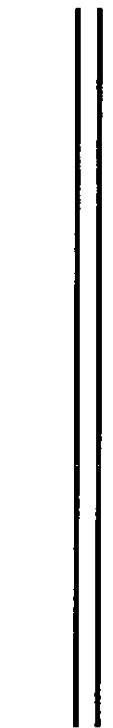


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CAMBIOS EN EL CONTENIDO DE TRES FACTORES ANTINUTRICIONALES
EN DIFERENTES ETAPAS DEL DESARROLLO DEL FRIJOL NEGRO JAMAPA
(Phaseolus Vulgaris)

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A:
ADRIANA CRUZ WHITE



MEXICO, D.F.

2001



2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis padres
Porque sin su acertada guía
no hubiera podido alcanzar esta meta.

A mi hermano
Por todo su cariño
Y apoyo incondicional

A mis abuelos
Por que su recuerdo
Me acompaña siempre

A mis tíos Felipe, Francisco, Enrique y Antonio
Por todo su apoyo

A Miriam, Mónica, Sara, Susana, Hazel y Sandra
Por su amistad sincera e incondicional

A la Maestra Angela Sotelo
Por haberme enseñado muchas cosas
más que nutrición.

A Rosa María Argote
Por ayudarme en todo momento

A mis maestros
Por todas sus enseñanzas

A todas las personas
Que de alguna manera ayudaron
Al logro de este objetivo...
y a tantos y tan pocos

“Que significa la enfermedad para un caballero andante, que importan las heridas, pues siempre que caiga deberá levantarse de nueva cuenta para desesperación de los malvados”

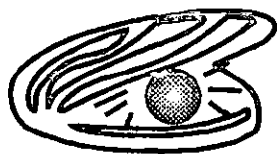
El Hombre de la Mancha.



Tesis

PERLA

IMPRESORES



A sus órdenes:

REP. DE CUBA No. 99-5
COL. CENTRO HISTORICO
TEL. 521-36-55

Jurado Asignado

Presidente: M. en C. Angela Sotelo Lopez

Vocal: M en C. Bernardo Lucas Florentino

Secretario: I. Maria de Lourdes Flores Tellez

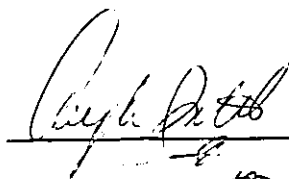
1er. Suplente: Lucia Cornejo Barrera

2° Suplente: Leticia Gil Vieyra

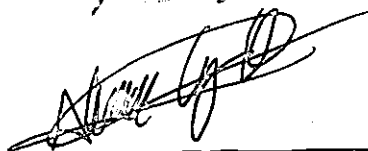
Lugar donde se desarrollo el tema:

Laboratorio 111 conjunto E departamento de farmacia,
Facultad de Quimica . UNAM

ASESOR: M. en C. Angela Sotelo Lopez.



SUSTENTANTE: Adriana Cruz White



ÍNDICE

1. -INTRODUCCIÓN.....	2
2.- GENERALIDADES.....	4
-FACTORES TÓXICOS EN LAS LEGUMINOSAS.....	4
-TANINOS.....	4
-LECTINAS.....	7
-INHIBIDORES DE TRIPSINA.....	9
-DETERMINACIÓN DE LAS ETAPAS DE DESARROLLO DEL FRIJOL.....	11
3. - OBJETIVO.....	13
4. -PARTE EXPERIMENTAL.....	14
- MATERIAL UTILIZADO.....	14
- DIAGRAMA DE TRABAJO.....	15
- METODOS ANALITICOS.....	16
- DETERMINACIÓN DE HUMEDAD.....	16
- DETERMINACIÓN DE PROTEINA.....	16
- DETERMINACIÓN DE INHIBIDORES DE TRIPSINA.....	19
- DETERMINACIÓN DE LECTINAS.....	24
- DETERMINACIÓN DE TANINOS.....	28
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
6.- CONCLUSIONES.....	55
7. -BIBLIOGRAFÍA.....	58

INTRODUCCIÓN

Los factores antinutricionales (FAN) son compuestos de diferentes estructuras químicas que se encuentran en organismos vegetales y animales aunque es más frecuente su presencia en los primeros. El efecto adverso de estos compuestos es que disminuyen la disponibilidad o provocan la pérdida de algunos nutrientes esenciales.

Según la naturaleza y las propiedades biológicas de los factores antinutricionales pueden manifestar su actividad en diversas fases:

-Durante la ingestión, por ejemplo, cuando se trata de enzimas liberadas por la masticación, que destruyen algunos nutrientes y cuando los FAN inhiben las hidrolasas digestivas.

-Durante el metabolismo, cuando la destoxicación de la sustancia implica una pérdida de moléculas endógenas(1).

Desde el punto de vista nutricional los FAN se clasifican en función del tipo de nutrientes con los que interfiere. Por ejemplo:

- Los que afectan la utilización digestiva o metabólica de las proteínas y carbohidratos.
- Los que interfieren en la asimilación de los minerales.
- Los que inactivan o aumentan el requerimiento de vitaminas

Algunos de los FAN más conocidos son: inhibidores de proteasas y amilasas, lectinas o hemaglutininas, taninos, fitatos y glucosinolatos entre otros.

Los factores antinutricionales han sido muy estudiados en las semillas de leguminosas que es donde más abundan pero hay poca información sobre los cambios de concentración de estos compuestos durante el desarrollo de las plantas, es por ello que se desarrolló la siguiente tesis.

En este trabajo se plantea conocer más sobre la fisiología de las leguminosas en cuanto a la concentración de tres factores antinutricionales en las diferentes etapas de desarrollo de las dos variedades de frijol *Phaseolus vulgaris*: el frijol negro jamapa y una variedad holandesa productora de ejote.

Se eligió esta variedad por ser muy consumida en México, en este trabajo se compara el frijol negro jamapa con una variedad europea de frijol utilizada para producir ejotes, dado que no existen trabajos similares al presente que permitan extender las comparaciones implicadas no se puede comparar con ninguna otra variedad de frijol.

GENERALIDADES

FACTORES TÓXICOS EN LAS LEGUMINOSAS

Dentro de las características de las leguminosas se encuentra que son buena fuente de energía, tienen un alto contenido de proteína, contienen diversos minerales y vitaminas, tienen la capacidad de adaptarse a diferentes climas y enriquecen el suelo de cultivo gracias a que las bacterias que se alojan en los nódulos de sus raíces fijan el nitrógeno atmosférico entre otras, pero también son portadoras de factores tóxicos que limitan su aprovechamiento, algunos de estos compuestos son: Los inhibidores de tripsina, las lectinas o hemaglutininas (enterotoxinas), los glucósidos cianogénicos, las saponinas, los taninos, los factores bociogénicos, los factores productores de latirismo, alcaloides, aminoácidos raros, factores anticoagulantes y otros inhibidores de enzimas(1). Los factores antinutricionales que se presentan mas frecuentemente en el frijol son los inhibidores de tripsina, las hemaglutininas, las saponinas y los glucósidos cianogénicos.

Debido a que algunos de los factores antinutricionales son de naturaleza proteica pueden ser destruidos mediante un tratamiento térmico prolongado; sin embargo, hay casos de factores antinutricionales de bajo peso molecular que presentan termoresistencia como los taninos, las saponinas y los promotores de flatulencia.

TANINOS

Tanino es el nombre genérico aplicado a una serie de polifenoles que se encuentran en las plantas y se clasifican como hidrolizables y condensados(1). Los taninos hidrolizables son sujetos a ruptura por tanasas estereolíticas en el tracto digestivo. Los productos resultantes incluyen glucosa, ácido elágico, ácido quínico y ácido gálico que es fácilmente absorbido y excretado por la

orina. El galato que se consume en la dieta puede tener efectos antinutricionales, como la disminución de la palatabilidad de los alimentos y de la velocidad de crecimiento en pollos (2-4).

El contenido de taninos en las semillas es muy variable y por su sabor astringente se ha supuesto que tienen una función importante en los mecanismos de defensa de las plantas contra insectos y predadores herbívoros (5).

Los taninos se localizan en las plantas en células específicas que se encuentran en el parénquima cortical rodeando el tejido vascular en las raíces, no se encuentran en las puntas de las raíces o en meristemas laterales jóvenes pero están presentes en todas las raíces maduras. En las hojas las células que contienen taninos aparecen distribuidas en el mesófilo, pero ausentes de las células epidermales (6).

Los principales efectos antinutricionales que provocan los taninos incluyen bajas ganancias de peso, y menor eficiencia de utilización de materia seca dietaria, principalmente la proteína. El consumo de alimentos puede ser disminuido por el consumo de taninos, pues los animales que tienen dietas con alto contenido de taninos consumen menos alimento que los animales con dietas sin de taninos, por lo que crecen menos; siendo el efecto de los taninos hidrolizables más evidente que el de los taninos condensados (6).

Tanto los taninos condensados como los hidrolizables inhiben la mayoría de los ensayos enzimáticos *in vitro*, tal vez porque en muchos ensayos las proteínas son el único material presente capaz de unirse a los taninos. En el intestino muchas otras proteínas compiten por unirse a los taninos y la inhibición de las enzimas digestivas puede ser insignificante(7,8).

Existe una gran cantidad de evidencias de que la percepción de los taninos como inhibidores de la digestión es muy simplista e inadecuada. Hay evidencias de que en ratas alimentadas con caseína marcada radioactivamente (C-14) el aumento de proteína fecal inducido

por los taninos de la dieta no era de origen alimentario, sino de proteínas endógenas de la membrana y de las secreciones del tracto digestivo (9).

Los taninos son responsables de la resequedad en la boca y astringencia debido a que se unen a las proteínas salivares (proteínas ricas en prolina) (1,6) y otras proteínas endógenas digestivas de muchos mamíferos consumidores de taninos (10,11), El complejo que se forma entre estas proteínas y los taninos de la dieta no es digerido y pasa por el tracto digestivo relativamente intacto como se juzga por el alto contenido de proteínas fecales (12-14).

Anteriormente se consideraba el tracto digestivo como el sitio de acción de los efectos antinutricionales de los taninos, pero ahora se reconoce que varios de los efectos de los taninos de la dieta ocurren en el tejido corporal (efectos sistémicos), no solo en el tracto intestinal. Estos efectos incluyen anomalías en el desarrollo de las piernas de pollo, inducción de enzimas hepáticas, disminución del volumen de la orina y muertes muy rápidas.

Los efectos en el tejido corporal son responsables de la disminución de la velocidad de crecimiento asociado con los taninos de la dieta. Cuando los daños en la velocidad de crecimiento se separaron en los efectos del consumo de alimento, del proceso de digestión/absorción, y del metabolismo post-absorción, fue este último el más alterado por los taninos (14).

Los taninos condensados son oligómeros y polímeros de monómeros de polihidroxiflavanol unidos por enlaces 4-6 ó 4-8. Los polímeros son dispersos y las cadenas son irregulares, algunas veces ramificadas y regularmente contienen más de un tipo de unidad base configuracional. Los taninos condensados son relativamente inestables en solución acuosa y forman complejos con iones metálicos y proteínas (4).

El grupo orto-dihidroxi en el anillo B del flavonoide de los taninos condensados es el principal grupo involucrado en la complejación de metales. Estudios potenciométricos y espectrofotométricos han mostrado que el Fe III forma complejos mono, di y tri dentados con los taninos, al igual que el Al III. Algunos metales divalentes forman complejos bien definidos con orto-difenoles aunque los complejos con los taninos están menos estudiados(6).

LECTINAS

Desde hace mas de un siglo se encontró que las semillas de ricino contenían una sustancia (ricina) capaz de aglutinar los eritrocitos. Las lectinas o hemaglutininas son proteínas que pueden interactuar de manera muy específica con ciertos carbohidratos, estos pueden ser azúcares libres o los residuos existentes en polisacáridos, glucoproteínas o glucolípidos como los que se encuentran en la membrana celular. Estas sustancias se encuentran en numerosas leguminosas consumidas por el hombre como la soya o las alubias, así como en algunos animales como esponjas, crustaceos, moluscos y peces. (15,16).

En las plantas las lectinas se encuentran principalmente en las semillas, donde constituyen un 10% del total de la proteína, pero también se encuentran en los cuerpos proteicos de los cotiledones, hojas, corteza y raíz. (17).

La intensidad de aglutinación por el extracto de la planta a menudo varía con el origen de las células probadas, es por ello que los eritrocitos de diferentes especies animales se pueden distinguir por sus reacciones de aglutinación con diferentes hemaglutininas. Por ejemplo se reportó que las lectinas del frijol de lima (*Phaseolus lunatus*) aglutinan eritrocitos humanos de sangre tipo A pero no aquellas de tipo B u O (17).

Las lectinas se caracterizan por tener una gran afinidad por los residuos glucídicos de la superficie de los glóbulos rojos que es muy específica para eritrocitos de diferentes animales según la fuente vegetal de la que proviene, pero para que se lleve a cabo la interacción lectina-eritrocito deben existir como mínimo dos grupos activos⁽¹⁸⁾ en su especificidad su interacción es comparable a la de un anticuerpo con su antígeno o incluso a la unión de una enzima con su sustrato; su nombre indica lo específico de la reacción (lectinas: del latín *legere*, elegir) ⁽¹⁵⁾.

Algunas lectinas estimulan a los linfocitos humanos y animales a llevar a cabo el proceso de mitosis, lo que ha sido muy útil para el estudio de la dinámica y la función de los linfocitos. Las moléculas que contienen carbohidratos se encuentran en las membranas de muchas células y pueden sufrir cambios característicos durante el desarrollo embrionario y pueden ocurrir transformaciones malignas posteriores al uso de lectinas ⁽¹⁸⁾.

Dado que son proteínas presentan termosensibilidad, por lo que su efecto tóxico puede ser eliminado mediante el proceso convencional de cocimiento ⁽¹⁷⁾.

En los experimentos realizados con ratas alimentadas con alubias crudas se observa una disminución del crecimiento acompañada por inflamación, edema y necrosis de las microvellosidades intestinales, estas lesiones parecen favorecer la proliferación de bacterias y su fijación a la superficie del epitelio causando daño a corto plazo que puede producir la muerte de los animales que con la ingestión de lectinas tóxicas, ⁽¹⁹⁾.

La disminución del crecimiento en las ratas de estos experimentos se debe a que disminuye la absorción de los nutrimentos, estos efectos son totalmente independientes de otros factores antinutricionales presentes en las alubias de la dieta, como los inhibidores de tripsina ⁽²⁰⁾.

Su función en las plantas no es del todo conocida, se cree que participan en los procesos de reconocimiento entre células o entre varias moléculas que contienen carbohidratos, también

transportan y almacenan azúcares. Pueden estar involucradas en mecanismos de defensa de la planta contra la invasión de microorganismos dañinos o contra el ataque de insectos (21).

Se ha estudiado la estructura química de algunas lectinas, y se ha encontrado que son glicoproteínas y que contienen cationes divalentes (Mn, Ca, Zn). Algunas se pueden separar en subunidades que pueden ser de uno o dos diferentes tipos. En el caso del frijol se pueden diferenciar cinco proteínas heterogéneas, lo que hace que la toxicidad de cultivos diferentes de frijol sea diferente en cada caso (18).

INHIBIDORES DE TRIPSINA

Se denomina inhibidor a una sustancia que reduce la actividad de una enzima. Los inhibidores más comunes son los que reducen la actividad de la tripsina, los cuales coexisten con los inhibidores de quimotripsina (22).

Los inhibidores de tripsina se encuentran en los cereales como el trigo, maíz, centeno, avena, arroz y alforjón; también se encuentran en chícharos y patatas pero los podemos encontrar particularmente en las leguminosas, sobretodo el género *Phaseolus*, en la soya y en *Vicia faba* (17) algunas de sus características son: inhiben la tripsina, resisten la actividad proteolítica de otras proteasas como la papaína y la pepsina, su peso molecular varía entre 20 000 y 8 000, presentan resistencia relativa hacia ciertos factores ambientales, tales como el pH y el calor (23,24,25)

Al someter a estos inhibidores a un tratamiento térmico adecuado se puede destruir su efecto por lo menos disminuirlo, ya que estos factores presentan termoestabilidad elevada; se ha reportado que la actividad original se puede conservar entre el 50 y 80% después de un

tratamiento térmico. Esta termoestabilidad se atribuye al alto contenido de cisteína y enlaces disulfuro presentes en los inhibidores (22).

Estos inhibidores se encuentran distribuidos en toda la planta, pero se encuentran en la semilla principalmente. En algunos frijoles se han encontrado en las hojas inhibidores diferentes a los encontrados en la semilla.

Se cree que estas moléculas desaparecen durante la germinación de la semilla, favoreciendo el catabolismo de proteínas durante esta etapa y durante la maduración de la semilla previenen la degradación de las proteínas (25).

Los inhibidores más estudiados son el de Kunitz y el de Bowman-Birk que difieren en varios aspectos: el de Bowman-Birk tiene un alto contenido de cisteína, pero está desprovisto de glicina y triptofano, puede inhibir a la tripsina y a la quimotripsina, su peso molecular es de 8 000 a 10 000 y tiene una gran cantidad de enlaces disulfuro, mientras que el inhibidor de Kunitz tiene un bajo contenido de cisteína, posee dos enlaces disulfuro y su peso molecular es de 20 000 (17).

Se ha demostrado que la acción antitriptica eleva la pérdida de nitrógeno en las heces, pero que este nitrógeno no solo es de origen alimentario, sino que una buena parte proviene de la estimulación de la secreción pancreática que depende de la colecistoquinina-pancreozimina, cuya liberación es inducida por la disminución de enzimas proteolíticos libres presentes en la luz intestinal, debida a la formación de complejos enzima-inhibidor irreversibles, lo que provoca una hipertrofia de este órgano. El grado de hipertrofia pancreática en respuesta a los factores antitripticos es muy variable según las especies animales; el hombre es una especie con respuesta baja(17). Otros efectos antinutricionales y tóxicos son la inhibición del crecimiento por propiciar la indisponibilidad de aminoácidos, en ratas producen hiperplasia de las células pancreáticas e

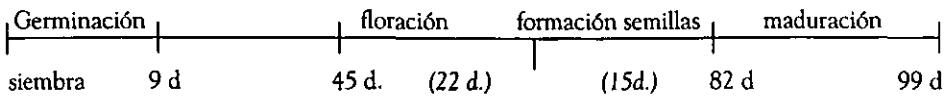
incremento en la concentración de tripsinógeno y quimotripsinógeno en el páncreas , además afectan el valor nutritivo de las proteínas (22).

Los inhibidores de tripsina tienen diferentes funciones en las plantas:

- Mecanismo de defensa contra los ataques de insectos y microorganismos, para lo cual en algunas plantas después de un daño mecánico o desprendimiento provocado por un ataque de insectos se lleva a cabo una acumulación de inhibidores de tripsina no solo en el lugar del ataque, también en los tejidos adyacentes a este. (25)
- Almacenaje, ya que los inhibidores de tripsina representan entre 0.25-3.6 g/Kg de proteína en las semillas de leguminosas.
- Control de proteinasas endógenas: para evitar la acción de éstas, que se activan en la germinación de la semilla (25).

DETERMINACIÓN DE LAS ETAPAS DE DESARROLLO DEL FRIJOL.

Para poder determinar las etapas que se trabajarían en este trabajo se tomó como base el siguiente diagrama (26)



Se decidió determinar los factores antinutricionales en las diferentes etapas de desarrollo del frijol negro jamapa para poder conocer el comportamiento de estos durante el desarrollo del frijol , ya que desde hace tiempo se conoce la existencia de estos factores en las semillas, pero solo

en un trabajo se estudió el comportamiento desde la germinación hasta la obtención de la semilla final(27).

Así se decidió basado en el diagrama mostrado anteriormente realizar las determinaciones de factores antinutricionales a las siguientes etapas de desarrollo del frijol:

- Germinado
- Plántula
- Ejote
- Semilla en maduración fisiológica
- Semilla final

Se escogió trabajar con el frijol negro jamapa ya que se desea comparar los resultados de este trabajo con un trabajo realizado anteriormente en el que también se determinaron factores antinutricionales en diferentes etapas de desarrollo del frijol, este trabajo se realizó sembrando los frijoles en el invernadero de la Universidad de Chapingo y en este caso se sembrarán en macetas en el invernadero del edificio E de la Facultad de Química.

Se decidió no recolectar muestras en la fase de floración por que no se contaba con mucho material y se consideró más importante estudiar las etapas posteriores, ya que son las que se utilizan para alimentación humana.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Conocer los cambios en el contenido de tres factores antinutricionales en diferentes etapas de desarrollo del frijol.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Plantar las muestras del frijol negro jamapa y de la variedad europea y coleccionar muestras en diferentes fases de desarrollo (germinado, plántula, ejote, maduración fisiológica y semilla seca)
- Medir y conocer el contenido de los siguientes factores antinutricionales de las muestras en las diferentes fases de desarrollo de ambas variedades de frijol: Inhibidores de tripsina, lectinas y taninos.

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIALES

-Frijol negro jamapa (*Phaseolos vulgaris*)

-Variedad holandesa de frijol utilizada para la obtención de ejote (no fue clasificado)

-Estas dos variedades fueron sembradas en macetas con una mezcla de tierra negra y tierra de hoja en proporción de 3:1 en el invernadero del edificio E de la Facultad de Química con ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, a 25°C de temperatura constante.

FECHA DE SIEMBRA DE AMBAS VARIEDADES: 11-SEPTIEMBRE-1998.

CUADRO No1.-ESTADIOS DE RECOLECCIÓN

Fase de desarrollo	Días para recolección	Fecha de recolección
GERMINADO	7	18-SEPTIEMBRE-1998
PLÁNTULA	35 ± 2	14-OCTUBRE-1998
EJOTE	60 ± 2	09-NOVIEMBRE-1998
MADURACIÓN FISIOLÓGICA	85 ± 4	04-DICIEMBRE-1998
SEMILLA FINAL	92 ± 5	11-DICIEMBRE-1998

En la figura 1 se presenta el diagrama de trabajo realizado.

DIAGRAMA DE TRABAJO

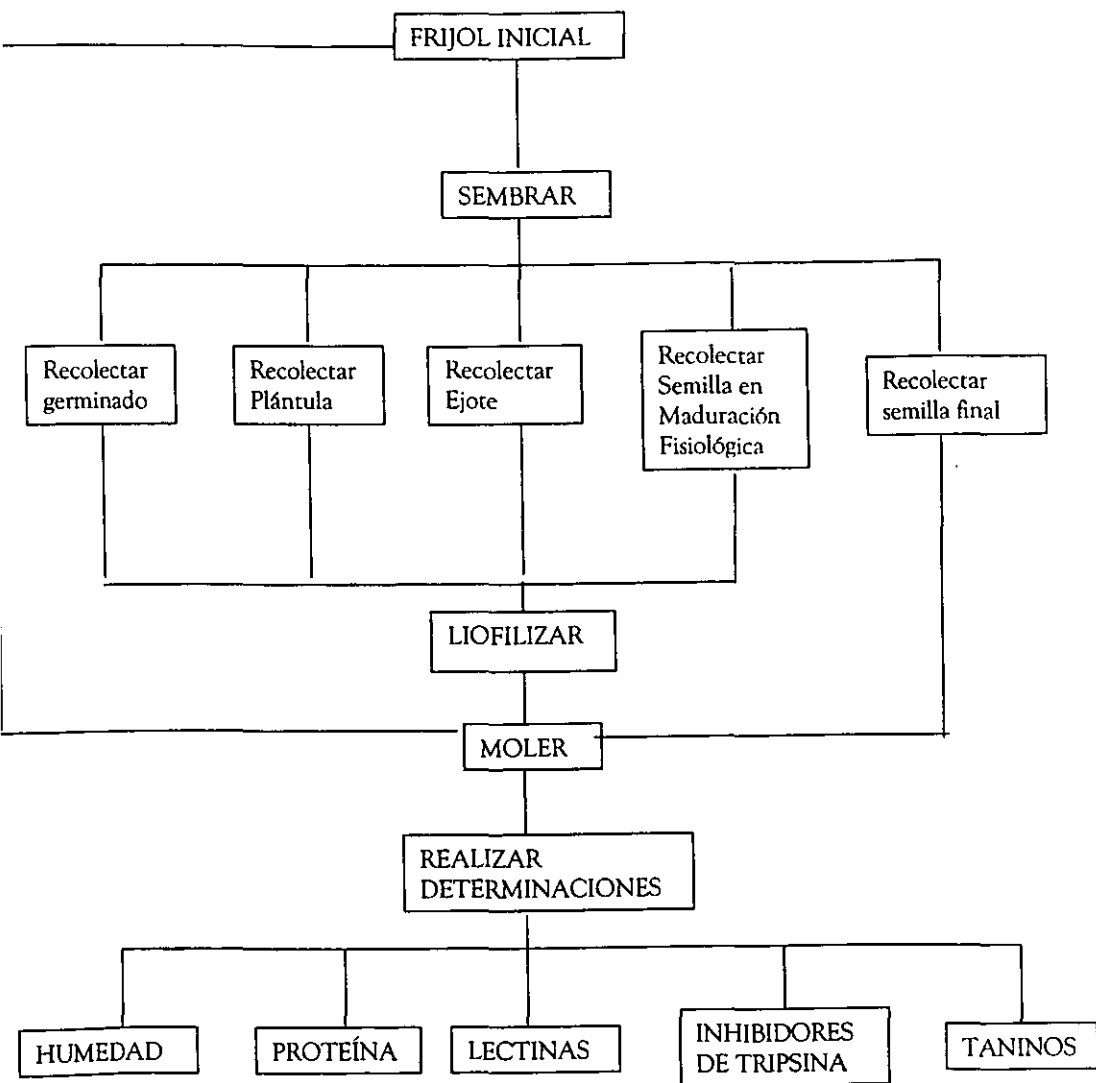


FIGURA 1 Diagrama general del proceso de siembra y análisis realizados a las muestras de frijol negro jamapa y frijol de ejote europeo.

MÉTODOS ANALÍTICOS

A) DETERMINACIÓN DE HUMEDAD (28)

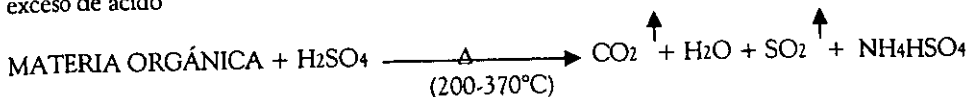
- 1.- poner a peso constante las charolas en la estufa a 130°C.
- 2.- Pesar 2-3 g de muestra en cada charola.
- 3.- Secar la muestra en la estufa a 100-110°C.
- 4.- Retirar de la estufa , dejar enfriar en desecador y pesar tan pronto como se se equilibre con la temperatura ambiente.
5. - Repetir las operaciones de secado hasta peso constante.
- 6.- Calcular el % de humedad con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{peso charola + muestra inicial} - \text{peso charola + muestra seca}}{\text{peso muestra}} \times 100$$

B) DETERMINACIÓN DE PROTEINA (28)

FUNDAMENTO

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. Muchos agentes catalizadores han sido usados para aumentar la velocidad de digestión de la muestra; como el cobre, mercurio y 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.

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

El amoniaco obtenido después de la digestión es liberado por acción de un álcali y atrapando el amoniaco liberado en una cantidad conocida de ácido valorado.

MATERIAL / REACTIVOS.

- Digestor TECATOR mod. ab-20-40.
- 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 %

- Solución de ácido bórico con indicadores (b).

- Solución de HCl 0.001N valorada

(a). Disolver 3 g de sulfato de cobre en 20ml de agua destilada; a continuación se agrega 50 ml de ácido ortofosfórico y una vez que este bien disuelta la sal, se adiciona con mucho cuidado y resbalando por las paredes del recipiente 430ml de ácido sulfúrico concentrado. Esta mezcla se deja agitando aproximadamente 30 minutos.

(b). Se pesan 5 g de ácido bórico y se coloca en un matraz aforado de 1 l ; se adiciona agua hasta disolverlo y a continuación se agregan 35ml del indicador A (100 mg de fenolftaleína aforados a 100ml con alcohol absoluto)y 10 del indicador B (33mg de verde de bromocresol +66 mg de rojo de metilo aforados a 100ml con alcohol etílico). Se ajusta el color a un tono café rojizo con ácido o álcali según se requiera y se afora a 1 l con agua destilada.

PROCEDIMIENTO

Pesar de 20-70 mg de muestra y colocarlos en un tubo de digestión, se le agrega aprox. 0.5 g de K_2SO_4 Y 3ml de mezcla de digestión se coloca un blanco positivo donde se pesa 20 mg de caseína y un blanco negativo donde se pesa 70 mg de sacarosa ; se ponen los tubos en el digestor por espacio de 15 minutos y despues de ello se sacan del digestor que se enfríen un poco, para poder adicionarles 1.5ml de H_2O_2 y nuevamente colocarlos en el digestor a 370°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.

Una vez realizada la digestión se deja enfriar y se añaden 25 ml de agua destilada a cada tubo, se enciende el analizador Kjeltec Auto 1030 como se describe en el manual, se debe asegurar que no hay burbujas en la bureta o en las tuberías del equipo, se coloca el tubo de muestra con agua en posición y se cierra la puerta de seguridad , cuando se enciende el foco que

indica que ha terminado el ciclo se anota el volumen de ácido gastado en la titulación de la muestra, se abre la puerta de seguridad y saca el tubo .

CALCULOS:

Para determinar el % de nitrógeno que contiene la muestra se sigue la siguiente ecuación:

$$\% N = \frac{\text{ml HCL muestra} - \text{ml HCl blanco} \times N \text{ HCl} \times 0.014 \times 100}{\text{peso muestra}}$$

DONDE:

- ml HCL muestra = volumen de ácido gastado en la titulación de la muestra
- ml HCL blanco = volumen de ácido gastado en la titulación del blanco de sacarosa
- N HCL = normalidad del HCl con que se realizó la titulación.

Para obtener el % de proteína de la muestra se multiplica el % de nitrógeno X 6.25

C) DETERMINACIÓN DE INHIBIDORES DE TRIPSINA⁽²⁹⁾

FUNDAMENTO:

La técnica es la utilizada por Kakade y colaboradores, la cual se basa en la medición de la inhibición producida por un extracto alcalino (NaOH 0.01N) de la muestra sobre una solución estandar de tripsina.

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

Una unidad de tripsina (U.T.) es arbitrariamente definida como el incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm. por 10 mL de mezcla de reacción descritas por Kakade y

colaboradores. La actividad de inhibidores de tripsina se expresa en términos de unidades de tripsina inhibida (U.T.I.).

MATERIAL / REACTIVOS:

- Potenciometro CORING mod. 10.
- Parrilla con agitación magnética THERMOLINE mod. SP-13025.
- Baño maría GRANT mod. SE 10.
- Espectrofotómetro COLEMAN mod. Junior II-A.
- Mezclador de tubos LAB-LINE mod. Super-mixer.
- NaOH 0.01N.
- Solución amortiguadora de TRIS, pH 8.2 y 0.05M (a).
- Solución BAPNA (b).
- Ácido acético al 30%.
- Solución estandar de tripsina (c).
- HCl 0.001N.

(a)- 6.05 g de tris (trihidroximetil-amino metano) y 2.94 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se disuelven en 900 ml de agua destilada. Se ajusta el pH a 8.2 y se afora a un volumen de 1l.

(b)- 100mg de benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida-HCl (BAPNA) se disuelvan en 2.5 ml de dimetil-sulfóxido y se diluye a 250 ml con amortiguador TRIS previamente preparado y calentado a 37°C. ESTA SOLUCIÓN DEBE SER PREPARADA EL MISMO DÍA Y CUANDO ESTE EN USO DEBE MANTENERSE A 37°C.

(c)- 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 contiene 20 µg de tripsina / ml y debe

ser almacenada en refrigeración donde puede durar de 2-3 semanas sin pérdida apreciable de actividad.

PROCEDIMIENTO

A). Preparación del extracto

Se pesa 1 g de muestra finamente molida en un vaso de precipitado y se le adiciona 45 ml de NaOH 0.01N, se ajusta el pH de esta suspensión a 9.6 ± 0.2 y se afora con NaOH 0.01N a 50 ml. A continuación se pasa a un vaso que contenga un magneto, para poder agitar la suspensión mecánicamente en la parrilla de agitación por espacio de 2 ½ horas a 300 r.p.m. Después de dicho tiempo se quita el magneto y se deja ½ hora en reposo, y por simple decantación se obtiene el sobrenadante eliminando el residuo insoluble. El sobrenadante debe ser diluido hasta el punto de que 1 ml produzca una inhibición de 40-60% ; este requisito es indispensable para reducir nuestra desviación estandar relativa.

B). Determinación de la actividad.

Porciones de 0.0, 0.6, 1.0, 1.4 y 1.8 ml de extracto directo o diluido son pipeteados a tubos de ensaye por duplicado y ajustado el volumen a 2.0 ml con agua destilada, se introducen al baño maría a 37°C. Se adicionan 2.0 ml de solución estandar de tripsina (previamente mantenida a 37°C) y se mantienen en contacto inhibidor-tripsina por espacio de 10 minutos. A continuación se adicionan 5 ml de solución de 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 ml de ácido acético al 30% ; el cual debe homogeneizarse inmediatamente.

Cuando por la adición del ácido acético al tubo de reacción se enturbie o forme un precipitado, será necesario filtrar el contenido a través de papel filtro (Whatman #1) para ello es conveniente dejar el tubo en reposo por 15 minutos (aprox.) para después filtrar primeramente el sobrenadante y por último se filtra la porción del precipitado gelatinoso. Sin embargo es necesario cerciorarse que el filtrado está transparente.

CUADRO No 2 Serie de tubos necesarios para determinar actividad inhibitoria

CLAVE:	ml EXT:	ml H ₂ O	ml std.tripsina	10min → ml BAPNA A 37°C	10 min → ml de ácido acético al 30%
B1	1.8	0.2	2.0+1.0AA	5.0	1.0
1	1.8	0.2	2.0	"	1.0
B2	1.4	0.6	2.0+1.0AA	"	1.0
2	1.4	0.6	2.0	"	1.0
B3	1.0	1.0	2.0+1.0AA	"	1.0
3	1.0	1.0	2.0	"	1.0
B4	0.6	1.4	2.0+1.0AA	"	1.0
4	0.6	1.4	2.0	"	1.0
BR	0.0	2.0	2.0+1.0AA	"	1.0
R	0.0	2.0	2.0	"	1.0

B1=blanco del tubo 1y así respectivamente para B2, B3 y B4

AA= ml de Acido acético al 30%

BR =Blanco de reactivos

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

NOTA: Cuando se trabaja con el extracto directo, es común que se arrastren coloraciones indeseables que pueden interferir en la determinación; por lo que es conveniente tomar una alícuota más de cada una de las porciones, las cuales servirán

como sus respectivos blancos. A estos tubos, una vez adicionados los 2.0 ml de solución de tripsina inmediatamente se les adiciona 1.0 ml de ácido acético al 30% y por último los 5.0 ml de solución de BAPNA, como se puede observar en estos tubos no es necesario llevar un control de tiempo.

CÁLCULOS:

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

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

Ya que se pone una serie de alícuotas del extracto, se tendrá a su vez una serie de valores de U.T. , los cuales al restar este valor al dato de referencia, dará los respectivos valores 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.

$$U.T.I./ml = \frac{R - U.T}{ml \text{ alícuota}}$$

Cuando se pone en una gráfica la actividad enzimática inhibitoria (U.T.I./ml) como una función de la alícuota del extracto de prueba, se observa una correlación lineal negativa, de donde se puede obtener el valor extrapolado, correspondiente al valor cero de la solución inhibitoria.

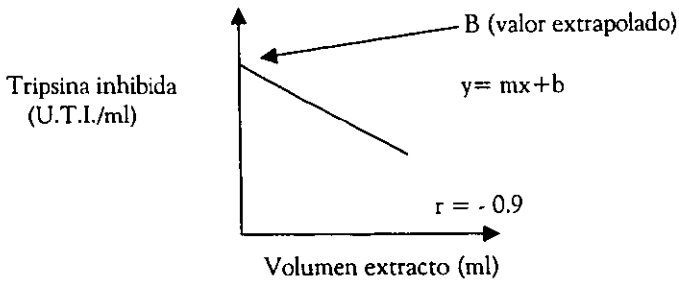


Figura 2 – Volúmen de extracto vs. UTI/ml
23

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

NOTA: Cuando se obtiene una correlación lineal no satisfactoria ($r < -0.9$), se puede trabajar el valor promedio de la serie de alícuotas reportado en términos de U.T.I./ml .

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 anterior dato se puede reportar las unidades de inhibición con respecto a 1 mg de de muestra:

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

DONDE:

B= valor extrapolado o promedio en (U.T.I./ml).

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

$$F = A1/a1 \times A2/a2 \quad A1 = \text{aforo} ; a1 \text{ alícuota}$$

D) DETERMINACIÓN SEMICUANTITATIVA DE HEMAGLUTININAS (30).

FUNDAMENTO:

La detección de hemaglutininas o lectinas en extractos de plantas se lleva a cabo con una técnica de diluciones seriadas en la cual se determina el punto final por una estimación visual de la aglutinación de los glóbulos rojos en estudio.

El método de microtitulación es rápido y requiere una mínima cantidad de muestra. Se necesita trabajar con glóbulos rojos lavados y activados con una solución de proteasa disponible (como pronasa, tripsina o papaína) , ya que la sensibilidad de la aglutinación se mejora considerablemente con este tratamiento.

MATERIAL/REACTIVOS:

- Agitador magnético con tacómetro marca THERMOLINE.
- Centrífuga para tubos marca DYNAC.
- Tubos de centrífuga de 15 ml con graduación.
- Jeringa de 5 o 10 ml con agua #22.
- Incubadora marca BLUE-M.
- Espectrofotómetro COLEMAN junior II-A.
- Adaptador para celdas de 10 X 75 mm (acondicionado a una abertura de 1 cm \varnothing).
- Microtiter kit (cook eng-Alexander Virginia USA).
- Filtro de vidrio poroso (poro grueso).
- Sangre de hamster desfibrinada y lavada
- Solución anticoagulante (a).
- Solución salina al 1%
- Solución salina al 0.9%
- Solución de proteasa al 0.1% en solución salina (b).
- Tripsina de páncreas porcino (SIGMA T-8128)
- Pronasa de S. Grisens (SIGMA P – 5005).

a) Cuando la sangre se va a trabajar inmediatamente se puede utilizar ya sea sol. de heparina o citrato, las cuales se usan en la siguiente relación:

- Solución de heparina : sangre = 15-20 UI : 1 ml sangre.
- Solución de citrato : sangre = 0.1 ml : 1 ml sangre.

Si la sangre no se va a trabajar de inmediato y se desea conservar en refrigeración por unos días, lo más conveniente es usar como solución anticoagulante, la solución ELSEVER, en la siguiente proporción: 1:1 o sea 1 ml de solución ELSEVER por 1 ml de sangre fresca.

- b) En términos generales se usa tripsina al 0.1% en solución salina, para el proceso de sensibilización; sin embargo, cuando se trabaja con sangre de cualquier roedor (ratón, hamster, etc.), es conveniente trabajar con pronasa al 0.2% en solución salina.

METODOLOGÍA:

a) Preparación del extracto:

Una vez que se tiene la muestra finamente molida (y desengrasada si el contenido de grasa es mayor del 5%), se suspende 1 g en 10 ml de solución salina al 1% , se efectúa una extracción con agitación mecánica durante 2 horas a 300 rpm a la temperatura ambiente.

Después de este tiempo se centrifuga el extracto a 1,400 rpm durante 15 min. Para eliminar el residuo insoluble; el sobrenadante se filtra a través de un filtro de vidrio poroso (grueso).

b) Preparación de la sangre

Una vez que se sangre al hamster, la sangre se coloca en un matraz pequeño que contenga solución anticoagulante, agitar suavemente para la completa homogenización de la sangre con la solución anticoagulante (no interrumpir hasta el momento de diluirla).

La sangre con anticoagulante se transvasa a tubos de centrifuga para lavarla (3 veces) con sol. salina al 0.9% , la relación sangre : solución salina es aproximadamente 1 : 5.

Se centrifuga a 1,500 rpm durante 10 min., después del último lavado, en el tubo de centrifuga se mide la cantidad de paquete de eritrocitos y se diluyen al 4% para lo cual se agregan por cada 1.0 ml de glóbulos rojos 24 ml de solución salina al 0.9%.

c) Sensibilización de los glóbulos rojos

A cada 10 ml de suspensión de glóbulos al 4% agregarles 1 ml de solución de pronasa al 0.2%(en solución salina) y colocarlos en incubadora por espacio de 1 hora a 37°C.

Después del tiempo estipulado, centrifugar para eliminar la enzima sobrenadante, dando además 3 lavados con solución salina al 0.9%. Después del último lavado se resuspende el paquete de glóbulos rojos al 5% , por lo cual cada 1.0 ml de paquete de eritrocitos se le adicionan 19 ml de solución salina al 0.9% .

NOTA: Cuando se observa que la sangre tiene algunos coágulos (aunque sean pequeños), es necesario filtrar esta suspensión a través de un pequeño trozo de gasa colocado dentro de un embudo de cuello corto.

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 solución salina al 0.9% . Se lee el espectrofotómetro a 620 nm, usando un adaptador de celdas que permita el paso de solo 1 cm² de luz y como blanco solución salina al 0.9% .

La lectura que se debe obtener será de $25\% \pm 1$ de transmitancia, en caso contraria se realizará la dilución necesaria para que la suspensión de glóbulos quede dentro de dicho rango.

e) Microtitulación

En las placas tipo "V" del microtiter colocar en cada pozo de una hilera 50 μ l de solución salina al 0.9% con el pipetador de gota evitando 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 escogida, introduciendo el microdilutor en el pozo y rotándolo sin excesiva presión.

NOTA: Es recomendable checar que el volumen que esté tomando el microdilutor, sea el requerido. Esto realiza con solución salina al 0.9% en una placa de prueba.

Por último con un pipetero de gota colocar en cada pozo 50 µl de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizada y ajustada. Luego se rota la placa en forma circular y se lleva 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 el fondo de los pozos de cada hilera de prueba. Se reporta la máxima dilución que presente aglutinación.

NOTA: cuando se trabaja con sangre de alta sensibilidad (como hamster o ratón) o un extracto de alto título, es conveniente realizar un mayor número de diluciones, por lo cual se pueden tomar hasta 3 hileras realizando la serie de dilución en forma de culebra.

E) DETERMINACIÓN DE TANINOS (31)

RESUMEN

Extracción de taninos por agitación con dimetilformamida. Posteriormente centrifugar y adicionar citrato férrico amoniacal y amoniaco a una alícuota de sobrenadante para desarrollar color y leer absorbancia de la solución obtenida en espectrofotómetro a 525 nm. Se determina el contenido de taninos usando una curva patrón preparada con ácido tánico.

MATERIAL/REACTIVOS:

NOTA: el agua utilizada en esta determinación debe ser desionizada.

- Ácido tánico: cristales grado analítico (SIGMA # T-0125).
- Solución estandar de referencia de ácido tánico que contenga 0.2g/100ml agua
- Dimetilformamida solución al 75% (V/V).

- Citrato férrico de amonio (SIGMA # F-5879) .
- Solución de citrato férrico de amonio que contenga 0.35g/100ml preparada 24 horas antes de usarse. El contenido de hierro debe estar entre 17-20%..
- Centrífuga marca DYNAC.
- Tubos de centrífuga de 50 ml con tapa hermética.
- Parrilla con agitación magnética THERMOLINE mod. SP-13025
- Agitador mecánico para tubos de ensaye LAB-LINE mod. Super-mixer.
- Baño regulador de temperatura GRANT mod. SE-10.
- Espectrofotómetro COLEMAN junior II-A
- Celdas para espectrofotómetro de 1 cm de espesor.

PROCEDIMIENTO

PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRÓN:

1. Preparar 7 matraces volumétricos de 25 ml y añadir 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 ml respectivamente de la solución estandar de ácido tánico 0.2g/100ml, llevando a la marca de aforo con la solución de dimetilformamida. La escala así obtenida corresponde a 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 mg de ácido tánico respectivamente.
2. Rotular 8 tubos de ensaye, correspondiendo el # 1 al blanco de la curva, al cual se le adiciona 1 ml de la solución de dimetilformamida. Los restantes corresponden a los puntos de la curva a los cuales se les adiciona respectivamente 1 ml de las soluciones de ácido tánico preparadas anteriormente. El intervalo obtenido es de 80 µg a 560 µg de ácido tánico.
3. Añadir 5 ml de agua a cada tubo y mezclar unos segundos. Después añadir 1 ml de solución de citrato férrico amoniaco 0.35g/100ml, mezcla y posteriormente añadir 1 ml de solución de amoniaco 0.232g/100ml (ver cuadro 1).

4. Después de la última adición agitar e introducir en baño de temperatura controlada y mantener 10 ± 1 min. A $30 \pm 1^\circ\text{C}$ para permitir el desarrollo óptimo del color.
5. Transferir a celdas de medición y leer en espectrofotómetro a 525 nm.
6. Trazar gráfica de absorbancia vs concentración de ácido tánico en μg

CUADRO No 3 Curva patrón

TUBO	Sol. ácido tánico (2-14 mg) (ml)	H ₂ O (ml)	Citrato férrico amoniacal 0.35g/100ml (ml)	Amoniaco 0.232g/100ml (ml)
1 (blanco)	1 ml DMF 75%	5	1	1
2	1	5	1	1
3	1	5	1	1
4	1	5	1	1
5	1	5	1	1
6	1	5	1	1
7	1	5	1	1
8	1	5	1	1

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO:

1. Pesar de 0.3 a 1 g de muestra en un vaso de precipitado de 50 ml
1. Disolver con 20 ml de solución de dimetilformamida al 75% en agua medidos con probeta y agitar moderadamente en agitador magnético durante 60 ± 3 min.
2. Transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 ml enjuagando el vaso y magneto 3 veces con porciones de 1 ml cada una de la solución de dimetilformamida al 75%. Llevar a la marca de aforo con el mismo reactivo, homogeneizar y transferir a un tubo de centrifuga de 50 ml, tapar el tubo y centrifugar a 2700 rpm (correspondiente a 100 unidades en centrifuga DYNAC) por 10 ± 1 min.
3. Decantar el sobrenadante en un vaso de precipitado y homogeneizarlo.

DETERMINACIÓN

Una vez obtenido el extracto de la muestra problema, rotular como mínimo 3 tubos de ensaye (uno corresponde al blanco y los otros 2 al problema, llevándose a cabo la lectura por duplicado).

1. Añadir los diferentes reactivos, de acuerdo al orden propuesto en el cuadro No 2. Mezclar perfectamente en Vortex el contenido de los tubos después de cada adición.
2. Después de la última adición agitar e introducir en baño de temperatura controlada y mantener 10 ± 1 min. a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ para permitir el desarrollo óptimo del color.
3. Transferir a celdas de medición y leer en el espectrofotómetro a 525 nm.
4. Mediante la ecuación de la línea recta obtenida con los datos de la curva patrón determinar el contenido de taninos y reportar como % de ácido tánico.

CUADRO No 4 Determinación de taninos

TUBO	MUESTRA (ml)	H ₂ O (ml)	Citrato férrico aminiacal 0.35g/100ml (ml)	Amoniaco 0.232g/100ml (ml)
1 (blanco)	1	6	1	-----
2	1	5	1	1
3	1	5	1	1

NOTAS :

- Para evitar que el agua del baño penetre a los tubos se recomienda taparlos con papel aluminio o parafilm
- El agua empleada en las determinaciones deberá ser desionizada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó que ambas variedades tienen un ciclo biológico muy parecido, a pesar de que el frijol negro jamapa se utiliza para la producción de semilla y la otra variedad se utiliza para obtener ejote.

Este trabajo se realizó en el invernadero pensando en tener temperatura y condiciones climáticas controladas para las plantas, lo cual resultó muy bien cuando las plantas se hallaban solas en uno de los cubículos del invernadero, pero al estar en contacto con otros frijoles fueron infectadas con hongos y las atacó una plaga de arañas, lo cual provocó que en la variedad productora de ejote no se pudiera recolectar la fase de maduración fisiológica ya que se decidió coleccionar la última fase y no la fase de maduración fisiológica; en el frijol negro jamapa las pérdidas no fueron tan graves, pero aun así como se verá en los resultados de las determinaciones de los factores antinutricionales estos variaron de lo que se reportó anteriormente ya que se cree que estos factores actúan como factores de defensa de las plantas. Cabe mencionar que las muestras de las etapas afectadas se trataron igual que las otras por considerar que el daño se produce a nivel metabólico.

Los resultados de la determinación de humedad original de las diferentes etapas del frijol negro jamapa indican que la semilla tiene una humedad de 6.68%, las tres etapas siguientes (germinado, plántula y ejote) tienen valores muy similares 86.01, 85.31 y 85.05% respectivamente, la semilla en maduración fisiológica tiene 50.20% de humedad y la semilla final tiene 6.56%, un valor muy cercano al de la semilla original (TABLA 1).

Los resultados del frijol productor de ejote indican que la semilla inicial tiene una humedad de 6.78%, las tres etapas siguientes tienen valores de 86.65, 85.38 y 85.45%

respectivamente y la semilla final presenta una humedad de 6.44, valor muy similar al de la semilla inicial (TABLA 2).

Se realizaron 4 repeticiones de las determinaciones de proteína, lectinas, inhibidores de tripsina y taninos y a estas se les realizó un análisis estadístico para saber que fases presentan diferencia significativa en cada determinación, para esto primero se realizó un análisis de varianza a los datos de todas las fases, posteriormente se realizó un análisis de rango múltiple de Duncan para determinar en que etapas presentan diferencia significativa.

Con base en los resultados de la determinación de proteína del frijol negro jamapa (Tabla 3) se ve que de la semilla inicial a la etapa de germinado se registra un aumento en la cantidad de proteína, siendo esta etapa donde se encuentran en mayor concentración, esto ya que las células presentes en el cotiledón tienen vacuolas donde se almacenan proteínas como reservas para la planta (21). Se ve una disminución en la etapa de plántula, donde en otro trabajo se había reportado la mayor cantidad de proteínas (27) y se ve un aumento progresivo en las siguientes etapas hasta que la semilla final alcanza un nivel similar al de la semilla inicial completando así un ciclo. En el análisis estadístico practicado a estos datos se encontró que existe diferencia significativa entre las diferentes fases de la determinación, al realizar la prueba de Duncan se encontró que no existe diferencia significativa entre la semilla inicial y la semilla final.

En el caso del frijol productor de ejote se tiene que del grano inicial a la fase de germinado hay un aumento y es en esta fase donde se encuentra la mayor cantidad de proteínas, en la etapa de plántula se nota una disminución de alrededor del 50% de la cantidad de proteína, se incrementa un poco en la fase de ejote, no se pudo coleccionar la fase de madurez fisiológica y en la semilla final se tiene una cantidad de proteína superior a la de la semilla inicial. En este caso al realizar el análisis de varianza se encontró que también existe diferencia significativa entre las

diferentes fases y con la prueba de Duncan se encontró que existe diferencia significativa entre todas las etapas.

En la figura 3 se muestran más claramente los cambios presentados por las dos diferentes variedades de frijol en el contenido de proteínas durante su desarrollo.

TABLA 1 CONTENIDO DE HUEMEDAD ORIGINAL (%)
FRIJOL NEGRO JAMAPA

ETAPA	HUMEDAD (%)
SEMILLA INICIAL	6.68
GERMINADO	85.01
PLANTULA	84.31
EJOTE	84.05
MADURACIÓN FISIOLÓGICA	50.20
SEMILLA FINAL	6.56

TABLA 2 CONTENIDO DE HUEMEDAD ORIGINAL(%)
FRIJOL PRODUCTOR DE EJOTE

ETAPA	HUMEDAD (%)
SEMILLA INICIAL	6.78
GERMINADO	86.65
PLANTULA	85.38
EJOTE	85.45
SEMILLA FINAL	6.44

TABLA 3 CONTENIDO DE PROTEINA (%)
FRIJOL NEGRO JAMAPA

ETAPA	BASE SECA
SEMILLA INICIAL (I)	27.51 ± 0.29
GERMINADO (G)	34.91 ± 0.27
PLANTULA (P)	15.61 ± 0.15
EJOTE (E)	19.01 ± 0.25
MADURACIÓN FISIOLÓGICA (MF)	26.39 ± 0.03
SEMILLA FINAL (F)	27.60 ± 0.15

TABLA 4 ANALISIS ESTADÍSTICO DEL CONTENIDO DE PROTEINA
EN EL FRIJOL NEGRO JAMAPA
PRUEBA DE ANOVA ($\alpha=0.05$)

VARIACION	SS	Gl	MS	F	Valor crítico para F
Tratamiento	873.552333	5	174.71045	922.9290	2.772850
ERROR	3.4074	18	0.1893		
Total	876.959733	23			

PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE DE DUNCAN

R6= 0.7222

R5= 0.7114

R4= 0.6983

G I E MF E P

R3= 0.6787

R2=0.6461

NOTA: el subrayado indica que no existe diferencia significativa entre las fases

TABLA 5 CONTENIDO DE PROTEINA (%)
FRIJOL PRODUCTOR DE EJOTE

ETAPA	BASE SECA
SEMILLA INICIAL (I)	21.58 ± 0.09
GERMINADO (G)	26.35 ± 0.01
PLANTULA (P)	13.22 ± 0.02
EJOTE (E)	17.43 ± 0.03
SEMILLA FINAL (F)	23.64 ± 0.24

TABLA 6 ANALISIS ESTADÍSTICO DEL CONTENIDO DE PROTEINA
EN EL FRIJOL PRODUCTOR DE EJOTE
PRUEBA DE ANOVA ($\alpha = 0.05$)

VARIACIÓN	SS	GI	MS	F	valor crítico
N	para F				
Tratamiento	373.86353	4	93.46588	1180.870	3.055568
ERROR	1.18725	15	0.07915		
Total	375.05078	19			

PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE DE DUNCAN

R5 = 0.4656

R4 = 0.4572

R3 = 0.4445

R2 = 0.4234

G F I E P

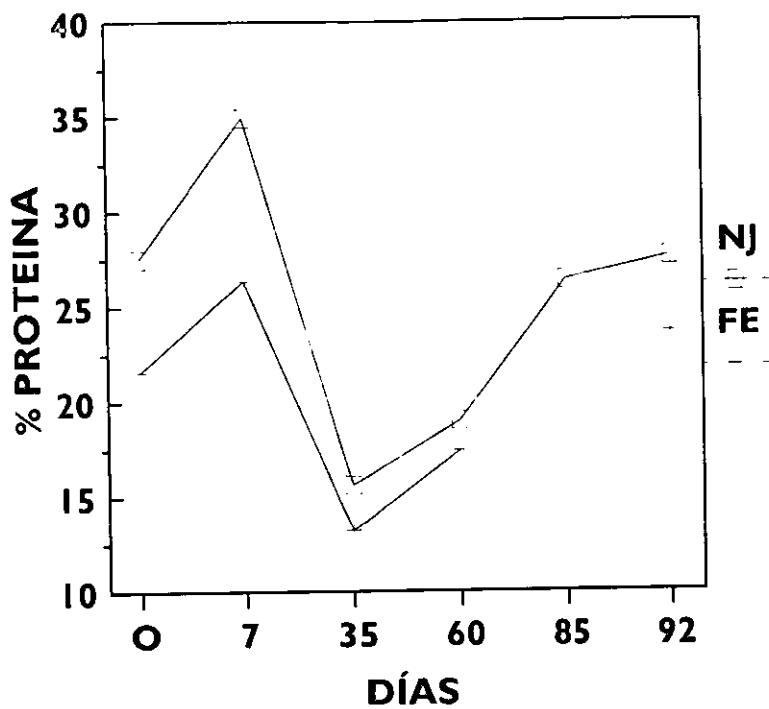


FIGURA 3. - Contenido de proteína total expresado en base seca en las etapas de desarrollo del frijol negro jamapa (NJ) y del frijol productor de ejote (FE) (g / 100 g de muestra)

Los resultados de la determinación de lectinas para el frijol negro jamapa se presentan en la Tabla 7 donde podemos ver que la semilla inicial presenta un título elevado (14 en base seca), se ve una pequeña disminución en el germinado (12 en base seca) en las fases de plántula y ejote se aprecia que la cantidad de lectinas disminuye; en la fase de maduración fisiológica se vuelve a incrementar la cantidad de lectinas igualando el nivel del germinado, la semilla final presenta un nivel mayor de lectinas aunque este nivel es menor al que presentó la semilla inicial. Estos resultados son diferentes al obtenido en otro trabajo donde se ha utilizado el frijol negro jamapa (27), esto se debe posiblemente a que en este trabajo las plantas fueron atacadas por hongos y arañas, lo que provocó un incremento en los factores de defensa de la planta (20). Al realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos se encontró diferencia significativa entre las etapas, posteriormente se determinó que las etapas que presentan diferencia significativa son la plántula y el ejote.

En cuanto al frijol productor de ejote (tabla 9) vemos que no hay cambio en el contenido de lectinas en las fases de semilla inicial y germinado, en la fase de plántula se ve una disminución importante en el contenido de lectinas, estas se incrementan nuevamente en la fase de ejote alcanzando el nivel de la semilla inicial y en la semilla final vemos que la cantidad de lectinas es superior al que presenta la semilla inicial. Al realizar el análisis estadístico vemos que al igual que en el frijol negro jamapa en el frijol productor de ejote también existe diferencia significativa entre los datos obtenidos en esta determinación, con un análisis posterior se determinó que la etapa de plántula es la que presenta diferencia significativa respecto a todas las otras.

En la figura 4 podemos ver el cambio en el contenido de lectinas en ambas variedades de frijol en las diferentes etapas de su desarrollo.

TABLA 7 CONTENIDO DE LECTINAS (TÍTULO*)
FRIJOL NEGRO JAMAPA

ETAPA	BASE SECA
SEMILLA INICIAL (I)	14 ± 0.33
GERMINADO (G)	12 ± 0.2
PLANTULA (P)	5 ± 0.0
EJOTE (E)	7 ± 0.92
MADURACIÓN FISIOLÓGICA (MF)	12 ± 0.3
SEMILLA FINAL (F)	13 ± 0.9

*TÍTULO= máxima dilución positiva

TABLA 8 ANALISIS ESTADÍSTICO DEL CONTENIDO DE LECTINAS
EN EL FRIJOL NEGRO JAMAPA
PRUEBA DE ANOVA ($\alpha = 0.05$)

VARIACIÓN	SS	GI	MS	F	Valor crítico para F
Tratamiento	196.375	5	39.275	85.69091	2.772850
ERROR	8.25	18	0.458333		
Total	204.625	23			

PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE DE DUNCAN

R6= 1.1238

R5= 1.1068

R4= 1.0865

R3= 1.0561

R2= 1.0053

I F G MF E P

TABLA 9 CONTENIDO DE LECTINAS(TITULO*)
FRIJOL PRODUCTOR DE EJOTE

ETAPA	BASE SECA
SEMILLA INICIAL (I)	14 ± 1.33
GERMINADO (G)	14 ± 0.25
PLANTULA (P)	6 ± 0.0
EJOTE (E)	14 ± 0.33
SEMILLA FINAL (F)	15 ± 0.2

*TITULO=Máxima dilución positiva

TABLA 10 ANALISIS ESTADÍSTICO DEL CONTENIDO DE LECTINAS
EN EL FRIJOL PRODUCTOR DE EJOTE
PRUEBA DE ANOVA ($\alpha=0.05$)

VARIACIÓ	SS	Gl	MS	F	Valor crítico para F
Tratamiento	170.7	4	42.675	98.48077	3.055568
ERROR	6.5	15	0.433333		
Total	177.2	19			

PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE DE DUNCAN

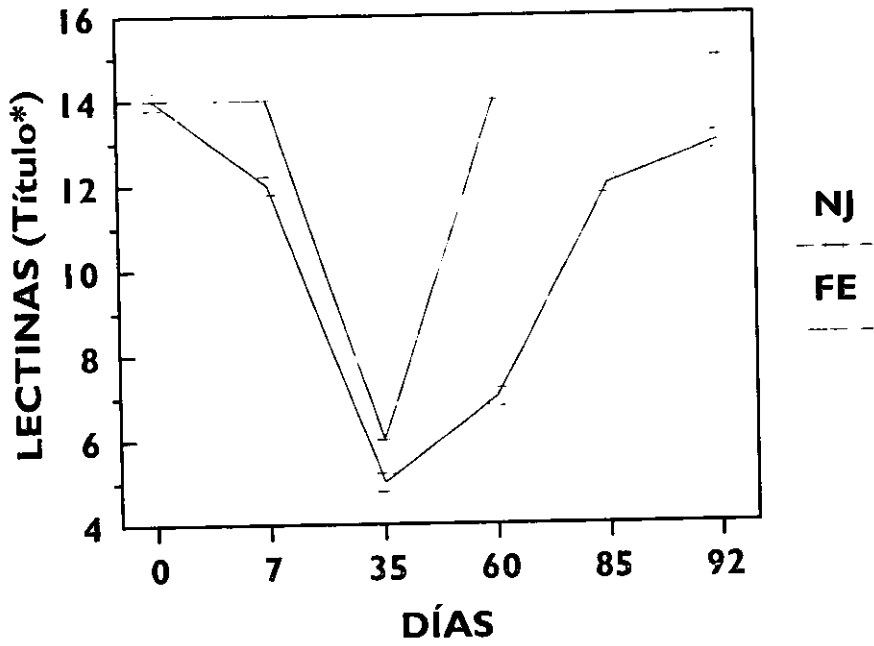
R5= 1.0890

R4= 1.0693

R3= 1.0401

R2= 0.9903

F I G E P



*= Máxima dilución a la que se distingue aglutinación de eritrocitos

FIGURA 4.-Contenido de lectinas expresado en base seca en las etapas de desarrollo del frijol negro jamapa (NJ) y del frijol productor de ejote (FE) (Título*)

En la tabla 11 se encuentran los resultados de la determinación de taninos realizada al frijol negro jamapa, en donde podemos ver en la semilla inicial se encontró 1.13% de ácido tánico, en el germinado esta cantidad disminuye hasta 0.44% debido a que en esta etapa la planta ya eliminó la cascarilla de la semilla, en la fase de plántula se encontró un nivel de taninos superior al que presenta la semilla inicial, en la fase de ejote se encontró un nivel muy similar al de la semilla inicial, esta cantidad se vuelve a incrementar en la semilla en maduración fisiológica siendo en esta etapa donde se encuentra la mayor cantidad de taninos en esta variedad de frijol, en la semilla final se presenta una nueva disminución de la cantidad de taninos pero este nivel es superior al presentado por la semilla inicial. Al realizar el análisis estadístico de estos datos se encontró que existe diferencia significativa entre todas las etapas. Esto puede deberse a que por la invasión de hongos y arañas la síntesis de taninos haya sufrido alguna alteración ya que estas moléculas también pueden actuar como mecanismos de defensa de la planta (6).

Por lo que respecta al frijol productor de ejote (Tabla 13) vemos que la semilla inicial contiene 1.06% de ácido tánico, esta cantidad disminuye en el germinado hasta 0.35%, en la fase de plántula se presenta un aumento en la cantidad de taninos, siendo este el nivel más alto encontrado en esta variedad de frijol, el ejote se encontró un nivel de 0.25% de ácido tánico siendo este el nivel más bajo encontrado en ambas variedades y en la semilla final se encuentra que el nivel es notablemente inferior al que presenta la semilla inicial. Es posible que el daño causado por la infección fúngica pueda haber afectado la síntesis de taninos. Al realizar el análisis estadístico se encontró que existe diferencia significativa entre todas las etapas.

En la figura 5 podemos ver la comparación del contenido de taninos en ambas variedades en las diferentes etapas estudiadas.

TABLA 11 CONTENIDO DE TANINOS(% ÁCIDO TÁNICO)
FRIJOL NEGRO JAMAPA

ETAPA	BASE SECA
SEMILLA INICIAL (I)	1.13 ± 3.2E-05
GERMINADO (G)	0.44 ± 2.1E-05
PLANTULA (P)	1.40 ± 1.7E-04
EJOTE (E)	1.11 ± 6.7E-05
MADURACIÓN FISIOLÓGICA (MF)	1.46 ± 2.4E-05
SEMILLA FINAL (F)	1.24 ± 3.0E-06

TABLA 12 ANALISIS ESTADÍSTICO DEL CONTENIDO DE TANINOS
EN EL FRIJOL NEGRO JAMAPA
PRUEBA DE ANOVA ($\alpha=0.05$)

VARIACIÓN	SS	GI	MS	F	Valor crítico para F
Tratamiento	2.4337575	5	0.486751	9136.11	2.772850
ERROR	0.000959	18	5.327E-05		
Total	2.4347165	23			

PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE DE DUNCAN

R6= 0.0121

R5= 0.0119

R4= 0.0117

MF P F I E G

R3= 0.0114

R2= 0.0108

TABLA 13 CONTENIDO DE TANINOS (% ÁCIDO TÁNICO)
FRIJOL PRODUCTOR DE EJOTE

ETAPA	BASE SECA
SEMILLA INICIAL (I)	1.06 ± 4.2E-04
GERMINADO (G)	0.35 ± 3.2E-05
PLANTULA (P)	1.46 ± 2.3E-04
EJOTE (E)	0.25 ± 9.1E-05
SEMILLA FINAL (F)	0.42 ± 6.0E-04

TABLA 14 ANALISIS ESTADÍSTICA DEL CONTENIDO DE TANINOS
EN EL FRIJOL PRODUCTOR DE EJOTE
PRUEBA DE ANOVA ($\alpha=0.05$)

VARIACION	SS	GL	MS	F	Valor crítico para F
Tratamiento	3.90005	4	0.975012	3545.5	3.055568
ERROR	0.004125	15	0.000275		
Total	3.904175	19			

PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE DE DUNCAN

R5 = 0.0275

R4 = 0.0269

R3 = 0.0262

R2 = 0.0249

E I F G P

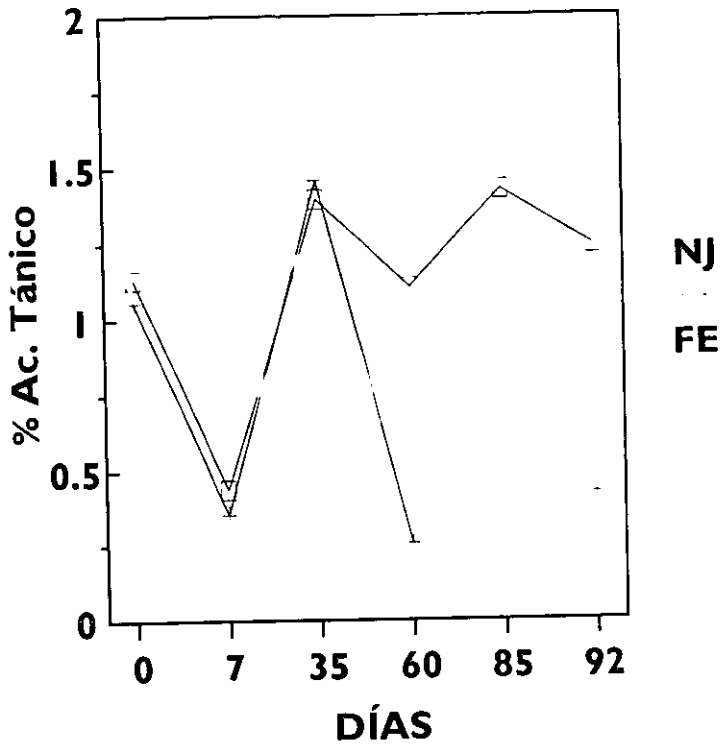


FIGURA 5- Contenido de taninos expresado en base seca en las etapas de desarrollo del frijol negro jampa (NJ) y frijol productor de ejote (FE) expresado en % ácido tánico

Los resultados de la determinación de inhibidores de tripsina del frijol negro jamapa se encuentran en la tabla 15 donde podemos ver que la semilla inicial presenta 26.65 UTI/mg, este nivel disminuye en el germinado y vuelve a disminuir hasta casi desaparecer en la plántula, en la fase de ejote se incrementa el contenido de inhibidores de tripsina y se vuelve a incrementar en la fase de maduración fisiológica superando por mucho el nivel de la semilla inicial y siendo así el nivel más alto registrado en esta variedad no solo en este estudio sino en un estudio previo realizado al frijol negro jamapa (27), en la fase de semilla final se puede ver una gran disminución en el contenido de inhibidores de tripsina para alcanzar un nivel muy similar al de la semilla original. En el análisis estadístico vemos que no existe diferencia significativa entre las etapas de la semilla inicial y final así como tampoco existe diferencia entre el germinado y la plántula.

En cuanto al frijol productor de ejote (TABLA 17) podemos ver que la semilla inicial tiene un contenido alto de inhibidores, similar al de la semilla del frijol negro jamapa, en la fase de germinado se ve una disminución en el contenido de inhibidores (3.88 UTI/mg), en la fase de plántula los inhibidores de tripsina prácticamente desaparecen en esta variedad de frijol, en la fase de ejote vemos un gran aumento en el contenido de inhibidores de tripsina, siendo mucho mayor que el contenido de inhibidores de la semilla inicial, en la semilla final podemos ver que la cantidad de inhibidores es similar al de la semilla inicial, pero en este caso la cantidad es mayor. Al realizar el análisis estadístico vemos que existe diferencia significativa entre todas las etapas

Si tomamos en cuenta que a partir de 10 UTI/mg de muestra la actividad de los inhibidores se considera importante, el valor obtenido en este estudio en la etapa de maduración fisiológica del frijol negro jamapa es de mucha consideración, ya que incluso sobrepasa el valor de inhibidores para la soya cruda que es considerado como uno de los más altos (22). Estos cambios se muestran en la figura 6 donde podemos ver la diferencia en la conducta de ambas variedades.

TABLE 15 CONTENIDO DE INHIBIDORES DE TRIPSINA (UTI**/mg)
 FRIJOL NEGRO JAMAPA

ETAPA	BASE SECA
SEMILLA INICIAL (I)	26.65 ± 0.06
GERMINADO (G)	5.45 ± 0.02
PLANTULA (P)	1.12 ± 0.09
EJOTE (E)	13.12 ± 0.44
MADURACIÓN FISIOLÓGICA (MF)	104.59 ± 83.1
SEMILLA FINAL (F)	25.36 ± 0.07

**= Unidades de tripsina inhibida

TABLE 16 ANALISIS DE VARIANZA DEL CONTENIDO DE INHIBIDORES DE TRIPSINA
 EN EL FRIJOL NEGRO JAMAPA
 PRUEBA DE ANOVA (α=0.05)

VARIACIÓN	SS	Gl	MS	F	Valor crítico para F
Tratamiento	24167.2269	5	4833.445	346.1496	2.772850
ERROR	251.342195	18	13.96345		
Total	24418.5691	23			

PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE DE DUNCAN

R6= 6.203

R5= 6.110

R4= 5.997

R3= 5.829

R2= 5.549

MF I F E G P

TABLA 17 CONTENIDO DE INHIBIDORES DE TRIPSINA (UTI**/mg)
FRIJOL PRODUCTOR DE EJOTE

ETAPA	BASE SECA
SEMILLA INICIAL (I)	25.82 ± 1.36
GERMINADO (G)	4.21 ± 0.01
PLANTULA (P)	0.16 ± 0.006
EJOTE (E)	39.61 ± 9.85
SEMILLA FINAL (F)	29.03 ± 0.26

**=Unidades de tripsina inhibida

TABLA 18 ANALISIS ESTADÍSTICO DEL CONTENIDO DE INHIBIDORES DE
TRIPSINA
EN EL FRIJOL PRODUCTOR DE EJOTE
PRUEBA DE ANOVA ($\alpha=0.05$)

VARIACIÓN	SS	Gl	MS	F	Valor crítico para F
Tratamiento	4428.26223	4	1107.065	482.2245	3.055568
ERROR	34.4362042	15	2.295747		
Total	4462.69844	19			

PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE DE DUNCAN

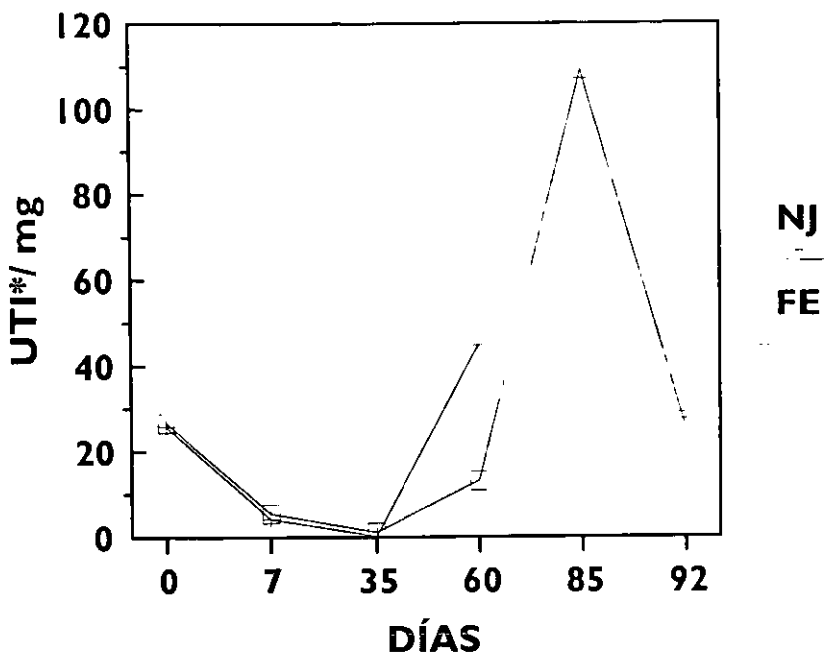
R5 = 2.50

R4 = 2.46

R3 = 2.39

R2 = 2.28

E F I G P



*= Unidades de Tripsina Inhibida

FIGURA 6 - Contenido de inhibidores de tripsina expresado en base seca en las etapas de desarrollo del frijol negro jamapa (NJ) y de frijol productor de ejote (FE) (UTI*/mg de muestra)

Como se puede apreciar los resultados de proteína, lectinas e inhibidores de tripsina en este trabajo son diferentes a otro realizado anteriormente(27), en ese también se trabajó con el frijol negro jamapa y se estudió el contenido de proteína, lectinas e inhibidores de tripsina, en el año de 1988, este se realizó en el invernadero de la Universidad de Chapingo y el presente trabajo se realizó en el invernadero de la Facultad de Química, a continuación se muestran las diferencias encontradas en ambos trabajos.

Como se puede ver en la figura7 la cantidad de proteína de la etapa de semilla inicial en este trabajo es de 27.51% y en el realizado anteriormente es de 20.69%, en el germinado en este trabajo se encontró 34.91%, mientras en el anterior se determinó 24.35%, esto puede deberse a que desde la semilla inicial la cantidad de proteína es mayor y por ello el germinado presenta una mayor cantidad de proteínas; en la etapa de plántula en este trabajo se observa una disminución de la cantidad de proteína (15.61%), mientras en el realizado en Chapingo se registra un aumento en esta etapa(27.10%), en la etapa de ejote en el presente trabajo se registra un aumento en la cantidad de proteína, mientras en el anterior vemos una disminución respecto a la etapa de plántula y en las dos últimas etapas podemos ver que la cantidad de proteína es mayor en esta ocasión que en el trabajo anterior. En este caso vemos que a pesar de que en ambos casos se trabajó en el invernadero el comportamiento de la misma variedad es diferente, por lo que una de las diferencias reside en que la semilla utilizada en este caso tiene mayor cantidad de proteína desde la semilla inicial, por ello en el germinado, la semilla en maduración fisiológica y en la semilla final la cantidad de proteína en este trabajo es mayor que en el anterior.

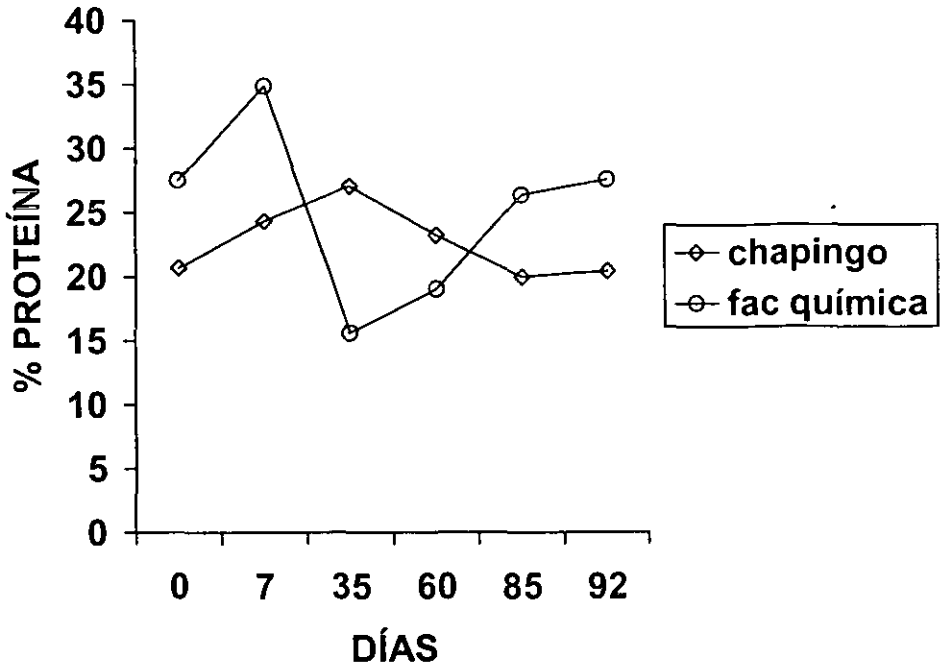
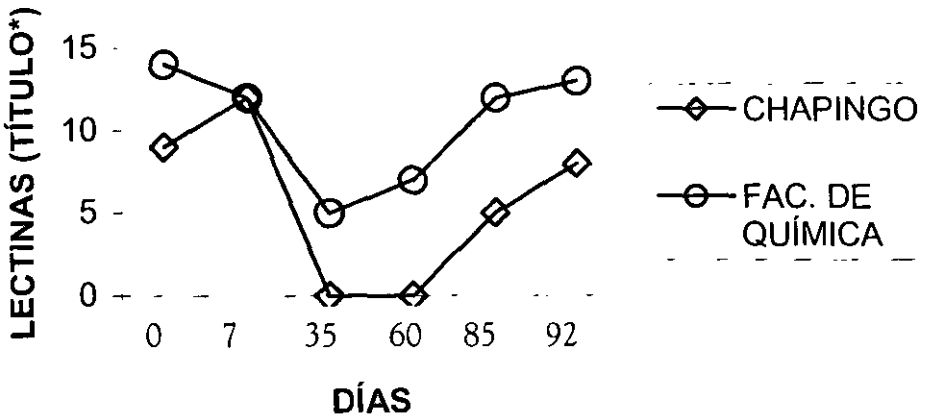


FIGURA 7.- Comparación del contenido de proteína expresado en base seca entre el trabajo realizado en Chapingo y el realizado en la facultad de Química

Se puede apreciar que el contenido de lectinas también presenta diferencias en ambos trabajos (FIGURA 8), vemos que este es mayor en las etapas de semilla inicial y germinado en el trabajo realizado en la Facultad de Química, en las etapas de plántula y ejote en el trabajo realizado en Chapingo no se detectan lectinas, mientras que en este trabajo se detecta un título de 5 y 7 respectivamente, se observa una tendencia descendente de las dos primeras etapas a las siguientes, en este trabajo se obtuvo una mayor cantidad de lectinas, pero se sigue la misma tendencia descendente, en las etapas finales se aprecia un incremento en la cantidad de lectinas pero este es mayor en el trabajo anterior (donde el título cambia de 5 a 8) que en este trabajo (donde el cambio es de 12 a 13); en general podemos decir que la cantidad de lectinas en la

semilla que se utilizó en esta ocasión es mayor a la utilizada en el trabajo anterior, esto puede deberse a que la semilla que se utilizó en esta ocasión había estado almacenada por un periodo mayor que la primera provocando que el contenido de lectinas aumente en esta semilla, lo que puede también explicar el alto contenido de proteína en esta semilla, ya que las lectinas representan el 10% de la proteína total en la semilla(18). La diferencia que se muestra en estos trabajos también puede deberse a que la determinación de lectinas en el trabajo realizado en Chapingo se realizó con eritrocitos de conejo, que presentan una sensibilidad diferente a los eritrocitos de hamster utilizados en esta ocasión.

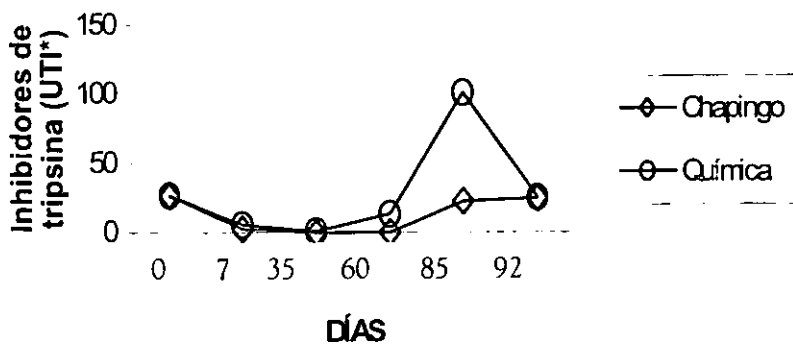


*TITULO= máxima dilución positiva

FIGURA 8 Comparación del contenido de lectinas entre el trabajo realizado en Chapingo y el realizado en la Facultad de Química

En cuanto a los inhibidores de tripsina también se pueden apreciar diferencias entre ambos trabajos(FIGURA 9), por ejemplo en la semilla inicial la cantidad de inhibidores es de 26.65 UTI en el trabajo realizado en Chapingo y en este es de 24.87 UTI, en la etapa siguiente se

aprecia una disminución de la cantidad de inhibidores de tripsina en ambos trabajos, en la etapa de plántula también se nota una disminución de los inhibidores de tripsina, pero en el trabajo anterior estos no se detectaron y en esta ocasión se cuantificaron 1.12 UTI, en la etapa de ejote en el trabajo anterior tampoco se detectaron, sin embargo en este la cantidad detectada representa el 50% de los inhibidores encontrados en la semilla inicial y en la etapa de maduración fisiológica mientras que en el trabajo anterior se registraron 22.7 UTI en este se registran 104.59 UTI, siendo esta cantidad equiparable a la reportada para la soya, lo cual puede confirmar la teoría de que estos factores sirven también como defensa de la planta, ya que es durante esta etapa y la anterior que se presenta la invasión de hongos e insectos en las plantas del invernadero, mientras que en Chapingo no se registró ninguna invasión de este tipo. En la semilla final la cantidad de inhibidores encontrada en este trabajo es un poco mayor a la encontrada en el trabajo anterior, pero quedan en el mismo rango ambas.



*UTI= unidades de tripsina inhibida

FIGURA 9 Comparación del contenido de inhibidores de tripsina entre el trabajo realizado en Chapingo y el realizado en la Facultad de Química

CONCLUSIONES

- La cantidad de proteína total de ambas variedades se incrementa notablemente en el germinado, ya que en esta etapa la planta sintetiza proteínas como reserva, mismas que se consumen durante el desarrollo de la planta, por lo que disminuye en la plántula y aumenta paulatinamente en las etapas posteriores hasta alcanzar niveles muy similares, de tal modo que las etapas de semilla final y semilla inicial no presentan diferencia significativa en el frijol negro jamapa mientras que en el frijol productor de ejote todas las etapas presentan diferencia significativa.
- Al comparar los resultados de la determinación de proteína en el frijol negro jamapa en dos trabajos diferentes se ve que la cantidad de proteína en el trabajo realizado en Chapingo no presenta variaciones muy drásticas en la cantidad de proteínas, mientras que en este trabajo los cambios son más notorios, esto demuestra las diferencias que se pueden presentar al cultivar la misma especie.
- Las lectinas no presentan disminución notable en los germinados, pero sí en la plántula que presenta diferencia significativa con las otras etapas en ambas variedades, esto ya que los factores de protección de la planta se sintetizan alternados y en esta etapa los taninos se sintetizaron en mayor cantidad. En el ejote aumentan, siendo mayor el incremento en el frijol de ejote, en el frijol negro jamapa aumentan en la etapa de maduración fisiológica y en la semilla final quedando en el nivel de la semilla original, siendo así un ciclo completo. En el frijol productor de ejote el nivel de lectinas en la semilla final es mayor que en la semilla original, lo que pudiera ser como respuesta al daño que sufrieron las plantas en el invernadero.

- Si se comparan los niveles de lectinas en el trabajo realizado en Chapingo y en la Facultad de química vemos que en general el nivel de lectinas es mayor en el último caso, esto se puede deber a que al haber mayor cantidad de proteínas en la semilla aumenta la cantidad de lectinas, además de que la determinación se realizó con eritrocitos de diferentes animales en ambos casos.
- Los taninos disminuyen en el germinado por la eliminación de la cascarrilla de la semilla y aumentan en la plántula por la aparición de las hojas más maduras, en el frijol negro jamapa mantienen un nivel relativamente constante en las etapas siguientes mientras que en el frijol productor de ejote disminuye en el ejote y en la semilla final.
- Los inhibidores de tripsina disminuyen notablemente en las etapas de germinado y plántula con respecto al frijol seco original, en la etapa de ejote aumentan en ambas variedades, y disminuyen en la semilla final de ambas variedades; en la etapa de semilla en maduración fisiológica en el frijol negro jamapa aumenta la cantidad de inhibidores de manera importante sobrepasando la cantidad de inhibidores encontrados en la soya, lo que probablemente se debió a que las plantas fueron infectadas por hongos y atacadas por arañas en el invernadero de la Facultad.
- Cuando comparamos los resultados para la determinación de inhibidores de tripsina en el trabajo realizado en Chapingo y este podemos ver claramente como el ataque de los insectos y la presencia de hongos en las plantas provocó que la síntesis de inhibidores de tripsina aumentara, esto en las etapas de ejote y maduración fisiológica.

- El trabajar en el invernadero de la facultad tiene ventajas como el hecho de que la temperatura se mantiene constante durante las 24 horas del día y las plantas no están expuestas a los cambios repentinos en el clima, pero al no haber la posibilidad de tener un espacio exclusivo para el trabajo que se realiza, sino que hay que compartirlo con otros trabajos existe la posibilidad de que se alteren los resultados del experimento como ocurrió en este caso.

- Se recomienda repetir el experimento fuera del invernadero para comprobar si se repite el comportamiento observado en este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Sandoval W. , Carmona A. 1998.Comparative study of condensed and hydrolyzable tannin interaction with isolated proteins and enzymes. In: Recent advances of research in antinutritional factors in legume seed and rapeseed. pp 39-42, A.J.M. Jansman, G.D.Hill, J.Huisman, A.F.B. van der Poel editors EAAP Publication No. 93. Wageningen pers. The Netherlands.
- 2.- Booth A.N. and W. Grala 1979. The metabolic fate of gallic acid and related compounds. J Biol. Chem. 234 , 3014-3018.
- 3.- Jung H.G. and Fahey G.C. Jr. 1983.Nutritional implications of phenolic monomers and lignin: a review. J Animal Sci. 57,206-209.
- 4.- Hemingway R.W. and P.E Laks (editor) 1992.Plant Polyphenols. pp 119, 245, 421, 693-696. Plenum Press. New York .
- 5 Trugo L.C. and D. Von Baer 1998 "Analytical methods for the analysis of antinutritional factors in legumeseed. In: Recent advances of research in antinutritional factors in legumeseed and rapeseed pp 11-28 A.J.M. Jansman, G.D. Hill, J. Huisman and AF.B. van der Poel (editors). EAAP Publication No. 93 Wageningen pers. The Netherlands
6. - Hemingway R.W. and A.E Hagerman (editor) 1989 Chemistry and significance of condensed tannins. pp 323-333.Plenum Press. New York.
7. – Asquith T. and L.G. Butler1986. Interactions of condensed tannins with selected proteins. Phytochemistry. 25, 1591-1593.
8. Glick Z. and M.A. Joselyn1970. Effect of tannic acid and related compoundson the absorption and utilization of proteinsin the rat. J Nutrition. 100, 516-520
9. - Mole S. and Haggerman A.E. 1990.Defense against dietary tannins in herbivores: a survey for proline rich proteins in mammals. Biochem. System Ecology.18, 2872-2874

- 10.- Austin P.J., Sucher L.A. and Robbins C.T. 1989. Tannin binding proteins in the saliva of deer and their absence in the saliva of sheep and cattle. *J Chem. Ecology* 15, 1335-1340.
11. - Mitaru B.N., Reichert R.D., and Blair R. 1984. The binding of dietary protein by sorghum tannins in the digestiv tract of pigs. *J Nutrition*. 114, 1787-1796.
- 12.- Eggum B.O. 1978. Breeding for seed protein improvement using nuclear techniques. pp 135-140 143. Intern. Atomic Energy Agency. Viena
- 13.- Mole S., Pieters Luc. and Vielnick Arnold 1990. Herbivore growth reduction by tannins: use of Waldbauer ratio techniques manipulation of salivary proteins production to elucidate mechanisms of action. *Biochem. System & Ecology*. 18, 183-187.
- 14.-Proulx R.W., C.M. Weaver and M.A.Bock 1993 Trypsin inhibitor activity and tannin content do not affect calcium bioavailability of three commonly consumed legumes. *J. Food Sci.* 58(2) 382-384
- 15.- Valle Vega, P. 1986. Toxicología de alimentos. Centro panamericano de ecología humana y salud/OPS/OMS. México, 1-18.
- 16.- Jaffé, W.G. 1973, Toxic proteins and peptides in: toxicants occurring naturally in foods. National academy of sciences . Wasington D.C. USA 109-126
- 17.- Ramírez, G. 1996, Cambios en la composición química y contenido de tóxicos en el fruto del colorín (*Erythrina americana*) durante su maduración. Tesis. Facultad de Química. UNAM México, D.F. 17-21
- 18.- Jaffé, W. G. 1973, Nutritional significance of lectins in: Toxicants occurring naturally in foods. National Academy of sciences. Washington D.C. USA 31-38

ESTA TESIS NO PERTENECE
DE LA BIBLIOTECA

- 19.-Sotelo,A., Gonzalez Licea A., Gonzalez-Garza Ma.T., Velasco E. and Feria-Velasco A. 1980
Ultrastructural changes of epithelial intestinal cells induced by the ingestion of raw *Phaseolus*
acutifolius. Nutr. Reports Int. 27(2) 329-337.
- 20.-. Derache R.(coordinador) 1990, Toxicología y seguridad de los alimentos. pág 111-114, 117,
118, 120, 121, 130, Ed. Omega, Barcelona,
- 21., Bewley, J.Derek and Black Michael .1990, Seeds : Physiology of development and
germination . p 74, 330. Plenum Press. New York
- 22.- Sousa, H. 1993, Estudio comparativo de la composición química de frijoles (*Phaseolus*
vulgaris) silvestres y cultivados. Tesis. Fac. de Química. UNAM. México,D.F. pág 12, 13, 71.
- 23.- Whitaker, J.R. and Feeney, R.E. Enzyme inhibitors in foods in: Toxicants occurring naturally
in foods. National Academy of Sciences. p 276-298. Washington D.C. 1973.
- 24.- Linder,E Toxicología de los alimentos. Ed. Acribia, Zaragoza, España 1978. P 1-21
- 25.-. Liener I.E. Toxic constituents of plants foodstuffs. 2nd edition. Academic Press, Inc.New
York, 1980. pp7-57, 73-99, 143-157, 161-181.
- 26.- Elias G. Luis, Conde Alfredo, Muñoz Alvaro y Bressani Ricardo. Effect of germination and
maturation on the nutritive value of common beans (*Phaseolus vulgaris*). En: Nutritional aspects
of common beans and other legume seeds as animal and human foods. p 140 Academic Press
USA 1979
- 27.- Sotelo,A. and Lucas B. 1998, Variations in antinutritional factors at different stages in seeds
of *Phaseolus vulgaris* and *Erythrina americana*. In: Recent advances of research in antinutritional
factors in legumeseed and rapeseed. pp 409-412 A.J.M. Jansman, G.D. Hill, J. Huisman and
A.F.B. van der Poel (editors). EAAP Publication No.93 Wageningen Pers. The Netherlands.

- 28.- AOAC. Official methods of analysis 15th edition; Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA 17,18,40-62.
- 29 - Kakade M.L., J.J Rackis, L.E. McGhee and G. Puski 1974 Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: A collaborative. Analysis of an improved procedure. Cereal Chem. 51, 376-382.
- 30.- Jaffe G. and Brucher O. 1972 Toxicity and especificity of diferent bean hemagglutinins: Arch. Latinoam. Nutr. 22, 267-281.
- 31.- International Organization of Standardization. ISO 9648: 1988 Determinación del contenido de taninos en sorgo