

57
28



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

**COMPOSICION QUIMICA Y CONTENIDO
DE COMPUESTOS TOXICOS
TERMOLABILES EN DOS VARIEDADES
DE FRIJOL EN DIFERENTES FASES
DE SU DESARROLLO**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
'QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A N :
NAVA RAMIREZ MARIA SERVANDA DEL ROSARIO
RODRIGUEZ RODRIGUEZ OLGA ELIZABETH

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

CONTENIDO

CAPITULO PRIMERO	INTRODUCCION	1
CAPITULO SEGUNDO	GENERALIDADES	4
II.1.	LEGUMINOSAS	4
II.1.a.	Descripción Botánica	
II.1.b.	Como fuente de alimento	
II.1.c.	Composición Química	
II.2.	TOXICOS EN LEGUMINOSAS	9
II.2.a.	Introducción	
II.2.b.	Inhibidores de Tripsina	
II.2.c.	Hemaglutininas	
II.2.d.	Otros Tóxicos	
II.2.d.a.	Favismo	
II.2.d.b.	Glucósidos Cianogénicos	
II.2.d.c.	Letirismo	
II.3.	PHASEOLUS VULGARIS	22
II.3.a.	Características Botánicas	
II.3.b.	Distribución y Origen	
II.3.c.	Usos y nombres vulgares	
CAPITULO TERCERO	OBJETIVO	26
CAPITULO CUARTO	PARTE EXPERIMENTAL MATERIAL Y METODOS	27
IV.1.	MATERIAL	27
IV.2.	DIAGRAMAS DE TRABAJO	27
IV.2.a.	Estadios y partes de la planta de frijol	
IV.2.a.b.	Determinaciones físicas y químicas en las diferentes partes de la planta	
IV.2.a.b.c.	Determinación de humedad original y análisis proximal	
IV.2.a.d.	Determinación de tóxicos termolábiles	
IV.3.	METODOS	33
IV.3.a.	Análisis Proximal	
IV.3.b.	Análisis Toxicológico	
IV.3.b.a.	Inhibidores de Tripsina	
IV.3.b.b.	Hemaglutininas	

CAPITULO QUINTO	RESULTADOS Y DISCUSION	60
CAPITULO SEXTO	CONCLUSIONES	92
CAPITULO SEPTIMO	BIBLIOGRAFIA	94

CAPITULO PRIMERO

INTRODUCCION

Las leguminosas pertenecen a la familia de las leguminosae y se cultivan en todo el mundo, tanto en los trópicos como en las zonas templadas aunque en menor cantidad que los cereales de primera necesidad; su contribución al suministro mundial de proteínas es considerable, constituyendo por tanto un alimento importante para el consumo humano que reviste un destacado interés desde el punto de vista de la nutrición (3).

En algunas leguminosas de consumo humano se encuentra una serie de compuestos tóxicos y antinutricionales dentro de los que destacan los inhibidores de tripsina, las hemaglutininas, los glucósidos cianogénicos, las saponinas, los alcaloides, los factores causantes del bocio y el factor tóxico causante del latirismo y favismo.

Va que el frijol (Phaseolus vulgaris) es un alimento de alto consumo en nuestro país, que aporta una parte sustancial de proteínas a la dieta del mexicano (24,59) es de notable interés conocer los tóxicos intrínsecos de esta leguminosa y aunque se han hecho estudios sobre la composición y caracterización de éstos en la semilla, hay escasos trabajos --- sobre su presencia en las diferentes partes de la planta (2,12,41).

En este trabajo haremos referencia a dos de los factores tóxicos ya mencionados que son: Inhibidores de tripsina y hemaglutininas y al mismo-

tiempo se tratará de correlacionar estos factores con algunos compuestos del análisis proximal tratando de buscar un posible papel en la fisiología de la planta.

La leguminosa de grano más importante, con gran diferencia sobre las demás es el frijol común (Phaseolus vulgaris) del que se cultivan diversas variedades, constituyendo además la principal fuente de proteína vegetal. Existen muchos tipos de frijol que difieren no solamente en su adaptación en distintas zonas ecológicas, sino también en su hábito de crecimiento y en la apariencia general de la planta, en el color, forma y tamaño de la semilla, así como en su sabor, estas últimas características son determinantes en cuanto a la aceptación del producto por el público de diferentes regiones geográficas o países (3,59).

Deben mencionarse como factores adicionales a favor del frijol como ---- fuente de nutrientes, la facilidad de su preparación para el consumo y la multiplicidad de formas comestibles, tales como: vainas, tallos, hojasternas y granos inmaduros o secos. En general el frijol constituye un buen complemento en las dietas que se consumen en los trópicos, caracterizadas por altas ingestas de carbohidratos y un mínimo de proteína animal.(7).

No cabe duda que las leguminosas de grano comestible juegan un papel importante para resolver los problemas de nutrición (3), aunque la generalidad de los países en vías de desarrollo que afrontan los problemas nu-

tricionales derivan de cereales y leguminosas su principal aporte de calorías y proteínas, sin embargo, como la proporción en que se consumen - estos alimentos no es adecuada, es necesario incrementar el consumo de -- leguminosas con el fin de lograr la mayor utilización biológica de la -- mezcla resultante (16).

CAPITULO SEGUNDO

GENERALIDADES

II.1. LEGUMINOSAS

II.1.a. DESCRIPCION BOTANICA

Las leguminosas constituyen una familia extensa que comprende más de --- 13,000 especies, que varían en tamaño, desde la diminuta arveja silvestre de la zona templada a los grandes árboles; algunos producen vainas de un metro de largo, que florecen en los trópicos y se plantan algunas veces-- para procurar sombra a otros cultivos más delicados (3).

Las leguminosas se caracterizan por varios rasgos morfológicos importan-- tes, las semillas se hayan contenidas en una vaina característica, las-- hojas tienden a ser de un color verde oscuro, se dividen generalment-- en foliolos. Las raíces tienen nódulos que encierran las bacterias es-- pecíficas que desempeñan un papel singular y vital en la nutrición de -- estos vegetales. Las flores de las leguminosas varían mucho en cuanto-- a tamaño y vistosidad (57).

Casi todas las plantas utilizadas como alimento para el hombre y los ani-- males domésticos, y todas las cultivadas como fuente de leguminosas -- para semilla, pertenecen a la subfamilia Papilionoideae así denominada-- por la forma de mariposa de sus flores, en cuanto a los caracteres de la flor se tiene pétalos imbricados y estandarte colocado hacia afuera de--

las alas. Son principalmente herbáceas, de vida anual y crecen en todo el mundo desde los trópicos hasta las altas regiones montañosas y subárticas.

El ser humano sólo come por lo regular en cantidades apreciables unas 20 especies de una gran subfamilia que han sido investigadas por los nutriólogos (2,3).

En las Caesalpinioideas, otra subfamilia, las flores son también irregulares y forman racimos relativamente sueltos, las características de la flor son: Pétalos imbricados y estandarte colocado hacia adentro de las alas.

En las Mimoscoideas, que es la tercera subfamilia, las flores forman panjas densas, como característica de la flor; son pétalos valvados y corola regular. Estas dos últimas subfamilias son principalmente árboles y crecen en los trópicos, en general no proporcionan alimentos de consumo humano, pero hay unas cuantas especies que suministran sustancias comestibles (17,57).

Las leguminosas difieren de otros vegetales alimenticios en que, merced a las bacterias simbióticas de los nódulos radicales, tiene la propiedad de obtener el nitrógeno combinado e incorporarlo a los demás alimentos nutritivos, tomándolo de la provisión de nitrógeno libre de la atmósfera. Esto hace que estas plantas puedan sintetizar con cierta facilidad proteínas lo que las convierte en una buena fuente de este nutriente, utilizándose tanto en la alimentación humana como en la animal.

II.1.b. COMO FUENTE DE ALIMENTO

Los países en vías de desarrollo afrontan problemas nutricionales y las leguminosas comestibles representan un potencial inmediato para resolver estos problemas (59).

Las hojas de algunas plantas leguminosas se consumen mucho como hortaliza y las flores de algunas de ellas también se comen. Las vainas inmaduras de frijoles, guisadas como hortalizas constituyen un alimento familiar especialmente en regiones de Latinoamérica (3).

Algunas leguminosas tienen raíces tuberosas y se aprovechan como alimento humano, un ejemplo de éste es el frijol de Goa (Psophocarpus Tetragolobus).

Nutricionalmente, las leguminosas de grano aportan cantidades significativas de energía a la dieta de poblaciones de bajos recursos económicos y lo que es más importante, aportan la proteína suplementaria a la dieta principalmente de cereales o toda la proteína a una dieta a base de tubérculos.

En general las leguminosas comestibles representan una fuente de proteína almacenable y transportable.

II.1.c. COMPOSICION QUIMICA

La singular composición química de las leguminosas es la que da a estas su gran valor alimenticio. Las semillas son una rica fuente de proteínas en tal forma, que queda garantizada la alta calidad (59).

La proteína de las leguminosas son en su mayor parte globulinas con un-

80% del contenido total de proteína, pero también se encuentran albúminas en algunas especies y representan del 8-10% de proteína total. Lo mismo que la mayoría de las proteínas vegetales, pueden ser deficientes en ciertos aminoácidos, como la cisteína y metionina.

Tienden a ser también deficientes en ácido glutámico, arginina y nitrógeno amoniacal; pero como fuente de proteínas vegetales, las proteíninas de las leguminosas no son inferiores a las de otras plantas, las leguminosas sirven admirablemente como complemento de otras fuentes de proteínina vegetal (57).

Las leguminosas contienen del 57-65% de hidratos de carbono (principalmente féculas) que en general se absorbe y se utiliza bien. Sin embargo, cabe mencionar que hay cierta cantidad de hidratos de carbono, tales como galactosas, pentosas y hemicelulosas que se aprovechan escasamente (3,56).

Un grupo importante de carbohidratos lo constituye la llamada fibra cruda, formada principalmente de celulosa y hemicelulosa, los cuales no son digeridos por el sistema digestivo humano, sin embargo los rumiantes si pueden aprovechar este tipo de compuestos (8).

El contenido de grasa de la mayoría de las leguminosas se haya entre 1-2%. Solo el cacahuete (Arachis Hipogamea) y la soya constituyen fuentes importantes de las citadas sustancias. Las grasas de las leguminosas en general, son ricas en ácidos grasos esenciales.

Las cenizas en leguminosas, varía de 2.5-4.2%.

Como las gramíneas, las leguminosas tienden a mantener concentraciones-

bastante altas de potasio y fósforo, pero por lo regular son mucho más ricas que las gramíneas en calcio y magnesio. Un valor representativo para el grupo en su conjunto es el de 100 mg. frente a 10 y 16 mg. de arroz elaborado.

Las leguminosas contienen cantidades considerables de ácido fítico que puede afectar a la absorción y aprovechamiento de su calcio, mediante la precipitación de sales insolubles en el estómago y duodeno, pero aun cuando se tenga en cuenta este hecho, la ingestión diaria de 50g. de leguminosas, puede representar una contribución útil a las necesidades de calcio.

La mayoría de las especies de las leguminosas contienen sólo cantidades pequeñas de caroteno (provitamina A). No obstante, existen diferencias entre las especies y dentro de ellas, según el color y la variedad.

Los valores de muchas leguminosas, según los datos disponibles son del orden de 50-300 Unidades internacionales de vitamina A por 100 mg.

El contenido de tiamina de las leguminosas como grupo es más o menos -- equivalente, o excede ligeramente al conjunto de los cereales. Los valores varían de 0.3 a 1.0 mg. por 100 g. de muestra.

Las leguminosas contienen poca riboflavina, los valores representativos oscilan entre 0.1 y 0.4 microgramos por 100 g.

Las leguminosas sin descortezar contienen vitamina E (tocoferol) en cantidades algo mayores que la del total de los cereales. En cuanto al -- ácido pantoténico, la relación es inversa. En comparación con la mayoría de los alimentos comunes, las leguminosas constituyen una buena --- fuente de ácido fólico.

II.2. TOXICOS EN LEGUMINOSAS

II.2.a. INTRODUCCION

En el reino vegetal la naturaleza ha dotado a ciertas plantas con capacidad de sintetizar una amplia variedad de sustancias químicas, las cuales se sabe ejercen ciertos efectos dañinos cuando son ingeridas por el hombre o los animales (24).

Fué a principios de este siglo, cuando se descubrió que las semillas de algunas leguminosas, al incorporarse en forma cruda a dietas experimentales para animales, no permiten un crecimiento normal, debido a que -- contienen sustancias que se consideran tóxicas tanto para el organismo humano como para el animal. Las primeras observaciones al respecto se deben a Osborne y Mendel quienes denominaron a estas sustancias "Toxicas búminas".

La investigación de estas sustancias tóxicas, resulta de gran importancia, ya que hasta ahora sólo se tiene referencia de factores que en mayor o menor grado influyen sobre los efectos antinutricionales. Sin--- que se conozca el papel que desempeñan estos compuestos tóxicos en la fisiología de la planta, o de saber los mecanismos de acción de estos factores antinutricionales en el organismo, por su ingestión. Hacemos referencia especialmente en aquellos compuestos termolábiles en los cug les la sustancia activa, ha resultado ser una proteína o una mezcla de proteínas como son: Fitohemaglutininas e inhibidores de tripsina.

Otros factores tóxicos y antinutricionales relacionados con las legumi-

nosas, son los siguientes:

Agentes latirogénicos, productores de favismo y glucósidos cianogénicos. La importancia que tiene estudiar la presencia de sustancias tóxicas en leguminosas, radica principalmente, en que constituyen una parte importante en la alimentación humana y es muy amplio su potencial de contribución para la alimentación animal.

11.2.b. INHIBIDORES DE TRIPSINA

Son sustancias que tienen la capacidad de inhibir la actividad proteolítica de ciertas enzimas (15,16).

Estos inhibidores de proteasas han atraído la atención debido al posible papel que estas sustancias podrían jugar en el valor nutritivo de proteínas en plantas.

En gran parte de las plantas consideradas como hortalizas, se encuentran inhibidores de proteasas, en primer lugar hay que mencionar a las leguminosas como las especies de phaseolus, la soya y habas, pero también los guisantes y patatas contienen tales sustancias.

También los cereales como el trigo, maíz, centeno, avena, arroz y alforfón contienen en el grano sustancias inhibidoras de tripsina y quimotripsina. El inhibidor de la tripsina que se encuentra en la harina de trigo se destruye por el calor, es una de las características de este inhibidor.

Los inhibidores se presentan en gran cantidad sobre todo en las partes comestibles de estas plantas, principalmente en las semillas, pudiendo

ser inhibidores de la tripsina y de la quimotripsina. No se conoce a-- ciencia cierta la acción fisiológica de estos factores y de su gran va-- riabilidad química posiblemente puede implicar la existencia de diferen-- cias en su toxicidad.

Debido al gran interés de la harina de soya como fuente de proteína, y-- a causa de su alto contenido de inhibidores de proteasas, se han hecho-- diversos ensayos en animales de experimentación sobre su influencia en-- el crecimiento y su valor protéico.

Los inhibidores más estudiados son el de Kunitz y el de Bowman-Birk.

Con lo que respecta a la reacción del inhibidor de Kunitz con la trip-- sina es casi instantánea, su constante de velocidad es de segundo orden y es de 2×10^7 litros/moles/segundos. El peso molecular del inhibidor de Kunitz y el de la tripsina es aproximadamente el mismo (24,000) y la relación molar se considera generalmente 1:1.

El complejo tripsina inhibidor de tripsina tiene poca tendencia a diso-- ciarse, excepto cuando el pH es inferior a 2.9, es por eso que se pensó que la inhibición de la tripsina por el inhibidor de Kunitz era no com-- petitiva sin embargo se comprobó que la inhibición es competitiva con -- pequeñas moléculas de sustrato tales como N-benzoil-L-arginina etil éster, ya que la reacción del inhibidor de Kunitz con tripsina es casi -- anulada en presencia de este sustrato.

El primer paso de la interacción entre el inhibidor y la tripsina con-- siste en la ruptura del enlace arginin-isooleucina que se encuentra en-- tre los dos puentes disulfuro del inhibidor (7,40).

Aparentemente se forma entonces una unión éster entre el resto de serina de la porción activa de la molécula de tripsina y el carbono terminal que acaba de aparecer en el resto de arginina del inhibidor modificado.

El inhibidor de Kunitz es capaz de atacar las tripsinas derivadas de -- una amplia variedad de fuentes (1).

La quimotripsina de bovino, plasma humano y larvas son también inhibidos a varios grados.

Entre las enzimas que son inhibidas por el inhibidor de Kunitz están:

Las proteasas de troleo, pepsina, trombina, colagenasas y las carboxipeptidasas. Para el caso de quimotripsina de bovino el inhibidor de -- Kunitz forma un complejo disociable muy alto con una constante de disociación 10^{-6} M (2,40).

El inhibidor de Bowman-Birk fue descrito primeramente por Bowman en --- 1944 y subsecuentemente purificado y caracterizado por Birk y colabo--- radores (3).

El inhibidor de Bowman-Birk difiere del inhibidor de Kunitz en los siguientes aspectos: su peso molecular es de aproximadamente 20,000, especialmente rico en residuos de cisteína, tiene siete enlaces disulfuro pero está desprovisto de glicina y triptofano (4). Presenta doble cabeza en donde existen sitios de enlace para la quimotripsina y la tripsina, tiene marcada estabilidad hacia el calor, el ácido y el álcali (7), una propiedad atribuible al efecto estabilizador de los enlaces disulfuro de la proteína.

La primera hipótesis que se realizó sobre la baja digestibilidad, como explicación del reducido valor alimenticio de muchas leguminosas crudas, encontró apoyo en el descubrimiento efectuado por Bowman (12), por Ham y Senndstedt (7) de los inhibidores de tripsina en la soya y en otras leguminosas.

Se han obtenido en forma pura inhibidores tripsínicos de soya (16), de frijol (59), de habas de lima (57) y de otras leguminosas. Parece muy probable que la destrucción de estos factores podría ser la causa del mejoramiento en el valor nutritivo de las semillas crudas de las leguminosas, al someterlas a cocción. En un estudio comparativo se observó que los índices de digestibilidad de las especies con el mayor contenido de inhibidores tripsínicos eran los más bajos (56).

La adición de un extracto pancreático a una dieta de soya cruda mejora mucho más por la suplementación con metionina que el de una dieta de soya cocida. Esta observación de Mellnick (34) al formular la hipótesis de que en la digestión de la soya cruda, la liberación de este aminoácido fuera más lento que en la soya cocida debido al inhibidor tripsínico.

Se atribuye a los inhibidores tripsínicos de soya y de frijoles la hipertrofia del páncreas que regularmente se observa en animales alimentados con dietas que contienen estas leguminosas en forma cruda (44).

Booth y colaboradores son de la opinión que la hipertrofia del páncreas, lleva a una excesiva pérdida de proteínas endógenas secretadas por el páncreas.

Ya que estas proteínas están compuestas de enzimas pancreáticas, ricas en cisteína, el resultado de este efecto en el cuerpo es una pérdida --

de aminoácidos azufrados. Esto puede explicar el hecho de la necesidad de metionina, la cual es inherentemente la proteína limitante en la soya, esto se manifiesta aún más en dietas que contienen soya cruda.

Recientemente hubo evidencias para indicar que la tripsina en el intestino suprime la secreción de enzimas pancreáticas por inhibición de retroalimentación y que los inhibidores de tripsina provocan un incremento en la secreción de enzimas impidiendo la supresión producida por tripsina. (5).

El efecto sobre el páncreas desaparece al usar las semillas en forma cocida lo que se explica por la termolabilidad de los inhibidores. Es difícil estimar cual puede ser el efecto de los inhibidores tripsicos en el organismo humano.

Diversos autores tratan de averiguar el papel de los inhibidores de proteasas en la fisiología de la planta. Si su acción está dirigida principalmente hacia la proteólisis endógena, así por ejemplo se ha observado que en algunas semillas éstos inhibidores que son activos contra ciertas proteínas endógenas, desaparecen cuando la semilla entra en la etapa de germinación. La otra hipótesis es que estos inhibidores actúan hacia la proteólisis exógena producida por microorganismos invasores. Dentro de los factores que afectan el contenido de los inhibidores de tripsina tenemos:

1. El tratamiento con calor en donde el límite por el cual el inhibidor de tripsina es destruido por calentamiento está en función de la temperatura, duración del calentamiento, tamaño de partícula y condiciones variables de humedad.

2. En autoclave a una atmósfera de vapor de 15 lb/in² durante 15-20 --

min. se inactiva casi por completo el inhibidor de tripsina del frijol de soya.

b. Si los frijoles están en remojo durante la noche y posteriormente se ponen a cocer se inactiva casi completamente el inhibidor de tripsina.

2. Durante la germinación hay un mejoramiento en el valor nutritivo -- del frijol de soya y un gran número de leguminosas, aunque la actividad del inhibidor de tripsina no parece cambiar durante este proceso (40).

3. Los preparados de soya fermentada conocida como tempech o natto, -- según reportes, se tiene que el nitrógeno de tempech es fácilmente disponible, se atribuye la destrucción del inhibidor de tripsina durante la preparación de esta comida.

No hubo evidencias de agrandamiento pancreático en ratas que fueron alimentadas con dietas que contenían tempech, lo cual indicaría que los inhibidores de tripsina de soya han sido destruidos debido al tratamiento de calor involucrado en la preparación del tempech.

4. Proteínas aisladas. En la actualidad los aislados de soya y texturizados de carne son de gran importancia aunque se ha reportado que la calidad nutritiva de estos alimentos texturizados es equivalente a la caseína o a la carne de res, la eficiencia de la proteína del aislado es muy baja, pero puede mejorarse por tratamiento térmico.

Estos resultados indican la posible presencia de inhibidores de crecimiento en el aislado de proteína, los cuales se inactivan durante el proceso en el que el aislado se convierte en fibra (8).

II.2.c. HEMAGLUTININAS

En las semillas de las leguminosas y también en otras plantas, existen sustancias termolábiles de tipo proteínico llamadas fitohemaglutininas-capaces de aglutinar los glóbulos rojos (39).

Los primeros estudios al respecto fueron presentados por Stillmark en 1888, sobre una proteína obtenida de la semilla de tártago (Ricinus communis), capaz de aglutinar las células de la sangre (30).

Posteriormente Sumner aisló de una variedad de frijol (Connivalis ensiformis) una globulina que llamó Concanavalina 4 y la cual tiene la propiedad de aglutinar glóbulos rojos.

También en diferentes variedades de frijoles (Phaseolus vulgaris) se han encontrado fracciones proteínicas, correspondientes a lectinas, que tienen actividad hemaglutinante. En realidad la toxicidad varía considerablemente en los diferentes tipos de frijoles (28,30).

Originalmente se conocieron como fitohemaglutininas y se relacionaron a las leguminosas euforbiáceas.

Actualmente estas sustancias se denominan lectinas del griego *legeré* -- que significa elegir. También se les conoce como hemaglutininas porque poseen afinidad muy marcada por los carbohidratos de la membrana de eritrocitos (63).

Las lectinas son proteínas o glucoproteínas que contienen uniones covalentes con azúcares. Tienen un PM de 10,000 (43).

Los azúcares presentes son: Glucosa, galactosa, xilosa, fructuosa, glucoamina, manosa, arabinosa y ramosa (31).

En las leguminosas, las lectinas se localizan indistintamente en toda -

la planta, aunque la máxima concentración se encuentra en las semillas, estas a su vez se hallan concentradas en el cuerpo de la proteína del endospermo, donde aparecen durante la maduración y desaparecen rápidamente en la germinación (30).

Estos tóxicos además de estar presentes en las leguminosas, han sido encontrados en muchas familias de plantas como líquenes y micelios de hongos, también han sido detectados en animales (6) como esponjas, crustáceos, moluscos, caracoles, en peces, anfibios y en tejidos de mamíferos (8).

Las fitohemaglutininas se distinguen por sus respectivas especificidades, frente a los glóbulos rojos de diferente origen. La mayoría de las membranas celulares, contienen glucoproteínas situadas en la superficie de la membrana, por lo tanto se considera que las lectinas se unen a ciertos receptores siempre y cuando tienen la misma afinidad.

Siendo de gran interés para la determinación de grupos sanguíneos y también para distinción serológica de varias especies de animales (27). Por ejemplo, extractos de arvejas, garbanzos o lentejas son activos en aglutinar sangre de conejo, pero no actúan en sangre humana de ningún grupo sanguíneo, los extractos de habas de lima (Phaseolus lunatus), aglutinan solo sangre humana del grupo A (9,10).

Son capaces de inducir la mitosis en los cultivos de leucocitos humanos. Es interesante mencionar que por su afinidad con carbohidratos, han sido un arma muy eficaz para estudiar la dinámica de la membrana celular (42). Una de las características de las lectinas es el de actuar mediante un mecanismo similar al complejo enzima-sustrato o antígeno anticuerpo sobre los carbohidratos, mediante múltiples sitios de unión.

Por otro lado se les asoció una actividad tóxica, ya que se encontró -- que las lectinas de ciertos frijoles (Phaseolus vulgaris), son responsables del efecto tóxico cuando son administrados oralmente en forma cruda a los animales (25,39,53,58).

Jaffé en 1960 encontró que la causa del efecto tóxico oral se relaciona con su acción sobre la absorción intestinal. Sucede que la aglutinación se debe a la combinación con grupos receptores de la superficie de las células de la mucosa gástrica de una manera muy semejante como se combina con los glóbulos rojos, interfiriendo en la absorción de los nutrientes (33).

Hay varias hipótesis acerca de las funciones que desempeñan estas sustancias en la planta, y son las siguientes:

1. Actuar como anticuerpos para contrarrestar la acción de bacterias del suelo.
2. Proteger a la planta contra el ataque de hongos.
3. Transporte y almacenamiento de azúcares.

Algunas bacterias tales como el rizobium, forman nódulos en las raíces de las leguminosas y fijan el nitrógeno el cual es vital para la planta. Una satisfactoria relación simbiótica entre las bacterias y las plantas es caracterizado por un alto grado de selectividad del simbionte huésped. Esto involucra a las lectinas en la base molecular para esta selectividad. La presencia de lectinas en los nódulos de la raíz de algunas leguminosas fueron observadas por Eisler y Porthern (20,50).

Cada lectina con una especificidad distinta debe considerarse como una sustancia diferente a todas las demás fitohemaglutininas con propiedades fisiológicas específicas, que pueden o no incluir acciones que re-

sulten nocivas para los animales que las ingieren, pueden o no ser ---
tóxicas (26,41).

Aquellas que tienen efectos tóxicos, producen trastornos parecidos, --
entre los que resalta, la intensa inflamación de la mucosa intestinal, --
con la posterior destrucción del epitelio y edema.

En el hígado se observa degeneración de grasa y necrosis; asimismo se -
ha observado que las lectinas de los frijoles aparecen fuertemente liga
das a los homogenados de la mucosa intestinal de la rata lo que hace su
poner que tiene para este tejido una afinidad semejante a la que mani--
fiesta por los eritrocitos, por lo que el posible efecto tóxico, esté -
relacionado a una mala absorción intestinal.

Ya que las fitohemaglutininas son compuestos termolábiles, muchos de --
los efectos antinutricionales de las leguminosas pueden ser eliminados--
por la aplicación de calor. Presentándose así un incremento general en
el valor nutritivo de las proteínas en las leguminosas (26,51).

II.2.d. OTROS TOXICOS

II.2.d.a. FAVISMO

Es una enfermedad ocasionada por la ingestión de habas comunes (Vicia -
Faba). En la actualidad el término Favismo se usa para describir un --
síndrome hemolítico en individuos susceptibles a la toxicidad por el --
consumo de esta leguminosa (52).

El Favismo se presenta principalmente en países del litoral Mediterrá--
neo. Se observa un defecto genético asociado a la presencia del Favis-

mo; así se ha establecido que debe haber una predisposición individual a esta intoxicación, confirmándose que todas las personas que sufren Favismo, tienen una deficiencia de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en sus glóbulos rojos.

En Vicia Faba se han encontrado dos glucósidos capaces de oxidar el glutatión, estos son la visina y convicina. La acción hemolítica, se origina por el desdoblamiento en la propia semilla o en el canal alimenticio por la acción de la β -glucosidasa (46,52).

Produce anemia hemolítica que se manifiesta en forma grave con fiebre de 39°C.

Los glucósidos responsables de esta enfermedad son resistentes al calor, por lo que es importante tener debidas precauciones para su consumo, se recomienda cocer y eliminar el agua de cocción, ya que son solubles en agua.

11.2.d.b. GLUCOSIDOS CIANOGENICOS

En la actualidad se sabe que la presencia de glucósidos cianogénicos en cantidades trazas, están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Los glucósidos cianogénicos no son tóxicos por sí mismos, sino lo son por el HCN liberado. La forma como se libera el HCN de estos glucósidos es por vía enzimática, llegándose a presentar la autólisis de estos compuestos, sólo cuando se presenta un daño físico de la planta. Es importante hacer notar que para que se libere el HCN del respectivo glucósido cianogénico, es necesaria la participación de la β -glucosidasa. El HCN es un potente inhibidor respiratorio a nivel celular, ya que su-

sitio de acción es sobre la citocromo oxidasa, la cual es el catalizador respiratorio terminal de los organismos aerobios. Es difícil predecir las dimensiones del envenenamiento, ya que la sensibilidad al HCN en los diferentes individuos es muy variable.

Aunque el envenenamiento por HCN suele ocurrir en la alimentación del ganado, no se descarta la posibilidad de que también se presente en el organismo humano, aunque en el tracto digestivo, no existe ninguna β -glucosidasa, pero ni en la propia planta pueden algunas bacterias intestinales descomponer el glucósido dejando en libertad el ácido cianhídrico o por la acción del HCL del estómago sin embargo, el organismo dispone de posibilidades de detoxificación, existe sulfurotransferasa (rodonasa) que cataliza la reacción del HCN con el tiosulfato, sintetizado en el hígado, con lo que se forma sulfina y tiocianato que es eliminado por la orina (17).

II.2.d.c. LATIRISMO

Esta enfermedad es causada por el consumo excesivo de ciertas semillas de leguminosas, en particular de *Lathyrus sativus* (almorta). Es bastante frecuente en la India. También se ha reportado la presencia de un tipo similar de neurolatirismo en caballos, vacas, monos y otros animales, cuando su dieta consiste predominantemente de ciertas especies de *Lathyrus*.

Las características de esta planta *Lathyrus sativus* son las siguientes: Su contenido en proteína es de 24-28% y 58% de carbohidratos, el conte-

nido de grasa es bajo, el contenido de lisina es elevado y contiene poca cantidad de cisteína y metionina (14).

En la actualidad el término latirismo abarca por lo menos dos entidades, una que involucra un desorden del sistema nervioso Neurolatirismo y otra es un desorden del tejido conectivo Osteolatirismo.

II.3. PHASEOLUS VULGARIS

II.3.a. CARACTERISTICAS BOTANICAS

El frijol pertenece a la familia leguminosa, subfamilia papilionoideae, tribu phaseoleae, subtribu faseolineae y género phaseolus. Las principales especies que se cultivan en México son *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común), *P. coccineus* L. (frijol oyocote), *P. lunatus* L. (frijol -- lima) y *P. acutifolius* Gray (frijol tepary). La especie más importante desde el punto de vista agrícola es *P. vulgaris* L. (3).

La planta es anual, la raíz es de tipo fibroso o tuberoso; los tallos son herbáceos, de crecimiento determinado o indeterminado; los dos primeros pares de hojas son simples, y a partir del tercer par las hojas son pinadas trifolieres, la inflorescencia es un racimo; las flores son pediceladas la flor consta de cinco sépalos, cinco pétalos, diez estambres y un pistilo.

En el centro de la flor se encuentre el pistilo, que consta de ovario, estilo y estigma; el fruto es una vaina con dos suturas; cuando está ma duro es dehiscente y puede abrirse por la sutura ventral o la dorsal, -- y si no se abre, es indehiscente.

Parte del estilo permanece a manera de filamento en la punta de la vaina, formando el ápice. Las semillas nacen alternadamente sobre los márgenes de las dos placentas ubicadas en la parte ventral de la vaina, la semilla carece de endospermo y consta de testa y embrión. La testa se deriva de los tegumentos del óvulo y su función principal es la de proteger al embrión; el embrión proviene del cigoto y consta del eje primario y divergencias laterales; el eje primario está formado por un tallo joven, el hipocótilo y la radícula.

El tallo es milimétrico y consta de 3 ó 4 nudos; su porción más baja es el nudo, de donde surgen los cotiledones: Este a su vez es la parte más baja del hipocótilo. El hipocótilo es la zona de transición entre las estructuras típicas del tallo y las de la raíz y la radícula (es la raíz en miniatura); las divergencias laterales del eje embrionario son las hojas, las más conspicuas de las cuales son los cotiledones o primer par de hojas de la planta.

Los cotiledones forman parte voluminosa de la semilla y en ellos se almacenan las proteínas y los carbohidratos, que son la fuente aprovechable del frijol. El segundo par de hojas simples también se distingue en el embrión y surge en el segundo nudo del tallo.

II.3.b. DISTRIBUCION Y ORIGEN

El frijol es nativo del área México-Guatemala y se ha venido cultivando en México por más de 4,000 años, según datos de restos arqueológicos encontrados en las cuevas de la región de Ocampo, Tamaulipas (35) y en la cueva de Coxcatlán, Puebla (44). Este largo periodo en que--

el frijol ha estado bajo domesticación, aunado a la gran diversidad - de condiciones ecológicas que prevalecen en las diferentes regiones - agrícolas de México, ha permitido adquirir a las especies cultivadas - una variabilidad genética muy grande debido a mutaciones espontáneas, recombinación genética y selección.

Con el correr de los siglos, el frijol común se ha extendido por todas las partes del mundo además de América habiéndose ya hecho constatar que su cultivo en México data de seis o más milenios. Posteriormente se domesticaron otras especies del género *Phaseolus* como el --- *Phaseolus coccineus* hace unos 2200 años, el *Phaseolus lunatus* hace -- 5300 años y el *Phaseolus acutifolius* hace 5000 años.

El frijol se ha cultivado en toda América del Norte, Central y del -- Sur desde tiempos remotos, y el gran número de nombres que le dan los indios americanos y el de las variedades cultivadas son una nueva --- prueba de su antigüedad (3,34).

La importancia del frijol común *Phaseolus vulgaris* en América Latina radica en el hecho que es un componente mayoritario de la dieta humana, constituyendo además una de las fuentes de proteína vegetal más - importantes en las regiones tropicales del continente.

II.3.c. USOS Y NOMBRES VULGARES

En la actualidad el frijol es uno de los cultivos más importantes de México, ya que de acuerdo con datos estadísticos, ocupa el segundo lugar en importancia como alimento básico, después del maíz y el sexto-

lugar por el valor de la producción nacional, siguiendo al maíz, algodón, trigo, caña de azúcar y café.

Este tipo de frijol del género Phaseolus vulgaris presenta las siguientes características: Es una planta herbácea anual, con variedades -- trepadoras y enanas de muchos colores blancas, rojas, negras, etc. Es procedente de América Central. Esta leguminosa es hoy en día la -- más importante en México, América Central y en la mayor parte de América del Sur. Se cultiva en la zona templada y en la subtropical, -- así como también en la tropical a grandes altitudes y durante la estación fresca.

Podemos mencionar como uso directo el beneficio que proporcionan en forma de grano, semillas o materia verde en este caso sus vainas verdes que se pueden comer como hortaliza cuando los suministros de esta leguminosa son abundantes, pudiendo ser ya sea para el consumo humano o animal. También influyen en la fertilidad del suelo al aumentar su contenido de nitrógeno por su asociación con las bacterias del rizobium.

Pero en los países tropicales y subtropicales desempeñan además otro importante papel: El de proteger el suelo contra el sol y la lluvia. En cuanto a los nombres vulgares con que se denomina a esta planta -- tenemos: Frijol común, habichuela, judía, frijol pinto, chumbinho, -- opaca.

CAPITULO TERCERO

O B J E T I V O

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la presencia de los ---
inhibidores de tripsina y hemaglutininas, en diferentes estadios del-
desarrollo de la planta del frijol y en diversas partes de la misma;-
a su vez observar si hay alguna correlación con algún componente quí-
mico del análisis proximal, para así tener un mejor conocimiento de -
la posible función de estos factores antinutricionales en esta legu--
minosa.

CAPITULO CUARTO

P A R T E E X P E R I M E N T A L

M A T E R I A L Y M E T O D O S

IV.1. MATERIAL

Para el presente trabajo se estudiaron dos variedades de frijol comestible Phaseolus vulgaris: Frijol canario-107 y Negro-Jamaica los cuales fueron proporcionados por el Departamento de Recursos Genéticos - del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas.

IV.2. DIAGRAMAS DE TRABAJO

IV.2.a. ESTADIOS Y PARTES DE LA PLANTA DE FRIJOL

El material de estudio se fue recolectando a las diferentes etapas -- de su desarrollo como se muestra en forma esquemática en el diagrama- 1.1.

IV.2.a.b. DETERMINACIONES FISICAS Y QUIMICAS EN LAS DIFERENTES PARTES DE LA PLANTA

Una vez teniendo el material de cada una de las variedades, las deter-minaciones físicas y químicas que se realizaron para las diferentes - partes de la planta son las que presentamos en el diagrama 1.1.2.

IV.2.a.c. DETERMINACION DE HUMEDAD ORIGINAL Y ANALISIS PROXIMAL

Para poder determinar la humedad original de cada una de las partes de las dos variedades de frijoles estudiados se desarrolló el diagrama de trabajo 1.1.3. Cabe aclarar que el material con bajo contenido de humedad (15%) se refiere al grano inicial y grano final. Y para el caso del material con humedad intermedia o altas son las hojas, tallo y raíz.

IV.2.a.d. DETERMINACION DE TOXICOS TERMOLABILES

De acuerdo al diagrama 1.1.4. para el caso del material con bajo contenido de humedad como es el grano inicial y final, únicamente requiere de su molienda para tenerlo en un tamaño de partícula adecuado que permita la obtención del extracto de hemaglutininas e inhibidores de tripsina. Sin embargo para las demás etapas en donde ya se contaba con las partes: Raíz, tallo, hojas y flor o fruto el cual presentaba una humedad mayor del 15% se tomó en cuenta la humedad original, que fue lo primero que se hizo y a continuación se muestra en forma desglosada y concisa los pasos que se siguieron para la preparación del extracto sujeto a estudio.

(Diagrama 1.).

ESTADIOS Y PARTES DE LA PLANTA DE FRIJOL
QUE SE ESTUDIARON

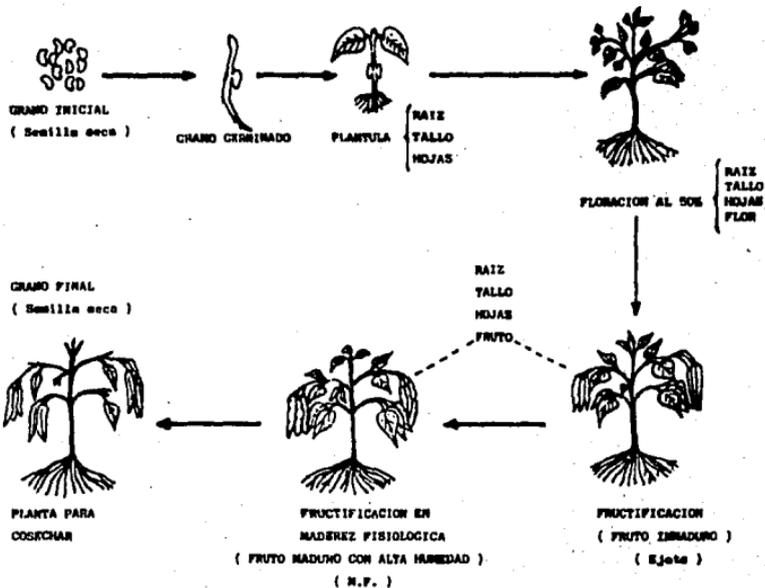


DIAGRAMA 1.1.2

DETERMINACIONES FISICAS Y QUIMICAS
EN LAS DIFERENTES PARTES DE LA PLANTA

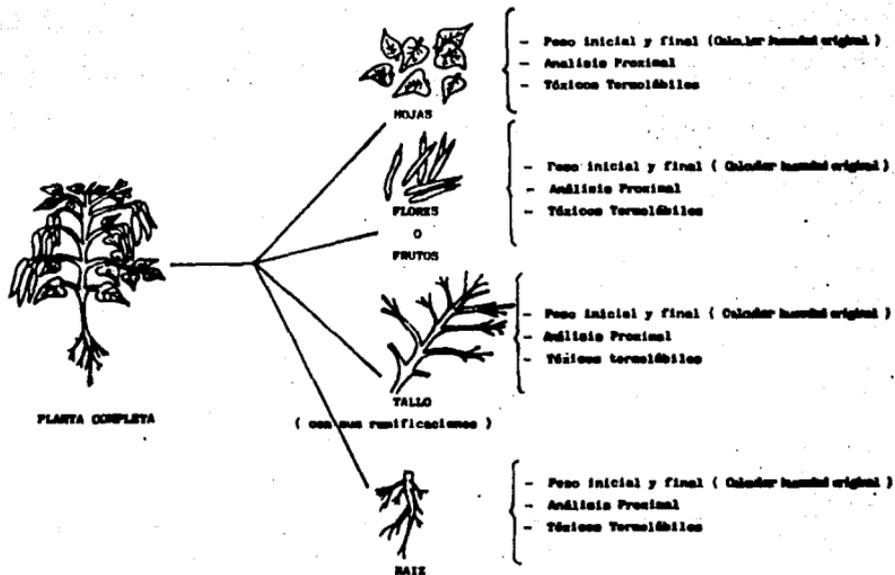


DIAGRAMA 1.1.3.
DETERMINACION DE HUMEDAD ORIGINAL Y
ANALISIS PROXIMAL

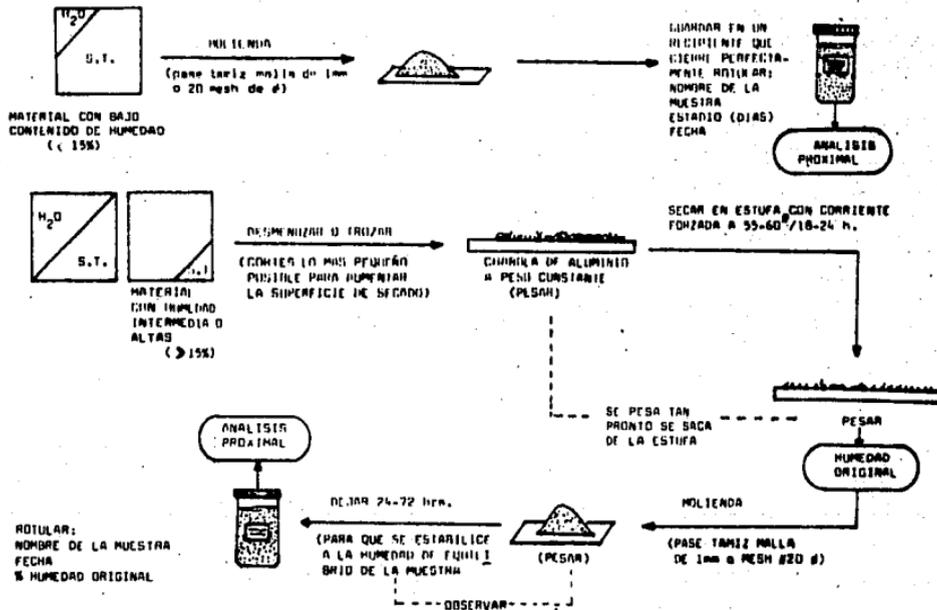
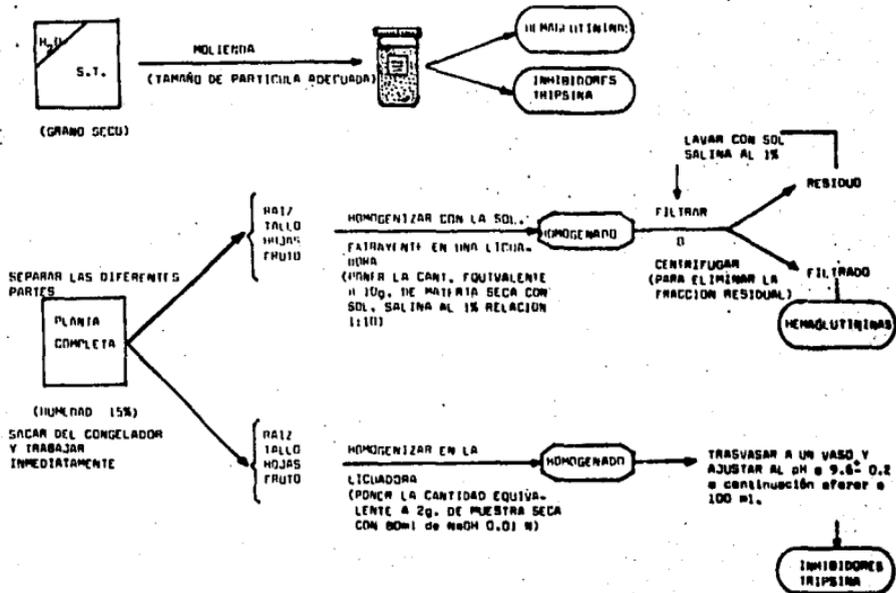


DIAGRAMA 1.1.4.
DETERMINACION DE TOXICOS TERMOESTABLES



IV.3. METODOS

IV.3.a. ANALISIS PROXIMAL

FUNDAMENTO:

El análisis proximal o sistema analítico Weende, se desarrolló en --- Alemania hace más de cien años, en la estación experimental que lleva su nombre. Desde hace mucho tiempo se ideó esta marcha analítica que logra cuantificar cuatro de los cinco grupos, en forma muy genérica. Consiste en determinar humedad, cenizas, proteína cruda, grasa cruda y fibra cruda, por diferencia se calculan los carbohidratos asimilables.

Para llevar a cabo las determinaciones consideradas en el esquema -- propuesto por Weende que se describe en el diagrama (IV.1.), se si--- guieron las técnicas descritas en el AOAC (21), con ligeras modificaciones las cuales se describirán más adelante.

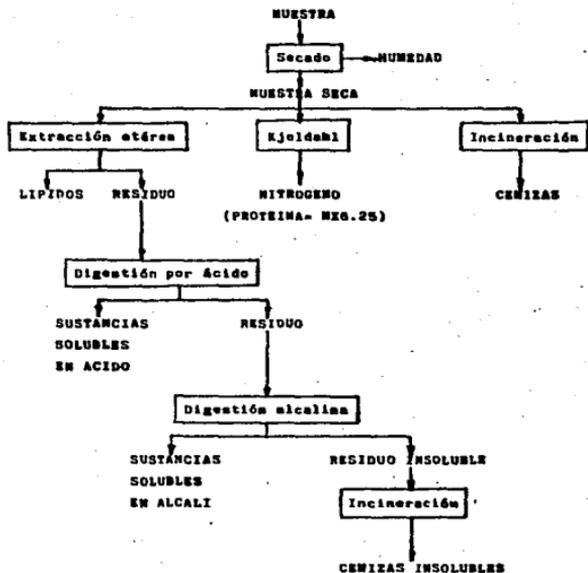
El análisis proximal está diseñado para simular el proceso de diges--- tión; una digestión ácida es seguida por una digestión alcalina. Este tipo de análisis se emplea en todo el mundo para hacer descripciones de los alimentos, y la mayoría de los requisitos legales para produc--- tos alimenticios se basan en el sistema Weende.

DETERMINACION DE HUMEDAD

FUNDAMENTO:

Es necesario conocer la humedad de la muestra para darle un valor real a la cantidad de los otros componentes, este dato también está relacio

DIAGRAMA IV.1
 ESQUEMA GENERAL DE ANALISIS



nado con la edad y estado de conservación de la muestra.

MATERIAL/REACTIVOS:

- Estufa de vacío LAB-LINE mod. 3620.
- Balanza analítica
- Desecador
- Pesafiltros o charolas de aluminio
- Estufa con corriente forzada LAB-LINE, mod. IMPERIAL III

PROCEDIMIENTO:

Primera se pone a peso constante el recipiente en donde se va a efectuar la determinación. Para el caso de charolas de aluminio con cárculas de 2 a 4 horas en la estufa es suficiente.

A continuación se adiciona la muestra (2-5g.), tratando de que presente la mayor superficie de evaporación se introduce en la estufa que se encuentre entre 100-110 °C. El tiempo de permanencia dentro de la estufa depende del material de que se trate. Para el caso de harinas y productos de baja humedad basta con 4-8 horas; sin embargo para productos de alto contenido de agua, como son los tejidos vegetales, se requiere de 24-48 horas y que cuente con una buena corriente de aireación.

Cuando se tienen muestras que a la temperatura de 100-110 °C. se dañan o descomponen, es conveniente realizar esta determinación en una estufa a presión reducida con el fin de abatir la temperatura de ebullición del agua. Para este caso se coloca el recipiente con muestra en una estufa que cuente con un dispositivo para hacerle vacío; hay que-

hacer notar que no es conveniente colocar demasiadas muestras que tengan un alto contenido de humedad (50%).

Cuando se usa el método de secado al vacío, la línea de vacío debe dar por lo menos 25 mmHg; el tiempo de secado es semejante a la determinación en estufa normal, siendo en este caso la temperatura de secado de 60-65°C.

Todas las pesadas que se efectúen deben hacerse inmediatamente después que son sacadas del desecador. Se considera a peso constante una muestra cuando al pesarla en la balanza analítica solo se presente variación en la cuarta cifra decimal.

CALCULOS:

Teniendo el peso de la charola con muestra antes y después de secada, y con el peso de la charola sola, se puede hacer la determinación. Generalmente la pérdida del material que se volatiliza bajo estas condiciones, se le acostumbra denominar como humedad.

$$\% \text{ HUMEDAD} = \frac{P_i - P_f}{m} \times 100$$

Donde:

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

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

m = Peso de la muestra (en gramos)

DETERMINACION DE CENIZAS

FUNDAMENTO:

Las cenizas incluyen todos los compuestos inorgánicos fijos de la

muestra, tanto los originales como los de contaminación.

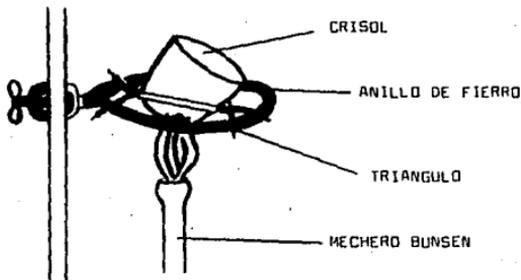
PROCEDIMIENTO

Previamente se deben poner a peso constante los crisoles, los cuales se deben colocar en la mufla a una temperatura de 900°C ., marcándolos con lápiz o cualquier sustancia que no se elimine en el proceso de la cineración.

Al crisol se le colocan de 2-3 gramos de muestra aproximadamente, se pone a carbonizar a la flama de un mechero y bajo una campana, ya que se desprenderá una gran cantidad de humo. Cuando ya no se presente - desprendimiento de humo, se puede introducir el crisol a la mufla, la cual debe encontrarse entre $500-550^{\circ}\text{C}$.

El tiempo de permanencia es muy variable, y depender del material que se esté trabajando.

DISPOSITIVO PARA CARBONIZACION



Cuando se va a determinar cenizas en muestras líquidas o semi-sólidas, es conveniente primeramente eliminar el agua o solvente en baño-maria o estufa de vacío. Si después de la incineración se obtienen cenizas con manchas negras, es conveniente adicionarle unas gotitas de agua - destilada a estas cenizas una vez que estén frías, con el fin de obtener cenizas grisáceas o blancas homogéneas, lo que nos indica el punto final de esta determinación.

Es conveniente dejar enfriar un poco el crisol antes de meterlo al de secador, para su posterior pesada en la balanza analítica.

CALCULOS:

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

$$\% \text{ CENIZAS} = \frac{P_f - P_i}{m} \times 100$$

Donde:

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

P_i = Peso del crisol a peso constante (en gramos)

m = Peso de la muestra (en gramos)

DETERMINACION DE GRASA

FUNDAMENTO:

La determinación del extracto etéreo, incluye una gran variedad de com puestos orgánicos, únicamente unos pocos de ellos tienen interés nutri cional; aquellos que se encuentran en gran cantidad incluyen la grasa-verdadera, ácidos grasos y sus ésteres, vitaminas liposolubles y provi-

taminas tales como son los carotenoides.

El éter etílico, es el solvente más eficaz y se utiliza en el establecimiento de las normas existentes. La desventaja es que el material debe estar libre de agua o alcohol, ya que el éter húmedo disuelve el azúcar y algunos otros carbohidratos; por lo cual es indispensable -- que la muestra se encuentre seca.

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

MATERIAL/REACTIVOS:

- Aparato de extracción Goldfish, LABCONCO
- Cartuchos de celulosa de 22 x 80 mm.
- Estufa de vacío LAB-LINE, Mod. 3620
- Vasos de borde esmerilado KIMAX
- Eter etílico (anhidro)
- Balanza analítica

PROCEDIMIENTO:

Para esta determinación es aconsejable trabajar con la muestra previamente secada; por lo cual a la muestra que se le haya determinado humedad, inmediatamente se trabaja en la determinación de grasa.

Dentro de un cartucho de celulosa se colocan de 2-5 gramos de muestra (dependiendo del contenido de grasa) se tapa con un pedazo de algodón y se coloca en el compartimiento de extracción.

La cantidad de solvente depende del tamaño del dispositivo de extracción, y en términos generales se recomienda la cantidad que produzca dos descargas y una más que solo cubra el cartucho de celulosa pero - sin llegar a sifonear.

Referente a la extracción en el aparato Goldfisch, es un dispositivo comercial que consta de 6 unidades de extracción, las cuales se pueden utilizar todas a la vez.

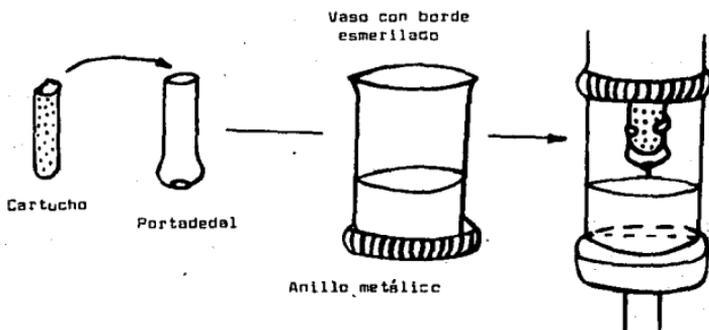
En este caso el cartucho de celulosa se coloca en el portadedal y - este a su vez en el seguro metálico del aparato. A continuación se - colocan aproximadamente 50 ml. del solvente sobre el vaso de borde es merilado, y este con la ayuda del anillo metálico con rosca se asegura el aparato de extracción.

Para el calentamiento en el aparato, se sube la parrilla hasta que -- esté en contacto con el vaso, además se abre la llave del agua para - que circule ésta sobre los refrigerantes. Cuando se trabaja con éter, es conveniente colocar el control de calentamiento en LOW (bajo). El periodo de calentamiento es de aproximadamente 5 horas.

Transcurrido el tiempo de extracción, se bajan las parrillas de calen tamiento, y se colocan los platillos de seguridad, se quita el anillo de rosca y se saca el portadedal con el cartucho, sustituyéndose por el tubo recuperador volviéndose nuevamente a colocar el vaso para pro ceder a calentar, pero en este caso el solvente quedará retenido en - el tubo recuperador.

Una vez que el vaso esté libre de solvente, secar a peso constante en estufa a 110°C. por 30 minutos, enfriar y pesar.

DISPOSITIVO DE EXTRACCION GOLDFISCH



CALCULOS:

A este procedimiento se le conoce como extracto etéreo.

Los pesos del recipiente recolector se deben tener tanto antes como después del procedimiento de extracción.

$$\% \text{ GRASA} = \frac{P_f - P_i}{m} \times 100$$

Donde:

P_f = Peso del recipiente después de la extracción (en gramos)

P_i = Peso del recipiente antes de la extracción (en gramos)

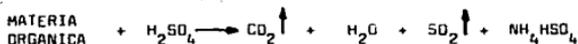
m = Peso de la muestra (en gramos)

DETERMINACION DE PROTEINA

FUNDAMENTOS:

El método empleado usualmente para la determinación de nitrógeno en alimentos, es el método Kjeldahl y varias modificaciones se han desarrollado en la actualidad.

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



La digestión de la muestra para formar el sulfato de amonio, es la parte más difícil de la operación.

Han sido usados muchos agentes catalizadores para aumentar la velocidad de digestión de la muestra; como son el cobre, mercurio y el selenio entre otros. Se han usado con mucha efectividad la combinación de catalizadores como es el uso de cobre-mercurio, cobre-selenio y mercurio-selenio.

Se han adicionado numerosos agentes oxidantes al final del período de digestión para obtener una completa oxidación; en varios tipos de muestras la pérdida de nitrógeno a través de la formación de aminas o de nitrógeno libre se ha presentado por el uso de estos agentes a excep-

ción del uso del peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno debe ser usado cuidadosamente ya que es común preservarlo con acetanilida para reducir la formación de oxígeno y agua.

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

El amoníaco obtenido después de la digestión, es liberado por una gran variedad de métodos; siendo el más usado por acción de un álcali y -- atrapado el amoníaco, liberado en una cantidad conocida de ácido valo rado. Otro método usa la directa estimación del amoníaco, por reac-- ción con el reactivo de Nessler, que nos da en bajas concentraciones un precipitado insoluble coloidal de color naranja.



Este precipitado colorido puede ser estimado colorimétricamente, siem pre y cuando se trabaje a concentraciones bajas.

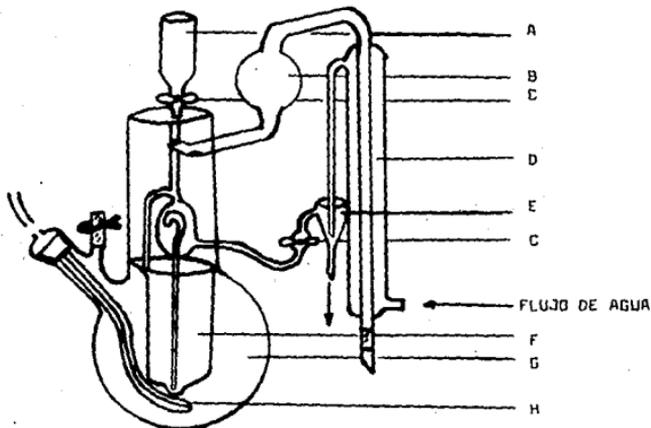
MATERIAL/REACTIVOS

- Digestor TECATOR, mod. ab-20/40
- Dispositivo de microdestilación LABCONCO
- Tubos de digestión TECATOR de 75 ml.
- Mezcla digestiva (a)
- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Sulfato de potasio (R.A.)

Solución de NaOH al 60%

Una vez efectuada la digestión se deja enfriar y se procede a realizar la destilación en el microdestilador, el cual previamente debe estar en proceso de destilación (CALIENTE).

DISPOSITIVO DE MICRODESTILACION



- | | |
|---|---|
| A. Copa de adición | G. Recipiente generador de vapor |
| B. Trampa de Kjeldahl | H. Resistencia de calentamiento eléctrica |
| C. Llave de teflón | |
| D. Refrigerante | |
| E. Trampa de vacío | |
| F. Bulbo o unidad de reacción/destilación | |

La muestra se vacía a la copa de adición del dispositivo y el tubo de digestión se enjuaga dos veces con la mínima cantidad de agua, pasándose este contenido a la unidad de destilación, a continuación se aña de a esta unidad con mucha precaución y lentamente 15 ml. de NaOH al-60%.

Solución de ácido bórico con indicadores (b)

Solución de HCl 0.01 N valorada

Preparación de la mezcla digestiva.

(a) Disolver 3 g. de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 20 ml. de agua destilada; a continuación se agregan 50 ml. de ácido ortofosfórico (H_3PO_4) y una vez que está bien disuelta la sal, se adiciona con mucho cuidado y resbalando por la pared del recipiente 430 ml. de ácido sulfúrico concentrado.

Esta mezcla se deja agitando por aproximadamente 30 minutos.

Preparación de la solución de ácido bórico para fijar el amoníaco.

(b) Se pesan 5 g. de ácido bórico y se colocan en un matráz aforado de 11; se adiciona agua hasta disolverlo y a continuación se -- agregan 35 ml. del indicador A (100 mg. de fenoftealeína aforados a -- 100 ml. con alcohol etílico) y 10 ml. del indicador B (33 mg. de verde de bromocresol + 66 mg. de rojo de metilo aforados a 100 ml. con alcohol etílico). Se ajusta el color a un tono café rojizo con ácido ó alcali según se requiera y se afora a 11 con agua destilada.

PROCEDIMIENTO:

Pesar de 5p-100 mg. y colocarlos en el tubo de digestión, se le agre-

ga aproximadamente 0.5 g. de K_2SO_4 y 3 ml. de mezcla de digestión; - se pone el tubo en el digestor por espacio de 15 minutos y después de ello se saca del digestor para que se enfríe un poco, para poder adicionarle 1.5 ml. de H_2O_2 y nuevamente colocarlo en el digestor que se encuentre a $370^{\circ}C$. Se considera que la digestión está realizada, --- cuando el tubo no muestra manchas y puntos negros y además la mezcla de digestión sea transparente.

LIBERACION DEL NITROGENO AMONIACAL

El destilado se recibe en un vaso de precipitados que contenga 50 ml. del ácido bórico, y la destilación se continúa hasta completar un volumen de 100-125 ml.

Una vez completa la destilación, se saca el vaso de precipitados para su posterior titulación; en tanto que con ayuda de la trampa de vacío del dispositivo se remueve de la unidad de destilación el residuo de la muestra que quedó.

Finalmente el amoníaco atrapado en el ácido bórico, se titula con $0.1 N$ $NaOH$, hasta un vire de color verde esmeralda a un rosa claro.

CALCULOS:

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

$$\% N_2 = \frac{(P-B) \times N \times meq. \times 100}{m}$$

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ N}_2 \times F$$

Donde:

P = ml. de la titulación de la muestra

B = ml. de la titulación del blanco

N = normalidad de la solución de HCl

meq = miliequivalente de nitrógeno (0.014)

m = peso de la muestra (en gramos)

F = factor de conversión (6.25)

Con respecto al factor de conversión debemos aclarar que este depende para cada tipo de muestra, el cual está relacionado al contenido de nitrógeno de la proteína en estudio.

DETERMINACIÓN DE FIBRA

FUNDAMENTO:

La denominación popular de fibra o fibra cruda, se refiere a las partes de la pared celular de los tejidos vegetales, las cuales no pueden ser digeridas por las enzimas del intestino. Durante el paso a través del tracto digestivo, la fibra se hincha y forma una masa gelatinosa, con una muy alta capacidad de retención de agua; con lo cual se facilita el transporte del bolo alimenticio en el tracto digestivo.

Dentro del interés analítico de un alimento, podemos dividir los carbohidratos de origen vegetal en dos partes: Por un lado los carbohidratos no-estructurales como son los almidones, azúcares y fructosanas; y por otro lado los carbohidratos estructurales, tales como la celulosa y hemicelulosa, que corresponde a lo que se denomina fibra -

cruda.

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

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

MATERIAL/REACTIVOS

Vasos de Berzelius de 600 ml. NIMAX

Aparato de digestión LABCONCO

Estufa de vacío LAB-LINE, mod. 3620

Mufia THERMOLYNE, mod. 1500

Aparato de digestión Fibertec marca TECATOR, mod. 1010

Heat Extractor

Crisoles de porcelana y de vidrio-TECATOR

Filtro de lino o papel Whatman # 40

Solución de H_2SO_4 al 1.25% (m/v)

Solución de NaOH al 1.25% (m/v)

Antiespumante (emulsión SIGMA-8)

Alcohol etílico

PROCEDIMIENTO:

Se pesan de 3-5 g. de muestra desengrasada sobre un vaso de Berzelius que contenga 0.5 g. de asbesto (limpio y calcinado) y unas perlas de vidrio. A continuación se le adicionan 200 ml. de H_2SO_4 al 1.25% que esté hirviendo, y unas gotas de antiespumante e inmediatamente se coloca en el aparato de digestión, el cual debe estar previamente caliente; se deja digerir por espacio de 30 min. exactos.

Después de dicho período se vacía el contenido sobre un embudo de -- Buchner que contenga filtro de lino y se realiza la filtración con ayuda de vacío; se lava el residuo con agua destilada caliente, hasta eliminar el ácido (aprox. 500 ml.). Una vez lavado el residuo se -- transfiere nuevamente al vaso Berzelius, se le adiciona unas gotas de antiespumante y 200 ml. de NaOH 1.25% que esté hirviendo y se mantiene en el aparato de digestión por espacio de 30 min. Transcurrido el tiempo se vacía nuevamente al filtro de lino y se filtra, lavando el residuo con agua caliente (aproximadamente 500 ml.), hasta eliminar el álcali y también quitar las perlas de vidrio lavándolas con agua -- para recuperar el material adherido.

Por último se le adiciona al residuo 25 ml. de alcohol etílico. El -- residuo se pasa a un crisol de porcelana (a peso constante) cuidando de pesarlo en forma cuantitativa. Se coloca en la estufa de vacío -- para su secado (aprox. 48 horas) y después se pesa. A continuación -- se carboniza y se introduce en la mufia para su incineración, a $900^{\circ}C$. para después de realizada dicha operación volver a pesar el crisol.

CALCULOS:

*Ya que se requiere de trabajar con muestras previamente desengrasadas, es recomendable usar la muestra a la que se le determinó humedad y ---- grass; por lo cual el peso de la muestra será referido al peso inicial- previo de las anteriores determinaciones.

$$\% \text{ FIBRA} = \frac{P_s - P_c}{m} \times 100$$

Donde:

P_s = Peso crisol con residuo después de secado (en gramos)

P_c = Peso crisol con residuo después de calcinado (en gramos)

m = Peso de muestra (en gramos) (*)

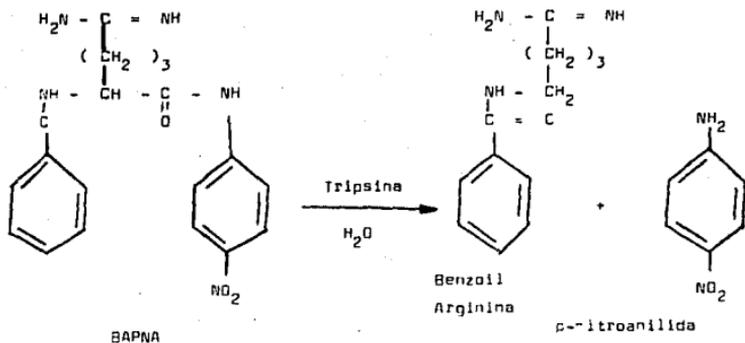
IV.3.b. ANALISIS TOXICOLOGICO

IV.3.b.a. INHIBIDORES DE TRIPSINA

FUNDAMENTO:

Para la determinación de inhibidores de tripsina se utilizó el método de Makade y col. el cual se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso (sol. de NaOH 0.01 N) de la muestra sobre una solución patrón de tripsina.

En dicha técnica, el extracto diluido se pone en contacto con una solución patrón de tripsina y después de cierto tiempo se determina la actividad proteolítica remanente, por medio de un sustrato sintético, BAPNA (Benzoil arginina p-nitroanilina) el cual producirá una coloración que se puede leer en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm. De acuerdo a la siguiente reacción:



Benzoyl arginina p-nitroanilida

La tripsina hidroliza al sustrato sintético liberando benzoyl arginina y p-nitroanilida de color amarillo.

Dicha coloración será inversamente proporcional a la concentración del inhibidor de tripsina presente en los extractos de las muestras. Y por definición arbitraria se dice que una unidad de tripsina (U.T.) es igual a un incremento de 0.01 unidades de absorbancia a una longitud de onda de 410 nm.

MATERIAL

- Potenciómetro CORNING mod. 10
- Parrilla con agitación magnética THERMOLINE
- Baño María GRANT mod. SE-10
- Espectrofotómetro COLLEMAN mod. Junior II-A
- Mezclador de tubos LAB-LINE mod. Super-Mixer

REACTIVOS:

a. Solución de NaOH 0.01 N

b. Solución amortiguadora de TRIS 0.05M, pH 8.2

Se prepara pesando 6.05 g. de TRIS (Hidroximetil-amino metano) y 2.94 g. de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se disuelven en agua destilada y se mezclan en un volúmen total de 900 ml.; se ajusta el pH a 8.2 y se afora a 1000 ml.

c. Solución BAPNA

Esta se prepara pesando 100 mg. de benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida-HCL (BAPNA SIGMA Co. St. Louis Mo.) se disuelven en 2.5 ml. de dimetil sulfóxido, y se diluye a 250 ml. con amortiguador TRIS previamente calentado a 37°C.

Esta dilución debe ser preparada el mismo día y cuando esté en uso -- debe mantenerse a 37°C.

d. Solución patrón de tripsina.

Se pesan con mucha exactitud 4 mg. de tripsina bovina (SIGMA # T-8253) y se disuelven en 200 ml. de HCL 0.001N.

Esta solución 20g. de tripsina/ml. debe ser almacenada en refrigeración y puede durar de 2 a 3 semanas sin pérdida apreciable de actividad.

e. Solución de ácido acético al 30%

METODOLOGIA:

a. Preparación del extracto. Se presenta en forma detallada en el -

diagrama (1.1).

b. Determinación de la actividad. Porciones de 0.0, 0.6, 1.0 y 1.8 ml. de extracto directo o dilución, se miden con pipeta, pesándose a tubos de ensaye por duplicado y se ajusta el volúmen a 2.0 ml. con -- agua destilada y se introducen al baño maría a 37°C. Se adicionan -- 2.0 ml. de solución patrón de tripsina (previamente mantenida a 37°C) y se mantiene en contacto inhibidor-tripsina por espacio de 5 minutos. A continuación se adiciona 5.0 ml. de solución BAPNA a 37°C. a cada -- tubo y se mantiene dicha mezcla de reacción por 10 minutos exactos -- (con cronómetro). La reacción enzimática se detiene por la adición -- de 1.0 ml. de ácido acético al 30% uno de los tubos del duplicado nos servirá para su respectivo testigo, por lo cual después de la adición de los 2.0 ml. de solución de tripsina se adicionará 1.0 ml. de ácido acético al 30% y después de ello se adicionarán 5.0 ml. de solución -- BAPNA, como se observa no es necesario el control de tiempo de éstos-- tubos.

Cuando por la adición del ácido acético el tubo de reacción la solu-- ción se enturbie o forme un precipitado, será necesario filtrar el -- contenido a través de un papel filtro (Whatman # 1); para ello es con-- veniente dejar el tubo en reposo por 15 minutos aproximadamente y --- después filtrar primeramente el sobrenadante; por último se filtra la porción del filtrado gelatinoso.

Sin embargo es necesario cerciorarse que el filtrado esté translúcido. A continuación se tiene la siguiente tabla que nos muestra en forma -- esquemática, la serie de tubos que se deben preparar para poder deter

minar la actividad inhibitoria de nuestra muestra.

CLAVE	ml.Ext.	ml.H ₂ O	ml.STD. Tripsina	ml.BAPNA 37°C.	Ac.scético al 30%
B ₁	1.8	0.2	2.0 + 1.0 ml.	5.0	----
1	1.8	0.2	2.0	5.0	1.0
B ₂	1.4	0.6	2.0 + 1.0 ml.	5.0	----
2	1.4	0.6	2.0	5.0	1.0
B ₃	1.0	1.0	2.0 + 1.0 ml.	5.0	----
3	1.0	1.0	2.0	5.0	1.0
B ₄	0.6	1.4	2.0 + 1.0 ml.	5.0	----
4	0.6	1.4	2.0	5.0	1.0
B _R	0.0	2.0	2.0 + 1.0 ml.	5.0	----
R	0.0	2.0	2.0	5.0	1.0

La lectura en el espectrofotómetro se realiza a 410 nm. y es necesario para cada una de las alícuotas del extracto, primeramente ajustar el aparato a 100% de transmitancia con su respectivo testigo. El tubo-- con 0.0 ml. de extracto es la referencia (40 µg. tripsina/10ml.) --- sobre el cual se basarán los cálculos.

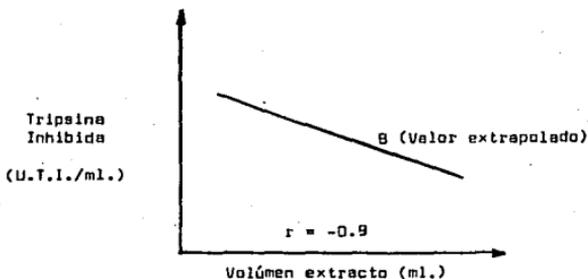
CÁLCULOS:

La lectura de absorbancia (A), directamente la podemos pasar a unidades de tripsina (U.T. previamente definidas):

$$U.T. = A \times 100$$

Ya que tenemos una serie de alícuotas del extracto, tendremos a su vez una serie de valores de U.T. los cuales el restar este valor al dato de referencia, obtendremos los respectivos valores de unidades de tripsina inhibida (U.T.I.) y por consiguiente se puede calcular el valor de U.T.I./ml. de cada una de las alícuotas.

Cuando se hace una gráfica en la que la actividad enzimática inhibida (U.T.I./ml.) es una función de la cantidad de solución inhibitoria, se observa una correlación lineal negativa de la cual por extrapolación al valor cero, de la solución inhibitoria, se obtiene un valor (B).



Este dato extrapolado, es un valor más cercano a la actividad inhibitoria verdadera o real (si se refiere al inhibidor de soya de tipo -- Kunitz).

Es conveniente reportar las unidades de inhibición por mg. de proteína de la muestra; para lo cual es necesario determinar el contenido de proteína en el extracto directo. De no tener el dato anterior se pueden reportar unidades de inhibición con respecto a 1 mg. de muestra:

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

B = Valor extrapolado ó promedio en (U.T.I./ml.)

F = Factor de dilución, lo cual depende de la(s) dilución(es) realizada(s). Cuando se trabaja el extracto directo F = 1.

$$F = \frac{A1}{a1} \times \frac{A2}{a2}$$

A1 = aforo(s)

a1 = alícuota(s)

IV.3.b.b. HEMAGLUTININAS

FUNDAMENTO:

Se realizó de acuerdo al método descrito por Jaffé y col. (29). Es una prueba semicuantitativa basada en la propiedad que tienen las hemaglutininas, presentes en los extractos de las muestras, para aglutinar diferentes tipos de eritrocitos. Esta prueba consiste en hacer una serie de diluciones seriadas del extracto salino de la leguminosa en estudio y observar hasta que dilución se tiene actividad hemaglutinante, por estimación visual.

Para esta determinación se emplearon glóbulos rojos de conejo lavados en solución salina y activados con tripsina, ya que la sensibilidad de la aglutinación se mejora considerablemente con este tratamiento.

MATERIAL

- Agitador magnético con tacómetro marca THERMOLINE
- Centrífuga para tubos DYNAC

- Tubos de centrifuga de 15 ml. con graduación
- Jeringa de 5 ó 10 ml. con aguja # 22.
- Incubadora marca BLUE-M
- Espectrofotómetro COLEMAN Junior 11-A
- Adaptador para celdas de 10 X 75 mm. (acondicionado a una abertura de 1 cm.)
- Microtiter MIT (Cook Eng-Alexander, Virginia USA)

REACTIVOS:

- a. Sangre desfibrinada y lavada
- b. Solución salina al 1%
- c. Solución salina al 0.85%
- d. Tripsina de páncreas bovino (SIGMAT-825')

METODOLOGIA:

- a. Preparación del extracto.

Se presenta en forma detallada en el diagrama (1.1.4)

- b. Preparación de la sangre.

Se extraen 3 ml. de sangre de conejo, se reciben en un tubo vacutainer que contiene citrato de sodio al 3.8%, esto es para evitar la coagulación. La sangre se trasvasa a tubos de centrifuga para lavarla tres veces con solución salina al 0.85%. La relación sangre/solución salina es aproximadamente 1/5.

Se centrifuga a 40 r.p.m. durante 10 minutos. Después se diluye al 4% el paquete de glóbulos rojos, para lo cual se agregan por cada ml. ---

de glóbulos rojos 24 ml. de solución salina al 0.85%.

c. Sensibilización de los glóbulos rojos.

A cada 10 ml. de suspensión de glóbulos rojos al 4% se le agrega 1 ml. de solución de tripsina al 0.1% en solución salina, colocarlos en incubadora por espacio de 1 hora a 37°C. La suspensión se centrifuga - tres veces manteniendo el nivel del líquido, hasta eliminar el exceso de tripsina.

Después del último lavado se resuspende el paquete de glóbulos rojos - al volumen original de la muestra de sangre.

d. Ajuste de la suspensión de glóbulos rojos.

Se toma 1 ml. de la suspensión de glóbulos rojos ya sensibilizada y - se agregan 4 ml. de la solución salina al 0.85%. Se toma la lectura - en el espectrofotómetro a 620 nm. usando un adaptador de celdas que - permiten el paso de celdas de solo 1 cm. de luz y como testigo solu- ción salina al 0.85%.

La lectura que se debe obtener será de $25 \pm 3\%$ de transmitancia, en - caso contrario se realizará la dilución necesaria para que la suspen- sión de glóbulos rojos quede dentro de dicho rango.

e. Microtitulación.

En las placas tipo V de microtiter, colocar en cada pozo de una hila - ra 50 μ l. de solución salina al 0.85% con el pipetero de gota evitan - do tocar las paredes del pozo.

A continuación llenar el microdilutor de 50 μ l. por contacto con la -

superficie del extracto problema y se procede a realizar las diluciones sucesivas en la hilera, introduciendo el microdilutor en el pozo y rotándolo sin excesiva presión.

Por último con un pipetero de gota colocar en cada pozo 50 μ l. de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizados y ajustados. Luego se -- rote la placa en forma circular y se lleve a la incubadora a 37°C. -- por espacio de 1 hora.

f. Lectura.

Una vez transcurrido el tiempo estipulado se coloca la placa de plástico sobre el dispositivo de lectura se observa a través del espejo -- de fondo de los pozos de cada hilera de la prueba. Se reporta la --- máxima dilución que presente la aglutinación.

CAPITULO QUINTO

RESULTADOS Y DISCUSION

Las determinaciones del análisis proximal para el frijol Canario-107- y el Negro-Jamapa se hicieron por triplicado, de donde se obtuvo un promedio que es el que representamos en el Cuadro 1 y Cuadro 2 respectivamente.

Para el caso del material con bajo contenido de humedad como es el -- grano inicial y el grano final, Únicamente se requiere de su molienda para tenerlo en un tamaño de partícula adecuado; sin embargo, para -- los demás estadios plántula, floración al 50%, fructificación ejote, FESMAH, fué necesario recolectar la planta e inmediatamente trabajarla para evitar la pérdida de humedad. Al mismo tiempo se determinó -- el contenido de humedad para poder expresar los resultados tanto en -- base húmeda como en base seca.

En cuanto al contenido de cenizas en el frijol Canario-107 se observa que los elementos minerales inorgánicos contenidos en las cenizas de la planta se presentan principalmente en la parte de hojas, y para -- el frijol Negro-Jamapa es en la raíz donde se encuentra el mayor contenido de cenizas.

Con base en los resultados de proteínas del frijol Canario-107 se --- tiene que del estadio de grano inicial al de germinación hay un ligero aumento y a partir del estadio de plántula donde ya se empiezan a -- analizar las plantas por separado existen diferencias en cuanto al --

contenido de proteínas entre cada una de las partes de los diferentes estadios, observándose que en el grano final se presenta un valor muy cercano al del grano inicial.

Para el Frijol Negro-Jamapa se tiene que del estadio de grano inicial al germinado se tiene un ligero aumento y que del estadio de plántula al de fructificación ejote, el valor más alto se presenta en la parte de hojas, sucediendo que en el estadio de FESMAH en el ejote se tiene un valor más alto y en el grano final se tiene un valor de proteínas superior al del grano inicial.

En cuanto al contenido de grasa en la mayoría de nuestros resultados refiriéndonos al frijol Canario-107 y Negro-Jamapa, se tienen valores que oscilan entre 1-3%, variando para el caso de las hojas que es de un 5-6% debido a que contienen carotenoides que son compuestos lipídicos que se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas principalmente en las hojas.

En la determinación de fibra cruda los valores más altos para el frijol Canario-107 se presentan en las partes de raíz y tallo sin embargo, para el frijol Negro-Jamapa se presenta el valor más alto en las hojas.

Para el contenido de carbohidratos tenemos valores altos tanto para el frijol Canario-107 como para el Negro-Jamapa en los estadios de grano inicial y germinación.

En el frijol Canario-107 en el estadio de plántula el mayor contenido de carbohidratos se presenta en raíz, y en el estadio de floración --

al 50% se tiene que en hojas es donde se presente el mayor contenido de carbohidratos.

En el estadio de fructificación ejote y FESMAH es en el fruto donde se presenta el valor más alto siendo muy cercano al del grano final. Respecto al frijol Negro-Jamapa se tiene que en el estadio de plántula el mayor contenido de carbohidratos se presenta en la raíz y en el estadio de floración al 50% en la flor se encuentra el valor más alto. Para el estadio de fructificación ejote se observa el valor más alto en la parte de tallo y para el estadio de FESMAH el mayor contenido se presenta en fruto observándose que se tiene un valor muy cercano al del grano final, lo mismo que ocurrió en la anterior variedad.

ANÁLISIS PROXIMAL
CANARIO - 107 EN BASE HUMEDA

ESTADIOS	CONTRIBUCION	HUMEDAD	CENIZAS	PROTEINAS (N X 6,25)	GRASA LÍQUIDA	FIBRA CRUDA	CARBONHIDRATOS POR DIFERENCIA
	%	%	%	%	%	%	%
GRANO INICIAL	100	9.63	3.77	23.24	1.26	4.0	58.10
GERMINADO	100	4.51	5.47	27.74	1.36	5.26	55.64
PLANTULA	RAIZ	16.67	6.09	12.55	1.29	27.08	30.32
	TALLO	54.17	4.07	8.25	39.68	1.31	22.25
	HOJAS	29.17	5.09	9.17	39.28	6.49	29.13
FLORACION AL 50%	RAIZ	15.38	4.11	9.05	17.13	1.86	31.38
	TALLO	35.38	3.75	9.56	17.80	1.75	32.73
	HOJAS	49.38	3.71	15.03	20.67	5.08	13.27
FRUCTIFICACION EJOTE	FLOR	3.65	3.31	9.81	23.92	4.08	27.44
	RAIZ	3.65	2.76	10.86	11.76	0.94	45.80
	TALLO	26.28	3.53	7.49	13.51	2.04	35.01
FESMAH	HOJAS	24.82	3.36	14.20	19.93	6.12	12.11
	EJOTE	45.26	4.20	5.83	18.16	2.10	15.30
	RAIZ	3.65	2.76	10.86	9.30	1.25	34.46
GRANO FINAL	TALLO	26.28	3.53	7.49	9.22	1.47	35.69
	HOJAS	24.82	3.36	14.20	17.10	5.98	21.21
	EJOTE	45.26	4.20	5.83	17.27	1.59	13.09

CUADRO 2
ANÁLISIS PROXIMAL
NEGRO JAMAICA EN BASE HUMEDA

ESTADIOS	CONTRIBUCION		HUMEDAD	CENIZAS	PROTEINAS (N X 6.25)	GRASA CRUDA	FIBRA CRUDA	CARBONHIDRATOS POR DIFERENCIA
	%	%	%	%	%	%	%	
GRANO INICIAL	100		7.93	4.19	19.05	1.47	3.88	63.48
GERMINADO	100		5.42	5.68	21.81	1.66	4.60	60.83
PLANTULA	RAIZ	30.77	4.36	14.59	27.4	3.70	11.25	27.2
	TALLO	30.77	4.71	19.18	38.14	3.78	7.58	26.61
	HOJAS	38.46	3.84	14.59	38.41	7.03	7.87	28.26
FLORACION AL 50%	RAIZ	15.86	5.14	34.32	10.71	1.22	11.44	37.17
	TALLO	24.27	6.58	28.19	9.68	1.56	13.07	40.92
	HOJAS	58.57	5.84	9.76	24.14	3.73	18.94	37.59
	FLOR	1.29	4.91	15.67	21.77	3.51	10.0	44.14
FRUCTIFICA CION EJOTE	RAIZ	9.77	4.36	35.32	11.37	1.30	11.91	35.74
	TALLO	28.99	5.42	25.80	8.66	1.39	11.53	47.15
	HOJAS	48.86	4.2	29.72	21.56	4.62	18.39	21.51
	EJOTE	12.38	5.54	21.93	19.29	2.08	7.38	43.78
FESMAH	RAIZ	3.41	6.48	35.21	8.78	1.21	10.86	37.46
	TALLO	16.78	7.13	13.56	6.44	1.24	11.94	39.69
	HOJAS	24.11	6.59	11.60	11.82	5.09	20.49	4.41
	EJOTE	55.70	7.42	11.43	17.54	1.52	5.17	56.92
GRANO FINAL	100		7.78	5.43	23.45	1.19	4.08	58.07

CUADRO 3
 ANALISIS PROXIMAL
 "TOTAL" CANVARIO-1977 EN BASE SECA

ESTADIOS	HUMEDAD %	CENIZAS %	PROTEINAS (N X 6.25)	GRASA CRUDA %	FIBRA CRUDA %	CARBOHIDRATOS POR DIFERENCIA
GRANO INICIAL	9.63	4.17	25.72	1.39	4.43	64.29
GERMINADO	81.0	5.73	29.05	1.45	5.51	58.27
PLANTULA	88.67	9.66	38.65	2.98	20.62	28.09
FLORACION AL 50%	82.93	12.16	22.74	3.47	22.99	34.93
FRUCTIFICACION EJOTE	80.69	8.85	17.83	3.16	21.55	48.61
FESMAH	76.65	10.61	14.79	2.71	25.13	46.75
GRANO FINAL	8.28	4.31	26.58	1.85	7.51	59.71

CUADRO 4
 ANALISIS PROXIMAL
 "TOTAL" NEGRO JAMAICA EN BASE SECA

ESTADIOS	HUMEDAD %	CENIZAS %	PROTEINAS (N X 6.25)	GRASA CRUDA %	FIBRA CRUDA %	CARBOHIDRATOS POR DIFERENCIA
GRANO INICIAL	7.93	4.21	20.69	1.60	4.55	68.95
GERMINADO	85.0	4.86	23.06	1.76	6.01	64.32
PLANTULA	83.95	9.22	36.45	5.16	20.54	28.62
FLORACION AL 50%	82.92	17.22	19.61	2.98	19.36	40.84
FRUCTIFICACION EJOTE	82.40	15.12	11.19	1.19	29.55	34.81
FESMAH	75.10	10.96	15.04	2.50	17.21	54.25
GRANO FINAL	7.82	4.42	25.43	1.29	5.89	62.97

Respecto al estudio toxicológico en el Cuadro 5 tenemos los resultados referentes a la determinación de inhibidores de tripsina del frijol -- Canario-107, en cada etapa de su desarrollo.

De los datos presentados se puede observar que la concentración de estos tóxicos del estadio grano inicial con un valor de 14.93 UTI/mg al estadio de germinación con un valor de 7.70 UTI/mg, existe una diferencia apreciable, lo cual indica que hay una fracción importante de inhibidores de tripsina en la semilla que baja en el estadio de germinación.

En términos generales observamos que en el estadio de germinación el metabolismo celular se incrementa y el contenido de inhibidores de tripsina disminuye.

En el estadio de plántula se empezó a trabajar por separado cada una de las partes de la planta raíz, tallo y hojas, encontramos valores pequeños poco trascendentes.

En los estadios de floración al 50% y fruto inmaduro la actividad anti tripsica es casi nula. Para el caso del estadio fructificación ejote semilla madura con alta humedad lo que llamamos FESMAH en las partes de raíz, tallo y hojas los valores que presentan son muy bajos sin embargo, se observa algo importante en la parte de fruto, donde presenta un valor de 17.92 UTI/mg lo cual nos lleva a pensar que estas sustancias se producen durante el desarrollo del fruto.

Y en el grano final se tiene un aumento de la actividad antitripsica de 18.70 UTI/mg.

Para el caso del frijol Negro-Jamapa en el Cuadro 6 se presentan los-- resultados de la determinación de inhibidores de tripsina, en cada e-- tapa de su desarrollo.

En el grano inicial con un valor de 26.55 UTI/mg. se aprecia una eleva da concentración de estos tóxicos en la semilla y en el estadio de ger minación baja considerablemente a un valor de 2.77 UTI/mg. lo que nos indica un incremento en el metabolismo celular de la planta en el es-- tadio de germinación, esto implica una degradación de proteínas que -- incluye a los inhibidores de tripsina.

Para el estadio de plántula sigue el proceso de síntesis para el creci miento de la planta sin que se manifieste nada relevante respecto a la presencia de inhibidores de tripsina, lo mismo sucede en el estadio de floración al 50% y fruto inmaduro, la actividad antitripsica casi desa parece por completo en las partes de raíz, tallo, hojas y fruto. Sin embargo en el estadio de fructificación ejote semilla madura con alta humedad FESMAH, en las partes de raíz, tallo y hojas, la actividad an titripsica es mínima pero en el fruto vuelve a manifestarse un incre-- mento muy notorio con un valor de 22.67 UTI/mg. muy cercano al del gra no final que es de 24.85 UTI/mg., es donde termina el desarrollo de la planta.

CUADRO 5

INHIBIDORES DE TRIPSINA
 FRIJOL CANARIO-107
 (UTI*/mg. de muestra)

		BASE HUMEDA	BASE SECA
GRANO INICIAL		13.490	14.93
GERMINADO		1.460	7.70
PLANTULA	RAIZ	0.303	2.43
	TALLO	0.184	1.98
	HOJAS	-----	----
FLORACION 50%	RAIZ	-----	----
	TALLO	0.141	0.86
	HOJAS	-----	----
FRUTO INMADURO	FRUTO	-----	----
	RAIZ	0.151	1.36
	TALLO	0.285	1.30
FESMAH	HOJAS	-----	----
	FRUTO	0.247	1.37
	RAIZ	0.368	0.79
FESMAH	TALLO	0.090	0.40
	HOJAS	-----	----
	FRUTO	3.671	17.92
GRANO FINAL		17.150	18.70

UT = Incremento de 0.01 unidades de absorbencia a 410 nm.

* UTI = Unidades de Tripsina inhibida

CUADRO 6

INHIBIDORES DE TRIPSINA

FRIJOL NEGRO JAMAPA

(UTI/mg. de muestra)

		BASE HUMEDA	BASE SECA
GRAND INICIAL		24.440	26.55
GERMINADO		0.420	2.77
PLANTULA	RAIZ	0.164	0.82
	TALLO	0.075	0.73
	HOJAS	0.162	0.69
FLORACION 50%	RAIZ	-----	----
	TALLO	0.021	0.15
	HOJAS	0.115	0.72
	FRUTO	-----	----
FRUTO INMADURO	RAIZ	-----	----
	TALLO	-----	----
	HOJAS	0.099	0.60
FEBRAN	FRUTO	-----	----
	RAIZ	0.216	0.65
	TALLO	-----	----
GRAND FINAL	HOJAS	0.127	0.68
	FRUTO	6.839	22.67
		22.910	24.85

La siguiente etapa fue manejar los resultados de cada variedad tanto de frijol Canario-107 y de frijol Negro-Jamapa como un total, para esto - fué necesario determinar las contribuciones de cada una de las partes - de la planta y tener un valor para cada estadio.

En base a los resultados de los Cuadros 7 y 8 de inhibidores de tripsi - ne como un total, observamos que las dos variedades siguen una misma - trayectoria respecto al ciclo de su desarrollo, empiezan con un alto - contenido de inhibidores de tripsina, baja este contenido en el esta - dio de germinación y esta disminución es más notoria en el frijol Ne - gro-Jamapa. En las etapas de plántula, floración al 50% y fruto inma - duro casi desaparece el contenido de inhibidores de tripsina. Hay un - incremento sustancial en el estadio de FEMAH (Fruto maduro con alta - humedad de madurez fisiológica) continuando este incremento en grano - final hasta completar el ciclo.

Por la única diferencia que aún siendo ambos del mismo género Phaseolus vulgaris, en la variedad de frijol Negro-Jamapa, se observaron valores - más altos de actividad antitripsica. Otro punto importante que mencio - nar es respecto al estadio de grano final con el que se cierra el ci - clo se puede notar que si bien para el caso del frijol Canario-107 se - restablece el valor inicial de actividad antitripsica e inclusive supe - ra el valor, para el caso del frijol Negro-Jamapa es menor el valor en - el grano final respecto al grano inicial, lo cual nos indica que ésta - variedad fué más precóz en su desarrollo y que el contenido de inhibi - dores de tripsina vaya en aumento a medida que pase el tiempo de alma - cenamiento.

CUADRO 7
INHIBIDORES DE TRIPSINA
FRIJOL CANARIO-107 TOTAL
(U.T.I./mg.muestra)

	BASE HUMEDA	BASE SECA
GRANO INICIAL	13.490	14.93
GERMINADO	1.460	7.70
PLANTULA	0.170	1.47
FLORACION AL 50%	0.051	0.30
FRUTO INMADURO	0.190	1.00
FESMAH	1.461	6.26
GRANO FINAL	17.150	18.70

CUADRO 8
 INHIBIDORES DE TRIPSINA
 FRIJOL NEGRO JAMAPA TOTAL
 (U.T.I./mg. muestra)

	BASE HUMEDA	BASE SECA
GRANO INICIAL	24.440	26.550
GERMINADO	0.420	2.770
PLANTULA	0.119	0.743
FLORACION AL 50%	0.078	0.457
FRUTO INMADURO	0.051	0.293
FESMAH	3.190	12.815
GRANO FINAL	22.910	24.850

En el Cuadro 9 se muestran los resultados de la determinación de hemaglutininas en el frijol Canario-107 para cada una de las etapas de su desarrollo. Destaca de esta información que en el estadio de grano -- inicial presenta un alto contenido de hemaglutininas, un título de --- aglutinación de 8.

Así como también en el estadio de germinación el alto título de actividad hemaglutinante se sigue manteniendo, aumenta a un valor de 9 y-- en el grano final para cerrar el ciclo presenta un título de aglutinación de 9.

El alto título de estos estadios se explica debido a que en la mayoría de las especies que contienen este tóxico, las altas concentraciones-- de fitohemaglutininas son localizadas en las semillas, y que a medida que transcurre el tiempo en la semilla madura el alto título de fito-- hemaglutininas disminuye o sea hay una gradual degradación durante el almacenamiento (28).

En la etapa de germinación se presenta un alto título de actividad --- hemaglutinante, donde puede jugar un papel importante en la fisiología y durante el metabolismo celular.

En los estadios de plántula y floreción al 50%, desaparece por completo la actividad hemaglutinante.

Para el caso de fructificación ejote fruto maduro con alta humedad --- FESMAH, se presenta actividad hemaglutinante en la parte de fruto así como en el estadio de fruto inmaduro.

CUADRO 9
 H E M A G L U T I N I N A S •
 FRIJOL CANARIO-107
 (Máxima dilución positiva)

		BASE HUMEDA	BASE SECA
GRANO INICIAL		7.000	8.00
GERMINADO		2.000	9.00
PLANTULA	RAIZ	----	----
	TALLO	----	----
	HOJAS	----	----
FLORACION AL 50%	RAIZ	----	----
	TALLO	----	----
	HOJAS	----	----
	FRUTO	----	----
FRUTO INMADURO	RAIZ	----	----
	TALLO	----	----
	HOJAS	----	----
	FRUTO	1.260	7.00
FESMAH	RAIZ	----	----
	TALLO	0.450	2.00
	HOJAS	----	----
	FRUTO	1.630	8.00
GRANO FINAL		8.250	9.00

• SEMICUANTITATIVO AGLUTINACION

CUADRO 10
 H E M A G L U T I N I N A S
 FRIJOL NEGRO JAMAICA
 (Máxima dilución positiva)

		BASE HUMEDA	BASE SECA
GRANO INICIAL		8.000	9.00
GERMINADO		1.000	8.00
PLANTULA	RAIZ	----	----
	TALLO	----	----
	HOJAS	----	----
FLORACION AL 50%	RAIZ	----	----
	TALLO	----	----
	HOJAS	----	----
	FRUTO	----	----
FRUTO INMADURO	RAIZ	----	----
	TALLO	----	----
	HOJAS	----	----
	FRUTO	----	----
FESMAH	RAIZ	----	----
	TALLO	----	----
	HOJAS	----	----
	FRUTO	1.500	5.00
GRANO FINAL	7.000	8.00	

Para el caso del frijol Negro-Jamapa para cada una de las etapas de su desarrollo en la determinación de hemaglutininas, los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 10 y se observa que lleva la misma disposición que el frijol Canario-107.

En el estadio de grano inicial presenta un título de aglutinación de 9, este alto título se sigue manteniendo en la etapa de germinación -- con un valor de actividad hemaglutinante de 8. En los siguientes estadios de plántula y floración al 50%, no hay actividad hemaglutinante. Es en el estadio de FESMAH donde se aprecia un valor relevante de actividad hemaglutinante con un título de 5 y sigue el aumento de esta actividad para el grano final con un valor de 8 donde se cierra el ciclo. El total de hemaglutininas se muestra en los Cuadros 11 y 12. Se puede observar que las dos variedades muestran un título semejante al encontrado para el frijol escumite Phaseolus acutifolius título de eritrocitos de conejo: 9, indicándonos que el contenido de fitohemaglutininas es de tomarse en consideración. Este alto título de actividad hemaglutinante se sigue manteniendo incluso en la etapa de germinación tanto en el frijol Canario-107 como en el Negro Jamapa, sin embargo -- para los siguientes estadios: Plántula, floración al 50% y fruto inmaduro hay ausencia de actividad hemaglutinante, a excepción del fruto -- del frijol Canario-107 en donde se aprecia la presencia de hemaglutininas. Para el caso del estadio FESMAH en la parte de fruto las dos variedades presentan actividad hemaglutinante. El frijol Canario-107 -- presenta en una fase más temprana la presencia de hemaglutininas.

CUADRO 11
 H E M A G L U T I N I N A S
 FRIJOL CANARIO-107 TOTAL
 (Máxima dilución positiva)

	BASE HUMEDA	BASE SECA
GRAND INICIAL	7.000	8.00
GERMINADO	2.000	9.00
PLANTULA	-----	----
FLORACION AL 50%	-----	----
FRUTO INMADURO	0.610	3.17
FESMAH	0.740	3.19
GRAND FINAL	8.250	9.00

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CUADRO 12
HEMAGLUTININAS
FRIJOL NEGRO JAMAPA TOTAL
(Máxima dilución positiva)

	BASE HUMEDA	BASE SECA
GRANO INICIAL	8.000	9.00
GERMINADO	1.000	8.00
PLANTULA	-----	----
FLORACION AL 50%	-----	----
FRUTO INMADURO	-----	----
FESMAH	0.690	2.78
GRANO FINAL	7.000	8.00

De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis proximal, así como de los tóxicos estudiados se decidió llevar a cabo un estudio estadístico.

Este se hizo con el fin de buscar una posible relación entre el contenido de carbohidratos, hemaglutininas, proteínas e inhibidores de tripsina para el frijol Canario-107 y el Negro-Jamepa a los diferentes estadios de su desarrollo que fueron los siguientes:

1. Grano inicial
2. Germinado
3. Floración al 50%
4. Fructificación ejote
5. Fructificación ejote semilla madura con alta humedad
6. Grano final.

Primero se hizo un análisis de varianza para modelos cruzados con dos criterios de clasificación en diseños completamente al azar balanceados (68) éste método consiste en separar de la variación total observada las diferentes causas o factores de variación que influyen en el experimento y que afectan en distinto grado el efecto de los tratamientos.

A fin de esperar las diversas causas de variación se siguió el siguiente método:

- a. Separar los grados de libertad (G.L.) para cada factor o causa de variación.
- b. Calcular la suma de cuadrados (S.C.) de las desviaciones de las observaciones con respecto a la media, para cada causa de variación.
- c. Calcular las varianzas o cuadrados medios (C.M.) para cada factor de desviación.

- d. Probar hipótesis por medio de la prueba F o relación de varianzas.
- e. Comparar las medias de los tratamientos (discriminación de variables).

Cabe mencionar que para la significancia de los efectos se estableció que:

0.01 SIGNIFICATIVO

0.05 ALTAMENTE SIGNIFICATIVO

TRABAJÁNDOSE A UNA P = 95% α = 0.05

Los resultados de concentración de carbohidratos para el frijol Canario-107 y Negro-Jamapa se muestran en el Cuadro 13 y se representan en la Gráfica 1, se ve que el comportamiento es diferente para las dos variedades.

En el frijol Negro-Jamapa los estadios 3. Floración al 50% y 4. fructificación ejote, el contenido de carbohidratos se mantiene constante volviendo a incrementarse en los dos siguientes estadios. En cambio se ve que el frijol Canario-107 sube notablemente la concentración de carbohidratos a partir del estadio 3. Floración al 50% que en esta variedad fue el valor más bajo.

En el Cuadro 18 se presenta el análisis de varianza de los resultados anteriores y se observan diferencias altamente significativas en el contenido de carbohidratos de las dos variedades.

Examinando el Cuadro 14 y la Gráfica 2, respecto al contenido de hemaglutininas para cada variedad, se ve que en el frijol Negro-Jamapa el

contenido de hemaglutininas se mantiene constante en el estadio 3. Floreción al 50% y el estadio 4. Fructificación ejote. Respecto al Canario-107 se observa un incremento en el contenido de hemaglutininas del estadio 3. Floreción al 50% y el estadio 4. Fructificación ejote.

En el Cuadro 19 se presenta la tabla del análisis de varianza de los datos anteriores que demuestran que hay diferencias altamente significativas entre el contenido de hemaglutininas de las dos variedades.

En el Cuadro 15 y Gráfica 3 se presentan los resultados de contenido de proteínas en las dos variedades de frijol y se encuentran diferencias entre ambas a partir del segundo estadio: Germinación. En el Cuadro 20 se muestra el análisis de varianza de los resultados anteriores.

En el Cuadro 16 y Gráfica 4 se presentan los resultados de contenido de inhibidores de tripsina se observa claramente que el frijol Canario 107 y el Negro-Jamapa muestran comportamientos distintos.

En el Cuadro 17 se muestra el análisis de varianza de estos resultados.

En conclusión se puede decir que en cada variedad el comportamiento fisiológico del frijol es diferente.

Con el fin de averiguar si existía alguna relación entre las variables que se habían estudiado: Proteínas, carbohidratos, inhibidores de tripsina, hemaglutininas, se realizó un análisis de regresión múltiple empleando el método de Stepwise (71).

- V_1 = Contenido de proteínas.
- V_2 = Contenido de carbohidratos.
- V_3 = Contenido de inhibidores de tripsina.
- V_4 = Contenido de hemaglutininas.

Trabajándose a una $P = 0,05$

Al analizar los resultados de esta prueba se encontró que tanto en el frijol Canario-107 como en el Negro-Jamapa existe relación únicamente de la variable V_2 (contenido de carbohidratos) con la V_4 (contenido de hemaglutininas), esto se comprueba con los resultados obtenidos a partir del análisis de varianza.

ANALISIS DE VARIANZA

FRIJOL CANARIO-107

	S.C.	M.C.	F
REGRESION	627.66528	627.66528	
RESIDUAL	32.31820	8.07956	77.68566 **
$r^2 = 0.95103$			

FRIJOL NEGRO-JAMAPA

REGRESION	449.53991	449.53991	
RESIDUAL	15.99302	3.99826	112.43400 **
$r^2 = 0.96565$			

** ALTAMENTE SIGNIFICATIVO

CUADRO 13
CARBOHIDRATOS
MEDIA ARITMETICA
(g/100 g. M)

ESTADIOS	FRIJOL CANARIO-107			FRIJOL NEGRO-JAMAPA		
	\bar{x}	σ	ESM	\bar{x}	σ	ESM
GRAND INICIAL	64.29	0.014	± 0.010	68.95	0.891	± 0.630
GERMINADO	58.27	0.092	± 0.065	64.33	0.502	± 0.355
FLORACION AL 50%	32.52	0.643	± 0.455	46.43	1.209	± 0.855
FRUCTIFICACION EJOTE	58.75	6.512	± 4.605	46.35	0.140	± 0.010
F.E.S.M.A.H.	60.73	0.339	± 0.240	61.49	0.219	± 0.155
GRAND FINAL	59.97	0.452	± 0.320	62.98	0.177	± 0.125

CUADRO 14
HEMAGLUTININAS
MEDIA ARITMETICA
(MAXIMA DILUCION POSITIVA)

ESTADIOS	FRIJOL CANARIO-107			FRIJOL NEGRO-JAMAPA		
	\bar{x}	σ	ESM	\bar{x}	σ	ESM
GRAND INICIAL	2.99	0.1178	± 1.083	2.99	0.1178	± 0.083
GERMINADO	3.00	--	--	2.91	--	--
FLORACION AL 50%	0.71	--	--	0.70	--	--
FRUCTIFICACION EJOTE	2.74	--	--	0.70	--	--
F.E.S.M.A.H.	2.99	0.1178	± 0.083	2.23	0.158	± 0.111
GRAND FINAL	2.99	0.1178	± 0.083	2.83	0.125	± 0.088

CUADRO 15
 PROTEINAS
 MEDIA ARITMETICA
 (g/100 g. M)

ESTADIOS	FRIJOL CANARIO-107			FRIJOL NEGRO-JAMAPA		
	\bar{x}	σ	ESM	\bar{x}	σ	ESM
GRANO INICIAL	25.72	0.021	± 0.015	20.69	0.890	± 0.630
GERMINADO	29.05	0.085	± 0.060	23.06	0.500	± 0.355
FLORACION AL 50%	24.74	0.643	± 0.455	22.89	1.220	± 0.860
FRUCTIFICACION EJOTE	18.95	5.027	± 3.550	20.42	0.014	± 0.010
F.E.S.M.A.H.	18.28	0.346	± 0.245	18.94	0.226	± 0.160
GRANO FINAL	26.36	0.452	± 0.320	25.43	0.176	± 0.120

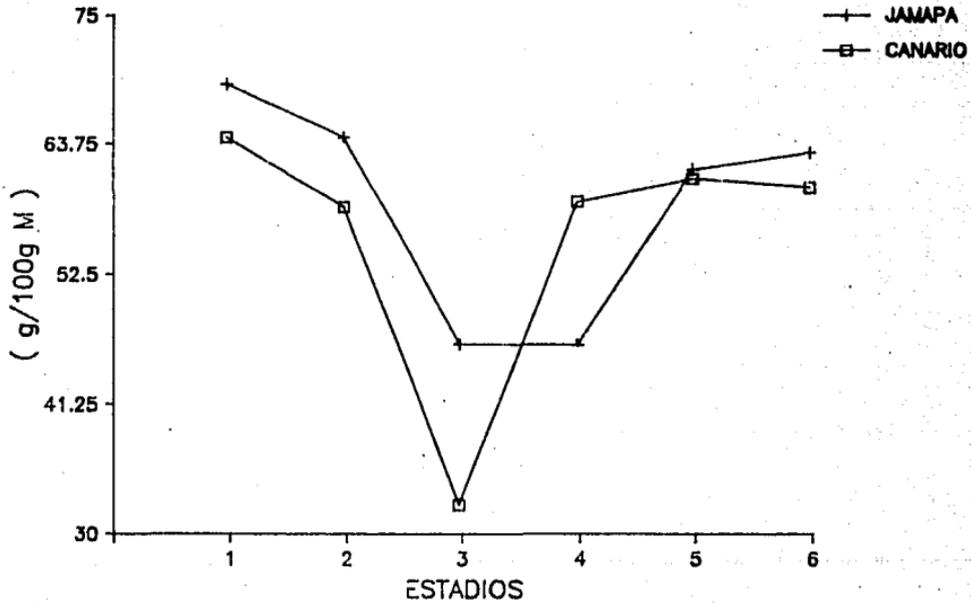
CUADRO 16
 INHIBIDORES DE TRIPSINA
 MEDIA ARITMETICA
 (U.T.I./mg. M)

ESTADIOS	FRIJOL CANARIO-107			FRIJOL NEGRO-JAMAPA		
	\bar{x}	σ	ESM	\bar{x}	σ	ESM
GRANO INICIAL	16.52	2.077	± 1.038	26.62	2.372	± 1.186
GERMINADO	37.86	15.142	± 7.571	7.77	1.529	± 0.765
FLORACION AL 50%	0	--	--	0	--	--
FRUCTIFICACION EJOTE	1.38	0.872	± 0.436	0	--	--
F.E.S.M.A.H.	8.69	4.488	± 2.244	22.86	3.150	± 1.575
GRANO FINAL	18.63	0.695	± 0.347	24.72	2.790	± 1.395

GRAFICA 1

CARBOHIDRATOS

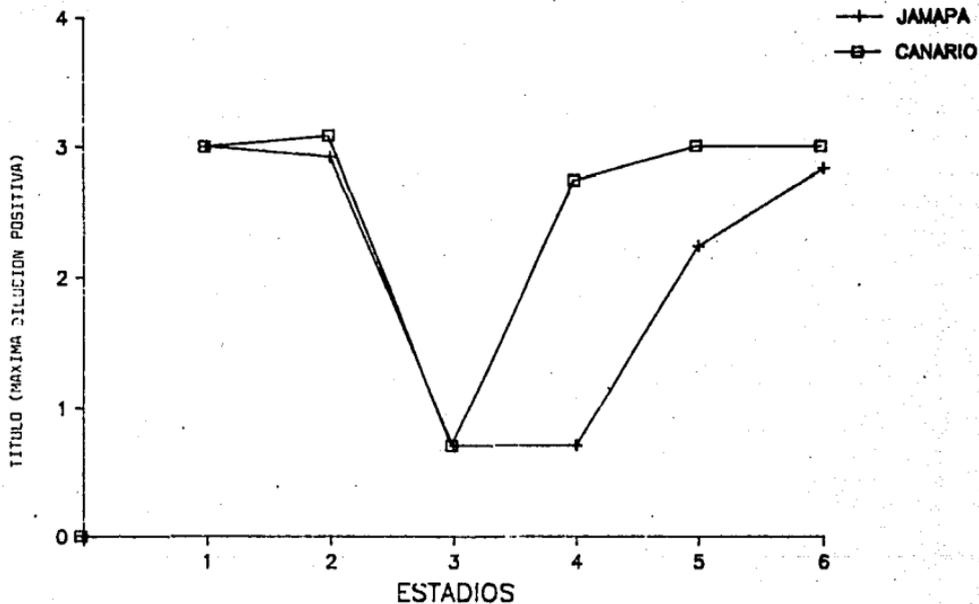
INTERACCION VARIEDAD-ESTADIO



GRAFICA 2

HEMAGLUTININAS

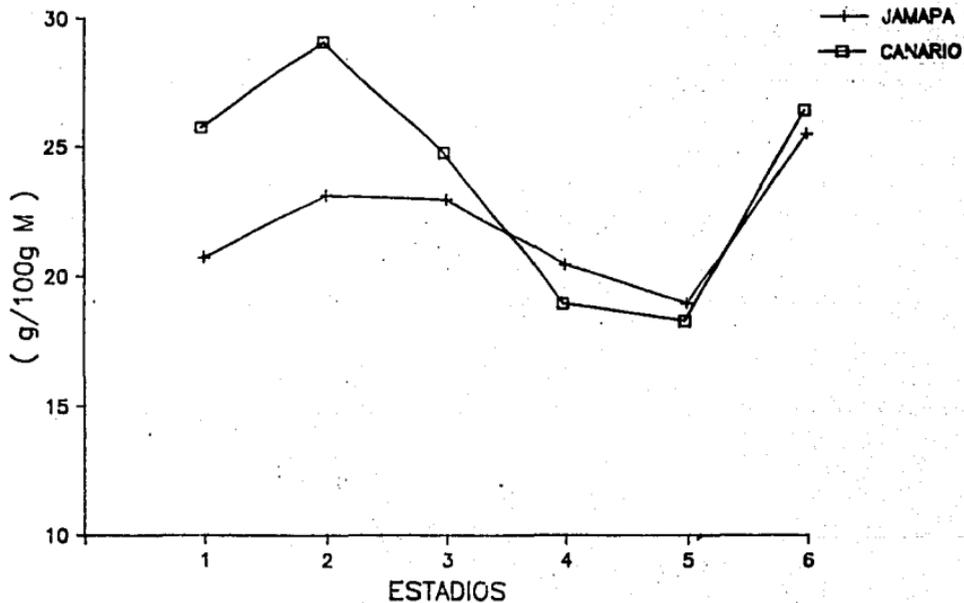
INTERACCION VARIEDAD-ESTADIO



GRAFICA 3

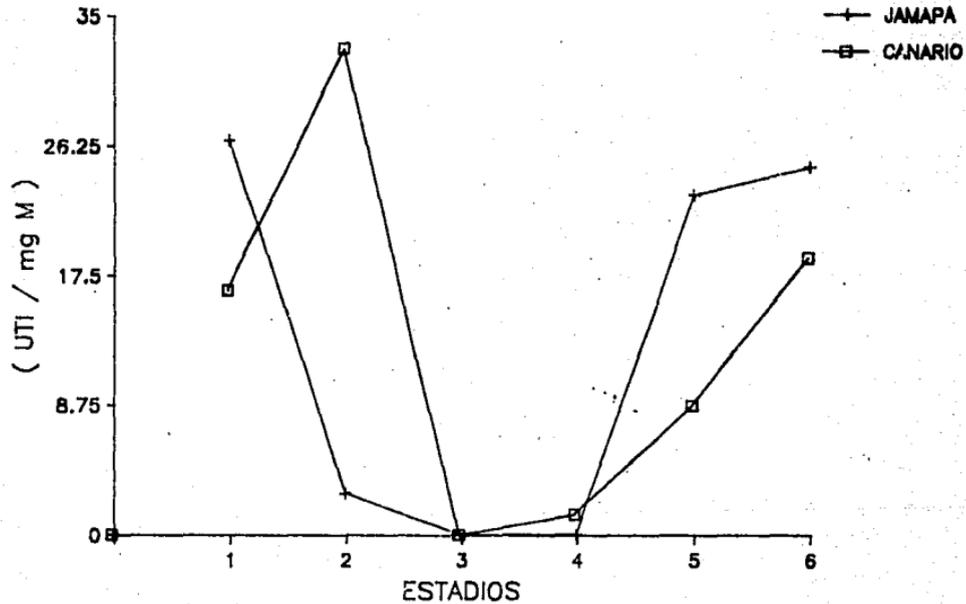
PROTEINAS

INTERACCION VARIEDAD-ESTADIO



GRAFICA 4

INHIBIDORES DE TRIPSINA INTERACCION VARIEDAD-ESTADIO



CUADRO 17
INHIBIDORES DE TRIPSINA

	S.C.	G.L.	C.M.	F
COLUMNAS (ESTADIOS)	4107.18	5	821.44	36.19
HILERAS (VARIEDAD)	0.04	1	0.04	0.001
INTERACCION	2532.32	5	506.46	22.32 **
ERROR RESIDUAL	817.06	36	22.70	

CUADRO 18
CARBOHIDRATOS

	S.C.	G.L.	C.M.	F
COLUMNAS (ESTADIOS)	1899.78	5	379.96	538.39
HILERAS (VARIEDAD)	42.62	1	42.62	60.40
INTERACCION	372.55	5	74.51	105.58**
ERROR RESIDUAL	8.47	12	0.70	

** ALTAMENTE SIGNIFICATIVO

CUADRO 19
H E M A G L U T I N I N A S

	S.C.	G.L.	C.M.	F
COLUMNAS (ESTADIOS)	17.27	5	3.45	430.46
HILERAS (VARIEDAD)	1.64	1	1.64	204.17
INTERACCION	3.13	5	0.63	78.04**
ERROR RESIDUAL	0.09	12	0.008	

** ALTAMENTE SIGNIFICATIVO ($P < 0.01$)

CUADRO 20
P R O T E I N A S

	S.C.	G.L.	C.M.	F
COLUMNAS (ESTADIOS)	194.30	5	38.86	16.33
HILERAS (VARIEDAD)	22.68	1	22.68	9.53
INTERACCION	45.39	5	9.08	3.81*
ERROR RESIDUAL	28.56	12	2.38	

* SIGNIFICATIVO ($P < 0.05$)

CAPITULO SEXTO

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos del Análisis Proximal se observa que en las dos variedades el contenido de proteínas y carbohidratos --- promedio en las distintas partes de la planta varió de 20 a 26% y de 30 al 69% respectivamente.

Los resultados obtenidos en este estudio respecto a los inhibidores de tripsina que mostraron su máxima actividad en el grano seco, viene a -- confirmar que la función de este compuesto es de frenador de los procesos de desarrollo de la nueva planta en donde algunas proteasas endógenas desencadenan el proceso que se inicia en la germinación y que no es observado en ningún otro estadio de crecimiento.

También podría considerarse que su acción sea de defensa hacia proteasas exógenas de bacterias, hongos, insectos, etc.

La actividad de hemaglutininas solamente se encontró en el grano y en el germinado lo que no va de acuerdo con la hipótesis propuesta por otros autores, de que las hemaglutininas juegan un papel importante en la selectividad del rizobium para fijar el simbiote específico para cada leguminosa, aunque no hay que descartar la posibilidad de que la sangre probada en estas dos variedades no haya sido la más específica, ya que de datos anteriores se sabe que todas las hemaglutininas de Phaseolus - Vulgaris aglutinan eritrocitos de conejo.

Encontramos una alta correlación para el frijol Canario-107 ($r = 0.95$) y para el frijol Negro-Jamapa ($r = 0.96$) entre el contenido de hemaglutininas y el contenido de carbohidratos.

Ya que en el desarrollo de este trabajo se vió que el contenido de hemaglutininas y carbohidratos se localiza principalmente en los estadios de grano inicial, grano final y germinación, lo que nos hace suponer que las hemaglutininas tengan en la planta de frijol la misión de ligar a los carbohidratos consiguiendo su almacenamiento.

La conclusión de este trabajo es de que tanto la actividad de los inhibidores de tripsina como de las hemaglutininas, así como de los carbohidratos investigados en las distintas partes de las plantas y en los distintos estadios de su desarrollo, únicamente se encuentra en mayor concentración en el fruto seco.

CAPITULO SEPTIMO

B I B L I O G R A F I A

1. ALQUIMIST, H.J. and MERRIT, J.B.; Effect of crystalline trypsin on the raw soybean growth inhibitor: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 83: 269 1953.
2. AGUILAR, C.A. y ZOLLA, C. Plantas tóxicas de México. I.M.S.S. --- Subdirección Gral. Médica, México, 1981.
3. AYKROYD, W.R. y DOVGHIV, J.; Las Leguminosas en la alimentación humana; FAO: Estudios sobre nutrición #19, pag. 1-19, 70-96, 114-127, Roma 1977.
4. BARROW, M.V., SIMPSON, C.F. and MILLER, E.J.; Lathyrism (a review); Quart. Rev. Biol. 49(2), 101-128 1974.
5. BATEMAN, J.V.; Nutrición animal (Manual de métodos analíticos); -- Herrero Hnos. pag. 110-112 y 170-278, México, 1970.
6. BRESSANI, R. and ELIAS, L.G.; Legume Foods. In: New protein foods; - Altschul, A.M (ed.); Academic Press, Vol. 1A, pag. 230-297, N.Y., -- 1974.
7. BRESSANI, R. MARINA FLORES and L.G. ELIAS; Acceptability and value of foods legumes in Latin America. Cali, Colombia Series Seminars - # 2E, pag. 161-187, 1973.
8. BOWMAN, D.E.; Fractions derived from soybean and navy beans which -

- retard the tryptic digestion of casein. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 57; 139-140, 1944.
9. BOYD, W.C. and REGUERA, R.M.; Hemagglutinating substances for human cell in various plants; J. Inmud. 62, pag. 333, 1949.
 10. BOYD, W.C. and SHAPLERGH, E.; Specific precipitating activity of -- plant agglutins (Lectins), Science 119: pag. 419-421, 1974.
 11. CONN, E.F.; Cyanogenetic glucosides. In: Toxicants occurring natural ly in foods; National Academy of Sciences (Eds.); 2th. edition, --- pag. 290-308, Washington, D.C., 1973.
 12. COVY, J.M.; Natural foods toxicants; nutr. Rev. 32, 321-332, 1974.
 13. CHURCH, D.C. and POND, W.G. Basic animal nutrition and feeding; -- O & P Books, pag. 8, Oregon, U.S.A., 1976.
 14. DUBOEDI, M.P., B.G. PRASAD: An epidemiological study of Lethyris - in the distric of Rewa, Madhya Pradesh Indian S. med. Res. 52, (81) 1964.
 15. FARRÉ, R. y TRUHAHT, R.; Tratado de toxicología; Paraninfo, S.A., -- Vol. 1, pag. 48-66 y 311-332 Madrid, 1976.
 16. FLORES, MARINA; R. BRESSANI y L.G. ELIAS. Factors and Tactics in-- fluencing consumer food habits and patterns. In: Potencial of --- field beans and other legumes in Latin America. Cali, Colombia, Cen tro Internacional de Agricultura Tropical, 1973. pp. 88-114, (CIAT Series Seminar).

17. HADORN, B., ROYER, D. and TURNER, B.I.; Chemotaxonomy of the -- leguminosae; Academic Press, pag. 1-25, London, 1971.
18. HAM, W.E. & SANDSTEDT, R.M.; A proteolytic inhibiting substance - in the extract from unheated soybean meal. J. Biol. Chem. 154:505, 1944.
19. HERB HERD, K. and J.L. ORBISON; Lathyrism in the fetal rat Evi--- dence for impairment of elastin formation. Arch. Path. 81 (1966) 60.
20. HONDUAR, P.M. SHIH, C.V. & LIENER, I.E.; The inhibition of the grow th of rats by purified hemagglutinin isolated from Phaseolus vulga- ris. J. Nutr. 77:109-114, 1962.
21. HORNITZ, W.; Official Methods of Analysis of the AOAC 11 Edition- AOAC; Washington, U.S.A. 1973.
22. HUGHES, M.A.; Studies on the β -glucosidase system of trifolium -- repens L.J. Exp. Bot. 19; 427, 1968.
23. HUGHES, D.W. and GENEST, K.; EYJOLFSSON, R.; Recent advances in - Chemistry of cyanogenic glucosides Fortsch. Chem Organ. Naturist. 28. 74-108. 1970.
24. Instituto Nacional de la Nutrición; La alimentación en el medio-- rural de México; segunda encuesta nacional de alimentación, INN. Div. Publicaciones México, 1980.
25. JAFFE, W.G.; Hemagglutininas y Tóxicos presentes en el frijol. -- Exp. 18, 76, 1962.

26. JAFFE, W.G. y BRUCKER, O.; Toxicidad y especificidades de diferentes fitohemaglutininas de frijoles; Arch. Latinoamericano. Nutt. - 22, 267-281, 1972.
27. JAFFE, W.G. Factores tóxicos en leguminosas; Archivos Latinoamericanos de Nut. 18, 205-218, 1968.
28. JAFFE, W.G.; Hemagglutinins (lectins). In toxic Constituents of -- plant Foodstuffs. Liener, E.I. (Ed), - Academic Press, 2a. ed. -- New York, 1960, vol. 2 pp. 73-98.
29. JAFFE, W.G. & GAEDE, K.; Purification of Toxic Phytohemagglutinin, from black beans (*Phaseolus vulgaris*). Nature (London) 183; 1329, 1959.
30. JAFFE, W.G. and BRUCKER, O.; Toxicidad y especificidad de las diferentes fitohemaglutininas de frijoles. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 22; 267-281, 1972.
31. JAFFE, W.G.K.; Hemagglutinins Haning: Fractionation of proteins - from kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). Arch. Biochem. 109 (1965)-80.
32. JAFFE, W.G.; Protein digestibility and trypsin inhibitor activity of legume seeds. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 75:219-220. 1950.
33. JAFFE, W.G.; Über phytotoxine aus Bohnen-Arzneimittel Forsch 10: - 1012, 1960.

34. KAPLAN L.: Archeology and domestication in American Phaseolus (beans) Econ. Botany 19 (4): 358-368, 1965.
35. KAPLAN, L. y R.S. MARC NEISH; 1960 Prehistoric bean remains from caves in the Ocampo Region of Tamaulipas, México. Bot. Mus. Leaflets Harvard University 19 (2): 33-56.
36. KRANH, J. and S.C. STEVENS; Lima bean trypsin inhibitor limited proteolysis by trypsin and chymotrypsin. Biochem. 9(13) : 2446-2652, 1972.
37. KRAITZER, F.H.; Soybean protein-mineral interrelationships Fed. Proc. 24, 1965.
38. KUNITZ, M.; Crystallization of trypsin inhibitor. Science 101: 668-669, 1945.
39. LIENER, I.E.; Seed Hemagglutinins: Econ. Bot. 18: 27-33, 1964.
40. LIENER, I.E.; Soyin, a toxic protein from the soybean. I. Inhibition of rat growth. J. Nutr. 5: 527, 1953.
41. LIENER, I.E.; Toxic constituents of plant foodstuffs; Academic Press, 2th. Edition, 23-102, 436-441, N.Y. 1980.
42. LINDER, E.; Toxicología de los alimentos; Acrisis, pag. 1-6 y 13-23, Zaragoza, 1978.
43. LIS, H., N. SHARON, E. HATCHALSKI; Isolation of a mannose containing glycopeptide from soybean hemagglutinin. Biochem. Biophys. Acta (Amst.) 83 (1964) 376.

44. MAC. NEISH, R.S.; 1964. The origins of new world civilization ---
Scientific American 211 (5) 37-39.
45. MATEUS VENTURA, M. & XAVIER FILHA, J.; A trypsin inhibitor from ---
black eyed pea (*Virginia sinensis*). I. Purification and partial --
characterization. An. Acad. Brasil. Ciencias 38:553-566, 1966.
46. MAGER, J., CHEVIDON, M. and GLASER, G.; Favism in Toxic constituents
of plant foodstuffs; Liener, I.E. (Ed); Academic Press, pag. 265--
294. N.Y., 1980.
47. MELNICK, D., OSER, B.L. & WEISS, S.; Rate of enzyme digestion of -
proteins as a factor in nutrition. Science 103:326-329, 1946.
48. MEYER, L.M.; Food Chemistry. Van Nostrand. pag. 129-133, N.Y. ---
1963.
49. MONTGOMERY, R.D.; Cyanogens. In toxic constituents of plant food--
stuffs. I.E. Liener (Ed). Academic Press, New York, 1969.
50. MORSON, W.T., J.W.M. WATKINS; The inhibition of the Hemagglutinins
in plant seeds by human blood group substances and simple sugars.
Brit. J. Exp. Path. 34 (1953). 94.
51. MUELENBAERE, H.J.M.; Toxicity and Hemagglutinating activity of legu-
minae; Nature 206, 827-828, 1965.
52. Nutrition Unit, WHO; Favism and broad (*Vicia faba*). In: The PAG --
compendium; Sach, N.Y. (Ed.) John Wiley & Sons, Vol. D. pag. D211-
D213, N.Y., 1975.

53. NOBEL, P.: Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human Leukocytes. *Cancer Res*, 20, (1960), 462.
54. PEARSON, D.; *The Chemical Analysis of Foods*. 7th. edition, pag. 14 15, Churchill Livingstone, N.Y., 1976.
55. PADMANABAN, G.; Lathrogens, In: *Toxic constituents of plant food-stuffs*; Liener, I.E. (Ed.); Academic Press, pag. 239-264, N.Y., --- 1980.
56. RACHIS, J.J., HONING, D.H., SESSA, J.D. and STEGGERDA, F.R.; Flavor and flatulence factors in soybean protein products; *J. Agr. Food -- Chem.* 18 (6) 977-982, 1970.
57. R.O. WHYTE, G. NILSSON-LEISSNER y H.C. TRUMBLE. Del Departamento de Fitotécnica de la Dirección de Agricultura; *Las Leguminosas en la Agricultura*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. No. 21; pag. 1-20.
58. SHOJI, D. and I. ITOJUKI. Studies on soyabean trypsin inhibitors. *J. Biochem.* 83: 747-753, 1978.
59. SINHA, S.K.; *Las leguminosas alimenticias*; FAO, Estudios de producción y protección vegetal No. 3, pag. 1-8, Roma, 1978.
60. STANTON, W.R. Factors affecting the limitation of the cultivation-- of grain legumes in tropical territories. *Proc. Nutr. Soc.*, 29(1): - 57-62, 1970.
61. TAUBER, H., KERSHAW, B.B. & WRIGHT, R.D.; Studies on the growth -- inhibitor fraction of lima beans and isolated crystalline heas --- table inhibitor J.B.

62. TECATOR, Inc.; Manual of Digestion System DS 40 (manual). pag. 6--21 Colorado, 1979.
63. TECATOR, Inc.; Tesetopic No. 41, Colorado 1979. pag. 1-5.
64. TOMS, G.C. and WESTERN, A.; Phytohemagglutinins Harbone, J.B. BOUTER D. and B.L. TURNER. In: Chemotaxonomy of the leguminosae (Ed). Acad. Press. 1971, London pp. 376-456.
65. Toxic Factors in Edible Legumes and their elimination. IRVIN E. LEINER; In: The PAG compendium; Sach, N.Y. (Ed) John Wiley & Sons, Vol. D. Pag. D183-D204, 1975.
66. WAGNER, L.P. & RIEHM, J.P.; Purification and partial characterization of a trypsin inhibitor from the navy bean. Arch. Biochem. -- Biophys. 121: 672-677, 1967.
67. WINTER, A.L. y WINTER, K.B.; Análisis de alimentos. Ed. Continental, S.A. México (1956) pag. 65-81.
68. ROBERTS M. DEVLIN; Fisiología Vegetal. 3a. Edición (1980) Ed. Omega, pag. 263-277.
69. DANIEL W.W.; Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 3a. edición. Editorial Limusa. pag. 244-266 y 332-333. México, 1978.
70. KAKADE, K.L., SIMONS, N. and LIENER, I.E.; An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples, Cereal Chem. 46, 518,526, 1969.

71. NORUSIS MARISA J.P.; SPSS-PC for the I.B.M. PC-XT-AT pag. C-135, -
C-144, 1986 Editorial SPCC-I.N.C.