



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“DESARROLLO DE UN MODELO DIDÁCTICO EXPERIMENTAL
PARA LA CARACTERIZACIÓN DE CARBOHIDRATOS EN EL
FRÍJOL COMÚN.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A

ADRIANA VEGA PÉREZ

MÉXICO, D.F.

2012



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 designado:

Presidente	M. en C. Francisca Aida Iturbe Chiñas
Vocal	M. en C. María de los Ángeles Valdivia López
Secretario	M. en C. María del Rocío Santillana Hinojosa
1er Suplente	M. en C. Sandra Pérez Munguía
2do Suplente	Q. F. B. Bertha Julieta Sandoval Guillén

El presente trabajo se desarrolló en:

Laboratorio 322 y 323 del Departamento de Alimentos y Química Ambiental, Edificio “E”, de la Facultad de Química.

Asesor:

Supervisor Técnico:

M. en C. Francisca Aida Iturbe Chiñas

Q. F. B. Bertha Julieta Sandoval
Guillén

Sustentante:

Adriana Vega Pérez

AGRADECIMIENTOS

A ese ente divino al que nos aferramos con amor y por piedad, que nunca se hace visible pero que siempre está presente.....

*A **SILVIA** e **ISRAEL VEGA PÉREZ** a quienes tengo el **HONOR** de llamar **MADRE** y **HERMANO** quienes forman parte de mi historia y son la base de mi futuro; los que al no darme cuanto quise, incitaron mi independencia enseñándome a conseguir lo que necesito y forjaron mi carácter al mostrarme que la nobleza no está en la intención, sino en la consumación de cada acto.....*

*A nuestra **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO** que forja el futuro grandioso de mentes abiertas y poderosas, dignificando la existencia del conocimiento en las manos del hombre.....*

*Por escuchar con una sonrisa lo que ya sabes, de labios de todos aquellos que no lo sabemos **FANNY ITURBE**.....*

A todos los personajes de este escenario fantástico que me mostraron el rumbo y recorrieron conmigo una parte del camino.....

Los que salieron de escena.....

Quienes llegaron a fincar realidades nuevas condimentadas con ilusión para deleite del alma alentándome a llegar aquí.....

A los más que son los menos por los que más vivo.....

iiiiGRACIASiiii

Introducción	6
3. Antecedentes	8
1.1 Carbohidratos	8
1.1.1 Clasificación	8
• Monosacáridos	9
• Oligosacáridos	14
• Polisacáridos	16
1.1.2 Análisis de Carbohidratos	30
• Azúcares en solución	32
• Almidón	36
• Pectinas	37
• Fibra	38
1.2 Generalidades del fríjol	40
Objetivos	42
2 Metodología	43
2.1 Procedimiento	45
2.1.1. Pretratamiento de la muestra	45
2.1.2. Análisis proximal	46
2.1.3. Caracterización de carbohidratos	46
• Separación de azúcares y polisacáridos	46
• Determinación de Almidón	48
• Determinación de pectinas	48

• Determinación de hemicelulosa	49
• Determinación de celulosa	49
• Determinación de lignina	50
• Métodos de referencia	50
3 Resultados y Discusión	51
3.1 Análisis proximal	51
3.2 Metodología propuesta	52
• Determinación de azúcares	52
• Almidón	53
• Pectinas	54
• Hemicelulosa	54
• Celulosa y lignina	55
3.3 Métodos de referencia	57
3.4 Ejercicio didáctico	61
Propuesta de Protocolo	71
• Uso del diagrama propuesto	78
Conclusiones	79
ANEXO 1	82
ANEXO 2	86
ANEXO 3	94
ANEXO 4	97
Bibliografía	101

Introducción.

Se propone el desarrollo de un modelo didáctico con el cual se evalúen diferentes tipos de carbohidratos presentes en una muestra y sus propiedades, basando las determinaciones en las características fisicoquímicas del macrocomponente en cuestión, haciendo posible su implementación en un laboratorio de enseñanza. Así mismo se sugiere su uso como apoyo didáctico para docentes del área de alimentos como una alternativa en la enseñanza del análisis de carbohidratos; tomando como referencia un alimento ampliamente consumido como lo es el frijol negro (*Phaseolus vulgaris L*), el cual, por presentar un alto contenido de carbohidratos y diversidad de los mismos permite que el modelo propuesto sea aplicable también como un instrumento de comparación para una misma muestra en diferentes condiciones de procesamiento.

Los carbohidratos son las moléculas biológicas más abundantes en la naturaleza, se encuentran en todas las formas de vida y se presentan en forma de azúcares, almidones y fibras; poseen una gran importancia como componentes de la dieta, sean digeribles o no y están presentes en todos los granos, verduras, hortalizas, frutas y otras partes de plantas consumidas por el hombre.

El frijol (*Phaseolus vulgaris L*) ha sido, tradicionalmente la base de la alimentación de la mayor parte de la población mexicana; contiene del 47% al 71% de carbohidratos, además de un alto contenido de proteína (18 a 37% en grano seco), es por esto que se considera una buena fuente de calorías y también de proteínas.

INTRODUCCION

Debido a la falta de modelos simples de análisis que involucren propiedades fisicoquímicas de los carbohidratos, no solo en su identificación sino también en su cuantificación es que se tiene como resultado el presente trabajo; considerando como un punto medular del mismo la integración de los conocimientos básicos previamente adquiridos.

1 Antecedentes.

1.1 Carbohidratos.

Son compuestos que por su fórmula estructural $(C_x(H_2O)_y)$ presentan funcionalidad de aldehído, cetona y polihidroxilo; son los principales compuestos químicos almacenadores de energía, fuente más abundante y barata de alimentos de la naturaleza y por lo tanto los más consumidos por el ser humano, constituyen las tres cuartas partes del mundo biológico y alrededor del 80% del aporte calórico de la humanidad. El más abundante de entre ellos es la celulosa, componente estructural principal de árboles y otras plantas, mientras que el ingrediente mayoritario en alimentos destinados al consumo humano es el almidón, que provee un 75 – 80 % del aporte energético total (Fennema, 1993).

En el área de alimentos los carbohidratos cumplen funciones como edulcorantes, gelificantes, espesantes, estabilizadores y precursores de compuestos aromáticos o coloridos (Belitz, 1997).

1.1.1 Clasificación.

Basada en su estructura química, según la cual, los hidratos de carbono pueden ser monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos se muestra en el cuadro 1.1. (Belitz, 1997).

Cuadro 1.1 Clasificación de los carbohidratos más importantes en alimentos.

Monosacáridos	Pentosas	Xilosa, arabinosa, ribosa, etc.
	Hexosas	Glucosa, fructosa, galactosa, etc.
Oligosacáridos	Disacáridos	Lactosa, sacarosa, etc.
	Trisacáridos	Rafinosa, etc.
	Tetra y pentasacáridos	Estaquiosa, verbascosa, etc.
Polisacáridos	Homopolisacáridos	Almidón, Glucógeno, celulosa, etc.
	Heteropolisacáridos	Hemicelulosa, pectinas, etc.

- Monosacáridos.

Los monosacáridos importantes son moléculas de peso molecular relativamente bajo que contienen cinco a seis átomos de carbono, con una fórmula empírica general $C_n(H_2O)_n$, los monosacáridos conocidos pueden ser fácilmente derivados del D-gliceraldehído (Fennema, 1993) como se observa en las figuras 1 y 2 .

Formalmente se derivan como polihidroxialdehídos (aldosas) del gliceraldehído y como polihidroxicetonas (cetosas) de la dihidroxiacetona por simple adición de unidades CHOH (Belitz, 1997).

ANTECEDENTES

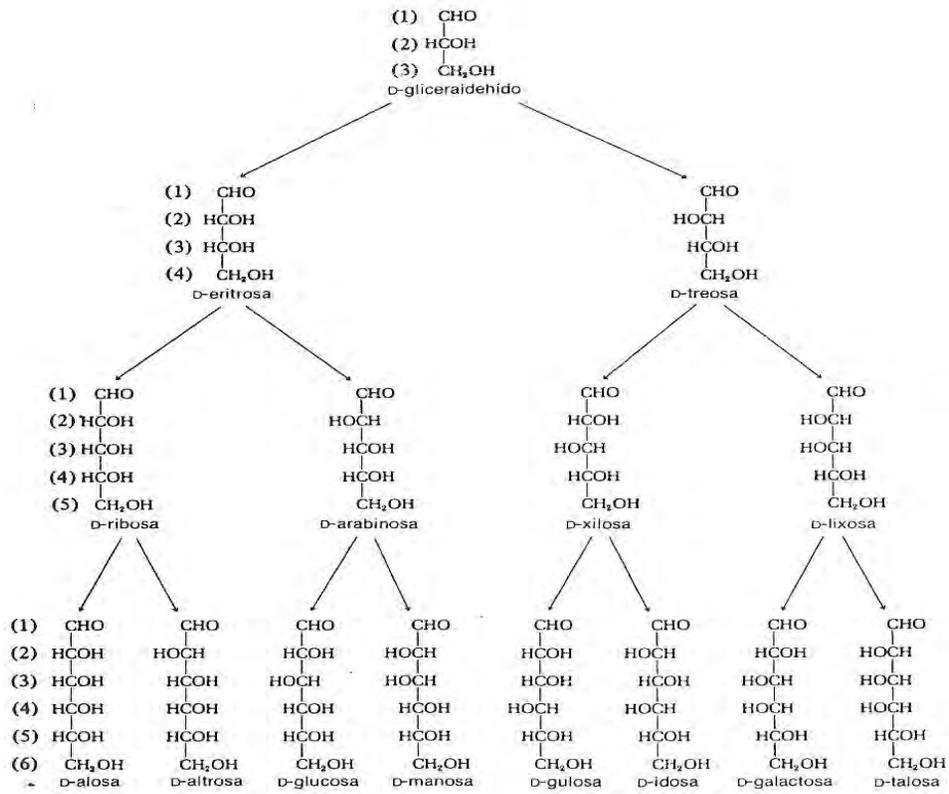


Figura 1. Derivación de monosacáridos (aldosas) (Belitz, 1997).

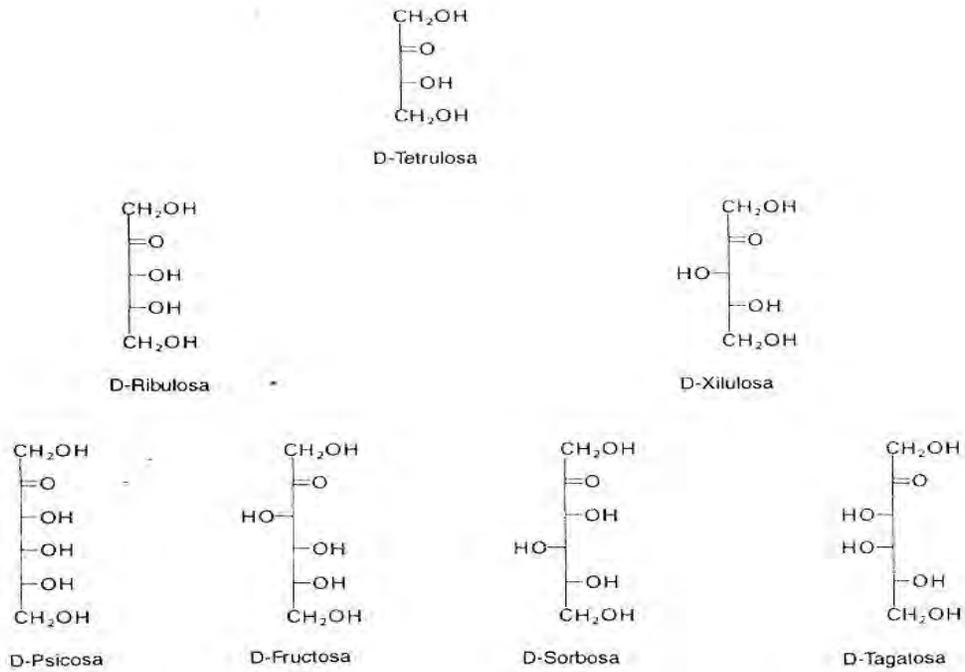


Figura 2. Derivación de monosacáridos (cetosas) (Belitz, 1997).

Los azúcares reaccionan intramolecularmente de modo que el grupo carbonilo se une a uno de los grupos alcohólicos para formar hemiacetal o hemicetal. Ello produce la formación de una estructura cíclica de cinco átomos (furanosa), o bien una más estable de seis (piranosa) y por tanto, un nuevo carbono asimétrico ó centro quiral, en donde esta localizado el grupo carbonilo (Fennema, 1993). Lo que da origen a dos formas estereoquímicas denominadas anómeros; cuando el –OH está por debajo del plano formado por los carbonos se denomina α , y cuando esta por encima β . Cabe indicar que los diferentes isómeros de un azúcar pueden presentar características físicas y químicas distintas (Belitz, 1997).

Aquellos hidratos de carbono que contienen un grupo hemiacetálico libre que puede reaccionar cumpliendo una función carbonílica son denominados azúcares reductores a causa de la capacidad que poseen de reducir iones metálicos como plata o cobre, al mismo tiempo que el azúcar se oxida para formar un ácido carboxílico (Fennema, 1993). Basado en lo anterior se entiende que todos los monosacáridos (hemiacetal, hemicetal) tienen poder reductor, mientras que en el caso de oligo y polisacáridos dependerá de su conformación.

Higroscopicidad y solubilidad.

La adsorción de agua por los azúcares es diferente para cada uno de ellos, y depende principalmente de la estructura, de la mezcla de isómeros y de su pureza. La higroscopicidad es nociva para polvos y granulados que contengan azúcares, ya que la solubilidad de los mismos se ve disminuida debido a la formación de aglomerados.

En el caso de las disoluciones concentradas de azúcares (jarabes de glucosa), contribuyen al mantenimiento de la humedad de algunos alimentos, como en los productos de panadería (Belitz, 1997).

La hidratación de los azúcares es debida a la presencia de numerosos grupos hidroxilo, estos interaccionan con las moléculas de agua mediante la formación de puentes de hidrogeno, lo cual conduce a la solvatación (solubilización) de los azúcares y de muchos de sus polímeros. La estructura del carbohidrato afecta en gran medida la velocidad de unión con el agua así como su cantidad (Fennema, 1993).

Los azúcares son solubles en solventes polares, y aunque para matrices alimentarias complejas se tienen en su mayoría polímeros, en su mayoría se trata de polisacáridos y proteínas, los cuales son insolubles en etanol al 80 % en presencia de calor (Pomeranz, 2001), es por ello que la extracción de azúcares es altamente específica en estas condiciones. La solubilidad de mono y oligosacáridos es muy alta en agua y disminuye parcialmente en alcohol, pero salvo algunas excepciones, todos son solubles en soluciones alcohólicas en presencia de calor (Southgate, 1991).

Rotación óptica, mutarrotación.

La rotación óptica es el ángulo obtenido al girar el plano vibracional de la polarización lineal de la luz cuando la luz polarizada pasa a través de una solución que contiene un compuesto ópticamente activo. (Kirk, 2006). El enantiomero que rota el plano de la luz polarizada a la derecha es dextrorrotatorio, y si rota a la izquierda es levorrotatorio.

Tras la disolución en agua de un azúcar, cinco estructuras pueden coexistir en equilibrio debido a un proceso dinámico de conformación química que ocurre hasta alcanzar el equilibrio mediante el fenómeno que recibe el nombre de mutarrotación; que corresponde a una manifestación del equilibrio entre las estructuras anomérica (α , β -furanosa, α , β – piranosa y de cadena abierta) (Fennema, 1993).

Glucosa.

El más representativo es la *glucosa*, forma de hidrato de carbono (monosacárido) más importante en el metabolismo de las células y su oxidación; ya que casi todos los hidratos de carbono contenidos en los alimentos, se absorben como glucosa tras la digestión; para posteriormente oxidarse hasta CO_2 y H_2O por medio de la glucólisis y el ciclo de Krebs generando ATP, base energética de los sistemas biológicos. La glucosa sintetizada en las plantas por el proceso de fotosíntesis representa la materia prima fundamental para la fabricación de la gran mayoría de carbohidratos y mediante diversas rutas bioquímicas, este azúcar da origen a muchos otros como la sacarosa y la fructosa o bien a polímeros como la celulosa y el almidón. Desde el punto de vista químico se tiene que la D - glucosa posee la fórmula empírica $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, su fórmula estructural muestra que tiene funcionalidad aldehído y polihidroxilo como se aprecia en la figura 3 (Fennema, 1993).

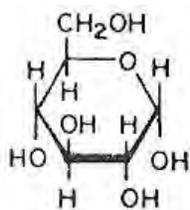


Figura 3. Estructura de Glucosa

ANTECEDENTES

- Oligosacáridos.

Los monosacáridos son moléculas capacitadas para la formación de enlaces glicosídicos, estos se forman entre el grupo lactol de un monosacárido y un grupo –OH de otro donde resulta un disacárido, su estructura se muestra en la figura 4, donde queda ejemplificado el enlace antes descrito (Belitz, 1997).

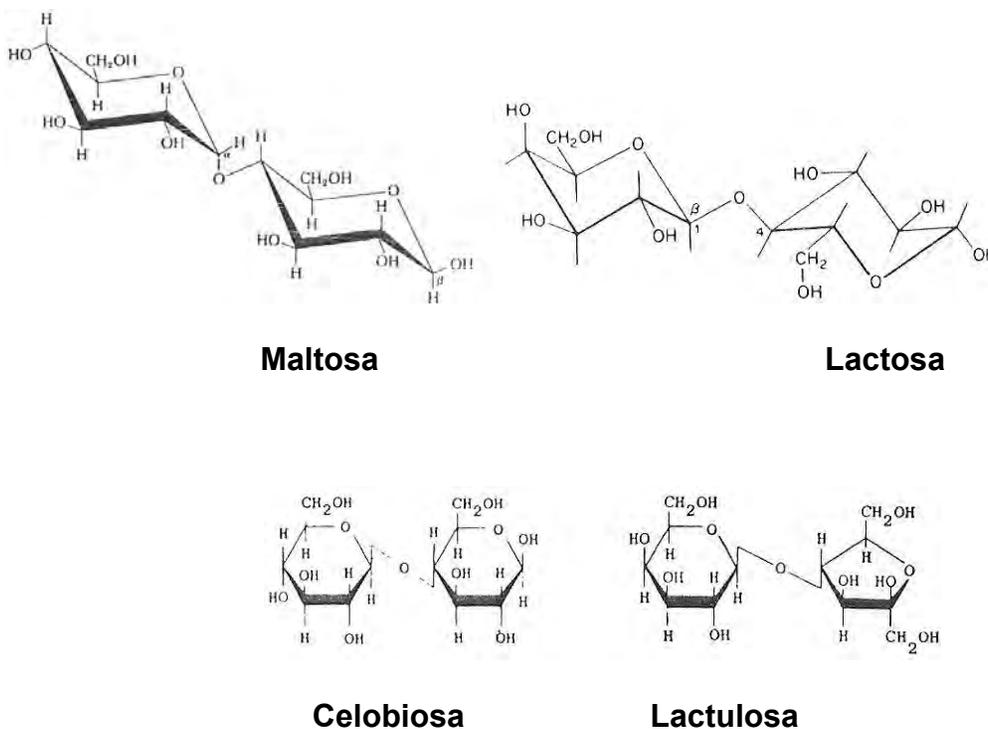
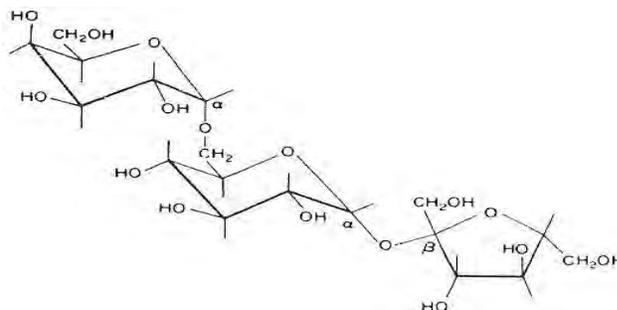


Figura 4. Estructura de algunos disacáridos.

La unión química (enlace glicosídico) de monosacáridos (2-10 aproximadamente) da como resultados los oligosacáridos un ejemplo muy común es el que se presenta en la figura 5, donde se aprecia la estructura química de la rafinosa y los enlaces químicos involucrados.

Generalmente los mono y oligosacáridos también se denominan azúcares, la síntesis natural se produce por transferencia de unidades glicosilo a partir de nucleótidos o por degradación enzimática de polisacáridos. (Fennema, 1993).



Rafinosa

Figura 5. Estructura de un trisacárido.

Los oligosacáridos presentan un comportamiento similar al de los monosacáridos, mismo que ya fue tratado con anterioridad; adicionalmente, la hidrólisis química de los enlaces glicosídicos de los oligosacáridos depende de factores como pH, temperatura y configuración anomérica, en general estas uniones son más lábiles en los ácidos que en los álcalis y las configuración β resisten más que la α (Southgate, 1991).

Galacto-oligosacáridos.

Algunos oligosacáridos de importancia son los α -galactosidos, conocidos también como oligosacáridos de la familia de la rafinosa, que se encuentran en las leguminosas (soya, frijoles, garbanzo, etc.) (Coultate, 1996).

Formados por residuos de α -D-galactopiranosil unidos a la glucosa de la unidad base (sacarosa); a ésta se le une una, dos, tres y cuatro moléculas de galactosa resultando la rafinosa, estaquiosa, verbascosa y ajucosa. Son compuestos de reserva en órganos vegetativos y en semillas de numerosas plantas para su uso durante la germinación (Martínez - Villaluenga, *et all.* 2005).

Estos compuestos se caracterizan por estar relacionados con la tolerancia a la desecación, almacenamiento de energía de las semillas y por ser productores de gases intestinales en el hombre debido a la ausencia de la enzima α -1,6 galactosidasa en la mucosa intestinal, por lo tanto los oligosacáridos intactos son absorbidos en el tracto digestivo y como consecuencia se acumulan en el intestino delgado, donde las bacterias presentes que poseen la enzima α -galactosidasa degradan y subsecuentemente fermentan anaerobicamente estos compuestos generandose así CO_2 , H_2 y CH_4 (Machaiah & Pednekar, 2002).

- Polisacáridos.

Los polisacáridos (glicanos) son polímeros de alto peso molecular y contienen numerosas unidades glucosilo, no tienen un grado uniforme de polimerización, sino que siguen más bien una distribución de tipo gaussiano de pesos moleculares (Fennema, 1993); pueden estar formados por unidades de un solo azúcar (homoglicanos) o de diferentes (heteroglicanos). Estos azúcares además pueden estar unidos de forma lineal o ramificada, siendo diversa la cantidad de posiciones de ramificación y la longitud de las cadenas laterales.

La secuencia de los restos de monosacáridos puede ser periódica en la que los periodos contienen uno o varios restos diferentes; esos mismos períodos pueden ser más o menos largos, o estar separados por intervalos no periódicos (pectinas) o ser totalmente aperiódica (carbohidratos de glicoproteínas) (Belitz, 1997).

De acuerdo con su función biológica se han dividido en dos grandes grupos: aquellos que constituyen la estructura celular y confieren rigidez a los tejidos (celulosa, hemicelulosa, pectinas, gomas) y los de reserva energética de animales y vegetales (glucógeno, inulina, almidón) (Southgate, 1998).

Pueden existir grandes diferencias en las propiedades de los polisacáridos dependiendo del monómero, tipo de enlace y peso molecular (Belitz, 1997).

En principio, los polisacáridos deberían ser solubles puesto que, son cadenas de unidades glicosídicas compuestas por hexosas y pentosas; cada una de esas unidades posee varios lugares capaces de formar puentes de hidrogeno.

Cada oxígeno o hidrogeno de un grupo hidroxilo puede unirse potencialmente a una molécula de agua, teóricamente cada unidad es capaz de estar totalmente solvatada contribuyendo a la solubilidad de la molécula entera. Sin embargo, el polisacárido puede no ser soluble en agua si las moléculas de esta no tienen acceso a formar puentes de hidrógeno, en consecuencia los lugares de unión ya no pueden participar en la formación de éstos con moléculas de agua, por tanto estas regiones cristalinas son insolubles y muy estables.

Basado en lo anterior se establece el principio general de que una molécula lineal uniforme, si se trata de disolver a pH neutro, interaccionará en una o más partes de su molécula con otras moléculas iguales vecinas para dar lugar a una estructura cristalina, quedando el agua excluida de estas zonas (Fennema, 1993).

Sólo se solubilizan mediante el uso de condiciones drásticas (altas temperaturas); polisacáridos de este tipo precipitan con facilidad (retrogradación del almidón) debido a las óptimas condiciones estructurales para la formación de conformaciones regulares y de interacciones intercatenarias, el ordenamiento es tan perfecto que resulta, parcialmente un estado cristalino. (Belitz, 1997).

Los polisacáridos ramificados son más solubles que los lineales - uniformes, puesto que disminuyen las interacciones intercatenarias se facilita la solvatación, de modo que no forman zonas de unión del suficiente tamaño y fuerza como para formar geles, generando así soluciones viscosas estables.

Todos los polisacáridos solubles producen soluciones viscosas, a causa de su gran tamaño molecular ya que la viscosidad depende de esta característica así como de la conformación y la carga.

Por razones estéricas, todas las moléculas lineales, independientemente de que posean carga o no, requieren más espacio para poder girar que las moléculas ramificadas del mismo peso molecular; en consecuencia, como norma general, las soluciones de los polisacáridos lineales serán más viscosas que las de los ramificados. Puesto que una de las razones más importantes para el uso de polisacáridos en la tecnología alimentaría es la de proveer viscosidad o capacidad de gelificación los lineales siempre serán más útiles (Fennema, 1993).

Almidón.

Se encuentra en grandes cantidades en el tejido de las plantas así como en el endospermo contenido en una matriz proteica en los cereales, como carbohidrato de reserva (Ocúltate, 1996), (Belitz.1997).

De todos los polisacáridos, el almidón es el único producido universalmente en pequeños agregados individuales denominados granulos (Fennema, 1993). Puesto que son sintetizados en las células de cada planta, los almidones de distinta procedencia tienen características diferentes y distintivas en lo que a la forma, tamaño, composición y cristalinidad de los granulos se refiere (Belitz, 1997) atributos que pueden ser utilizados para identificar el origen del almidón o de la harina (Tester, *et all*, 2004).

Químicamente es una mezcla de dos polisacáridos similares: amilosa y amilopectina. La amilosa (figura 6) consiste en largas cadenas de D – glucopiranosas unidas por medio de enlaces glucosídicos α (1,4) (Ocúltate, 1996).

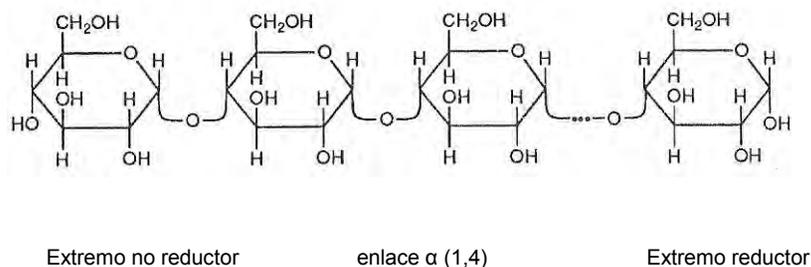
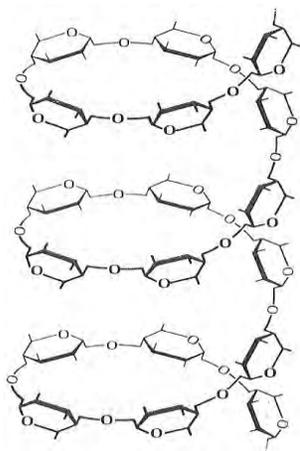


Figura 6. Representación de la amilosa



En disolución acuosa las moléculas de amilosa tienden a formar estructuras helicoidales (figura 7), capaces de incluir moléculas como ácidos grasos e hidrocarburos, en la que cada vuelta de hélice consta de seis moléculas de glucosa.

Figura 7. Enrollamiento helicoidal (amilosa)

Por su parte, la amilopectina es un polímero ramificado, constituido por repetidas unidades de glucosa unidas por enlaces α (1,4) y ramificado a través de enlaces α (1,6) como se observa en la figura 8, y que le dan una forma molecular similar a la de un árbol; las ramas están unidas al tronco central (semejante a la amilosa) por enlaces α -D - (1,6) como se muestra en la figura 9, localizados cada 15 – 25 unidades lineales de glucosa. La concentración relativa de estos dos polímeros está regida por factores genéticos típicos de cada vegetal. La proporción de amilosa y amilopectina en el almidón tiene efectos importantes en las propiedades físicas del mismo (Tester, *et all*, 2004).

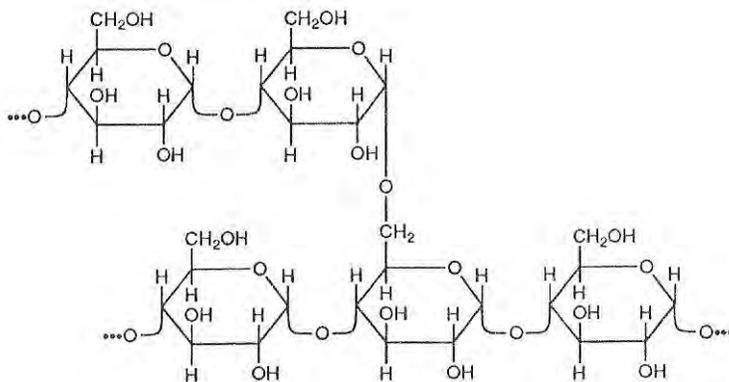


Figura 8. Ramificación (enlace α 1-6) de amilopectina

Los gránulos de almidón son insolubles en agua fría debido a que su estructura esta altamente organizada ya que presenta una gran estabilidad debido a las múltiples interacciones que existen entre sus dos polisacáridos constituyentes; sin embargo cuando se aumenta la temperatura, las moléculas de almidón vibran vigorosamente rompiendo los enlaces intermoleculares permitiendo así la formación de puentes de hidrógeno con el agua.

A medida que se incrementa la temperatura se retiene más agua y el granulo empieza a hincharse y aumenta de volumen (fenómeno que se puede observar en el microscopio); una vez que la parte amorfa se ha hidratado completamente, la cristalina empieza un proceso semejante, pero para esto se requiere más energía, al llegar a cierta temperatura, el granulo alcanza su volumen máximo y pierde tanto su patrón de difracción de rayos X como la propiedad de birrefringencia; si se administra más calor, el granulo incapacitado para retener el líquido, se rompe parcialmente y la amilosa y amilopectina, fuertemente hidratadas se dispersan en el seno de la solución.

A todo este proceso se le llama gelatinización (solubilización del almidón) y es una transición de un estado ordenado (estructura cristalina) a otro desordenado en el que se absorbe calor; la gelatinización transforma los gránulos de almidón insolubles en una solución de las moléculas constituyentes en forma individual (Pomeranz, 2000). Más específicamente la amilopectina se asocia por medio de puentes de hidrogeno con cadenas lineales de amilosa, para formar regiones micelares cristalinas, por esta razón los gránulos de almidón (fundamentalmente la amilosa) se solubilizan, formando una matriz intergranular, lo que produce un incremento de la viscosidad.

El grado de hidratación depende de la temperatura, el pH, la concentración y la fuerza cizallante aplicada (Wong, 1995).

Si se enfría una disolución diluida de almidón, las moléculas lineales se realinean, a través de puentes de hidrógeno para formar un precipitado insoluble. En las disoluciones concentradas de almidón este realinamiento es rápido y desordenado y la asociación de moléculas se produce sólo en determinadas zonas, quedando agua atrapada en los intersticios.

A esta asociación de moléculas lineales, con la consecuente disminución de la solubilidad se le denomina retrogradación (Wong, 1995). Este fenómeno se define como la insolubilización y precipitación espontánea, principalmente de las moléculas de amilosa, debido a que sus cadenas lineales se orientan paralelamente e interaccionan entre sí por puentes de hidrógeno a través de sus múltiples hidroxilos (Pomeranz, 2000).

Pectinas.

Las sustancias pécticas comprenden un grupo extenso de los polisacáridos cuya estructura básica está integrada por unidades de (1→4)- α -D-galacturonapiranosilo (Figura 9), un aspecto que diferencia a las pectinas entre sí es su contenido en esteres metílicos, que disminuye al producirse la maduración de las plantas (Fennema, 1993).

ANTECEDENTES

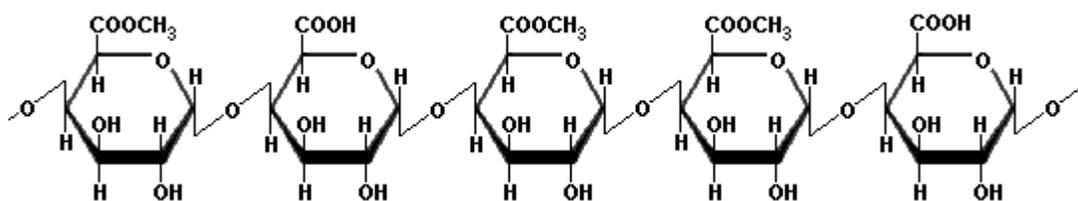


Figura 9. Estructura general de las pectinas. (X puede ser H ó CH₃).

Se encuentran en las laminillas intermedias de las células vegetales asociados con otros hidratos de carbono en las paredes celulares como se aprecia en la figura 10, y son responsables de la firmeza de algunos productos (Pomeranz, 2000).

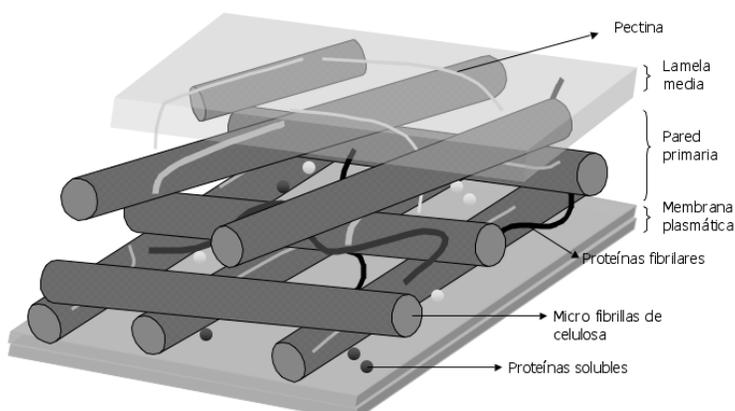


Figura 10. Conformación de la pared celular

La *protopectina* es la sustancia péctica presente en la pulpa de los frutos inmaduros altamente metilada. Los *ácidos pectínicos* son sustancias pécticas menos metiladas que las protopectinas, y se derivan de ella por acción de protopectinasa y pectin-metilesterasa (pectasa). Dependiendo del grado de polimerización y el de metilación los ácidos pectínicos pueden ser coloidales ó solubles en agua y son conocidos como pectinas de bajo metoxilo.

La acción completa de la pectin– metilesterasa sobre ellos conduce a la eliminación total de los grupos metiléster, dando lugar a los *ácidos pécticos*. Las enzimas contribuyen al desarrollo de la textura deseable que se produce en los frutos durante la maduración; a lo largo de este período la protopectinasa convierte la protopectina en pectina coloidal o en ácidos pécticos solubles; la pectasa elimina grupos metiléster de la pectina para producir ácido poli-D-galacturónico o ácido péctico, y éste puede ser parcialmente degradado a monómeros de ácido D-galacturónico por la poligarcturonasa, estas tres enzimas actúan concertadamente durante la maduración y son cruciales para determinar la textura los frutos (Fennema, 1993).

Las pectinas se usan mucho por su capacidad de gelificar, propiedad que esta determinada por factores como peso molecular, grado de esterificación, pH, sales disueltas y la presencia de azúcares (Pomeranz, 2000).

Las pectinas pueden clasificarse de acuerdo con su grado de esterificación en: *pectina de alto metoxilo*, con un grado de esterificación superior a 50 %, que gelifica en un medio que contiene sólidos solubles (generalmente azúcar) hasta del 55 %, en pH de 2.0 – 3.5; y *pectina de bajo metoxilo* con un grado de esterificación menor al 50 %, su gelificación se controla introduciendo iones calcio en el sistema y tiene lugar a pH 2.5-6.5, en un medio con 10-20% de sólidos solubles (Wong, 1995).

El mecanismo de gelificación de las pectinas de alto y bajo metoxilo exige la aproximación de las cadenas del polisacárido para formar zonas de unión. El gel de pectinas de alto metoxilo se estabiliza por medio de interacciones hidrofóbicas de los grupos ester metílico y mediante la formación de puentes de hidrógeno.

El bajo pH utilizado para la gelificación provoca la protonación de los grupos carboxilatos, disminuye la repulsión electrostática entre las cadenas pecticas y aumenta la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares. La adición de un cosoluto, disminuye la actividad del agua, ésta se encuentra menos libre para solvatar la molécula del polisacárido, por consiguiente el cosoluto añadido aumenta la interacción hidrofóbica entre los grupos éster metílico. En los geles de pectina de bajo metoxilo las zonas de unión se estabilizan mediante puentes de calcio intercatenarios (Wong, 1995).

Hemicelulosas.

Las hemicelulosas se encuentran, junto a la celulosa, lignina y pectina, formando parte de las paredes celulares de los vegetales como se presenta en la figura 11. Su composición varía con la fuente vegetal de procedencia. El contenido de este componente decrece durante la germinación; y están altamente concentrados en el pericarpio de los cereales y presentes en muy bajas concentraciones en el endospermo de los mismos.

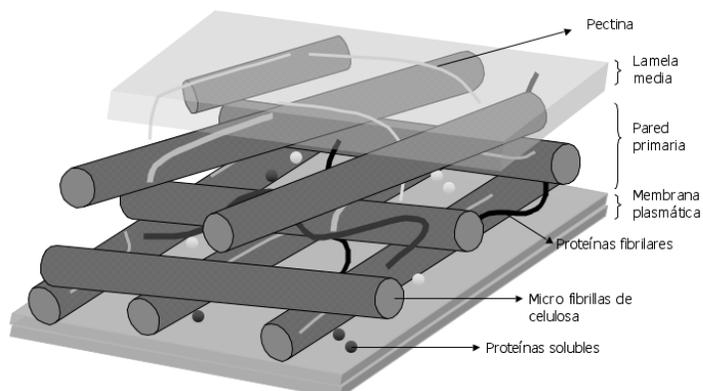


Figura 11. Acomodo de los componentes de la pared celular

La mayor parte son heteropolisacáridos, con 2 – 4 tipos de restos de monosacáridos y se clasifican de acuerdo con la cadena esquelética principal en: xilanos, mananos y glucomananos y galactanos y arabinogalactanos (Wong, 1995).

Las hemicelulosas simples están compuestas de arabino – xilanos, los cuales son completamente hidrolizables en sus constituyentes principales, pentosas (arabinosa y xilosa) (Pomeranz, 2000).

La hemicelulosa más abundante presente en los alimentos posee un esqueleto de tipo xilano, compuesto por unidades (1→4) β- D-xilopiranosilo (Fennema, 1993).

Por definición, las hemicelulosas, son insolubles en agua y en soluciones de oxalato de amonio y solubles en alcali; la solubilidad depende del tamaño de las cadenas y su conformación; se requiere hidrolizar el polímero ya sea en medio fuertemente alcalino o medianamente ácido para romper dichas cadenas y tener los monómeros en solución (Southgate, 1991).

Una de las principales complicaciones que se presentan en la determinación de hemicelulosas es la variedad que existe en las estructuras químicas de las mismas, debido a la complejidad estructural que presentan no hay disponibles métodos estándar para la determinación de éstas (Pomeranz, 2000).

Celulosa.

Se encuentra presente en todas las plantas como principal componente estructural de sus paredes celulares, asociada a varias hemicelulosas y lignina, y el tipo y extensión de estas asociaciones contribuye a la textura característica de los alimentos vegetales (Fennema, 1993).

ANTECEDENTES

Químicamente es un polisacárido constituido por bloques de celobiosa (que a su vez constan de dos unidades de glucosa unidas por enlaces β -1,4 (Wong, 1995).

Celulosa (poliglucosa
lineal unida por enlaces β -1-4)

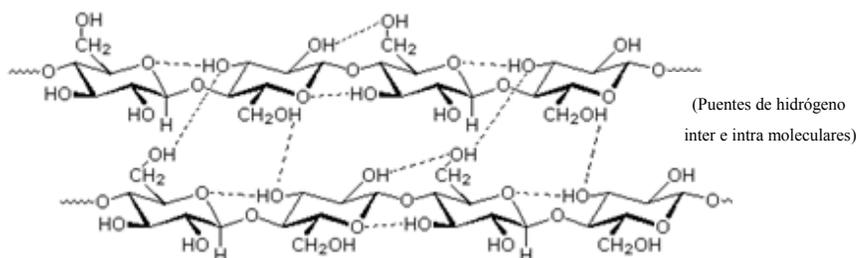


Figura 12. Representación de la celulosa.

La celulosa es un homoglucano formado por cadenas lineales de unidades de (1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosilo (Figura 12) (Fennema, 1993), con alta resistencia mecánica y química propiedades atribuidas al acomodo de sus cadenas, mismas que se alinean paralelamente estableciendo un gran número de puentes de hidrógeno intermoleculares, lo que da origen a microfibrillas altamente estructuradas (Southgate, 1991). La extrema linealidad de la celulosa es lo que facilita el que las moléculas se asocien fuertemente, como ocurre en la celulosa vegetal nativa. Sus moléculas poseen regiones amorfas y cristalinas, y son las amorfas las que son más fácilmente atacadas por solventes y reactivos químicos (Fennema, 1993).

A pesar de tener muchos hidroxilos libres es muy poco soluble en agua debido a que estos grupos no se hidratan por estar actuando entre sí. Puede ser hidrolizada a residuos de D-glucosa en condiciones extremas de pH y temperatura, en su estado nativo es insoluble en agua y la llamada α -celulosa es insoluble en una solución de NaOH al 17.5 %(p/V) (Southgate, 1991).

Lignina.

Este componente no es un carbohidrato como tal, más bien se encuentra ligado a la celulosa de la pared celular así como a algunos polisacáridos no celulósicos, es por ello que se le considera en el análisis de carbohidratos ya que forma parte de la fibra insoluble. Se compone de gran cantidad de ácidos y alcoholes fenilpropílicos (*p*-coumarilo, coniferilo y alcohol sinapílico), como se observa en la figura 13. Tiene dos funciones principales: como enlace y anclaje de las microfibrillas de celulosa y otros polisacáridos de la matriz; y dando rigidez a las paredes previniendo la degradación bioquímica y daño de la pared celular (Knud Erik Bach Knudsen, 1997). Es parcialmente soluble en solventes orgánicos y es extremadamente resistente a degradación química y enzimática (Southgate, 1991).

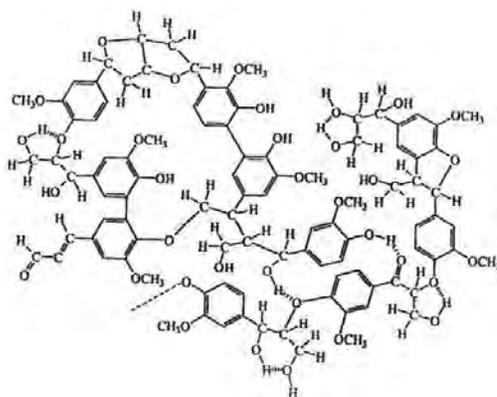


Figura 13. Estructura de la lignina

Fibra.

Con el nombre de fibra se designa a un grupo muy amplio de polisacáridos, de los considerados estructurales (celulosa, hemicelulosa y pectina) incluyendo lignina, exclusivos de los vegetales, mismos que no son aprovechados metabólicamente por los organismos monogástricos, incluyendo al hombre.

La fibra cruda corresponde al residuo obtenido luego de un tratamiento en caliente con HCl y posteriormente con NaOH; en estas condiciones se pierde una fracción importante de polisacáridos (Southgate, 1991).

El termino fibra dietética se usa para definir la fibra total en la dieta para incluir todos los componentes de los alimentos que no son degradados por las enzimas del aparato digestivo humano a fragmentos asimilables. En forma alterna, la fibra de la dieta se puede considerar esencialmente como polisacáridos (no amiláceos) y lignina resistentes a la hidrólisis por las enzimas digestivas del hombre (Kirk, 2006).

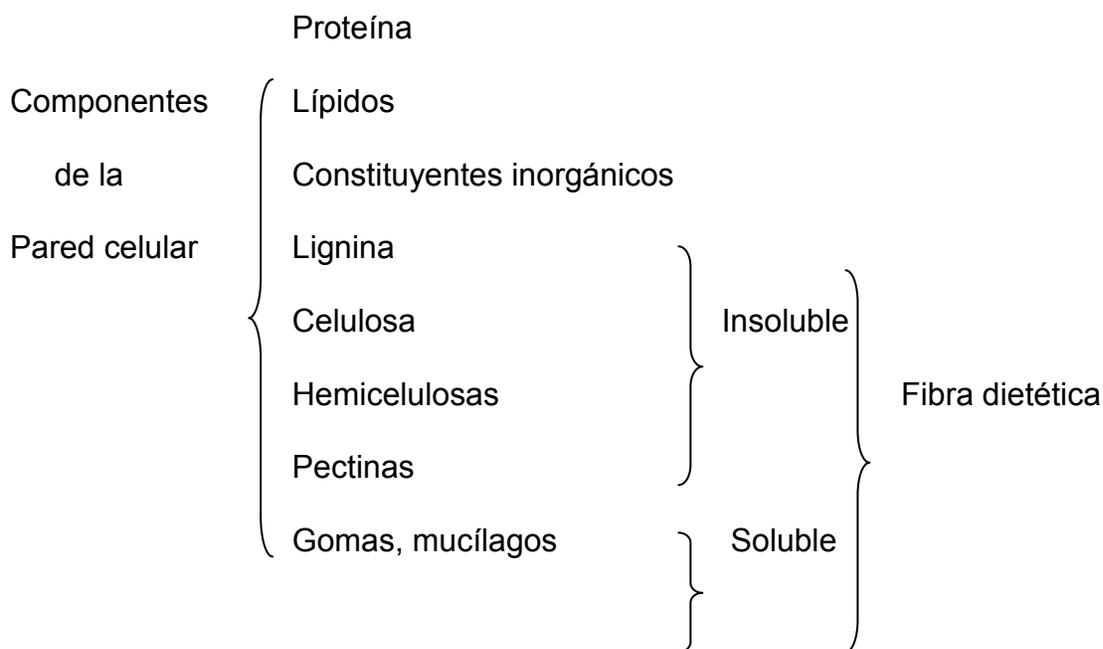


Figura 14. Componentes de la fibra dietética.

La fibra dietética, tradicionalmente considerada como un conjunto de carbohidratos complejos, puede dividirse en dos grupos principales según sus características químicas y sus efectos en el organismo. Estos dos tipos son: fibra insoluble y fibra soluble (Figura 14)

La fibra insoluble está integrada por sustancias que no se disuelven en agua, este tipo de fibra predomina en alimentos como el salvado de trigo, granos enteros y las verduras, resiste la acción de los microorganismos del intestino.

La fibra soluble está formada por componentes solubles en agua y con capacidad de formar geles que confieren volumen a las heces, sus componentes son utilizados parcialmente por los microorganismos intestinales.

Este tipo de fibra predomina en las legumbres, en los cereales y en algunas frutas, puede regular la velocidad de absorción intestinal de los azúcares procedentes de los alimentos (Southgate, 1991).

1.1.2 Análisis de Carbohidratos.

Para fines analíticos básicamente se les considera como azúcares libres y polisacáridos (Southgate, 1991), a partir de los cuales se deriva el análisis de componentes particulares, como se aprecia en la figura 15 donde se tienen algunos ejemplos de dichos componentes.

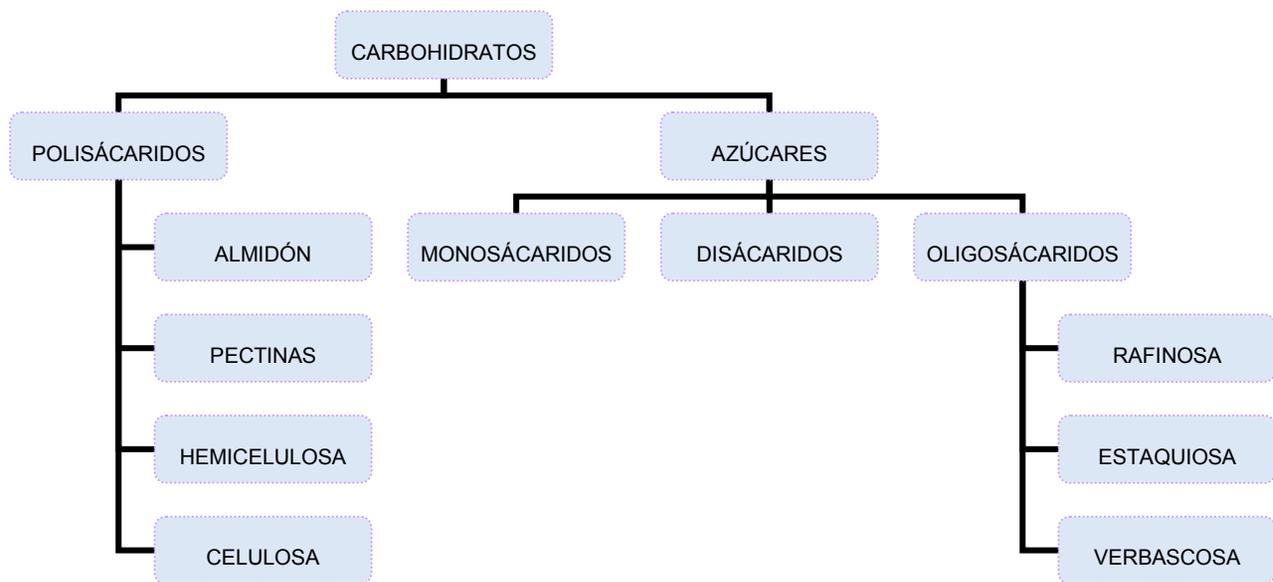


Figura 15. Esquema analítico de carbohidratos

Las pruebas cualitativas para azúcares, están basadas en reacciones coloridas por efecto de la condensación de los productos de degradación de azúcares en ácidos minerales fuertes con varios compuestos orgánicos; las propiedades reductoras del grupo carbonilo; y en la oxidación de los grupos hidroxilo vecinos. La mayoría de estas pruebas se realizan en extractos, y muchas de ellas han sido adaptadas como determinaciones cuantitativas (Pomeranz, 2000).

Los métodos disponibles para la determinación cuantitativa de los azúcares de los alimentos se basan principalmente en la refractometría, la polarimetría, la reducción de cobre, la cromatografía (HPLC, GLC) y la espectrofotometría basada en reacciones enzimáticas y de color (Kirk, 1996).

El método de elección depende de varios factores como el tipo y número de muestras, exactitud, precisión, sensibilidad y tipo de información requerida, tiempo y equipo con que se cuente (Kirk, 1996).

- Azúcares en solución.

Índice de refracción.

Cuando un haz de luz pasa de un medio a otro, cambia de dirección, se dobla o se refracta. La relación entre el ángulo de incidencia al seno del ángulo de refracción se llama índice de refracción, varía con la naturaleza del compuesto, la temperatura, la longitud de onda de la luz y la concentración. Si las tres primeras variables se hacen constantes la concentración del compuesto se puede determinar midiendo el índice de refracción, de tal forma que se utiliza para determinar sólidos totales en solución.

El uso de este método para determinar concentraciones es preciso solamente para sacarosa pura u otras disoluciones puras; se utiliza para obtener concentraciones aproximadas de azúcares para productos líquidos en cuyo caso la solución debe ser clara (Nielsen, 1998).

Cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

Es también conocida como de alta eficiencia. La HPLC es una técnica cromatográfica de reparto o partición en la que la muestra se fracciona entre una fase móvil que es líquida y una fase estacionaria sólida o embebida en un líquido activo (Bermejo, 1991).

Utiliza una presión muy elevada para forzar el paso del disolvente por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución (Harris, 2001). Debido a estas presiones el equipo para HPLC es elaborado y costoso. Los azúcares no absorben la luz a las longitudes de onda del ultravioleta, por ello, un método altamente disponible y directo de detección acoplado en HPLC es mediante el índice de refracción, los azúcares son muy susceptibles a los cambios de temperatura de la columna, y en particular, a los cambios de composición del solvente móvil (Skoog *et al* 2001). Ha resultado ser una técnica muy útil y ampliamente utilizada para identificar y cuantificar azúcares en alimentos.

Método de Fenol – Sulfúrico.

La acción de ácidos fuertes en hidratos de carbono conduce a la deshidratación de la molécula formando un anillo con dobles enlaces, las hexosas se convierten en hidroximetilfurfural (HMF) y las pentosas producen furfuraldehído (Figura 16), una coloración distintiva se obtiene cuando se adiciona a los productos de descomposición de los azúcares en ácido, algunos compuestos orgánicos como por ejemplo fenol, el resultado de la reacción de condensación sufrida por dichos productos (Figura 17) son formas coloridas que pueden ser cuantificadas en el espectro visible ya que son detectados a longitudes de onda de 480 nm en el caso de pentosas y en el de hexosas a 490 nm (Pomeranz, 2000).

ANTECEDENTES

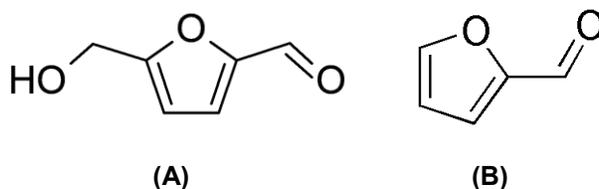


Figura 16. Estructura de hidroximetilfurfuraldehído (A) y furfural (B).

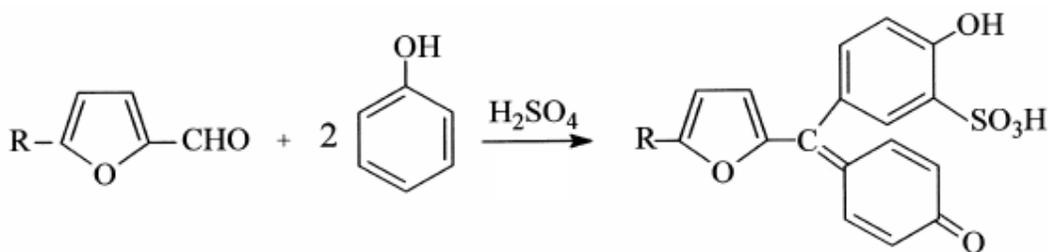


Figura 17. Reacción del método fenol – sulfúrico.

Método de ácido dinitrosalicílico (DNS).

En disolución alcalina el azúcar se hidroliza produciendo un compuesto (enediol) que reduce un grupo nitro del ácido 3,5-dinitrosalicílico, para dar el producto monoamino colorido el 3-amino-5-nitrosalicilato de sodio, especies representadas en la figura 18. (Southgate, 1991).

ANTECEDENTES

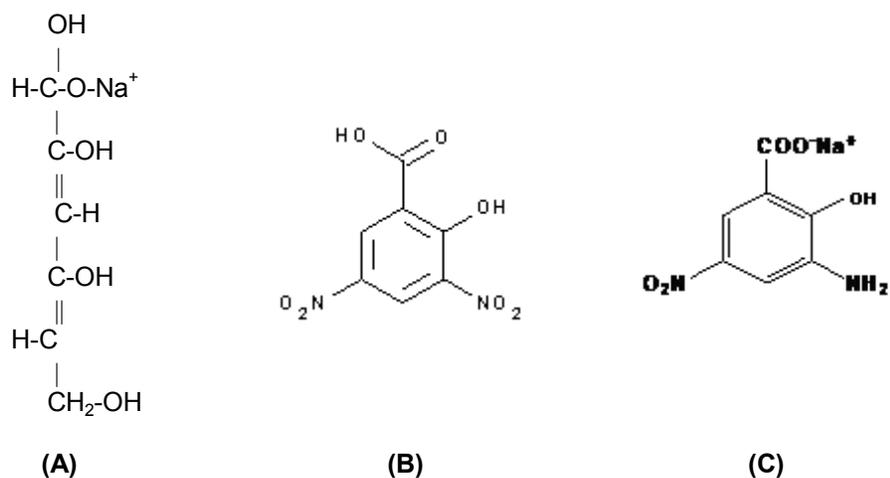


Figura 18. Enediol o reductona (A), ácido 3,5-dinitrosalicílico (B) y 3-amino-5-nitrosalicilato de sodio (C).

Método Trifeniltetrazolio.

El ión 2,3,5-trifeniltetrazolio (Figura 19) es incoloro en solución, pero cuando es reducido por azúcares reductores forma un precipitado insoluble de color rojo - cereza, el cual es soluble en solventes orgánicos como el isopropanol o etanol y puede ser detectado a una longitud de onda de 485 nm (Fairbridge *et al*, 1951).

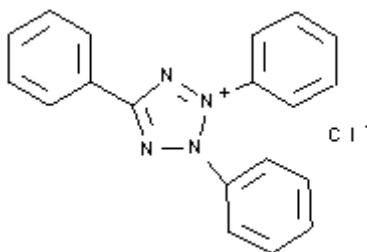


Figura 19. Cloruro de Trifeniltetrazolio.

- Almidón.

Reacción colorida con yodo.

La amilosa es comúnmente determinada por reacción entre α - 1,4 - glucanos y yodo formando un complejo de color azul que puede ser medido espectrofotométricamente (Knutson, 1999), mientras que la molécula de amilopectina ha dado evidencia de no formar complejos estables con yodo pero dan un color rojo pálido en su presencia (Southgate, 1991).

El complejo almidón - yodo consiste en el arreglo lineal de los átomos de yodo ocupando la cavidad helicoidal de la molécula (amilosa) del polisacárido confirmado por difracción de rayos - X en estudios realizados, mismos que mostraron la disposición de la estructura que existe en solución (Rendleman, 2003).

Hidrólisis ácida directa.

Puede ser usado cuando solo se tiene almidón y dextrinas sin algún otro polisacárido hidrolizable. La hidrólisis ácida del almidón da un rendimiento teórico de glucosa y este proceso ha sido el principio de varios métodos analíticos. La fuerza del ácido utilizado para la hidrólisis puede variar pero se sabe que una disolución 0.2 M de ácido sulfúrico por 4 horas en reflujo convierte el almidón en glucosa, por lo cual el procedimiento se vuelve cuantitativo al poder determinarse el contenido de almidón como glucosa liberada de la hidrólisis. La limitante del proceso es el contenido de proteínas y ácidos grasos en el alimento ya que dan productos de condensación en estas condiciones (Southgate, 1991).

Hidrólisis enzimática.

El almidón se dispersa en DMSO (dimetilsulfoxido) y luego se convierte cuantitativamente en D-glucosa con α -amilasa termoestable, llevando a cabo la despolimerización y solubilización del almidón. Una glucoamilasa completa la acción de la α -amilasa para determinar la D-glucosa usando un reactivo (glucosa oxidasa / peroxidasa) que contiene una parte incolora que se oxida a un compuesto colorido por medio del peróxido de hidrógeno generado por la oxidación de la glucosa (Nielsen, 1998).

Basado en este tipo de condiciones es que se tienen procedimientos de tipo comercial para la determinación de almidón, mismos que están basados en los métodos oficiales (AOAC, 996.11, 2000).

- Pectinas.

Las soluciones pécticas incluyen polisacáridos que pueden ser extraídos con agua caliente, sin embargo es común añadir un agente quelante como EDTA u oxalato de amonio al medio de extracción para liberar aquellas pectinas que están presentes como sales de calcio. (Southgate, 1991)

No se tiene un método oficial establecido para su determinación, y la mayoría de los métodos que han sido publicados básicamente involucran precipitación con alcohol, acetona o sales de calcio (Nielsen, 1998). Sin embargo, se tienen alternativas basadas en la hidrólisis del polisacárido y la cuantificación de los monómeros como se observa en la hidrólisis ácida directa en el caso del almidón.

Reacción con carbazol.

Una constante en las pectinas es la presencia del D – ácido galacturónico como principal componente, el cual puede ser detectado por reacción con carbazol (Figura 20), basado en el mismo principio que el método de fenol – sulfúrico; deshidratación del ácido urónico en medio ácido, seguida de una reacción de condensación con carbazol, el cual corresponde a un heterociclo con nitrógeno como heteroátomo mostrado en la figura 21 (Jiebing, *et al.*, 2007).

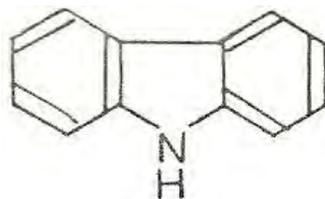


Figura 20. Carbazol

- Fibra.

Considerando la composición de la fibra como un grupo amplio de polisacáridos es que se relaciona su detección y cuantificación con los métodos empleados para la caracterización de azúcares y polisacáridos antes mencionados. Sin embargo, para su análisis se han desarrollado procedimientos basados en las características fisicoquímicas de sus componentes, algunos de ellos se presentan a continuación.

Método de Weende (Fibra cruda).

La fibra cruda corresponde al producto de la pérdida por ignición, después de la digestión de la muestra con H_2SO_4 y NaOH al 1.25%, en condiciones controladas (calentamiento), se cuantifica dicho producto por diferencia de pesos (método gravimétrico) y está compuesto principalmente por celulosa y lignina (Southgate, 1991).

Fibra dietética total.

Por muchos años se consideró que el procedimiento para cuantificar la fibra cruda era inadecuado y brindaba poca información sobre los componentes de la fibra. Sin embargo este método representa la evolución de las metodologías y su combinación.

La determinación de fibra dietética total se basa en la eliminación por hidrólisis enzimática de los componentes digeribles, seguida de precipitación con alcohol de todos los polisacáridos y polímeros no hidrolizados así como de la cuantificación gravimétrica del precipitado (Nielsen, 1998).

La diferenciación de fibra dietética soluble e insoluble es una modificación de la determinación enzimática de Fibra Dietética Total.

Después de digerir el almidón y proteínas de una muestra, se separan los polisacáridos solubles de los insolubles por filtración; el residuo sólido corresponde a la fibra dietética insoluble (FDI) cuantificado por gravimetría; mientras que en el sobrenadante se encuentra la fibra dietética soluble (FDS). En ambos casos se puede cuantificar por hidrólisis y determinación química de los azúcares (Saura – Calixto *et al.*, 2000).

1.2 Generalidades del frijol negro.

El frijol es una planta originaria de Mesoamérica (que incluye a México) la cual se cultiva desde hace 8 mil años, desarrollándose durante ese tiempo una diversidad de tipos y calidades del mismo. Se considera que en total existen alrededor de 150 especies, aunque en México éstas solo ascienden a 50, destacando las 4 especies que el hombre ha domesticado de las cuales, en nuestro país, las más importantes en cuanto a superficie sembrada y producción son el frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) y el frijol ayocote (*Phaseolus coccineus L.*).

Esta leguminosa es uno de los alimentos más antiguos que el hombre conoce y gusta de consumir ya que forma parte de la cultura gastronómica de México de ahí su alta aceptación y demanda a nivel nacional concentrándose principalmente en la zonas centro y sur del país; por su gran importancia económica y social, es un producto estratégico dentro del desarrollo rural de México, ya que ocupa el segundo lugar en cuanto a superficie sembrada nacional y además representa la segunda actividad agrícola mas importante en el país.

Es un alimento fundamental en la dieta de la población mexicana, al igual que en otras regiones de América Latina, ya que constituye una fuente importante de carbohidratos y proteínas, siendo un alimento que no puede sustituirse con el consumo de algún otro; actualmente esta leguminosa se enfrenta a modificaciones importantes, incluidos los hábitos alimenticios, a consecuencia del urbanismo, la migración y el empleo; así como el paso de una economía cerrada a una economía global, todo lo cual esta generando presiones en diversas etapas de la cadena de producción, comercialización, transformación y consumo. (SIAP - SAGARPA, 2008).

ANTECEDENTES

Los carbohidratos constituyen la fracción principal en los granos de las leguminosas en general, entre 55 y 65 % del peso seco en promedio. De ellos, el almidón y otros polisacáridos (componentes importantes de la fibra dietética) son los principales constituyentes, con cantidades pequeñas pero significativas de azúcares libre y algunos oligosacáridos (Osorio *et al.*, 2003).

Gracias al tipo y cantidad de carbohidratos que presenta esta leguminosa así como su disponibilidad es que se favorece su uso como instrumento didáctico para el análisis de carbohidratos.

Objetivo General.

- *Implementar un procedimiento para evaluar diferentes tipos de carbohidratos presentes en una muestra y sus características, en un laboratorio de docencia, basado en las propiedades fisicoquímicas del macrocomponente.*

Objetivos Particulares.

- Establecer un esquema de: extracción basada en la solubilidad de los diferentes tipos de carbohidratos; y su cuantificación a través de métodos químicos.
- Aplicar diversos métodos analíticos utilizados en la cuantificación de carbohidratos para explicar sus propiedades fisicoquímicas.
- Conocer el tipo y cantidad de los diferentes carbohidratos presentes en frijol negro, crudo y cocido.
- Evaluar los cambios en el contenido y tipo de carbohidratos por efecto de la cocción.

2 Metodología.

A continuación se presenta en la figura 21 el diagrama de caracterización de carbohidratos propuesto, mismo que a demás de resumir los procedimientos requeridos en el presente trabajo, muestra la secuencia de dichos procedimientos, lo que implica que cada etapa depende del tratamiento previo a la misma.

La metodología propuesta fue probada inicialmente en la muestra de frijol cocido, una vez probada, se analizó la muestra de frijol crudo; para tener un ejemplo aplicado de esta metodología, basado en la comparación del efecto de cocción en el frijol.

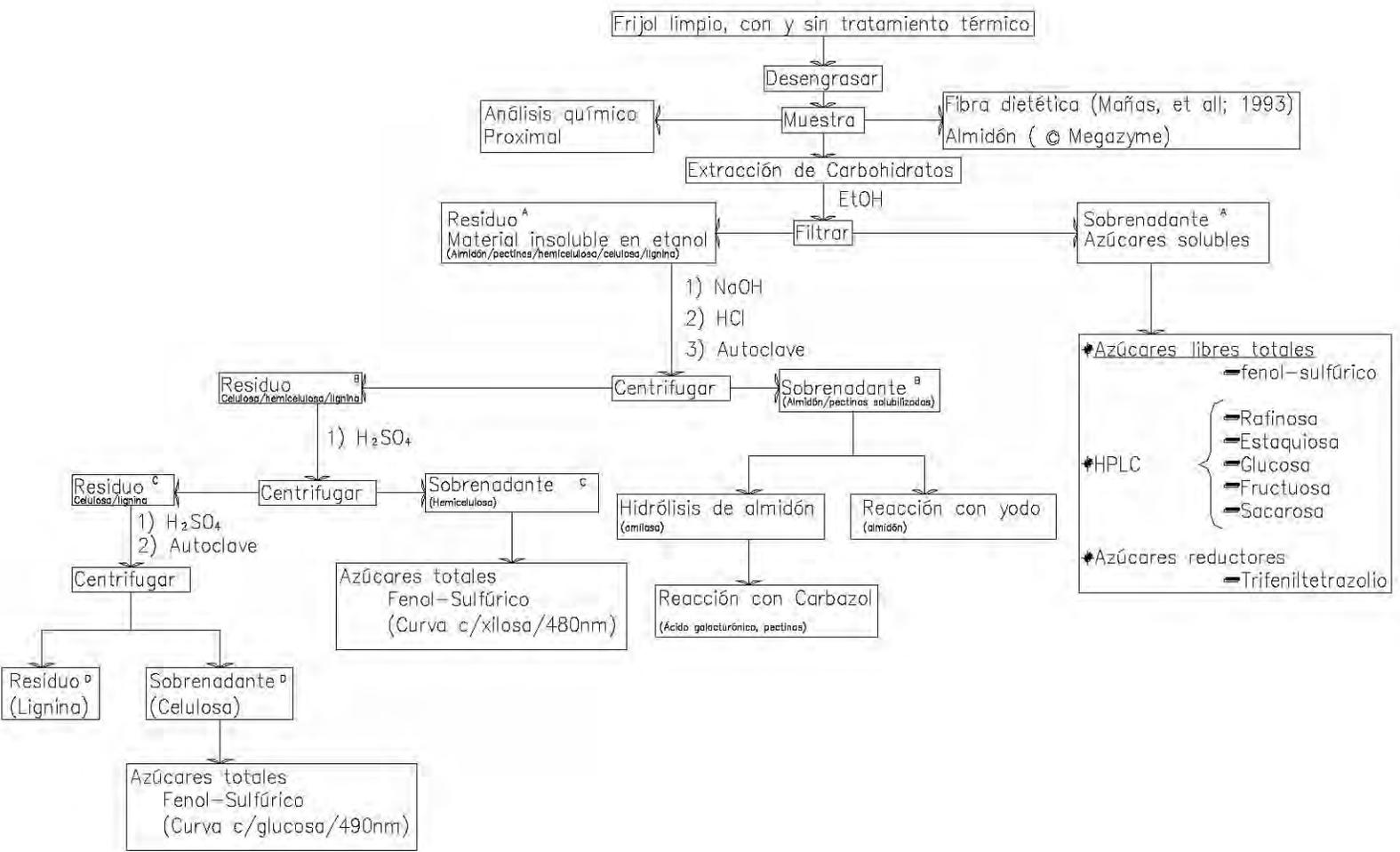


Figura 21. Diagrama de Caracterización de Carbohidratos

2.1 Procedimiento.

2.1.1 Pretratamiento de la muestra.

➤ Muestras.

Se empleó frijol negro (*Phaseolus vulgaris L*) comercial empacado por CIA. ARROCERA COVADONGA S.A. de C.V., lote 03091403, contenido neto 1 Kg; limpio, entero, homogéneo con y sin tratamiento térmico.

- El *tratamiento térmico* se refiere a la cocción de la muestra, misma que se realizó de la siguiente manera: el frijol comercial crudo se cocinó en una olla casera a presión en una relación agua/grano 3:1 a temperatura de ebullición, hasta que se obtuvo una consistencia suave (aproximadamente 1–1:30 h); y se somete a un secado de 24 hrs a 80°C. (6)

- *Homogenización de la muestra.*

La muestra cocida y presecada al igual que la muestra cruda se sometieron a molienda, en una licuadora hasta que el 80% de cada muestra pase la malla 100.

- *Desengrasado.*

La extracción de la grasa presente en las muestras se realizó por el método de Soxhlet, con base en la técnica del AOAC 920.39C, 2000. Se empleó éter etílico como disolvente; la extracción se llevó a cabo durante 6 hrs; por último, para la evaporación del disolvente remanente en la muestra, se dejó a temperatura ambiente durante 24 hrs.

2.1.2 Análisis Proximal.

Se caracterizó cada una de las harinas desengrasadas de frijol, crudo y cocido, para lo cual se realizaron las siguientes determinaciones por triplicado:

- Humedad: Secado en estufa de vacío (AOAC 925.09, 2000).
- Cenizas: Método en seco, a 550°C (AOAC 923.03, 2000).
- Grasa cruda: Método de Soxhlet, Éter etílico (AOAC 920.39, 2000).
- Proteína cruda: Método de Kjeldahl. FC =5.85 (AOAC 920.87, 2000).
- Carbohidratos: Por diferencia.

2.1.3 Caracterización de carbohidratos.

○ **Separación de azúcares y polisacáridos.**

Se colocaron 2 g de muestra seca y desengrasada en un matraz bola de fondo plano, se adicionaron 200 mL de etanol al 80% y se colocó a reflujo con agitación constante, con ayuda de una parrilla de calentamiento durante 1 hora. Se filtró con papel filtro a peso constante. El remanente sólido (residuo A) se secó en estufa de vacío a 50 °C hasta peso constante registrándose el peso del mismo y se almacenó en un desecador para determinaciones posteriores.

En el extracto etanólico (sobrenadante A) obtenido se determinó:

- I. Cuantificación de azúcares totales (método fenol-sulfúrico)
(Southgate, 1991).
- II. Cuantificación azúcares reductores (método Trifeniltetrazolio)
(Southgate, 1991).
- III. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC).
(Machaiah & Pednekar, 2002)

<i>Condiciones de trabajo</i>	
Cromatógrafo	<i>Beckman, modelo System Gold</i>
Columna (fase estacionaria)	Marca <i>Phenomenex , Luna – NH2</i>
	Dimensiones <i>250 x 4.6 mm</i>
	Tamaño de partícula <i>5.00 ± 0.30 μm</i>
Fase móvil	<i>Acetonitrilo : Agua (75:25)</i>
Flujo	<i>1.2 mL/min</i>
Volumen de inyección	<i>50 μL</i>
Detector	<i>Índice de refracción. Perkin Elmer LC – 30</i>

Se utilizaron como estándares: glucosa, galactosa, fructosa, sacarosa, rafinosa y estaquiosa marca SIGMA.

- **Determinaciones de polisacáridos en el residuo A.**

- **Determinación de almidón.**

Para solubilizar el almidón y pectinas a partir del remanente sólido proveniente de la extracción etanólica (residuo A), se colocó una cantidad conocida del sólido en un matraz erlenmeyer de 250 mL, a la cual se le adicionó NaOH 2M, manteniendo la relación de 5 mL de NaOH 2M por cada 0.2 g del sólido, una vez obtenida la suspensión, se sometió a temperatura de ebullición entre 5 – 10 min tratando de solubilizar lo mejor posible el sólido, posteriormente se neutralizó con 5 mL de HCl 2M (pH=7).

Después, la suspensión neutralizada, se colocó en autoclave a 120°C por 1 hr. Por último se centrifugó y el sólido separado se lavó varias veces con agua caliente hasta que el agua de lavado no presentó reacción colorida con yodo; obteniéndose un nuevo remanente sólido (residuo B), mismo que fue secado en estufa de vacío a 50 °C hasta peso constante, registrando su peso y almacenado para análisis posteriores.

En el sobrenadante obtenido (sobrenadante B) junto con el agua de los lavados realizados al sólido, se aforaron a un volumen conocido, y en este se realizó la cuantificación de almidón por reacción con yodo (Southgate, 1991).

- **Determinación de pectinas.**

Del mismo sobrenadante B, en el cuál se tiene almidón y pectinas solubilizadas, se tomó un volumen conocido (10 – 50 mL), se colocó en baño de agua a 60 °C y se adicionó entre 1 – 5 mL de una solución concentrada de amilasa fúngica (25 mg/mL) se incubó hasta que la solución no presentó reacción colorida con yodo.

En el hidrolizado se cuantifican pectinas a partir de ácidos urónicos (unidad estructural) por reacción con carbazol (Shiga & Lajolo, 2006).

- **Determinación de hemicelulosa.**

Partiendo del sólido remanente luego de solubilizar el almidón y pectinas (residuo C), se colocó una cantidad conocida de este en un matraz bola de fondo plano y se adicionó H_2SO_4 1M, considerando que por cada gramo de sólido se agregan 100 mL de H_2SO_4 1M; éste se mantuvo en reflujo durante 2 horas, se dejó enfriar y se centrifugó; en el sobrenadante se cuantificó azúcares totales por el método de fenol – sulfúrico a una λ de 480 nm (vinculado a una curva patrón elaborada con xilosa), para determinación de pentosas, como unidad estructural de hemicelulosa.

Por otro lado, el recién obtenido sólido remanente, fue lavado con agua destilada, para eliminar total o parcialmente el H_2SO_4 1M, y secado en estufa de vacío a 50 °C hasta peso constante (registrando el valor) y almacenado para determinaciones posteriores (residuo D).

- **Determinación de celulosa.**

Del residuo D, obtenido después de la hidrólisis de hemicelulosa, se tomó una cantidad conocida y se procesó con H_2SO_4 al 76 % (respetando una relación de 1:10 sólido / líquido) durante una hora a 30°C, seguido de 1 hr en autoclave (120°C), para la hidrólisis de celulosa.

La solución se dejó reposar durante 24 hrs en refrigeración y posteriormente se centrifugó; en el sobrenadante ^(D) se cuantificaron azúcares totales por el método fenol – sulfúrico a una λ de 490 nm, para identificación de hexosas, (haciendo referencia a una curva patrón elaborada con glucosa) para determinar la glucosa liberada a partir de celulosa.

- **Determinación de lignina.**

Se cuantificó teóricamente por diferencia, luego de calcular el balance de materia, considerando los componentes determinados anteriormente.

- **Métodos de referencia.**

Simultáneamente al análisis químico realizado, se determinó Fibra Dietética (Mañas, *et al.*, 1993), así como Almidón por un método oficial (AOAC, 996.11, 2000), a partir de las muestras desengrasadas, tanto para el caso de Frijol Crudo (FC) como para Frijol cocido (FC₂); con el fin de corroborar la exactitud de la metodología sugerida, en la etapa correspondiente al componente en estudio del esquema de análisis propuesto.

3. Resultados y Discusión.

3.1. Análisis Proximal.

Luego de llevar a cabo el pretratamiento correspondiente para cada muestra, y con la finalidad de caracterizar la materia prima a emplear se hizo el análisis proximal de frijol crudo (FC) y cocido (FC₂), a partir del cual se obtiene los resultados presentados en la tabla 3.1, en donde se observa que para ambas muestras solo se aprecia diferencia evidente en un componente principal; debido al presecado al que fue sometido el frijol cocido previo a la homogenización, la humedad presente es al menos el 50 % menor que en frijol crudo. Por otro lado el contenido de humedad en las muestras se considera óptimo ya que a valores mayores al 14 % son más propensas al deterioro microbiológico principalmente (hongos) alterando la composición original de las mismas (Serna, 1996).

Tabla 3.1 Composición proximal de frijol crudo y cocido (g componente/ 100 g muestra)

Componente	Frijol Crudo		Frijol Cocido	
	% Base Húmeda	% Base Seca	% Base Húmeda	% Base Seca
Humedad	11.12 ± 0.04	-----	5.56 ± 0.06	-----
Cenizas	3.82 ± 0.02	4.30	3.32 ± 0.02	3.51
Grasa	1.53 ± 0.01	1.72	1.64 ± 0.01	1.74
Proteína	19.57 ± 0.18	22.01	19.61 ± 0.25	20.77
Carbohidratos (por diferencia)	63.96	71.96	69.87	73.98

*Cada determinación se realizó por triplicado.; en la tabla se muestra el promedio de las repeticiones y la desviación estándar (σ).

De acuerdo al análisis estadístico se tiene un coeficiente de variación menor al 5%.

Cabe recordar que para fines de desarrollo e implementación inicialmente se trabajo solo con la muestra de frijol cocido para ensayar la metodología propuesta, y así conocer y corregir los posibles imprevistos de ésta; realizando triplicados de cada prueba para cada una de tres muestras empleadas de un mismo lote de frijol cocido.

Posteriormente el frijol crudo se sometió a tratamiento con el procedimiento ya corregido, motivo por el cual, los valores de las desviaciones estándar tienden a ser mayores para las determinaciones realizadas en frijol cocido como se aprecia en la tabla 3.1 con fines comparativos.

3.2. Metodología propuesta.

Una vez caracterizada la muestra mediante el análisis químico proximal, se realizó la identificación y cuantificación de los diferentes carbohidratos presentes, haciendo uso del diagrama propuesto para la caracterización de carbohidratos.

- Cuantificación y caracterización de azúcares.

La extracción y cuantificación de azúcares totales por el método de fenol-sulfúrico no presenta inconvenientes y es altamente reproducible, al igual que en la determinación de azúcares reductores, esto basado en la desviación estándar presentada en la tabla 3.2.

La caracterización realizada por HPLC no presenta interferencias, pero se sugiere un especial cuidado con la temperatura ambiental, la cual afecta principalmente al detector (índice de refracción) afectando las señales del mismo e interfiriendo así con la reproducibilidad en los tiempos de retención de las especies analizadas.

En la caracterización del extracto etanólico mediante HPLC, se identificó y cuantifico: fructosa, glucosa, sacarosa, rafinosa y estaquiosa como se observa en la siguiente tabla.

Tabla 3.2. Caracterización de *extracto etanolico* obtenido de frijol cocido (g componente/ 100 g de muestra) en base seca

Componente	Frijol Cocido
Fructosa	1.28 ± 0.04
Glucosa	2.59 ± 0.09
Sacarosa	1.80 ± 0.06
Rafinosa	0.79 ± 0.03
Estaquiosa	1.08 ± 0.04

*Cada determinación se realizó por triplicado.; en la tabla se muestra el promedio de las repeticiones y la desviación estándar (σ).

De acuerdo al análisis estadístico se tiene un coeficiente de variación menor al 5%.

- Almidón.

El almidón en el frijol es de los principales componentes de los carbohidratos totales presentes (Rehman, *et al.*, 2001).

La extracción de este componente es un punto crítico del esquema de trabajo, debido a que si no se extrae adecuadamente, el contenido de los componentes subsecuentes (hemicelulosa y celulosa) se verá afectado (sobrestimado) esto por las características de los métodos que se emplean en dichas determinaciones.

- Pectinas.

Son detectadas y cuantificadas a partir de la hidrólisis del almidón de acuerdo a la metodología propuesta, la cual se lleva a cabo para disminuir las interferencias ocasionadas por este componente al cuantificar ácidos urónicos por reacción con carbazol. En esta etapa no se tienen consideraciones importantes respecto a su realización.

- Hemicelulosa.

El procedimiento sugerido para la extracción y cuantificación de hemicelulosa no presenta dificultades pero si un punto crítico para las determinaciones subsecuentes: extracción y cuantificación de celulosa y lignina (*en el secado del remanente sólido luego de ser tratado con H₂SO₄ 1M, residuo C*), ya que al ser extracciones secuenciales debe eliminarse el ácido remanente previo al secado del mismo, de otro modo la muestra quedara carbonizada, y la determinación de celulosa posterior ocasionando interferencias en los resultados.

Cabe mencionar que la cuantificación de este componente tiene como premisa mayor, la suposición de que en su estructura, la hemicelulosa más común en las leguminosas, posee pentosas como unidad estructural, considerando que puede tener ramificaciones de unidades glucopiranosilo y/o galactopiranosilo (Shiga & Lajolo, 2006), es por ello que el tratamiento sugerido en la metodología con H₂SO₄ 1M supone la hidrólisis de la hemicelulosa presente en la muestra para así cuantificar el monosacárido producto de dicha hidrólisis; y es por ello que se cuantifica a partir de una curva patrón elaborada con xilosa a una longitud de onda de 480nm, la cual es más específica para pentosas.

- Celulosa y Lignina.

La metodología empleada en la determinación de estos componentes, se basa en la solubilización por hidrólisis de la celulosa. Esto requiere emplear H_2SO_4 a concentraciones elevadas (72%), por ello se sugiere cuidado pertinente en el manejo de material y reactivos debido a la peligrosidad de los mismos.

También se tiene el uso de autoclave, en consecuencia debe tenerse cuidado de no sellar totalmente el material que sea introducido para evitar explosiones.

Una vez hidrolizada la celulosa, se cuantifica sin problemas por el método de fenol-sulfúrico usando glucosa para la curva patrón a una longitud de onda de 490 nm considerada específica para hexosas.

Ya cuantificados los diferentes tipos de carbohidratos presentes en la muestra seca y desengrasada según el esquema de la figura 21, se realiza un balance de masa del cual se deriva el *cálculo* del contenido de *lignina por diferencia*.

Posteriormente, se calculó el contenido de cada uno de los carbohidratos cuantificados a través de la metodología propuesta, en la muestra original; considerando el contenido total de carbohidratos obtenido por diferencia a partir del análisis proximal (tabla 3.1) como se muestra en la tabla 3.3.

Tabla 3.3 Contenido de Carbohidratos en frijol cocido
(g componente/ 100g de muestra original) en base seca.

Componente	Frijol Cocido
Azúcares totales solubles	1.54 ± 0.06
Reductores	0.36 ± 0.01
Almidón	41.87± 0.42
Pectinas	0.68 ± 0.01
Hemicelulosa	18.24 ± 0.38
Celulosa	5.19 ± 0.15
Lignina (por diferencia)	6.47 ± 0.51

*Para cada componente, se realizaron determinaciones por triplicados, a partir de tres muestras.

En la tabla se muestra el promedio de las repeticiones y la desviación estándar (g).
De acuerdo al análisis estadístico se tiene un coeficiente de variación menor al 5%.

Una vez analizada y explicada la metodología propuesta y como se puede observar en la tabla 3.3 todos los componentes son detectados y cuantificados.

Con la finalidad de cotejar la exactitud de la metodología propuesta en la determinación de polisacáridos (almidón, pectinas, hemicelulosa, celulosa) y lignina se determinó fibra dietética (Mañas *et al.*, 1993) y almidón por método enzimático (AOAC, 996.11, 2000) para corroborar el contenido de dichos componentes.

3.3. Métodos de referencia.

En la tabla 3.4 se presenta el contenido de fibra dietética soluble; misma que se divide en azúcares totales que corresponden a polisacáridos de bajo peso molecular solubles, mientras que el ácido galacturónico corresponde al contenido de pectinas; y fibra dietética insoluble dividida en: azúcares totales que involucran el contenido de celulosa y hemicelulosa, y lignina la cual se determina como el residuo sólido y seco luego de la hidrólisis de celulosa y hemicelulosa.

Tabla 3.4. Contenido de fibra dietética soluble e insoluble (Mañas *et al.*, 1993) de frijol cocido (g componente/ 100 g de muestra).

Componente	Frijol Cocido
Fibra soluble	
Azúcares totales	1.90 ± 0.05
Ácido galacturónico	1.01 ± 0.01
Fibra insoluble	
Azúcares totales	13.19 ± 0.24
Lignina	5.78 ± 0.14

*Para cada componente, se realizaron determinaciones por triplicados, a partir de tres muestras.

En la tabla se muestra el promedio de las repeticiones y la desviación estándar (σ). De acuerdo al análisis estadístico se tiene un coeficiente de variación menor al 5%.

Se compararon los resultados obtenidos por ambas metodologías mediante un análisis de varianza (ANOVA) realizado con el programa de estadística: Statistic Package for Social Science (SPSS para Windows, versión 11.0.0), a través del cual se definieron los principales puntos de interferencia presentes en la determinación de los componentes en cuestión: muestra, replicas y métodos.

En la tabla 3.5 se presenta los resultados obtenidos por el método de referencia empleado (Mañas *et al.*, 1993) y la metodología propuesta.

Tabla 3.5 Método enzimático (Mañas *et al.*, 1993) vs Metodología propuesta. Determinación de fibra soluble, insoluble y lignina en frijol cocido (g componente/ 100 g muestra) en base seca.

Componente	Frijol cocido	
	Método enzimático (Mañas <i>et al.</i> , 1993)	Metodología propuesta
Fibra soluble		
Ác. galacturónico (pectinas)	1.01 ± 0.01	0.68 ± 0.01
Fibra insoluble		
Azúcares totales (hemicelulosa y celulosa)	13.19 ± 0.24	23.43 ± 0.47**
** Este valor corresponde a la sumatoria del contenido de celulosa y hemicelulosa de frijol cocido.		
Lignina		
Lignina	*5.78 ± 0.14	6.47 ± 0.51

*Para cada componente, se realizaron determinaciones por triplicados, a partir de tres muestras.

En la tabla se muestra el promedio de las repeticiones y la desviación estándar (g). De acuerdo al análisis estadístico se tiene un coeficiente de variación menor al 5%.

Una vez analizados los datos por el programa SPSS (ANEXO 4), los resultados indican que para el caso de *fibra soluble* en frijol cocido solo hay diferencia significativa entre los *métodos* y no hay interferencia alguna respecto a la muestra empleada y a las replicas realizadas, situación que se mantiene para la *fracción insoluble de la fibra* donde se considera hemicelulosa y celulosa.

Mientras que en el caso de la cuantificación de *lignina* a pesar de que las replicas mostraron una dispersión considerable de acuerdo con la prueba tamiz del programa utilizado para el análisis (SPSS), el análisis de varianza indica que no hay diferencia significativa entre las replicas lo que nos deja nuevamente solo la diferencia entre métodos.

Para el caso de almidón en frijol cocido (tabla 3.6) y respecto al comparativo entre el método de referencia (AOAC, 996.11, 2000) y la metodología propuesta, se encontró diferencia entre métodos y aunque la manipulación al momento de la determinación podría llegar a presentar interferencia se demuestra mediante un análisis de varianza que no hay diferencia significativa respecto a las replicas realizadas. El ANOVA fue igualmente realizado con el programa estadístico SPSS, cuyos resultados se pueden apreciar en el ANEXO 4.

Tabla 3.6 Contenido de Almidón (© Megazyme) vs Metodología propuesta de frijol cocido. (g componente/ 100 g muestra) en base seca.

Muestra \ Método	Método enzimático (AOAC, 996.11,2000)	Metodología propuesta.
Frijol cocido	49.93 ± 0.23	41.87± 0.42

*Para cada componente, se realizaron determinaciones por triplicados, a partir de tres muestras.

En la tabla se muestra el promedio de las repeticiones y la desviación estándar (σ). De acuerdo al análisis estadístico se tiene un coeficiente de variación menor al 5%.

Básicamente se entiende que existe diferencia al cuantificar almidón, pectinas, hemicelulosa, celulosa y lignina, con la metodología propuesta respecto al método de referencia, sin embargo, para fines didácticos la metodología propuesta permite la detección de los componentes, por ello puede ser recomendable.

Con la finalidad de ejemplificar el uso de la metodología propuesta, se analizó haciendo uso de esta el frijol crudo, para observar el comportamiento del contenido de carbohidratos y comparar respecto al frijol cocido. El contenido de almidón, pectinas, hemicelulosa, celulosa y lignina del frijol crudo se cuantificó tanto con la metodología propuesta como por los métodos de referencia para así evaluar si se observan comportamientos similares respecto a lo observado en el frijol cocido.

Una vez desarrollada la metodología antes comentada, se utiliza la información para ejemplificar su uso con fines didácticos dentro de los laboratorios de enseñanza

3.4 Ejercicio didáctico.

Partiendo del análisis proximal, se tiene que a causa del tratamiento térmico (cocción), la disminución observada en el caso del contenido de cenizas y proteína de frijol cocido respecto al de frijol crudo, puede ser debida a la solubilización de los componentes en el agua empleada para el tratamiento, afectando directamente el contenido de carbohidratos calculado por diferencia (tabla 3.1).

En la tabla 3.7 se reporta la caracterización y cuantificación de carbohidratos para el frijol crudo y así mismo se compara con lo obtenido previamente para frijol cocido.

Tabla 3.7 Contenido de Carbohidratos en frijol crudo y cocido
(g componente/ 100g de muestra original) en base seca.

Componente	Frijol Crudo	Frijol Cocido
Azúcares totales solubles	5.74 ± 0.05	1.54 ± 0.06
Reductores	0.19 ± 0.01	0.36 ± 0.01
Almidón	45.98 ± 0.13	41.87± 0.42
Pectinas	0.13 ± 0.01	0.68 ± 0.01
Hemicelulosa	10.17 ± 0.18	18.24 ± 0.38
Celulosa	4.66 ± 0.15	5.19 ± 0.15
Lignina (por diferencia)	5.29 ± 0.27	6.47 ± 0.51

*Para cada componente, se realizaron determinaciones por triplicados, a partir de tres muestras.

En la tabla se muestra el promedio de las repeticiones y la desviación estándar (σ). De acuerdo al análisis estadístico se tiene un coeficiente de variación menor al 5%.

Al respecto se tiene como efecto de la cocción el contenido de azúcares solubles se ve disminuido drásticamente de 5.74 % en frijol crudo a 1.54% en frijol cocido, posiblemente porque los azúcares se solubilizan fácilmente en el agua de cocción generando así la baja en el contenido de estos para frijol cocido. En el caso de azúcares reductores se observa un incremento del doble del estado crudo (0.19 %) al cocido (0.36 %) en la concentración; lo que se relaciona directamente con la posible hidrólisis de algunas estructuras, esto debido a que por el efecto de la cocción algunos granos del frijol se rompen liberando su contenido, exponiendo el resto de los carbohidratos como los oligosacáridos y el almidón principalmente, mismos que por las condiciones de pretratamiento y almacenamiento pudieron sufrir hidrólisis, liberando así monosacáridos que presentan propiedades reductoras contribuyendo al aumento en frijol cocido.

➤ La caracterización de azúcares solubles

El contenido de azúcares libres fue bajo en el frijol cocido por merma de los mismos en el agua de cocción lo que se refleja en el contenido de azúcares totales solubles que se observa en la tabla 3.7; sin embargo, el efecto térmico al que fue sometido el frijol favorece: la ruptura del grano, la exposición de poli y oligosacáridos y a su vez la hidrólisis de especies como rafinosa y estaquiosa, las cuales presentan en su estructura unidades de sacarosa y ya sea por calentamiento, pequeñas cantidades de ácido presente en la matriz o el propio incremento de la temperatura se provoca la hidrólisis de dichas especies, liberándose principalmente D-glucosa y D-fructosa lo que se refleja en el incremento de azúcares reductores en el frijol cocido que es de 0.36% mientras que en el frijol crudo solo era del 0.19 %.

Se observa en la tabla 3.8 para los α – galactosacáridos, el contenido de rafinosa aumenta de 0.46 % en frijol crudo a 0.79 % en frijol cocido, mientras se observa una baja en el contenido de estaquiosa de 1.88 % en frijol crudo a 1.08% en frijol cocido, efecto posiblemente causado por la hidrólisis parcial de la estaquiosa a causa de la cocción (Abdel-Gawad, 1993) lo cual involucra la liberación de una molécula de galactosa y de rafinosa a partir de una de estaquiosa.

Tabla 3.8 Azúcares en frijol crudo y cocido (g componente/ 100 g de muestra)
base seca

Componente	Frijol Crudo	Frijol Cocido
Fructosa	0.12 ± 0.01	1.28 ± 0.04
Glucosa	2.42 ± 0.12	2.59 ± 0.09
Sacarosa	2.97 ± 0.14	1.80 ± 0.06
Rafinosa	0.46 ± 0.02	0.79 ± 0.03
Estaquiosa	1.88 ± 0.09	1.08 ± 0.04

*Para cada componente, se realizaron determinaciones por triplicados, a partir de tres muestras.

En la tabla se muestra el promedio de las repeticiones y la desviación estándar (σ).
De acuerdo al análisis estadístico se tiene un coeficiente de variación menor al 5%.

Ahora bien, si los oligosacáridos sufren hidrólisis parcial con la consecutiva pérdida de moléculas de galactosa, se incrementa la presencia de moléculas de sacarosa, mismas que a su vez se hidrolizan obteniéndose moléculas de glucosa y fructosa; por tanto, el incremento en la concentración de fructosa se relaciona con la hidrólisis de la sacarosa, al igual que para la glucosa.

Sin embargo, para la detección de glucosa se tiene interferencia de las moléculas de galactosa liberadas por la hidrólisis parcial de los oligosácaridos ya que tanto la galactosa como la glucosa presentan tiempos de retención similares razón por la cual se traslapan las señales en los cromatogramas (ANEXO 29, en consecuencia, si hay moléculas de galactosa libres, éstas se identifican junto con la glucosa, sobreestimando así la concentración de ésta en el frijol cocido.

El contenido de almidón no es afectado de manera significativa por la cocción del frijol; mientras que en frijol crudo se tiene el 45.98 %, en frijol cocido disminuye el contenido a 41.87 %, cuantificado por reacción con yodo (metodología propuesta); se aprecia una pérdida de alrededor del 9 %, que teóricamente debe encontrarse en el agua de cocción, ya que está se llevó a cabo en una olla de presión y a temperatura de ebullición, recordando que, al calentarlos con agua, los granulos del almidón se hinchan y revientan a partir de una temperatura de 70 °C solubilizandose así el almidón (Kirk, 1996), por ello, se tienen condiciones óptimas para la gelatinización del almidón, ésta no puede ser completa ya que el almidón se encuentra en el endospermo del grano en su mayoría (Serna,1996), y se cocinaron los granos enteros pero con la ruptura de algunos de ellos, el almidón presente se expone y facilita su solubilización pudiendo así causar la disminución del contenido promedio de almidón en frijol cocido.

La conjunción de temperatura de ebullición y presión sobre el grano de frijol favorece la desestabilización en la estructura de la pared celular permitiendo el paso de agua y favoreciendo la solubilización de las pectinas presentes en la pared (Shiga & Lajolo, 2006). Basado en lo anterior, se puede relacionar el incremento observado en el contenido de pectinas de 0.13% a 0.68% en frijol crudo y cocido respectivamente.

El aumento aparente en la concentración de hemicelulosa, cuantificado según la metodología propuesta en frijol cocido (18.24 %) respecto de frijol crudo (10.17 %), y en general de los componentes de la pared celular se debe a la pérdida de rigidez y degradación por efecto de la temperatura y presión implicadas en el procedimiento de cocción (Shiga & Lajolo, 2006), motivo por el cual la extracción de la hemicelulosa se favorece en la muestra de frijol cocido.

El contenido de celulosa aumenta un 10% en frijol cocido respecto del frijol crudo, ya que se tiene un contenido de 5.19 % en frijol cocido mientras que en el crudo se tiene 4.66 %, esto guarda relación con que la celulosa es de las estructuras más estables y resistentes que existen en la naturaleza, el proceso de cocción como ya se comentó con anterioridad, solo tiende a hacer más disponibles dichas estructuras; por lo tanto hay que considerar que la metodología propuesta sugiere una serie de separaciones parciales, es decir, a lo largo de los procedimientos secuenciales que se proponen se entiende que si la hemicelulosa no fue debidamente extraída, el remanente quedara presente en la solubilización de la celulosa (por hidrólisis) sobreestimando el contenido de la misma, lo cual puede explicar ese aumento del 10 % en la concentración de este componente de un estado cocido respecto del crudo.

El contenido de lignina al igual que el de celulosa debería ser igual tanto en frijol crudo como en frijol cocido debido a las características que poseen; sin embargo, la diferencia que se observa en la concentración de lignina en ambas muestras, a pesar de no ser importante, refleja el efecto de manipulación a lo largo de todas las pruebas realizadas.

Hay que recordar, en primer lugar, que la cuantificación de lignina se realizó por diferencia luego de la cuantificación de los componentes asociados y carbohidratos anteriormente discutidos, y segundo que fue con la muestra de frijol cocido que se realizaron las pruebas para corrección del esquema de trabajo sugerido. Como se observa en la tabla 3.6, el contenido de lignina va de 5.29 % en frijol crudo a 6.47% en frijol cocido, sin embargo, la desviación estándar en el caso del frijol cocido es aproximadamente del doble respecto al crudo, lo que representa el error acumulado de todas las determinaciones realizadas ya que, al ser subsecuentes están íntimamente relacionadas.

Basado en otras investigaciones realizadas (Shiga & Lajolo, 2006), (Rehman *et al.*, 2001) se sabe que la concentración de los componentes que forman parte de la pared celular no son gravemente afectados por efecto de la cocción, las consecuencias de este tratamiento están dirigidas a la disponibilidad de los componentes facilitando su aislamiento y detección, misma que generalmente se relaciona con la cuantificación de los monómeros que constituyen a cada componente (Southgate, 1991) situación que se observa en el caso de hemicelulosa, celulosa y lignina.

Ahora bien, se realiza la cuantificación del contenido de almidón pectinas, hemicelulosa, celulosa y lignina en frijol crudo y cocido por métodos enzimáticos (de referencia) los resultados obtenidos se presentan en la tabla 3.9 para el contenido de fibra dietética y en la tabla 3.10 para el de almidón. Así mismo, se compara respecto a lo obtenido por la metodología propuesta.

Tabla 3.9 Método enzimático (Mañas *et al.*, 1993) vs Metodología propuesta. Determinación de fibra dietética en frijol crudo y cocido (g componente/ 100 g muestra) en base seca.

	Frijol crudo		Frijol cocido	
Componente	Método enzimático	Metodología propuesta	Método enzimático	Metodología propuesta
Fibra soluble				
Ác. galacturónico (pectinas)	0.25 ± 0.004	0.13 ± 0.01	1.01 ± 0.01	0.68 ± 0.01
Fibra insoluble				
Azúcares totales	16.89 ± 0.23	**14.83 ± 0.23	13.19 ± 0.24	**23.43 ± 0.47
Lignina	7.86 ± 0.12	5.29 ± 0.27	5.78 ± 0.14	6.47 ± 0.51

** Este valor corresponde a la sumatoria del contenido de celulosa y hemicelulosa de frijol crudo y cocido.

Se realizaron determinaciones por triplicados, a partir de tres muestras.

En la tabla se muestra el promedio de las repeticiones y la desviación estándar (σ).

De acuerdo al análisis estadístico se tiene un coeficiente de variación menor al 5%.

Al respecto se tienen como cambios debidos a la cocción, un decremento en el contenido de los componentes de la fibra insoluble en el frijol cocido y un incremento en el contenido de fibra soluble de la misma muestra.

En el caso de la fracción soluble se compara principalmente el contenido de pectinas, aparentemente se tiene el mismo comportamiento en los contenidos determinados por las dos metodologías.

Sin embargo, se puede apreciar en la tabla 3.9 que el contenido obtenido a partir de la metodología propuesta es subestimado tanto en frijol crudo como en cocido, circunstancia que indica que la metodología propuesta no es exacta en la determinación del contenido de pectinas, pero se puede establecer como característica de la propuesta niveles de detección para el componente en cuestión, asegurando que si el contenido de material péctico es mayor o igual a 0.13%, éste puede ser detectado haciendo uso de la metodología propuesta.

En lo referente a la fracción insoluble cuantificada por el método de referencia, se observa una baja en el contenido de éste material en frijol cocido, posiblemente causada por la ruptura de algunos granos por efecto de la temperatura y presión empleadas en la cocción; por ello, el material insoluble podría quedar suspendido en el agua del tratamiento y por lo tanto no se recupera completamente, lo cual representa mermas del tratamiento y manejo, así mismo se evidencia una sobreestimación en el contenido del material insoluble cuantificado por la metodología propuesta, la cual podría atribuirse al manejo de la muestra, sobre todo en la extracción de los componentes, recordando que es con la muestra de frijol cocido que se prueba la metodología propuesta.

Para complementar, se determina si hay diferencia significativa entre los métodos, muestra y/o replicas en el caso de frijol crudo, lo cual se hace a través de un análisis de varianza igual a como se realizó para frijol cocido (ANEXO 4).

Como resultado se determinó que en la cuantificación de la fracción soluble solo hay diferencia entre los métodos de detección, con interferencia de las replicas realizadas; mientras que para la fracción insoluble, considerada como hemicelulosa, celulosa y lignina hay diferencia entre métodos y entre las replicas realizadas. Lo anterior indica lo importante que es un manejo adecuado de la muestra cuando se aplica la metodología propuesta.

Se presenta en la tabla 3.10 el contenido de almidón en frijol crudo y en cocido observándose que los valores obtenidos del método enzimático son mayores que los obtenidos por la metodología propuesta, señalando una subestimación del 18 % en el contenido del polisacárido cuantificado mediante los procedimientos sugeridos.

Tabla 3.10 Contenido de Almidón de frijol cocido y crudo.
(g componente/ 100 g muestra) en base seca.
© Megazyme vs Metodología propuesta

Muestra \ Método	Método enzimático (AOAC, 996.11,2000)	Metodología propuesta.
Fríjol crudo	55.90 ± 0.13	45.98 ± 0.13
Fríjol cocido	49.93 ± 0.23	41.87± 0.42

Se realizaron determinaciones por triplicados, a partir de tres muestras.

En la tabla se muestra el promedio de las repeticiones y la desviación estándar (σ).

De acuerdo al análisis estadístico se tiene un coeficiente de variación menor al 5%.

El uso de enzimas en el método de referencia hace que éste sea altamente específico, por ello se cuantifica el almidón total (incluso el almidón resistente) presente en la muestra mientras que en la metodología propuesta la cuantificación depende de una extracción adecuada del componente seguida de una reacción química lo que sugiere menor especificidad, motivo por el cual se puede tener la subestimación antes comentada, pero a pesar de ello la detección del almidón mediante la metodología propuesta mantiene la didáctica necesaria incluso para explicar parte del procedimiento realizado el método enzimático.

De acuerdo con el planteamiento inicial del proyecto se diseñó un protocolo experimental que pueda ser implementado en un laboratorio de enseñanza, motivo por el cual, se presenta a continuación una propuesta de dicho protocolo, el cual corresponde a la integración de todas las partes que conforman el presente trabajo.

ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN.

ENUNCIADO PROBLEMA

Indicar el tipo y la concentración de cada uno de los carbohidratos presentes en la muestra.

PROCEDIMIENTO.

PRIMERA ETAPA. Realizar ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL de la muestra.

SEGUNDA ETAPA. Fraccionación y cuantificación de carbohidratos.

1. Coloque en un sistema de reflujo 2 g de muestra desengrasada con 100 mL de etanol al 80%, durante 1 h.

Recupere el material insoluble (**residuo 1**) por centrifugación y coloque en un vidrio de reloj o caja petri de vidrio a peso constante, seque en estufa a 100°C y pese. Someta a secado hasta obtener peso constante.

2. En el **sobrenadante**, realice las siguientes determinaciones:
 - a) **Reacción de fenol-sulfúrico.**
 - b) **Reacción con Trifeniltetrazolio.**
 - c) **HPLC**

3. En el **residuo insoluble en etanol** seco:

3 a) Coloque 0,2 a 0,5 g del residuo seco en un matraz Erlenmeyer y adicione 5 mL de solución de hidróxido de sodio 2M, agite hasta homogenizar, neutralice con solución de ácido clorhídrico 2M, verifique que el pH se encuentre en $7 \pm 0,5$, coloque en un baño de agua a ebullición durante 10 min y traslade a una autoclave a 120 °C por 1 hr, deje enfriar, separe el material insoluble (**residuo 2**) por centrifugación y realice lavados con agua caliente, transfiera cuantitativamente el sobrenadante y el agua de los lavados a un matraz aforado de 25 o 50 mL, lleve a la marca con el agua destilada. Coloque el residuo 2 en un vidrio de reloj o caja petri de vidrio, seque en estufa a 100°C hasta peso constante.

3 b) Realice la reacción con yodo en el extracto aforado.

3.1 Coloque 5 mL del mismo filtrado en un tubo de ensaye y adicione 1 mL de solución de amilasa fungica (25 mg/ mL) mantenga la solución a 60 °C. Al mismo tiempo prepare un tubo control con agua destilada y amilasa, sometido a las mismas condiciones.

3.1 a) Realice reacción con carbazol para detección de ácido urónicos.

3 En el **residuo 2** seco:

Coloque en un sistema de reflujo 0.5 g del residuo 2 con 50 mL de H₂SO₄ 1 M, durante 2 hr. Por centrifugación separe el sobrenadante y **realice reacción de fenol – sulfúrico (480 nm)**. Lave el material insoluble (**residuo 3**) con agua destilada hasta pH 7 ± 0.5 y colóquelo en un vidrio de reloj o caja petri de vidrio a peso constante, seque en estufa a 100°C y pese. Someta a secado hasta peso constante.

4 En el **residuo 3** seco:

Coloque 0.1 - 0.2 g con 10 mL de H₂SO₄ al 76 % durante una hora a 30°C, seguido de 1 hr en autoclave (120°C), deje enfriar y reposar por 24 hrs en refrigeración, separe el liquido por centrifugación. **Realice reacción de fenol – sulfúrico (490 nm)**.

Coloque todos los resultados en una tabla, reportando el **porcentaje** de cada componente **en 100 g de carbohidratos en base seca**.

CUESTIONARIO

Considerando solo los resultados del análisis de los otros componentes de la muestra (humedad, cenizas totales, proteína cruda y grasa cruda) del análisis proximal.

1. ¿Qué tipo de carbohidratos se están evaluando a través del cálculo “por diferencia”?
2. ¿Cuál es la cantidad de carbohidratos presente en su muestra problema original calculándolos “por diferencia”? Incluya los cálculos.

Considerando todos los resultados del análisis de carbohidratos

3. ¿La suma de estos componentes da 100%? ¿Por qué?
4. ¿Qué componente asociado a carbohidratos de la fibra se encuentra en el residuo resistente a todos los tratamientos realizados? ¿Cómo se cuantifica?
5. Realice un balance de materia para la fracción de carbohidratos, relacionando cada uno de los componentes cuantificados con la cantidad de carbohidratos presentes en su muestra problema, calculado “por diferencia” a partir del análisis proximal. Incluya cálculos.

Coloque todos los resultados en una tabla, reportando el **porcentaje** de cada componente **en 100 g de muestra original en base seca**.

Considerando la extracción de carbohidratos.

6. ¿Qué clase de carbohidratos se evalúan en el residuo insoluble en etanol?
7. Además de los carbohidratos ¿qué otros componentes se encuentran presentes en el residuo insoluble?
8. ¿Qué clase de carbohidratos se evalúan en el residuo insoluble en agua caliente?

Método de fenol-sulfúrico.

1. ¿Cuál es el fundamento de la determinación con el método de fenol-sulfúrico?, ¿Qué reacciones se llevan a cabo? ¿Qué tipo de carbohidratos se evalúan por este método?

Método de Trifeniltetrazolio.

2. ¿Cuál es el fundamento de la determinación con el método de trifeniltetrazolio?, ¿Qué tipo de carbohidratos se evalúan por este método?
¿Qué otros métodos se pueden utilizar?

HPLC.

3. ¿Qué tipo de carbohidratos se pueden detectar por cromatografía HPLC?
¿Cuáles se encontraron en la muestra? ¿En que se basa su detección?
Explique ampliamente.
4. ¿Cuál es la concentración de los carbohidratos detectados? Incluya cálculos.

Método de reacción con yodo

5. ¿Cuál es el fundamento de la reacción colorida con yodo?, ¿Qué tipo de carbohidratos se evalúan por este método?

Método de reacción con carbazol.

6. ¿Qué carbohidratos no reaccionan con yodo y se encuentran en el residuo insoluble en etanol? ¿Cómo se cuantifican?
7. ¿Cuál es el fundamento de la reacción con carbazol?, ¿Qué tipo de carbohidratos se evalúan con este método?
8. ¿Cuál es la concentración? Incluya cálculos.

Cuantificación de componentes de la fibra.

1. ¿Cuál es la diferencia entre fibra cruda y fibra dietética? ¿Qué métodos son los más utilizados para su cuantificación?
2. ¿Qué tipo de carbohidratos se consideran parte de la fibra?, ¿Cuáles son y como pueden clasificarse?, ¿Cuál es su concentración en la muestra?
Incluya cálculos.

3. ¿Cuál es el fundamento de la metodología empleada para la cuantificación de los componentes de la fibra?
4. ¿Cuál es el contenido de “fibra” en la muestra problema? A partir de los componentes cuantificados ¿Cómo se calcula?

TERCERA ETAPA. Resolución del problema.

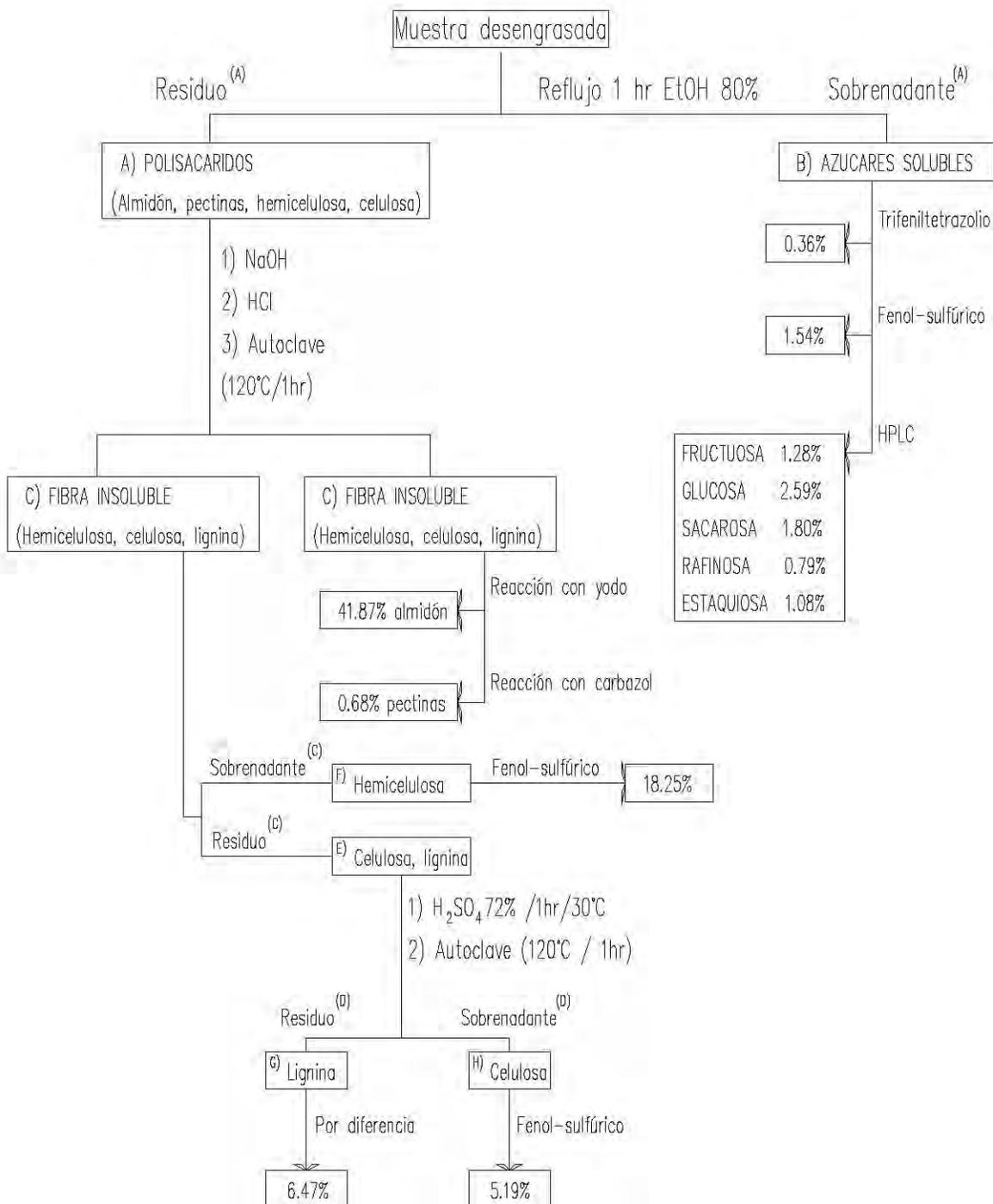
ENUNCIADO PROBLEMA

Indicar el tipo y la concentración de cada uno de los carbohidratos presentes en la muestra.

1. ¿Qué **carbohidratos** se encuentran en la muestra?
2. ¿La muestra contiene azúcares reductores? ¿cuáles podrían ser estos componentes? Explique
3. ¿La muestra contiene α – galactosacáridos? ¿Cuáles son? ¿Cuál es su concentración en la muestra? Incluya cálculos.
4. ¿La muestra contiene almidón? Explique
5. ¿La muestra contiene pectinas? Explique
6. ¿Qué otros polisacáridos contiene la muestra? Explique
7. De acuerdo con el procedimiento seguido, indique en las casillas con letra (A.....H) que carbohidratos se están determinando; y en las casillas en blanco del siguiente esquema, en que concentración se encuentran en la muestra original.
8. ¿Existen otro tipo de carbohidratos que no se indiquen en el esquema? Justifique su respuesta.

A continuación se presenta el uso de un diagrama para resumir la información obtenida a partir del uso del protocolo propuesto, utilizando los resultados obtenidos respecto a la caracterización de carbohidratos en el frijol cocido.

PROTOCOLO PROPUESTO



CONCLUSIONES.

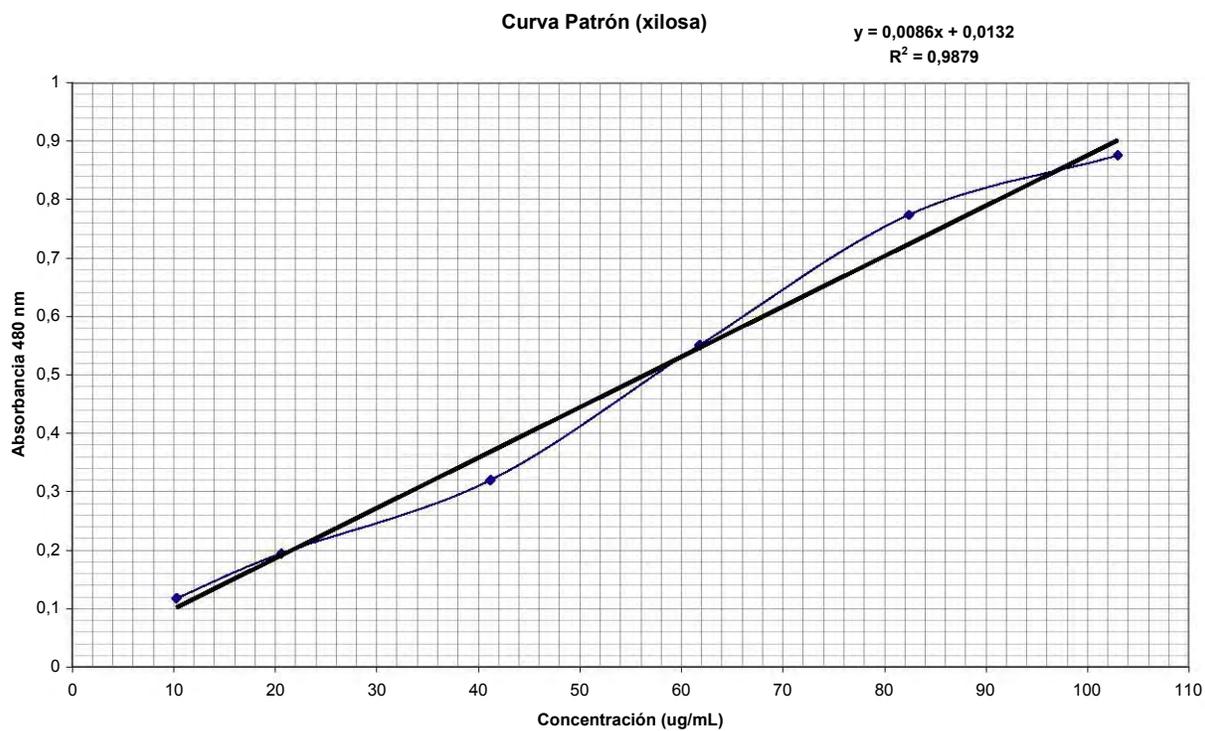
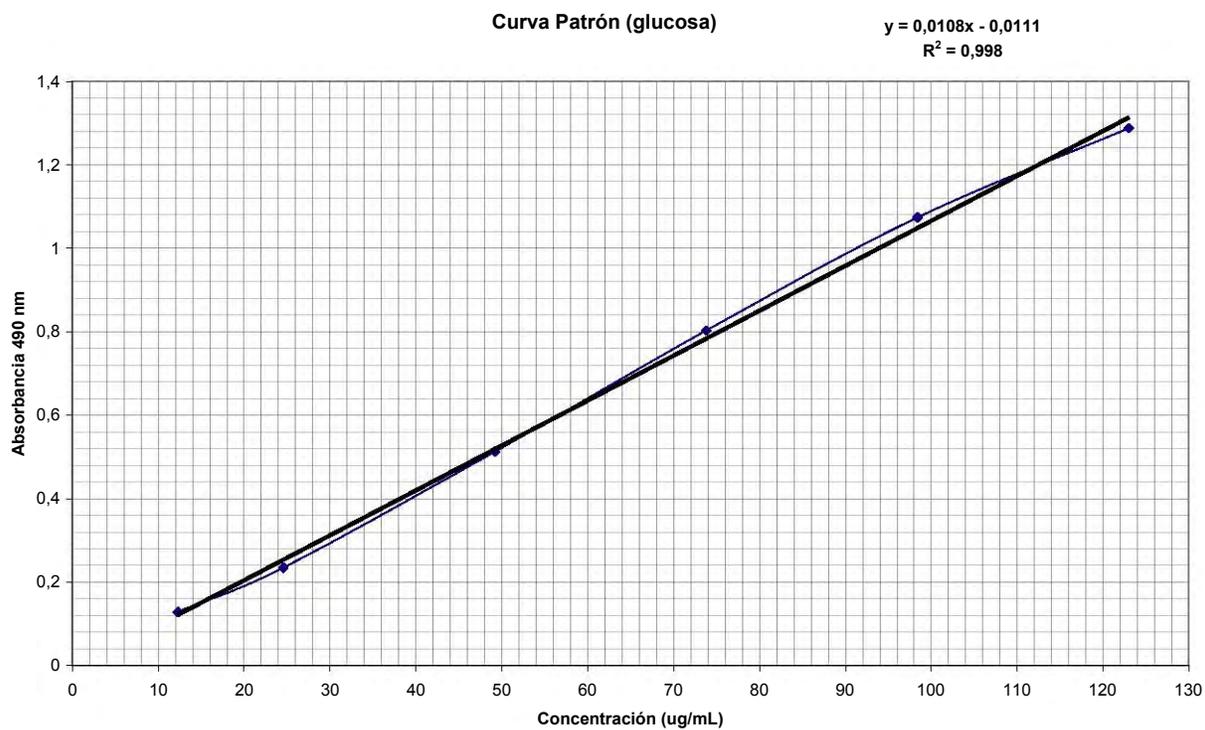
- Se cuantificaron los principales carbohidratos presentes en frijol crudo y cocido (azúcares solubles, reductores, almidón) y los componentes que forman parte de la fibra: pectinas, hemicelulosa, celulosa y lignina mediante la metodología propuesta.
- El proceso secuencial de solubilidad utilizado para la extracción y cuantificación de los carbohidratos contenidos en las muestras permitió el aislamiento adecuado de los mismos.
- Se compararon estadísticamente los resultados obtenidos a partir de la metodología propuesta con los obtenidos mediante métodos oficiales.
- A pesar de las diferencias que se observan entre los resultados obtenidos de las metodologías comparadas, queda la posibilidad de emplear los procedimientos sugeridos con fines didácticos, ya que:
 - A falta de metodologías de referencia para varios de los diferentes tipos de carbohidratos, el modelo propuesto nos sirve como instrumento para conocer el contenido aproximado de éstos en una muestra.
 - A diferencia de los métodos enzimáticos, los sugeridos en éste trabajo desglosan cada componente poniendo en evidencia características esenciales de los mismos, facilitando su estudio, conocimiento y comprensión.

- El análisis proximal de la harina de frijol crudo y la de frijol cocido presentan un alto contenido de carbohidratos de 71.96 % y 73.98 % respectivamente.
- El almidón es la fracción mayoritaria de los carbohidratos analizados tanto en frijol crudo como en cocido.
- Por efecto de la cocción:
 - Se facilita la disponibilidad para extracción y cuantificación de polisacáridos como pectinas, hemicelulosa y celulosa.
 - el 74 % de los azúcares libres presentes en el frijol crudo aparentemente son solubilizados en el agua empleada para el proceso.
- Basado en el análisis de varianza se concluye que
 - Existe diferencia significativa entre los métodos empleados; es decir, la cuantificación de fibra soluble, insoluble, lignina y almidón varia dependiendo del método, (propuesto o de referencia) que se emplee para su determinación.
 - En el caso del contenido de almidón, se observa diferencia significativa solo entre el método propuesto y el valorado para la obtención del contenido de almidón presente tanto en frijol crudo como en cocido.

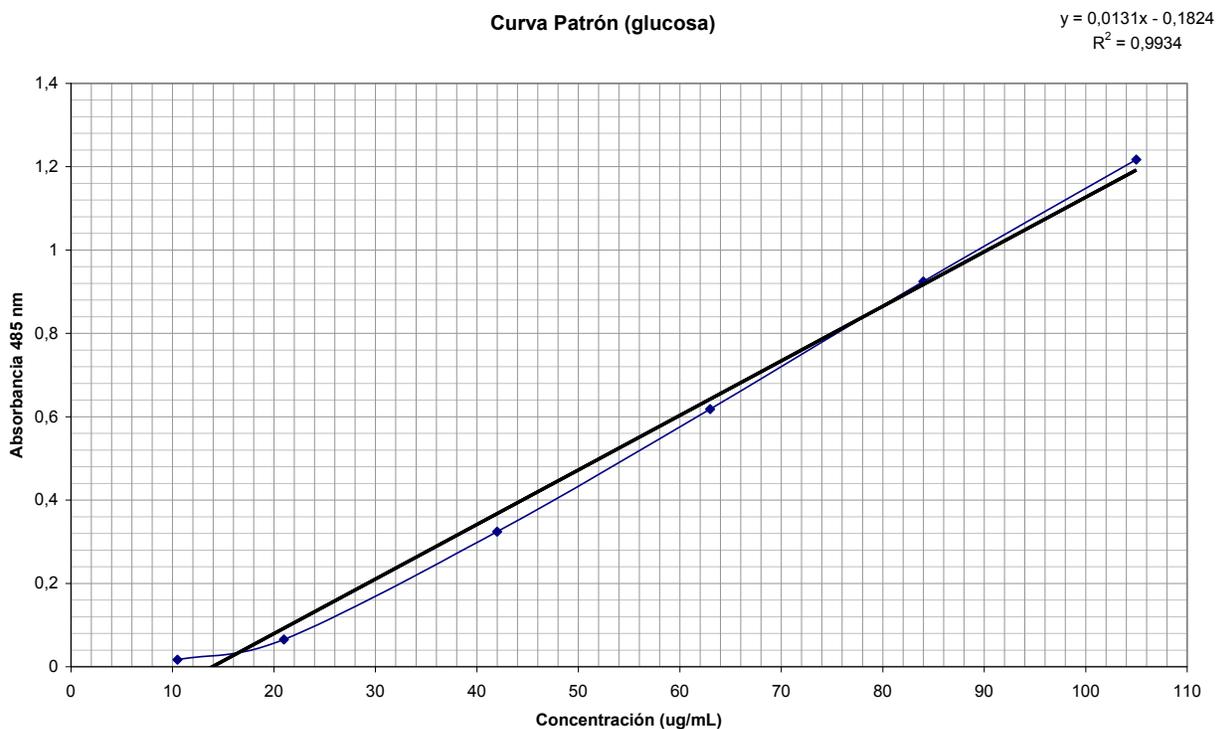
COCLUSIONES

- Se presentan diferencias significativas entre las replicas realizadas en la cuantificación de la fracción insoluble y de lignina en el fríjol crudo; sin embargo, las replicas corresponden a una variable altamente sensible, mismas que aunque no siempre presenten diferencias significativas entre sí, afectan las diferencias entre los métodos comparados, y son las replicas las que dan indicios de la manipulación de una muestra durante su análisis.
- El fríjol permite ser utilizado como modelo didáctico experimental en el área de alimentos.

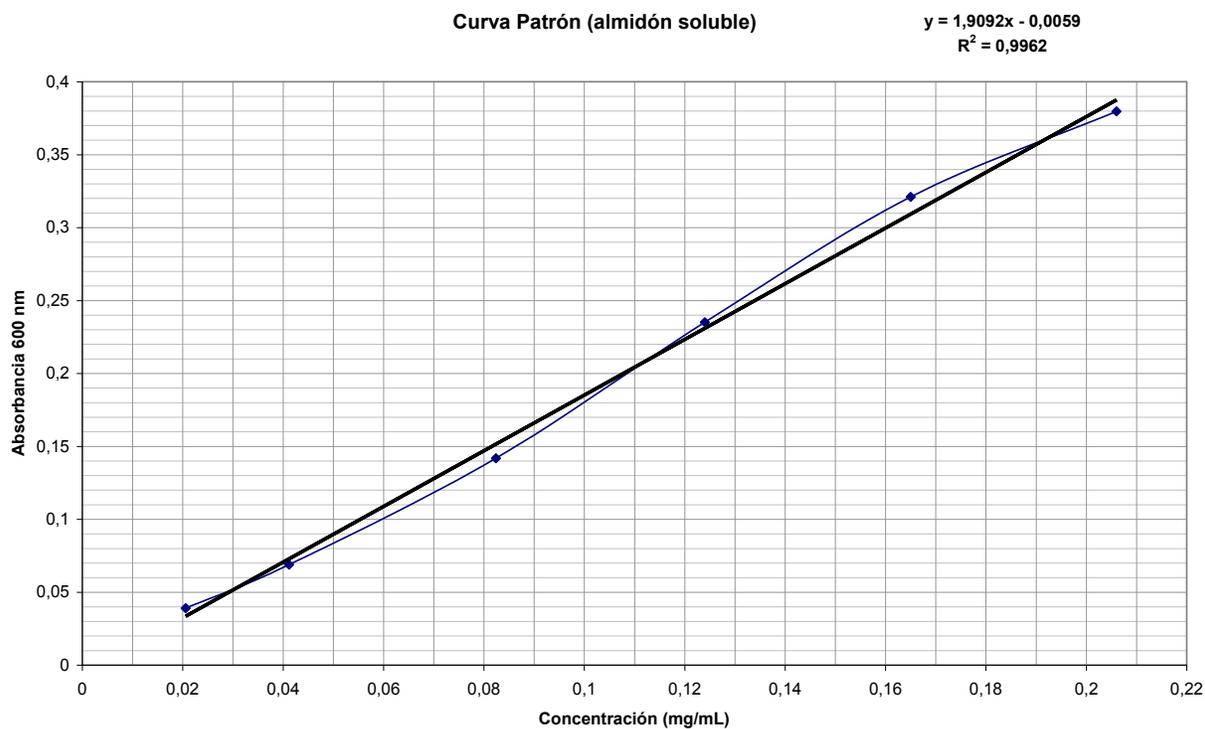
1 Curvas patrón del método de fenol sulfúrico.



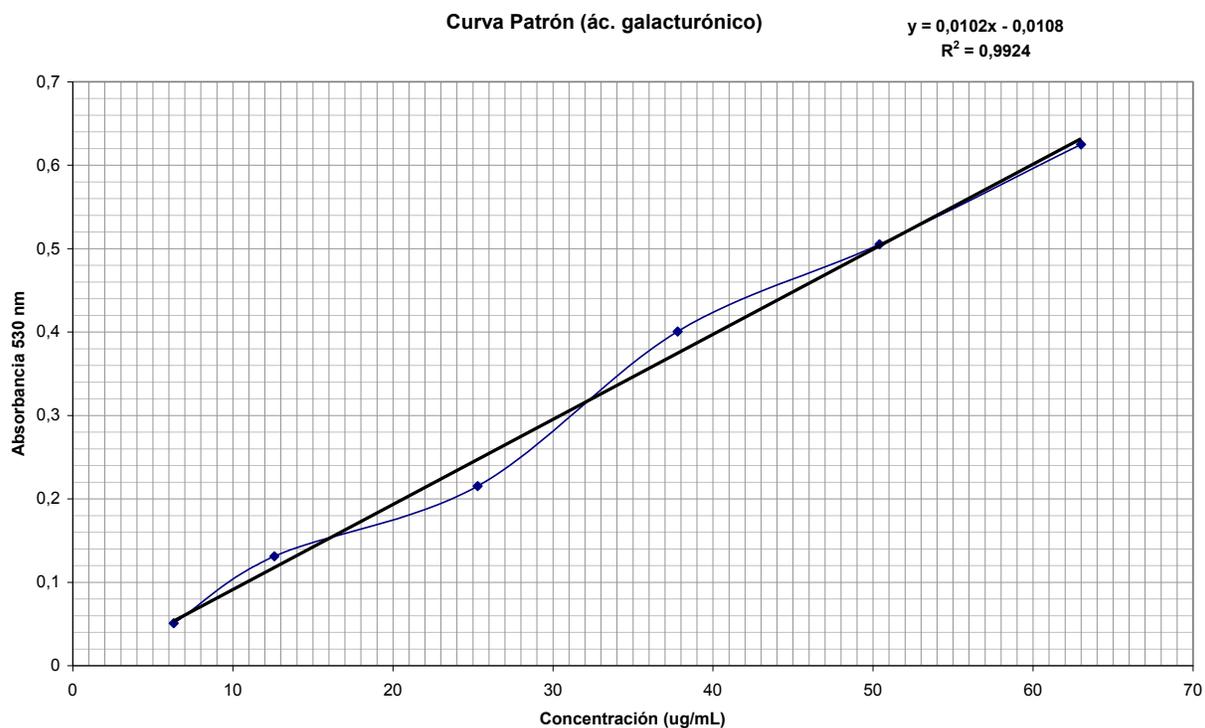
2 Curva patrón método de trifeniltetrazolio (Glucosa, 485 nm).



3 Curva patrón método de reacción con yodo (Almidón soluble, 600 nm).



4 Curva patrón método de reacción con carbazol (Ácido galacturónico, 530 nm).



Todas las curvas son lineales con valores de R^2 desde 0.9879 hasta 0.9980, por ello se utiliza la ecuación de la recta para calcular la concentración de carbohidratos (azúcares libres y polisacáridos).

$$y = mX + b$$

Donde y = absorbancia

X = concentración

b = ordenada

m = pendiente de la curva

Despejando: $X = (y + b) / m$

En el caso particular de los polisacáridos, una vez calculada la concentración a partir de la curva patrón, adicionalmente se multiplica por 0.9. Éste factor representa, en función del peso molecular, la equivalencia entre el estándar utilizado y el polímero que se cuantifica.

Dado que la reacción de hidrólisis de polisacáridos da como resultado n monómeros que lo conforman y la pérdida de $n - 1$ moléculas de agua, se obtiene un factor que en la medida que aumenta el tamaño del polímero tiende a ser 0.9. Se puede utilizar siempre y cuando la curva patrón se haga con los monómeros correspondientes.

Por ejemplo:

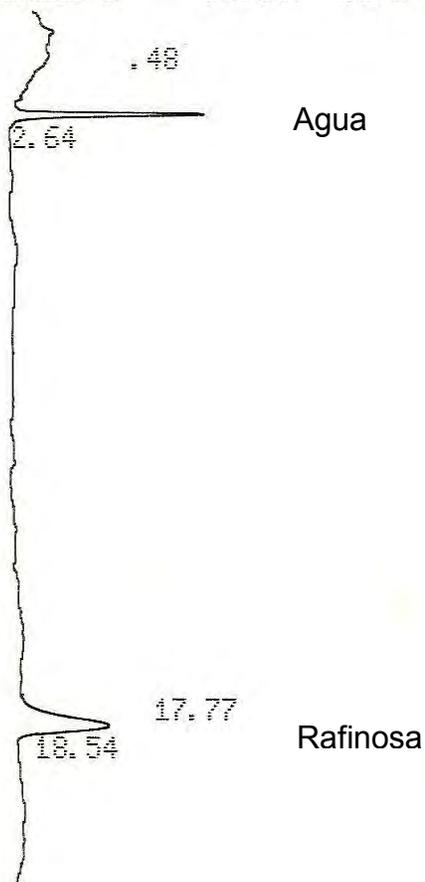
Para una solución de maltotriosa (glucosa-glucosa-glucosa) el resultado a partir de una curva patrón de glucosa debe multiplicarse por 0.933, que resulta de dividir 504 (peso molecular del trisacárido) entre 540 (peso molecular de la glucosa multiplicado por 3 moléculas de glucosa).

ANEXO 2

Cromatogramas obtenidos a partir del análisis del extracto etanólico por HPLC.

- Rafinosa 2mg/mL**

CHANNEL A INJECT 28/04/08 18:05:32

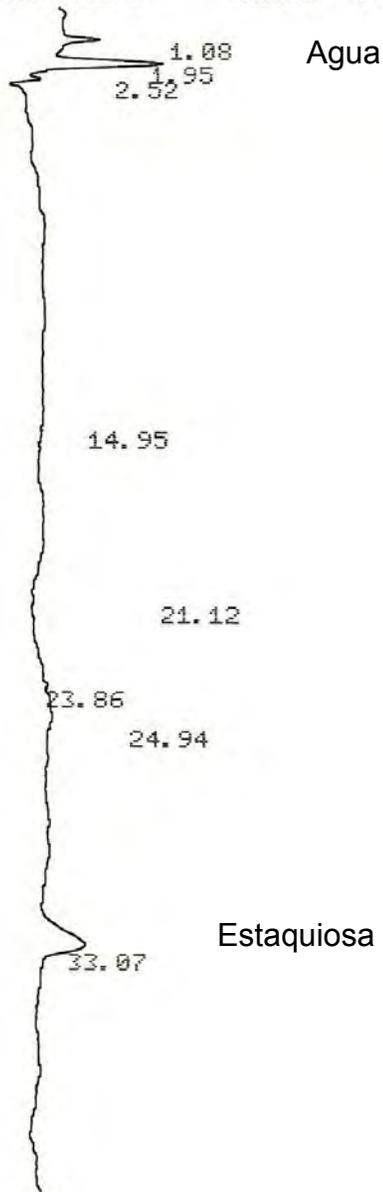


28/04/08 18:05:32 CH= "A" PS= 1.

FILE	1.	METHOD	0.	RUN	4	INDEX	4
PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC			
1	32.764	0.48	103646	02			
2	26.136	2.64	82679	03			
3	41.1	18.54	130016	01			
TOTAL	100.		316341				

• **Estaquiosa 1.55 mg/mL**

CHANNEL A INJECT 28/04/08 18:29:19



28/04/08 18:29:19 CH= "A" PS= 1.

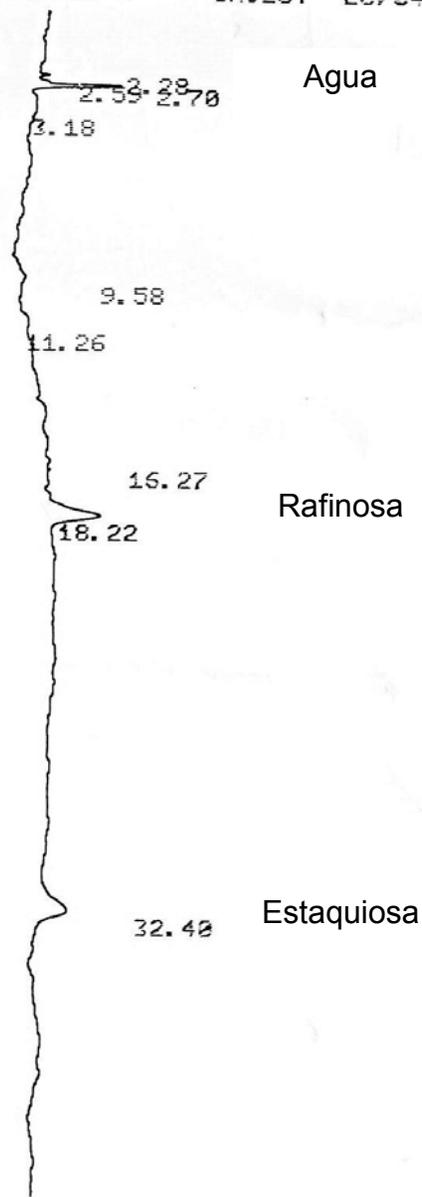
FILE	1.	METHOD	0.	RUN	5	INDEX	5
PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC			
1	7.236	1.08	21006	01			
2	40.302	1.95	116997	01			
3	3.689	2.52	10710	01			
4	0.587	23.86	1704	01			
5	6.462	24.94	18760	01			
6	41.724	33.07	121127	01			

Area BC
Total 100 = ... = 290304

• **Rafinosa (1mg/ml) – Estaquiosa (1mg/ml)**

CHANNEL A INJECT 28/04/08 19:14:09

Engle - 100

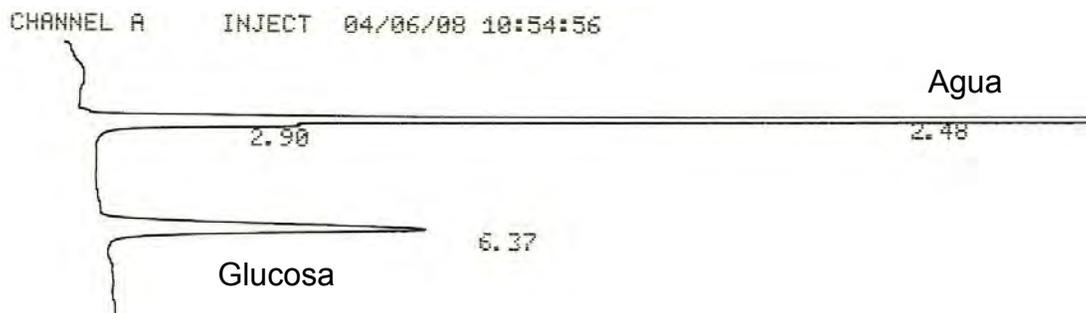


28/04/08 19:14:09 CH= "A" PS= 1.

FILE	1.	METHOD	0.	RUN	6	INDEX	6
PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC			
1	0.0000	2.59	23366	01			
2	0.0000	2.70	30664	02			
3	0.0000	3.18	26916	03			
4	0.0000	9.58	12001	04			
5	0.0000	11.26	28706	05			
6	0.0000	16.27	111810	06			
7	0.0000	18.22	120606	07			
8	0.0000	32.40	44170	08			
TOTAL	100.		459608				

ANEXO 2

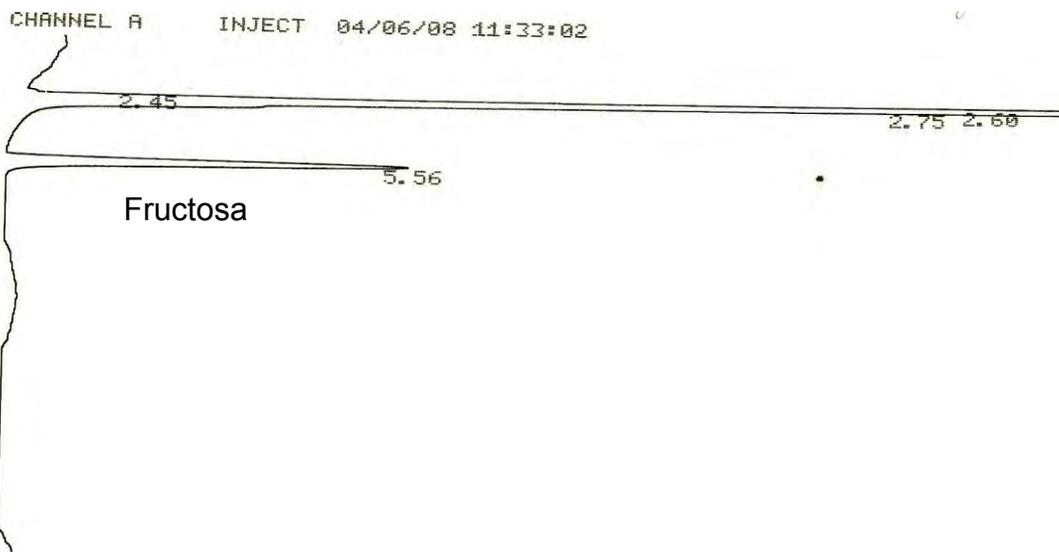
• **Glucosa 2.05 mg/mL**



04/06/08 10:54:56 CH= "A" PS= 1.

FILE	1.	METHOD	0.	RUN	2	INDEX	2
PEAK#		AREA%	RT	AREA	BC		
1		75.193	2.48	1663174	02		
2		5.088	2.9	112539	03		
3		19.719	6.37	436158	01		
TOTAL		100.		2211871			

• **Fructosa 2.3 mg/mL**



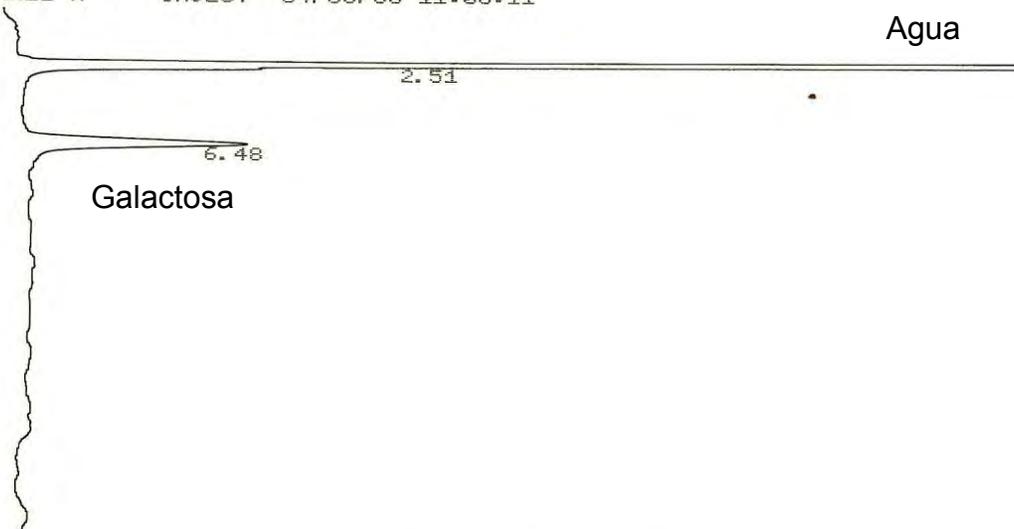
04/06/08 11:33:02 CH= "A" PS= 1.

FILE	1.	METHOD	0.	RUN	4	INDEX	4
PEAK#		AREA%	RT	AREA	BC		
1		0.111	2.45	3134	02		
2		47.503	2.75	1336181	02		
3		33.841	2.60	951908	03		
4		18.545	5.56	521638	01		
TOTAL		100.		2812861			

ANEXO 2

• **Galactosa 2.0 mg/mL**

CHANNEL A INJECT 04/06/08 11:06:11

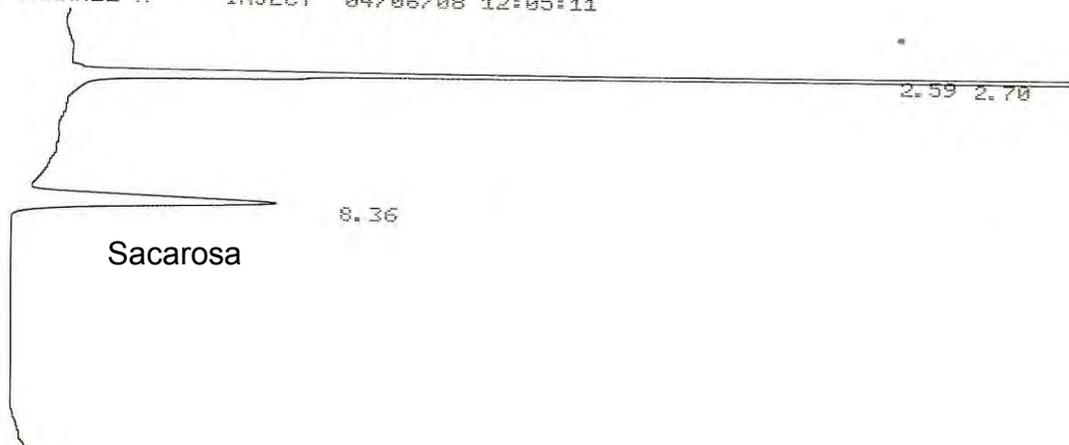


04/06/08 11:06:11 CH= "A" PS= 1.

FILE	1.	METHOD	0.	RUN	3	INDEX	3
PEAK#		AREA%	RT	AREA	BC		
1		85.028	2.51	2110762	01		
2		14.972	6.48	371663	01		
TOTAL		100.		2482425			

• **Sacarosa 2.1 mg/mL**

CHANNEL A INJECT 04/06/08 12:05:11



04/06/08 12:05:11 CH= "A" PS= 1.

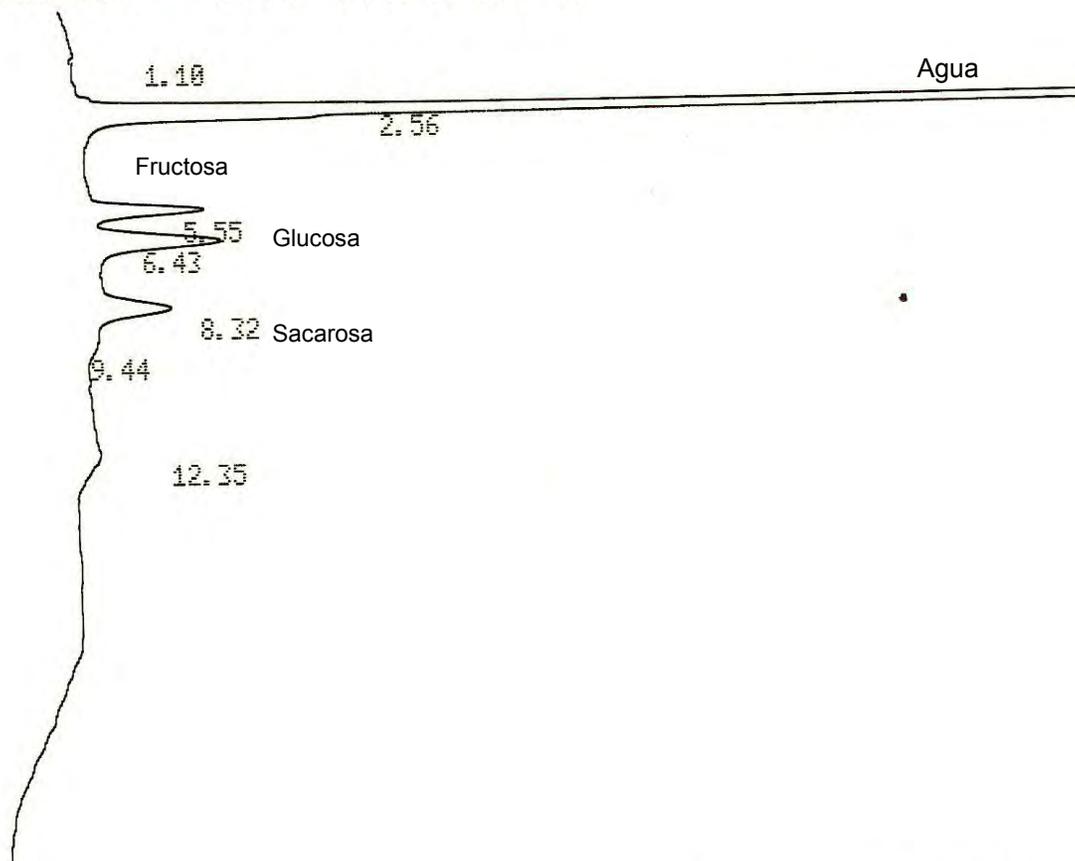
FILE	1.	METHOD	0.	RUN	5	INDEX	5
PEAK#		AREA%	RT	AREA	BC		
1		41.287	2.59	1079476	02		
2		41.225	2.7	1077835	03		
3		17.488	8.36	457227	01		
TOTAL		100.		2614538			

ANEXO 2

• Mezcla:

- Galactosa 0.5 mg/mL
- Glucosa 0.5125 mg/mL
- Fructosa 0.575 mg/mL
- Sacarosa 0.525 mg/mL

CHANNEL A INJECT 04/06/08 12:25:31



04/06/08 12:25:31

CH= "A" PS= 1.

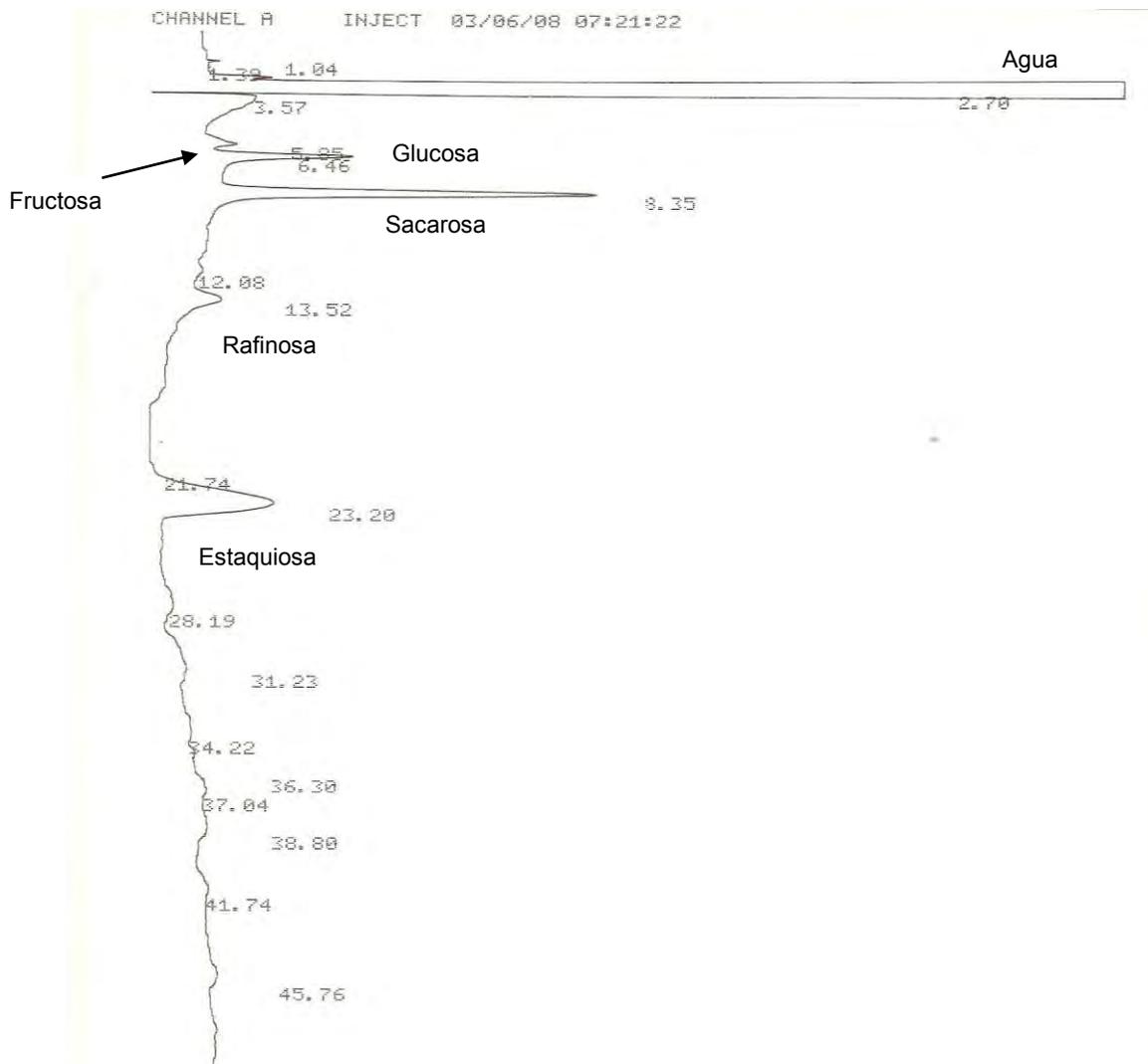
FILE 1. METHOD 0. RUN 6 INDEX 6

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.454	1.1	12478	02
2	76.028	2.56	2089163	03
3	5.539	5.55	152219	02
4	9.178	6.43	252190	02
5	7.289	8.32	200288	02
6	0.479	9.44	13153	03
7	1.033	12.35	28397	01

TOTAL 100. 2747888

ANEXO 2

- Extracto etanólico de frijol crudo (FC)**



INPUT OVERRANGE AT RT= 3.39

03/06/08 07:21:22 CH= "A" PS= 1.

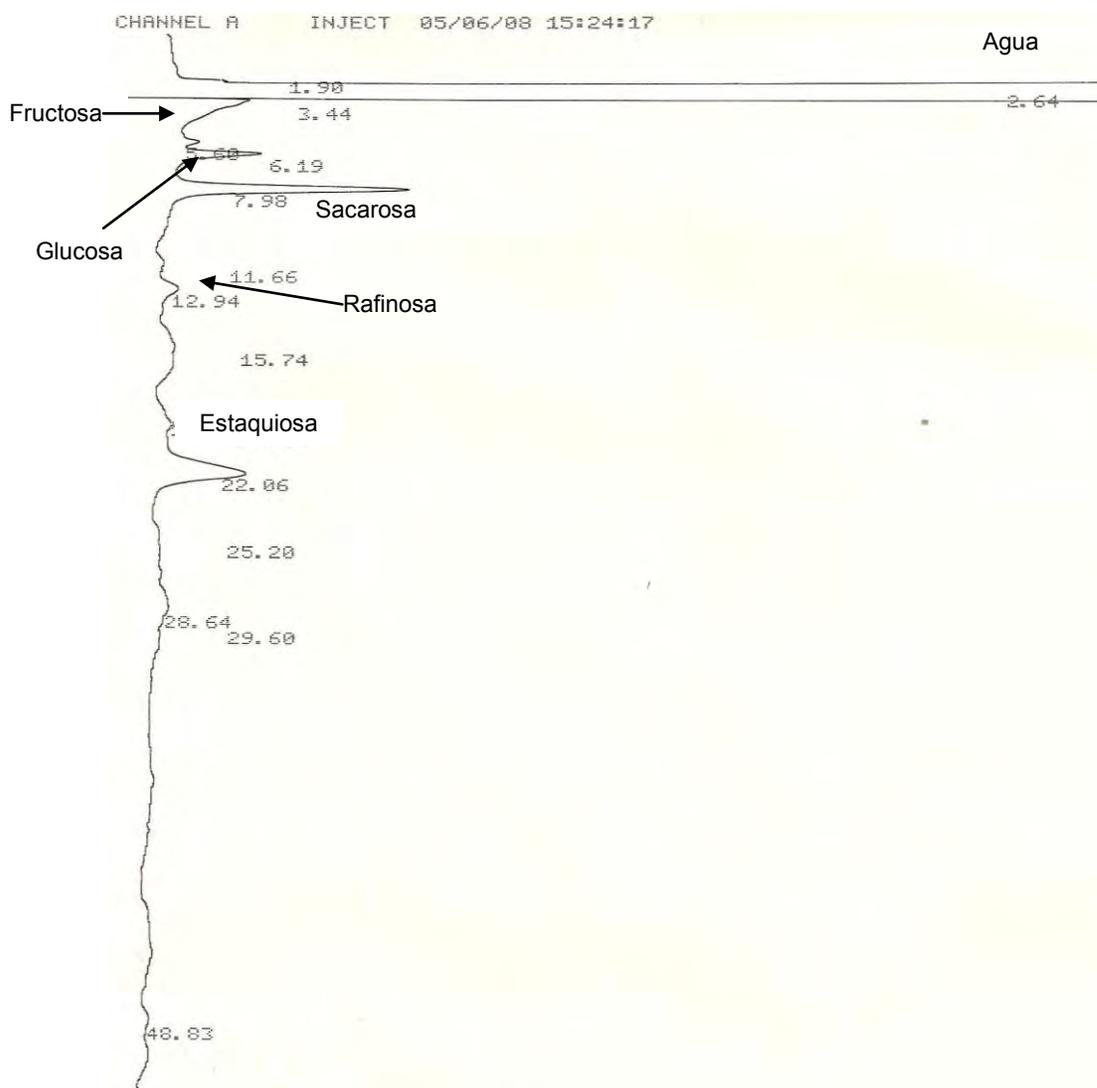
FILE 1. METHOD 0. RUN 9 INDEX 9

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.27	1.04	75456	00
2	0.27	1.04	200443	00
3	7.14	3.57	240532	00
4	0.43	5.05	950705	00
5	1.91	6.46	510040	00
6	0.21	8.35	51049	01
7	0.03	12.08	8490	01
8	0.33	13.52	96182	01
9	1.14	21.74	27521	00
10	0.20	23.20	613506	00
11	0.00	28.19	441930	00
12	0.00	31.23	440304	00
13	0.06	34.22	16603	02
14	0.10	36.30	28697	00
15	0.09	37.04	25796	00
16	0.10	38.80	10611	00
17	0.14	41.74	41025	00
18	0.14	45.76	41025	00

TOTAL 100. 27614934

ANEXO 2

- Extracto etanólico de frijol cocido (FC₂)**



INPUT OVERRANGE AT RT= 3.35

05/06/08 15:24:17 CH= "A" PS= 1

FILE	METHOD	RT	AREA	BC
1.	0.	RUN 4	INDEX 4	
PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.502	1.9	159472	02
2	82.417	2.64	26179329	02
3	6.284	3.44	1996004	02
4	2.26	5.6	717869	02
5	3.003	6.19	953755	02
6	3.387	7.98	1075763	03
7	0.065	11.66	20648	02
8	0.282	12.94	64220	02
9	0.105	15.74	33329	03
10	0.041	19.31	13055	02
11	0.053	19.63	16871	03
12	0.981	22.06	311561	01
13	0.196	25.28	62277	02
14	0.104	28.64	58519	02
15	0.023	29.6	7148	03
16	0.298	48.83	94599	01
TOTAL	100.		31764411	

ANALISIS DE CARBOHIDRATOS

- Método del fenol-sulfúrico (Southgate, 1991).

Preparar una solución o suspensión de la muestra en agua, procurando que los carbohidratos se encuentren en el intervalo de sensibilidad del método (10-100 μ g/mL)

En tubos de ensaye perfectamente etiquetados, colocar 1 mL de la solución o suspensión acuosa de la muestra.

Adicionar a cada tubo 1 mL de una solución acuosa de fenol al 5%. Mezclando perfectamente, adicionar cuidadosamente 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, homogeneizar.

Dejar enfriar leer en espectrofotometro a 490 nm para hexosas y 480 nm para pentosas.

Calcular la cantidad de azúcares totales a partir de una curva patrón preparada en el intervalo de 10 – 100 μ g/mL generalmente se utiliza glucosa como estándar, tratada de la misma manera que el problema.

- Cuantificación de almidón por reacción con yodo (Baks, *et al.*, 2007).

Este procedimiento únicamente puede ser utilizado cuando el almidón se encuentra completamente disuelto (gelatinizado).

Colocar 2 mL de la solución de almidón en un tubo de ensayo y adicionar 3mL de una solución de I/KI preparada diluyendo 2 mL de sol de yodo (1.269 g I₂ con 1.8 g de KI en 100 mL) a 100 mL con agua.

Medir la intensidad del color azul producido en un espectrofotómetro a 600 nm, frente a un blanco de reactivos.

Calcular la cantidad de almidón a partir de una curva patrón preparada en el intervalo de 0.02-0.2 mg /mL de almidón soluble, tratada de la misma manera que el problema.

Los resultados de esta determinación son relativos, ya que no todas las fuentes de almidón forman el mismo complejo colorido con yodo.

- Método de reacción con carbazol (Southgate, 1991).

Preparar una solución o suspensión de la muestra en agua, procurando que los carbohidratos se encuentren en el intervalo de sensibilidad del método (4 – 40 $\mu\text{g/mL}$)

Colocar en tubo de ensaye perfectamente etiquetado:

5 mL de la solución de tetraborato de sodio en H_2SO_4 conc a 4 °C.

1 mL de la solución problema

Mezclar y calentar en baño de agua hirviente por 10 min.

Añadir 0.2 mL de carbazol, agitar y dejar en el baño durante 5 min más.

Dejar enfriar y leer en el espectrofotómetro a 530 nm.

Calcular la cantidad de azúcares totales a partir de una curva patrón preparada en el intervalo de 4 – 40 $\mu\text{g/mL}$ con ácido galactúronico como estándar, tratada de la misma manera que el problema.

- Método de trifeniltetrazolio (Southgate, 1991).

Preparar una solución o suspensión de la muestra en agua, procurando que los carbohidratos se encuentren en el intervalo de sensibilidad del método (10 –100 µg/mL)

Colocar en tubo de ensaye perfectamente etiquetado:

1 mL de una solución de 2,3,5 – trifeniltetrazolio al 0.3 %

1 mL de NaOH 2N

2 mL de la solución problema

Calentar en baño de agua a ebullición por 3 minutos

Acidificar inmediatamente con 1 mL de ácido acético 2.1 N

Diluir la mezcla con isopropanol ó etanol a 25 mL

Calcular la cantidad de azúcares reductores a partir de una curva patrón preparada en el intervalo de 10 – 100 µg/mL generalmente se utiliza glucosa como estándar, tratada de la misma manera que el problema.

- Análisis de varianza (ANOVA).

Este análisis de varianza se realizó con el programa de estadística: Statistic Package for Social Science (SPSS para Windows, versión 11.0.0), el cual efectúa una prueba tamiz considerando todas las variables involucradas en este caso: *muestra* corresponde a tres partes (5g) de un mismo lote empleadas para el análisis; *replica* se refiere al número de repeticiones realizadas en cada determinación (triplicados); *método* se entiende como la metodología empleada sea el método de referencia o el propuesto.

La prueba tamiz consiste en discernir con base en los datos ingresados al programa; si alguna de las variables involucradas (muestra, replicas, método) presenta o no interferencia significativa, si no presenta se puede considerar esa variable como una constante, luego entonces se analiza prioritariamente el resto de las variables a través de un análisis de varianza; es por ello que en las tablas de resultados del ANOVA no aparecen necesariamente las tres variables reportadas.

A continuación se presentan las tablas de resultados obtenidos del análisis de varianza realizado para fibra soluble, insoluble, lignina y almidón en el caso de frijol crudo y cocido.

- Frijol Crudo.

Tabla 4.1 Resultados de ANOVA para fibra soluble en frijol crudo.

ANOVA fibra soluble en frijol crudo.							
Fuente de variación	SC	GI	CM	$F_{\text{calculado}}$	Comparativo	$F_{\text{tabla}}^{\rho = 0.05}$	Interpretación
MÉTODO	0,06582401	1	0,06582401	9058,2516	>	4.60	Si hay diferencia
REPLICA	1,7114E-05	2	8,5572E-06	1,17758653	<	3.74	No hay diferencia
Error	0,00010173	14	7,2667E-06				
Total	0,06594286	17					

Tabla 4.2 Resultados de ANOVA para fibra insoluble en frijol crudo.

ANOVA fibra insoluble en frijol crudo.							
Fuente de variación	SC	GI	CM	$F_{\text{calculado}}$	Comparativo	$F_{\text{tabla}}^{\rho = 0.05}$	Interpretación
MÉTODO	19,1168056	1	19,1168056	757,291634	>	4.60	Si hay diferencia
REPLICA	0,21921111	2	0,10960556	4,34190587	>	3.74	Si hay diferencia
Error	0,35341111	14	0,02524365				
Total	4545,1821	18					
Total corregido	19,6894278	17					

ANEXO 4

Tabla 4.3 Resultados de ANOVA para lignina en frijol crudo.

ANOVA. Lignina en frijol crudo							
Fuente de variación	SC	GI	CM	F _{calculado}	Comparativo	F _{tabla} ^{p = 0.05}	Interpretación
MÉTODO	29,72205	1	29,72205	1228,23088	>	4.60	Si hay diferencia
MUESTRA	0,05337778	2	0,02668889	1,10288885	<	3.74	No hay diferencia
REPLICA	0,25187778	2	0,12593889	5,20428544	>	3.74	Si hay diferencia
Error	0,29038889	12	0,02419907				
Total	807,4173	18					
Total corregido	30,3176944	17					

Tabla 4.4 Resultados de ANOVA para almidón en frijol crudo.

ANOVA almidón en frijol crudo.							
Fuente de variación	SC	GI	CM	F _{calculado}	Comparativo	F _{tabla} ^{p = 0.05}	Interpretación
MÉTODO	442,817888	1	442,817888	18791,5309	>	5.32	Si hay diferencia
REPLICA	0,0653874	8	0,00817343	0,34684952	<	3.44	No hay diferencia
ERROR	0,18851807	8	0,02356476				
Total	443,071794	17					

- Frijol Cocido.

Tabla 4.5 Resultados de ANOVA para fibra soluble en frijol cocido.

ANOVA fibra soluble en frijol cocido.							
Fuente de variación	SC	GI	CM	F _{calculado}	Comparativo	F _{tabla} ^{p = 0.05}	Interpretación
MÉTODO	0,51126272	1	0,51126272	11940,1599	>	4.49	Si hay diferencia
Error	0,0006851	16	4,2819E-05				

Total	0,51194782	ANEXO 4			
-------	------------	----------------	--	--	--

Tabla 4.6 Resultados de ANOVA para fibra insoluble en frijol cocido.

ANOVA fibra insoluble en frijol cocido.							
Fuente de variación	SC	GI	CM	F _{calculado}	Comparativo	F _{tabla} ^p = 0.05	Interpretación
MÉTODO	474,525356	1	474,525356	3460,1458	>	4.49	Si hay diferencia
Error	2,19424444	16	0,13714028				
Total	476,7196	17					

Tabla 4.7 Resultados de ANOVA para lignina en frijol cocido.

ANOVA lignina en frijol cocido.							
Fuente de variación	SC	GI	CM	F _{calculado}	Comparativo	F _{tabla} ^{p = 0.05}	Interpretación
MÉTODO	2,13555556	1	2,13555556	16,7212483	>	4.60	Si hay diferencia
REPLICA	0,40603333	2	0,20301667	1,58960608	<	3.74	No hay diferencia
Error	1,78801111	14	0,12771508				
Total	679,9784	18					
Total corregido	4,3296	17					

Tabla 4.8 Resultados de ANOVA para almidón en frijol cocido.

ANOVA almidón en frijol cocido.							
Fuente de variación	SC	GI	CM	F _{calculado}	Comparativo	F _{tabla} ^{p = 0.05}	Interpretación
MÉTODO	292,853881	1	292,853881	1866,253	>	5.32	Si hay diferencia
REPLICA	0,53952426	8	0,06744053	0,429774	<	3.44	No hay diferencia
ERROR	1,25536626	8	0,15692078				
Total	294,648771	17					

Bibliografía.

- Abdel-Gawad A. S.; **“Effect of domestic processing on oligosaccharide content of some dry legume seeds”**; Food Chem. 46 (1993) 25-31.
- Admassu Shimelis Emire, Kumar Rakshit Sudip; **—Proximate composition and physico-chemical properties of improved dry bean (Phaseolus vulgaris L.) varieties grown in Ethiopia—**LWT 38 (2005) 331–338.
- Baks T., Ngene I.S., J.G. van Soest J., E.M. Janssen Anja, M. Boom Remko.; **—Comparison of methods to determine the degree of gelatinisation for both high and low starch concentrations”**; Carbohydrate Polymers 67 (2007) 481–490
- Belitz H. D., Grosgh W.; **Química de los alimentos**. Ed. Acribia, S. A., Zaragoza, España, 2ª edición. 1997.
- Bermejo, M. F.; **“Química analítica general, cuantitativa e instrumental ”**; Ed. Paraninfo, S. A. Madrid, Vol. 2, 1991.
- Coultate T. P.; **FOOD. The Chemistry of its Components**. Royal Society of Chemistry Paperbacks, 3ª edic., 1996.
- Englyst H. N., Cummings J. H.; **—Improved method for the measurement of dietary fiber as nonstarch polysaccharide in plant foods”**; J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71 (1988) 808 – 814.

- Fairbridge R. A., Willis K. J., Booth R. G.; —**The direct Colorimetric Estimation of Reducing Sugars and other Reducing Substances with Tetrazolium Salts**”; Bovril Research Laboratory, London; 49 (1951) 423 – 427.

BIBLIOGRAFIA

- Fennema, O. R.; **Química de los alimentos**. Acribia, S. A., Zaragoza, España., 2ª edición, 1993.
- Garcia E., Infante R. B. & Riverab C. J.; —**Determination of total, soluble and insoluble dietary fibre in two new varieties of Phaseolus vulgaris L. using chemical and enzymatic gravimetric methods**”; Food Chem., Vol. 59, No. 1, pp. (1997) 171-174.
- Harris, D. C.; **Análisis químico cuantitativo**. Ed. Reverte, S. A. Barcelona. 2001.
- Illanes S. E., Patiño C.S; **Utilización de dos métodos alternos para evaluar la calidad nutricional de frijol sometido a endurecimiento acelerado**. Tesis licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, D. F., 1989.
- Jiebing Li, Koki Kisara, Sverker Danielsson, Mikael E. Lindström and Göran Gellerstedt; —**An improved methodology for the quantification of uronic acid units in xylans and other polysaccharides**”; Carbohydrate Research 342 (2007) 1442–1449
- Kirk R.S., Sawyer R., Egan H.; **Composición y análisis de los alimentos de Pearson**. CECSA., 2ª edición, 1996.

- Knud Erik Bach Knudsen; **—Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding**”; Animal Feed Science Technology 67 (1997) 319-338.
- Knutson C. A. and Jeanes Allene; **—Determination of the Composition of Uronic Acid Mixtures**”; Analytical Biochemistry 24 (1968) 482 – 490.

BIBLIOGRAFIA

- Knutson C.A.; **—Evaluation of variations in amylose–iodine absorbance spectra**”; Carbohydrate Polymers 42 (1999) 65–72.
- M. Shiga T., M. Lajolo F.; **—Cell wall polysaccharides of common beans (Phaseolus vulgaris L.)—composition and structure**”; Carbohydrate Polymers 63 (2006) 1–12.
- Machaiah J. P., Pednekar M. D.; **—Carbohydrate composition of low dose radiation – processed legumes and reduction in flatulence factors**”; Food Chem., 79 (2002) 293 – 301.
- Mañas E., Saura – Calixto F.; **—Ethanol precipitation: a source of error in dietary fiber determination**”; Food Chem., 47 (1993) 351 – 355.
- Martínez-Villaluenga C., Frías J., Vidal - Valverde C.; **—Raffinose family oligosaccharides and sucrose contents in 13 Spanish lupin cultivars**”; Food Chem., 91 (2005) 645–649.
- Mondragon Jaimes Leonora; **Evaluación y aplicación de técnicas analíticas en el área alimentaria**. Tesis licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, D. F., 1989.

- Nielsen S.; **Food Analysis**, Aspen Publication, 2^a edic., Gaithersburg, Maryland, 1998.
- Osorio D. P., Méndez M. G., Agama A. E., Islas J. J., Sánchez M. J., Bello P. L. A.; **“Biodisponibilidad del almidón en dos variedades comerciales de frijol (Phaseolus vulgaris L.) y en frijoles industrializados”**; Yautepec, Morelos, Méx., Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del IPN, 2003.

BIBLIOGRAFIA

- Pomeranz Y., Meloan Clifton E.; **Food Analysis. Theory and Practice**. Aspen Publication , 3^a edic., Gaithersburg, Maryland, 2000.
- Rehman Z., Salariya A.M., Zafar S.I.; **—Effect of processing on available carbohydrate content and starch digestibility of kidney beans”**; Food Chem., 73 (2001) 351 – 355.
- Rendleman J.A.; **—The reaction of starch with iodine vapor. Determination of iodide-ion content of starch–iodine complexes”**; Carbohydrate Polymers 51 (2003) 191–202.
- Saura – Calixto F., García – Alonso A., Goñi I., Bravo L.; **—In Vitro Determination of the Indigestible Fraction in Foods: An Alternative to Dietary Fiber Analysis”**; J. Agric. Food Chem., 48 (2000) 3342 – 3347.
- Serna Saldivar S. R. O., **Química, almacenamiento e industrialización de los cereales**. A. G. T. Editor, S. A., 1^a edición, México, 1992
- Shiga Tânia M., Lajolo Franco M.; **—Cell wall polysaccharides of common beans (Phaseolus vulgaris L.)—composition and structure”**; Carbohydrate Polymers 63 (2006) 1–12.

- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J.; **Química analítica**. Ed. Mc Graw Hill. 7ª edición. 2001.
- Southgate D. A. T.; **Determination of food carbohydrates**. Elsevier Applied Science, London and New Cork., 2ª edic. 1991.
- Tester Richard F., Karkalas John, Qi Xin; **—Stach — composition, fine structure and architecture—**; Journal of Cereal Science 39 (2004) 151–165.

BIBLIOGRAFIA

- Tovar J., Fernández P. M., Blanco M. A.; **—Digestibilidad in vitro del almidón en preparaciones cocidas y molidas de frijol (Phaseolus vulgaris L.)—**; Venezuela, INTERCIENCIA, 30 (2005) 7-12.
- Wong D.W. S., Ph D.; **Química de los alimentos: Mecanismos y teoría**. Ed. Acribia, S. A., Zaragoza, España, 1995.

Referencias.

- www.siap.sagarpa.gob.mx, en línea junio 2008.
- AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International**; Gaithersburg, Maryland: Association of Official Analytical Chemists, capitulo 32 (2000) 1-14