



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“PROCESO ÓPTIMO DE COCCIÓN DE UNA
VARIEDAD DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*) DE
AMPLIO CONSUMO CON UN ALTO CONTENIDO
DE LECTINAS”**

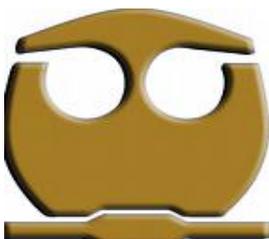
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

CARLOS ENRIQUE FLORES LANDERO



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Bernardo Lucas Florentino

VOCAL: Profesor: Lucia Cornejo Barrera

SECRETARIO: Profesor: Luz Sandra Sánchez del Ángel

1er. SUPLENTE: Profesor: Karla Mercedes Díaz Gutiérrez

2° SUPLENTE: Profesor: Armando Conca Torres

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**Laboratorio 111, Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de
Química, UNAM**

ASESOR DEL TEMA

M en C Bernardo Lucas Florentino

SUPERVISOR TÉCNICO

M En C Rosa María Argote Espinoza

SUSTENTANTE

Carlos Enrique Flores Landero

DEDICO ESTA TESIS:

A ti, la persona por la cual he logrado llegar hasta donde estoy, siendo que quizás ni te lo imaginas.

Y a mis Padres que por sobre todas las cosas siempre tuve su apoyo, comprensión y cariño.

AGRADECIMIENTOS.

"A la Universidad,

...porque me brindó una oportunidad.

"A mis maestros,

...por haber contribuido en mi formación académica y personal.

"A mi familia,

...que me apoyaron siempre.

"Al M en C Bernardo Lucas Florentino,

...por su dedicación y entrega.

"A la QFB Leticia Gil Vieyra,

...por su apoyo desde el principio.

"A la maestra Rosa María Argote,

...por su valiosa ayuda y su Amistad.

"A las profesoras Lucia Cornejo y Luz Sandra Sánchez,

...por su colaboración y tiempo que dedicaron a este trabajo.

"Al Laboratorio 111,

...que fue el mejor de los laboratorios durante toda la carrera.

"A mis amigos, compañeros de trabajo...

...que siempre los tendré presentes."

Y la verdad, cada frase esconde lo siguiente:

"A la Universidad,

Ya que fue como mi segunda casa, ¡no es cierto! de hecho fue mi primera porque pasaba más tiempo ahí que en mi propia casa

...porque me brindó una oportunidad.

"A mis maestros,

Porque son quienes van dejando huella en tu formación académica y personal, así que pienso que uno aprende más de un maestro rudo y exigente, y que sepa hacer su bien su trabajo. En especial quiero agradecer al maestro Jesús Gumaro que me apoyo mucho durante los últimos años, gracias.

...por haber contribuido en mi formación académica y personal

"A mi familia,

Que a pesar de todo me brindaron cariño, apoyo y comprensión

...que me apoyaron siempre.

"Al M en C Bernardo Lucas Florentino,

Que es mejor persona de la que muchos piensan, ya que te brinda confianza y apoyo siempre que lo necesites porque se nota el entusiasmo que le pone a todo lo que realiza

...por su dedicación y entrega.

"A la QFB Leticia Gil Vieyra,

Porque aprendí mucho de ella, es muy entregada a lo que hace y con su ayuda fue más fácil la realización de este trabajo. Pero sobre todo por su amistad y confianza, se le extraña en el Laboratorio 111.

...por su apoyo desde el principio.

“A la maestra Rosa María Argote,

Le agradezco por brindarme su apoyo incondicional y su amistad, pero sobre todo por el tiempo que se tomó en ayudarme a la realización de mi tesis, nunca olvidare todo lo que me ayudo ni tampoco olvidare que era la alegría del laboratorio 111.

...por su valiosa ayuda y su Amistad.

“Al Laboratorio 111,

Que puedo decir, estuve desde que hice mi servicio, fueron más de tres años, por lo mismo conocí a muchos compañeros de los cuales nunca me olvidare, en especial de Rubén, Gretel y Lorena, con quienes tuve las mejores platicas, apoyo, amistad; llegando después Haide, Brenda, Poucel, Mónica, Rangel y Rich, y sin olvidar a Toño, Argelia y Olga.

...que fue el mejor de los laboratorios durante toda la carrera.

"A mis amigos, compañeros de trabajo..."

Ya que pase muchos momentos alegres, agradables, difíciles y siempre estuvieron ahí, Gracias por ser mis amigos: Mónica Barrios, Mike, Miguel Rangel y Ricardo; y a lo largo de la carrera conocí a personas en las que puedo confiar mucho como Esteban, Toño Soto, Luis A., Cynthia Puga, Gustavo, Claudia, Blanquita, Alex, Jose, Alma, Ruth y claro sin olvidar las personas con las que pase algunos momentos que recordare siempre.

...que siempre los tendré presentes.”

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN -----	4 -
2. OBJETIVOS-----	6
2.1 Objetivo general -----	6
2.2 Objetivos específicos-----	6
3. ANTECEDENTES -----	7
3.1 Los alimentos como fuentes de proteínas -----	7
3.2 Leguminosas -----	8
3.3 (<i>Phaseolus ssp</i>)-----	9
3.3.1 Frijol Común-----	9
3.4 Valoración de la Calidad de las Proteínas -----	16
3.4.1 Valor Biológico (VB).-----	16
3.4.2 Balance de Nitrógeno.-----	17
3.4.3 Utilización de Proteína Neta (NPU) -----	17
3.4.4 Crecimiento.-----	18
3.4.5 Relación de Eficiencia Proteínica (REP)-----	18
3.4.6 Relación de Proteína Neta (NPR) -----	18
3.4.7 Métodos químicos. -----	19
3.5 Factores tóxicos y antinutricionales -----	19
3.5.1 Inhibidores de Proteasa-----	19
3.5.2 Oligosacáridos-----	20
3.5.3 Hemaglutininas-----	20

3.6 Cocimiento	23
3.7 Metionina	25
4. METODOLOGIA	27
4.1 Origen y obtención de la muestra	28
4.2 Preparación y Selección del material	28
4.3 Descripción de la metodología	29
4.3.1 Determinación semicuantitativa de hemaglutininas	29
4.3.2 Determinación cuantitativa de hemaglutininas	32
4.3.3 Procesamiento con calor	37
4.3.4 Determinación de Humedad	38
4.3.5 Determinación de cenizas	40
4.3.6 Determinación de grasa	41
4.3.7 Determinación de fibra cruda	43
4.3.8 Determinación de proteína	46
4.3.9 Determinación de triptofano por hidrólisis alcalina	48
4.3.10 Determinación de metionina	52
4.3.11 Inhibidores de tripsina	55
4.3.12 Determinación del proceso óptimo de cocción	59
4.3.13 Determinación de la Relación de Eficiencia Proteínica (REP)	59
4.3.14 Determinación de la Densidad Energética de Alimentos	66
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
5.1 Contenido de lectinas en variedades de frijol comercial	69
5.2 Selección de la muestra	70

5.3 Evaluación de Factores Tóxicos, Antinutricionales y Calidad Nutritiva de los Procesamientos Térmicos -----	70
5.4 Selección del procesamiento óptimo -----	73
5.5 Selección del proceso óptimo de cocción por medio de un ensayo biológico -	75
5.5.1 Determinación de la relación de eficiencia proteínica (REP) -----	77
6. CONCLUSIONES-----	85
7. BIBLIOGRAFÍA-----	87
8. ANEXOS -----	92

1. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es la especie cultivada y más importante para los americanos junto con el maíz, ya que desde un inicio el agricultor los sembró juntos, pues el tallo del maíz sirve de sostén a la frágil enredadera que es el frijol y éste fertiliza con nitrógeno el suelo en el que crece el maíz. Es una fuente de proteínas, de algunas vitaminas como la tiamina, la riboflavina, niacina, vitamina B₆ y ácido fólico y de algunos minerales como calcio y magnesio.(1,6)

Las Lectinas o hemaglutininas son proteínas y más específicamente glicoproteínas que se distribuyen en forma amplia en el reino vegetal y que presentan una elevada especificidad de enlace hacia moléculas que contengan hidratos de carbono. Cuando estos hidratos de carbono están formando parte de las paredes celulares, las lectinas causan la aglutinación de las células libres que los contienen. Si las lectinas se unen a los hidratos de carbono de las células epiteliales intestinales determinan una disminución de la absorción de nutrientes del tracto digestivo.(2)

Aunque la mayor parte de las poblaciones que consumen leguminosas han aprendido de manera empírica que su consumo requiere de un tratamiento térmico (independientemente de la forma en que se consuma; además que con éste, disminuyen los factores tóxicos y en particular las lectinas), hay reportes alrededor del mundo de casos en el que los frijoles son ingeridos parcialmente cocidos en ensaladas (la mayor parte en países Europeos) por ignorancia en su consumo o en poblaciones con escasos recursos debido a que la cocción no es la adecuada por falta de combustibles con los cuales propiciar el calentamiento o por el mal estado de los utensilios que se requieren (cacerolas, estufas, etc) o por el contrario, si el

calentamiento es demasiado prolongado se puede dañar la calidad nutritiva de la proteína y en especial la de algunos aminoácidos como la lisina y la metionina.(24)

En la presente investigación se trabajó con dos variedades comerciales de frijol común¹ (*Phaseolus vulgaris*), las cuales de acuerdo a estudios previos contenían la mayor cantidad de lectinas, lo cual se corroboró haciendo uso de la técnica semicuantitativa y cuantitativa que aprovecha la capacidad hemaglutinante de este tipo de enterotoxinas y que hace uso de un sistema de microtitulación seriada (9). Así se seleccionó la muestra cuyo valor de enterotoxina fue el más alto y que además se tuviera en una cantidad suficiente para concluir el trabajo con un ensayo biológico.

Posteriormente utilizando el procesamiento térmico en autoclave (121 °C, 1.5 kg/cm²) a diferentes tiempos, y cuantificando el contenido de lectinas, se logró observar la inactivación de éstas, a la vez que hubo pérdida de manera gradual de la calidad nutrimental, como medida del contenido de metionina principalmente² en parte porque es el aminoácido esencial limitante en las leguminosas (14). Por lo mencionado anteriormente se pudo seleccionar el óptimo procesamiento térmico, el cual mantenga la mejor calidad nutritiva de la muestra y reduciendo al mínimo el principal factor tóxico que son las lectinas.

Así mismo se llevó a cabo un ensayo biológico, lográndose observar que efectivamente el óptimo procesamiento térmico fue el que se sometió a menor tiempo de cocción. Con dicho estudio biológico también se pudo observar que hay pérdida de la calidad nutritiva por exceso de cocción, ya que al comparar la dieta sometida a mayor tiempo de cocción con y sin suplementación de metionina, se mejoró sustancialmente la calidad nutritiva del frijol cocido.

¹ Se usaron dos marcas comerciales diferentes para cada variedad

² Ya que los valores obtenidos de Triptofano no fueron muy representativos en la pérdida de la calidad proteínica

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar el proceso óptimo de cocción sobre la calidad nutritiva de una variedad de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) de amplio consumo con un elevado contenido de lectinas, utilizando parámetros analíticos y corroborando con la evaluación biológica respectiva.

2.2 Objetivos específicos

- * Obtener las muestras representativas del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) de amplio consumo con elevado contenido de lectinas.
- * Seleccionar la muestra de frijol determinando el contenido de hemaglutininas de manera semi cuantitativa y cuantitativa, y además determinar el contenido de inhibidores de proteasas sobre la misma.
- * Llevar a cabo el proceso de cocimiento con calor húmedo de la muestra seleccionada, controlando la relación semilla:agua, temperatura y variando el tiempo de cocción.
- * Realizar el seguimiento del procesamiento por medio de la determinación del contenido de tóxicos termolábiles (efecto tóxico) y del nivel de los aminoácidos indispensables (efecto por sobreprocesamiento) con la finalidad de encontrar el óptimo procesamiento de cocción.
- * Acondicionar el material biológico procesado para realizar la determinación del análisis proximal, con la finalidad de poder realizar el ensayo biológico para evaluar la calidad nutritiva de la proteína de acuerdo al valor de REP que se obtenga.
- * Realizar el ensayo biológico con la finalidad de corroborar el proceso óptimo de cocción de la variedad de frijol común seleccionada.

3. ANTECEDENTES

3.1 Los alimentos como fuentes de proteínas

Las proteínas son unos de los componentes de los alimentos, las cuales al digerirse dan lugar a los aminoácidos y una vez absorbidos vuelven a conformar proteínas que cumplen funciones como: catálisis enzimática, transporte y almacenamiento, movimiento, soporte mecánico, protección inmune, control del desarrollo y la diferenciación, entre otras. (1)

A pesar de que los cereales se consideren como una fuente de proteínas no tan buena (ya que cada 100 g contiene por lo general 7-8 g de proteínas) y que la carne o las leguminosas sean consideradas como buenas fuentes de proteínas, pues cada 100 g contiene cerca de 20 g de proteínas, para la gran mayoría de las personas la fuente principal de proteínas (entre 70-80 %) son los cereales, mientras que la carne y leguminosas pasan a ser fuentes secundarias de proteínas, aunque esto va a depender de las cantidades que se consumen de cada una de ellas. En la tabla 1 se puede ilustrar lo anterior ya que se presenta la contribución de diferentes alimentos al aporte promedio de energía y proteínas de la dieta en México. (1)

Tabla 1. Contribución promedio del aporte energético y proteínico de nueve de los principales productos alimenticios consumidos por día en México

PRODUCTO	ENERGIA(KCAL)		PROTEÍNAS(g)	
Tortilla	1363	59%	29.0	39%
Pan y pastas	512	21%	16.0	21%
Frijol	111	5%	6.4	8.5%
Arroz	43	2%	0.9	1.5%
Subtotal	2029	87%	52.3	70%
Leche	154	6.7%	9.3	12.5%
Huevo	49	2.1%	3.7	5.0%
Carne de res	53	2.3%	4.9	6.5
Carne de puerco	34	1.5%	3.2	4.0%
Carne de pollo	10	0.4%	1.2	2.0%
Subtotal	300	13%	22.3	30%
Total	2329	100%	74.6	100%

Fuente: (1)

Sin embargo cuando se consumen en la comida diferentes mezclas de alimentos por lo general se logra una complementación adecuada entre los aminoácidos, con lo cual se obtiene una proteína de buena calidad. Así pues se tiene que las proteínas de los cereales son deficientes en lisina, mientras que las de las leguminosas lo son en aminoácidos azufrados, por lo que se obtiene una complementación entre los cereales y leguminosas como por ejemplo el maíz y el frijol, que como buen mexicano es la base de su alimentación. (1)

3.2 Leguminosas

La familia ***Leguminosae*** se compone de unas 18 mil especies, de las que se aprovechan como alimento humano apenas unas 30, en la mayoría de los casos sus semillas maduras, pero a veces también sus vainas, raíces o frutos.(1)

Las leguminosas pertenecen a un grupo de plantas con flor. Son de distribución universal y en cada zona o región existe un grupo representativo.

De acuerdo a su composición se pueden clasificar en dos grupos de leguminosas. El primer grupo es rico en proteína y aceite, en el que se encuentran la soya, cacahuate entre otros, las cuales se utilizan en su mayoría procesadas. El contenido de proteína llega al 35 % mientras que el de aceite varía del 15-45 %. El segundo grupo presenta un contenido medio de proteína y bajo de aceite; en este grupo se encuentran la mayoría de las leguminosas, como son: el caupí, garbanzo, guisante, lenteja y el género ***Phaseolus***, que comprende a la judía común, el frijol o habichuela. El contenido de proteína es del 17-30 % y un 1% o menos de aceite que es rico en ácidos grasos poliinsaturados y vitamina E. (5)

La concentración de almidón en las leguminosas varia, de 25-30% en cacahuate o soya, hasta 60% en el frijol, en el cual el almidón es resistente a la digestión por enzimas humanas, lo que da un índice glucémico bajo, que es benéfico para diabéticos. (1)

Las leguminosas son ricas en fibra de tipo insoluble y en el caso de México, la fibra de frijol sumada a la de maíz permite que la mayoría de la población tenga una ingestión satisfactoria de fibra.

En general, las leguminosas son buenas fuente de calcio, de fósforo y hierro, que estos dos últimos son poco absorbibles por la abundancia de fitatos. También presentan un alto contenido de tiamina y riboflavina. (1)

Un aspecto adicional de las leguminosas es que albergan bacterias simbióticas que fijan el nitrógeno del aire. Las raíces poseen unos nódulos típicos, visibles a simple vista, que contienen *Rhizobium leguminosarum*. (5)

3.3 (Phaseolus ssp)

El género *Phaseolus* pertenece a la familia *Leguminosae*, subfamilia *Papilionoideae*. El número de especies que pertenecen a este género en México se encuentran alrededor de 50 y todas son de origen tropical o subtropical. Las cuatro principales especies domesticadas son: la judía escarlata o caraota (*P. coccineus*), el escumite (*P. acutifolius*), que se halla en América central, el frijol de lima (*P. lunatus*) y el frijol común (*P. vulgaris*), cuyo origen se halla en América central y América del sur. Todas estas especies silvestres de *Phaseolus* son plantas perennes, volubles y trepadoras de los árboles y de los arbustos para exponer las hojas al sol. (7,20)

3.3.1 Frijol Común

El frijol común (*P. vulgaris*) es una planta herbácea que de forma silvestre se comporta como plantas anuales y su periodo de germinación y madurez duran alrededor de seis meses, que muestra una gran variación en costumbres, caracteres vegetativos, color de las flores y en el tamaño, forma y color de las vainas y semillas, como se puede observar en la figura 1. (7,18)

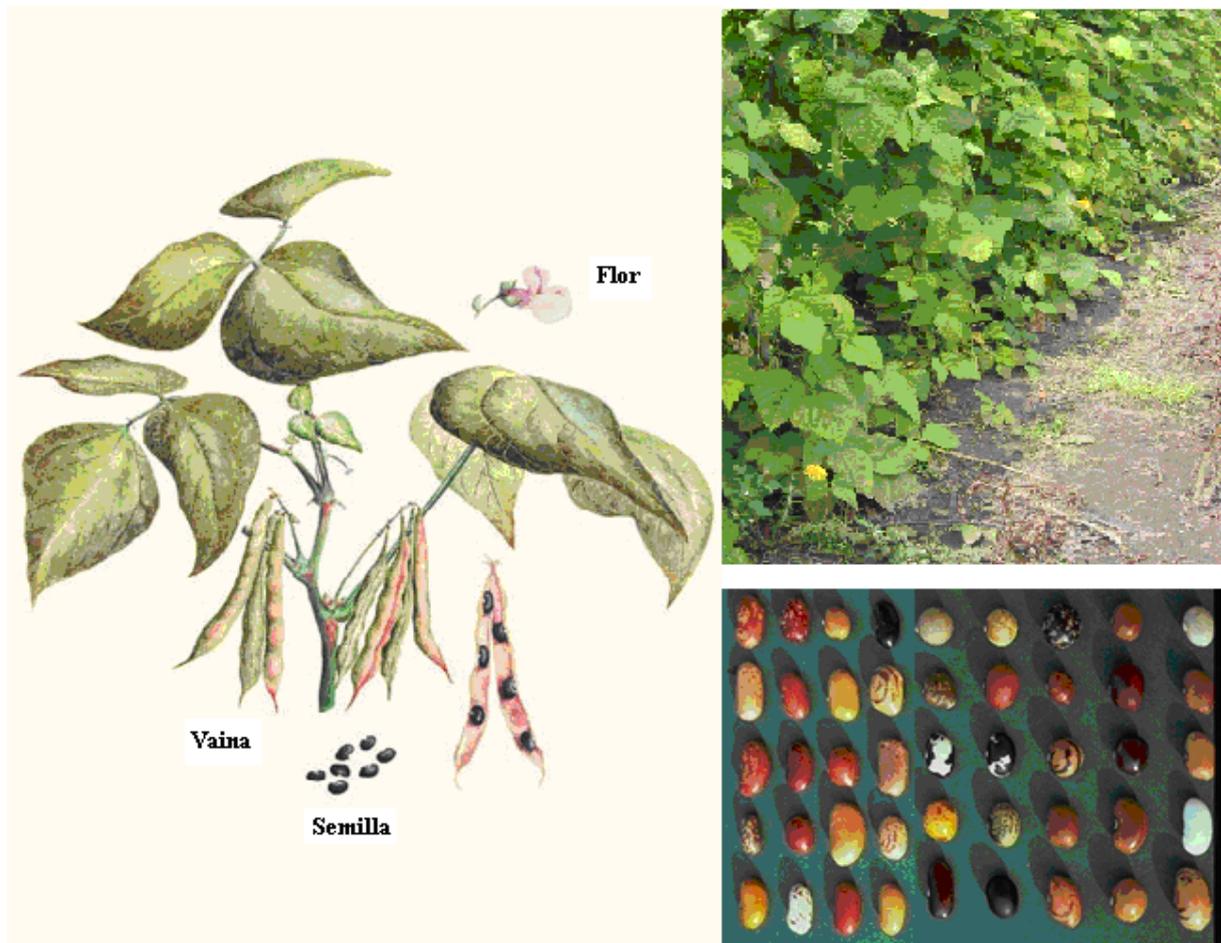


Figura 1 Existen diferentes formas en semilla, vaina, flor y tamaño de planta del *P. vulgaris*

Existen tipos trepadores o erguidos y también arbustos enanos, y tipos intermedios que desarrollan estolones débiles, aun así todos tienen una raíz central bien desarrollada. Los tallos son delgados, retorcidos, angulosos y nerviados. Las hojas son alternas, trifoliadas, a veces algo peludas y las vainas de las semillas son finas, rectas o ligeramente curvadas, de bordes redondeados o convexos y extremo prominente, además que su color puede ser desde amarillo hasta verde oscuro. Y el número de semillas puede oscilar entre 1 y 12, mostrando variación importante en su color, tamaño y medida. **(18)**

Los frijoles que se utilizan secos se pueden dividir en clases conforme a las características de sus granos. Los *medianos* presentan granos de 1-1.2 cm de largo, la mayor parte de color rosado o amarillento, moteados en un tono morado o pardo; *del país* que muestran una gran diversidad de colores y tamaños. También existen

unos granos pequeños, de color claro o blanco, de 8 mm o menos de largo, que se clasifican como *frijol guisante*.

En América latina existe una variedad de grano grande, de 1.5 cm o más de largo, que se cultiva mucho, es el *frijol colorado*, popular también en partes de África oriental.

La última clase *frijoles de meollo*. Tienen granos de tamaño medio a grande de 1-1.5 cm de largo, de forma entre redondeada y oblonga, y suele ser de color claro.

(20)

El frijol es nativo de América, probablemente del centro de México y Guatemala; en México en el valle de Tehuacan, estado de Puebla, hay evidencias de su existencia desde hace 5000 años **(7)**. En América central y América del sur se consume en grandes cantidades, tal y como se muestra en la tabla 2. **(5)**

Tabla 2. Datos sobre consumo de frijoles en diferentes países.

País	g de frijol/per capita/día
Brasil	66
México	49
Uganda	34
Guatemala	29
Chile	13
Turquia	11
Estados Unidos	9
Argentina	2

Fuente: **(5)**

Condiciones de cultivo

Para que se tenga un crecimiento óptimo se requieren temperaturas de 16-24 ° C y con un mejor crecimiento en los trópicos y subtrópicos bajo condiciones de temperaturas decrecientes. Como la mayoría de las plantas su crecimiento se detiene y mueren por heladas con temperaturas menores a los 10 ° C. Requiere además crecer como cosecha de lluvia en zonas con un promedio de lluvias que va de los 500-1500 mm. **(18)**

Cosecha y almacenamiento

De 60 a 90 días tiene que pasar para alcanzar la madurez de los frijoles, claro que van a depender del cultivar y las condiciones climáticas locales. La cosecha comienza al arrancar la planta entera, siendo aproximadamente el 80 % de las vainas amarillas y maduras con un contenido de humedad de las semillas superior al 40 %. Se atan las plantas y se secan al sol de 7-10 días. Los granos se trillan y se almacenan en recipientes como cestos tejidos y ollas de arcilla, entre otros. Como los frijoles a menudo se estropean y hay pérdidas durante el almacenamiento por ataques de gorgojos, escarabajos y mohos toxigénicos como *Aspergillus flavus*, para que sea correcto dicho almacenamiento se debe tener de preferencia un contenido de humedad inferior al 12 por ciento. **(20)**

Valor nutricional y fisiológico

El frijol es la leguminosa más consumida en México, gracias a su amplia adaptación el frijol se puede producir en todas las regiones agrícolas del país en diversos sistemas de producción y épocas del año, y además tiene a su favor milenios de experiencia culinaria y la existencia de numerosas variedades como las que se muestran en la tabla 3. **(12)**

El frijol se puede consumir como una verdura fresca con la vaina, o como semilla seca, que en este caso se tiene en remojo durante 24 hrs y luego se cuece antes de consumirla.

Es una fuente de proteína importante para los miembros más pobres de la sociedad. El frijol contiene aproximadamente el 20 % de proteína, 1.5 % de grasa, 4 % de fibra bruta y 4 % de cenizas. (cabe mencionar que existe notable variación en la composición bajo diferentes condiciones ambientales)**(5)**.

Tabla 3. Composición del frijol común (por 100 g de base Húmeda)^a

Variedad	Proteínas g	Energía kcal	Grasa g	Hidratos de carbono g	Tiamina mg	Riboflavina mg	Niacina mg	Calcio mg	Hierro mg
Amarillo	14.2	337	1.7	67.1	0.62	0.12	2.1	347	4.8
Ayocote	15.0	343	1.7	68.0	0.42	0.19	1.9	116	5.9
Azufrado	20.9	337	1.5	61.9	0.52	0.14	1.3	254	5.3
Bayo gordo	22.7	332	1.8	58.5	0.69	0.14	1.7	200	5.7
Blanco	22.5	312	2.7	52.0	0.60	0.15	1.8	185	4.6
Garbancillo	18.0	340	1.7	66.4	0.54	0.14	1.7	300	4.9
Negro	21.8	322	2.5	55.4	0.63	0.17	1.8	183	4.7
Ojo de liebre	17.5	328	1.5	62.0	0.72	0.13	1.5	307	5.2
Palacio	22.2	344	1.5	62.4	0.85	0.13	1.6	759	6.9
Rosita	19.2	373	6.2	61.0	0.74	0.17	1.5	105	8.9

^a Variedades cultivadas en México. Contenido de Humedad: 10-12 %. Fuente: (1)

Además es una fuente de vitaminas y minerales tales como: vitamina A, niacina, tiamina riboflavina, calcio hierro, cobre zinc fosforo magnesio, así como ácido ascórbico, aminoácidos en mayor y menor proporción tales como lisina y leucina, y metionina, cisteína y triptófano respectivamente, encontrándose estos últimos en niveles más altos en frijoles que tienen un contenido proteínico entre el 20-22 %.

Como componentes importantes de las proteínas del frijol se tiene: faseolina (20 % del peso seco de la semilla), faselina (2%) y confaseolina (0.35-0.4 %). Y como hidratos de carbono se tiene a azúcares 1.6 %, dextrinas 3.7 %, almidón 35.2 pentosanos 8.4 galactanos 1.3 celulosa 3.1 y 0.7 % de pectina. Además contiene aceite con un 19 % de ácidos grasos saturados, y un 63.3 % de insaturados. (18)

Por lo anteriormente mencionado se puede decir entonces que el frijol es un alimento que proporciona una buena cantidad de nutrimentos entre los que destacan las proteínas que por su alto contenido puede ser una solución a los problemas nutricionales de una población creciente, sin embargo esto no quiere decir que la proteína contenga los aminoácidos esenciales en cantidad suficiente para satisfacer las necesidades humanas.

Entonces se tiene que las proteínas que contienen abundancias de aminoácidos indispensables se les considera como de alta calidad, esto porque cuanto más se aproxime su composición en aminoácidos indispensables a los requerimientos en aminoácidos indispensables del individuo, mayor eficiencia es utilizada por éste; solo si se considera que la proteína contiene una proporción adecuada entre aminoácidos indispensables y no indispensables³. Por esto no solo se debe de procurar por el requerimiento mínimo diario de aminoácidos indispensables, sino también por el balance de aminoácidos (ingestión de cada aminoácido en relación con la ingestión de otros aminoácidos). **(17)**

O sea que el valor nutritivo de una proteína debe ser considerado en relación con todas las otras proteínas de la dieta, por lo que se tiene que las proteínas de los cereales suelen ser deficientes en lisina y treonina, mientras que las leguminosas suelen ser deficientes en aminoácidos azufrados, así entonces el frijol es un alimento complementario del maíz por su alto contenido de lisina, aminoácido deficiente en esta gramínea.

Aunque se debe de tomar en cuenta que no porque la dieta contenga un nivel y un balance satisfactorio de aminoácidos no se garantiza que esa dieta satisfaga los requerimientos de aminoácidos de un individuo. Esto es posible ya que bajo ciertas circunstancias algunos de los aminoácidos pueden ser inutilizables debido a que las proteínas no sean totalmente digeridas. Por ejemplo, en las mucoproteínas algunas porciones de la cadena peptídica adyacentes a los restos de azúcar son totalmente resistentes al ataque digestivo. Las celulosas y hemicelulosas de la pared de las células vegetales pueden impedir también el acceso de las enzimas digestivas hasta las proteínas del interior. También puede estar influenciado por factores como la

³ Los aminoácidos que pueden omitirse en la dieta, se denominan aminoácidos no indispensables o no esenciales ya que pueden sintetizarse fácilmente en el organismo; aquellos que no se pueden sintetizar se les conoce como aminoácidos esenciales o indispensables, los cuales se encuentran en los alimentos que se consumen (Lisina, metionina, treonina, leucina, isoleucina, valina, fenilalanina, triptófano) En el niño hay que añadir histidina y a veces arginina. **(10,16)**

configuración y la solubilidad que tengan las proteínas ya que en general las proteínas globulares tienden a ser altamente digestibles, sin embargo, las albuminas y globulinas se encuentran casi siempre asociadas a lípidos, metales, ácidos nucleicos o hidratos de carbono, por tanto su digestibilidad se ve afectada y no es tan alta como se esperaría, debido a la presencia de dichos factores. En otros casos la digestión puede verse alterada por la presencia de factores antifisiológicos.

(15,17)

Para el caso del frijol común se ha reportado que la fracción proteínica de albumina. Presenta una baja disponibilidad biológica de aminoácidos principalmente metionina. Además se ha reportado que para la semilla cruda la digestibilidad varia de 56% a 64 % en diferentes cultivares de frijol, y para semillas cocidas de 76 a 79 %.(15)

3.4 Valoración de la Calidad de las Proteínas

La calidad de una proteína se define como su capacidad para apoyar el crecimiento de los animales. Las proteínas de más alta calidad producen una tasa de crecimiento más rápida, con la cual se evalúan los verdaderos factores importantes en una proteína: a) patrón y abundancia de aminoácidos esenciales, b) cantidades relativas de aminoácidos esenciales y no esenciales en la dieta, c) digestibilidad al ser ingerida y d) presencia de factores tóxicos y antinutricionales.

(3)

La función primaria de las proteínas de la dieta es suministrar los aminoácidos que el animal necesita para mantenimiento, crecimiento, gestación y lactancia; por lo cual la valoración será mejor si se realiza con la especie a la que la proteína va dirigida y en las condiciones bajo las cuales será empleada. Sin embargo los ensayos biológicos con personas y animales de gran tamaño son costosos y difíciles de llevar a cabo. Es por ello que los ensayos se realizan normalmente en condiciones estandarizadas y con especies de laboratorio.

3.4.1 Valor Biológico (VB).

Fue uno de los primeros conceptos usados para describir la calidad de las proteínas y mide el porcentaje de la proteína que se digiere y se absorbe. Puesto que las principales vías de eliminación del nitrógeno de la dieta son las heces y la orina se supone que todo el nitrógeno ingerido que no se recupera de estas salidas ha sido retenido y empleado por el organismo para satisfacer sus requerimientos de aminoácidos. Así el valor biológico puede expresarse como:

$$\%VB = 100 \times \frac{N_{\text{ingerido}} - [(N_{\text{fecal}} - N_{\text{metabolico}}) + (N_{\text{urinario}} - N_{\text{endogeno}})]}{N_{\text{ingerido}} - (N_{\text{fecal}} - N_{\text{metabolico}})}$$

Aunque dicha determinación proporciona resultados valiosos cuando se lleva a cabo en forma apropiada, resulta largo y costoso y es empleado raramente para determinar la calidad de la proteína, pero se usa normalmente para describir la calidad de las proteínas.

3.4.2 Balance de Nitrógeno.

Es la diferencia entre la retención y la excreción de nitrógeno.

$$B = I - (U + F)$$

siendo B balance, I la ingestión y (U + F) el nitrógeno excretado en la orina y las heces.

Este método se ha utilizado mucho para valorar la proteína de los alimentos en las dietas humanas, además de ensayo para mezclas estándar de aminoácidos para los mismos. Es costoso y largo de determinar y además varía con la ingestión de nitrógeno.

3.4.3 Utilización de Proteína Neta (NPU)

Es la combinación de la digestibilidad y el valor biológico de una proteína (NPU = BV x digestibilidad). La retención del nitrógeno determinada por el análisis de la canal⁴ puede usarse para calcular la NPU así:

$$NPU = N_{\text{canal c/p}} - N_{\text{canal s/p}} / N_{\text{ingerido}}$$

donde $N_{\text{canal c/p}}$ es el nitrógeno de la canal de los animales alimentados con la dieta que contiene proteínas, $N_{\text{canal s/p}}$ es el nitrógeno de la canal de animales comparables alimentados con dietas exentas de proteína y N_{ingerido} es la ingestión del nitrógeno de los animales alimentados con la dieta que contiene proteínas. Es un método más sencillo y rápido que las anteriores pero solo es válido para aquellas especies que se prestan al análisis de la totalidad de su canal.

⁴ Cuerpo del animal sano, desprovisto de vísceras torácicas, abdominales y pelvianas, con o sin piel, patas y cabeza.

3.4.4 Crecimiento.

La velocidad de crecimiento de un animal es un índice razonablemente sensible de la calidad de la proteína. Bajo condiciones controladas la ganancia de peso es proporcional al suministro de aminoácidos esenciales. En las ratas la correlación entre la ganancia de peso y la ganancia de nitrógeno del organismo es muy buena. Es una prueba muy simple empleada en la industria ganadera, aunque también se ha empleado en niños.

3.4.5 Relación de Eficiencia Proteínica (REP)

Se define como los gramos de peso ganados por gramo de proteína consumida y probablemente es el método más ampliamente utilizado para valorar la calidad de la proteína. Aunque el método puede ser practicado con cualquier especie, se trata básicamente de un ensayo de crecimiento para ratas, en los cuales se toman en cuenta parámetros tales como edad de la rata, número de ratas por grupo testigo, duración del estudio y composición de la dieta.

$$\text{REP} = \Delta P / \Sigma AI \times F$$

donde ΔP es el incremento de peso (g), ΣAI es el alimento ingerido acumulado o total (g) y F es un factor de conversión de alimento a proteína

3.4.6 Relación de Proteína Neta (NPR)

Es la ganancia de peso de un grupo de ratas alimentadas con la dieta en ensayo mas la pérdida de peso de un grupo similar alimentado con una dieta exenta de proteína, dividido todo ello por el peso de la proteína consumida por el primer grupo. Es utilizada para ver la proteína que es utilizada para mantenimiento y no solo para crecimiento como el caso del REP.

3.4.7 Métodos químicos.

Ya que la determinación de la calidad de la proteína con animales es larga y costosa, se han buscado métodos químicos para la valoración de proteínas. Entre ellos se encuentra el método de Block y Mitchell (chemical score), basado en que el valor nutritivo de una proteína depende en primer lugar de la cantidad del aminoácido esencial más deficitario en esa proteína comparado con una de referencia. (17)

3.5 Factores tóxicos y antinutricionales

El frijol ya que pertenece a las leguminosas presenta inconvenientes desde el punto de vista nutritivo. Ya que además de la deficiencia de metionina y cisteína, su digestibilidad es baja, por lo que un consumo elevado provoca flatulencias. Otro de los inconvenientes es que puede presentar factores antifisiológicos tales como inhibidores de proteasas, hemaglutininas y factores de flatulencia.

3.5.1 Inhibidores de Proteasa

Como se sabe, las proteasas son enzimas naturales las cuales hidrolizan a las proteínas, clasificándose en función de la naturaleza del aminoácido que controla el centro activo, existiendo proteasas serinas (tripsina, quimotripsina), las sulfodrilproteinasas (papaína, bromelina y ficina), las carboxi-peptidasa(AyB), aminopeptidasas y las carboácidas proteinasas (pepsina y renina). (5)

Los inhibidores de proteasas presentes en *Ph. vulgaris* se hayan localizados principalmente en las semillas, encontrándose del tipo de inhibidores de tripsina, elastasa y plasmina. Estos factores tóxicos son termolábiles, lo cual mediante el tratamiento térmico adecuado se inactivan (25)

3.5.2 Oligosacáridos

Es evidente que algunos componentes de los frijoles (principalmente hidratos de carbono) escapan a la digestión del estómago. Pasan directamente a los intestinos, donde son digeridos por enzimas bacterianas producidas por agentes anaerobios intestinales como *Clostridium perfringens*; de ello se deriva una producción excesiva de gases, principalmente hidrógeno y metano, lo cual produce las flatulencias. (20)

3.5.3 Hemaglutininas

Las fitohemaglutininas, conocidas también como lectinas, causan la aglomeración de los glóbulos rojos de la sangre y a veces de los leucocitos. Las lectinas de las plantas, denominadas con frecuencia fitolectinas, son generalmente glicoproteínas que contienen aproximadamente un 5% de hidratos de carbono unidos covalentemente. En las leguminosas, aproximadamente unas 600 especies contienen lectinas que representan del 2 al 10% de la proteína total de la legumbre seca. Algunos cultivares contienen diversas isolectinas; por ejemplo las lectinas del frijol de lima aglutinan específicamente las células sanguíneas del grupo A, mientras que las de *Phaseolus vulgaris* reaccionan inespecíficamente con los eritrocitos humanos de todos los grupos sanguíneos. Las lectinas de algunas semillas son también mitogénicas, lo que puede determinarse por su capacidad para estimular *in vitro* la síntesis del ADN por linfocitos de bazo de ratón.

Los estudios bioquímicos han demostrado que las lectinas de los frijoles pueden inhibirse por los oligosacáridos aislados de los eritrocitos después de la proteólisis o por un trisacárido sintetizado químicamente, por lo que se cree que la hemaglutinación es debida a una interacción entre los oligosacáridos presentes en las glicoproteínas de las paredes celulares y las lectinas, que con frecuencia se clasifican ahora en función de la capacidad para unir los diferentes hidratos de

carbono. Por ejemplo, las lectinas del guisante pertenecen a un grupo que incluye la concaivalina (de *Canavalia ensiformis*) y las lectinas de habas gruesas y lentejas que se unen todas a residuos de glucosa y manosa. Las lectinas manifiestan afinidad por los hidratos de carbono presentes en forma de monosacáridos sencillos o como segmentos de residuos de hidratos de carbono simples y complejos.

La afinidad específica de las lectinas por los hidratos de carbono ha sido utilizada para su aislamiento y purificación; las lectinas unidas a la glucosa pueden aislarse fácilmente mediante cromatografía de afinidad usando Sephadex G-50 para retenerlas y glucosa 0.2 M para desplazar las lectinas absorbidas.(4)

Las moléculas de todas las lectinas son multiméricas; las lectinas de los guisantes, las lentejas y las habas gruesas tienen estructura dimérica con un PM de aproximadamente 25.000; la concaivalina (PM 104.000) tiene una estructura tetramérica y las lectinas de los frijoles también. Todas las lectinas son metaloproteínas y cada subunidad contiene centros de unión para los iones Ca^{2+} y Mn^{2+} esenciales para la unión de hidratos de carbono y la actividad mitogénica.

La lectina de frijol contiene dos subunidades diferentes que pueden combinarse formando cinco tetrámeros no covalentes distintos con diversas funciones. (4)

Como las lectinas están presentes en un amplio número de especies vegetales, y a su vez en distintas partes de éstas, así como las propiedades que se han encontrado de ellas, sugieren que pueden estar implicadas en diversas funciones:

Como una sustancia de defensa contra depredadores naturales ya algo que caracteriza cualquier mecanismo de defensa en un sistema biológico es la habilidad de reconocer específicamente el agente dañino y responder a su presencia. (26)

Como una sustancia inhibidora de las hifas de los hongos, el caso de las lectinas de la papa, por ejemplo inhiben el crecimiento de las hifas del hongo *Botrytis cinerea*; para el caso del trigo sirven como protección durante las primeras etapas

de germinación por inhibir el crecimiento de hifas de *Aspergillus niger* y *Stemphylium botryosum*. (27)

Existen otras investigaciones de las funciones de las lectinas en las plantas que las contienen, como la posible relación de las lectinas con el inicio de la germinación en las semillas. La localización en tejidos como el tallo ha dado indicio a que las ligas con la elongación de las paredes celulares actuando como una especie de pegamento entre células permitiendo la extensión y reajuste en los componentes de las paredes en el tallo. (26)

Las lectinas son altamente tóxicas en humanos, insectos, cerdos, pollos y ratas. Se ha encontrado que con menos del 0.5 % de lectinas presentes en las dietas de animales, el crecimiento es lento o se detiene, y si se aumenta la dosis por encima de ese nivel no solo se inhibe el crecimiento sino que hasta se da la muerte.(28,29)

Se ha demostrado que las fitohemaglutininas llegan a unirse a la mucosa del intestino, atribuyéndolo a su capacidad de unirse en sitios receptores específicos en la superficie del intestino, donde provoca lesiones y disrupciones, además de un crecimiento anormal en las vellosidades intestinales. (27,30)

Una de las mayores consecuencias del daño infligido a la mucosa del intestino es el severo debilitamiento en la absorción de nutrimentos a través de las paredes intestinales. Se ha demostrado que las lectinas interfieren en la absorción de nutrimentos como la glucosa, aminoácidos como la histidina, lípidos y vitaminas del grupo B12, además de interferir en el transporte de iones (31)

Los efectos nocivos de las lectinas pueden ser inactivados mediante la desnaturalización de las mismas. Así por ejemplo, las lectinas presentes en algunas patatas no son activas después de la cocción durante 45 minutos. Se ha demostrado que la actividad aglutinante puede reducirse substancialmente en los frijoles si se remojan con agua y a continuación se calientan a 100°C; sin embargo, el

calentamiento a temperaturas menores de 70°C u 80°C aumenta esta actividad aglutinante en algunos casos en un factor de siete. En consecuencia está claro que la ingestión de legumbres poco cocidas y frescas puede dar lugar a una intoxicación.

(2)

Los análisis de las lectinas se han llevado a cabo desde métodos cromatograficos hasta ensayos basados en la capacidad de las lectinas de aglutinar células, siendo estos últimos los más utilizados por su bajo costo y alta especificidad, llevados a cabo por metodologías que van desde aglutinación de perlas de látex con ovoalbúmina hasta los que aprovechan la capacidad de aglutinar eritrocitos de ciertas especies animales, siendo este ultimo el método utilizado en el departamento de farmacia, y en el cual se hace uso de la sangre de hámster ya que sus eritrocitos⁵ son sumamente sensibles a este tipo de glicoproteínas, **(23,32,33,9)**

3.6 Cocimiento

El cocimiento en agua es probablemente el método más antiguo que se conoce para procesar las leguminosas, ya que además de que se necesita para suavizar la cáscara y desarrollar un perfil de sabor y textura aceptable en toda la semilla, es un factor fundamental en la destrucción o inactivación de componentes tóxicos presentes en forma natural en todas las leguminosas. Se puede efectuar en agua a ebullición (100°C 1 atm), o a alta presión (121°C 15psi), en cualquiera de los casos con o sin la adición de condimentos. **(15)**

El tiempo de cocción puede llevar de 30 minutos a cuatro horas o más, dependiendo de la variedad de leguminosa, su cultivar, origen, edad de la semilla, contenido de humedad y condiciones de almacenamiento⁶. Existen otros factores que afectan el tiempo de cocción como la altitud que rebaja el punto de ebullición del

⁵ Tratados con tripsina o pronasa para mejorar la sensibilidad del ensayo.

⁶ Si son deficientes el grano desarrolla dos propiedades indeseables, el endurecimiento de cáscara y el fenómeno de resistencia a la cocción, los cuales conducen a incrementos en el tiempo de cocción y por tanto a un mayor gasto de combustible.

agua, y la presencia o ausencia de diversas sales minerales en el agua de remojo y cocción. **(20)**

Con la ayuda de diferentes tipos de estudio se pueden conocer algunos cambios que tienen lugar durante la cocción: liberación parcial de magnesio al agua de cocimiento, rápida gelatinización del almidón intracelular, separación de células del frijol a lo largo de las capas de la pared celular sin ruptura de la célula, desnaturalización lenta y progresiva de las proteínas, así mismo la retención de vitaminas y minerales se ve afectada. **(15)**

En la mayoría de las leguminosas se sabe que el proceso de cocción induce una mejora en el valor nutritivo, observándose que los valores de PER, DAP⁷ y NPU aumentan significativamente en comparación con la semilla cruda, lo cual es representado por la siguiente figura.

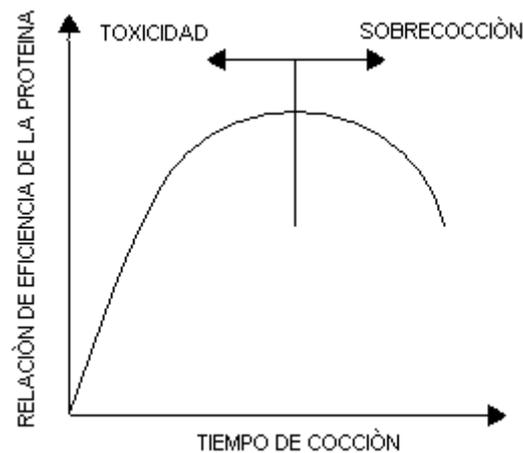


Figura 2. Relación de Eficiencia de la Proteína contra el tiempo de cocción de las leguminosas. Fuente **(5)**

⁷ Digestibilidad aparente de la proteína.

Con lo mencionado anteriormente se puede llegar a obtener la mejor calidad proteínica de una leguminosa ya que al eliminar los factores tóxicos, también se mejora la biodisponibilidad de la proteína; sin embargo si se prolonga el tiempo de cocción se pueden perder la disponibilidad de ciertos aminoácidos esenciales de la proteína, ya que se conoce que el contenido de lisina disponible disminuye en forma proporcional al tiempo de tratamiento por calor así como la de otros aminoácidos esenciales termolábiles como lo son el triptofano y aminoácidos azufrados como la metionina que es un aminoácido limitante en las leguminosas.

3.7 Metionina

Tanto la metionina como la cisteína son los aminoácidos principales que actúan como fuentes de azufre en la dieta, sabiendo que el cuerpo puede sintetizar cisteína a partir de la metionina pero no viceversa. Por ello es que la metionina es un aminoácido esencial en la dieta, como ya se había mencionado anteriormente, ya que cumple con diversas funciones en el cuerpo como lo es la síntesis de carnitina, creatina, glutatión, catecolaminas y como sustrato para la síntesis de proteínas. **(10)**

Los aminoácidos azufrados, metionina y cisteína, por lo regular se consumen como componentes de las proteínas en la dieta, siendo más abundantes en las proteínas animales y en la de los cereales que en las de las leguminosas. Así el bajo contenido de este aminoácido limita el valor nutritivo de muchas proteínas en alimentos como por ejemplo las leguminosas, en especial en las siguientes circunstancias: el procesado y almacenamiento del alimento ya que como otros aminoácidos la metionina es químicamente modificada, porque forma parte de las proteínas que tienen pobre digestibilidad y por ello es pobremente utilizada. **(34)**

En la tabla 4 se presentan el contenido de metionina y cisteína en diversos alimentos, así como las recomendaciones dadas para los aminoácidos.

Tabla 4. Contenido de metionina y cisteína en algunos alimentos, y recomendaciones de los aminoácidos

Alimento	Cantidad		Muestra		Aminoácido ^a	Recomendación mg/kg/día ^b
	Met (mg /100g porción comestible)	Cis	Met (mg /g proteína)	Cis		
Queso cheddar	652	125	26	5	valina	13
Leche entera	83	30	25	9	leucina	19
Huevo entero	392	289	32	24	isoleucina	13
Pollo sin piel, cocido asado	800	370	28	13	treonina	9
Carne de res, solo magra	557	224	26	11	cisteina	17
Harina de trigo, harina entera	186	278	14	21	metionina	17
Harina de maiz, regular, seco	196	237	22	22	lisina	16
Avena, regular, seca	266	398	17	25	histidina ^c	16
Mantequilla de cacahuete	292	365	10	13	triptofano	5
Frijol de soya, verde, cocido	150	113	12	9	tirosina	19
Arroz integral, seco	142	152	19	21	fenilalanina	19

^a glicina, alanina, serina, ac. aspartico y glutamico, arginina y prolina, *No existe recomendación*

^b Para un adulto. Recomendación FAO-OMS, 1985 ^c En niños pequeños la síntesis no es suficiente

Fuente(1,3)

4. METODOLOGIA

A continuación en la figura 3 se presenta el diagrama general de la metodología llevada a cabo en el presente trabajo y posteriormente se describen las actividades desarrolladas en él.

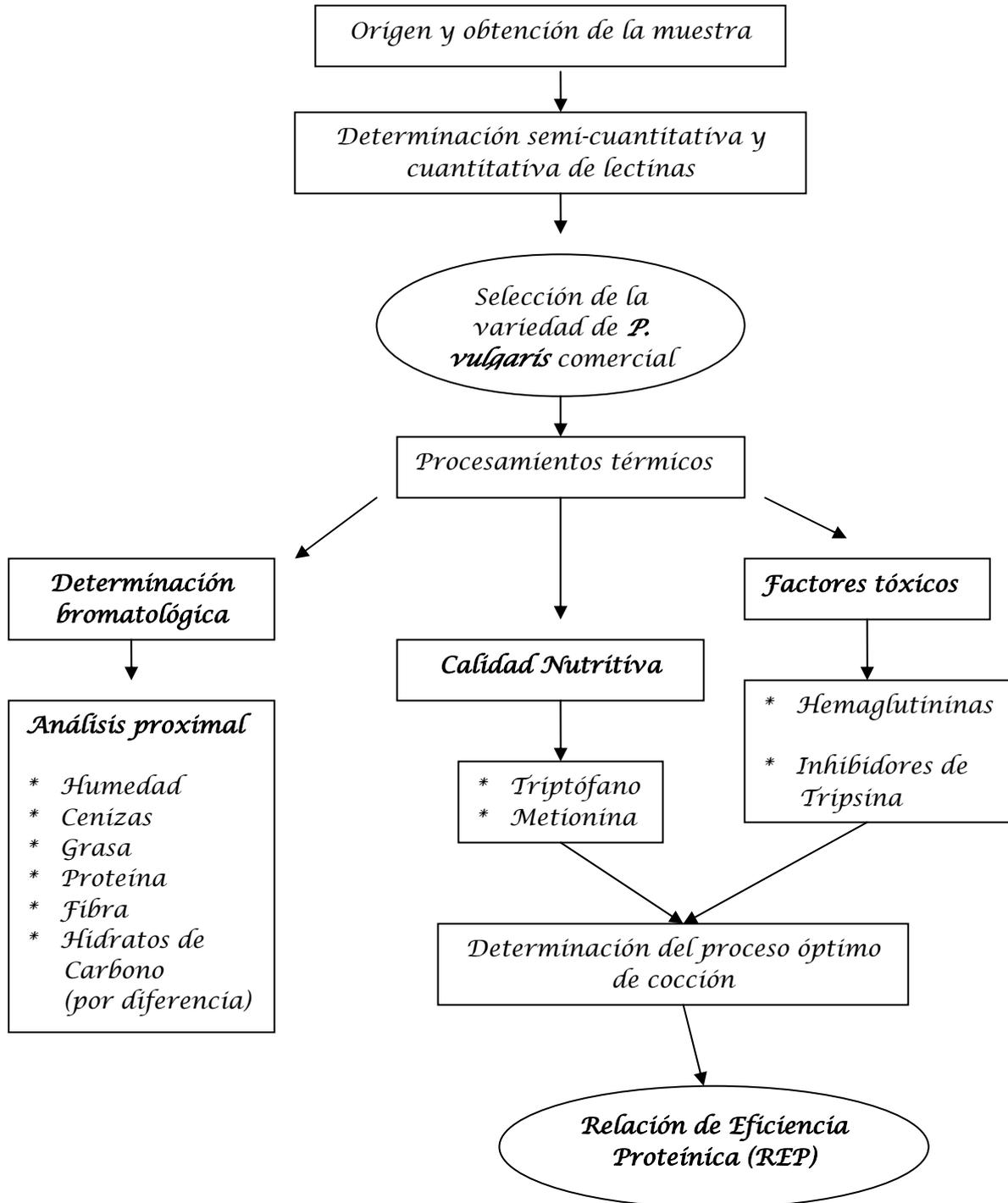


Figura 3. Diagrama General de Trabajo

4.1 Origen y obtención de la muestra

Con la finalidad de obtener y trabajar una muestra con un alto contenido de lectinas, se consultó un trabajo previo en el cual se habían estudiado diversas variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*) comercial(8); encontrándose a las variedades de Frijol Mayocoba y Frijol Peruano como las variedades comerciales con un mayor contenido de lectinas, ambas variedades fueron adquiridas en una tienda de autoservicio (Tienda UNAM).

Para el caso del frijol Mayocoba se consiguió la marca El Labrador y La Merced, mientras que para el frijol Peruano se consiguió la marca Morelos y otro con el que ya se contaba en el laboratorio (frijol peruano Amarillo de Tierra caliente, Guerrero). El hecho de conseguir marcas distintas fue que podía variar las cantidades de lectinas por su procedencia; además se compró la suficiente cantidad para llegar a realizar el ensayo biológico pertinente y que la muestra sea del mismo lote para lograr el objetivo fijado en el presente trabajo.



Figura 4. Variedades de frijol con las que se trabajó.

4.2 Preparación y Selección del material

Una vez obtenidas las muestras, se homogeneizaron cada una de ellas y se tomó una porción que con la ayuda de un molino del laboratorio se logró una harina con un tamaño de partícula ≤ 1 mm de diámetro. Con la harina de frijol de cada una de las muestras se comenzó a trabajar, realizando la determinación de lectinas por el

método semicuantitativo y cuantitativo que aprovechan la capacidad hemaglutinante de este tipo de enterotoxinas y que hace uso de un sistema de microtitulación seriada (9); esto con el fin de seleccionar la muestra con la cual se trabajará en esta investigación.

4.3 Descripción de la metodología

4.3.1 Determinación semicuantitativa de hemaglutininas⁽³⁵⁾

Fundamento

La detección de hemaglutininas en extractos de plantas se lleva a cabo por medio de una técnica de diluciones seriadas en la cual se determina el punto final de la aglutinación de los glóbulos rojos de hámster 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.

Material/Reactivos:

- Parrilla de múltiple agitación marca CORNING STIRRER
- Centrífuga marca EPPENDORF 5702 para tubos de 15 mL
- Tubos de centrífuga de 15 mL con graduación.
- Jeringa de 5 ó 10 mL
- Incubadora marca BLUE-M
- Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER
- Adaptador para celdas de 12 x 80 mm (acondicionado a una abertura de 1 cm²)
- Microtiter Kit (Cook Eng-alexander Virginia USA).
- Embudos pequeños
- Fibra de vidrio.

- Sangre lavada de hámster
- Solución anticoagulante (Heparina 1000 UI)
- Solución salina (NaCl) al 1%.
- Solución salina (NaCl) al 0.9%.
- Solución de pronasa al 0.2% en solución salina 0.9 %.
- Proteasa (SIGMA P-5147).

Metodología

a) Preparación del extracto

Con la muestra finamente molida (con < 5% de grasa), se suspendió 1 g en 10 mL de solución salina al 1%, llevando a cabo la extracción con agitación mecánica durante 2 horas a 300 r.p.m. a temperatura ambiente.

Después de este tiempo se centrifugó el extracto a 3000 r.p.m., durante 10 minutos para eliminar el residuo insoluble; el sobrenadante se filtró a través de un filtro de vidrio (poro grueso) lavando el residuo con más solución salina al 1%, hasta que se llevó el extracto filtrado a un volumen de 10 mL.

b) Preparación de la sangre

Una vez que se sangró al hámster (anestesiado) por vía ocular, la sangre se colocó en un matraz pequeño que contenía solución anticoagulante y se agitó suavemente para la completa homogeneización de la sangre con la solución anticoagulante. Para evitar al máximo la coagulación, se diluyó ésta con solución salina isotónica.

La sangre con anticoagulante se transvasó a tubos de centrifuga para lavarla (3 veces) con solución salina al 0.9%. La relación sangre:solución salina fue aproximadamente 1:13 y se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 10 minutos. Después

del último lavado, se midió en el tubo de centrifuga, la cantidad de paquete de eritrocitos y se diluyeron al 4% para lo cual se agregaron por cada 1.0 mL de glóbulos rojos 24.0 mL. de sol. salina al 0.9%.

c) Sensibilización de los glóbulos rojos.

A cada 10 mL. de suspensión de glóbulos rojos al 4% se agregó 1 mL. de solución de pronasa al 0.2% y se colocaron en la incubadora por espacio de 1 hora a 36.5 ± 0.5 ° C., resuspendiéndose los eritrocitos por lo menos dos veces.

Después del tiempo estipulado, se centrifugó para eliminar la enzima sobrenadante y se les dió 3 lavados con solución salina al 0.9%. Después del último lavado se resuspendió el paquete de glóbulos rojos al 4 %, para lo cual, por cada 1.0 mL de paquete de eritrocitos se les adicionó 24 mL de solución salina al 0.9%.

d) Ajuste de la suspensión de glóbulos rojos.

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

La lectura debía encontrarse en un valor de 26.5% \pm 2.5 (24-29) de transmitancia, para lo cual se realizaron diluciones necesarias para que la suspensión de glóbulos quedara dentro de dicho rango.

e) Microtitulación

En las placas tipo "V", se pusieron 50 μ L de solución salina al 0.9% en cada uno de los pozos evitando tocar las paredes, utilizando una micropipeta automática multicanales. A continuación se llenó el microdilutor (50 μ L) con el extracto problema

y se introdujo en el primer pozo girándolo sin excesiva presión, se pasó el microdilutor al siguiente pozo y se giró, y así sucesivamente hasta que se completó la hilera, se descendió al siguiente pozo y completó la hilera, hasta llenar tres hileras en forma de culebra. Por último, con un pipetero de gota se agregaron a cada pozo 50 μL de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizados y ajustados. Se giró la placa en forma circular y se incubó a $36.5 \pm 0.5^\circ \text{C}$ durante 1 hora.

f) Lectura

Transcurrido el tiempo de incubación se colocó la placa sobre el dispositivo de lectura y se observó a través del espejo el fondo de los pozos de cada hilera de prueba, así que se reportó la máxima dilución en la que se presentó prueba positiva de aglutinación. A la máxima dilución que presentó aglutinación se le denomina como el título del ensayo de la muestra. La prueba se realizó por triplicado, con los datos individuales de los títulos se obtuvo la mediana que representó el título de la muestra.

4.3.2 Determinación cuantitativa de hemaglutininas⁽⁹⁾

Fundamento

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 1 unidad hemaglutinante (UHG) el equivalente a 1 mg de dicha lectina.

Material/reactivos

Se emplearon los mismos materiales que la determinación semicuantitativa, además de:

- Lectina purificada de frijol (*Phaseolus vulgaris*) faseolotoxina (PHT)
- Solución de lectina de referencia:

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

Metodología

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

Después del tiempo indicado se centrifugó el extracto a 3000 r.p.m., durante 10 minutos para eliminar el residuo insoluble; el sobrenadante se filtró a través de un filtro de vidrio de porosidad gruesa lavando el residuo con solución salina al 1%, hasta llevar el filtrado al volumen inicial (10 mL.)

La obtención y lavado de la sangre, sensibilización y ajuste de suspensión de glóbulos rojos, se realizaron de manera similar a la determinación semicuantitativa.

Microtitulación:

En las placas tipo "V" del microtiter se colocaron en cada pozo de las hileras que se van a utilizar, 100 µL 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 se llenó el microdilutor con 50 μL introduciéndolo en el extracto problema y al sacarlo se absorbió con mucho cuidado la solución adherida en el vástago del microdilutor, posteriormente se introdujo en el primer pozo de la hilera escogida y se giró sin excesiva presión y se pasó con mucho cuidado al siguiente pozo y así sucesivamente hasta que se completó una hilera. Lo anterior también se realizó para la solución diluida (1:100) de la faseolotoxina que sirvió como referencia para la determinación cuantitativa, haciéndose por cada placa una hilera para la solución de PHT y otra para la prueba negativa de hemaglutininas, la cual solo contenía la solución salina isotónica.

Por último, con un pipetero de gota se colocaron en cada pozo 50 μL de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizados y ajustados, se giró la placa en forma circular y se colocó en la incubadora a 36.5 ± 0.5 °C durante 1 hora.

Lectura:

Una vez transcurrido el tiempo estipulado se puso la placa sobre el dispositivo de lectura y se observó a través del espejo el fondo de los pozos de cada hilera de prueba, y se reportó la máxima dilución que presentó prueba positiva de aglutinación, tanto del extracto de la muestra como de la solución de faseolotoxina.

RECOMENDACIONES

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

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

Cálculos

La máxima dilución que presenta aglutinación se denomina como título del ensayo de la muestra y la prueba debe efectuarse como mínimo por triplicado. Con los datos individuales de los títulos se obtiene el promedio y se redondea al número entero más cercano y este es el título (**t**) que se usa para los cálculos.

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

$$E = M \times D$$

Donde:

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

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

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

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

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

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

Donde:

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

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

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

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

$$e = m \times D$$

Donde:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ejemplo: $MA = 2(0.05/3^3) = 3.70 \times 10^{-3} \text{ mg}$

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

$$LE = L / MA$$

Ejemplo : $LE = 1.234 \times 10^{-3} \mu\text{g} / 3.70 \times 10^{-3} \text{ mg} = 0.3332 \mu\text{g} / \text{mg} = 0.3332 \text{ UHG/g}$
muestra

Donde:

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

4.3.3 Procesamiento con calor

Una vez seleccionada la muestra de frijol con mayor contenido de lectinas y debido al carácter proteínico de las lectinas, es posible la inactivación o disminución de éstas por medio del calor, lo que provoca la desnaturalización de proteínas.

Cuando se lleva a cabo un tratamiento con calor húmedo (Cocción) en cualquier alimento, se debe considerar que no solo depende del alimento que se va a cocinar, sino que también depende de factores como: temperatura, tiempo, humedad, etc.,

así que se optó por escoger un solo tratamiento (autoclave) en el cual la única variable fuera el tiempo. El proceso de cocción general se cita a continuación:

Cocción 15 min: Se tomaron 500 g del frijol crudo en un vaso de precipitado de 2 L y se agregaron 1000 mL de agua destilada (una relación 1:2), se colocaron en autoclave automática (121 °C a 1.5 kg/cm² de presión de vapor, marca Hirayama, modelo HA-300MII), el tiempo se comenzó a tomar a partir de alcanzadas estas condiciones.

Se procedió de la misma forma para la cocción de las demás muestras, solo fue variando el tiempo de cocción: 30 min, 60 min y 120 min, y la cantidad de frijol crudo, para los casos donde se requirió mayor cantidad de muestra cocida como el de 120 min.

Preparación del material cocido

Al terminar de cocer las muestras, se secaron en una estufa de circulación forzada marca Lab-line, mod. Imperial III a 60°C por un tiempo mínimo de 18 hr, posteriormente se molieron las muestras secas obteniéndose una harina lo más homogénea posible, y se realizó las determinaciones esbozadas en el diagrama de trabajo.

Como la cocción del frijol a 15 min y 30 min no consumió toda el agua de cocción, se realizó una liofilización en un equipo Labconco mod. FreeZone 4.5 para evitar pérdidas que pudiera haber de proteínas solubles en el agua de cocción.

4.3.4 Determinación de Humedad ⁽³⁷⁾

Fundamento

La determinación de humedad se basa en la pérdida de peso de la muestra por evaporación del agua. Para esto se requiere que la muestra sea térmicamente estable y que no contenga una cantidad significativa de compuestos volátiles.

El principio operacional del método de determinación de humedad utilizando estufa y balanza analítica, incluye la preparación de la muestra, pesado, secado, enfriado y pesado nuevamente de la muestra hasta que se tenga un peso constante.

Material/ Reactivos:

- Estufa de vacío LAB-LINE Mod. 3620
- Balanza analítica(Sartorius Analytc)
- Desecador de vidrio
- 3 charolas de aluminio

Procedimiento:

Las charolas de aluminio se colocan en la estufa de vacío (a una presión reducida de 508 mmHg) hasta que estas alcanzan el peso constante (de 2 a 4 horas), el cual fue registrado, enseguida se adiciona la muestra (2-5 g), tratando de que presente la mayor superficie de evaporación, se introduce en una estufa que cuente con un dispositivo para hacerle vacío y que se encuentre entre 60-65 ° C.

Durante el tiempo en que las charolas permanecieron en la estufa de vacío, se realizaron pesadas periódicas de las mismas; sacándolas de la estufa y colocando inmediatamente en un desecador donde permanecían aproximadamente 15 minutos; para posteriormente ser pesadas en una balanza analítica.

Esta actividad se realizó hasta que se alcanzó el peso constante y fue registrado. La determinación se hizo por triplicado.

Cálculos:

Teniendo el peso de la charola con muestra antes y después de secada, y con el peso de la charola sola, se puede hacer la determinación. Generalmente la pérdida

del material que se volatiliza bajo estas condiciones, se le acostumbra denominar como humedad.

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

donde:

P_i = peso charola con muestra antes de secada (en gramos)

P_f = peso charola con muestra después de secada (en gramos)

m = peso de muestra (en gramos)

4.3.5 Determinación de cenizas ⁽³⁷⁾

Fundamento

La determinación de cenizas se basa en la destrucción de la materia orgánica contenida en una matriz alimentaria, considerándose a las cenizas como el residuo inorgánico que queda después de incinerar dicha materia orgánica en la mufla.

Material / Reactivos:

- Mufla Thermolyne, Mod. 1500
- Balanza analítica (Sartorius Analytic)
- Mechero Bunsen
- 3 Crisoles de porcelana
- Desecador de vidrio

Procedimiento:

Previamente se deben de poner a peso constante los crisoles, los cuales se deben colocar en la mufla a una temperatura de 500°C. Al crisol se le coloca de 2-3 gramos de muestra aproximadamente, se pone a carbonizar a la flama de un mechero y bajo

una campana, cuando ya no se presente desprendimiento de humo, se puede introducir el crisol a la mufla, la cual debe encontrarse entre 500-550°C.

Después de aproximadamente 8 horas los crisoles fueron colocados en un desecador por aproximadamente 30 minutos y fueron pesados en la balanza analítica. Posteriormente se realizaron pesadas periódicas de los crisoles hasta que éstos alcanzaron peso constante, los cuales también se registraron. La determinación se hizo por triplicado.

Cálculos: El cálculo de cenizas en términos de porcentaje es el siguiente:

$$\% \text{cenizas} = (P_f - P_o / m) 100$$

donde:

P_f = peso de crisol con la muestra después de incinerada (en gramos)

P_o = peso del crisol vacío a peso constante (en gramos)

m = peso de muestra (en gramos)

4.3.6 Determinación de grasa ⁽³⁷⁾

Fundamento:

Los constituyentes grasos de las materias orgánicas son diversas sustancias lipídicas. El contenido de grasa es aquel que puede ser extraído por los disolventes menos polares como lo son el éter de petróleo y éter etílico. La determinación se basa en la extracción, con una fracción ligera de éter de petróleo o con éter etílico, del material seco y molido en un aparato de extracción continua en el que las gotas condensadas del disolvente caen sobre la muestra contenida en un recipiente poroso o dedal, alrededor del cual pasan los vapores calientes del disolvente.

Material / Reactivos:

- Aparato de extracción Goldfish, LABCONCO Mod 35001-00CV
- Vasos de borde esmerilado Labconco 35051
- Portadedales de vidrio
- Anillos de metalicos para extracción Goldfish
- Tubos recuperadores de disolvente
- Cartuchos de celulosa de 22x80 mm (Whatman)
- Estufa de vacío LAB-LINE, Mod. 3620
- Éter de petróleo
- Balanza analítica (Sartorius Analytic)
- Bomba de recirculación (Little Grant pump mod. 1)

Procedimiento:

Se colocaron los vasos esmerilados en la estufa de vacío hasta que estos alcanzaron peso constante.

Dentro de los cartuchos de celulosa se colocaron de 2 – 5 gramos de muestra seca y molida, se taparon con algodón introduciéndose a los portadedales de vidrio y se colocaron en el compartimiento de extracción Goldfish.

En los vasos esmerilados se colocaron aproximadamente 50 mL de éter de petróleo y fueron colocados con ayuda del anillo metálico en el aparato de extracción, el cual a su vez se conectó con una bomba de recirculación de agua helada.

Finalmente se subió la perrilla de calentamiento del equipo y se trabajó con el control de calentamiento en la posición LOW durante un periodo de 4 horas. Al término de este tiempo se bajaron las parrillas de calentamiento y se sacaron los porta dedales, sustituyéndose por el tubo recuperador de disolvente y se volvió a

colocar nuevamente el vaso para iniciar de nuevo el calentamiento, cuando los vasos se encontraron libres de disolvente, fueron retirados del equipo y colocados durante unos minutos en una campana de extracción, para asegurar la completa remoción del disolvente. Los vasos fueron colocados en la estufa de vacío hasta alcanzar peso constante, el cual se registró. La determinación fue hecha por triplicado.

Cálculos:

Se debe de tener los pesos del recipiente colector tanto antes como después del procedimiento de extracción. A esta determinación se le conoce como extracto etéreo.

$$\%Grasa = (Pf - Po/m) 100$$

donde:

Pf = peso del recipiente después de la extracción (en gramos)

Po = peso del recipiente vacío antes de la extracción (en gramos)

m = peso de la muestra seca (en gramos)

4.3.7 Determinación de fibra cruda⁽³⁷⁾

Fundamento

La determinación popular 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.

Por definición de acuerdo al método Weende, la fibra cruda es la pérdida 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 específicas, de una muestra previamente desengrasada.

Dentro del interés analítico de un alimento, se puede 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 a lo que se denomina fibra cruda.

Para la determinación de fibra de una muestra 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.

Material / Reactivos:

- Aparato de digestión marca LABCONCO
- Embudo buchner con malla metálica tipo California (California buchner funnel LABCONCO No. 26617-032)
- Vasos de Berzelius de 600 mL KIMAX
- Estufa de vacío LAB-LINE, Mod. 3620
- Balanza analítica (Sartorius Analytic)
- Mufla THERMOLYNE, Mod. 1500
- Mechero Bunsen
- Matraces de vidrio Kitasato(Kimax)
- Silicato de aluminio
- Solución de H₂SO₄ al 1.25% (m/v)
- Solución de NaOH al 1.25% (m/v)
- Antiespumante (emulsión SIGMA-B)

- Alcohol etílico

Procedimiento:

La muestra desengrasada obtenida a partir de la determinación de grasa, se paso cuantitativamente a los vasos de Berzelius que contenían 0.5 g de Silicato de aluminio.

A continuación se le adicionaron 200 mL de H_2SO_4 al 1.25% en ebullición, así como unas gotas de antiespumante y perlas de vidrio para controlar la ebullición.

Los vasos se colocaron inmediatamente en el aparato de digestión, él cual estaba previamente calentado, y se dejó digerir por un tiempo de 30 minutos exactos. Después de dicho tiempo se filtró en un embudo california con ayuda de vacío, lavando el residuo con agua destilada caliente, hasta que se eliminó el ácido.

Nuevamente el residuo fue transferido cuantitativamente al vaso Berzelius, y se adicionaron unas gotas de antiespumante y 200 mL de NaOH 1.25% hirviendo y se mantuvieron en el aparato de digestión por 30 minutos exactos. Transcurrido el tiempo se filtró en el mismo embudo buchner california, lavando el residuo con agua caliente, hasta que se logró la eliminación del álcali y finalmente se le agregaron 25 mL de alcohol etílico.

El residuo se pasó a un crisol de porcelana (a peso constante), se colocó en la estufa de vacío para su secado hasta que alcanzó peso constante (se registró el peso del crisol mas residuo digerido).

A continuación se carbonizó la muestra con un mechero y se introdujo en la mufla, los crisoles fueron pesados en diferentes periodos hasta que éstos alcanzaron peso constante registrando el valor obtenido. La determinación se hizo por triplicado.

Cálculos:

$$\%Fibra = (Ps - Pc / m) 100$$

donde:

Ps = peso crisol con residuo después de secado (en gramos)

Pc = peso crisol con residuo después de calcinado (en gramos)

m = peso de muestra (en gramos)

4.3.8 Determinación de proteína⁽³⁷⁾

Fundamento

Se realizó la determinación por el método de Kjeldahl, el cual consiste en una oxidación de la materia orgánica por acción de una mezcla digestiva (H_2SO_4 , H_3PO_4 y $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$) formándose sulfato ácido de amonio por el exceso de ácido en la solución. Posteriormente se lleva a cabo una destilación en la que se libera amoníaco, mediante la adición de NaOH al 40% , el amoníaco liberado será atrapado por ácido bórico para formar borato de amonio el cual se titula con ácido clorhídrico 0.01N. Con lo cual se obtiene el porcentaje de nitrógeno en la muestra, que al multiplicarlo por el factor 6.25 nos da el porcentaje de proteína cruda.

Materiales y reactivos:

- Digestor TECATOR, mod. Ab 20/40
- Microdestilador TECATOR AUTO KJELTEC, No. 1030
- Tubos de digestión de 75 mL
- Mezcla digestiva (3 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 50 mL de H_3PO_4 y 430 mL de H_2SO_4 conc)
- Peroxido de hidrogeno al 30 %
- Sulfato de potasio RA

- Solución de NaOH al 40 %
- Solución de ácido bórico con indicador (se disolvieron 100 g de ácido bórico en 10 L de agua destilada, posteriormente se agregaron 100 mL de verde de bromocresol (100 mg en 100 mL de CH₃CH₂OH), después se adicionaron 70 mL de rojo de metilo(100 mg en 100 mL de CH₃CH₂OH) y finalmente se agitó vigorosamente).
- Solución de ácido clorhídrico 0.01 N valorada

Procedimiento

Se pesaron de 20-80 mg de muestra (dependiendo del contenido de proteína esperado) en papel cebolla y se introdujeron en el tubo de digestión, se adicionaron aproximadamente 0.5 g de K₂SO₄ y 3 mL de mezcla digestiva y se colocaron en el digestor a una temperatura de 370 ° C durante 15 min; pasando este tiempo se sacaron y dejaron enfriar los tubos y se adicionaron 1.5 mL de H₂O₂ 30 % y se colocaron de nuevo en el digestor hasta que terminara la digestión(al quedar el contenido traslúcido o incoloro).

Al terminar la digestión se dejaron enfriar y se les agregaron 25 mL de H₂O destilada y se realizó la destilación en el equipo AutoKjeldahl, el cual dio la lectura de los mL gastados en la titulación de la muestra, los cuales se utilizaron para conocer el % de nitrógeno, contenido en la misma. Además de las muestras se preparó un blanco de glucosa.

Cálculos

$$\% \text{ de Nitrógeno} = ((\text{mL mtra} - \text{mL blanco}) \times \text{N} \times \text{meq} \times 100) / m$$

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

donde:

N = normalidad de la sol de HCl

meq = miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m = peso de la muestra (g)

4.3.9 Determinación de triptofano por hidrólisis alcalina^(13,22)

Fundamento

El método se basa en la condensación del triptófano con el *p*-dimetilaminobenzaldehído en medio ácido. Dicho producto de condensación es tratado con solución de nitrito de sodio, produciéndose una coloración azul proporcional a la cantidad de triptófano presente en la muestra. En la figura 6, que se muestra a continuación, se presenta dicha reacción.

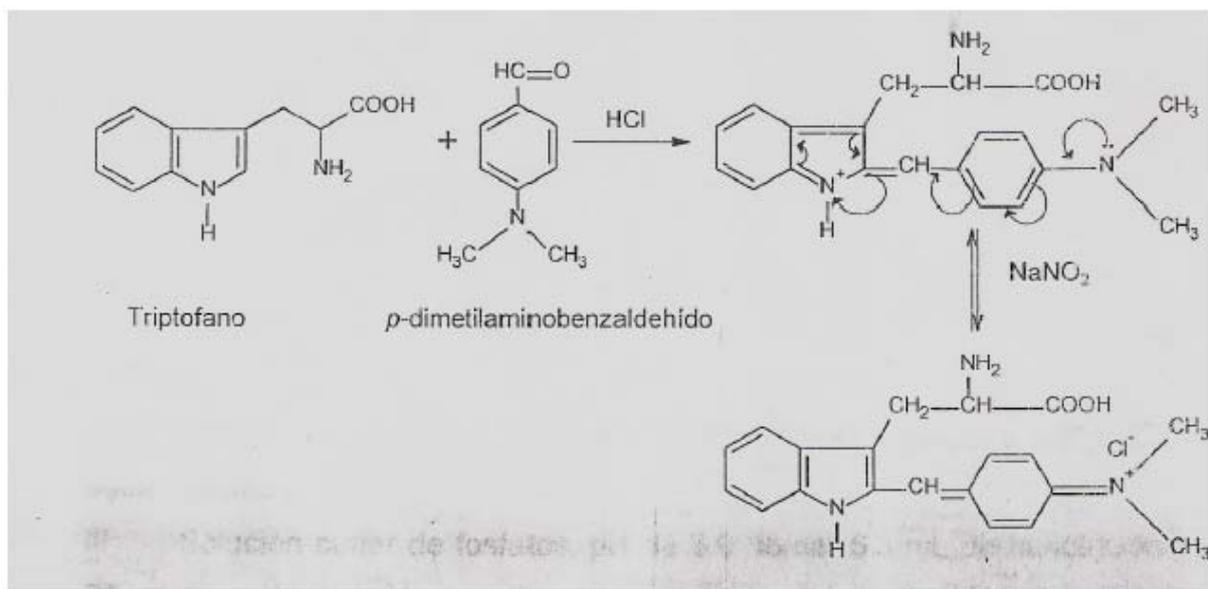


Figura 6. Reacción química para el desarrollo de color del triptófano con *p*-dimetilaminobenzaldehído.

Material y reactivos:

- Digestor marca TECATOR mod. 1001-LTN
- Agitador Vortex marca LAB-LINE INSTRUMENTS, mod. Super-mixer # 1290
- Rotavapor marca BUCHI, mod. R.

- Espectrofotómetro GENESYS 10 Series
- Potenciómetro marca CORNING, mod. 10
- Hidróxido de litio 4 N
- Tubos de cultivo con tapón de rosca y cubierta de teflón marca PYREX No. 9826
- Acido o-fosfórico concentrado
- Buffer de fosfatos pH=7
- Solución lavadora: agua-etanol (3:1, v/v) con hidroquinona al 0.01% como agente antioxidante
- Nitrito de sodio 0.2 %: pesar 200 mg de nitrito de sodio y aforar a 100 mL con agua destilada.
- Solución estándar de triptófano (0.05 mg /mL): pesar 12.5 mg de triptófano y aforar a 250 mL con agua destilada
- p-dimetil-amino-benzaldehido (PDAB) al 0.5 %: pesar 0.5 g de PDAB y disolverlos con HCl concentrado, aforar a 100 mL con HCl concentrado.
- Tubos de ensaye de 16 x 150

Procedimiento:

Se pesó la cantidad de muestra finamente molida (<5% de grasa) dentro del tubo de hidrólisis. A continuación se adicionó con mucho cuidado la cantidad de álcali requerida, para tratar que toda la muestra se humedeciera con dicho reactivo utilizando un agitador mecánico

$$A = 0.1 \times 100 / \% P$$

$$B = 4 \times 100 / \% P$$

Donde: A: cantidad de muestra (g)

B: mL de álcali (LiOH 4N)

% P : porcentaje de proteína en la muestra

se le insufló nitrógeno y se cerraron con tapón de rosca. La hidrólisis se llevó a 145 °C y el tiempo dependía del contenido de proteína en la muestra

contenido de proteína %	tiempo de hidrólisis
9 - 35	8 horas
> 35 – 64	6 horas
> 64 – 91	4 horas

Transcurrido el tiempo de hidrólisis se dejó enfriar el tubo y se trasvasó cuantitativamente el contenido a un vaso de precipitado, dándole algunas lavadas con solución lavadora. Se procedió a ajustar el pH del hidrolizado cerca de la neutralidad con ácido o-fosforico concentrado, con la ayuda de un potenciómetro (6.8 ± 0.2), enseguida se eliminó el precipitado por filtración al vacío sobre papel doble del 50 y se lavó con solución lavadora.

El hidrolizado filtrado se pasó a un matraz de bola y con la ayuda del rotavapor se eliminó el exceso de solvente hasta que se tenía un volumen de hidrolizado < 25 mL. Por último se llevó el volumen del hidrolizado a 25 mL en un matraz aforado y se aforó.

Elaboración de la curva estándar: de 0 a 100 µg de triptofano. Se tomaron 0.0,0.4,0.8,1.2,1.6 y 2.0 mL de sol estándar de triptofano. Se llevaron a 2 mL cada uno de los tubos con agua y se les adicionó 7.5 mL de PDAB, agitándose para después dejarlos 15 min en la oscuridad, se les agregó 0.5 mL de nitrito de sodio, se agitaron nuevamente y se dejaron en reposo por 15 min. Pasado el tiempo se leyeron las absorbancias a 590 nm.

Se tomaron tres alícuotas de 2 mL cada una. Un tubo fue el blanco de la muestra y a este se le adicionaron 7.5 mL de HCl conc, en tanto que a los otros dos se les adicionó 7.5 mL de PDBA, se agitaron y se dejaron reposar 15 min en la oscuridad, después de ese tiempo se les agregó 0.5 mL de nitrito de sodio, agitándose y dejando 15 min en oscuridad. Pasando el tiempo se leyeron las absorbancias a 590 nm.

Cálculos

A los tubos problema se les restó la absorbancia del blanco de la muestra y el resultado se interpoló en la curva estándar, considerando el aforo y la alícuota utilizada.

Recordando que para reportar el triptófano en g/100 g de proteína fue necesario conocer el porcentaje de proteína de la muestra.

$$\text{g de triptófano /100 g muestra} = (\delta \times A \times 100 / a \times M) \times (1/ 10^6)$$

donde:

δ = μg de triptófano obtenido por interpolación

A = aforo

a = alícuota

M = peso de la muestra (g)

$1/10^6$ = factor de conversión de μg a g

$$\text{g de triptófano /100 g proteína} = (\text{g triptófano/ 100 g mtra})(100 \text{ g mtra/ \%} \\ \text{proteína})$$

4.3.10 Determinación de metionina⁽¹⁴⁾

Fundamento

Este método colorimétrico para la determinación de metionina en proteínas se basa en el color rojo formado cuando una solución alcalina de metionina y nitroprusiato de sodio es acidificado, utilizando una hidrólisis ácida y la adición de glicina para eliminar los efectos producidos por el triptófano y la histidina sobre la determinación.

Materiales y Reactivos

- Digestor marca TECATOR mod. 1001-LTN
- Agitador Vortex marca LAB-LINE INSTRUMENTS, mod. Super-mixer # 1290
- Rotavapor marca BUCHI, mod. R.
- Potenciómetro marca CORNING, mod. 10
- Espectrofotómetro GENESYS 10 Series
- Tubos de cultivo con tapón de rosca y cubierta de teflón marca PYREX No. 9826
- Ácido o-fosfórico concentrado
- Matraz de bola de 50 mL para el rotavapor
- Solución lavadora: agua-etanol (3:1, v/v)
- Nitroprusiato de sodio 10 %
- Solución estándar de metionina (1 mg /mL): se disolvió 100 mg de metionina en 5 mL de HCl 6N y se aforó a 100 mL con agua destilada.
- NaOH 5 N
- HCl 6 N
- Solución de Glicina al 3 %

- Solución A (se pesó la cantidad de los siguientes aminoácidos (en mg): Alanina 20, arginina 48, ác. Aspartico 60, Cystine 10, Glicina 5, Ac. Glutámico 210, Histidina 30, Hidroxipolina 10, Isoleucina 50, Leucina 100, Lisina 60, Fenilalanina 40, Prolina 80, Serina 60, Treonina 45, Triptofano 12, Tirosina 65, Valina 60; se disolvieron en poco HCl 6N y se aforó a 100 mL).
- Tubos de ensaye de 16 x 150

Procedimiento:

Se pesó la cantidad de muestra finamente molida (<5% de grasa) dentro del tubo de hidrólisis. A continuación se le adicionó con mucho cuidado la cantidad de HCl 6 N requerido, tratando que toda la muestra se humedeciera con dicho reactivo utilizando un agitador mecánico

$$A = 0.1 \times 100 / \% P$$

$$B = 4 \times 100 / \% P$$

Donde: A: cantidad de muestra (g)

B: mL de ácido (HCl 6N)

% P : porcentaje de proteína en la muestra

se le insufló nitrógeno y se cerraron con tapón de rosca. La hidrólisis se realizó a $145\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4 horas.

Transcurrido el tiempo de hidrólisis se dejó enfriar el tubo y se trasvasó cuantitativamente el contenido a un matraz de bola de 50 mL, dándole algunas lavadas con solución lavadora. Con la ayuda del rotavapor se eliminó el exceso de solvente para poder llevar a sequedad (cuidando de no excederse un tiempo mayor a 30 min). Se le adicionó agua destilada caliente al matraz para disolver la muestra añadida en él y se procedió a eliminar el precipitado por filtración al vacío sobre

papel doble Whatman #50. Por último se ajustó el pH a 6.5-7 y se llevó el volumen del hidrolizado a 25 mL en un matraz aforado.

Elaboración de la curva estándar: de 0.1 a 2 mg de metionina. Se colocaron 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5 y 2.0 mL de sol estándar de metionina en tubos de ensaye y se les adicionó a cada tubo 2 mL de la solución A. Se llevaron a 5 mL cada uno de los tubos con agua y se les adicionó 1 mL de NaOH 5N. Se agitaron y se les adicionó 0.1 de nitroprusiato de sodio 10 %. Se colocaron en un baño a 30 °C por 10 min, se les adicionó 2 mL de glicina 3%, se agitaron y dejaron reposar por otros 10 min a 30°C., para después agregarles 2 mL de ácido fosfórico, se agitaron y dejaron reposar 5 min y posteriormente se leyeron las absorbancias a 510 nm.

Se tomaron tres alícuotas de 4 mL cada una. Un tubo fue el blanco de la muestra, al cual se le adicionaron 1 mL de agua y 1 mL de NaOH, en tanto que a los otros dos se les adicionó 1 mL de agua, 1 mL de NaOH y 0.1 mL de nitroprusiato, se agitaron y se procedió a realizar el mismo procedimiento que para la curva estándar.

Cálculos

A los tubos problema se les restó la absorbancia del blanco de la muestra y el resultado se interpoló en la curva estándar, considerando el aforo y la alícuota utilizada.

Recordando que para reportar la metionina en g/100 g de proteína fue necesario conocer el porcentaje de proteína de la muestra.

$$\text{g de metionina /100 g muestra} = (\delta \times A \times 100 / a \times M) \times (1/ 10^3)$$

donde:

δ = mg de triptófano obtenido por interpolación

A = aforo

a = alícuota

M = peso de la muestra (g)

$1/10^3$ = factor de conversión de mg a g

$$\text{g de metionina /100 g proteína} = \frac{(\text{g metionina/ 100 g mtra})(100 \text{ g mtra/ \% proteína})}{\text{proteína}}$$

4.3.11 Inhibidores de tripsina⁽²¹⁾

Fundamento

La técnica de Kakade se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso de la muestra sobre una solución estándar de Tripsina.

El extracto directo o diluido se pone en contacto con una solución estandarizada de tripsina, y después de cierto tiempo se determina la actividad proteolítica remanente, por medio de un sustrato sintético (BAPNA), el cual produce una coloración que se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm. Dicha coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores en la muestra. Y por definición una unidad de actividad de tripsina(UT) es equivalente a 0.01A.

Material y reactivos:

- Potenciómetro marca CORNING, mod. 10
- Parrilla de múltiple agitación marca CORNING STIRRER
- Baño Maria.
- Espectrofotómetro GENESYS 10 Series
- NaOH 0.01N
- HCl 0.001N
- Ácido acético 30%

- Solución amortiguadora TRIS (hidroximetil-amino-metano) pH 8.2, 0.05M (se pesaron 6.05 g de TRIS y 2.94g de cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), se disolvieron en 900 mL de agua destilada y se ajustó el pH a 8.2 que enseguida se aforó a un volumen de 1L)
- Solución estándar de Tripsina bovina (SIGMA # T-8253) (100 mg de BAPNA se disolvieron en 2.5 mL de dimetilsulfóxido y que se diluyeron en 250 mL con amortiguador TRIS previamente calentado a 37°C).
- Solución BAPNA (benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida-HCl) (SIGMA B-4875) (se pesaron 4 mg de tripsina bovina y se disolvieron en 200 mL de HCl 0.001N).

Procedimiento

a) Preparación del extracto

Se pesaron un gramo de la muestra finamente molida en un vaso de precipitados, se le adicionaron 45 mL de NaOH 0.01N, se ajustó el pH de esta suspensión a 9.6 ± 0.2 y se aforó con NaOH 0.01 N a 50 mL. Enseguida se pasó a un vaso que contenía un magneto para agitar la suspensión por espacio de 2 ½ hrs a 300 r.p.m. Después de dicho tiempo se detuvo la agitación, dejando reposar por 30 min. Y por simple decantación se obtuvo el sobrenadante desechándose el residuo insoluble. El sobrenadante debía ser diluido hasta el punto que 1.0 mL produzca una inhibición de 40-60% para reducir la desviación estándar relativa.

b) Determinación de la actividad

Porciones de 0.0, 0.6, 1.0, 1.4 y 1.8 mL de extracto directo o diluido se pipetearon a tubos de ensaye por duplicado (2 series de 5 tubos) ajustándose el volumen a 2.0 mL con agua destilada. Se introdujeron a baño maría a 37°C. A una serie de los 10

tubos se les adicionó 2.0 mL de solución estándar de tripsina (previamente mantenida a 37°C) a cada tubo, se agitó y se mantuvo el contacto inhibidor-tripsina por espacio de 10 min en el baño a 37°C. A continuación se le adicionaron 5.0 mL de solución de BAPNA (previamente mantenida a 37°C), se agitó y se mantuvo dicha mezcla de reacción por 10 min exactos (con cronómetro) en el baño a 37°C. La reacción enzimática se detuvo por la adición de 1.0 mL de ácido acético al 30% agitándose inmediatamente.

A la segunda serie de tubos se les hizo el mismo tratamiento, sólo que, en este caso los reactivos (estándar de tripsina, ácido acético al 30% y BAPNA) se adicionaron sucesivamente, sin espacio de tiempo entre las adiciones y agitando inmediatamente terminada la adición del BAPNA, cada tubo de esta serie fue el blanco respectivo de la primer serie.

Figura 5. Procedimiento general de la metodología

CLAVE	mL Extracto	mL Agua	mL Estándar Tripsina		mL BAPNA		mL a.A.
B1	1.8	0.4	2.0 + 1 a.A.	10min	5	10min	-
1	1.8	0.4	2.0		5		1
B2	1.4	0.6	2.0 + 1 a.A.		5		-
2	1.4	0.6	2.0		5		1
B3	1.0	1.0	2.0 + 1 a.A.		5		-
3	1.0	1.0	2.0		5		1
B4	0.6	1.4	2.0 + 1 a.A.		5		-
4	0.6	1.4	2.0		5		1
B referencia (tripsina)	0.0	2.0	2.0 + 1 a.A.		5		-
Referencia (Tripsina)	0.0	2.0	2.0		5		1

B (Blanco)

a.A. (ácido acético al 30%)

La lectura en el espectrofotómetro se realizó a 410 nm y se registró. El tubo que no contenía extracto fue la referencia (40 µg de tripsina/10 mL), sobre el cual se basaron los cálculos.

Cálculos

Una unidad de tripsina (UT) es arbitrariamente definida como un incremento de 0.01 unidades de Abs a 410 nm por 10 mL de mezcla de reacción. Así la lectura de Abs. (A) se puede pasar directamente a UT, así que $UT = Abs \times 100$.

Debido a que se tiene una serie de alícuotas del extracto, se tendrían entonces una serie de valores de U.T. Estos valores de U.T. deben ser restados al valor de referencia (0.0 mL de extracto, 40 μ g tripsina/100 mL) para así obtener el valor de unidades de tripsina inhibida (U.T.I.). Después calcular el valor de U.T.I./mL de cada una de las alícuotas tomadas del extracto y calcular el promedio de U.T.I./mL. La actividad de inhibidores de tripsina se expresa en términos de U.T.I./g muestra.

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

Donde:

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

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

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

50mL = del primer aforo realizado con NaOH 0.01N

1000mg = 1g de muestra que se peso para preparar el extracto (si no se peso exactamente 1g de muestra entonces se procede a realizar la relación necesaria para reportar el resultado con respecto a 1g)

Donde:

A_i = Aforo

A_i = alícuota

4.3.12 Determinación del proceso óptimo de cocción

Se llevó a cabo un seguimiento en el contenido de lectinas presentes en las muestras después de someterlas al proceso de cocción a diferentes tiempos, así como también el contenido de inhibidores de tripsina, triptofano y metionina existentes en las mismas, con lo cual se pretende encontrar el proceso adecuado, en donde se presente la eliminación o casi completa inactivación de los factores tóxicos más relevantes y la mínima disminución del contenido de los aminoácidos indispensables limitantes termolábiles.

4.3.13 Determinación de la Relación de Eficiencia Proteínica (REP)⁽³⁸⁾

Como fase final de este trabajo de investigación, se procedió a realizar un ensayo biológico, con el fin de corroborar los resultados obtenidos del punto óptimo de cocción con parámetros químicos analíticos.

Elaboración de dietas para la prueba biológica

Para la preparación de las dietas utilizadas en el ensayo, se determinó a cada una de las muestras el análisis proximal para poder ajustar los nutrimentos a la composición de la dieta de referencia y hacer las comparaciones pertinentes.

Se prepararon las siguientes dietas (de manera que fueran isoproteicas e isocalóricas, partiendo del análisis proximal realizado previamente):

- Dieta de Referencia (Caseína con un nivel del 10% de proteína)
- Dieta de frijol Crudo
- Dieta de frijol cocido 15 min
- Dieta de frijol cocido 30 min
- Dieta de frijol cocido 60 min
- Dieta de frijol cocido 120 min
- Dieta de frijol cocido 120 min con metionina

Cabe mencionar que la dieta con metionina se preparó y se utilizó una semana después de empezar con el ensayo, ya que al observar durante toda esa semana el comportamiento de los animales, se notó que no había un incremento en peso de los animales alimentados con la dieta de 120 min, es por ello que se preparó dicha dieta con el fin de comparar los resultados con los de la dieta sin metionina.

Material requerido para la preparación de la dieta:

- Balanza granataria
- Recipientes para pesar
- Caseína MP Biomedicals inc. LLC, 960128
- Sacarosa comercial Cucurumbe®
- Glucosa USP Comercial Química BARSÁ S. de R.L.
- Dextrina Maizena®
- Aceite de maíz Patrona®
- Manteca vegetal INCA®
- Mezcla de vitaminas MP Biomedicals inc. LLC, 904654
- Mezcla de minerales MP Biomedicals inc. LLC, 902842
- Colina
- Celulosa SIGMA C-8002

Procedimiento de preparación de dietas:

Se prepararon las dietas con frijol crudo y procesado. Es importante que las dietas estén correctamente preparadas. Para que las dietas sean isocalóricas e isoproteicas con respecto a la dieta de referencia (caseína) fue necesario tener el análisis proximal de las muestras, el cual se presenta en la tabla 9 de resultados. Con ello se realizaron los cálculos pertinentes para obtener así la siguiente formulación de las dietas, basándose en la dieta de referencia.

Tabla 5. Dietas de referencia y de frijol peruano utilizadas para el bioensayo

Ingredientes	Caseína (82.4 % de proteína)	Frijol Crudo	Frijol Cocido 15 minutos	Frijol Cocido 30 minutos	Frijol Cocido 60 minutos	Frijol Cocido 120 minutos	Frijol Cocido 120 minutos con Metionina
Fuente de proteína	12.14	52.88	50.33	49.04	49.31	50.20	50.20
Sacarosa	22.00	10.73	10.94	11.20	11.12	10.63	10.63
Glucosa	19.00	9.26	9.45	9.67	9.60	9.18	9.18
Dextrina	25.00	12.19	12.43	12.72	12.63	12.08	12.08
Manteca vegetal	8.00	7.66	7.63	7.65	7.67	7.62	7.62
Aceite de maíz	6.00	5.74	5.72	5.74	5.76	5.72	5.72
Mezcla de minerales	4.00	2.02	2.06	2.05	2.09	1.99	1.99
Mezcla de vitaminas	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Colina	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
Celulosa	1.50	-----	-----	-----	-----	0.18	-----
Metionina							0.20
Total	100.00	102.88	100.96	100.47	100.58	100.00	100.02

Nota: Los valores están expresados en g /100 g de dieta aproximadamente

Una vez elaboradas las dietas fue necesario realizar la determinación de proteína en éstas, así como su densidad calórica con el fin de corroborar que fueran isoproteicas e isocalóricas (ver **ANEXO II**).

Selección y Preparación de los animales

Para el método de REP se acepta que la ganancia en peso de los animales de ensayo provee una medida confiable del valor nutricional de la fuente de proteína de una dieta; sin embargo, ya que factores tales como edad, sexo, periodo de ensayo, nivel de proteína entre otros, definitivamente afectan la determinación del REP, a continuación se mencionan los mínimos requerimientos para llevar a cabo este bioensayo.

Se deben emplear ratas macho Wistar o Sprague Dowley ya que los expertos en estos bioensayos manifiestan que en los estudios de nutrición realizados con estas especies de roedor, su crecimiento refleja fielmente la calidad nutricional de su alimentación; además las ratas son poco sensibles a los factores ambientales e infecciosos a diferencia de otros roedores. Las ratas deben ser de 21 a 23 días de edad (recién destetadas) y el intervalo de peso de las ratas no debe rebasar los 10 gramos.

El periodo de ensayo va de 21 a 28 días y deben mantenerse con alimento y agua *ad libitum*, en condiciones de 12 horas de iluminación por 12 horas de oscuridad con una temperatura de 23 a 24 °C ,y una humedad relativa entre 30 a 35 %.

Reactivos y material especial

- Dieta de referencia (caseína)
- Dietas de la fuente de proteína a evaluar (isoproteínicas e isocalóricas)
- Jaulas individuales de acero inoxidable
- Comederos y bebederos
- Balanza granataria para pesar animales pequeños de laboratorio
- Balanza analítica (SARTORIUS ANALITYC)
- Papel manila
- Cernidor (de 2 ± 0.5 mm de abertura)
- Franela o trapo limpio

Procedimiento

El numero de ratas para cada lote de la dieta de estudio y la de control (caseína) fue de 6 ratas por lote (a excepción del frijol crudo que solo fueron 4). Todos los animales se pesaron y después se ordenaron los pesos de forma ascendente:

$P_1, P_2, P_3, P_4, P_5, P_6, P_7, P_8, P_9, \dots, P_n$

Se colocaron los animales en las jaulas individuales del estante metálico, siguiendo la distribución de culebra japonesa como se indica a continuación:

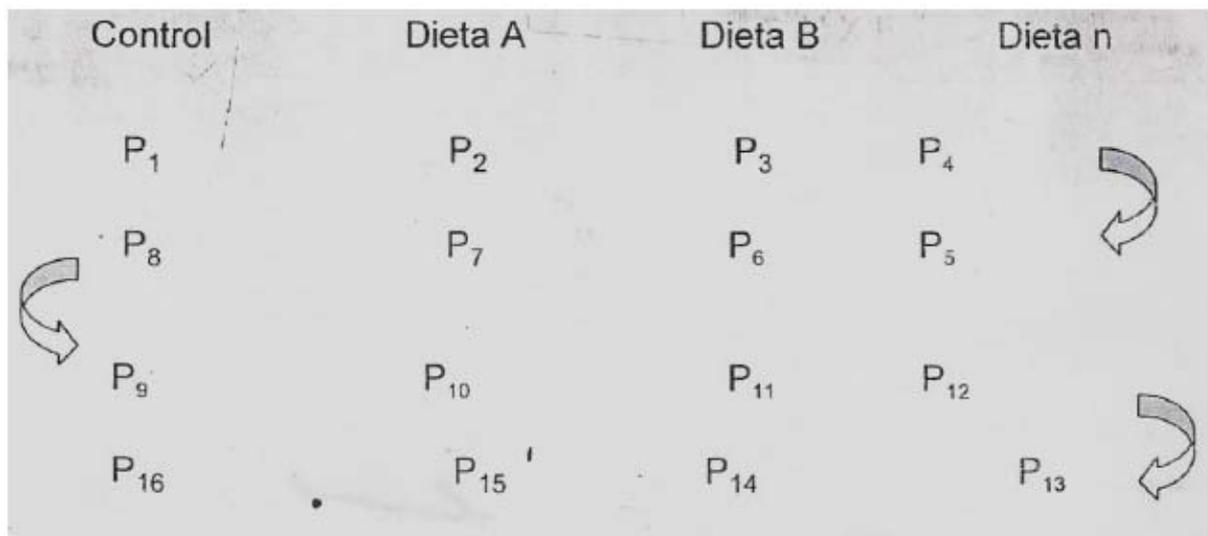


Figura 7. Culebra Japonesa

Una vez distribuidos los animales en las jaulas individuales se les colocó el comedero con la dieta correspondiente, en cantidad que siempre contuvo exceso de alimento para que su consumo fuera *ad libitum*, lo mismo se debe hacer con el bebedero. Como las ratas al alimentarse tienden a desperdiciar alimento, fue conveniente colocar debajo de cada jaula una charola hecha con papel manila para recuperar este alimento separándolo de las heces con la ayuda de un cernidor y considerar el alimento real ingerido. Los animales se pesaron cada tercer día y se registró el peso de cada rata y el alimento ingerido considerando el alimento recolectado de la charola de papel manila. Esto se realizó durante los 21 días que duró el experimento.

Para llevar a cabo el control de datos, fue necesario contar con un formato para anotar adecuadamente los resultados obtenidos a través del periodo de experimentación (Ver **Anexo I**).

Cálculos

Contando con los resultados al final del experimento, se procedió a calcular el REP de cada uno de los animales, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{REP} = \Delta P / \Sigma AI \times F$$

Donde:

ΔP = Incremento de peso (expresado en gramos)

ΣAI = Alimento ingerido acumulado o total (expresado en gramos)

F = factor de conversión unitario de alimento a proteína

Ya que los métodos biológicos con mucha frecuencia presentan variación interlaboratorios, no es sorprendente que exista una variación considerable entre laboratorios, en la obtención del valor absoluto de una variable biológica y como el REP no es la excepción, algunos investigadores han sugerido expresar el valor del REP en términos de Relación de Eficiencia Proteica ajustada o corregida (REP_a); para lo cual, es necesario contar con el valor experimental de este índice biológico del lote de animales alimentados con la dieta de caseína (referencia) que cumplan los requisitos mínimos de experimentación. Se le ha asignado un valor estandarizado de REP de 2.5 a la proteína de referencia; por tal motivo, es conveniente informar el resultado en términos de REP_a :

$$\text{REP}_a = \text{REP prueba} (\text{REP CASEINA}_{\text{std}} / \text{REP CASEINA}_{\text{exp}})$$

Donde:

REP PRUEBA = REP experimental de la proteína a evaluar

REP (CASEINA)_{std} = REP de caseína estandarizado = 2.5

REP (CASEINA)_{exp} = REP de caseína obtenido en el presente experimento

4.3.14 Determinación de la Densidad Energética de Alimentos

Fundamento

Los organismos vivos y específicamente el hombre necesita de energía para desempeñar sus actividades diarias aun estando en reposo absoluto como dormir. Una forma práctica de obtener el contenido energético o densidad calórica de un alimento o dieta es utilizando el método directo con una bomba calorimétrica, la cual determina la energía liberada por la completa oxidación del alimento (Energía Bruta o gruesa), siendo que el cuerpo la realiza de forma incompleta⁸. El principio esta basado en la primera ley de la termodinámica: " la energía en cualquier proceso físico o químico no se crea ni se destruye", ya que hay una conversión de la energía química en la producción de energía térmica, la cual se detecta por el cambio en la temperatura.

Material y reactivos:

- Acido benzoico (Patron de referencia cuyo valor calórico estaba certificado)
- Desecador de vidrio
- Balanza analítica (SARTORIUS ANALITYC)
- Estufa de secado a presión reducida BLUE M
- Mecha de algodón de 75 mm de longitud
- Crisol de acero inoxidable de 25.4 mm de diámetro

⁸ En especial para el caso de las proteínas, ya que parte del nitrógeno de las proteínas ingeridas son excretadas como urea, ácido úrico y creatinina en la orina.

- Mango metálico compactador
- Bomba calorimétrica balística GALLENKAMP

Procedimiento:

Se pesaron aproximadamente 800 mg de muestra para las dietas, se colocaron en un crisol metálico a peso constante junto con la mecha de algodón, y se procedió a pesar cada crisol, el peso se registró el cual correspondía al peso preliminar (Pp). Se compactaron las muestras con el mango metálico de forma que quedara lo más uniforme posible y un extremo de la mecha dentro de éstas, y se volvió a pesar el crisol con la muestra compactada, el cual fue el peso final (Pf).

Se colocaron los crisoles de uno en uno en la base superior del pilar central de la bomba y se introdujo la punta suelta de la mecha en el alambre de ignición, se cerró el cilindro con el capuchón de forma tal que quedara un cierre hermético y se colocó el sensor del termopar en el orificio del capuchón. Se utilizó un cilindro de oxígeno para que se tuviera una presión en la bomba de 25 bars de 20 a 30 segundos, alcanzada la presión se cerró la válvula de paso y se ajustó el indicador del galvanómetro a cero, mantenidas las condiciones por 10 segundos se oprimió el botón de ignición y comenzó la combustión que dio una lectura máxima en el galvanómetro, la cual se registró. Se desconectó el sensor, se liberaron los gases y se quitó el capuchón para atemperarlo con agua fría para la siguiente determinación.

La determinación se hizo para cada dieta y se realizó por triplicado.

Cálculos:

Se utilizó una curva de calibración de ácido benzoico (**ANEXO IV**), donde las lecturas que se obtuvieron para la combustión del ácido benzoico, se convirtieron los gramos del ácido a kj y kcal, siendo que 1g de ácido benzoico = 26454.3 joules=26.45 kj y 4.1868 kjoules = 1 kcal., con estos datos se trazó la curva de contenido calórico en kj (abscisas) vs lectura del galvanómetro (ordenadas) y solo se interpoló la densidad calórica de cada muestra.

La densidad calórica de la muestra se calculó de la siguiente forma:

$$\text{kj / 100g de muestra} = \text{Lectura (kj)} \times 100 / \text{peso de la muestra (g)}$$

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Contenido de lectinas en variedades de frijol comercial

De acuerdo con estudios anteriormente realizados (8), se conoce que las variedades de *P. vulgaris* con la mayor cantidad de lectinas son el frijol Peruano y el frijol Mayocoba, por lo que fueron seleccionadas dichas variedades de frijol comercial para comenzar con dicha investigación.

Se realizó la determinación semicuantitativa de lectinas por triplicado como mínimo para cada muestra, lo que permitió seleccionar una de ellas, así, la que tuviera el mayor título en la determinación sería la muestra que se utilizaría para el desarrollo de este trabajo.

Los datos obtenidos para este análisis se muestran en la tabla 6, en los que se consideró como título el valor de la mediana.

Tabla 6. Contenido de Lectinas en las muestras de frijol comercial

Frijol Comercial	Marca	Contenido de			Lectinas	
		Títulos				Título ^a
Peruano	Morelos	35	32	30	32	401.72 ± 0.56
	Amarillo	29	33	32	32	401.62 ± 0.46
Mayocoba	El labrador	19	21	20	20	-----
	La merced	18	20	19	19	-----

^a Valor de la máxima dilución que manifiesta prueba positiva de hemaglutinación, expresado como la mediana de la determinación (determinación semicuantitativa)

^b Valor expresado en unidades de hemaglutinación (UHG)/g muestra. 1 UHG equivale a 1 mg de faseolotoxina (SIGMA # L-8754) (determinación. cuantitativa)

se puede observar que la muestra de frijol Peruano Morelos y frijol Amarillo son las que presentan el título mayor (notándose que tienen el mismo valor), así que se podría haber escogido cualquiera de ellas, sin embargo se optó por realizar la determinación cuantitativa de lectinas para observar de forma más clara el contenido real de éstas (tabla 6), el cual se reportó en unidades de hemaglutinación por gramo

de muestra (UHG/g de muestra), donde 1 UHG es equivalente a 1 mg de faseolotoxina(SIGMA # L-8754). Solo se consideró este análisis para las muestras del frijol Peruano ya que presentaron el título más alto en la prueba semicuantitativa.

5.2 Selección de la muestra

Para la selección de la muestra se tomó en cuenta el contenido de lectinas presente en ella, donde el valor expresado en UHG/g muestra, tenía que ser el mayor de forma tal que al aplicar los tratamientos térmicos se tuviera un mayor rango y así poder observar gradualmente la disminución en el contenido de lectinas. Como se puede observar en la tabla 6, no hay diferencia entre las dos muestra en cuanto al contenido de lectinas por lo que se podía haber trabajado con cualquiera de ellas, sin embargo también había que tomar en cuenta que se contara con la cantidad suficiente de muestra para el desarrollo de la investigación.

Dicho lo anterior, se tiene entonces que la muestra con la que se realizaron los procesos térmicos fue el frijol comercial Peruano de la marca Morelos, el cual además de tenerse en mayor cantidad, contiene la mayor cantidad de lectinas (401.72 UHG/g muestra).

5.3 Evaluación de Factores Tóxicos, Antinutricionales y Calidad Nutritiva de los Procesamientos Térmicos

Con la muestra ya una vez seleccionada, se realizaron los procesos de cocción y preparación del material cocido citados anteriormente y se procedió a realizar la determinación cuantitativa de lectinas siguiendo el sistema de microtitulación seriada **(9)**, los resultados obtenidos de esta determinación se muestran en la tabla 7, donde se puede observar que desde el proceso de cocción de 15 minutos ya la cantidad de lectinas es muy baja y además ya no variaba en los siguientes procesos de cocción. Ahora bien, al llevar a cabo la determinación de Inhibidores de Tripsina **(21)** para observar si ocurría lo mismo o si se observaba un descenso gradual en el contenido

de éstos, se encontró que para el caso del frijol crudo la cantidad que se tiene de Inhibidores ya es muy baja, de 2.61 UTI/mg muestra, y conforme a la técnica de Kakade utilizada, valores por arriba de 10 UHT/mg muestra son de interés y valdría hacer el seguimiento, es por ello que a pesar de que se realizaron las determinaciones correspondientes, no se tomaron en cuenta los valores obtenidos para los procesamientos (tabla 7).

Tabla 7. Factores Tóxicos y Antinutricionales en el frijol Peruano crudo y procesado

<i>Proceso térmico</i>	<i>SIGLAS</i>	<i>Contenido de Lectinas</i>	<i>Inhibidores de Tripsina</i>
		<i>UHG/g muestra^a</i>	<i>UTI/mg muestra^b</i>
Frijol Crudo	FCR	401.72 ± 0.56	2.61 ± 0.25
Frijol Cocido 15 min	FC15	0.148 ± 0.09	1.19 ± 0.11
Frijol Cocido 30 min	FC30	0.144 ± 0.17	1.08 ± 0.22
Frijol Cocido 60 min	FC60	0.147 ± 0.18	1.24 ± 0.25
Frijol Cocido 120 min	FC120	0.141 ± 0.12	1.09 ± 0.09

^a Valor expresado en unidades de hemaglutinación (UHG/g muestra), 1 UHG equivale a 1 mg de faseolotoxina (SIGMA # L-8754)

^b Valor expresado en unidades de tripsina inhibida (UTI/ mg muestra)

Con lo que respecta al contenido de hemaglutininas, como ya se menciono desde los 15 min el contenido es muy bajo y es que se ha reportado que al trabajar con frijol pinto y darle un cocimiento a ebullición y a presión se requirió 15 y 5 minutos respectivamente para eliminar la actividad aglutinante con un proceso de cocción (20). Así que probablemente se hubiera observado un descenso gradualmente si los procesamientos se hubieran llevado a cabo en un tiempo menor a los 15 minutos.

Para la evaluación de la calidad nutritiva, se tomó en cuenta el contenido de metionina biodisponible (14) y del triptofano (13,22), los resultados obtenidos en estas determinaciones se muestran en la tabla 8 (Curvas de calibración en ANEXO III).

Tabla 8. Evaluación de la Calidad nutritiva en el frijol Peruano crudo y procesado

<i>Proceso térmico</i>	<i>SIGLAS</i>	<i>Contenido de Metionina^a</i>	<i>Contenido de Triptofano^a</i>
		<i>g Metionina /100 g proteína</i>	<i>g Triptofano /100 g proteína</i>
Frijol Crudo ^b	FCR	1.89 ± 0.0721 a	0.86 ± 0.1274 a
Frijol Cocido 15 min	FC15	1.45 ± 0.0281 b	1.22 ± 0.0618 b
Frijol Cocido 30 min	FC30	1.39 ± 0.0252 bc	1.15 ± 0.0355 bc
Frijol Cocido 60 min	FC60	1.37 ± 0.0153 c	1.09 ± 0.0640 bc
Frijol Cocido 120 min	FC120	1.13 ± 0.0400 d	1.06 ± 0.048 c

^a Se muestran los valores promedio ± desviación estándar (n=3), CV<5%.

Diferentes letras dentro de las columnas indican diferencia estadísticamente significativa.

^b Valores reportados de metionina y triptofano son 0.45-2.09, 0.51-1.62g/100prot., respectivamente.
Fuente (11)

En la figura 8 se presenta de forma gráfica los valores de lectinas, de metionina y de triptófano para cada uno de los procesamientos térmicos, con lo cual se puede apreciar de forma más clara el efecto que tienen los mismos tanto en los factores tóxicos como en la calidad nutritiva, notándose que hay una tendencia de disminución conforme aumenta el tiempo de cocción.

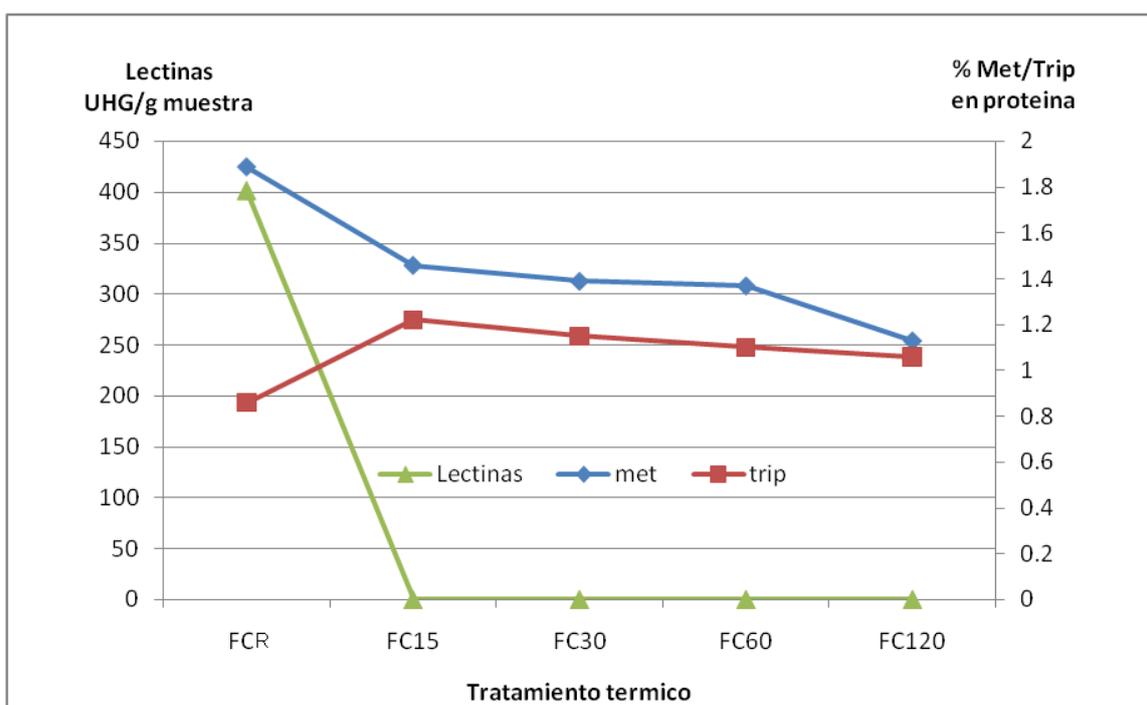


Figura 8 Presentación simultánea del descenso del nivel de lectinas y contenido de metionina y triptofano bajo los diferentes procesamientos del frijol seleccionado

5.4 Selección del procesamiento óptimo

Para seleccionar el procesamiento óptimo se debe tomar en cuenta aquel tratamiento que presente el mayor grado de inactivación de las aglutininas presentes en la muestra original, sabiendo que por estudios anteriores han determinado como nivel mínimo de lectinas que no producen daños clínicos, ni subclínicos valores menores de 1 UHG/ g muestra(23). A la par dicho tratamiento debe mantener en la muestra una buena calidad nutritiva, que para este estudio se midió en base al contenido de Metionina y de Triptofano.

Con base a lo mencionado anteriormente se tiene que todos los procesamientos realizados (FC15, FC30, FC60 y FC120) presentan ya un nivel bajo de lectinas y de Inhibidores de tripsina, por lo que se podría escoger cualquiera de ellos ya que en todos ya no existe riesgo de estos factores tóxicos, sin embargo a pesar de esta importante mejoría producida por el proceso de cocción, también existe el riesgo de pérdida de calidad nutritiva por exceso de cocción ya que tienen lugar diversas reacciones químicas que conducen a un descenso en la calidad de la proteína. Dentro de las que se pueden mencionar las que se llevan a cabo entre aminoácidos y azúcares presentes (Reacción de Maillard), así como aquellas que conducen a la destrucción de aminoácidos sensibles al procesamiento térmico, por ello se determino la cantidad de metionina y de triptófano.

Ahora bien al medir la cantidad de metionina y de triptófano para observar la calidad de la proteína, se tiene que tanto para el caso de metionina como de triptófano, todos los procesamientos presentan diferencia significativa con respecto a la muestra cruda (tabla 8), esto es que desde los quince minutos de cocción ya se encuentra una pérdida significativa del aminoácido limitante metionina y conforme aumenta el tiempo de cocción va disminuyendo este aminoácido. Mientras que para el caso del triptófano se obtuvo un valor menor en el frijol crudo que en los

procesados, y de acuerdo con la bibliografía se ha reportado que una de las proteínas presentes en el frijol es la globulina donde una fracción de ella es una proteína resistente aun al tratamiento con el álcali a pH 12.5 durante 24 horas y solo le provoca una ligera disociación(7), además se encontró que por efecto de la cocción sobre las globulinas G1 y G2 la digestión de sus aminoácidos alcanzo respectivamente valores de 56 y 82 % en relación al de la caseína(15), por lo que se podría decir que dicho aminoácido se encuentra presente en esta parte de la proteína del frijol por ello es que al realizar la determinación de triptófano en el frijol crudo el valor es menor y aumenta cuando se lleva a cabo la cocción, ya que se ha reportado que la globulina G1 es la proteína mejor digerible después de su desnaturalización, incrementando la calidad de la proteína después del cocimiento(20); sin embargo al igual que la metionina después de los quince minutos de cocción va disminuyendo el contenido de triptófano conforme se aumenta el tiempo de cocción.

Así que para lograr escoger uno de los tratamientos se tomó en cuenta solo los valores obtenidos de metionina ya que por parte del triptófano no se puede observar si hay una pérdida significativa en cuanto al valor del frijol crudo ya que es menor; además el hecho de haber determinado metionina en las muestras cocidas es que se conoce que los aminoácidos azufrados son deficientes en las leguminosas, siendo la metionina el aminoácido limitante en ellas, y pierde su valor nutritivo durante el procesado y almacenamiento del alimento (en este caso el frijol) como otros aminoácidos ya que ocurren modificaciones como la oxidación a metionina-sulfoxido, metionina-sulfona y la racemización a la forma D-metionina la cual no se puede absorber(10); así al realizar el ANOVA para el caso de metionina se tiene que con la cocción de 15 minutos ya hay una pérdida significativa de este aminoácido

con respecto al crudo, que es del 23.28 %, pero se podría escoger como el tratamiento óptimo de cocción, sin embargo como se muestra en la tabla 8, no hay diferencia entre el proceso FC15 y FC30 en cuanto al contenido de metionina, mientras que con los demás si se encontró; por lo que se propone como aquel tratamiento óptimo que elimina las lectinas de manera importante(99.96 %), a niveles aceptables (<1UHG/g muestra) y presentó menor pérdida en cuanto a la calidad de la proteína original al procesamiento FC15 y/o FC30, con pérdidas del 23.28% y 26.45 % respectivamente.

5.5 Selección del proceso óptimo de cocción por medio de un ensayo biológico

A continuación se presentan los resultados del análisis proximal, realizados al frijol crudo y procesado.

Tabla 9. Composición proximal del frijol crudo y procesado, expresado en g/100 g de muestra^a

Componente	FCR	FC15	FC30	FC60	FC120
Humedad	8.21	5.53	4.85	5.21	4.75
Proteína ^b	18.91	19.87	20.39	20.28	19.92
Grasa	1.14	1.29	1.24	1.16	1.31
Cenizas	3.73	3.86	3.97	3.87	4.01
Fibra cruda	4.05	3.51	3.46	3.27	2.06
Hidratos de carbono ^c	63.96	65.94	66.09	66.21	67.95

^a: Se muestran los valores promedio de la determinación con un CV<5%

^b: Proteína (Nx6.25)

^c: Hidratos de carbono calculados por diferencia

Para fines de comparación, se expresan estos resultados en base seca, los cuales se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 10. Composición proximal del frijol crudo y procesado, expresado en g/100g de muestra^a en base seca (BS).^a

Componente	FCR	FC15	FC30	FC60	FC120
Proteína ^b	20.60	21.03	21.43	21.39	20.91
Grasa	1.24	1.37	1.30	1.22	1.38
Cenizas	4.06	4.09	4.17	4.08	4.21
Fibra cruda	4.41	3.72	3.64	3.45	2.16
Hidratos de carbono ^c	69.68	69.80	69.46	69.85	71.34

^a: Se muestran los valores promedio de la determinación con un CV<5%

^b: Proteína (Nx6.25)

^c: Hidratos de carbono calculados por diferencia

Como se puede observar en la tabla 10, los datos obtenidos para el análisis proximal del frijol crudo dieron menores al de los cocidos y se ha reportado que ocasionalmente hay valores que exceden el 100 % de retención de los componentes del frijol al cocer, y que es atribuido a la variabilidad natural de la muestra y que especialmente en el caso de la grasa y la fibra, los problemas son asociados con la metodología analítica (19).

En la siguiente tabla se muestra la composición química general del grano crudo del *Phaseolus vulgaris*. (7)

Tabla 11. Composición química proximal del frijol crudo (*P. vulgaris*) (porcentajes en base húmeda y base seca)

COMPONENTE	CONTENIDO BH	CONTENIDO BS
Humedad	9.87	---
Proteína	24.13	26.77
Grasa	1.31	1.45
Hidratos de carbono	54.60	60.58
Fibra	5.62	6.24
Cenizas	4.46	4.95

Se puede notar que los valores obtenidos para el frijol crudo son similares a los mostrados en la tabla 11, existe cierta variación porque los datos reportados en

dicha tabla, son los valores medios de diferentes variedades de la especie ***P. vulgaris***.

Cabe mencionar que en el frijol con el que se trabajo, el contenido de grasa es bajo (1.24 %) y el de hidratos de carbono es elevado (69.68 %) como se esperaba, además el contenido de proteína (20.60 %) se encuentra dentro del rango reportado que va desde 18-33 %, esto siendo por las condiciones ambientales, y por la variedad del frijol.

5.5.1 Determinación de la relación de eficiencia proteínica (REP)

Para evaluar la calidad de la proteína *in vivo* se prepararon siete dietas; cinco de ellas representaban a cada uno de los tratamientos, FCR hasta FC120, en todas ellas la única fuente de proteína era el frijol; como se sabe que una cocción excesiva afecta la calidad proteínica se realizó una dieta mas de FC120 solo que esta fue suplementada con 0.2 % de metionina con el fin de observar el efecto que tenia sobre el crecimiento de las ratas. Con las dietas ya mencionadas y la dieta control de caseína se llevo a cabo el ensayo biológico, mostrándose los datos obtenidos en las tablas 12 y 13; además a cada dieta se le determinó la cantidad de proteína y contenido energético que con la ayuda de Análisis de Varianza se corroboró que efectivamente fueran isoproteicas e isocalóricas con respecto a la dieta de referencia Caseína (**ANEXO II**).

Tabla 12. Resultados del ensayo biológico (Relación de Eficiencia Proteínica experimental)

Muestra	REP _{exp}
Frijol crudo (FCR)	-14.07
Frijol cocido 15 min (FC15)	2.12
Frijol cocido 30 min (FC30)	1.66
Frijol cocido 60 min (FC60)	1.39
Frijol cocido 120 min (FC120)	0.46
FC120 suplementado (FC120Met) con Metionina	3.11
Caseína	3.70

Se muestran los valores promedio de la determinación, CV<15%.

Tabla 13. Resultados del ensayo biológico (Relación de Eficiencia Proteínica ajustado)

Muestra	Δ Peso/día	Alimento/día	REP _{ajustado}
FCR	-1.27 a	0.90 a	-9.50
FC15	1.03 b	4.82 b	1.43 a
FC30	0.75 bc	4.42 bc	1.12 b
FC60	0.51 cd	3.67 cd	0.94 b
FC120	0.14 d	2.79 d	0.31 c
FC120Met	2.30 e	7.43 e	2.10 d
Caseína	3.40 f	8.87 f	2.50 e

Diferentes letras dentro de las columnas indican diferencia estadísticamente significativa

La dieta de FCR mostró un valor de REP negativo (-9.50), lo cual podría indicar una baja digestibilidad de la proteína del frijol crudo, simplemente al considerar que el material tiene un elevado nivel de lectinas y es que se ha reportado que ratas alimentadas con globulina G1 cruda tienden a perder peso en forma similar a la de ratas sometidas a una dieta libre de proteína (**15**); además el lote de animales presentó los valores más bajos, tanto en ganancia de peso como en alimento

consumido por las ratas recién destetadas, e incluso se presentó el 100 % de mortalidad a la segunda semana de desarrollo experimental.

Ahora bien, por el efecto tóxico que tienen las lectinas sobre los órganos de las ratas principalmente el intestino delgado, duraron solo nueve días, siendo que se esperaba que no duraran ni una semana; aun así al no durar los 21 días durante los cuales se llevó a cabo dicho ensayo, no se consideró como parte del análisis estadístico.

Se puede observar que el valor de REP obtenido para la dieta de caseína era lo esperado, pero además se realizó la corrección para expresarla en términos de $REP_{ajustado}$, donde se obtiene el valor de 2.5 que es similar al valor reportado en la bibliografía **(3)** que es de 2.8, mostrándose así una respuesta más adecuada hacia el ensayo biológico lo cual sirvió de referencia para la comparación de las dietas de frijol, ya que la dieta de caseína es una fuente de proteína de buena calidad y se asume que la proteína de mayor calidad es la que apoya el máximo crecimiento de un animal joven produciendo una tasa de crecimiento más rápida **(3)**, lo cual fue observado durante el tiempo del ensayo sobre las ratas de esta dieta, llegando a presentar los mayores valores tanto en incremento en peso como en alimento consumido, como se puede observar de la tabla 13.

Se sabe que para la mayoría de las leguminosas el proceso de cocción induce a una mejoría en el valor nutritivo, siendo que los valores de REP aumentan significativamente en comparación con la semilla cruda. Esto se puede notar en los valores mostrados en la tabla 13, ya que al someter al frijol peruano a cocción mejoro su valor de REP, obteniéndose un valor de 1.43 para el proceso FC15 que fue el de menor tiempo de cocción, lo cual concuerda con los valores reportados de

REP para diferentes variedades de frijol común cocido que se encontraron en un intervalo de 1.0 a 2.0 **(15)**.

Se puede observar también que conforme aumenta el tiempo de cocción los valores del incremento en peso, alimento acumulado y REP van disminuyendo, como ya se había mencionado cuando es prolongado el tiempo de cocción tienen lugar diversas reacciones químicas que conducen a un descenso en la calidad de la proteína, como lo es el oscurecimiento no enzimático (Reacciones de Maillard) que puede destruir muchos aminoácidos en particular la lisina que es uno de los aminoácidos más lábiles por su grupo amínico pero también puede generarse pérdidas de arginina y metionina. De este modo el oscurecimiento de Maillard reduce la calidad proteínica de los vegetales ya que reduce los aminoácidos esenciales y la digestibilidad del nitrógeno total. Aunque también el procesamiento térmico a altas temperaturas por periodos extensos ocasiona otras reacciones indeseables en la proteína como la oxidación de aminoácidos (en particular aminoácidos azufrados), alteración de enlaces peptídicos entre aminoácidos, retraso o impedimento de liberación de los aminoácidos durante la digestión y formación de nuevas estructuras de aminoácidos o dipeptidos que no experimentan digestión y procesos de absorción de tipo normal **(3)**.

La siguiente figura muestra gráficamente el efecto del procesamiento térmico sobre el valor nutritivo, como medida de la relación de eficiencia proteínica (REP) del frijol peruano.

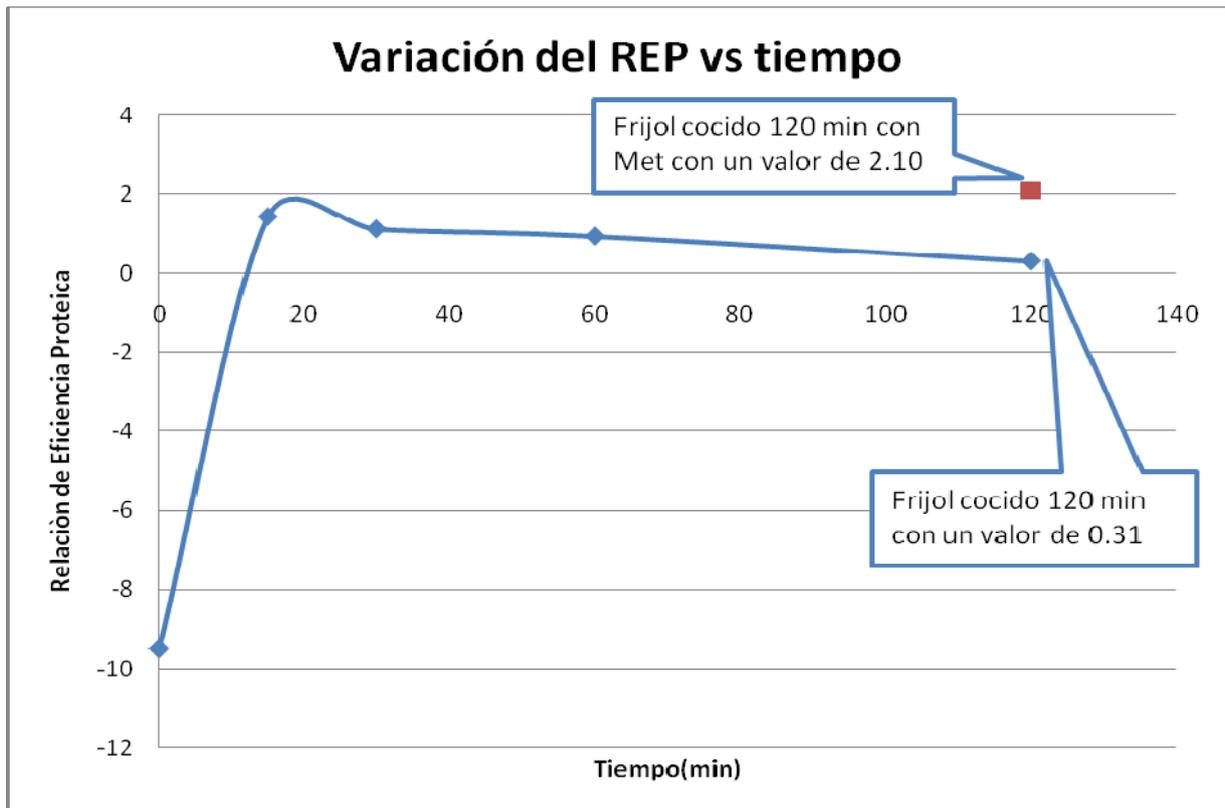


Figura 9. Gráfica de la variación del REP conforme aumenta el tiempo de cocción del frijol peruano

De acuerdo a los resultados obtenidos del bioensayo para la dieta de FC120 suplementada con metionina se puede decir que tuvo un comportamiento en el incremento del peso corporal de los individuos y alimento consumido mejor que los de las dietas de los otros procesos térmicos, y muy semejante al de los individuos de la dieta de caseína presentando diferencias significativas con todas las dietas, ya que esta dieta suplementada se trabajó con el fin de corroborar la pérdida de metionina por un exceso de cocción sobre el frijol peruano y efectivamente se obtuvo un valor de 2.10 siendo que la dieta de FC120 tuvo un valor de 0.31, por lo que se puede notar que la dieta al ser suplementada incrementó su valor biológico casi siete veces. Lo anterior se puede ver con mayor claridad en la figura 10, donde se observa que la dieta FC120Met presenta una tendencia creciente como la dieta control, mientras que para la dieta de frijol crudo se observa un decremento en el peso por la presencia de factores tóxicos, principalmente lectinas.

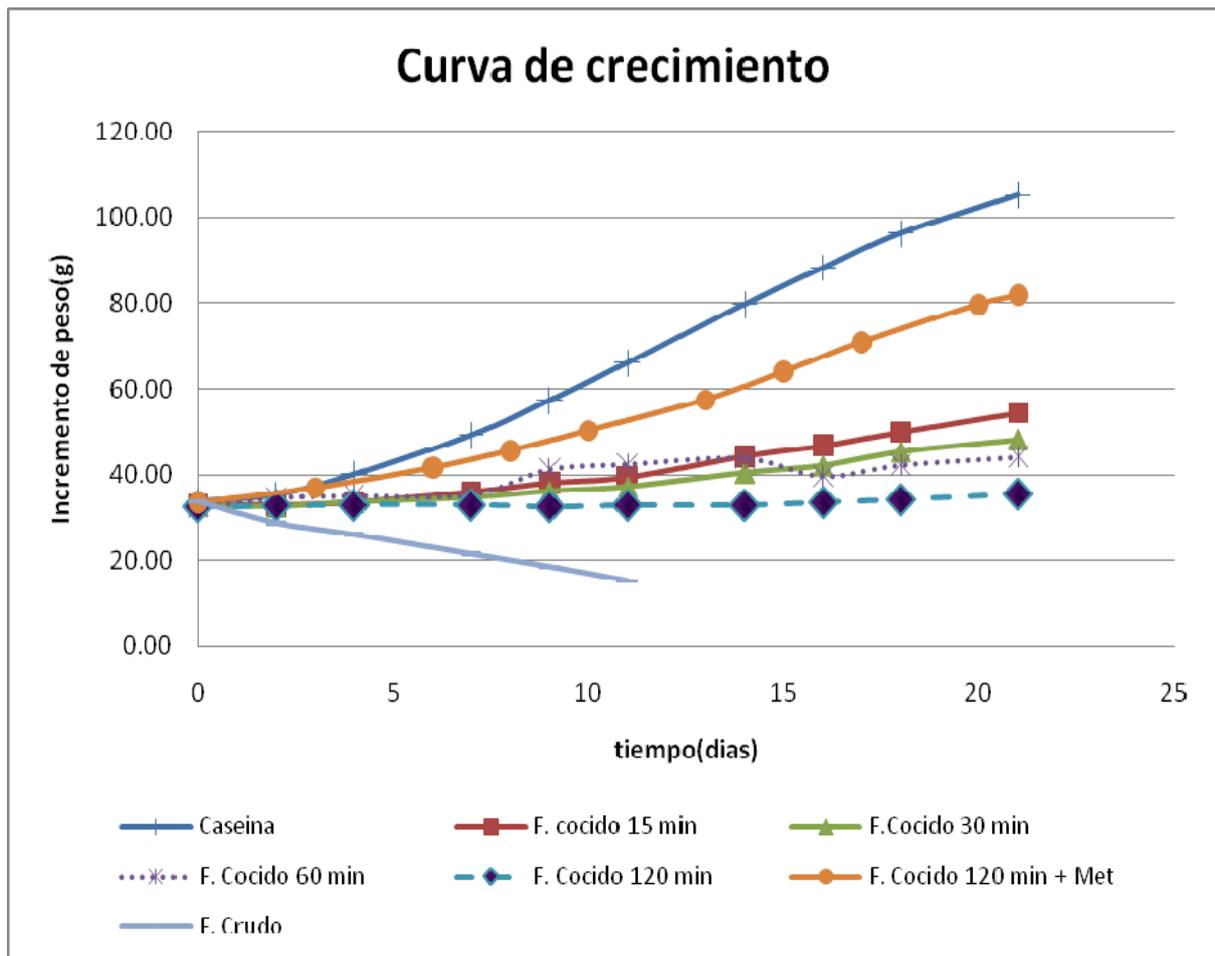


Figura 10. Curva de crecimiento

Es importante considerar que el factor principal del valor nutritivo de una proteína lo constituye la composición y la proporción de los aminoácidos indispensables contenidos en ella. Por lo tanto el crecimiento del animal se vio reducido por las deficiencias en aminoácidos indispensables, entre ellos la metionina que es el limitante en las leguminosas, por llevar a cabo un exceso en el proceso de cocción, lo cual es muy claro al compararlo con la dieta suplementada utilizada en este ensayo biológico.

Con los valores obtenidos del REP (a excepción de FCR), incremento en peso y alimento consumido de cada dieta se realizaron los Análisis de Varianza y las pruebas de Rango múltiple (Duncan) correspondientes, utilizando el paquete

estadístico StatGraphics plus V. 5, para determinar si había diferencia significativa entre las dietas trabajadas (en ambos casos $\alpha=0.05$).

Con lo que respecta a la calidad de la proteína, la tabla 13 muestra en primer lugar que se mejora la calidad de la proteína al cocer el frijol crudo por lo menos 15 minutos, y en segundo lugar se presentan diferencias estadísticamente significativas entre todas las dietas (marcadas con letras diferentes para cada una de ellas) a excepción de la FC30 y FC60, lo cual muestra que hay pérdida significativa de la calidad de la proteína por destrucción de aminoácidos indispensables conforme se incrementa el tiempo de cocción en el frijol, mejorándose cuando hay una suplementación de metionina sobre la dieta de mayor tiempo de cocción (FC120).

Al igual que fue disminuyendo la calidad de la proteína conforme aumentaba el tiempo de cocción, el incremento en peso y el consumo de alimento fueron disminuyendo, así las ratas que consumieron las dietas con un mayor tratamiento de cocción (FC60 y FC120 min, no existe diferencia significativa entre ellas) tuvieron ganancias de peso más bajas y significativamente diferentes a la dieta de frijol suplementada con metionina, lo cual indica una pérdida de este aminoácido durante la cocción prolongada del frijol. Además se observa que existe una diferencia significativa en la ganancia de peso de la dieta de Caseína con la dieta FC120Met observándose una mayor ganancia en la dieta de caseína que en la suplementada con metionina.

El consumo de alimento presentó las mismas características que el incremento en peso, así el mayor consumo de alimento lo obtuvieron las ratas alimentadas con la dieta de caseína, seguido por FC120Met y luego por la de menor cocimiento FC15 existiendo diferencia significativa, y disminuyendo conforme aumentaba el tiempo de cocción. Se logró observar consumo superiores para la dieta FC120Met y menores

para las demás dietas, siendo esto el producto del efecto de un imbalance de aminoácidos, ya que se ha reportado que el consumo de alimento en ratas decrece marcadamente cuando la dieta presenta niveles bajos de un aminoácido esencial y que la suplementación de metionina en dietas deficientes mejora el consumo del alimento y la ganancia de peso, lo cual llevó a la conclusión de que el imbalance de aminoácidos produce una alteración en el cerebro de las ratas con lo que se afecta el consumo del alimento **(36)**.

Por lo mencionado anteriormente se puede decir entonces que al parecer en todos los procesos térmicos utilizados ya hay pérdida significativa de la calidad proteínica sin embargo se podría tomar como el proceso óptimo de cocción del frijol peruano al FC15 ya que presenta el mayor valor de REP encontrado, aunque no se descarta la posibilidad de que pueda obtenerse un valor más elevado si el tiempo de cocción es menor a los quince minutos, haciendo la observación que este tiempo es el de permanencia a dada temperatura (121°C), sin considerar que hay un previo y post calentamiento del frijol.

6. CONCLUSIONES

- * Se corroboró la existencia de dos variedades comerciales representativas de la especie *Phaseolus vulgaris* con alto contenido de lectinas, las cuales fueron el Frijol Mayocoba y el Frijol Peruano, mismas que se tomaron como punto de partida para dicha investigación, considerando diferentes marcas comerciales entre las variedades, ya que puede existir diferencias dentro de lotes diferentes.

- * Al determinar semicuantitativamente el contenido de lectinas se logró escoger a la variedad de mayor contenido de lectinas, la cual fue el Frijol Peruano, que tuvo un título de 32 para ambas marcas comerciales, mientras que el Mayocoba presentó títulos cercanos a 20.

- * Se seleccionó la muestra de Frijol Peruano Marca Morelos cuyo contenido de lectinas fue de 401.72 UHG/g muestra, y a pesar de que la otra marca de frijol peruano contenía un similar contenido de lectinas, no se tenía la cantidad suficiente para completar los objetivos del presente trabajo.

- * Se obtuvo una inactivación del 99.96 % de las lectinas presentes en la muestra para todos los tratamientos utilizados, y solo se logró observar una disminución gradual para el caso de la calidad nutrimental, determinada por el contenido de Metionina principalmente.

* Se seleccionó a los procesamientos FC15 y FC30 realizados en autoclave (121°C y 1.5 kg/cm²) como los óptimos, ya que además de tener un nivel de lectinas bajo, se mostró que no había diferencias significativas en cuanto al contenido de metionina entre ellos, a pesar de que se tuvo una disminución significativa de este aminoácido del contenido original (23.28% y 26.45 % respectivamente).

* Una vez acondicionado el material biológico procesado, se llevó a cabo el ensayo biológico, con lo cual se corrobora que el procesamiento FC15 es el óptimo, ya que al término de dicho ensayo, fue el que presentó el valor mayor de REP, sin embargo no se descarta la posibilidad de que un menor tiempo de cocimiento pueda proporcionar una mejor calidad nutritiva, siempre y cuando se disminuya significativamente el contenido de lectinas; además, se pudo comprobar la pérdida de metionina por un exceso de cocción sobre el frijol, ya que al suplementar con metionina se obtuvo un valor de REP cercano al de la dieta de referencia (caseína).

* Se debe considerar que de todo lo anterior, no se toma en cuenta factores del tipo sensorial, ya que como se menciona a lo largo de la investigación la finalidad principal fue encontrar el tratamiento que disminuyera el principal factor tóxico en la muestra seleccionada y que se conservara la calidad proteínica de la misma.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Casanueva E., Kaufer-Horwitz M., Perez B., Arrollo P. (2001),
Nutriología Médica, Editorial Medica Panamericana, 2º ed México,D.F. pág.
452, 462, 463, 482, 483, 493-496.
2. Shibamoto, T. (1996) “ Introducción a la toxicología de los alimentos”.Editorial
Acribia S.A: Zaragoza, España pág. 71-75
3. Shils M., Olson J., Shike M., Ross C. (2002) “Nutrición en salud y
enfermedad” Ed Mc Graw Hill Interamericana. 9ª Ed vol II pág.
50,625,2107,2108,2151
4. Robinson D. (1991), “ Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos”(traducido
por Miguel Calvo Rebollar y Emilia Sevillano Calvo) Ed Acribia, S.A.
Zaragoza, España pág. 168-171
5. Muller, H. y Tubin, G. (1998) “Nutrición y ciencia de los alimentos”(traducción
por Barrado, A. Aguilera) Ed Acribia S.A. Zaragoza, España pág. 143-271
6. Reyes, C. y Lopez, O. (1992)”Endurecimiento del frijol común. Estrategias
para su prevención y alternativas tecnológicas para su utilización” Cuadernos
de nutrición. Volumen 15 Número 2. México D.F. pág. 20
7. Engleman E. M. (1991) “Contribuciones al conocimiento del frijol (***Phaseolus***)
en México”, Colegio de Postgraduados, Institución de enseñanza e
Investigación en Ciencias Agrícolas, Chapingo, pág. 101-111
8. Garciafigueroa, D. Y. “Desarrollo de una metodología cuantitativa en la
determinación de lectinas en frijoles y su correlación con su toxicidad
subaguda.” Tesis, Fac. de Química, UNAM, México, D. F. (1998).

9. Lucas, B. and Sotelo, A. (1993) A useful modification of the haemagglutination method for screening of lectins in legume seeds. 2th International Workshop on ANFs. In legumne seeds. EAAp Publication No. 70, pp.71-74, Wageningen.
10. Albor, Ruben. "Procesamiento térmico óptimo sobre la calidad nutritiva de una variedad de frijol común (*Phaseolus vulgaris*). Tesis de la Fac. de Química, UNAM, México, D. F. (2008).
11. FAO, (1976) Contenido de aminoácidos de los alimentos y datos biológicos sobre las proteínas. Estudio de nutrición No. 24, Publicación de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación, Roma, pág. 50, 144, 214, 215,.
12. Vargas, M. Muraglia, J. Martinez, J. (2006) "Colección núcleo de *Phaseolus vulgaris*" INIFAP. Catalogo de accesiones de la forma domesticada. Centro de Investigaciones Regionales del Centro Campo Experimental Valle de México Libro Técnico No. 10. México, D.F. pág. 1-7
13. Lucas, B. and Sotelo, A. (1980) "Effect of different alkalies, temperatura and hydrolysis times on tryptophano determination of pure proteins and of foods". Analytical Biochemistry. 109,192-197.
14. Millard, J., Breese, D. and Amos, E. (1946) "Colorimetric determination of methionine in proteins and foods." J. Biol. Chem. 166: 313-320 (Downloaded from www.jbc.org)
15. Goycoolea Francisco Martín. "Efecto de los tratamientos caseros de preparación de frijol pinto (*Phaseolus vulgaris*) sobre el contenido de taninos y valor nutritivo de las proteínas". Tesis de la Escuela de Química, incorporada a la UNAM, Universidad La Salle, México, D. F. (1988).

16. García Rollan, M. (1990), Alimentación Humana errores y consecuencias, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid pág. 206.
17. Lloyd, L.E. (1982), Fundamentos de Nutrición, Editorial Acribia, Zaragoza, España pág. 110-117.
18. Kay Daisy E. (1979), Legumbres Alimenticias, Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España pág. 137,139,141,158,159
19. Matthews R.H. (1989) Legumes Chemistry, Technology and Human Nutrition, Ed Marcel Dekker, INC., New York pág. 196-199, 204.
20. FAO, (1990). Utilización de Alimentos tropicales: frijoles tropicales. Estudio de Alimentación y Nutrición 47/4. Publicación de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, pág. 2-4,6,7,44,45,47,48.
21. Kakade, M.L., Rackis, J.J., Mc Ghee, J.E., Puski, G. (1974) Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. A collaborative analysis of an improved procedure. Cereal Chemistry. 51: 376-382.
22. Rao, R.M., (1974) "Colorimetric estimation of tryptophan content of pulses". Journal of Food Science and Technology. 11, 213-216
23. González, Perla. "Efecto del procedimiento con calor sobre la cuantificación de lectinas de frijol y su toxicidad remanente". Tesis de la Facultad de Química, UNAM, Mexico D.F. (2001)
24. Shahidi, F. Editor (1997) "Antinutrients and phytochemicals in food" American Chemical Society, Washinton D.C. pág. 30-44.
25. Silvestre, A. (1993) "Tóxicología de los Alimentos" Editorial Hemisferio sur, Buenos Aires 2ª Ed pág. 74-78.

26. Liener, I., Sharon, N., Goldstein, I. (1986). "The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine" Academic Press, New York pág. 266-285, 371-414, 527-547.
27. Lis, H., Sharon, N. (1981) "The biochemistry of plant. A comprehensive treatise" Academic Press, New York. Pág. 372-431.
28. Chrispeels, M. and Raikhel, N. (1991) "Lectins, lectin genes, and their role in plant defense". Plant Cell. 3, 1-9.
29. Liener, I.E. (1964) "Seed Hemagglutinins". Economic Botany. 18, 27-33.
30. Grant, G., Van Driessche, E. (1993) "Legume lectins: physicochemical and nutritional properties" Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds" (A.F.B. Van der Poel, J. Huisman, H.S. Saini, eds. (Wageningen Pers), pág. 219-234
31. Donatucci, D. Liener, I and Gross, C. (1987) "Binding of Navy Bean (*Phaseolus vulgaris*) Lectin to the intestinal cell of rat and its effect on the absorption of glucose". Journal of Nutrition. 117, 2154-2160.
32. Nelson, G. Almeida, A. (1991) "Effect of different heat treatments on the antinutritional activity of *Phaseolus vulgaris* (Variedad Ojo de cabra). Agricultural and Food Chemistry. 34, 1627-1630.
33. Aregheore, E. Makkar, H. (1998) "Assessment of lectin activity in a toxic and a non-toxic variety of *Jatropha curcas* using latex agglutination and hemagglutination methods and inactivation of lectin by heat treatments". Journal of the Science of Food and Agriculture. 77, 349-352
34. Friedman, M. (1989) "Absorption and utilization of amino acids" CRE Press Boca Ratón, Florida pág. 189.

35. Jaffe, W.G., Levy, A., Gonzalez, D.I. (1974) Isolation and Partial characterization of bean phytohemagglutinins. *Phytochemistry*. 13; 2685-2693.
36. Campabadal, C., Vargas E., Musmanni M. (1978) "Efecto de la suplementación con metionina y triptófano sobre el valor nutritivo del frijol gandul (*Cajanus cajan*) utilizado como fuente de proteína" Proyecto 02-07-06-35 de la Vicerrectoria de Investigación de la Universidad de Costa Rica. 2 (2): 163-169.
37. Horwitz, W. and Latimer, G. (2006) Official Methods of Analysis of the Association Official Analytical Chemists. Published of AOAC International, 18th edition, Chapter 4, pp. 1-8, 33-36, 42-47 Gaithersburg.
38. Helrich, K. (1990). Official methods of analysis of the Association Official Analytical Chemists. Published of AOAC, 15th edition, Vol. II, pp. 1095-1098, Arlington.

8. ANEXOS

ANEXO I:

Tabla de registro de datos para los animales del bioensayo

Rata: _____ Sexo: _____ Peso inicial (P_i): _____ Dieta: _____									
Fecha: _____									
Tiempo (días)									
Peso animal ($P_{\text{día}}$)									
Incremento acumulado ($P_{\text{día}} - P_i$)									
Alimento inicial (I)									
Alimento final (F)									
Alimento ingerido ($AI = I - F$)									
Alimento acumulado ($\sum AI$) _{día}									
Observaciones: _____ _____									

ANEXO II:

Resultados del Análisis Estadístico de las Dietas utilizadas en el ensayo biológico

H_0 : No existe diferencia significativa en cuanto al contenido de proteína entre las dietas

H_i : Existe diferencia significativa en cuanto al contenido de proteína entre las dietas

ANOVA DE DIETAS ISOPROTEICAS

<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>G.L.</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>F₀</i>	<i>F₀ tablas</i>
% Proteína (g/100 g muestra)	0.70145833	6	0.11690972	0.27224753	2.91527158
Error	5.58251667	13	0.42942436		
Total	6.283975	19			

$\alpha=0.05$

como el valor de la F_0 es menor que F de tablas, H_0 no se rechaza, lo que quiere decir que el contenido de proteína en todas las dietas es el mismo, de 10 %, o sea que son isoproteicas.

H_0 : No existe diferencia significativa en cuanto al contenido energético entre las dietas

H_i : Existe diferencia significativa en cuanto al contenido energético entre las dietas

ANOVA DE DIETAS ISOCALORICAS

<i>Fuente de Variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>G.L.</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>F₀</i>	<i>F tablas</i>
Kjoules/ g muestra	29.8387338	6	4.97312229	2.10718045	2.57271164
Error	49.5617583	21	2.36008373		
Total	79.4004921	27			

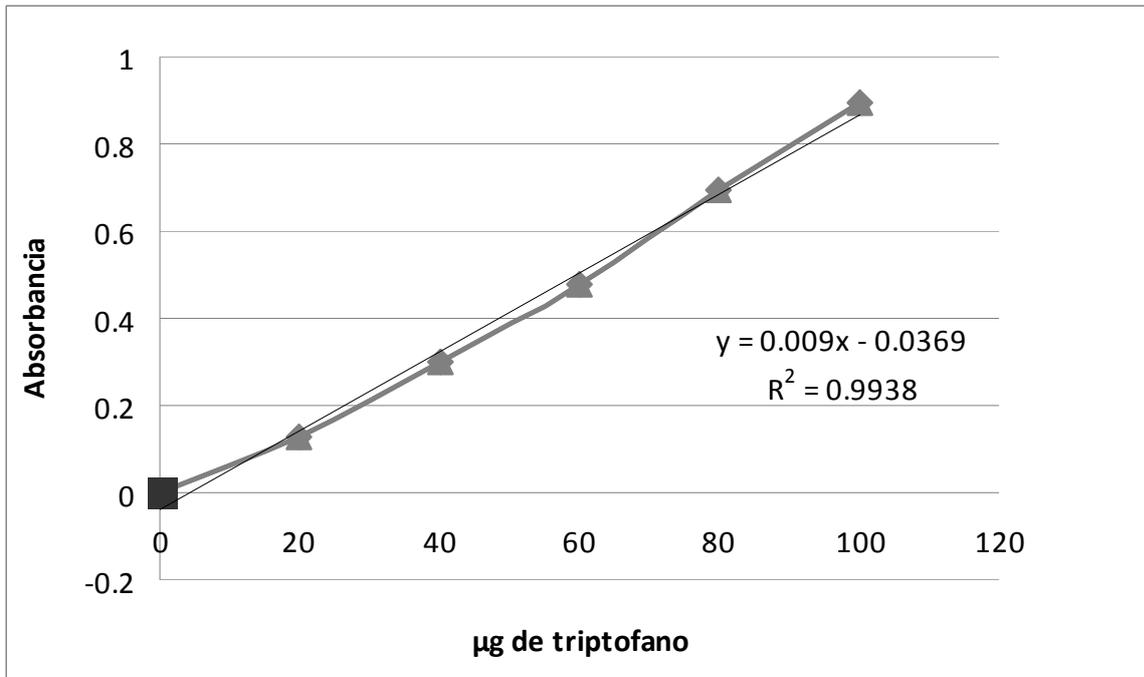
$\alpha=0.05$

como el valor de la F_0 es menor que F de tablas, H_0 no se rechaza, lo que quiere decir que el contenido energético en todas las dietas es el mismo, de 1800.33 kj/g o sea que son isocalóricas.

ANEXO III :

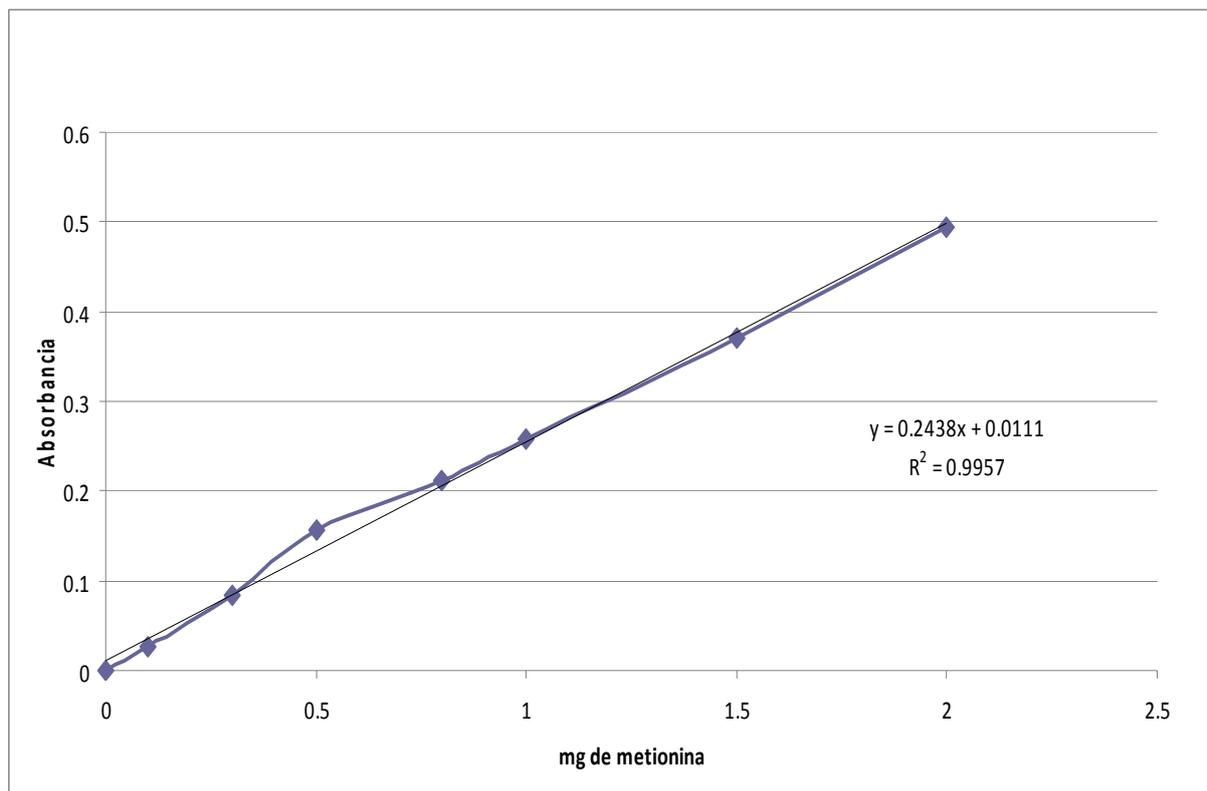
Curva patrón de Triptofano

$\mu\text{g Trp}$	<i>mL</i>	<i>Abs 1</i>	<i>Abs 2</i>	<i>Abs 3</i>	<i>Abs 4</i>	<i>promedio</i>
0	0	0	0	0	0	0
20	0.4	0.152	0.194	0.085	0.083	0.129
40	0.8	0.383	0.34	0.235	0.241	0.300
60	1.2	0.581	0.564	0.376	0.397	0.480
80	1.6	0.816	0.808	0.574	0.575	0.693
100	2	1.064	0.998	0.753	0.752	0.892



Curva patrón de metionina

mg Met	mL	Abs 1	Abs 2	Abs 3	promedio
0	0	0	0	0	0
0.1	0.1	0.023	0.029	0.025	0.026
0.3	0.3	0.085	0.081	0.083	0.083
0.5	0.5	0.179	0.136	0.154	0.156
0.8	0.8	0.215	0.212	0.21	0.212
1	1	0.255	0.263	0.259	0.259
1.5	1.5	0.351	0.392	0.368	0.370
2	2	0.49	0.499	0.493	0.494



ANEXO IV:

Curva de calibración del ácido Benzoico

