueda efectuar la comparación y ver si hubo algún cambio en cuanto a éstos parámetros durante el tratamiento térmico para cada fase de frijol independiente; de igual manera la distinción se realizó con la prueba estadística "t de student". Como se puede ver el contenido de metionina no varió en ninguno de los dos granos, aun considerando que éste aminoácido es termosensible, y susceptible a la oxidación. La digestibilidad *in vitro* es significativamente diferente, por lo que podemos afirmar que durante la cocción aumentó la digestibilidad de la proteína debido a que con el calentamiento se desnaturalizan las proteínas y por lo tanto están más accesibles a la acción enzimática, además de que fueron destruidos los agentes antinutricionales que interfieren ésta; cabe mencionar que esta vez, con este parámetro no importo el tamaño de muestra tan pequeño debido a que aún siendo



la distribución amplia, la diferencia entre el valor del frijol gordo crudo y el frijol gordo cocido no entro en el intervalo. En cuanto a la determinación de la densidad energética los valores obtenidos son significativamente iguales, tal y como era de esperarse.

**Tabla 11. Comparación estadística entre el frijol gordo seco crudo y cocido.** <sup>a, b</sup>

DETERMINACIONES	Tamaño de la muestra	FRIJOL GORDO CRUDO	FRIJOL GORDO COCIDO	Distribución "t de student"
Metionina <sup>c</sup>	6	1.60 ± 0.066	1.58 ± 0.055	Significativamente iguales
Digestibilidad "in vitro" <sup>d</sup>	2	79.40 ± 0.319	85.82 ± 0.638	Significativamente diferentes
Densidad energética <sup>e</sup>	4	21.02 ± 0.476	21.24 ± 0.304	Significativamente iguales

<sup>a</sup> Se muestran los valores promedio ± desviación estándar

<sup>b</sup> Resultados expresados en base seca.

<sup>c</sup> Resultados expresados en g del aminoácido por 100 g de proteína (%)

<sup>d</sup> Resultados expresados en g de proteína digerida por 100 g de proteína total (%)

<sup>e</sup> Resultados expresados en kJ por gramo de muestra.

**Tabla 12. Comparación estadística entre el frijol gordo fresco crudo y cocido.** <sup>a, b</sup>

DETERMINACIONES	Tamaño de la muestra	FRIJOL GORDO CRUDO	FRIJOL GORDO COCIDO	Distribución "t de student"
Metionina <sup>c</sup>	6	1.81 ± 0.077	1.80 ± 0.090	Significativamente iguales
Digestibilidad "in vitro" <sup>d</sup>	2	76.92 ± 0	86.51 ± 0.160	Significativamente diferentes
Densidad energética <sup>e</sup>	4	20.92 ± 0.244	21.06 ± 0.381	Significativamente iguales

<sup>a</sup> Se muestran los valores promedio ± desviación estándar

<sup>b</sup> Resultados expresados en base seca.

<sup>c</sup> Resultados expresados en g del aminoácido por 100 g de proteína (%)

<sup>d</sup> Resultados expresados en g de proteína digerida por 100 g de proteína total (%)

<sup>e</sup> Resultados expresados en kJ por gramo de muestra.

Es importante hacer hincapié en que el análisis de digestibilidad realizado fue *in vitro* por lo que solo se simularon las condiciones y reacciones fisiológicas que se llevan a cabo dentro del organismo, así que aunque los resultados fueron precisos y reproducibles, pueden ser inexactos (Manríquez J.A. y J.J. Romero. 1993), de manera que se recomienda realizar el ensayo *in vivo* que arroja resultados más confiables, y compararlos con los datos aquí reportados. De igual manera la densidad energética analizada en el presente trabajo considera el contenido energético "grosso" del frijol, lo que significa que el dato proyecta la energía liberada por la combustión completa del

grano, mientras que el cuerpo humano no realiza la oxidación completa; por esta razón se recomienda realizar el ensayo biológico pertinente para conocer la energía real que el frijol aporta al cuerpo después de consumirlo.

## **5.2 Análisis Toxicológico**

Referente a la determinación de los factores tóxicos y antinutricionales naturales que potencialmente pueden estar presentes en el material biológico en estudio, en la **Tabla 13** se presentan los resultados obtenidos para el grano de frijol gordo seco y crudo. Como se puede observar, hay poca diferencia de los valores reportados en base seca o húmeda, lo cual se debe a la baja concentración de agua que presenta la muestra (< 5%). Cabe mencionar que solamente en las determinaciones de fitohemaglutininas y taninos se obtuvo un coeficiente de variación menor al 5%; para la cuantificación de ácido fítico se obtuvo un coeficiente de 6.67% en base húmeda y 6.70% en base seca, esta fluctuación se debió a que en esta técnica hay mucha manipulación de la muestra; en la determinación de inhibidores de tripsina el coeficiente dio un valor de un 7.32% tanto en base húmeda como en base seca; y en la cuantificación de inhibidores de  $\alpha$ -Amilasa el coeficiente proyectó un valor de 6.73% en base húmeda y seca; la variación de estos dos últimos análisis se debieron a que son pruebas enzimáticas en las que el tiempo de reacción es crucial, por lo que una diferencia en segundos nos da resultados muy distantes; en estos tres casos se acepta un coeficiente de variación menor al 10% para así hacer de nuestro valor promedio, un valor confiable.

Respecto a los resultados cuantitativos de los factores tóxicos y antinutricionales analizados, se observa un alto nivel de fitohemaglutininas, inhibidores de tripsina e inhibidores de  $\alpha$ -amilasa, lo cual implica que en ésta fase el material biológico tiene un riesgo toxicológico (agudo, subagudo

y crónico) por lo menos en estos factores tóxicos y antinutricionales detectados. Para el caso del contenido de ácido fítico y taninos, los valores encontrados son discretos.

**Tabla 13. Análisis toxicológico del frijol gordo seco y crudo. <sup>a</sup>**

DETERMINACIONES	Tamaño de la muestra	BASE HUMEDA	BASE SECA
Ácido Fítico <sup>b</sup>	9	1.33 ± 0.089	1.39 ± 0.093
Taninos <sup>b</sup>	6	0.55 ± 0.009	0.58 ± 0.008
Fitoheamaglutininas <sup>c</sup>	7	803.4628 ± 2.122	842.1159 ± 2.224
Inhibidores de tripsina <sup>d</sup>	3	142.7128 ± 10.441	149.5785 ± 10.944
Inhibidores de α-Amilasa <sup>e</sup>	9	1044.10 ± 70.249	1094.33 ± 73.629

<sup>a</sup> Se muestran los valores promedio ± desviación estándar

<sup>b</sup> Resultados expresados en g del componente por 100 g de muestra (%)

<sup>c</sup> Resultados expresados en unidades hemaglutinantes (UHG) por gramo de muestra

<sup>d</sup> Resultados expresados en unidades de tripsina inhibida (UTI) por miligramo de muestra

<sup>e</sup> Resultados expresados en unidades inhibidas de α-amilasa (UIA) por gramo de muestra

En cuanto al grano de frijol inmaduro y crudo, en la **Tabla 14** se exhiben los resultados de la concentración de los factores tóxicos naturales que se contemplaron. El coeficiente de variación fue menor al 5% para las determinaciones de fitohemaglutininas, inhibidores de tripsina e inhibidores de α-Amilasa; para el caso de la cuantificación de ácido fítico se obtuvo una variación del 5.51% en base húmeda y 4.99% en base seca, esta se debió a la misma razón mencionada anteriormente; y en el caso de los taninos, el coeficiente dio de un 6.66% en base húmeda, debido a que el contenido de este factor es muy pequeño después de convertirlo a la base original; aún así estos datos dan una variación menor al 10% por lo que se puede confiar en el valor promedio obtenido.

En el caso de esta fase del frijol gordo si se nota una diferencia en los valores reportados en base húmeda o seca, debido a que este material biológico sí tiene un contenido importante de agua (> 60%). No obstante el grano aun tiene un alto contenido de fitohemaglutininas, inhibidores de tripsina, e inhibidores de α-Amilasa, por lo que su consumo en crudo se puede considerar de

riesgo para la salud. Referente a los otros factores antinutricionales, sus niveles no son de relevancia.

**Tabla 14. Análisis toxicológico del frijol gordo fresco y crudo. <sup>a</sup>**

DETERMINACIONES	Tamaño de la muestra	BASE HUMEDA	BASE SECA
Ácido Fítico <sup>b</sup>	9	0.41 ± 0.023	1.15 ± 0.057
Taninos <sup>b</sup>	9	0.05 ± 0.003	0.15 ± 0.003
Fitoheamaglutininas <sup>c</sup>	8	101.3750 ± 0.053	282.9332 ± 0.147
Inhibidores de tripsina <sup>d</sup>	3	12.2915 ± 0.278	34.3050 ± 0.774
Inhibidores de α-Amilasa <sup>e</sup>	9	301.57 ± 12.548	841.66 ± 35.023

<sup>a</sup> Se muestran los valores promedio ± desviación estándar

<sup>b</sup> Resultados expresados en g del componente por 100 g de muestra (%)

<sup>c</sup> Resultados expresados en unidades hemaglutinantes (UHG) por gramo de muestra

<sup>d</sup> Resultados expresados en unidades de tripsina inhibida (UTI) por miligramo de muestra

<sup>e</sup> Resultados expresados en unidades inhibidas de α-amilasa (UIA) por gramo de muestra

También se realizó la comparación estadística con la distribución “t de student” con el fin de ver si existe diferencia significativa en cuanto al contenido de los factores tóxicos analizados para las distintas fases de maduración en el que se consume este grano.

En la **Tabla 15** se muestran los resultados obtenidos en base seca tanto del frijol gordo seco y crudo, como del frijol gordo fresco y crudo, así como los resultados arrojados tras el análisis estadístico. Como se puede observar todos los factores tóxicos son significativamente diferentes en las distintas fases, y disminuyen en el frijol gordo fresco, siendo menos riesgoso éste último; sin embargo el alto contenido de fitohemaglutininas, inhibidores de tripsina e inhibidores de α-Amilasa es alto para los dos granos, por lo que ninguno de los dos debe consumirse en crudo.

**Tabla 15. Comparación estadística entre el frijol gordo crudo en sus distintas fases.** <sup>a, b</sup>

DETERMINACIONES	Tamaño de la muestra	FRIJOL GORDO SECO	FRIJOL GORDO FRESCO	Distribución “t de student”
Ácido Fítico <sup>c</sup>	9	1.39 ± 0.093	1.15 ± 0.057	Significativamente diferentes
Taninos <sup>c</sup>	6/9	0.58 ± 0.008	0.15 ± 0.003	Significativamente diferentes
Fitoheماغلوتينinas <sup>d</sup>	7/8	842.1159 ± 2.224	282.9332 ± 0.147	Significativamente diferentes
Inhibidores de tripsina <sup>e</sup>	3	149.5785 ± 10.944	34.3050 ± 0.774	Significativamente diferentes
Inhibidores de α-Amilasa <sup>f</sup>	9	1094.33 ± 73.629	841.66 ± 35.023	Significativamente diferentes

<sup>a</sup> Se muestran los valores promedio ± desviación estándar

<sup>b</sup> Resultados expresados en base seca.

<sup>c</sup> Resultados expresados en g del componente por 100 g de muestra (%)

<sup>d</sup> Resultados expresados en unidades hemaglutinantes (UHG) por gramo de muestra

<sup>e</sup> Resultados expresados en unidades de tripsina inhibida (UTI) por miligramo de muestra

<sup>f</sup> Resultados expresados en unidades inhibidas de α-amilasa (UIA) por gramo de muestra

En la **Tabla 16** se muestran los resultados obtenidos para el grano de frijol gordo seco y cocido. Hay una gran diferencia entre la base seca y la base húmeda, ya que esta última considera al platillo tal y como se consume; con una humedad del 75.37%. Aquí en todas las determinaciones se obtuvo un coeficiente de variación menor al 5%, por lo que el valor promedio es un valor confiable.

**Tabla 16. Análisis toxicológico del frijol gordo seco y cocido.** <sup>a</sup>

DETERMINACIONES	Tamaño de la muestra	BASE HUMEDA	BASE SECA
Ácido Fítico <sup>b</sup>	9	0.28 ± 0.011	1.13 ± 0.045
Taninos <sup>b</sup>	9	0.09 ± 0	0.36 ± 5x10 <sup>-3</sup>
Fitoheماغلوتينinas <sup>c</sup>	9	1.0730x10 <sup>-4</sup> ± 5.3x10 <sup>-7</sup>	4.3565x10 <sup>-4</sup> ± 2.17x10 <sup>-6</sup>
Inhibidores de tripsina <sup>d</sup>	3	0.5931 ± 0.028	2.4079 ± 0.115
Inhibidores de α-Amilasa <sup>e</sup>	9	291.12 ± 4.873	1181.97 ± 19.783

<sup>a</sup> Se muestran los valores promedio ± desviación estándar

<sup>b</sup> Resultados expresados en g del componente por 100 g de muestra (%)

<sup>c</sup> Resultados expresados en unidades hemaglutinantes (UHG) por gramo de muestra

<sup>d</sup> Resultados expresados en unidades de tripsina inhibida (UTI) por miligramo de muestra

<sup>e</sup> Resultados expresados en unidades inhibidas de α-amilasa (UIA) por gramo de muestra

Al igual que todo lo anterior, se realizó la comparación estadística con la distribución “t de student” para ver si hay una diferencia significativa en cuanto al contenido de los factores tóxicos y antinutricionales analizados después del tratamiento térmico.

En la **Tabla 17** se muestran los resultados obtenidos en base seca del frijol gordo seco crudo y cocido; y los resultados del análisis estadístico. Tras el tratamiento térmico todos los factores tóxicos y antinutricionales cambiaron significativamente. Se observa que las fitohemaglutininas disminuyeron drásticamente y el valor podría considerarse nulo para el grano cocido. En cuanto al contenido de inhibidores de tripsina el valor también se redujo considerablemente. Los inhibidores de  $\alpha$ -amilasa se conservaron altos, siendo éste un motivo para considerar al frijol como inseguro; más sin embargo el riesgo no es tan grande, ya que los inhibidores de  $\alpha$ -Amilasa son solo un factor antinutricional que impide la digestión del almidón, pero no interfieren en el aprovechamiento de otros nutrientes. Para el caso del contenido de ácido fítico y taninos, estos siguen siendo discretos.

**Tabla 17. Comparación estadística entre el frijol gordo seco crudo y cocido.** <sup>a, b</sup>

DETERMINACIONES	Tamaño de la muestra	FRIJOL GORDO CRUDO	FRIJOL GORDO COCIDO	Distribución "t de student"
Ácido Fítico <sup>c</sup>	9	1.39 ± 0.093	1.13 ± 0.045	Significativamente diferentes
Taninos <sup>c</sup>	6/9	0.58 ± 0.008	0.36 ± 0.005	Significativamente diferentes
Fitoheamaglutininas <sup>d</sup>	7/9	842.1159 ± 2.224	4.3565x10 <sup>-4</sup> ± 2.17x10 <sup>-6</sup>	Significativamente diferentes
Inhibidores de tripsina <sup>e</sup>	3	149.5785 ± 10.944	2.4079 ± 0.115	Significativamente diferentes
Inhibidores de $\alpha$ -Amilasa <sup>f</sup>	9	1094.33 ± 73.629	1181.97 ± 19.783	Significativamente diferentes

<sup>a</sup> Se muestran los valores promedio ± desviación estándar

<sup>b</sup> Resultados expresados en base seca.

<sup>c</sup> Resultados expresados en g del componente por 100 g de muestra (%)

<sup>d</sup> Resultados expresados en unidades hemaglutinantes (UHG) por gramo de muestra

<sup>e</sup> Resultados expresados en unidades de tripsina inhibida (UTI) por miligramo de muestra

<sup>f</sup> Resultados expresados en unidades inhibidas de  $\alpha$ -amilasa (UIA) por gramo de muestra

Ahora se muestran los resultados obtenidos para el frijol gordo fresco y cocido en la **Tabla 18**. También existe una gran diferencia entre la base seca y la base húmeda, ya que esta última considera al frijol tal y como se consume; con una humedad del 82.26%. Asimismo se obtuvo un coeficiente de variación menor al 5% en todas las determinaciones, teniendo por ende un valor promedio confiable.

**Tabla 18. Análisis toxicológico del frijol gordo fresco y cocido.** <sup>a</sup>

DETERMINACIONES	Tamaño de la muestra	BASE HUMEDA	BASE SECA
Ácido Fítico <sup>b</sup>	9	0.18 ± 0.008	1.01 ± 0.038
Taninos <sup>b</sup>	9	0.02 ± 0	0.11 ± 0.005
Fitoheamaglutininas <sup>c</sup>	9	2.0838x10 <sup>-3</sup> ± 7.714x10 <sup>-6</sup>	0.01175 ± 4.3588x10 <sup>-5</sup>
Inhibidores de tripsina <sup>d</sup>	3	0.4267 ± 0.005	2.4056 ± 0.029
Inhibidores de α-Amilasa <sup>e</sup>	9	126.62 ± 5.505	713.74 ± 31.026

<sup>a</sup> Se muestran los valores promedio ± desviación estándar

<sup>b</sup> Resultados expresados en g del componente por 100 g de muestra (%)

<sup>c</sup> Resultados expresados en unidades hemaglutinantes (UHG) por gramo de muestra

<sup>d</sup> Resultados expresados en unidades de tripsina inhibida (UTI) por miligramo de muestra

<sup>e</sup> Resultados expresados en unidades inhibidas de α-amilasa (UIA) por gramo de muestra

A continuación en la **Tabla 19** se muestran los resultados obtenidos en base seca tanto del frijol gordo fresco y crudo, como del frijol gordo fresco y cocido; con el propósito de saber si hubo un cambio en el contenido de factores tóxicos del grano en ésta fase de maduración, después del tratamiento térmico. Al igual que en los análisis anteriores se utilizaron los resultados expresados en base seca con el fin de hacer una comparación válida.

La comparación se realizó utilizando la misma herramienta estadística; la distribución “t de student”, y los resultados que arrojó también se muestran en la **Tabla 19**. Igualmente tras el tratamiento térmico todos los factores tóxicos y antinutricionales cambiaron significativamente. Las fitohemaglutininas disminuyeron radicalmente y el valor podría considerarse nulo para el grano cocido. El contenido de inhibidores de tripsina también se redujo de manera que el dato reportado ya es menor al valor admisible de muestra de acuerdo con la técnica de Kakade et al (10 UTI/mg). Los inhibidores de α-amilasa se conservaron altos, por lo que son bastante termoestables y son un motivo para considerar al frijol como inseguro; sin embargo el riesgo no es tan grande, ya que estas sustancias actúan de forma no competitiva. Asimismo el contenido de ácido fítico y taninos aunque disminuyó, es irrelevante.

**Tabla 19. Comparación estadística entre el frijol gordo fresco crudo y cocido.** <sup>a, b</sup>

DETERMINACIONES	Tamaño de la muestra	FRIJOL GORDO CRUDO	FRIJOL GORDO COCIDO	Distribución "t de student"
Ácido Fítico <sup>c</sup>	9	1.15 ± 0.057	1.01 ± 0.038	Significativamente diferentes
Taninos <sup>c</sup>	9/9	0.15 ± 0.003	0.11 ± 0.005	Significativamente diferentes
Fitoheماغلوتينinas <sup>d</sup>	8/9	282.9332 ± 0.147	0.01175 ± 4.3588x10 <sup>-5</sup>	Significativamente diferentes
Inhibidores de tripsina <sup>e</sup>	3	34.3050 ± 0.774	2.4056 ± 0.029	Significativamente diferentes
Inhibidores de α-Amilasa <sup>f</sup>	9	841.66 ± 35.023	713.74 ± 31.026	Significativamente diferentes

<sup>a</sup> Se muestran los valores promedio ± desviación estándar

<sup>b</sup> Resultados expresados en base seca.

<sup>c</sup> Resultados expresados en g del componente por 100 g de muestra (%)

<sup>d</sup> Resultados expresados en unidades hemaglutinantes (UHG) por gramo de muestra

<sup>e</sup> Resultados expresados en unidades de tripsina inhibida (UTI) por miligramo de muestra

<sup>f</sup> Resultados expresados en unidades inhibidas de α-amilasa (UIA) por gramo de muestra

Con esto se puede afirmar, de que el tratamiento térmico realizado tanto al frijol gordo seco, como al frijol gordo fresco; es adecuado para que al consumirlos no se presente riesgo alguno.

Es importante buscar si existe algún tratamiento tecnológico para disminuir el contenido de inhibidores de α-Amilasa, aunque puede considerarse ventajosa la presencia de éstos, ya que es posible recomendar el consumo del frijol gordo a pacientes con diabetes y obesidad.



## 6. CONCLUSIONES

Se aportó información de la composición química del frijol *Phaseolus polyanthus*, que hasta el momento no existían referencias al respecto.

Todos los resultados promedio obtenidos son confiables porque la mayoría tienen un coeficiente de variación menor al 5%. Además esta comparación se realizó con los componentes en base seca.

En cuanto al análisis proximal:

- El frijol gordo seco y el frijol gordo fresco son significativamente iguales con respecto al contenido de ceniza y proteína, en cambio el contenido de grasa y fibra cruda sí varía en las distintas fases de maduración y de hecho estos valores se duplican en el frijol gordo fresco.
- Tanto para el frijol gordo seco, como para el fresco, no hubo variación alguna en el contenido de grasa, fibra cruda, y proteína durante el proceso de cocción, sin embargo el contenido de cenizas fue estadísticamente diferente aumentando después del tratamiento térmico, cabe mencionar que esta diferencia no es relevante.
- La composición en base seca del frijol gordo en general tiene como componente mayoritario a los hidratos de carbono digeribles, seguido por la proteína, la fibra cruda, las cenizas y finalmente la grasa.

Con respecto a los otros parámetros bromatológicos determinados:

- El contenido de metionina es significativamente diferente en las distintas fases del frijol, habiendo un mayor contenido de este aminoácido limitante en el frijol gordo fresco. Después de la cocción el contenido de metionina no varió en ninguno de los dos granos.
- Los dos granos crudos tienen una baja digestibilidad proteínica *in vitro* significativamente igual, la cual incrementa tras la cocción debido a que con el calentamiento la proteína se hizo más accesible a la acción enzimática, y a que se destruyeron los agentes antinutricionales que interfieren en ésta.

- El contenido energético también se considera igual tanto para el frijol gordo seco como para el fresco, y éste tampoco varió significativamente con el tratamiento térmico.

Referente a la determinación de los factores tóxicos y antinutricionales naturales:

- Todos ellos son significativamente diferentes en las distintas fases, y disminuyen en el frijol gordo fresco, siendo menos riesgoso éste último.
- El contenido de fitohemaglutininas, inhibidores de tripsina e inhibidores de  $\alpha$ -Amilasa es alto para los dos granos, por lo que ninguno de los dos debe consumirse en crudo, ya que tienen un alto riesgo toxicológico (agudo, subagudo, y crónico). Tras el tratamiento térmico éstos factores cambiaron significativamente: las fitohemaglutininas disminuyeron radicalmente, pudiéndose considerar el valor como nulo; el contenido de inhibidores de tripsina también se redujo a un valor que no presenta riesgo; y los inhibidores de  $\alpha$ -Amilasa se conservaron altos ya que son termoestables, y son un motivo para considerar al frijol como inseguro, sin embargo el riesgo no es tan grande, ya que son sustancias que no actúan de forma competitiva.
- Para el caso del contenido de ácido fítico y taninos, los valores encontrados son discretos, y el hecho de que hayan disminuido tras la cocción es irrelevante.

El tratamiento térmico realizado es adecuado para el consumo de ambos frijoles (seco y fresco), y solo habría que tener en cuenta el riesgo por el alto contenido de inhibidores de  $\alpha$ -Amilasa.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- ☉ Arteaga M. Inhibidores nutricionales en leguminosas comestibles. Tesis profesional. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. pág 90. 1976.
- ☉ Basurto Peña Francisco Alberto. Aspectos etnobotánicos de *Phaseolus coccineus L y Phaseolus polyanthus Greenman* en la sierra norte de Puebla, México. Tesis maestría. UNAM. México, D.F., pág 1, 3, 5, 14-15. 2000.
- ☉ Bowman B. A. y Russell R. M. Conocimientos actuales sobre nutrición. OPS e Instituto Internacional de Ciencias de la vida (Publicación científica y técnica No. 592) Octava edición, Washington D. C. pág. 7-11. 2003.
- ☉ Buscador: google. Consultado el 25 de Agosto del 2008. Responsable de la página: SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera).  
[siap.gob.mx/sispro/IndModelos/SP\\_AG/Frijol/Descripcion.pdf](http://siap.gob.mx/sispro/IndModelos/SP_AG/Frijol/Descripcion.pdf);  
[www.siap.sagarpa.gob.mx/modelos/Cadenas/frijol/demanda.pdf](http://www.siap.sagarpa.gob.mx/modelos/Cadenas/frijol/demanda.pdf).
- ☉ Buscador: google. Consultado el 25 de Agosto del 2008. Responsable de la página: SDR (Secretaría de Desarrollo Rural).  
[www.sdr.gob.mx/beta1/contenidos/CadenasAgropecuarias/docs/360148.235.138.1326-07-2007MONOGRAFIA%20FRIJOL.pdf](http://www.sdr.gob.mx/beta1/contenidos/CadenasAgropecuarias/docs/360148.235.138.1326-07-2007MONOGRAFIA%20FRIJOL.pdf)
- ☉ Charley Helen. Tecnología de alimentos; Procesos químicos y físicos en la preparación de alimentos. Editorial Limusa S. A. de C. V. Grupo noriega editores. México D. F. pág 623-631. 2004.
- ☉ Delgado, A. Systematics of the genus *Phaseolus (Leguminosae)* in North and Central America. Dissertation Doctor of Philosophy. The University of Texas at Austin. pp 363. 1985.

- Derache. R Toxicología y seguridad de los alimentos. Ediciones Omega, S. A. Barcelona. pág 109-121. 1990.
- Engleman, M. Contribuciones al conocimiento del frijol (*Phaseolus*) en México. Introducción general. C. P. Chapingo, Texcoco Estado de México. pág 15-22. 1979.
- Fennema Owen. Química de los Alimentos. Segunda edición, editorial ACRIBIA, S. A. Zaragoza. pág. 1121-1136. 2006.
- Fisher, P. B. Valor nutritivo de los alimentos. Primera edición, Limusa. México D. F. pág 138-139. 2000.
- Frühbeck G., Alonso R., Marzo F., Santidrián S. Modified method for the indirect quantitative analysis of phytate in foodstuffs. Anal. Biochem. Navarra, Pamplona. 225: 206-212. 1995.
- García Figueroa D. Y. Desarrollo de una metodología cuantitativa en la determinación de lectinas en frijoles y su correlación con su toxicidad subaguda. Tesis licenciatura, facultad de Química, UNAM, Mexico D.F. 1998.
- Helrich, K. (Editor). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15° edition, published by AOAC, Inc. Vol. I. Washington D. C. pág 17-18, 40-62 y 69-83. Vol. II, pp 1012. 1990.
- Hernández I. y Sotelo A. Calidad nutritiva del ayacote (*Phaseolus coccineus*) suplementado con metionina en diferentes etapas de la cocción. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 30(1): 99-116. 1980.
- Hernández J. E. y León J. Cultivos marginados; Otra perspectiva de 1492. Publicación de la FAO; producción de protección vegetal No. 26. Roma. pág. 56-62. 1992.

- ☉ Hernandez X., E., Ramos, E. A. y Martínez M. A. Contribuciones al conocimiento del frijol en México. Engleman, E. M. (editor); Chapingo, Colegio de Postgraduados, Texcoco, Estado de México. pág. 113-138. 1979.
- ☉ Hernandez X., E., S. Miranda y C. Prywer. El origen de *Phaseolus coccineus L. darwinianus* Hdz. X. & Miranda C. , subespecies nova. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural 20: 99-121. 1959.
- ☉ Horn Millard J., Jones D. Breese and Blum Amos E. Colorimetric determination of methionine in proteins and foods. J. Biol. Chem. 166: 313-320. 1946.
- ☉ Horwitz, W. and Latimer, E. Official Methods of Analysis of AOAC International. 48th, edición 2005. Published by AOAC international, Gaithersburg. 2006.
- ☉ ISO 9648-1988. Determination of tannin content in sorghum. 1° edición, pp 12-15. 1988.
- ☉ Kakade, M. L. Hoffa, D. E. and Liener, I.E. Contribution of trypsin inhibitors to the deterioro effects of unheated soybeans fed to rate. J. Nutr, 103: 1772-1778. 1973.
- ☉ Kakade, M. L. Rackis, J. J., Maghee, J. E. and Paski, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. Cereal Chem. 51: 376-382. 1974.
- ☉ Kakade, M. L. Simons, N. and Liener, I. E. An evaluation of natural vs synthetic substrates for measuring he antitryptic activity of soybean sample. Cereal Chem. 46: 518-526. 1969.
- ☉ Kataria A. Chauan B. and Punia D. Digestibility of proteins and starch (in vitro) of amphidiploids (black gram X mung bean) as affected by domestic processing and cooking. Plant Food Hum Nut. 42: 117-125. 1992.
- ☉ Liener, I. Plant Lectins: properties, nutritional significance, and function. In: Antinutrients and phytochemicals in food. Shahidi, F. (Ed.), American Chemical Society. Washington, D.C. pp. 31-43, 1997.

- Lucas B. and Sotelo A. A useful modification of the hemagglutination method of lectin in legume seed. EAPP publication, Wageningen. 70: 71-74. 1993.
- Manríquez J.A. & Romero J.J. Determinación de la digestibilidad del alimento utilizado en la salmonicultura. Una herramienta para su certificación ambiental. Seminario Internacional de Acuicultura y Medio Ambiente. Santiago, 2-3 septiembre. pág. 189. 1993.
- Miller, D.S. Payne, P.R., A Ballistic bomb calorimeter. Br. J. Nutr. 13: 51. 1959.
- Norman N. Potter, Ph. D. La ciencia de los alimentos. EDUTEX, S. A. México, D. F. pág 41. 1973.
- Orúe, E., Butrón, J., Ibañez, R., Alonso, R. and Marzo. F. The effect of germination and extrusion on the nutritional quality of peas (*Pisum sativum* L. cv. Ballet). In: Recent advances of research in antinutritional factors in legume seed and rapeseed. EAAP Publication, Wageningen. 93: 417-420. 1998.
- Paredes López O., Guevara Lara F. y Bello Pérez L. A. Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas. Colección: La ciencia/212 para todos. Fondo de cultura económica. México D. F. pág. 59-81. 2006.
- Pearson, D. The Chemical Analysis of Foods. 7° edition, Churchill Livingstone, New York. pp 13-15. 1976.
- Piergiovanni, A. R. Effects of some experimental parameters on the Activity of cowpea  $\alpha$ -amylase e inhibitors. Lebensm wiss Technol. 25: 321-329. 1992.
- Piergiovanni, A. R.  $\alpha$ -Amylase inhibitors in cowpea (*Vigna unguiculata*): Effects of soaking and cooking methods. Food Chem. 51: 79-81. 1974.
- Pinero D. and Eguiarte C. The origin and biosystematic status of *Phaseolus coccineus* spp. *polyanthus*: electrophoretic evidence. Euphytica 37(3): 199-203. 1988.

- ☉ Robinson David. S. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza. pág 162-171. 1991.
- ☉ Schoonhoven A. and Voysest O. (eds.). Common beans: Research for crop improvement. C·A·B·International in association with CIAT (Centro internacional de agricultura tropical). Commonwealth Agricultural Bureaux International, Wallingford, RU pp. 34, 56-74. 1991.
- ☉ Sharma A. and Seghal S. Effect of domestic processing, cooking and germination on trypsin inhibitor activity and tannin content of faba bean (*Vicia faba*). Plant Foods Hum Nut. 42: 127-133. 1992.
- ☉ Smartt J. Grain Legumes: Evolution and genetic resources. Cambridge university press. New York. pp 86-91. 1990.
- ☉ Sotelo, A. and Lucas, B. Variation in antinutritional factors at different development stages in seed of *Phaseolus vulgaris* and *Erythrina Americana*. In: Recent advances of research in antinutritional factors in legume seed and rapeseed. EAAP Publication, Wageningen. 93: 409-412. 1998.
- ☉ Thompson L. Rea R. and Jenkins D. Effect of heat processing on hemagglutinin activity in red kidney beans. J. Sci. Food Agric. 43: 215-228. 1983.
- ☉ Van der Poel, A., Block, J. Van Zuilichen, D. van Oort, M. Thermal inactivation of lectin and trypsin inhibitors activity during stem processing of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) and effects on protein quality. J. Sci. Food Agric. 53: 215-228. 1990.
- ☉ Varner, J. E. Chandra, M. J. Chrispeels, M. J. Gilberellic acid-controlled synthesis of  $\alpha$ -amylase in barley aleurone layers. J. Cell Comp. Physiol. 66: 55-68. 1967.
- ☉ Winton, A.L. y Winton, K.B. Análisis de alimentos. Continental, S.A. México, D.F. pág 64-81. 1957.

8. ANEXOS

8.1 Anexo 1. Municipio de Cuetzalán, Puebla.







Catedral de San Francisco





8.2 Anexo 2. Mercado del domingo



Venta de Frijol fresco en el municipio de Cuetzalán, Puebla.









### 8.3 Anexo 3. Frijol gordo

Frijol gordo fresco



Frijol gordo seco

