



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Análisis proximal y factores tóxicos naturales del frijol Comba (*Phaseolus lunatus*) y Peruano (*Ph. Vulgaris*) crudos y cocidos; así como evaluación nutritiva de los frijoles cocidos, consumidos en San Miguel Totolapan, Gro.

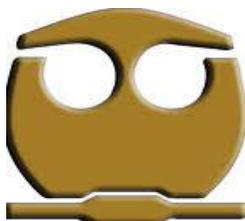
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

CARLOS ANTONIO POUCELL FERRÁEZ



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: Rosa María Argote Espinosa

SECRETARIO: Profesor: Inocencia María de Lourdes Flores Tellez

1er. SUPLENTE: Profesor: Jesús Antonio Beaz Rivera

2° SUPLENTE: Profesor: Liliana Rocío González Osnaya

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

SUSTENTANTE

Carlos Antonio Poucell Ferráez

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

A mis padres por siempre buscar siempre mi superación con su vida y esfuerzo, los amo 'apás, son más banda que la súper bandota.

A mis hermanos por su cariño y empuje, los quiero hartos.

A Erika G., Haide L., Jennifer E., Myrna A. y Verónica L. (P.V.) por su amistad, cariño y muy extremo apoyo, son la súper bandota, sin uds... ¿quién sabe?... gracias por ser parte de mi vida, las quiero chicas.

A Carlos F. (Chaaarls!), Miguel R. (El Mike), Rodrigo G. (Rod), Miguel (El otro Mike) David L. (David) y José R. (Exkiws) por ser tan finas personas... ha chingao!, si es cierto y amigos... también son banda.

A Olguita, Bety, y Mónica... chicas!, las aprecio un buen... un cachito de esto, también les pertenece... también bandota.

Luz, Paulina, Mercedes, Marisol, Gaby y Alicia, nuestras vecinas en el Lab-111... por atreverse a dirigirnos la palabra y lo más importante, por atreverse a trabajar con tamaño anomalía, son muy chidas chicas.

Lucero R. (Lu, Luciérnaga), por tu cariño, amistad y fortaleza... tú... si!, tú también... claro que estas nominada, te quiero, gracias por entrar en mi mundo.

A ti Mónica M (QuetzalMonitl). por aceptarme como soy... le quitaste lo monótono a mis tardes. Gracias por tu amistad, tiempo y por no verme bicho extraño y hacerte que la virgen te hablaba cuando nos conocimos, gracias por arriesgarte a ser parte de mi vida.

Rosita, Arge, Toño... se merecen un párrafo, así que disculpen que solamente sean unas líneas... gracias por ayudarme a que esto no se quedara en el limbo. Su esfuerzo también es parte de este trabajo.

Al M. en C. Bernardo Lucas, muchas gracias por hacerme menos neófito en toxicología y análisis de alimentos, por su dedicación a la universidad y a la investigación, gracias por todo... Más que M en C... el Prof que no teme ensuciarse las manos.

A la UNAM, espero volver pronto... para

A la Vida por enseñarme que el que persevera no siempre alcanza lo que quiere pero siempre alcanza algo, para bien o para mal.

No olvides:

¿Por qué te caes?...

La Vida te dará oportunidades, depende de ti, tomarlas o dejarlas ir.

Las situaciones que la Vida te plantea, es obligatorio vivirlas, tu decides si las disfrutas o las sufres.

La mejor religión que puedes hacer, es la de ser justo, honesto y apasionado, porque eso hará que la felicidad llegue a ti sin que la busques.

El verdadero potencial del ser humano... tu potencial... está en tu potencial de hacer el bien...

Si alguien te odia por errar, déjalo ir, no vale la pena ser odiado por ser humano... nunca dejaras de caer...

ÍNDICE	Página
Resumen	6
1 Objetivos e Hipótesis	7
2 Generalidades	8
2.1 Proteínas importancia y calidad	8
2.1.1 Necesidades proteínicas	9
2.1.2 Evaluación de la calidad de las proteínas	10
2.1.3 Metionina	12
2.1.4 Digestibilidad <i>in Vitro</i>	12
2.2 Leguminosas	13
2.2.1 Frijol Peruano	15
2.2.2 Frijol Comba	15
2.3 Maíz	16
2.4 Factores Tóxicos	17
2.4.1 Glucósidos cianogénicos	18
2.4.2 Lectinas (Fitohemaglutininas)	19
2.4.3 Factores Antinutricionales	20
2.4.3.1 Inhibidores de Tripsina	20
3. Materiales y métodos.	22
3.1 Selección y limpieza del material biológico	22
3.2 Análisis Químico Proximal	22
3.2.1 Determinación de humedad	23
3.2.2 Determinación de cenizas	23
3.2.3 Determinación de contenido graso	24
3.2.4 Determinación de proteína	26
3.2.5 Determinación de fibra	28
3.2.6 Determinación hidratos de carbono	29
3.3 Análisis de factores tóxicos	30
3.3.1 Glucósidos cianogénicos	30
3.3.2 Fitohemaglutininas (Lectinas)	33

3.3.3 Inhibidores de tripsina (factor antinutricional)	37
3.4 Determinación de Metionina	40
3.5 Digestibilidad <i>in Vitro</i>	43
3.6 Proceso térmico	45
3.7 Bioensayos nutricionales	45
4. Resultados y Discusión	47
4.1 Análisis Químico Proximal	47
4.2 Determinación de agentes tóxicos	48
4.3 Análisis de Metionina	50
4.4 Digestibilidad <i>in Vitro</i>	51
4.5 Bioensayo nutricional	52
5. Conclusiones	58
6. Referencias	59
7. Apéndices	62

RESUMEN

Las leguminosas han sido un alimento para el hombre desde hace miles de años y actualmente dentro de los alimentos de origen vegetal son el segundo grupo en importancia en la dieta del ser humano. Las semillas de estas plantas son reconocidas como una buena fuente de proteína debido a que poseen aproximadamente un 20% de este macro nutriente por lo que pueden cubrir una buena parte de los requerimientos de nitrógeno. Dentro de estas leguminosas destaca el frijol común (*Phaseolus vulgaris*) que históricamente es una de las especies alimenticias más importantes para los americanos junto con el maíz. En gran parte del territorio nacional se obtiene una complementación cereal-leguminosa al consumir maíz y frijol común, sin embargo, en el municipio de Totolapan en Guerrero, un sustituto del frijol común que suelen consumir, es el frijol Comba (*Phaseolus lunatus*), el cual es cultivado para autoconsumo por los habitantes de ese municipio. Cuando las cosechas del frijol comba son pobres los habitantes consumen el frijol peruano. Las semillas del frijol Comba, aparte de contener los factores tóxicos más comunes de las especies comestibles de este género, puede contener potencialmente glucósidos cianogénicos, específicamente la linamarina. El objetivo general del estudio es el de evaluar cual, de los frijoles consumidos en la región posee una mejor calidad como alimento de acuerdo a los resultados obtenidos de su análisis químico proximal, al análisis de algunos factores tóxicos y de determinar por medio de un ensayo biológico la calidad y disponibilidad proteica. Siendo de importancia relevante determinar el contenido de macro nutrientes y factores tóxicos y antinutricionales, después de que son sometidos al cocimiento tradicional de la región anteriormente mencionada. La metodología de investigación que se siguió se presenta más adelante.]Aun cuando previamente se han realizado estudios bromatológicos sobre ambos frijoles¹ es importante confirmar los resultados obtenidos en particular para el caso del frijol comba, ya que algunos metabolitos secundarios varían su concentración de acuerdo al estrés climatológico. Ambos frijoles son consumibles sin ningún riesgo después de la cocción implementada, además de poseer una calidad de proteica muy similar, por lo que el consumir uno en lugar del otro no provee una verdadera ventaja desde el punto de vista nutrimental.

1. OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar y verificar por medio de análisis bromatológico, toxicológico y biológico, cual frijol, entre el Comba (*Phaseolus lunatus*) o el Peruano (*Phaseolus vulgaris*), ofrece mejor calidad como alimento.

Objetivos específicos:

- Evaluar el contenido de macro-nutrientes y metionina en ambos frijoles, tanto crudos como cocidos.
- Determinar el contenido de glucósidos cianogénicos, lectinas e inhibidores de tripsina para ambos frijoles crudos y cocidos.
- Evaluar el grado de destoxificación de los frijoles al someterlos a tratamiento térmico (cocción tradicional).
- Determinar la calidad proteica de ambos frijoles cocidos solos y complementados en un estudio biológico de REP.

HIPÓTESIS

Si con el método de cocción a implementar se consigue destoxificar los frijoles en estudio, entonces será posible evaluar por medio de un ensayo biológico cual, de ambos frijoles, provee de una mejor calidad proteica para el desarrollo de un individuo y así determinar si uno es mejor que el otro, como opción alimenticia.

2. GENERALIDADES

2.1 Proteínas importancia y calidad

Las proteínas son macromoléculas compuestas por aminoácidos y pueden clasificarse según su estructura química. Los aminoácidos son las unidades fundamentales de las proteínas, se caracterizan por poseer un grupo amino y uno carboxilo además de contar con un grupo funcional siendo característico para cada aminoácido.

Existen en particular algunos aminoácidos que no pueden ser sintetizados por el organismo, por lo que deben ser suministrados en la dieta diaria en proporciones adecuadas.

Estos son los aminoácidos esenciales o indispensables:

- | | |
|-----------------------|----------------------|
| -Fenilalanina | -Treonina |
| -Histidina (en niños) | -Arginina (en niños) |
| -Isoleucina | -Triptófano |
| -Leucina | -Valina |
| -Lisina | -Metionina |

Las necesidades de aminoácidos con grupo funcional aromático (Fenilalanina, Triptófano, Tirosina) se deben a la incapacidad que tiene el organismo de tener de no poder sintetizar anillos aromáticos.⁵

Los aminoácidos considerados dispensables, son aquellos que el organismo puede sintetizar en concentraciones suficientes para cubrir sus necesidades, si la cantidad de nitrógeno aportado por las proteínas es satisfactoria.⁶

Las proteínas son los constituyentes principales de los tejidos del organismo y su principal función es la de aportar nitrógeno y aminoácidos necesarios para la síntesis de proteínas corporales y sustancias nitrogenadas; por lo que la calidad y cantidad de estos compuestos en la dieta son parámetros fundamentales que deben ser considerados.⁷

Existe una gran variedad de ellas e intervienen en numerosos procesos desempeñando diversas funciones biológicas, en el organismo humano, tales como; energéticas, ya que una pequeña cantidad de energía que requieren las células es suministrada por las proteínas; plásticas, por que participan en la construcción de órganos y tejidos; catalizadoras, interviniendo en reacciones metabólicas; mediadoras y transportadoras que se encargan de transportar sustancias a través de la sangre y otros líquidos corporales.

La determinación del contenido de proteína en un alimento no es suficiente para evaluar su calidad nutricional, debido a que diversos factores afectan su aprovechamiento por el organismo relacionados con su naturaleza, balance y biodisponibilidad.² Aun cuando dos alimentos contengan la misma cantidad de proteína, es posible que uno tenga mejor aporte nutricional.³ Se puede decir que una proteína de buena calidad es aquella que se digiere fácilmente y contiene aminoácidos indispensables en cantidades que corresponden a los requerimientos de los individuos.⁴

2.1.1 Necesidades Proteínicas

Se puede establecer una calificación de la calidad biológica de una proteína en la dieta a partir de su composición de aminoácidos, una proteína deficiente en aminoácidos esenciales tendrá un valor menor que una que los contiene en mayor proporción. Las proteínas de origen animal tienen una composición de aminoácidos óptima para la alimentación humana y en estudios relativos a proteína pueden ser utilizadas como proteínas de referencia. Las proteínas provenientes de otros alimentos pueden sustituir a las de origen animal a condición de que satisfagan el requerimiento de aminoácidos esenciales.

Las necesidades de proteína de una persona dependen de su actividad física y aporte calórico en su dieta debido a que si este último es insuficiente una parte de las proteínas consumidas será empleada para la producción de energía. Las necesidades energéticas se incrementan, naturalmente, durante el crecimiento, embarazo y lactancia.⁷ Las cantidades indispensables de proteínas que el organismo requiere, se clasifican en 2 categorías.

1. La cantidad necesaria de aminoácidos esenciales
2. La cantidad necesaria de proteínas totales o nitrógeno total, que el cuerpo debe de obtener para la síntesis de aminoácidos dispensables, formación de otras proteínas distintas y otros elementos nitrogenados en los tejidos.

La FAO/OMS valoró los requerimientos proteínicos diarios (**Tabla 1**) y las necesidades de aminoácidos (**Tabla 2**) desde la niñez hasta la adultez en 1985.⁶

Tabla 1. Requerimientos proteicos diarios*

Edad (años)	g de proteína/Kg _p corporal/día
Lactantes y niños	
0.25-0.5	1.86
0.75-1.0	1.48
2-3	1.13
9-10	0.99
Adolescentes	
10-11	0.99
14-15	0.96
17-18	0.86
Adultos**	0.75

*Fuente FAO/OMS/ONU, 1985⁶

**Durante la gestación se recomienda que la ingesta proteínica sea de 6g/día y en la lactancia de 16g/día.

Tabla 2. Requerimientos de aminoácidos sugeridos por FAO/OMS/ONU.⁶

Aminoácido	mg de aminoácido/g de proteína			
	Lactante [media(rango)]*	Preescolares (2-5 años)	Niños (10-12 años)	Adultos
Histidina	26 (18-36)	19	19	16
Isoleucina	46 (41-53)	28	28	13
Leucina	93 (83-107)	66	44	19
Lisina	66 (53-76)	58	44	16
Metionina+Cistina	42 (29-60)	25	22	17
Fenilalanina+Tirosina	72 (68-118)	63	22	19
Treonina	43 (40-50)	34	28	9
Triptófano	17 (16-17)	11	9	5
Valina	55 (44-77)	35	25	13
Total	460 (406-588)	339	241	127

*Composición de aminoácidos de la leche materna.

2.1.2 Evaluación de la calidad de las proteínas

La evaluación de la proteína de un alimento, normalmente se lleva a cabo partiendo de lo más complejo, comienza con el análisis de nitrógeno y aminoácidos, seguido de una serie de determinaciones químicas específicas, terminando con una evaluación nutritiva. Debido a que los ensayos con animales han sido ampliamente usados para evaluar la calidad proteínica, han logrado tal reconocimiento, que frecuentemente se considera que los resultados obtenidos suministran toda la información requerida.⁸

Para determinar el valor nutritivo de las proteínas se puede hacer uso de métodos químicos o biológicos:

1. Métodos Químicos.

Utilizando los patrones de la FAO/OMS de 1985, la cantidad adecuada de proteína que se debe de consumir en cada etapa de la vida puede estimarse a partir de su composición en aminoácidos, para lo cual se determinan Calificaciones Químicas (C. Q.) relacionadas con el patrón FAO/OMS para los aminoácidos individuales, siendo esta forma de evaluar la calidad de las proteínas por métodos químicos.

La C. Q. expresa la relación entre el porcentaje de cada aminoácido en la muestra y el porcentaje del mismo aminoácido en la proteína de referencia. Para la proteína a analizar, el aminoácido limitante es el componente que determina el valor global de la proteína.⁴

$$C.Q. = [(mg \text{ de aminoácidos/g de proteína a evaluar}) 100] / mg \text{ de a.á. en la proteína de referencia.}$$

La calidad de proteína de un alimento es un parámetro que incide en su valor comercial. Además, existen varias razones que obligan a la industria alimentaria a medir el valor biológico de la proteína de sus productos, entre éstas destacan las regulaciones de la Food and Drugs Administration, sobre todo en casos de exportación en los que este organismo establece valores mínimos de calidad biológica de la proteína de ciertos alimentos. También es útil la predicción del valor biológico de una proteína o mezclas de éstas, con el propósito de desarrollar nuevos productos o realizar cambios en los ingredientes.^{8,9}

2. Métodos Biológicos.

Una forma de expresar la calidad de una proteína, es por medio de los ensayos biológicos que se basan en medir el crecimiento o el balance de nitrógeno en animales experimentales y la Relación de Eficiencia Proteica (REP) constituye ese parámetro, siendo el método más ampliamente utilizado.

En 1919, Osborne, Mendel y Ferri introdujeron el concepto de la REP, que después de ser modificado en varias formas, se convirtió en el procedimiento de mayor aplicación en la evaluación de una fuente de proteína, mediante pruebas biológicas.¹⁰ La REP es la ganancia en peso obtenido por gramo de proteína consumida, suponiendo que toda la proteína consumida es utilizada para el crecimiento.

$$REP = \text{ganancia en peso (g)} / \text{Proteína consumida (g)}$$

$$REP_{\text{ajustado}} = REP_{\text{dieta}} (REP_{\text{proteína de referencia teórico}} / REP_{\text{x dieta de referencia}})$$

El ensayo se realiza, usando un grupo de ratas machos Winstar recién destetados, cuyo peso oscile entre los 35-55g. A estos animales se les suministra una dieta que incluye el 10% en peso de la proteína a estudiar, de forma que el aporte proteínico sea el mínimo indispensable para el desarrollo del roedor por un lapso de 28 días.

Generalmente los valores REP experimentales se relacionan con los valores de la caseína experimental y los obtenidos de la evaluación estándar, cuyo valor es de 2.5.

2.1.3 Metionina

La Metionina es un aminoácido azufrado esencial para el ser humano debido que no puede sintetizarlo a partir de otros metabolitos. Su deficiencia provoca varios problemas en el organismo, uno de ellos; la falta de carnitina, la cual se encarga del transporte de ácidos grasos al interior de la mitocondria para la obtención de energía. Por lo que la carnitina acelera el proceso de oxidación de los ácidos grasos, luego entonces al presentarse una deficiencia en carnitina hay una disminución en la producción de energía por el uso de lípidos y un aumento de peso en el individuo.

Claro está que la deficiencia de este aminoácido es difícil de alcanzar, debido a que generalmente hay suficiente metionina disponible en la dieta. La carne, el pescado, la leche y el huevo son fuentes ricas en proteína y proporcionan una buena parte de este aminoácido, sin olvidar a los cereales que son ricos en aminoácidos azufrados, sin embargo, pobres en lisina, por lo que su proteína se complementa de muy buena forma con la de las leguminosas, que sufren del caso opuesto.

Este aminoácido es susceptible a la oxidación por reacciones de Maillard, produciéndose compuestos como metionina-sulfoxido y metionina-sulfona y también por acción de los hidroperóxidos producidos en la oxidación de los lípidos ya que los radicales libres proteicos entran en contacto con los radicales hidroperóxidos de los lípidos en oxidación lo que termina afectando de manera drástica la calidad de la proteína.³⁴

2.1.4 Digestibilidad *in Vitro*

Los aminoácidos presentes en las proteínas no están siempre disponibles en su totalidad, debido a que la digestión y/o absorción de los aminoácidos puede ser incompleta.

Las proteínas de origen animal son altamente asimilables ya que no hay factores que condicionen su adecuada absorción, mientras que las de origen vegetal lo son en menor proporción, estas últimas, solo son aprovechadas entre 60-70%, en parte debido a algunos factores antinutricionales pero además a que la digestibilidad de las proteínas de los alimentos está asociada con su contenido de fibra, lo que aumenta la excreción de nitrógeno en el excremento y reduce por consiguiente la digestibilidad de la proteína.¹¹

Esta baja digestibilidad de proteínas y aminoácidos en granos de leguminosas son atribuidos a la presencia de fracciones proteínicas menos digeribles, presencia de factores antinutricionales (que deben de ser trazas, después del proceso de cocción) y altas concentraciones de hidratos de carbono indigeribles y taninos (se ligan y desnaturalizan a las proteínas formando complejos estables).

Los procedimientos *in Vitro* se han desarrollado para remplazar a los procedimientos *in Vivo*, tratando de simular en lo más posible la digestión natural para determinar la biodisponibilidad de las proteínas sin recurrir a ensayos biológicos con el manejo de animales.

Así pues, esta prueba tiene su fundamento en que, al llevarse a cabo la digestión de las proteínas por proteólisis, se liberan al medio H^+ (por la ruptura del enlace peptídico), disminuyendo así el pH. Asumiendo una correlación entre la liberación de H^+ y la digestibilidad de la proteína, ésta última puede evaluarse por el registro de la disminución del pH, mientras más bajo sea el pH más digerible será la proteína.¹²

Estudios han demostrado que la proteína de los frijoles crudos es de 76-82.2% y después de haberles llevado a cabo un procedimiento de cocción poseen una digestibilidad *in vitro* de entre 84.1-93.2%.³⁵

2.2 Leguminosas

La familia de las leguminosas o fabáceas es la segunda en importancia después de los cereales desde el punto de vista alimenticio y al poseer un contenido de proteína de alrededor del 20% (50-70% de hidratos de carbono, 8% de fibra y 3% de minerales), de dos a tres veces más contenido proteico que los cereales, son las de mayor contenido en este nutrimento en el reino vegetal por lo que se considera que pueden cubrir una parte significativa del requerimiento de nitrógeno, al no haber presencia de proteínas de origen

animal, por ello el que sean tan atractivas para su estudio como fuentes de este nutrimento.^{13, 14}

Una de las leguminosas más consumidas en el mundo es el frijol peruano (*Phaseolus vulgaris*) y forma parte de la dieta tradicional mexicana, siendo obviamente la fuente vegetal de proteína más importante, teniendo un mayor beneficio al complementarla con el maíz, ya que las proteínas de las leguminosas son pobres en aminoácidos azufrados pero ricas en lisina, aminoácido deficiente en cereales.^{13, 15}

En la figura 1 se muestra la estereoquímica de la metionina y de la cisteína.

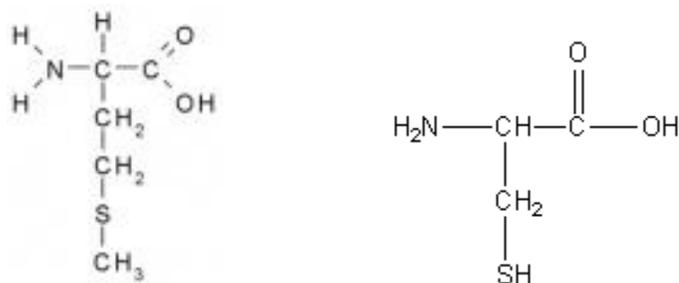


Figura 1. Estructuras de metionina y cisteína respectivamente.

Las semillas de leguminosas, sin embargo, poseen sustancias dañinas, como son: inhibidores de proteasas, fitohemaglutininas (lectinas), taninos y en algunos casos glucósidos cianogénicos, por lo que pueden provocar intoxicación aguda o crónica. La presencia de glucósidos cianogénicos en algunas variedades de estas plantas conduce a una ventaja biológica en comparación a las que nos los poseen debido a que ofrecen una defensa natural contra insectos.²³

Los inhibidores de proteasas y las lectinas se inactivan suministrando un tratamiento térmico a los granos o semillas. Los glucósidos cianogénicos son eliminados normalmente por el remojo, el cambio de agua de cocción e indirectamente por la cocción al inactivar la β -glucosidasa endógena en el grano.¹⁶

En este trabajo el tratamiento térmico fue similar al que se da en donde se consume el frijol comba.

2.2.1 Frijol Peruano (*Phaseolus vulgaris*)

Este es el frijol de mayor consumo en el país, es de origen americano y se cree que es nativo de México y Guatemala.

Su contenido de proteína es elevado, del 18-25%, por lo que en regiones del mundo donde la disponibilidad de proteínas animales es escasa, este frijol se consume en cantidades significativas.^{1, 17, 33}

México es uno de los principales productores de frijol en el mundo situándose solamente por debajo de India y Brasil, en el año 2000 se cosecharon 1.35 millones de toneladas del grano y desde entonces la producción se mantuvo estable.¹⁸ En el 2008 la producción nacional fue de 1.12 millones de toneladas, mientras que el consumo per cápita fue de 12Kg/persona.¹⁹

En cuanto a los factores tóxicos y antinutricionales contiene inhibidores de tripsina, quimotripsina y amilasa, lectinas, ácido fítico (acomplejante de minerales) y taninos (forman complejos con las proteínas, disminuyendo su disponibilidad y el valor nutricional del alimento), pero se encuentra libre de glucósidos cianogénicos.^{15, 17}



Figura 2. Frijol Peruano crudo.

2.2.2 Frijol Comba (*Phaseolus lunatus*)

El frijol comba es una subvariedad del frijol lima, la especie botánica *Phaseolus lunatus*, que es de la familia de las fabáceas. El frijol lima es una leguminosa antigua de origen americano. Debido a hallazgos arqueológicos realizados en Perú, se cree que la semilla es originaria de esa región ya que dichos hallazgos datan de hace 8000 años, mientras que la antigüedad de la semilla en Mesoamérica data de tan solamente 1200

años.²⁰ Actualmente se mantiene como cultivo tradicional en latino América, oeste de África y el sudeste asiático, mientras que en regiones como el suroeste de los E.U.A. se cultiva de modo más importante. De todos los *Phaseolus* es el que mejor se adapta a condiciones subtropicales. Es la especie más resistente a la mayoría de las enfermedades y plagas que afectan al *Phaseolus vulgaris*, las cuales, limitan su expansión.²¹ Por estas características resulta ser una leguminosa ideal para consumo en tierra caliente, como sucede en comunidades de los estados de Michoacán y Guerrero, pero actualmente su consumo se lleva a cabo solamente a nivel regional.²² 100g de esta leguminosa proporcionan poco menos de 350 Kcal.

Esta variedad, contiene factores tóxicos como; lectinas y glucósidos cianogénicos, siendo éste, el factor tóxico de mayor relevancia además de una diferencia entre el frijol comba y el frijol peruano, el cual no los contiene, y por último, factores antinutricionales como; inhibidores de proteasas. Las variedades negras son las que tienen un mayor contenido de ácido cianhídrico y de las variedades blancas se han reportado entre 10-20mg HCN/100g de frijol, particularmente pueden contener linamarina y ninguna variedad de este frijol está libre totalmente de este agente tóxico.^{16, 23}



Figura 3. Frijol Comba crudo.

2.3 Maíz (*Zea mays*)

Este cereal tuvo su origen hace aproximadamente unos 7000 años, con toda probabilidad, en América Central, especialmente en México y ha logrado adaptarse a muchos tipos de climas logrando así una difusión prácticamente mundial. En la actualidad se cultiva en climas fríos como los de Canadá y Rusia, y en altitudes que van desde por debajo del nivel del mar como lo son las llanuras del Caspio hasta los 4000 metros de altura en los andes Peruanos. Forma parte de la dieta mexicana por tradición, principalmente por

el consumo de tortilla, siendo un excelente complemento cuando se consume con frijol, debido a que su proteína es deficiente en lisina y triptófano pero rica en aminoácidos azufrados.²⁴

Se ha demostrado que el maíz contiene más niacina (vitamina B3, hidrosoluble) que muchos otros cereales, pero se encuentra como zimógeno, inactiva o muy poco disponible en el mejor de los casos, lo que afecta su disponibilidad. La falta de niacina en la dieta produce pelagra, enfermedad que afecta piel, tracto digestivo y el estado mental. Su deficiencia es poco común en centro América debido a que por tradición, en esa región, el maíz se ha tratado con álcali, lo que puede provocar que la niacina sea más disponible o quizás mejora el balance de aminoácidos aumentando la disponibilidad de triptófano. El organismo humano es capaz de sintetizar niacina a partir de triptófano, por lo tanto, si la proteína contiene una buena cantidad de triptófano, es posible evitar la pelagra.²⁵

En la figura 4 se muestra la estructura química de la lisina y el triptófano.

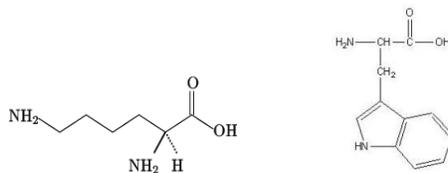


Figura 4. Estructuras de lisina y triptófano respectivamente.

2.4 Agentes tóxicos

Se consideran auténticos tóxicos los capaces de producir anormalidad fisiológica a corto plazo, sin que pueda disminuir por una suplementación alimenticia, generalmente son xenobióticos de alto grado de toxicidad y afectan un órgano blanco.

De modo genérico se puede definir la toxicidad de una sustancia como su capacidad de producir efectos nocivos a un organismo vivo. De este modo habrá sustancias débilmente tóxicas que producirán efectos nocivos si se administran en dosis elevadas y sustancias con alto grado de toxicidad que provocan efectos nocivos con bajas dosis administradas. Para valorar el grado de toxicidad de una sustancia es necesario valorar por lo menos uno de los siguientes puntos:

- Dosis (cantidad de sustancia absorbida).
- Vía de administración (oral, intramuscular, subcutánea, etc...).
- Frecuencia de administración.

- Grado de toxicidad.
- Tiempo (el necesario para que aparezcan los efectos).

Los efectos de las sustancias tóxicas están relacionados con la duración o tiempo de exposición, los estudios toxicológicos se dividen por lo general en tres categorías:

1. Estudios de toxicidad aguda o a corto plazo (24 – 48 horas).
2. Estudios de toxicidad sub-crónica o a mediano plazo.
3. Estudios de toxicidad crónica o a largo plazo.

La toxicidad aguda se define como Los efectos tóxicos adversos que aparecen en un corto periodo después de la administración de una dosis única o de múltiples dosis en un intervalo de 24 horas.³³ También nos ayuda a establecer, la dosis que provoca la muerte del 50% de los animales con los que se lleva a cabo el estudio, conocida también como Dosis Letal media (DL₅₀).

La toxicidad sub-crónica es el conjunto de los efectos observados después de una administración cotidiana de una o varias dosis de la sustancia estudiada. Esta prueba dura generalmente un periodo de aproximadamente el 10% de la vida del animal o tratamientos más cortos de 14 a 28 días para roedores pequeños como el ratón. Su objetivo es determinar los posibles efectos acumulativos en tejidos y sistemas metabólicos.

La toxicidad crónica se encarga de evaluar los resultados de la exposición a una sustancia de estudio durante mucho tiempo a dosis relativamente bajas, estos ensayos requieren que la ruta de administración sea apropiada ya que así será durante una gran parte de la vida del animal utilizado en el estudio.³³

2.4.1 Glucósidos cianogénicos

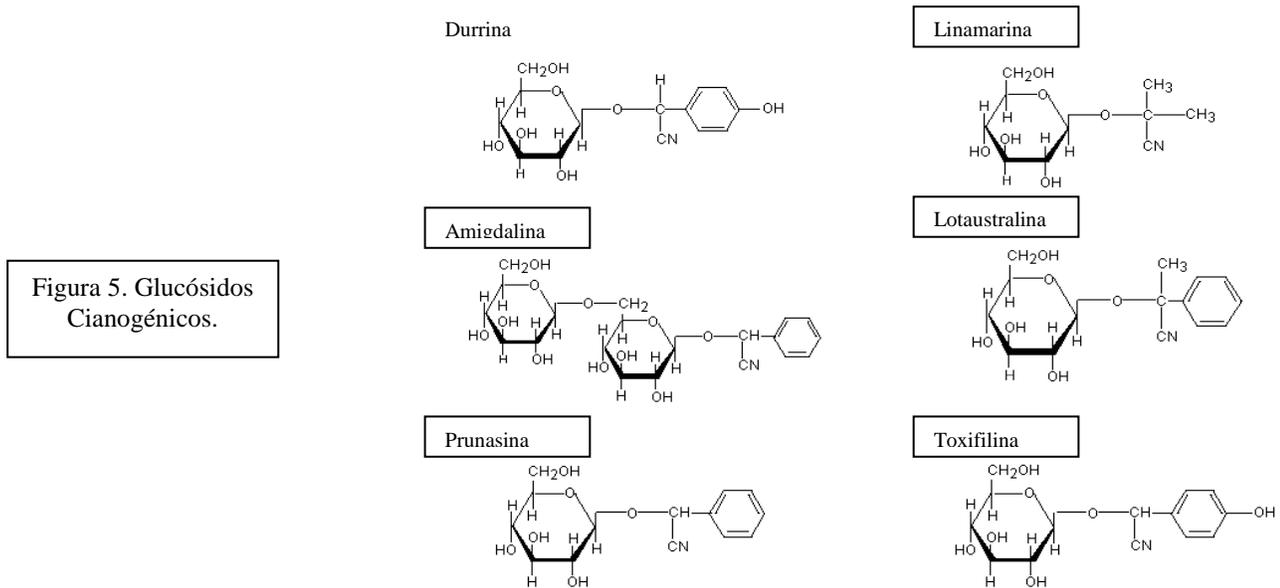
Estas toxinas se encuentran en los frutos de numerosas especies de plantas pertenecientes a diversas familias y algunas de ellas son utilizadas por el hombre como alimento. Existen cuatro de mayor relevancia; linamarina, amigdalina, durrina y lotaustralina (Figura 5).²³

El responsable de la toxicidad de los glucósidos cianogénicos es el ácido cianhídrico el cual es liberado por medio de acción enzimática o de algunas bacterias intestinales capaces de desdoblar el enlace β -glucosídico entre el hidrato de carbono y el carbono adyacente al grupo ciano.

Los glucósidos cianogénicos son eliminados normalmente por el remojo, el cambio de agua y la cocción, este último tratamiento actúa indirectamente, ya que se encarga de desnaturalizar a la β -glucosidasa endógena de la semilla, que puede liberar el ácido cianhídrico, durante alguna de las operaciones anteriormente descritas.²³

El cianuro que es liberado al organismo produce una acción anoxiante al unirse con la citocromo-c-oxidasa de las mitocondrias de manera irreversible ya que posee una afinidad muy grande por ella, aun mayor a la del Fe^{3+} , impidiendo así la respiración celular.^{15, 16}

Esta reportado que material biológico arriba de HCN 10mg/100g de frijol causan daño en humanos aunque en los Estados Unidos un contenido entre HCN 10-20mg/100 de frijol está estimado como seguro y dentro de su límite legal.²⁶



2.4.2 Lectinas (fitohemaglutininas)

La mayoría de estos tóxicos se encuentran en las semillas de leguminosas y poseen afinidad específica por los residuos glucosídicos localizados en la superficie de los eritrocitos (glóbulos rojos). La presencia de estas fitohemaglutininas, en las semillas, las hace un alimento no apto para el ser humano, pero afortunadamente pierden su actividad debido a la cocción ya que son termolábiles por su naturaleza proteínica.^{15, 16}

Pueden ser caracterizadas y detectadas por su acción en los eritrocitos, debido a su especificidad, por ejemplo; los *Phaseolus lunatus* y *vulgaris* poseen una lectina específica para el grupo sanguíneo humano A y sólo el *vulgaris* posee, además, una para el tipo B, aunque también las hay inespecíficas, las cuales aglutinan los eritrocitos humanos de cualquier tipo.

Todas producen síntomas similares en menor o mayor intensidad; intensa inflamación de mucosa intestinal, posterior destrucción de los epitelios y por último hemorragia del tejido linfático. Esto es porque las lectinas reconocen residuos glucosídicos (como en la superficie del eritrocito) en los enterocitos de la mucosa y de las micro vellosidades del yeyuno, elevando la descamación de la mucosa y disminuyendo de tamaño las micro vellosidades, con lo que disminuye la superficie de absorción de nutrientes, obstaculizando su función, provocando; inflamación, edema y necrosis intestinal.¹⁶

2.4.3 Factores antinutricionales

Son sustancias que provocan una disminución en la disponibilidad o una pérdida suplementaria de los nutrientes esenciales. Provocan desequilibrio que se compensa con aporte suplementario de los nutrientes implicados al inicio, si no, a la larga determinan la aparición de una patología en particular. El aporte suplementario del nutriente permite restablecer el valor del alimento.^{15, 27}

Se clasifican de acuerdo al nutriente con el que interaccionan en:

- ▶ Inhibidores de enzimas: Sustancias que afectan la actividad metabólica de las enzimas.
- ▶ Anti vitaminas: Sustancias que inactivan o aumentan los requerimientos de vitaminas.
- ▶ Agentes secuestrantes de minerales: sustancias que interfieren en la asimilación de los minerales (ej. ácido fítico).

2.4.3.1 Inhibidores de Tripsina

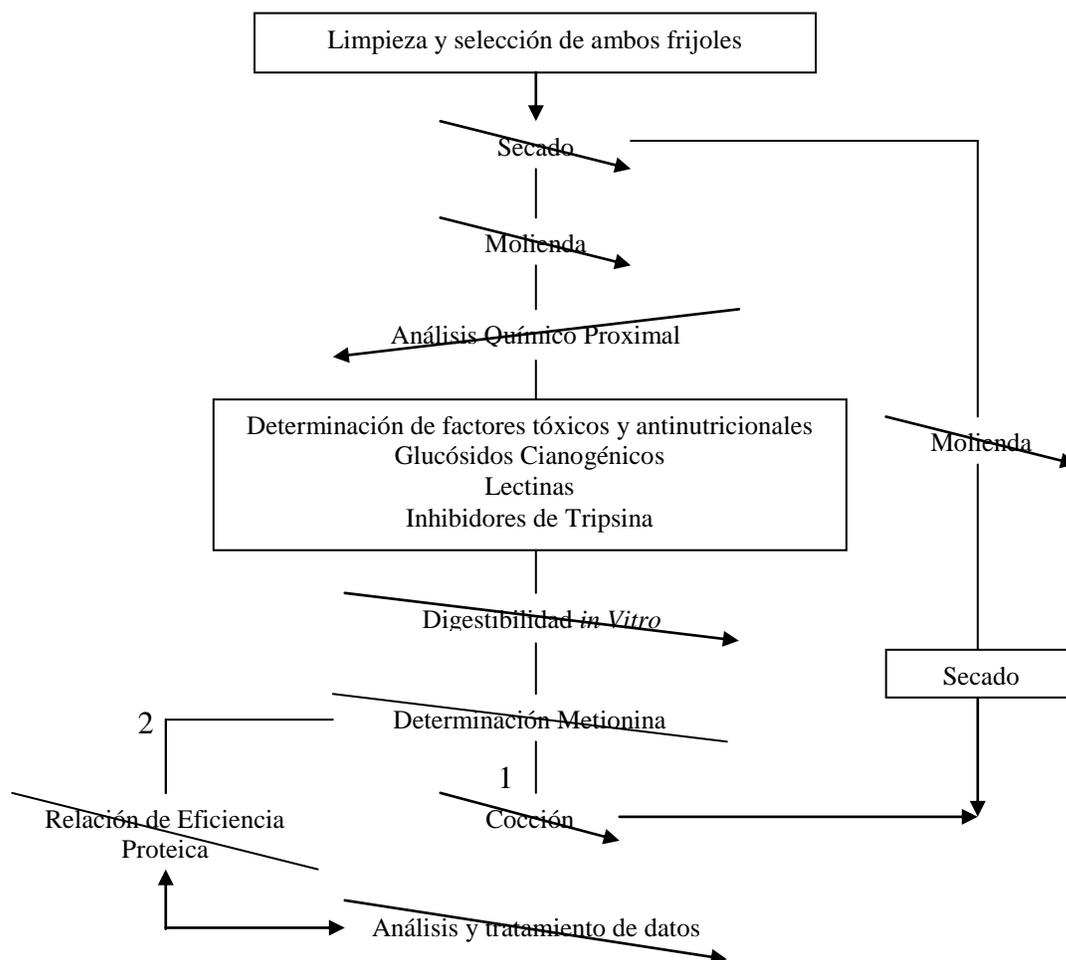
Son sustancias capaces de inhibir la actividad proteolítica de ciertas enzimas (tripsina, quimo tripsina, amilasa, carboxipeptidasa), se encuentran en el reino vegetal, sobre todo, localizados en los órganos reproductores de los vegetales y están ampliamente distribuidos

en las leguminosas. Las leguminosas son limitantes en su contenido de aminoácidos azufrados y estas sustancias condicionan el valor biológico real de las proteínas al no permitir que las enzimas las desdoblen para una mejor digestión y posterior aprovechamiento.

La inhibición de la tripsina estimula al páncreas a secretar en exceso debido a la falta de enzimas proteolíticas libres, por la formación del complejo enzima-inhibidor, lo que agranda e incrementa la demanda de la enzima por el órgano.¹⁵

Son sustancias de naturaleza proteica y por ello son termolábiles, por lo que con un proceso de cocción adecuado se puede, por lo menos, disminuir en gran medida la actividad de estos inhibidores al desnaturalizarlos.²⁷ El grado de destrucción de estos inhibidores depende de la temperatura, del tiempo que se lleve a cabo el tratamiento, del volumen del alimento y de su contenido de agua, pero siempre y cuando el tratamiento (cocción) sea efectivo, es así como se hace posible el consumir los frijoles. Ambas especies de *Phaseolus*, mencionadas anteriormente, contienen estos compuestos, sobre todo los inhibidores de tripsina, aunque bien pueden coexistir con inhibidores de quimotripsina.¹⁶

3. Materiales y métodos.



3.1 Material biológico

Las muestras fueron frijol comba blanco tardío (*Phaseolus lunatus*) y frijol peruano (*Phaseolus vulgaris*), colectados en mayo del 2000 en el municipio de San Miguel Totolapan, Guerrero. El material biológico se separo del material extraño y de los granos dañados.

El maíz fue adquirido en forma de harina nixtamalizada marca Minsa.

3.2 Análisis Proximal¹²

Al material biológico tanto crudo como cocido se le determino la composición de macro nutrientes. Las determinaciones se realizaron de acuerdo a las técnicas de la AOAC¹², donde se lleva a cabo el análisis proximal o sistema analítico Weende.

3.2.1 Determinación de Humedad¹²

Esta determinación se lleva a cabo por gravimetría comparando el valor inicial del peso de la muestra y contra uno final, después del tratamiento de secado que se le proporciona.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Estufa de vacío LAB-LINE
- Estufa de corriente forzada LAB-LINE
- Balanza analítica Sartorius Analytic 022605
- Desecador
- Pesa filtros o charolas de aluminio

PROCEDIMIENTO

Previamente se llevan a peso constante las charolas de aluminio donde se piensa llevar a cabo la determinación. Se coloca la muestra en el recipiente (de 2-5g) tratando de presentar la mayor cantidad de superficie de evaporación.

Se introduce en la estufa de vacío a 60-65°C de 4-6 horas. Después de ese tiempo las muestras se retiran de la estufa, se colocan en un desecador y evitar que estas vuelvan a ganar humedad del ambiente, mientras llegan a la temperatura ambiente, entre 10-15 min.

Todas las pesadas se deben hacer inmediatamente después que son sacadas del desecador. Se considera peso constante cuando solamente hay variación en la cuarta cifra decimal.

CÁLCULOS

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

Donde:

P_i: Peso inicial de la charola con la muestra antes del proceso de secado (g)

P_f: Peso final de la charola con la muestra después del proceso de secado (g)

m: Peso de la muestra (g)

3.2.2 Determinación de cenizas¹²

Las cenizas representan la fracción de materia inorgánica que posee el alimento, pero para llegar a esa fracción es necesario eliminar de la materia orgánica por lo cual se somete a calcinación. Posteriormente se determina el grado de cenizas totales por gravimetría.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Mufla THERMOLYNE
- Balanza analítica Sartorius Analytic 022605
- Mechero Bunsen
- Crisoles de porcelana
- Desecador

PROCEDIMIENTO

Los crisoles se ponen previamente a peso constante a 550°C dentro de la mufla, marcándolos con lápiz o cualquier otra sustancia que no se elimine en el proceso de incineración.

Se colocan de 2-3g de muestra en el crisol y se carbonizan a la flama de un mechero bajo la campana de extracción. Cuando ya no haya desprendimiento de humo se puede introducir el crisol a la mufla la cual debe encontrarse entre 500-550°C mínimo 2 horas o el tiempo necesario para que el color sea homogéneo.

CÁLCULOS

$$[(P_f - P_o) * 100] / m = \% \text{ Ceniza}$$

Donde:

P_f: Peso del crisol con la muestra después de incinerada (g)

P_o: Peso del crisol a peso constante (g)

m: Peso de muestra (g)

3.2.3 Determinación de contenido graso¹²

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

El solvente más eficaz es el éter etílico y se utiliza en el establecimiento de las normas existentes. Aunque se puede utilizar el éter de petróleo ya que absorbe menos humedad que el éter etílico.

El material debe estar libre de agua y/o alcohol, ya que el éter húmedo disuelve el azúcar y algunos otros carbohidratos; por ello la muestra debe de estar seca.

Una razón por la cual es importante determinar el dato de grasa, es poder aislar la fracción alta en contenido calórico.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Equipo de extracción Goldfish, LABCONCO
- Vasos de borde esmerilado KIMAX
- Cartuchos de celulosa de 22*80mm
- Éter de petróleo
- Estufa de vacío LAB-LINE
- Balanza analítica Sartorius Analytic 022605
- Canasta de calentamiento eléctrica GLAS-COL

PROCEDIMIENTO

Aprovechando la muestra seca de la determinación de humedad, se toman y colocan de 2-5g de muestra en el cartucho de celulosa y se coloca en la porta dedal y este a su vez en el seguro metálico del equipo. A continuación se adicionan 50 mL de solvente sobre el vaso de borde esmerilado y este con la ayuda del anillo metálico son rosca se asegura al aparato de extracción.

Para calentar se sube la parrilla hasta que esté en contacto con el vaso, se abre la llave de agua para que circule sobre el refrigerante. Como se trabaja con éter es conveniente colocar el control de calentamiento en LOW. El calentamiento se lleva a cabo durante aprox. 8hrs. y después de ese periodo de extracción, se bajan las parrillas de calentamiento, se colocan los platillos de seguridad, se quita el anillo de rosca y se deja caer una gota de solvente en papel filtro, si al evaporarse el solvente no deja mancha de grasa, se saca el porta dedal con el cartucho, sustituyéndose por el tubo recuperador volviéndose nuevamente a colocar el vaso para nuevamente proceder a calentar, pero en este caso el solvente quedara retenido en el tubo recuperador. Una vez que el vaso éste libre de

- Tubos de digestión TECATOR de 75mL
- Mezcla digestiva **(a)**
- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Sulfato de Potasio (R.A.)
- Solución de NaOH al 40%
- Solución de ácido bórico con indicadores **(b)**
- Solución de HCl 0.01N valorada

(a) Disolver 3g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 20mL de agua destilada; se adicionan 50mL de ácido orto fosfórico (H_3PO_4) y una vez que esté bien disuelta la sal, se adiciona con mucho cuidado y resbalando por la pared del recipiente 430mL de ácido sulfúrico concentrado. Esta mezcla se deja agitando por aproximadamente 30min.

(b) Se pesan 10g de ácido bórico y se coloca en un matraz aforado de 1L, se le adiciona agua hasta disolverlo (sin aforar) y a continuación 10mL de verde de bromocresol [100mg de verde bromocresol en 100mL de metanol] y 7mL de rojo de metilo [100mg de rojo de metilo en 100mL de metanol]. Se ajusta el color a un tono café rojizo con ácido o álcali según se requiera y se afora a 1L con agua destilada.

PROCEDIMIENTO

Pesar de 10-100mg de muestra y colocarlos en el tubo de digestión, se agregan aproximadamente 0.5g de K_2SO_4 y 3mL de mezcla de digestión, se coloca el tubo en el digestor por espacio de 15min, se retira del digestor y se deja enfriar un poco para poder adicionarle 1.5mL de H_2O_2 y nuevamente colocarlo en el digestor a 370°C . La digestión termina cuando la mezcla de digestión es transparente y sin partículas negras.

Se deja enfriar y se procede a realizar la destilación en el micro destilador, el cual debe estar previamente en proceso de destilación (caliente).

El equipo se enjuaga con un tubo blanco lleno con agua y se calibra con dos tubos de dextrosa, una vez listo, se la adicionan a la muestra 25 ml de agua destilada, se coloca el tubo, se cierra la puerta de seguridad y se da inicio a la destilación y a la titulación, la destilación la lleva a cabo el equipo con NaOH al 40% y la titulación con HCl 0.01N.

Finalmente el amoniaco atrapado en el ácido bórico se titula con HCl 0.01N, hasta un vire de color verde esmeralda a un rosa claro.

CÁLCULOS

Para realizar los cálculos es conveniente correr un blanco, en donde se sustituye la muestra por el equivalente en peso de glucosa o sacarosa; trabajándose de la misma forma.

$$[(P - B) * N * meq * 100] / m = \%N_2$$

$$\%Proteína = \%N_2 * F$$

Donde:

P: mL de la titulación de la muestra

meq: mili equivalentes de nitrógeno (0.014)

B: ml de la titulación del blanco

m: peso de la muestra en g

N: Normalidad de la solución de HCl

F: factor de conversión (6.25)

3.2.5 Determinación de fibra¹²

Podemos dividir los hidratos de carbono de origen vegetal en dos partes; los no estructurales, como los almidones y azúcares, y los estructurales como la celulosa y hemicelulosa, lo denominado como fibra cruda.

Para determinar la fibra cruda es necesario trabajar con una muestra desengrasada y someter a una hidrólisis ácida seguida de una hidrólisis alcalina con una posterior incineración del material insoluble para así, por diferencia, calcular el contenido de carbohidratos no asimilables.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Vaso de Berzelius de 600mL
KIMAX
- Equipo de digestión LABCONCO
- Estufa de vacío LAB-LINE
- Mufla THERMOLYNE
- Aparato de digestión Fibretec
TECATOR mod. 1010-Heat
Extractor
- Crisoles de porcelana y de vidrio-
TECATOR
- Filtros california marca
TECATOR
- Solución H₂SO₄ al 1.25% (m/v)
- Solución NaOH 1.25% (m/v)
- Antiespumante (emulsión
SIGMA-B)Alcohol etílico

PROCEDIMIENTO

Se pesan de 2-5g de muestra desengrasada sobre un vaso de Berzelius que contenga 0.5g de silicato de aluminio (limpio y calcinado) y 3 perlas de vidrio. A continuación se le adicionan 200mL de H₂SO₄ al 1.25% (que esté hirviendo), y unas gotas de antiespumante e inmediatamente se coloca en el equipo de digestión, el cual debe estar previamente caliente; se deja digerir por espacio de 30min exactos. Después de dicho periodo se vacía el contenido sobre un buchner con malla metálica (filtros california) y se realiza la filtración con ayuda de vacío; lavando el residuo con agua destilada caliente, hasta eliminar el ácido (aprox. 500mL) Una vez lavado el residuo se transfiere nuevamente al vaso de Berzelius, se le adiciona unas gotas de antiespumante, las 3 perlas de vidrio y 200mL de NaOH 1.25% que este hirviendo y se mantiene en el aparato de digestión por exactamente 30min, transcurrido el tiempo se vacía nuevamente al filtro y se filtra, lavando el residuo con agua destilada caliente (aprox. 500mL), hasta eliminar el álcali y también quitar las perlas de vidrio, lavándolas con agua para recuperar el material adherido. Por último se le adiciona al residuo 25mL de etanol.

El residuo se pasa a un crisol de porcelana (a peso constante) cuidando de pasarlo de forma cuantitativa. Se coloca en la estufa de vacío para su secado de 4-8horas y después se pesa. A continuación se carboniza y se introduce en la mufla para su incineración, para después de realizada dicha operación, enfriar en desecador y volver a pesar el crisol.

CÁLCULOS

Y a que se requiere trabajar con la muestra desengrasada (por lo tanto sin humedad), el peso de la muestra será el referido al peso inicial previo de las anteriores determinaciones.

$$[(P_s - P_c) * 100] / m = \% \text{ Fibra}$$

P_s: Peso obtenido después de incinerar m: peso de la muestra inicial

P_c: Peso del crisol

3.2.6 Determinación de hidratos de carbono asimilables¹²

Estos carbohidratos se calculan por medio de diferencia de los datos obtenidos anteriormente de la siguiente forma:

$$\text{CH asimilables} = 100 - [\%(\text{humedad} + \text{cenizas} + \text{extracto etéreo} + \text{proteína} + \text{fibra cruda})]$$

3.3 Análisis de factores toxicológicos

3.3.1 Glucósidos Cianogénicos²⁸

Un método para detectar la presencia de ácido cianhídrico en material biológico es la reacción de Guignard, la cual consiste en hacer reaccionar el picrato de sodio con el HCN para producir un compuesto colorido, isopurpurina.

Se humedece un papel con al 1% de ácido pícrico. Si la prueba es positiva, el papel cambia de color de amarillo/naranja a rojo y por lo tanto el material analizado posee 10 μ g o más de ácido cianhídrico por gramo de material analizado.

Para cuantificar el HCN total liberado se adiciona una β -glucosidasa exógena para la hidrólisis del correspondiente glucósido cianogénico. Con este método se puede detectar hasta 5 μ g de HCN, equivalente a 46 μ g de glucósido cianogénico (expresado como linamarina).

MATERIAL Y REACTIVOS

- Incubadora BLUE-M
- Congelador comercial REVCO
- Espectrofotómetro Thermo Scientific
- Baño de agua con agitación LAB-LINE INSTRUMENT
- Tubos de cultivo con tapón de rosca Pyrex #'s 9825 y 9826
- Micro molino marca TECATOR mod. CYCLO-TEC
- Solución de β -glucosidasa con activador **(a)**
- Solución de KCN equivalente a HCN 100 μ g/mL (24.1mg/100mL)
- HCl 0.5N
- Fécula de maíz marca Maizena
- Buffer de fosfatos pH = 7.0 **(b)**
- Solución de picrato de sodio alcalinizada **(c)**
- Papel indicador de HCN **(d)**

(a) Disolver 0.25g de β - glucosidasa en solución buffer de fosfatos pH 7.0, agitando suavemente (de lo contrario se forma espuma). Una vez disuelta la enzima, adicionar 1.7g de NaNO₃ que actúa como activador de dicha enzima; aforar a 250mL con el mismo buffer. Así se tiene una concentración de 1mg de β -glucosidasa/mL y 0.08M de NaNO₃.

- (b) 39mL de la solución A [2.4g de fosfato monobásico de sodio (NaH_2PO_4) en 100mL de agua destilada para tener una concentración 0.2M] se agregan 61mL de solución B [2.84g de fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4) en 100mL de agua destilada para tener una concentración 0.2M] una vez mezclados se afora hasta 200mL.
- (c) Se disuelve en agua destilada 2.5g de ácido pícrico y a continuación 12.5g de carbonato de sodio, llevándose a un volumen de 500mL con agua destilada.
- (d) De papel Whatman #2 se cortan tiras de 2*10cm se empapan en una solución de picrato de sodio alcalinizada, se deja escurrir y se pone a secar en una estufa a temperatura de 55-60°C por 30 minutos.

PROCEDIMIENTO

Curva estándar. Para la elaboración de la curva estándar de referencia, se usa una solución de cianuro de potasio con una concentración equivalente a HCN 100µg/mL. Además con el fin de simular la interacción muestra-HCN liberada se introduce en una curva estándar la llamada matriz alimenticia, que en este caso es fécula de maíz comercial.

Tabla 3. Curva estándar para glucósidos cianogénicos.

mL solución estándar	Matriz alimenticia (mg)	Buffer pH = 7.0 (mL)		HCl 0.5N (en frío, mL)	[HCN] (µg)
0	500	5.0	$40^\circ\text{C} / 4\text{hrs}$ 	1.0	Blanco
0.05	500	5.0		1.0	5
0.1	500	5.0		1.0	10
0.2	500	5.0		1.0	20
0.4	500	5.0		1.0	40
0.6	500	5.0		1.0	60

a) Preparación de la muestra

Se somete a molienda fina el material biológico íntegro e inmediatamente se pasa a un frasco que cierre perfectamente. Si la determinación no se lleva a cabo en ese momento, se procede a colocar la muestra ya molida en un congelador.

b) Procedimiento de análisis

Liberación de HCN de la muestra. Se coloca en un tubo de cultivo Pyrex de 20-500mg de muestra, dependiendo de su contenido aproximado de glucósidos cianogénicos (cuando no se tiene información se coloca la cantidad máxima, 500mg); a continuación se le adicionan 5.0mL de solución de β-glucosidasa (fría), se homogeneiza y se procede a

colocar la tira de papel indicador humedecida (aprox. con 8 gotas de agua) en la boca del tubo y se cierra perfectamente con tapón de rosca.

Los tubos se colocan en el baño maría a una temperatura de $40 \pm 1^\circ\text{C}$, con un control de agitación ajustado a 3.5 oscilaciones/min, 4 horas. Al final de dicho tiempo se sacan los tubos y se colocan en el congelador por 30min.

Una vez cumplido ese tiempo se sacan los tubos y se destapan para adicionarles 1.0mL de HCl 0.5N (frío); es importante que se utilicen los tapones adecuados, de esta forma la tira de papel indicador queda adherida a dicho tapón y se evitan problemas de manipulación en este paso.

Una vez adicionado el HCl, se vuelven a cerrar nuevamente, se homogeneiza el contenido teniendo cuidado de que el líquido no toque el papel indicador y se coloca en la incubadora por espacio de 15min a 60°C . Transcurrido ese tiempo, se saca de la incubadora y en ese momento se procede a realizar la detección cualitativa, aquellos tubos que no muestren ningún cambio en la coloración del papel indicador, se consideran negativos; en tanto aquellos que sí la muestran, son positivos y se procede a su determinación cuantitativa.

c) Determinación cuantitativa

Con cuidado se procede a recuperar el papel indicador y se coloca en un tubo de cultivo, se le adicionan 20mL de agua destilada (medidos con bureta) se tapa y se agita vigorosamente con el fin de extraer el pigmento de isopurpurina del papel indicador en el agua. Después de extraer el pigmento (aprox. 2-5min) se filtra el extracto acuoso con papel de filtración rápida. El filtrado se coloca en la foto celda para su lectura con el espectrofotómetro a una longitud de onda de 520nm; previamente ajustado a 100% de transmitancia con el blanco correspondiente (todos los reactivos, excepto la muestra).

CÁLCULOS

Trazar la curva patrón usando los valores de absorbancia en el eje de las ordenadas y las correspondientes concentraciones de HCN (μg) en el eje de las abscisas. Interpolar el valor de la Absorbancia de la muestra en la gráfica para obtener el contenido de HCN liberado en μg . Para obtener el contenido de HCN en la muestra.

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

Donde:

X: μg de HCN

D: número de veces de adición de 20mL de agua (dilución), si la Absorbancia sale de los valores de curva estándar.

M: mg de muestra

$(\text{HCN } \mu\text{g} * D/\text{mg muestra}) * (\text{HCN } 1\text{mg}/1000\mu\text{g HCN}) * (1000\text{mg muestra}/1\text{g muestra}) = \text{HCN mg}/\text{g muestra}$

$\text{HCN mg}/\text{g muestra} * 100 = \text{HCN mg}/100 \text{ g muestra}$

3.3.2 Lectinas²⁸

La metodología utilizada es la técnica de Jaffé; una técnica de dilución seriada en micro placas de 96 pozos, en donde se detectan las lectinas aprovechando la capacidad de aglutinación de los eritrocitos de hámster, expresando los resultados en forma cuantitativa, ya que se ha encontrado una buena correlación en la toxicidad de las lectinas del frijol común con el método de micro titulación.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Agitador magnético
- Centrifuga Eppendorf (5702)
- Tubos de centrífuga de 15mL con graduación
- Jeringa 5mL
- Incubadora BLUE-M.
- Espectrofotómetro Thermo Scientific
- Adaptador para celdas
- Microtiter Kit (CooK Eng-Alexander Virginia USA)
- Crisol de vidrio con poro grueso
- Sangre de hámster dorado
- Solución anticoagulante: heparina
- Solución salina al 1%
- Solución salina al 0.9%
- Solución de pronasa al 0.2% en solución salina
- Lectina de *Ph. vulgaris* (SIGMA L-8754)

PROCEDIMIENTO

a) Preparación del extracto

Se muele la muestra finamente, se suspende 0.1g en 10mL de solución salina al 1%, se efectúa una extracción con agitación magnética durante 2hrs a 300 r.p.m. a temperatura ambiente. Se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 15min para eliminar el residuo insoluble; el sobrenadante se filtra a través del filtro de vidrio y de ser necesario se puede lavar el residuo con más solución salina al 1% para llevar el extracto filtrado al volumen inicial de 10mL.

b) Preparación de la sangre

Se sangra por vía ocular a un hámster y la sangre se coloca en un matraz pequeño que contenga solución anticoagulante, se agita suavemente y se trasvasa a tubos de centrifuga para lavarla 3 veces con solución salina al 0.9%. La relación sangre:solución salina es aproximadamente 1:5. Se centrifuga a 1500 r.p.m. durante 10min. Después del último lavado, se mide en el tubo, la cantidad de paquete de eritrocitos y se diluyen al 4% para lo cual se agregan por cada 1.0mL de glóbulos rojos 24mL de solución salina al 0.9%.

c) Sensibilización de los glóbulos rojos

A cada 10mL de suspensión de glóbulos rojos al 4% se les agrega 1mL de solución de pronasa al 0.2% y se coloca en la incubadora por espacio de 1h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ Después del tiempo estipulado, se centrifuga, se lava 3 veces con solución salina al 0.9%. Al termino del último lavado se resuspende el paquete de glóbulos rojos al 4% (por cada 1.0mL de paquete de eritrocitos se adicionan 24mL de solución salina al 0.9%).

d) Ajuste de la suspensión de glóbulos rojos

Se toma 0.1mL de la suspensión de glóbulos rojos ya sensibilizados y se agregan 4.9mL de solución salina al 0.9%. Se lee en el espectrofotómetro a 620nm, usando un adaptador de celdas que permita el paso de sólo 1cm^2 de luz y para ajustar el espectrofotómetro al 100% de transmitancia se usa como blanco, solución salina al 0.9%. La lectura que se debe obtener es de $25\% \pm 1$ de transmitancia.

e) Micro titulación

En las placas tipo “V” del microtiter, se coloca en cada pozo de una hilera 100µL de solución salina al 0.9% con la micro pipeta multicanales evitando tocar las paredes del pozo.

Se llena el micro dilutor de 50µL por contacto con la superficie del extracto problema y se procede a realizar las diluciones sucesivas en la hilera escogida, introduciendo el micro dilutor en el pozo y rotándolo sin excesiva presión, para realizar la micro dilución seriada. Lo anterior también se realiza para la solución diluida (1:100) de la lectinas comercial que servirá de referencia para la determinación cuantitativa.

Con un pipetero de gota se coloca en cada pozo 50µL de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizados. Luego se rota la placa en forma circular y se lleva a la incubadora que esta a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 1h.

f) Lectura

Después de la hora de incubación Se coloca la micro placa de plástico sobre el dispositivo de lectura y se observa a través del espejo el fondo de los pozos de cada hilera de prueba.

Se reporta la máxima dilución que presente aglutinación.

CÁLCULOS

La máxima dilución que presenta aglutinación se denomina como título (t) de la muestra. La prueba debe efectuarse varias veces para mayor representación y confiabilidad de la determinación (mínimo por triplicado). Se saca el promedio de los títulos de las diferentes lecturas y se redondea al número entero más cercano.

a) Se calcula el límite de detección del método usando como referencia la faseolotoxina (SIGMA L-8754); para lo cual, primero es necesario conocer la cantidad de lectina que se utiliza realmente en la determinación y se calcula de la siguiente forma:

$$E = M * D$$

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

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 $\mu\text{g/mL}$)

D: Cantidad de muestra tomada por el microdilutor (μL)

Conociendo este dato se puede efectuar el cálculo para obtener el límite de detección del método:

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

Donde:

L: Límite de detección, cantidad mínima de lectina que produce prueba positiva de aglutinación (expresada en μg)

t: Título o el promedio de los títulos redondeando al entero inmediato.

b) Con el resultado del límite de detección, se calculan las unidades hemoaglutinantes (UHG) de la muestra problema, para lo cual es necesario calcular la cantidad utilizada realmente de la muestra problema en el primer pozo de la hilera respectiva como se hizo anteriormente, pero expresada en mg; a su vez, se calcula la cantidad mínima de muestra que produce prueba positiva de aglutinación (título de la muestra problema).

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

Donde:

MA: Cantidad mínima de muestra que produce aglutinación (expresada en mg)

E: Cantidad de muestra en el primer pozo (expresado en mg)

t: Título o promedio de los títulos redondeado al entero inmediato.

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

$$LE = L/MA$$

Donde:

LE: Cantidad de lectina de referencia expresada en $\mu\text{g/mg}$ de muestra que también equivale a lectina 1 mg/g de muestra.

Si por definición establecemos que 1 unidad de hemoaglutinación (UHG) es equivalente a 1mg de faseolotoxina bajo las condiciones establecidas, podemos expresar nuestros resultados en UHG/g de muestra.

3.3.3 Inhibidores de Tripsina²⁹

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 410nm. Dicha coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores en la muestra.

MATERIAL Y REACTIVOS

- | | |
|--|--|
| ▶ Potenciómetro CORNING mod. 10 | ▶ HCl 0.001N |
| ▶ Parrilla con agitación magnética CORNING STTRRER Multiple position 5x400mL | ▶ Ácido acético 30% |
| ▶ Baño María GRANT | ▶ Solución amortiguadora TRIS (hidroximetil-amino-metano) pH 8.2, 0.05M (a*) |
| ▶ Espectrofotómetro Thermo Scientific | ▶ Solución estándar de Tripsina bovina (SIGMA # T-8253) (b*) |
| ▶ Mezclador de tubos LAB-LINE | ▶ Solución de BAPNA (benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida-HCl) (SIGMA B-4875) (c*) |
| ▶ NaOH 0.01N | |

(a*) Se pesan 1.51g de TRIS y 0.73g de cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), se disuelven en 200mL de agua destilada, se ajusta el pH a 8.2 y se afora a un volumen de 250mL.

(b*) 100mg de BAPNA se disuelven en 2.5mL de dimetilsulfóxido y se diluye en 250mL de amortiguador TRIS previamente calentado a 37°C.

(c*) Se pesan 4mg de tripsina bovina y se disuelven en 200mL de HCl 0.001N.

PROCEDIMIENTO

a) Preparación del extracto

Se pesa un gramo de la muestra finamente molida en un vaso de precipitados, se le adicionan 45mL de NaOH 0.01N, se ajusta el pH de esta suspensión a 9.6 ± 0.2 y se afora con agua destilada a 50mL. Se trasvasa a un vaso que contenga un magneto para agitar la suspensión por espacio de 2:30 hrs. A 300 r.p.m. Después de dicho tiempo se detiene la agitación, se deja reposar por 30min. Y por simple decantación se obtiene el sobrenadante desechando el residuo insoluble. El sobrenadante debe ser diluido hasta el punto que 1.0mL produzca una inhibición de 40-60%; este requisito es indispensable para reducir la desviación estándar relativa.

b) Determinación de la actividad

Porciones de 0.0, 0.6, 1.0, 1.4 y 1.8mL de extracto directo o diluido son pipeteados a tubos de ensaye por duplicado (2 series de 5 tubos) ajustando el volumen a 2.0mL con agua destilada. Se introducen a baño maría a 37°C. A una serie de los 5 tubos se les adicionan 2.0mL de solución estándar de tripsina (previamente mantenida a 37°C) a cada tubo, se agita y mantiene el contacto inhibidor-tripsina por espacio de 10min en el baño a 37°C. A continuación se adicionan 5.0mL de solución de BAPNA (previamente mantenida a 37°C), se agita y se mantiene dicha mezcla de reacción por 10min exactos (con cronómetro) en el baño a 37°C. La reacción enzimática se detiene por la adición de 1.0mL de ácido acético al 30% agitándose inmediatamente.

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

Tabla 4. Series de tubos a preparar para determinar la actividad del inhibidor.

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 realiza a 410nm y es necesario para cada una de las alícuotas del extracto, primeramente ajustar al aparato a 100% de transmitancia con su respectivo blanco. Hay que recordar que el tubo que no lleva extracto es la referencia (40µg de tripsina/10mL), sobre el cual se basaran los cálculos.

CÁLCULOS

Una unidad de tripsina (U.T.) es arbitrariamente definida como un incremento de 0.01 unidades de Absorbancia a (A) 410nm por 10mL de mezcla de reacción. Así la lectura de Abs. (A) se puede pasar directamente a U.T. ($U.T. = A * 100$).

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 (0.0mL de extracto, 40µg tripsina/100mL) 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.

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

Donde:

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

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

F: $A_1/a_1 * A_2/a_2$

Donde:

A_i : Aforo

A_i : alícuota

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)

3.4 Determinación de Metionina³⁰

El método colorimétrico de McCarthy y Sullivan propone que las proteínas que contienen metionina reaccionan con el nitroprusiato de sodio, cuya fórmula es: $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO} * 2\text{H}_2\text{O}$, en solución básica y tomando una coloración rojiza.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Digestor marca TECATOR
- Mezclador de tubos LAB-LINE
- Rota vapor
- Potenciómetro CORNING mod. 10
- Tubos de digestión con tapón de rosca y cubierta de teflón
- Ácido orto-fosfórico concentrado
- Matraz de bola de 50mL para rota vapor
- Solución lavadora, agua:etanol (3:1, v/v)
- Nitroprusiato de sodio al 10%
- Solución estándar de Metionina 1mg/mL
- NaOH 5N
- HCl 6N
- Solución de Glicina al 3%
- Solución A (**Tabla 5**)
- Tubos de ensaye (16*150)

Tabla 5. Solución A para la determinación de metionina.

<i>Amino Ácido</i>	<i>Pesar (mg)</i>
Alanina	20
Asparagina	48
Ácido Aspártico	60
Cistina	10
Glicina	5
Ácido Glutámico	210
Histidina	30
Hidroxipolina	100
Isoleucina	50
Leucina	100
Lisina	60
Fenilalanina	40
Serina	60
Teronina	45
Triptófano	12
Valina	60
Prolina	80

Lo anterior se pesa y posteriormente se afora a 100mL.

PROCEDIMIENTO

Curva estándar (de 0.1-2mg de metionina). Tomar 2.0mL de la solución A y 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5 y 2.0mL de solución estándar de metionina. Llevar a 5.0mL cada uno de los tubos con agua y adicionar 1mL de NaOH 5N. Agitar y adicionar 0.1mL de nitroprusiato de sodio 10 %. Dejar en un baño a 30°C por 10min, adicionar 2mL de glicina 3% agitar y dejar reposar 10min a 30°C., agregar 2mL de ácido fosfórico agitar y dejar reposar 5min. Leer las Abs. a 510nm.

Se pesa la cantidad de muestra desengrasada finamente molida, dentro del tubo de hidrólisis. A continuación se le adiciona el HCl 6N requerido procurando que toda la muestra se humedezca con dicho reactivo utilizando, si es necesario, 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 insufla nitrógeno y se cierran con tapón de rosca. La hidrólisis se realiza a $145^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 4h.

Transcurrido el tiempo de hidrólisis se deja enfriar el tubo y se trasvasa cuantitativamente el contenido a un matraz de bola de 50mL, lavando algunas veces con solución lavadora (lo menos posible). Con la ayuda del rota vapor eliminar el exceso de HCl y solvente para poder llevar a sequedad. Se le adiciona agua caliente al matraz con la muestra seca para disolverla y se procede a eliminar el precipitado por filtración al vacío sobre papel doble del 50. Por último se lleva el volumen del hidrolizado a 25mL en un matraz aforado.

Tomar tres alícuotas de 4.0mL cada una. Un tubo será el blanco de la muestra y a éste se le adicionan 1.0mL de agua y 1mL de NaOH 5N, en tanto que a los otros dos se les adiciona 1.0mL de agua, 1mL de NaOH 5N y 0.1mL de nitroprusiato, se agitan y se procede a realizar lo mismo que la curva estándar.

CÁLCULOS

A los tubos problema se les resta la Abs. del blanco de la muestra y el resultado se interpola en la curva estándar, considerando el aforo y la alícuota utilizada.

Recordar que el estándar de metionina tiene metionina 1mg/mL.

$$\text{Metionina g / 100g muestra} = d * A * 100 / a * M * 10^3$$

Donde:

d: mg de Metionina obtenidos por interpolación

A: Aforo

a: alícuota

M: Peso de la muestra

$1/10^3$: Factor de mg a g

$$\text{metionina g / 100g Proteína} = (\text{metionina g / 100g muestra}) * (\text{muestra 100g / \%Proteína})$$

3.5 Digestibilidad *in Vitro*¹²

La AOAC describe un método que utiliza enzimas proteolíticas: tripsina, quimotripsina, peptidasa y proteasa bacterial. Se mide el pH al final del experimento y se determina el % de digestibilidad con el dato proporcionado por el potenciómetro.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Baños de recirculación a 37 y 55°C de agua con agitación LAB-LINE INSTRUMENT conectados por mangueras.
- Potenciómetro CORNING mod. 10
- Solución A: Disolver 227040 BAEE unidades de Tripsina (SIGMA T-0134) **(1)** + 1860 BAEE unidades de α -quimotripsina (SIGMA C-4129) **(2)** + 0.0520 unidades de peptidasa L-Leucina β -naftalina (SIGMA P-7500) **(3)** en 10mL de agua.
- Solución B: Disolver 65 unidades de caseína de proteasa bacterial (SIGMA P-5147) **(4)** en 10mL de agua

Donde: BAEE es el sustrato N- α -benzoil-L-arginina etil ester.

- (1)** Una unidad de Tripsina produce un ΔA_{253} de 0.001 por minuto a pH 7.6 a 25°C, usando BAEE como sustrato.

Contiene 16700 BAEE unidades por mg de proteína. Por lo tanto para disolver 227040 BAEE unidades de tripsina, se requiere.

$$\frac{(1\text{mg proteína} * 227040 \text{ unidades BAEE})}{16700 \text{ unidades BAEE}} = 13.59\text{mg de proteína}$$

y debido a que 100mg de tripsina equivalen a 100mg de proteína, se requiere:

$$\frac{(100\text{mg de tripsina} * 13.59\text{mg proteína})}{100\text{mg de proteína}} = 13.59\text{mg de tripsina}$$

- (2)** Una unidad de α -quimo tripsina hidroliza 1 μ mol de BTEE (N-benzoil-L-Tirosina etil ester) por minuto a pH 7.8 a 25°C.

Contiene 54 BAEE unidades por mg de α -quimo tripsina. Por lo tanto, para disolver 1860 BAEE unidades de α -quimo tripsina, se requiere:

$$\frac{(1\text{mg } \alpha\text{-quimo tripsina} * 1860 \text{ unidades BAEE})}{54 \text{ unidades BAEE}} = 34.44\text{mg quimo tripsina}$$

- (3) Una unidad libera 1.0 μ mol de β -naftilamina de L-Leucina- β -naftilamina por minuto a pH 7.1 a 37°C.

Contiene 102 unidades por g de peptidasa. Por lo tanto para disolver 0.520 unidades de peptidasa L-Leucina- β -naftilamina, se requiere:

$$\frac{(1000\text{mg peptidasa} * 0.520 \text{ unidades})}{102 \text{ unidades}} = 5.09\text{mg proteasa}$$

- (4) Una unidad hidroliza caseína para producir color equivalente a 1.0 μ mol (181 1.0 μ g) tirosina por minuto a pH 7.5 a 37°C.

$$\frac{(1\text{mg proteasa} * 65 \text{ unidades})}{5.5 \text{ unidades}} = 11.81\text{mg proteasa}$$

PROCEDIMIENTO

Se parte de 10mg de nitrógeno de la proteína (caseína) o muestra según sea el caso, a la cual se le añaden 10mL de agua destilada en agitación a una temperatura de 37°C durante 1h, a continuación se mide el pH el cual se ajusta a 8.0 \pm 0.03 con HCl o NaOH 0.1N según sea necesario. Inmediatamente se le adiciona 1.0mL de solución A, la cual debe permanecer 10min exactamente en agitación a una temperatura de 37°C, transcurrido el tiempo, se añade 1mL de solución B, permaneciendo en agitación 9min a una temperatura de 55°C. Al término, se coloca la muestra a 37°C durante 1min y a los 20min exactos de haber adicionado la solución A, se mide el pH.

El pH para la caseína control o referencia deberá ser de 6.42 \pm 0.05 y sólo hasta que se obtiene este pH en la serie de referencia, se podrá realizar la determinación de las muestras a ensayar.

CÁLCULOS

El por ciento de digestibilidad se obtiene al sustituir el pH en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ digestibilidad} = 234.84 - 22.56 (\text{pH})$$

Reunida la condición de que la referencia de caseína muestra un pH que sea igual a 6.42 \pm 0.05.

3.6 Proceso térmico

Para que los frijoles se puedan consumir sin ningún riesgo aparente a la salud, es necesario su procesamiento con suficiente calor húmedo (cocción). Por lo que a ambos frijoles se les aplicó el proceso térmico tradicional que se realiza en las comunidades donde se consumen estos frijoles. Cocción por espacio de 2-3 horas a fuego directo con una relación 1:3, frijol:agua.

1.7 Ensayo Biológico REP (Relación de Eficiencia Proteica)

El ensayo biológico se realizó con 36 ratas macho cepa Wistar, con un peso de $40g \pm 5g$, recién destetados para aprovechar la etapa de desarrollo óptima, que es cuando es más notorio el incremento en peso del animal en estudio.

El manejo de animales se realizó siguiendo el protocolo de Uso y Cuidado de Animales del Bioterio del conjunto E de la Facultad de Química (Protocolo para el cuidado y uso de los animales de laboratorio en la facultad de Química establecido por el comité institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio). Los animales se mantuvieron en jaulas individuales bajo condiciones estándar: temperatura de 19-22°C, humedad relativa de 31-60% y ciclos de luz/oscuridad de 12 h. En todos los casos, se proporcionó a los animales agua y alimento *ad limitum*. El peso corporal y alimento consumido fueron registrados tres veces por semana. Con estos datos se calculó la REP.

Se elaboraron 6 dietas para el ensayo las cuales fueron: Caseína, Maíz, Frijol Peruano, Frijol Comba, Frijol Peruano/Maíz (50:50), Frijol Comba/Maíz (50:50), todas al 8.5% de proteína (debió ser al 10%; sin embargo las dietas de prueba deben ser isoproteínicas e isoenergéticas con respecto a los datos de referencia y la dieta de maíz solamente aportaba un 8.5%) y el registro de los datos se llevo en una tabla como la que se muestra a continuación.

Tabla de vaciado de datos.

Rata:	Sexo:	Peso inicial:				Dieta:				Peso Comedero *:				Fecha:
Tiempo (días)	0	1	4	6	8	11	13	15	18	20	21	Final...		
Peso Animal (x día)	0											P _f =		
Incremento acumulado (P _{día} -P _i)												P _f - P _i =		
Alimento Inicial + * (I)														
Alimento Final + * (F)														
Alimento Ingerido (AI = I - F)												ΣAI =		
Alimento Acumulado (ΣAI _{día})														
OBSERVACIONES:														

MATERIAL para elaboración de dietas: Sacarosa, marca: Cucurumbe

- Glucosa Anhidra USP, marca: Química Barsa S. de R. L.
- Dextrina, marca: Maizena
- Manteca Vegetal, marca: INCA
- Aceite de maíz sin colesterol, marca; Patrona (puro de maíz)
- Mezcla de sales (minerales), marca; Harlen Tekland
- Mezcla de vitaminas, marca; MP Biomedicals de Illkrich Francia
- Celulosa
- Maíz nixtamalizado marca Minsa
- Solución de colina al 5%

Es importante señalar que el mezclado debe llevarse a cabo con cuidado ya que de no ser así, se puede levantar parte de la harina de mezclado (recordar que algunos son polvos muy finos) al aire y así perder parte de material de dieta, lo que desajustaría la dieta y provocaría errores en el ensayo biológico.

4. Resultados y Discusión

4.1 Análisis Químico Proximal

En la Tabla 6 y figura 6 se presentan los resultados del análisis químico proximal de los frijoles crudos mientras que en la Tabla 7 y figura 7 se presenta el resultado del análisis de proteína en ambos frijoles cocidos. Se observa que el tratamiento térmico disminuye la cantidad de proteína del frijol peruano, aunque no de manera significativa en ninguno de los casos.

Tabla 6. Análisis químico proximal de los frijoles *Phaseolus vulgaris* (Frijol Peruano) y *Phaseolus lunatus* (Frijol Comba), crudos.

Componente (g / 100g alimento) ⁺	Frijol Peruano	Frijol Comba	Valores Reportados para el <i>Phaseolus vulgaris</i> ⁽³¹⁾
Humedad	6.34 [±] 0.10	6.84 [±] 0.17	10.06-12.39
Proteína (%N * 6.25)	23.24 [±] 1.70	23.75 [±] 0.78	18.81-25.33
Grasa	0.58 [±] 0.01	0.31 [±] 0.07	0.25-2.66
Cenizas	3.66 [±] 0.21	3.27 [±] 0.18	3.37-4.30
Fibra cruda	5.87 [±] 0.12	7.33 [±] 0.76	2.49-6.23
Hidratos de carbono⁺⁺	60.31	58.50	58.33-64.19

⁺ Valor promedio [±] desviación estándar (n=3), ⁺⁺ Valor obtenido por diferencia.

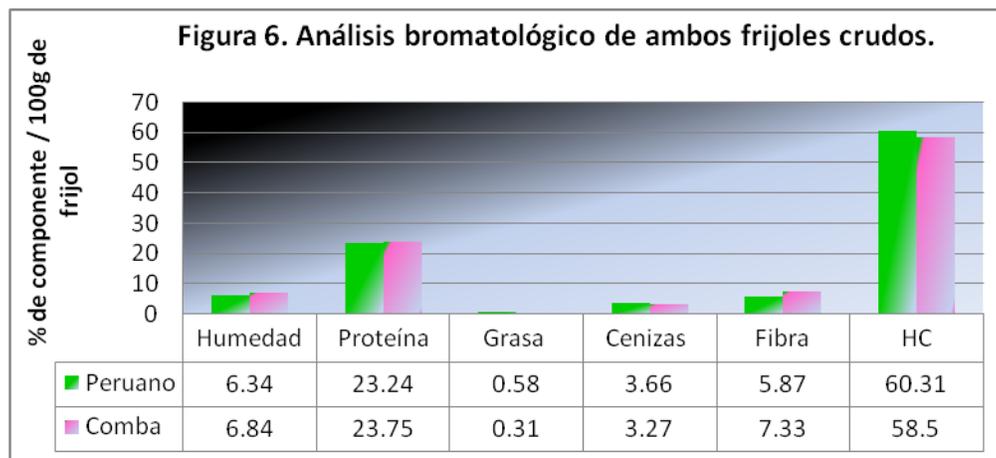
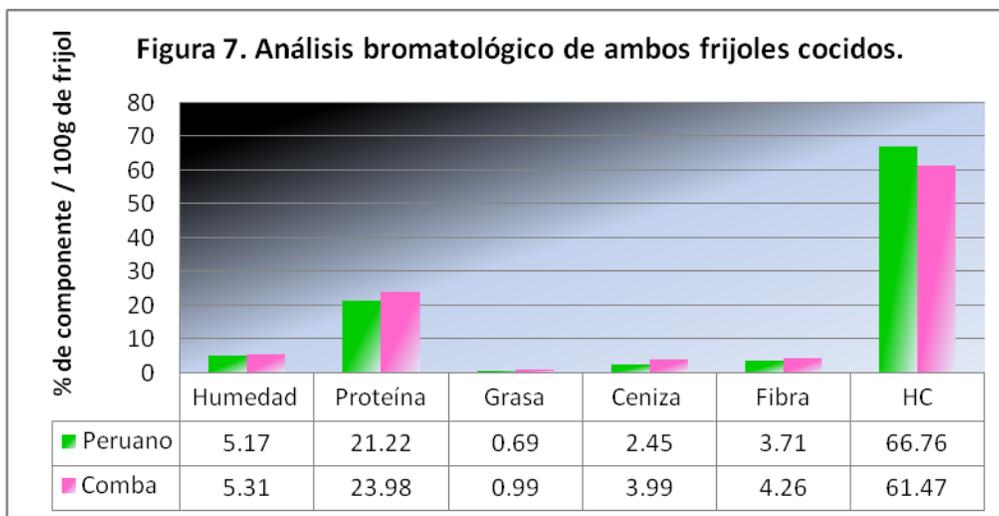


Tabla 7. Análisis bromatológico de los frijoles *Phaseolus vulgaris* (Frijol Peruano) y *Phaseolus lunatus* (Frijol Comba), cocidos.

Componente (g/100g alimento) ⁺	Frijol Peruano cocido	Frijol Comba cocido
Humedad	5.17 [±] 0.18	5.31 [±] 0.01
Proteína	21.22 [±] 0.2	23.98 [±] 0.6
Grasa	0.69 [±] 0.08	0.99 [±] 0.05
Cenizas	2.45 [±] 0.05	3.99 [±] 0.06
Fibra cruda	3.71 [±] 0.12	4.26 [±] 0.30
Hidratos de carbono⁺⁺	66.76	61.47

⁺ Valor promedio [±] desviación estándar (n=3), ⁺⁺ Valor obtenido por diferencia.



Los estudios bromatológicos indican que ambos frijoles, peruano y comba crudos son muy similares entre sí, siendo quizás las diferencias en fibra e hidratos de carbono las más notorias entre ambos, ya que el frijol comba posee un poco más de fibra en comparación al frijol peruano y éste último posee mayor cantidad de hidratos de carbono en comparación al comba. Por otra parte, es notoria la pérdida de fibra de ambos frijoles después del cocimiento, esto debido a que en la determinación del material se está calculando solamente el contenido de fibra cruda, la fibra soluble se pierde durante el tratamiento agresivo que recibe la muestra. Los hidratos de carbono son el principal componente de ambos frijoles crudos ya que representan un contenido mayor a 60% de este componente por cada 100g de frijol.

Al realizar la comparación entre el contenido proteico de ambos frijoles antes y después de la cocción, el frijol comba se mantiene estable y se puede apreciar que el frijol peruano presenta una pérdida de nitrógeno total, aunque no de manera importante, quizás debido a su formación de compuestos complejos con grasas e hidratos de carbono, que durante la

cocción arrastran parte de la proteína al agua de cocción lo que provoca esa pequeña pérdida proteica.

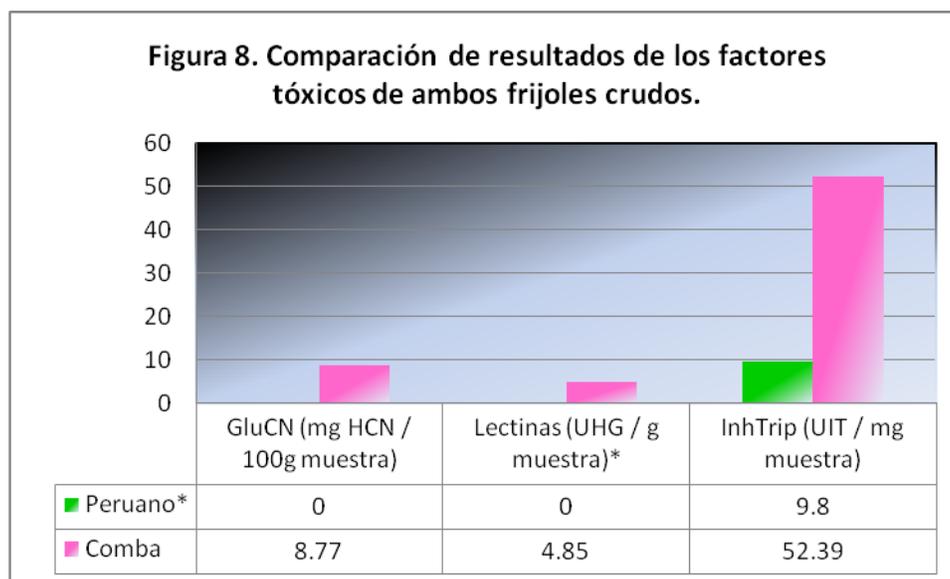
4.2 Análisis de Factores Tóxicos

En la Tabla 8 y figura 8 se presentan los resultados de los estudios toxicológicos para los frijoles crudos, mientras que en la Tabla 9 y figura 9, muestra una comparación entre los frijoles cocidos.

Tabla 8. Análisis de factores tóxicos de los frijoles *Phaseolus vulgaris* (Frijol Peruano) y *Phaseolus lunatus* (Frijol Comba), crudos.

Determinación ⁺	Frijol Peruano	Frijol Comba
Glucósidos Cianogénicos (mg HCN / 100g muestra)	No cuantificable	8.77±1.14
Lectinas (UHG / g muestra)	228±19.5	4.85±2.8
Inhibidores de Tripsina (UTI / mg muestra)	9.8±0.79	52.29±2.67

⁺Valor promedio ± desviación estándar (n=3)



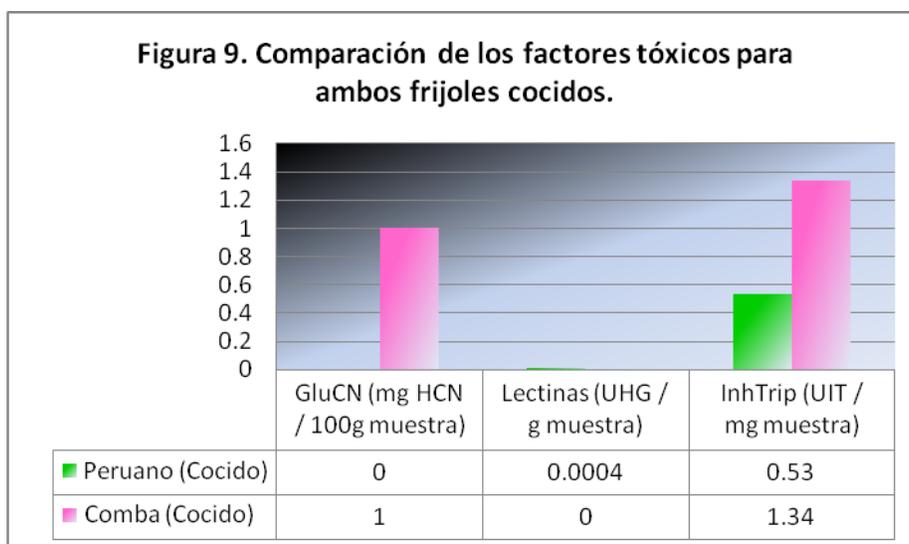
* Debido a que el valor de lectinas para el frijol peruano es de 228±19.5 UHG/g muestra, se optó por no colocarlo en el gráfico debido a que la resolución de los otros resultados en el gráfico se hubiese visto afectada.

Tabla 9. Análisis de factores tóxicos y % de destoxificación de los frijoles *Phaseolus vulgaris* (Frijol Peruano) y *Phaseolus lunatus* (Frijol Comba), cocidos.

Determinación ⁺	Frijol Peruano		Frijol Comba		% Destoxificación	
	Crudo	Cocido	Crudo	Cocido	Peruano	Comba
Glucósidos Cianogénicos (mg HCN / 100g muestra)	No cuantificable	No cuantificable	8.77±1.14	< 1.00*	–	88.60
Lectinas (UHG / g muestra)	228±19.5	4*10 ⁻⁴	4.85±2.8	No cuantificable	99.99	100
Inhibidores de tripsina (UTI / mg muestra)	9.8±0.79	0.53±0.04	52.29±2.67	1.34±0.23	94.59	97.44

⁺Valor promedio ± desviación estándar (n=3)

* El valor de glucósidos cianogénicos, para el frijol Comba cocido, es de máximo HCN 1.00mg /100g muestra, debido a que cualitativamente las tiras indicadoras de las muestras eran casi idénticas a la tira del límite inferior de la curva estándar (5µg HCN, habiendo ocupado 500mg de muestra).



Los glucósidos cianogénicos no representan riesgo alguno para ninguno de los dos frijoles analizados, debido a que desde su determinación en los frijoles crudos, ninguno presentó la concentración que se reporta como de riesgo para el hombre (HCN 10mg/100g de muestra) y al llevar a cabo la cocción, es natural que el contenido de este tóxico en el frijol Comba disminuyera hasta casi desaparecer. Las lectinas como se observa son eliminadas en su totalidad. La cantidad de inhibidores de tripsina se ve reducida significativamente debido a la cocción implementada.

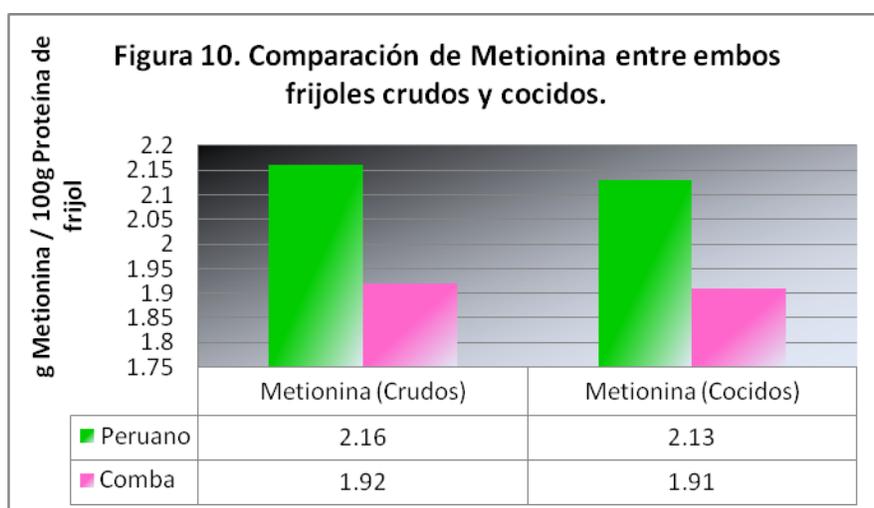
4.3 Análisis de metionina

En la Tabla 10 y figura 10 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de metionina para ambos frijoles antes y después de llevar a cabo el tratamiento térmico.

Tabla 10. Análisis de metionina de los frijoles *Phaseolus vulgaris* (Frijol Peruano) y *Phaseolus lunatus* (Frijol Comba) crudos y cocidos en forma de harina.

Determinación [†]	Frijol Peruano		Frijol Comba	
	Crudo	Cocido	Crudo	Cocido
Metionina (g metionina / 100g P)	2.16±0.09	2.13±0.15	1.92±0.40	1.91±0.11

[†]Valor promedio [±] desviación estándar (n=3)



La metionina presente en los frijoles crudos no se modifica con la cocción implementada, ya que para ambos frijoles, aunque los valores disminuyen, no lo hacen de manera significativa por lo que se consideran valores estables, además, la cantidad que poseen es casi igual entre ambos, por lo que esta determinación no es un factor decisivo que indique cual frijol posee una proteína de mejor calidad.

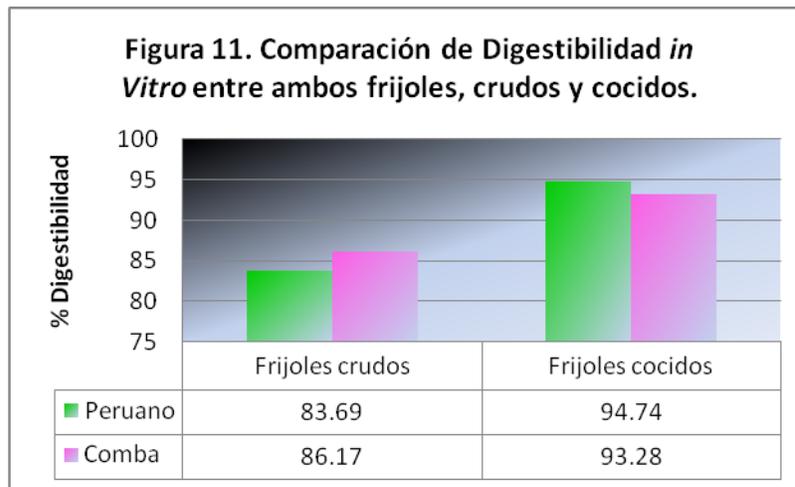
4.4 Digestibilidad *in Vitro*

En la Tabla 11 y figura 11 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de Digestibilidad *in vitro* para ambos frijoles tanto crudos como cocidos.

Tabla 11. Digestibilidad *in Vitro* de los frijoles *Phaseolus vulgaris* (Frijol Peruano) y *Phaseolus lunatus* (Frijol Comba) crudos y cocidos en forma de harina.

	Frijol Peruano		Frijol Comba	
Determinación ¹	Crudo	Cocido	Crudo	Cocido
Digestibilidad <i>in Vitro</i> (% digestibilidad)	83.69 (1.07)	94.74 (0.47)	86.17 (0.52)	93.28 (0.24)

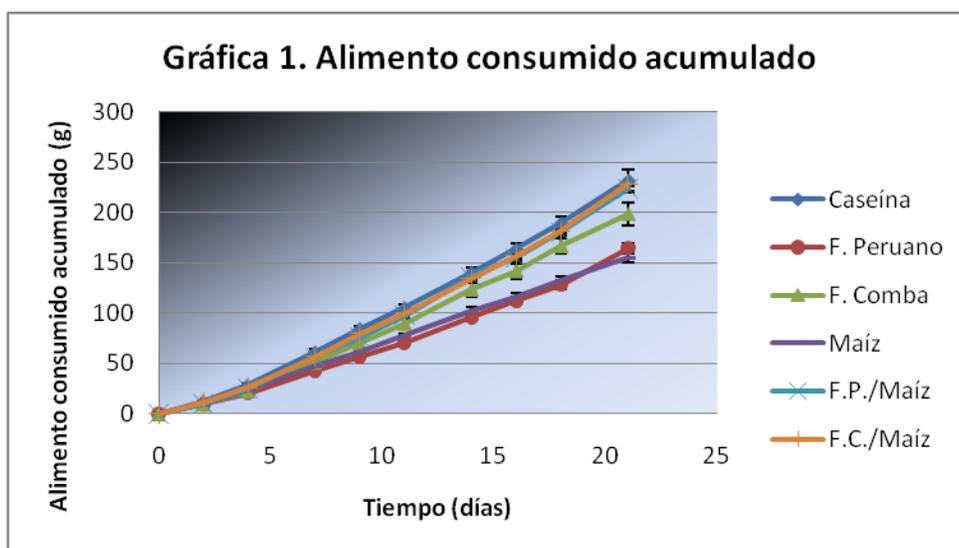
¹(n=2) El valor entre paréntesis reporta la variación, dado por: (valor max. – valor min.) * 100 / val. max.



Estos resultados demuestran que la proteína de ambos frijoles es altamente digestible y aun más cuando es llevada a cabo la cocción de los frijoles lo que indica que la proteína sufre una desnaturalización suave por lo cual la digestibilidad de la proteína de los frijoles cocidos es aún mayor en comparación a la de los frijoles crudos. Algo totalmente esperado debido a que la cocción provoca que la proteína se desdoble, sin afectar sus características nutricionales.

4.5 Bioensayo Nutricional REP

La Gráfica 1 representa el alimento que las ratas consumieron durante los 21 días de manera acumulada lo que demuestra que las ratas tenían un aumento en su consumo, o en otras palabras, un consumo constante y en aumento. Lo que es totalmente esperado, ya que, conforme la rata va creciendo y desarrollándose, empieza a requerir un mayor consumo de alimento para la formación de tejidos y el desarrollo de sus órganos.



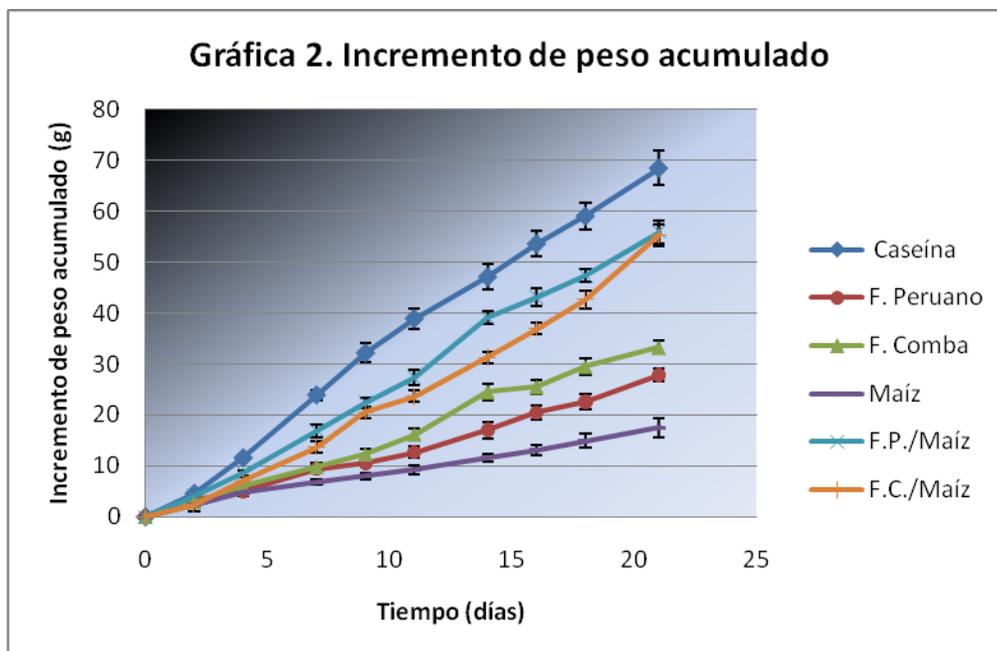
La tabla 12 muestra el promedio del alimento total consumido por los grupos de ratas alimentadas con cada dieta, siendo las dietas de Maíz y F. Peruano las que presentaron un menor consumo, las ratas de la dieta de F. Comba muestran tener un mejor consumo que las antes mencionadas, sin embargo su consumo quedó relegado por el presentado en las dietas de F. Peruano/Maíz, F. Comba/Maíz y Caseína ya que los grupos de ratas de estas tres dietas presentaron el mayor consumo, siendo la de Caseína la preferida, quizás por tener una mejor palatabilidad y mejor calidad proteica.

Tabla 12. Alimento consumido acumulado.

Dieta*	Alimento consumido acumulado (g)
Caseína ^a	234.78
F. Peruano/Maíz ^a	223.70
F. Comba/Maíz ^a	228.48
F. Peruano ^c	164.53
F. Comba ^b	198.12
Maíz ^c	155.17

*Letra en supraíndice en dieta, indica diferencia significativa. (al 95% de confianza)

La Gráfica 2 representa el incremento de peso acumulado de las ratas durante el periodo de 21 días que duró el experimento, observándose que, en general, para todas las dietas el incremento tiene un comportamiento lineal. Esto es lo que se esperaba ya que una de las características de las ratas era que tenían que ser recién destetadas, etapa después de la cual, las ratas muestran tener un desarrollo y crecimiento muy notorio.



La tabla 13 muestra el promedio del incremento de peso en cada dieta siendo la dieta de Maíz la que presenta el menor incremento, mientras que las dietas de F. Peruano y Comba tienen un incremento parecido entre sí, pero sin embargo no tan parecido al que presentan las dietas de F. Peruano/Maíz y F. Comba/Maíz entre sí las cuales a su vez tienen un incremento menor a la dieta de referencia la cual posee el mayor incremento en peso acumulado.

Tabla 13. Incremento de peso acumulado de las ratas alimentadas.

Dieta*	Incremento de peso acumulado (g)
Caseína ^a	68.45
F. Peruano/Maíz ^b	55.95
F. Comba/Maíz ^b	55.27
F. Peruano ^c	27.83
F. Comba ^c	33.27
Maíz ^d	17.50

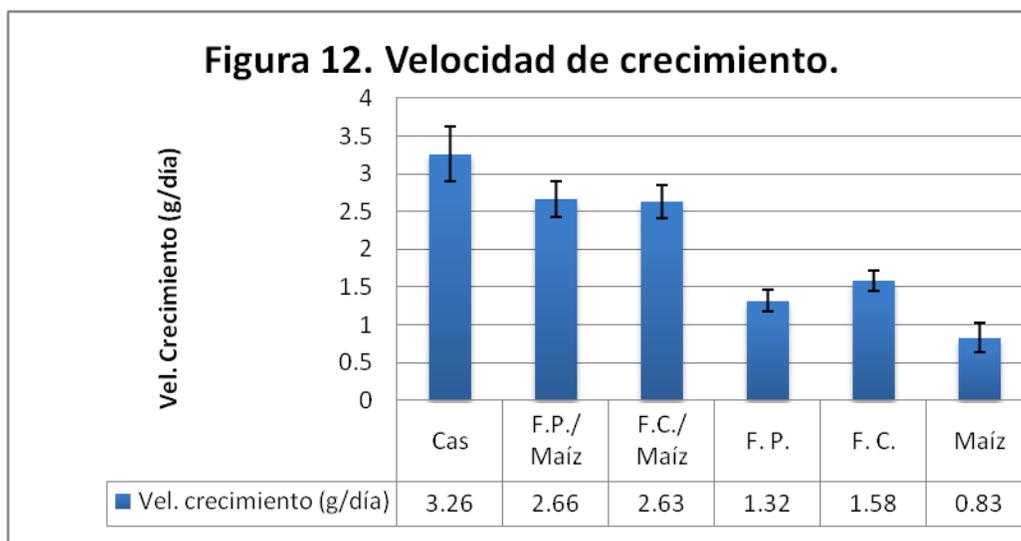
*Letra en supraindice en dieta, indica diferencia significativa. (al 95% de confianza)

Con los datos obtenidos para elaborar la Gráfica 2 y la tabla 13 fué posible determinar la Velocidad de crecimiento de las ratas.

Tabla 14. Velocidad de crecimiento de las ratas alimentadas.

Dieta	Incremento de peso promedio de las ratas alimentadas (g)	Desviación Estándar de cada dieta	Tiempo total del ensayo (días)	Velocidad de crecimiento* (g/día)
Caseína	68.45	0.36	21	3.26
F. Peruano/Maíz	55.95	0.24	21	2.66
F. Comba/Maíz	55.27	0.22	21	2.63
F. Peruano	27.83	0.14	21	1.32
F. Comba	33.27	0.13	21	1.58
Maíz	17.5	0.20	21	0.83

* Vel. crecimiento = Incremento Peso Promedio/Tiempo total del ensayo



Aun cuando la dieta de F. Peruano fue una de las dietas menos consumidas se puede apreciar que se obtuvo un incremento en peso similar al de la dieta de F. Comba. Lo que indica que su proteína es de buena calidad ya que sin consumir mucho los ratones tuvieron un buen desarrollo. Claro hay que aclarar que también se tiene que tomar en cuenta la capacidad del animal en estudio para aprovechar esa proteína.

Como era de esperarse la dieta de caseína proporciona la mejor velocidad de crecimiento para las ratas y esto debido a que su proteína es la de mejor calidad en comparación a la proteína de los frijoles y del maíz, ya que tiene un mejor perfil de aminoácidos además de que al ser una proteína de origen animal posee una mayor biodisponibilidad, la única dieta que muestra ser similar y sin diferencia significativa a la de caseína es la de frijol peruano suplementada con harina de maíz.

La dieta de F. Peruano/Maíz, como ya se dijo, es similar a la de caseína pero también a la de F. Comba/Maíz, teniendo con esta última un valor casi idéntico. La dieta de F. Comba/Maíz, por su parte, es distinta a la de caseína pero por muy poco.

La dieta de Frijol Comba posee una mejor velocidad de crecimiento en comparación a la dieta del Frijol Peruano y aunque no con diferencia significativa, parte importante de los resultados es ver que al suplementar las dietas con maíz, la dieta de Frijol Peruano mejora su velocidad de crecimiento hasta empatar con la del Frijol Comba.

La dieta de Maíz por su parte es la dieta con menor índice de velocidad de crecimiento, siendo distinta a todas las demás.

La Tabla 15 presenta los resultados de la REP obtenidos, una vez tratados los datos finales correspondientes a el ensayo nutricional con ratas.

Tabla 15. Relación de Eficiencia Proteica (REP) de cada dieta.

Dieta*	REP	REP ajustado
Caseína ^a	3.13	2.5
Frijol Peruano ^b	1.81	1.44
Frijol Comba ^b	1.82	1.46
Maíz ^b	1.73	1.39
Frijol Peruano / Maíz ^a	2.94	2.35
Frijol Comba / Maíz ^a	2.97	2.37

REP = ganancia de peso (g)/Proteína consumida (g), (con un nivel de significancia del 95%).

* Letra en supraindice en dieta, indica diferencia significativa.

Al analizar los datos obtenidos, se observa que no hay diferencia significativa entre las dietas Caseína, F. Peruano/Maíz, F. Comba/Maíz, pero éstas a su vez son distintas a las dietas F. Peruano, F. Comba, Maíz siendo estas últimas tres, iguales entre sí.

Como también se puede observar, las dietas con letra “a”, poseen un mejor REP por lo que sus proteínas poseen una calidad similar para el desarrollo del animal, habiendo un interés aun mayor al ver la suplementación que hay entre las dietas de ambos frijoles su complementadas con maíz, ya que esto ocasiona que la calidad proteica de estas dietas sea muy similar a la de caseína (proteína de origen animal, de mejor calidad y mayor disposición) en comparación a las dietas de ambos frijoles de manera individual y a la de maíz.

Estos resultados demuestran que la velocidad de crecimiento de animal en estudio está directamente relacionada a la calidad de la proteína, mientras la proteína sea de mejor calidad el animal en estudio tendrá un mejor desarrollo. Pero también demuestra el por qué es bueno tener una dieta balanceada, ya que al consumir distintos alimentos, aseguramos un aporte más balanceado y suficiente de todo nutriente necesario para el desarrollo y crecimiento de un individuo.

5. CONCLUSIONES.

1. El contenido de proteínas en ambos frijoles es similar, además de que es el esperado de acuerdo a lo reportado en estudios anteriores, por lo que ambos fungen como una buena fuente de proteína. Su contenido de metionina es el esperado considerando que ambos son leguminosas, teniendo valores similares al máximo reportado para el frijol peruano en otros estudios, por lo que ambos, aunque deficientes por la naturaleza de su especie en este aminoácido, son leguminosas que cuentan con una cantidad elevada en este aminoácido.
2. Ambos frijoles crudos presentan contenido de agentes tóxicos los cuales reducen la biodisponibilidad de la proteína endógena del grano y que claro pueden también poner en riesgo la salud de quien los consuma.
3. El tratamiento térmico empleado resulta en la destoxificación casi total de los tóxicos analizados, permitiendo que ambos frijoles, cocidos, sean consumidos sin ningún riesgo, bajo los tóxicos analizados.
4. El tratamiento térmico hace que la proteína del frijol tenga una mayor biodisponibilidad, como es manifiesto por los resultados de la digestibilidad “*in Vitro*”.
5. Ambos frijoles son de buena calidad para el consumo humano ya que ninguno mostro tener una mejor Relación de Eficiencia Proteica con respecto al otro.
6. Finalmente y por lo tanto, estos dos frijoles son un buen alimento y fuente de proteína en especial cuando se complementan con maíz, claro está, que su calidad se ve mejorada al llevar a cabo una cocción adecuada y al consumirlos junto con maíz, cereal que por tradición forma parte de la dieta general mexicana. Sin embargo, es importante aclarar que el frijol comba, es más resistente ante las plagas y enfermedades en comparación al peruano, por lo que, aunque como alimento son similares, como opción para siembra, el frijol peruano queda rezagado ante el frijol comba.

6. REFERENCIAS

- ¹ Braun, A. Comparación bromatológica y de factores tóxicos entre frijol comba (*P. lunatus*) y frijol peruano (*P. vulgaris*), consumidos en San miguel Totolapan, Gro. México D.F. (2003).
- ² Boutrif E. Recent Developments in protein quality evaluation. Food nutrition and agriculture alimentation FNA/ANA 2/3 Vol. pp. 36-40 (1991).
- ³ Scheider L. Nutrición. Conceptos básicos y aplicaciones. Editorial Mc Graw-Hill. pág. 36-69 México D.F. (1985).
- ⁴ Sarwar G. and Mc. Donough, F. E. Evaluation of protein digestibility, corrected aminoacid score method for assessing protein quality of foods. J. Assoc. Anal. Chem. 73(3) 347-355 (1990).
- ⁵ Fennema, O. R. Química de alimentos. Editorial Acribia S. A. pág. 321-323. Zaragoza (1993).
- ⁶ Robinson, S. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Editorial Acribia, S. A. pág. 107-141, Zaragoza (1991).
- ⁷ Mitchell S., Helen R. Nutrición y Dieta. Editorial Interamericana, 16^a edición pág. 35-36 México D.F. (1978).
- ⁸ Cheftel, J. C. Proteínas alimentarias. Editorial Acribia. S. A. pág. 49-58, 116-123. Zaragoza (1989).
- ⁹ Mora, J. F. Soporte nutricional especial. Editorial Médica Panamericana. pág. 35-40, 56-58. Bogotá (1992).
- ¹⁰ Pellet, L. Young, V. Nutrition evaluation of protein foods. The United Nations University. pp. 26-75 Tokio (1980).
- ¹¹ Fox, B. A., Cameron, A. G. Ciencia de los alimentos, Nutrición y Salud. Limusa Noriega Editores. 5^a Edición. Pág. 198 (1997).
- ¹² Herlich, K. Official methods of analysis of AOAC, Published by AOAC Press, 15^a edition, Vol. I pp 17-18, 40-62, 69-83, Vol II pp 1095-1098, Arlington (1990).
- ¹³ Cubero J. I., Moreno M. Leguminosas de grano. Ed. Acribia, pág 15-19, Zaragoza (1983).
- ¹⁴ Robinson D. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Ed. Acribia. S. A. pág 107-141, Zaragoza (1991).

¹⁵ Derache, R. Toxicología y seguridad de los alimentos. Ediciones Omega. pág. 24, 111-130, Zaragoza (1990).

¹⁶ Lindner, E. Toxicología de los alimentos. 2ª edición, Ed. Acribia, pág. 1-17, 82-84, Zaragoza (1995).

¹⁷ Serrano, J. Goñi, I. Papel del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de la población guatemalteca. Arch. Lat. Nutr. Vol. 54, no. 1, pág. 36-44 (2004).

¹⁸ Página web:

<http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/busca.asp?palabra=frijol>

Consultada a las 12:45 hrs. 25 Enero 2010. ASERCA. Título: Producción Mundial de Frijol.

<http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/revistas/088/ca088.pdf#page=31>

Consultadas a las 12:47hrs. 25 Enero 2010. ASERCA. Revista: Claridades Agropecuarias. Título: “Producción Mundial de frijol”. Editorial Abriendo Surcos. Director en Jefe. Act. Mario Barreiro Parera. Editor responsable: Miguel Yoldi.

¹⁹ Página web:

<http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines/Lists/Enero%202009/Attachments/194/B152.pdf>

Consultada a las 12:15 hrs. 25 Enero 2010. SAGARPA. “Recupera México consumo de frijol”. Coordinación General de Comunicación Social. (Calera, Zacatecas 5 Agosto 2009).

²⁰ Hernández, J.E. y León, C. Cultivos marginados (otra perspectiva de 1492). FAO: Colección de alimentación y nutrición #2, pág. 52, 54-55, Roma (1992).

²¹ Ballesteros, G., Evolución del frijol Lima (*P. lunatus* L.), colegio de postgraduados Montecillo, pág. 1, 48. Texcoco. (1990).

²² Flores, N. (Editor) ¿Producir para la desnutrición? Centro de ecodesarrollo, pág. 13-34, 243-266, México, D.F. (1988).

²³ Liener, I. Toxic constituents of plant foodstuffs, 2ª Edición Academic Press. pp 3-7, 12, 23-24, 73-96, 143-157, 452-453. New York (1980).

²⁴ Página web: <http://www.fao.org/docrep/t0395s/T0395S00.htm#Contents>

Consultada a las 13:08 hrs. 29 Noviembre 2009. FAO, Depósito de documentos de la FAO, Colección FAO: Alimentación y nutrición, No.25. “El maíz en la nutrición humana”, Cap. 1. Roma (1993).

²⁵ Página web: <http://www.fao.org/docrep/006/W0073S/w0073s00.htm#Contents>

Consultada a las 13: 45 hrs. 29 Noviembre 2009. FAO, Depósito de documentos de la FAO, Colección FAO: Alimentación y nutrición, No. 29. Latham, M. “Nutrición humana en el mundo en desarrollo” Cap. 17. Roma (2002).

- ²⁶ Contreras, S. Araya, H. Pak, N. y Tagle, M. Factores tóxicos de leguminosas cultivadas en Chile. Glucósidos cianogénicos. Arch. Lat. Nutr. (1973).
- ²⁷ Adrian, J. Potus, J. Poiffait, A. Dauvillier, P. Análisis nutricional de los alimentos. Ed. Acribia S. A. pág. 209-212, Zaragoza (2000).
- ²⁸ Lucas, B. y Sotelo, A. Useful modification of the hemagglutination method for screening of lectin in legume seeds. Second International Workshop on ANF's in legume seed. EAPP Publication No. 70, pp. 71-74, Wageningen (1993).
- ²⁹ Kakade, M. Rackis, J. Maghee, J. and Puski, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. Cereal Chem. pp. 51, 376-382 (1974).
- ³⁰ Millard, J. Horn, D. Breese, J. & Amos, E. Colorimetric Determination of methionine in proteins and foods. Bureau of Human Nutrition and Home Economics, Agricultural Research Administration, United States Department of Agriculture. pp. 313-320 Washington (1946).
- ³¹ Haytowitz, D. y Matthews, R., Composition of food: Legumes and legume products. Nutrition Monitoring Division, pp. 24-72 U.S. Department of Agriculture (1986).
- ³² Contenido en aminoácidos de los alimentos y datos biológicos sobre las proteínas. FAO: Estudios sobre nutrición No. 24. Editor: Servicio de ciencia y política de la alimentación, dirección de nutrición, FAO. pág. 50. Roma. (1976).
- ³³ Lu F. Toxicología Básica. Editorial Harla, 1ª edición, pág. 99 – 110. México D.F. (1992).
- ³⁴ Gil, A. Composición y calidad nutritiva de los alimentos. Tratado de Nutrición Tomo II. 2ª Edición. Editorial Médica Panamericana, Madrid. Pág. 553-554. 2010
- ³⁵ Hernández, J. C. y Campos, E. Efecto de la cocción sobre algunas características nutricionales del frijol. Agron. Mesoam. 1993. 4:42-47.

7. APÉNDICES

1. TABLAS

<i>No. de Tabla</i>	<i>Parte</i>	<i>Título de la tabla</i>	<i>Página</i>
1	Generalidades; Necesidades Proteínicas	Requerimientos proteicos diarios.	10
2	Generalidades; Necesidades Proteínicas	Requerimientos de aminoácidos sugeridos por FAO/OMS/ONU.	10
3	Metodología General; Glucósidos Cianogénicos	Curva estándar para GluCN.	31
4	Metodología General; Inhibidores de Tripsina	Series de tubos a preparar para determinar la actividad del inhibidor.	39
5	Metodología General; Determinación de Metionina	Solución A para la determinación de metionina.	41
6	Resultados y Discusión; Análisis Químico Proximal	Análisis Químico Proximal de los frijoles <i>Phaseolus vulgaris</i> (Frijol Peruano) y <i>Phaseolus lunatus</i> (Frijol Comba), crudos.	47
7	Resultados y Discusión; Análisis Químico Proximal	Análisis de proteína de los frijoles <i>Phaseolus vulgaris</i> (Frijol Peruano) y <i>Phaseolus lunatus</i> (Frijol Comba), cocidos.	48
8	Resultados y Discusión; Análisis de Factores Tóxicos	Análisis de factores Tóxicos de los frijoles <i>Phaseolus vulgaris</i> (Frijol Peruano) y <i>Phaseolus lunatus</i> (Frijol Comba), crudos.	49
9	Resultados y Discusión; Análisis de Factores Tóxicos	Análisis de factores tóxicos y % de destoxificación de los frijoles <i>Phaseolus vulgaris</i> (Frijol Peruano) y <i>Phaseolus lunatus</i> (Frijol Comba), cocidos.	50
10	Resultados; Análisis de metionina	Análisis de metionina de los frijoles <i>Phaseolus vulgaris</i> (Frijol Peruano) y <i>Phaseolus lunatus</i> (Frijol Comba) crudos y cocidos.	51
11	Resultados; Digestibilidad <i>in Vitro</i>	Digestibilidad <i>in Vitro</i> de los frijoles <i>Phaseolus vulgaris</i> (Frijol Peruano) y <i>Phaseolus lunatus</i> (Frijol Comba) crudos y cocidos.	52
12	Resultados; Bioensayos Nutricionales	Alimento consumido acumulado	53
13	Resultados; Bioensayos Nutricionales	Incremento de peso acumulado	54
14	Resultados; Bioensayos Nutricionales	Velocidad de crecimiento.	55
15	Resultados; Bioensayos Nutricionales	Relación de Eficiencia Proteica (PER) de cada dieta.	56

2. FIGURAS

<i>No. de Figura</i>	<i>Parte</i>	<i>Título</i>	<i>Página</i>
1	Generalidades; Legumbres	Estructuras de metionina y cisteína respectivamente.	14
2	Generalidades; Frijol Peruano	Frijol Peruano crudo.	15
3	Generalidades; Frijol Comba	Frijol Comba crudo.	16
4	Generalidades; Maíz	Estructuras de lisina y triptófano respectivamente.	17
5	Generalidades; Glucósidos Cianogénicos	Glucósidos Cianogénicos.	19
6	Resultados; Análisis Químico Proximal	Análisis bromatológico de ambos frijoles crudos.	47
7	Resultados; Análisis Químico Proximal	Análisis bromatológico de ambos frijoles cocidos.	48
8	Resultados; Análisis de Factores Tóxicos	Comparación de los factores tóxicos entre ambos frijoles crudos.	49
9	Resultados; Análisis de Factores Tóxicos	Comparación de los factores tóxicos entre ambos frijoles cocidos.	50
10	Resultados; Análisis de metionina	Comparación de Metionina entre ambos frijoles crudos y cocidos.	51
11	Resultados; Digestibilidad <i>in Vitro</i>	Comparación de Digestibilidad <i>in Vitro</i> entre ambos frijoles, crudos y cocidos.	52
12	Resultados; Bioensayos Nutricionales	Velocidad de Crecimiento.	55

3. GRÁFICOS

<i>No. de Gráfico</i>	<i>Parte</i>	<i>Título</i>	<i>Página</i>
1	Resultados; Bioensayos Nutricionales	Alimento consumido acumulado	53
2	Resultados; Bioensayos Nutricionales	Incremento de peso acumulado	54