

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

pp

"LA ULTRAESTRUCTURA DEL COTILEDON DE
Cicer arietinum (GARBANZO), DESPUES DEL
REMOJO EN AGUA ALOTROPIZADA Y SOLUCION
SALINA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JUAN JOSE SERRANO ARELLANO

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. CLARA ESQUIVEL HUESCA



MEXICO, D. F.



JULIO, 2003

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**TESIS CON
FALLA DE
ORIGEN**



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MEXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Juan José Serrano Arellano

FECHA: 27/09/03

FIRMA: [Firma manuscrita]

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "La ultraestructura del cotiledón de Cicer arietinum (garbanzo), después del remojo en agua alotropizada y solución salina."

realizado por JUAN JOSE SERRANO ARELLANO

con número de cuenta 07715181-0 , quien cubrió los créditos de la carrera de: BIÓLOGO

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
 Propietario

Dra. Clara Esquivel Huesca

[Firma manuscrita]

Propietario

Dra. Guadalupe Trinidad Zavala Padilla

[Firma manuscrita]

Propietario

Biol. María Raquel González Avalos

[Firma manuscrita]

Suplente

Dr. Guillermo Laguna Hernández

[Firma manuscrita]

Suplente

Dra. Sonia Vázquez Santana:

[Firma manuscrita]

Consejo Departamental de Biología

[Firma manuscrita]

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

B

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
 DE BIOLOGÍA

Dedico este trabajo enteramente a la persona que la vida me brindó el privilegio de conocer desde que llegue a este mundo, y quien a parte de ser una excelente madre, ha tenido la visión para ser mi mejor aliada, a la Sra. María Isabel Arellano Garnica. Mami, gracias por tu apoyo incondicional.

A mi hermana Lulú, su esposo Martín y a mi hermano Daniel, ustedes saben que contarán conmigo en todo momento.

A mis sobrinos Dany y Yael.

A mi padre el Sr. Daniel Serrano Martínez.

En memoria de mi abuelita Cruz y mi amigo Raúl Salgado.

AGRADECIMIENTOS

A mi maestra la Dra. Clara Esquivel Huesca, por depositar su confianza en mí y apoyarme en todo momento tanto académica como emocionalmente y ser un ejemplo a la dedicación para la investigación científica.

A los miembros del jurado: Dra. Guadalupe Trinidad Zavala Padilla, Biol. María Raquel González Avalos, Dr. Guillermo Laguna Hernández y Dra. Sonia Vázquez Santana, por su valiosa aportación en el contenido del presente trabajo.

A la Coordinadora del Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad Ciencias de la Universidad Autónoma de México, Dra. Judith Márquez Guzmán por brindarme todas las facilidades para el desarrollo del presente estudio.

Al Coordinador Técnico Dr. Emiliano Castellanos Juárez y al Dr. Sebastián Guadalupe Castillo Medina, de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Instituto Mexicano del Seguro Social Siglo XXI; la Dra. Alma Ortiz Plata Investigador del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía del Departamento de Neuropatología, por su apoyo técnico y brindarme las facilidades para el uso del Microscopio Electrónico de Transmisión.

Al Sr. Raúl Patiño Cervantes por proporcionarnos las celdas alotrópicas industriales.

Al Biólogo Jorge Ramón Toledo García, quien desde hace más de dos décadas me ha enseñado el sentido de la lealtad y la dedicación en todos los aspectos, sabes que te admiro y te agradezco todo lo que me has aportado.

A mi familia entre quienes se encuentran mi tío el Sr. Juan Manuel Arellano Garnica, mi prima Paty García Arellano y mis amigas Graciela y Marisol, gracias por su apoyo incondicional.

Gracias a mi Universidad por el enriquecimiento de mi vida.

*Vivir no es sólo existir, sino existir y crear, saber gozar y sufrir y no
dormir sin soñar. Descansar, es empezar a morir.*

Gregorio Marañón.

INDICE

RESUMEN.....	3
I. INTRODUCCION.....	4
II. ANTECEDENTES	6
1. ORIGEN E HISTORIA DEL GARBANZO	6
2. TAXONOMIA DEL GARBANZO	6
3. BIOLOGIA DE <i>CICER</i>	6
4. ULTRAESTRUCTURA DE LAS CELULAS COTILEDONARIAS.....	7
a) La pared celular y la lámina media	8
b) Los gránulos de almidón.....	8
c) El almacén de proteínas en los cuerpos protéicos	9
5. USOS Y VALORES NUTRITIVOS.....	10
6. PRODUCCION MUDIAL DEL GARBANZO.....	11
7. PRODUCCION NACIONAL DEL GARBANZO.....	12
8. EL REMOJO.....	14
a) La importancia biológica de la imbibición	15
b) Preparación doméstica, comercial e industrial, relacionada con el reblandecimiento	16
9. LA ALOTROPIA, LA CELDA ALOTROPICA Y SU EFECTO EN EL AGUA.....	17
10. LA SOLUCION DE ROCKLAND Y METZLER.....	18
III. OBJETIVO.....	20
IV. MATERIAL Y METODO	21
V. RESULTADOS.....	23
AGUA DESTILADA (LÁMINA 1).....	23
a) La pared celular y la lámina media	23
b) Esquinas y espacios intercelulares.....	23
c) Los gránulos de almidón.....	24
d) Los cuerpos protéicos.....	24
LAMINA 1. Micrografías del cotiledón de garbanzo <i>Cicer arietinum</i> ; remojo con agua destilada (testigo).....	26
AGUA ALOTROPIZADA (LÁMINA 2).....	27
a) La pared celular y la lámina media	27
b) Esquinas y espacios intercelulares.....	27
c) Los gránulos de almidón.....	28
d) Los cuerpos protéicos.....	28
LAMINA 2. Micrografías del cotiledón de garbanzo <i>Cicer arietinum</i> ; remojo con agua alotropizada	29
SOLUCION SALINA (LÁMINA 3).....	30
a) La pared celular y la lámina media	30
b) Esquinas y espacios intercelulares.....	30

c) Los gránulos de almidón.....	31
d) Los cuerpos protéicos.....	31
LAMINA 3. Micrografías del cotiledón de garbanzo <i>Cicer arietinum</i> ; remojo con solución salina	32
VI. DISCUSION.....	33
VII. CONCLUSIONES.....	43
VIII. LITERATURA CONSULTADA.....	44
IX. ANEXOS.....	51
ANEXO 1	51
ANEXO 2	52
ANEXO 3	52
ANEXO 4	52
ANEXO 5	52
ANEXO 6	52
ANEXO 7	52
ANEXO 8	52
ANEXO 9	52
ANEXO 10	52
ANEXO 11	52

Resumen

Las semillas de garbanzo (*Cicer aietinum*) son utilizadas por el hombre como una buena fuente de alimento en los países en desarrollo, debido a su aporte rico en proteínas y aminoácidos esenciales. El remojo previo a la cocción de las leguminosas es una práctica doméstica e industrial común para suavizar la textura y acelerar el proceso, en el que habitualmente se gastan considerables cantidades de recursos energéticos con un alto costo. Se han desarrollado algunos métodos que permiten así mismo, disminuir el tiempo de remojo requerido para reblandecer a las semillas; entre ellos podemos citar el aumento en la temperatura del agua de remojo, o bien el uso de diversas soluciones, aunque esto ocasionalmente provoca la pérdida de la calidad en el producto final. Dentro de las soluciones recomendadas, se encuentran el uso de agua alotropizada (AA) y el empleo de la solución salina (SS) de Rockland y Metzler modificada por González et al. (1997). Hasta este momento no se habían realizado observaciones de la ultraestructura de los cotiledones del garbanzo que se suscitan por el reblandecimiento de la semilla durante el remojo. En el presente trabajo se llevaron a cabo observaciones de los cambios que estos tratamientos de remojo provocan en la ultraestructura de las células cotiledonarias del garbanzo en el ámbito de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). Se encontró que ambas soluciones provocan cambios ultraestructurales en la pared celular, lámina media, gránulos de almidón y cuerpos protéicos del cotiledón, de manera más drástica que el agua destilada (AD) utilizada como solución testigo. Los efectos de la ultraestructura por el remojo con AA, son muy parecidos a los observados con AD, aunque al parecer las semillas se hidratan más rápido. Al usar SS, presumiblemente la ultraestructura se afecta incluso, desde los primeros tiempos de remojo. Estos resultados apoyados con un estudio previo de cocción en semillas de garbanzo, sugieren indirectamente que tanto AD y SS reblandecen a las semillas en un menor tiempo, y que de igual manera al utilizarlas se lograría un ahorro en el gasto de energéticos, ya que se disminuyen los tiempos medios de cocción.

I. INTRODUCCION

Las plantas proporcionan casi el 70 % de proteínas en la dieta humana. Las leguminosas, han sido reconocidas como valiosas fuentes de proteínas alimenticias, así como importantes contribuyentes para la dieta en muchas regiones del mundo. Junto con los cereales, son aceptados como una perspectiva para resolver el grave problema de desnutrición, especialmente de los países en desarrollo.

El garbanzo (*Cicer arietinum*), al igual que el cacahuate (*Arachis hypogea*), el frijol (*Phaseolus vulgaris*), la lenteja (*Lens esculenta*) y el chícharo (*Pisum sativum*) entre otros, pertenece a las leguminosas cuyas semillas y legumbres se utilizan para complementar y diversificar la alimentación, debido a su rica aportación de proteínas y aminoácidos esenciales. El garbanzo se prepara de diversas maneras según la región, entre los procesos tradicionales para su consumo se incluyen: el remojo, la molienda, la fermentación, el cocimiento, el asado, el tostado, frito en aceite y al vapor; otras de las formas en que también se consume, son como puré o como germen de garbanzo.

Una de las causas por las que su consumo es reducido, es que el garbanzo aún en estado fresco es duro, provocando un uso excesivo de energéticos, debido a los largos tiempos de cocción necesarios, para alcanzar la textura y palatabilidad adecuadas en su preparación, esto ocasiona por un lado la disminución en su valor nutritivo y por el otro la poca aceptación por parte de los consumidores.

El remojo es un proceso de rehidratación que es ampliamente usado para provocar el reblandecimiento de las semillas comestibles, entre éstas las leguminosas logrando reducir considerablemente el tiempo de cocción; a pesar de esto se requiere también de largos periodos de remojo para obtener los resultados adecuados, y adquirir las características de calidad apropiadas del producto final. Para disminuir los tiempos de remojo, se han desarrollado algunos métodos, entre ellos podemos citar el aumento en la temperatura del agua de remojo, o bien el uso de diversas soluciones, aunque esto ocasionalmente conlleva a la pérdida de la calidad en el producto final. Entre las

soluciones recomendadas, se encuentran el uso del agua alotropizada y el empleo de la solución salina de Rockland y Metzler (1967); en la primera las llamadas celdas alotrópicas se recomiendan para reducir los tiempos de cocción; respecto a la segunda, ya se han obtenido resultados formales en la suavización de las semillas de leguminosas, entre ellas las del garbanzo.

La mayoría de los trabajos acerca de los efectos que el remojo ocasiona en las leguminosas, han sido relacionados con la absorción de agua y con la textura de las semillas, esta última ha sido analizada a nivel de microscopía óptica (MO) y de microscopía electrónica de barrido (MEB); sin embargo, no se han realizado estudios a nivel de microscopía electrónica de transmisión (MET). En este rubro probablemente sea debido a la dificultad que presentan las células vegetales cuando son procesadas para su análisis con el MET, ocasionado principalmente por la presencia de paredes celulares y el estado vítreo de las semillas frescas.

Como parte de un proyecto más amplio, se obtuvieron resultados en semillas de garbanzo a nivel de MO, donde se emplearon como medios de remojo el agua alotropizada y la solución salina de Rockland y Metzler, a pesar de esto a la fecha no existen observaciones de los cambios que estas soluciones ocasionan en la ultraestructura de las células cotiledonarias del garbanzo a nivel de MET.

Al respecto, consideramos que el análisis de la ultraestructura de las células cotiledonarias mediante el MET después del remojo en ambos tratamientos, brindará un mejor conocimiento sobre los efectos en su textura, lo que permitirá un aprovechamiento racional de los recursos energéticos utilizados para su preparación doméstica e industrial; paralelamente, esto ofrecería la posibilidad de que el consumo del garbanzo se incremente en un futuro inmediato.

II. ANTECEDENTES

1. ORIGEN E HISTORIA DEL GARBANZO

El garbanzo es probablemente originario de la zona suroeste de Turquía, sin embargo se han postulado diferentes orígenes como lo son en el norte de Persia, el suroeste de Asia y la cuenca del Mediterráneo. Por otro lado, existen indicios principalmente lingüísticos, que sugieren que una variedad de garbanzo de semilla grande y color crema llegó a la India, probablemente de Afganistán, ya que su nombre hindú "kabuli chana" (chana = garbanzo), hace una clara referencia a la capital afgana. Al garbanzo hindú, que es más pequeño se le llama "deis" (local); estas denominaciones son ampliamente utilizadas para diferenciar a los cultivos que actualmente se cosechan en esas regiones. En América el garbanzo fue introducido por los españoles y los portugueses en el siglo XVI (De Miguel, 1991).

2. TAXONOMIA DEL GARBANZO

La palabra "*cicer*" es de origen latino, y probablemente derive de la palabra pre-indogermánica "*Kickere*", así mismo la palabra "*arietinum*" es la probable traducción del griego *Arios*, que significa carnero y garbanzo, en clara alusión a la forma de la semilla, parecida a la cabeza de un carnero ("*Aries*"). Inicialmente el género *Cicer* se clasificó como parte de la Tribu *Vicieae* Alef de la Familia *Fabaceae*, pero por sus características únicas actualmente está considerado en la Tribu *Cicereae* Alef. Adicionalmente, en la zona suroeste de Turquía limitrofe con Siria, se han encontrado tres especies silvestres muy relacionadas con el garbanzo: *C. bijugum* K.H. Rech, *C. echinospermum* P.H. Davis y *C. reticulatum* Lad. Esta última, también se puede clasificar como variedad o una subespecie silvestre de *C. arietinum* (De Miguel, 1991).

3. BIOLOGIA DE *Cicer*

La germinación de la semilla del garbanzo es hipógea y el crecimiento de la plúmula produce un retoño erecto, hasta formar la primera hoja verdadera que tiene dos o tres pares de folíolos y uno terminal. La radícula es alargada y posteriormente produce raíces secundarias. Las hojas nacen individualmente en cada nudo, arregladas en forma alterna y generalmente son unipinadas; comúnmente poseen de 11 a 13 folíolos en cada hoja,

dispuestas en un raquis con un pequeño peciolo. Las estípulas tienen de 3 a 5 mm de longitud y de 2 a 4 mm de ancho. Todas las superficies externas de la planta, con excepción de la corola están cubiertas por pubescencia, presentando pelos glandulares o sin glándulas. La planta posee una raíz profunda que penetra hasta 120 cm y presenta pocas raíces laterales. Las plantas crecen en arbustos de 20 a 100 cm de altura. Las flores son típicamente papilionáceas y por lo general crecen individualmente en racimos axilares, aunque se pueden encontrar pares de flores. Las flores de 6 a 13 mm de largo, emergen sobre el racimo axilar en el pedicelo y el pedúnculo. La corola es comúnmente de color morada o blanca y raramente azul. Generalmente las plantas poseen un carpelo por cada flor. Los estambres son didelfos. El pistilo y las anteras permanecen dentro de la quilla. La polinización se lleva a cabo antes de la apertura del botón floral, por lo tanto la fecundación es cleistógama, a pesar de que el garbanzo produce abundantes flores, una gran parte de ellas nunca llegan a madurar. El garbanzo produce desde unas pocas, a más de 100 vainas por planta. El tamaño de la vaina es muy variable, aunque está influenciado por el medio ambiente; su forma ha sido descrita como romboide, oblonga u ovalada y al igual que las flores, muchas de las vainas nunca maduran. La semilla posee testa, dos cotiledones y el eje embrionario; por lo general es puntiaguda y muestra un pico característico recto o curvado (Anexo 1). Se pueden reconocer tres formas de semilla: angular, en forma de cabeza de buho y más o menos redondeada (como chicharo). La superficie de la semilla puede ser rugosa, lisa o también tuberculada y el color es una característica muy importante para la elección comercial; ya que existen 21 colores y tonos diferentes reconocidos, dentro de los cuales pueden presentarse el blanco, crema, amarillento, café, rojizo y hasta negro. El peso de las semillas es muy variable, ya que 100 unidades pesan de 8 a 70 g, dependiendo de la variedad (Singh, 1997).

4. ULTRAESTRUCTURA DE LAS CELULAS COTILEDONARIAS

Para comprender los cambios provocados en la textura de los cotiledones por el efecto del remojo, es necesario detallar la ultraestructura de las células cotiledonarias. Los cotiledones de las leguminosas difieren marcadamente de otras células del parénquima típico de los vegetales, debido a que la desecación que sufren durante la maduración de la semilla, hay la reducción de organelos celulares tales como el núcleo, las mitocondrias, etc., y mayor presencia de proteínas de reserva y almidón acumulado. Otra característica de estas semillas, es el estado protector ocasionado por los carbohidratos solubles como

la sacarosa y algunos oligosacaridos de la familia de la rafinosa, que estabilizan la estructura lamelar y participan en la protección del estado seco de la semilla, mantienen la actividad enzimática, e inducen el estado vítreo del citoplasma. Este estado consiste de un líquido de alta viscosidad que impide la difusión molecular y así mismo evita o disminuye las reacciones químicas. Esta fase es inestable y se funde dependiendo de la composición química y del contenido de humedad de la semilla (González, 1994; Tovar, 1997).

a) La pared celular y la lámina media

La pared celular es la estructura que rodea a la membrana plasmática en las células vegetales maduras. La pared celular consiste de microfibrillas de celulosa y hemicelulosa principalmente. Otros constituyentes importantes de las paredes celulares, son las sustancias pécticas que conforman a la lámina media (la unión entre las paredes celulares), presentes como gel polielectrolito, que presenta entrecruzamientos provocados por los cationes divalentes en forma quelada; la organización de estas moléculas en fibrillas, tiene una significativa influencia en la textura de la semilla, así como también los polisacáridos de las paredes que contienen entre 5 y 10% de compuestos polifenólicos, en la forma de complejos polisacárido-proteína-polifenol. Las sustancias pécticas, comprenden una mezcla intrincada de polisacáridos coloidales derivados de la pectina metil esterificada, el ácido péctico diesterificado y sus sales (pectatos), además de ciertos polisacáridos neutros que constituyen el armazón galacturónico (Stanley y Aguilera, 1985).

b) Los gránulos de almidón

Los carbohidratos son el principal componente de las leguminosas, ya que por lo general contienen de 60 a 70% de su peso total seco. El almidón es el de mayor proporción, aunque existe una gran variedad de carbohidratos distribuidos en la semilla, como los oligosacáridos, a los que se les atribuye ser los causantes de la flatulencia, junto con otros monosacáridos y polisacáridos. El almidón de las leguminosas se encuentra depositado en los denominados gránulos de almidón, y sus tamaños varían entre 20 μ m, 50 dependiendo de la especie. Se ha reportado que estos gránulos son resistentes al hinchamiento y la ruptura, caracterizándose por contener de 20 a 30% de amilosa (Stanley y Aguilera, 1985; Derek y Black, 1994).

c) El almacén de proteínas en los cuerpos protéicos

Una proteína almacenada se define como: "cualquier proteína acumulada en cantidades significativas mientras la semilla se desarrolla; durante la germinación esta proteína es rápidamente hidrolizada para brindar una fuente de nitrógeno reducido en los primeros estados del crecimiento de los brotes". Lo anterior comprende a las proteínas que no tienen otra función más que la definida; así también, a las proteínas que poseen actividades biológicas adicionales, como lo es la enzimática. Todas ellas se encuentran almacenadas en los mismos compartimentos subcelulares y muestran cinéticas de acumulación y degradación similares. Las proteínas almacenadas de las leguminosas fueron primeramente descritas por Osborne en 1924 (Vitale y Bollini, 1995) como "proteínas solubles a la sal aunque insolubles en agua", lo que le permitió agruparlas en dos clases: las vicilinas y las leguminas, diferenciándose por el tamaño, su contenido de azúcar y su coeficiente de sedimentación (valores S). A pesar de que ambas son globulinas y se encuentran presentes en la mayoría de las leguminosas, su abundancia es relativamente variable; ya que algunas especies carecen de una de ellas. Un tercer tipo de proteínas, está representado por las lectinas o proteínas unidas a carbohidratos y las proteínas que se le relacionan. Las lectinas están distribuidas en las plantas en menor proporción, aunque se encuentran en la mayoría de los tejidos vegetales; sin embargo, grandes cantidades se pueden encontrar en semillas de la familia *Phaseolae* (Vitale y Bollini, 1995).

Por otro lado, los organelos típicos para el almacenaje de las proteínas de reserva se presentan sólo en las semillas. Estos organelos actualmente se denominan cuerpos protéicos y se encuentran tanto en tejidos haploides, diploides y triploides. En el caso de las semillas dicotiledóneas, no poseen endospermo y el tejido especializado de reserva es el parénquima cotiledonario, los cuerpos protéicos se encuentran contenidos dentro del citoplasma de las células cotiledonarias. Son estructuras pequeñas y más o menos esféricas, su diámetro varía de una planta a otra, e incluso de un tejido a otro (de 0.1 a 25 μm), se encuentran rodeados por una membrana que al parecer es simple. De acuerdo a su origen específico o histológico, se pueden distinguir varias estructuras internas en los cuerpos protéicos; algunos poseen una estructura granular homogénea y carecen de inclusiones embebidas en su matriz proteica, mientras otros exhiben inclusiones internas que pueden ser de dos tipos: el globoide y el cristaloides. El globoide es una inclusión donde se almacena ácido fítico, en tanto que el cristaloides es protéico (Anexo 2). En el caso de las leguminosas, la mayoría carece de ambas inclusiones, aunque en el

cacahuete (*Arachis hypogea*), éste exhibe dos tipos de cuerpos protéicos, unos con uno o varios globoides y otros que son homogéneos. Las sustancias acumuladas en los cuerpos protéicos difieren entre una y otra especie, aunque en promedio contienen de 70 a 80% en peso seco de proteínas almacenadas; 10% de sales de ácido fítico; enzimas hidrolíticas en menores proporciones, cationes y ácido ribonucleico (ARN), además de otros compuestos tales como carbohidratos, sales de ácido oxálico, lípidos y tocoferol, cuya presencia es muy variable y de menor importancia. El ácido fítico o hexafosfato de mioinositol, es un agente quelante y está considerado como una fuente de cationes y de fósforo, cuando el globoide no está presente como en la mayoría de las leguminosas, la fitina no tiene un lugar definido y podría estar presente como un complejo fitin-protéico. La síntesis de la fitina se lleva a cabo durante la maduración de la semilla, dentro del cuerpo protéico y precede a la fosforilación del mioinositol. Con respecto a las enzimas hidrolíticas que están contenidas dentro de los cuerpos protéicos, su función es degradar los componentes almacenados, proteínas y fitina durante la germinación; por lo tanto estos organelos poseen propiedades autolíticas, ya que sus hidrolasas no reaccionan con los demás componentes citoplásmicos en este evento. El destino de los cuerpos protéicos durante la germinación, inmediatamente después de la autólisis, es que se convierten en pequeñas vacuolas que se fusionan para dar lugar a vacuolas centrales, esta fusión inicia antes de que se complete la degradación proteica (Chang, 1977; Pernollet, 1978; Derek y Black, 1994).

5. USOS Y VALORES NUTRITIVOS

El garbanzo es una muy buena fuente de carbohidratos y proteínas (Anexo 3), que en conjunto constituyen alrededor del 80% del peso total de la semilla. El contenido total de carbohidratos varía del 50 al 70%, siendo su principal componente el almidón (alrededor del 47%). Los oligosacáridos más comunes en las semillas del garbanzo son la rafinosa, la estaquirosa y la verbascosa. Estas sustancias no son digeridas en el intestino delgado, ya que éste carece de galactosidasas; al llegar al colon, son fermentados produciendo pequeñas cadenas de ácidos grasos y ocasionan la flatulencia. Los oligosacáridos son compuesto solubles y son fácilmente eliminados por acción del remojo en solución salina o por el proceso de cocción. El garbanzo contiene cantidades significativas de polifenoles que son considerados como antinutricionales, sin embargo esta posición ha cambiado al describirse el papel de los polifenoles como antioxidantes y antimutágenos. El contenido

de proteínas en promedio es del 20%, esto es dos veces más que la de los cereales, por lo que se consideran una buena fuente de proteína y aminoácidos esenciales, como isoleucina, leucina, fenilalanina, treonina y valina. A pesar de que las semillas de leguminosas exhiben una deficiencia de aminoácidos ricos en sulfuro como lo son la metionina, la cisteína, poseen un contenido de lisina adecuado. La calidad nutricional depende de su contenido de aminoácidos y de la utilización fisiológica de aminoácidos específicos después de la digestión, la absorción y mínimos rangos obligatorios de oxidación. También la disponibilidad de los aminoácidos varía con la fuente de proteína, el tratamiento en el procesamiento y la interacción con otros componentes en la dieta (De Miguel, 1991; Bravo et al., 1999; Clemente et al., 1999). Otro aporte importante de las leguminosas en la alimentación humana es su contenido de minerales; en el caso de las semillas de garbanzo, Jambunathan y Singh (1981), reportaron que principalmente están constituidas por los siguientes minerales: Fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y en menor proporción zinc (Zn), cobre (Cu), hierro (Fe) y manganeso (Mn); el Ca es el mineral predominante de la testa del garbanzo y forma casi el 60% del total en la semilla entera.

No obstante todas las ventajas que presentan las leguminosas, éstas también contienen factores tóxicos y antinutricionales que limitan su aprovechamiento, entre estos se encuentran los inhibidores de tripsina, las fitohemaglutininas, los factores biociogénicos, y los glucósidos cianogénicos, entre otros (Liener, 1961; Dang et al., 2000), que por lo regular son removidos o desactivados gracias al proceso de cocción.

6. PRODUCCION MUDIAL DEL GARBANZO

El garbanzo es la segunda leguminosa más importante en el mundo, ya que se cultiva por lo menos en 33 países del sur y oeste de Asia, en el norte y este de Africa, en el sureste de Europa, en el norte y sur de América y en Australia (Singh, 1997). La India es el país productor y consumidor más importante (Anexo 4), ya que produce poco más del 60% del total mundial; sin embargo, a pesar de que en esa región se ha incrementado la superficie cultivada se ha obtenido un comportamiento negativo de los rendimientos, provocando que este país tenga que recurrir al mercado externo para satisfacer su demanda interna, convirtiéndolo de igual manera en el principal importador de garbanzo. Turquía es el

segundo país productor, que también incorporó una mayor superficie al cultivo, aunque no alcanzó un aumento en los rendimientos. Canadá ocupa el tercer lugar; Paquistán ocupa el cuarto sitio y es el único país que ha registrado un comportamiento con altibajos en su producción, con una clara tendencia a la baja, debido a las variaciones que se han presentado tanto en la superficie cultivada como en los rendimientos. Australia se encuentra en la quinta posición. Respecto a Irán, este país ha demostrado un importante incremento en su producción, pero al igual que los demás países, no ha sido consecuencia de una mayor productividad, sino más bien por la incorporación de una mayor cantidad de hectáreas al cultivo. Es importante destacar que estos principales países productores, no ocupan el mismo lugar en materia de rendimiento. Este renglón es ocupado por países que no tienen un peso significativo en la producción mundial, e incluso algunos de ellos son los llamados desarrollados, tal es el caso de Italia, o países no desarrollados como Grecia, Jordania, Líbano y Egipto, donde los métodos de cultivo, el uso de mejores semillas y fertilizantes, les ha permitido obtener mejor rendimiento. El comercio internacional del garbanzo no tiene la importancia que registran otros granos, debido a que gran parte de la producción es consumida dentro de los mismos países productores. Sin embargo, dentro de los principales países exportadores de garbanzo se encuentran: Turquía, Australia, México, Siria y Estados Unidos, que en conjunto exportan poco más del 95% del total mundial (Anexo 5). Los importadores están más diversificados que los exportadores, pero destacan por su importancia, además de la India y Pakistán países como: Bangladesh, España y Argelia, que en conjunto demandan cerca del 65% del total mundial. En Asia el garbanzo es un producto muy demandado y consumido, a tal grado que casi el 85% de la producción mundial se encuentra concentrada en esa zona, y aproximadamente el 60% de las importaciones de garbanzo, las realiza ese continente (ASERCA, 1997; FAO, 2002).

7. PRODUCCION NACIONAL DEL GARBANZO

Las leguminosas han sido cultivadas en México desde tiempos muy remotos. Existen evidencias de que algunas culturas prehispánicas usaron al frijol como alimento por más de 4,000 años. En el caso del garbanzo, su cultivo va íntimamente ligado con la conquista española. Las Antillas fue la primera región en donde los españoles realizaron los primeros cultivos para el establecimiento de dicha leguminosa, aunque debido a las

condiciones y factores climáticos desfavorables dieron resultados poco alentadores. Al ser introducido a México donde el potencial ecológico favorable fue enorme, permitió que este cultivo se desarrollara con éxito, de tal forma que en pocos años llegó a competir con el producido en España. La producción comercial del garbanzo lleva más de 50 años en nuestro país. A pesar de ser un cultivo que no utiliza grandes superficies, su importancia radica en que es un producto que se destina en mayor medida al mercado internacional. Compitiendo en el extranjero con países como Turquía, Canadá y Australia. El garbanzo de México se ha ubicado como el mejor del mundo, no sólo por su alta calidad, sino también por la capacidad que ha tenido para introducir diversas variedades al mercado, lo que le ha permitido llegar a más de 18 países. Sin embargo, este sector en donde confluyen productores privados y ejidatarios a través de uniones o asociaciones, que buscan sobre todo, las mejores condiciones para la comercialización, han visto en el aspecto de financiamiento, su principal problema, ubicándolos en seria desventaja, frente a las empresas comercializadoras privadas (ASERCA, 1997; FAO, 2002).

Las variedades de garbanzo que se producen en el país, provienen originalmente de la región mediterránea y asiática. Debe destacarse que estas variedades han sido adaptadas y mejoradas genéticamente, produciendo variedades con altos rendimientos, semilla de buena calidad para el mercado de exportación y resistencia a las distintas enfermedades de pudrición de la raíz. Así, encontramos que desde el año de 1961 se iniciaron en el país los trabajos de mejoramiento genético del garbanzo, dirigido principalmente al garbanzo forrajero. Posteriormente, los trabajos en la variedad blanca permitieron que se liberaran las primeras variedades mejoradas obtenidas por selección individual siendo éstas: "Unión", "Angostura", "Culiacán 860" y "Sinaloa". Durante la segunda parte de la década de los setenta y primera de los ochenta, se obtuvieron otras variedades como "Surutato 77", "Sonora 80" y "Santo Domingo 82", las que además de tener alto rendimiento y calidad de grano, presentan un buen nivel de resistencia al ataque de *Fusarium sp*; cabe señalar que la resistencia se obtuvo de líneas de garbanzo forrajero, las que fueron cruzadas con variedades comerciales de garbanzo blanco. De manera más reciente, se liberaron nuevas variedades como "Tubatama 88", "Mocorito 88" y "Blanco-Sinaloa 92", "Hermosillo 93" y "Pictic 93". Han sido tan exitosos los programas de investigación y mejoramiento genético, que cerca del 95% de la superficie nacional sembrada con garbanzo, es de variedades generadas en el país. En Sinaloa, principal estado productor, la época de siembra para el garbanzo blanco es durante el periodo de noviembre y diciembre, mientras que la cosecha es de abril a junio. De esta forma la

producción mexicana de garbanzo blanco sale al mercado internacional durante el bimestre mayo-junio, a diferencia de la producción española que aparece en julio y la turca en septiembre, marcando una cierta ventaja. La variedad Tubutama 88: en particular presenta un periodo de maduración de 126 días y una cierta tolerancia a los hongos, causantes de la enfermedad comúnmente conocida como "rabia del garbanzo"; la densidad de siembra es de 60 a 80 kg/ha; de la cual, el 90 % del grano es usado para exportación. A este respecto, México sólo ha contribuido con el 9.6% de las exportaciones totales de garbanzo, ocupando así el cuarto lugar mundial; a pesar de ello su participación en el mercado internacional ha ido en aumento, destacando a España y Estados Unidos como sus principales mercados; pero sobre todo España ya que en 1994 se destinó al mercado español poco más de la mitad de las exportaciones. Sin embargo, estudios recientes han señalado que México cuenta con un amplio mercado potencial para la colocación de su producto. De acuerdo a la Unión Nacional de Productores y Exportadores de Garbanzo (UNPEG), las exportaciones se han dirigido a distintos países que lo solicitan por su calidad y precio de mercado, tales como Canadá, Estados Unidos, y América Latina, podrían convertirse en importantes demandantes del garbanzo mexicano, pero no se descarta a Francia, Italia y algunos asiáticos como Turquía e India, aunque en menor medida éstos últimos (ASERCA, 1997; FAO, 2002).

8. EL REMOJO

El garbanzo para ser consumido al igual que otras leguminosas, se debe cocer. En el proceso de cocción se presentan cambios estructurales de la lámina media ya que ésta se fractura y se solubiliza, y gracias a esto las células se separan. De igual manera las proteínas del citoplasma se desnaturalizan, permitiendo que se lleve a cabo la gelatinización de los gránulos de almidón (Stanley y Aguilera, 1985). Ahora bien, cualquier factor previo como lo es el remojo, que modifique cualitativa o cuantitativamente los componentes de la pared celular y/o la susceptibilidad de los gránulos de almidón a la gelatinización o la estabilidad térmica de las proteínas, afectará en forma importante el proceso de cocción (Stanley y Aguilera, 1985; Bernal, 1994; González, 1994).

Habitualmente, el remojo se ha practicado desde la antigüedad para facilitar el consumo humano de las semillas, entre éstas las del garbanzo, y su principal beneficio es la disminución de los largos periodos de cocción utilizados tanto en la preparación

doméstica como la industrial. Generalmente se realiza usando agua corriente, aunque la adición del cloruro de sodio y el bicarbonato de sodio, son sales que generalmente se usan en el proceso tradicional de remojo antes de la cocción.

a) La importancia biológica de la imbibición

Desde el punto de vista biológico en la mayoría de las leguminosas, una vez que la semilla ha completado su desarrollo se inician los cambios que darán lugar al establecimiento del reposo en las semillas; este reposo o reducción del metabolismo se denomina quiescencia, cuando la causa de que no germine sea fundamentalmente la falta de agua, como en el caso de las semillas de garbanzo. El agua es el recurso clave para iniciar los cambios fisiológicos que conducen a la germinación de este tipo de semillas al llegar de manera natural al suelo. La cantidad de agua que absorbe una semilla y la velocidad a la que lo hace, no sólo dependen de las características de la semilla, como son la permeabilidad de la testa, la composición química de sus reservas, el tamaño y contenido de humedad, sino que también están determinadas por condiciones ambientales como la humedad del suelo, la humedad del aire y de la temperatura. En la mayoría de las semillas, el agua penetra inicialmente por el micrópilo. El proceso de imbibición en el que se somete a la semilla a largos periodos de tiempo, para inducir su germinación, se conoce comúnmente como remojo, y su acción es la de acelerar la solubilización de las moléculas inhibitoras asociadas a la impermeabilidad de la testa. Las consecuencias del remojo en la semilla son la liberación de gases ocasionada por la absorción coloidal y una rápida salida de solutos tales como azúcares, ácidos orgánicos, iones, aminoácidos y proteínas, esto ocurre por lo regular a los pocos minutos de que el agua penetra a las células cotiledonarias. Al exponer a las semillas a largos periodos de remojo, estas mantendrán su metabolismo de manera anaeróbica, y al prolongar aún más el tiempo de remojo, la falta de oxígeno conlleva a la muerte de la semilla. (Derek y Black, 1994). En el frijol, las enzimas se encuentran presentes en la semilla seca, lo mismo que su sustrato, y solo requieren de agua para reiniciar su actividad. Entre éstas enzimas se encuentran las lipasas y las lipogenasas, que al activarse modifican a los lípidos y producen degradación en las membranas; de la misma manera las proteasas hidrolizan a las proteínas produciendo péptidos de menor peso molecular y diferente estabilidad térmica. La fitasa hidroliza al ácido fítico o inosítidos, al fósforo inorgánico y cationes. La pectina esterasa que hidroliza los grupos metilo de las pectinas y expone a los grupos carboxilo; su acción en la semilla de frijol produciría un aumento en el número de los sitios

y/o en la fuerza de interacción de las pectinas con los iones bivalentes; y las peroxidasas y enzimas asociadas que ocasionarían el entrecruzamiento de los fenoles presentes en la pared celular. Por último se manifiesta aunque no de igual manera, la actividad de las glucosidasas y las amilasas (Bernal, 1994). Los cambios estructurales de las semillas de garbanzo remojadas al igual que los observados en las semillas del frijol, son también el reflejo de las actividades y reacciones de estas enzimas en cualquiera de los tratamientos usados.

b) Preparación doméstica, comercial e industrial, relacionada con el reblandecimiento

Como se señaló con anterioridad, el remojo es el proceso previo con el que las amas de casa preparan comúnmente de manera empírica a las semillas de leguminosas para su consumo, a pesar de esto en algunas recetas se observan interesantes recomendaciones que se relacionan con los cambios que sufren las semillas por la acción del remojo, y dependiendo de las necesidades y gustos, se modifican las condiciones físicas y químicas del medio de remojo, con la finalidad de obtener un producto suave y palatable (Anexo 6). Industrialmente, por lo general las semillas de leguminosas son procesadas para enlatarse con la finalidad de obtenerlas fácilmente durante las temporadas bajas de producción. La práctica comercial más común involucra la hidratación de las leguminosas en agua, seguida de un proceso térmico en una solución que contiene 2% de NaCl. El enlatado de semillas tales como el frijol (*Phaseolus vulgaris*), es un proceso interesante ya que la cocción y la esterilización se realizan durante la misma operación; la solución salina extrae más sólidos y provoca mayor reblandecimiento durante el proceso (Quast y Silva, 1977). Pese a que antes de enlatarse las semillas son cocidas, su textura tiende a ser variable, algunas veces haciendo difícil el control de calidad. Las soluciones en las que son sometidas para obtener la suavidad deseada, no son por lo general difundidas por las empresas enlatadoras, ya que cada una utiliza fórmulas únicas en el proceso de sus productos (Silva et al., 1981).

9. LA ALOTROPIA, LA CELDA ALOTROPICA Y SU EFECTO EN EL AGUA.

Existen referencias respecto al efecto que causa el remojo con agua alotropizada, en la disminución de los tiempos de cocción empleados para suavizar a las semillas comestibles en general.

El término alotropía, deriva de la raíz griega: ALLOS - Cambio y TROPOS - Forma; y en general se define como "la existencia de un elemento en más de una forma en el mismo estado físico". Las diferentes formas de un mismo elemento se conocen con el nombre de alótropos o formas alotrópicas, y como ejemplos claros de esto se encuentran los casos del carbono, que se presenta en forma de diamante o de grafito; del fósforo, que puede ser amarillo o rojo; y del oxígeno que puede existir como oxígeno (O₂) y como ozono (O₃), entre otros. En todos estos casos la composición química es idéntica, pero varía la forma en la que se distribuyen los átomos en su estructura. Cuando la diferencia de energía entre dos estructuras diferentes es relativamente pequeña y cuando una barrera de energía significativamente potencial debe ser sobrepuesta para transformar uno en otro, puede ser posible que existan ambas formas, como configuraciones estables a la misma temperatura y presión. En tal caso, una forma será termodinámicamente estable, en tanto la otra es metastable, esto es teóricamente inestable con respecto a la otra, pero inhibida para realizar una transformación por la barrera de potencial energético, que debe ser superado (Brown et al., 1997; Mc Kelvey, 1993; Mortimer, 1983; Gray y Haight, 1983; MacDonald y Burns. 1978).

Bajo este esquema, se fundamentan los principios del dispositivo denominado "Celda Alotrópica", el cual consiste de un envase cilíndrico hueco hecho de latón, sellado herméticamente y que contiene, una mezcla en pasta de polvo de magnetita y aserrín, inmersa en una solución de ácido ascórbico (Muñoz, et al. Por publicar). Se dice que este instrumento es capaz de generar un campo magnético homogéneo alrededor de su superficie revestida de plata o de oro (Anexo 7). Su inventor, el Sr. Raul Patiño Cervantes la patentó en los Estados Unidos de América con el número *US5522992: Solution treatment device* (dispositivo para el tratamiento de soluciones, http://www.delphion.com/cgi-bin/viewpat.cmd/US05522992_?OUT_FORMAT=pdf&MODE=fstv).

El uso que originalmente se le daba a la celda alotrópica, se llevaba a cabo en las máquinas de vapor para disminuir los daños que sufrían las calderas y conductos por

donde circulaba el agua que se calentaba para producir el vapor, al quitar las incrustaciones de sarro que se formaba en las mismas. En la actualidad se ha recomendado su uso en el cuerpo humano para sanar golpes y en la limpieza general del organismo. De igual manera, entre otros usos se recomienda utilizarla para evitar que las semillas comestibles se infecten por parásitos, o bien el alotropizar agua y usarla en el remojo para reducir los tiempos de cocción. Se dice que el agua al alotropizarse, sufre un cambio de los grados en la unión del átomo del oxígeno con los dos átomos de hidrógeno (de 104.5° a 108°), provocando mayor acción disolvente y un cambio estructural geométrico de las sales y minerales, evitando el depósito de incrustaciones que forman el sarro en las tuberías, lo que análogamente por citar un ejemplo, es la formación de los cálculos renales en el cuerpo humano. Cabe mencionar que todas estas recomendaciones son observaciones empíricas, ya que no señalan alguna fuente bibliográfica que sostenga tales afirmaciones (Folleto del proveedor).

A pesar de esto, en la actualidad se tiene conocimiento de un trabajo de investigación realizado por el departamento de Física del CINVESTAV-IPN en colaboración con otras Instituciones, en el que se midió el campo magnético que una celda alotrópica generaba en el agua destilada y el agua ultrapura. Cabe mencionar que al alotropizar ambas soluciones, éstas tuvieron contacto físico con la superficie de la celda alotrópica, al sumergirla durante 120 minutos, el proveedor refiere que el agua se alotropiza en unos pocos minutos. Los autores observaron que en realidad la función dieléctrica del agua alotropizada se incrementaba en las soluciones tratadas, y aún mucho más, cuando el agua se calentaba y/o se agitaba (Muñoz, et al., en preparación).

10. LA SOLUCION DE ROCKLAND Y METZLER

El efecto que comúnmente tienen las soluciones salinas en el reblandecimiento, apoyó al desarrollo de un proceso para preparar semillas de frijol, entre ellas del denominado "Frijol de Lima" (*Phaseolus lunatus*), y cocerlas en el menor tiempo posible obteniendo un valor nutritivo y de digestibilidad óptimos, durante un periodo de 15 min o aún en un tiempo menor de cocción (Rockland y Metzler, 1967). Dicho proceso consistió por un lado, en separar las testas, por infiltración al vacío de una solución de sales inorgánicas comunes, compuesta por cloruro de sodio (2.5%), tripolifosfato de sodio (1.0%), bicarbonato de sodio (0.75%) y carbonato de sodio (0.25%); y por el otro remojar y rehidratar las semillas en la misma solución salina. A pesar de que las razones de utilizar esta solución fueron

inicialmente empíricas, los resultados les permitieron corroborar que al ajustar los niveles de cloruro de sodio y las sales totales, era posible controlar el tiempo de cocción de las testas; la presencia del cloruro de sodio en el medio de remojo, aumentó el sabor de los frijoles; los fosfatos y particularmente el tripolifosfato, fueron efectivos para reducir los tiempos de cocción de los cotiledones; estos se agregaron al medio de remojo para disociar al calcio u otro posible complejo metal-salino-protéico; los carbonatos alcalinos controlaban el pH del medio e influyeron en el sabor y las propiedades de cocción de los cotiledones; los agentes activos del medio de remojo facilitaron la imbibición, propiciando la disminución de la rehidratación y los tiempos de cocción de los frijoles procesados en proporción directa a los tiempos de remojo; paralelamente a esto, el uso de esta solución ocasionó la suavización de las semillas. A pesar de que lograron obtener un procesamiento exitoso y una calidad final muy aceptable, los autores no lograron determinar el mecanismo por el cual los frijoles se suavizaron. A partir de estas observaciones, se han realizado otros trabajos para relacionar los cambios en la estructura de las semillas de algunas leguminosas, por el efecto de esta solución salina (Rockland, y Jones, 1974). González et al. (1997), al modificar la fórmula de la solución salina de Rockland y Metzler, observaron que la microestructura de la testa y el cotiledón del frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) se modificaba al ser remojados con dicha solución salina. En estudios adicionales del efecto de la solución salina modificada en la variedad "Perla" de *P. vulgaris*, se obtuvieron cambios de la microestructura de la semilla del frijol desde los inicios del remojo (Lemus et. al., 2001).

Con respecto al garbanzo, Esquivel et al. (2001; 2002), observaron también cambios en la microestructura de los cotiledones de la variedad "Tubutama " de *Cicer arietinum*, al remojar la semilla en agua alotropizada (AA) y en solución salina (SS) de Rockland y Metzler modificada por González et al. (1997); dichos cambios fueron en el tamaño y forma de los gránulos de almidón y los cuerpos protéicos; así mismo determinaron que en relación a los tiempos medios de cocción, los de las semillas remojadas en SS fueron menores respecto al agua destilada (AD) que fue usada como solución testigo de remojo y el AA; ésta última solución de remojo también obtuvo valores de T_{50} menores que en el AD.

III. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo fue determinar los cambios ultraestructurales que sufren las células cotiledonarias de *Cicer arietinum* L. (garbanzo) a nivel de MET, bajo la influencia de tres soluciones de remojo, que son el agua destilada, el agua alotropizada y la solución de Rockland y Metzler (modificada por González et al., 1997).

IV. MATERIAL Y METODO

Se obtuvieron semillas frescas certificadas de garbanzo (*Cicer arietinum*) de la variedad Tubutama 88, donadas por la Productora Nacional de Semillas (PRONASE), de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Las semillas se remojaron en agua destilada (AD), agua alotropizada (AA) y solución salina (SS), según la fórmula de Rockland y Metzler (1967). El AA se obtuvo al introducir una celda alotrópica industrial en 1 lt de agua destilada durante 10 a 12 min; la SS se preparó según la modificación a la original, al sustituir el tripolifosfato de sodio por el fosfato tribásico de sodio (González et al. 1997). Los tiempos de remojo se realizaron en 3.5, 6, 12, 24 y 36 horas en cada solución. La testa de las semillas remojadas en cada tratamiento, se retiró y se cortaron rebanadas de 1 a 3 mm de espesor, de la zona periférica del cotiledón cercano a la epidermis. Las muestras de cotiledón se fijaron con Glutaraldehido-Paraformaldehido (fijación doble) en proporción 3:1.5 % respectivamente, en amortiguador de S-Collidina a una concentración de 0.05 M y pH 7.2, durante 24 horas a 4°C. Al fijador se le agregó sacarosa, a una concentración de 0.06 M, como soluto para evitar la fuerte carga osmótica que ejerce en el tejido y de esta manera evitar el choque osmótico. Después de la fijación, se realizaron seis enjuagues con el amortiguador antes mencionado en un periodo de 5 a 6 min cada uno. Se realizó la deshidratación con cambios de alcoholes graduales, de 30%, 50%, 70%, 85%, 96%, de 15 a 20 min cada uno, y tres cambios de etanol absoluto por 20 min cada uno. Para la inclusión de las muestras se usó la resina LR White. Se realizó la preinclusión lenta en resinas graduales con cambios de 25%, 50% y 75% disueltos en etanol absoluto por 24 horas en cada uno, por último se incluyó en resina pura haciendo tres cambios de una hora cada uno y se colocaron en cápsulas de gelatina durante 24 horas a 60°C para su polimerización. Se realizaron cortes semifinos (0.5-1.5 micras) para explorar las muestras, utilizando cuchillas de vidrio en el ultramicrotomo marca LEICA ULTRACUT R (Anexo 8); después se hicieron cortes ultrafinos (65 a 90 nm), con cuchillas de vidrio nuevas, limpias y desengrasadas, en el mismo aparato. Las tiras de cortes de tejido se montaron en rejillas de cobre para microscopía electrónica de 300 mallas (mesh). El contraste se hizo por la técnica de flotación de las rejillas sobre una gota en cada uno de los contrastantes; en acetato de uranilo 20 min, y en citrato de plomo 10 min. Las observaciones se realizaron en dos MET marca ZEISS M-10, que se encuentran en el Laboratorio de Investigación del Instituto de Neurología de la Secretaría de Salud, y en la Unidad de Investigación Médica

en Enfermedades Oncológicas del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social. Las imágenes observadas a diferentes aumentos, fueron seleccionadas y expuestas sobre placas fotográficas ELECTRON MICROSCOPE FILM, de 8.3 x 10.2 cm de la marca KODAK y en película fotográfica para blanco y negro de 135 mm ISO 100 (misma marca). Luego de revelar las placas y los rollos fotográficos, se positivaron las imágenes en papel fotográfico F-3 de KODAK. Finalmente se seleccionaron y/o amplificaron las micrografías que permitieron la observación más efectiva para el análisis de la ultraestructura cotiledonaria en cada uno de los tiempos de remojo.

V. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en cada uno de los tratamientos de remojo, se han dividido en tres secciones, la primera se refiere a los cambios ultraestructurales observados en los cotiledones tratados con AD (testigo), la segunda a los resultados del AA; y la tercera a los obtenidos con SS.

AGUA DESTILADA (Lámina 1)

a) La pared celular y la lámina media

En las primeras horas de remojo (3.5 horas), la pared celular se encontraba bien organizada aunque arrugada, y la lámina media bien definida (Fig. A1). A las 6 horas las paredes celulares presentaron un aspecto semejante al del tiempo anterior (Fig. A2). A las 12 horas de remojo la pared celular perdió totalmente su conformación, aunque en algunas zonas se observaron paredes celulares con material fibrilar en su interior y en otras los bordes se encontraban muy poco integrados, no se observó la lámina media (Fig. A3 y B3). A las 24 horas de remojo, se pudo observar que las paredes celulares estaban mejor integradas y presentaban ondulaciones, la lámina media se observa bien definida (Fig. A4). Después de 36 horas de remojo, las paredes celulares se encontraban bien integradas, aunque con material electrodensos, tal vez por los cambios que la hidratación haya ocasionado en su conformación molecular o bien debido a la presencia de contenido almidonoso vertido por los gránulos de almidón, por tal motivo no se logró observar la lámina media (Fig. A5).

b) Esquinas y espacios intercelulares

Se observó que en los primeros tiempos de remojo (3.5 y 6 horas), las esquinas se encontraban más o menos conformadas, algunas zonas contenían material y ocasionalmente se encontraban algunos cuerpos electrodensos (Fig. B1 y B2). A las 12 horas las esquinas presentaron una conformación irregular y contenido en su interior (Fig. B3). A las 24 horas su conformación era más regular y el contenido en su interior presentaba gránulos electrodensos (Fig. B4). A las 36 horas, las esquinas ya se

encontraban conformadas por paredes celulares destruidas y sin rastros de contenido (Fig. B5).

c) Los gránulos de almidón

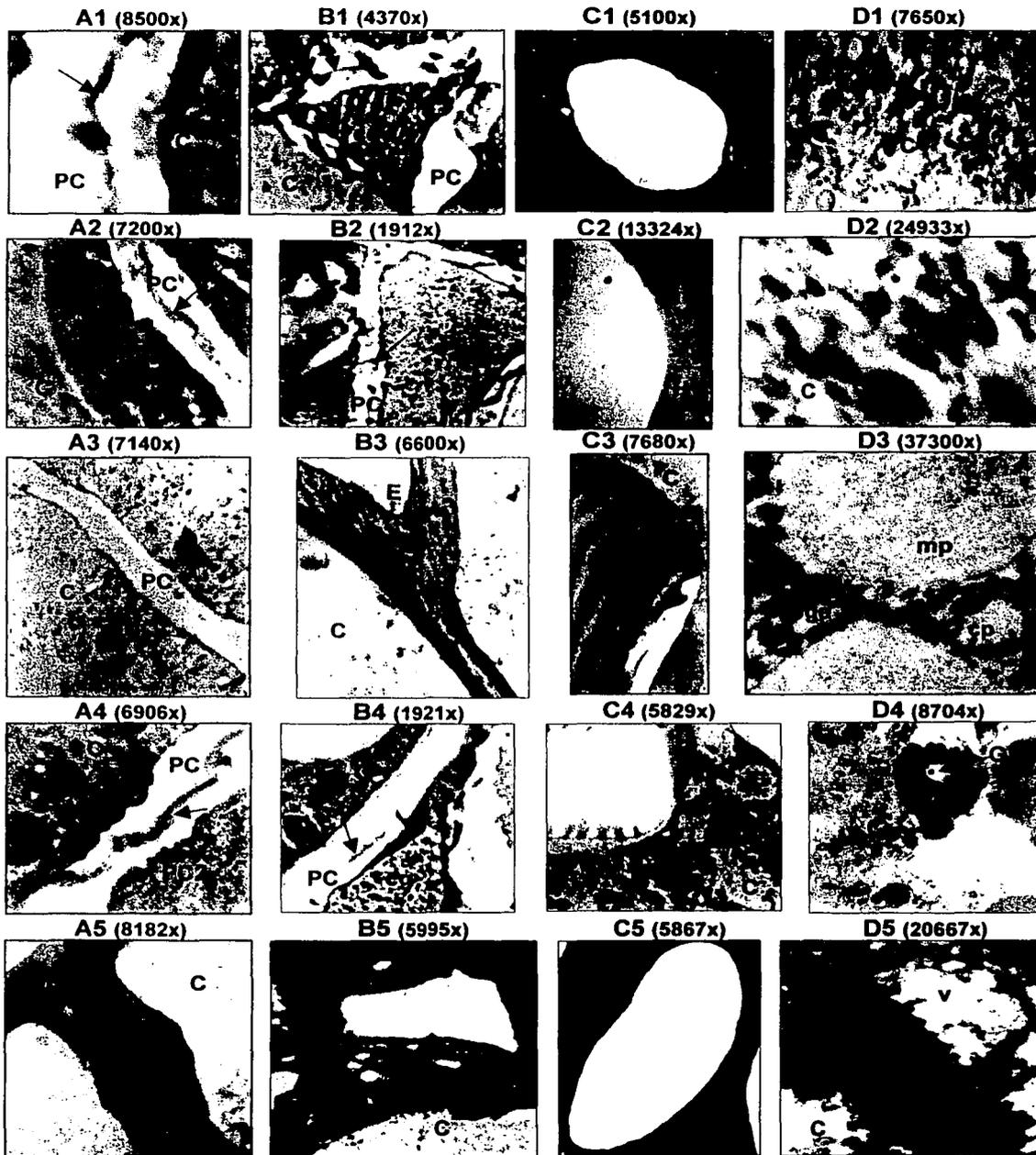
Con respecto a los cuerpos almidonosos, a las 3.5 horas de remojo se observaron espacios huecos con un halo y una sustancia electrodensa a su alrededor, probablemente ocupados por gránulos de almidón, y que debido a que el material aún no se encontraba bien hidratado (estado vítreo) no se pudieron observar en los cortes; como dato adicional, se observó que durante la obtención de los cortes ultrafinos, un polvo blanquecino se quedaban en la cuchilla de vidrio, tal vez debido a que se desprendían los gránulos por no estar bien hidratados (Fig. C1). Después de 6 horas se observaron gránulos totalmente ovalados y con un halo a su alrededor (Fig. C2). A las 12 horas se presentaban cuerpos con membranas nítidas que incluso se desprendían de los bordes formando huecos, junto a ellos se apreció una sustancia electrodensa en el citoplasma que probablemente era contenido de origen almidonoso (Fig. C3). A las 24 horas los cuerpos se observaron mejor, presentaban membranas translúcidas, que en algunas zonas formaban pliegues en los bordes, además sobre el citoplasma cercano a estos, se observó también un halo electrodense, que probablemente era parte del contenido de estos gránulos (Fig. C4). En el último tiempo de remojo (36 horas), se observaron grandes gránulos electrotransparentes, deformados y el citoplasma a su alrededor se encontraba muy electrodense. Esto se pudo haber suscitado debido a que el contenido almidonoso de los gránulos reaccionó por acción del remojo, y se virtió en las zonas próximas a ellos (Fig. C5).

d) Los cuerpos protéicos

Durante las primeras horas del remojo (3.5 horas), se observaron algunos pequeños cuerpos esféricos poco electrodensos que probablemente corresponden a los cuerpos protéicos. Ocasionalmente estaban presentes algunas cisternas con granulillos electrodensos en la cara interna de sus bordes (Fig. D1), probablemente el retículo endoplásmico rugoso (RER). A las 6 horas de remojo, se observaron mejor organizados los cuerpos protéicos que contenían material más electrodense (Fig. D2); esto coincide con las pruebas histoquímicas de Azul Negro de Naftol para proteínas observadas en cotiledones de garbanzo remojados en AD mediante MO (Garduño, comunicación

personal);. Después de 12 horas de remojo, los cuerpos protéicos presentaron una estructura similar al tiempo anterior (Fig. D3). A las 24 horas de remojo, se observaron ya los cuerpos protéicos bien formados y muy electrodensos, adicionalmente presentaban una zona interna electrotransparente que ocasionalmente presentaba un gránulo electrodenso alojado en su interior, probablemente formando al globoide que es una de las subestructuras típicas de los cuerpos protéicos (Fig. D4). En el último tiempo de remojo (36 horas) se observó que las vesículas electrotransparentes carecían del globoide electrodense y eran de mayor tamaño, e incluso se observó más de una vesícula en un solo cuerpo protéico, en este tiempo de remojo probablemente se lleve a cabo la autólisis del material de estos organelos, cuyo significado biológico sea el inicio del aprovechamiento de los recursos protéicos, por el embrión (Fig. D5).

LAMINA 1. Micrografías del cotiledón del garbanzo *Cicer arietinum*; remojo con agua destilada (testigo).



Figuras: A- Pared celular, (PC). B-Esquina (E). C- Hueco de/o gránulo de almidón. D- Citoplasma (C) y Cuerpos Protéicos (cp)., pared celular, secundaria (PC2); lámina media (flecha); gránulos electrodensos (ge); Halo (H);, cisternas de RER (cabeza de flecha); globoide (G); matriz protéica (mp); Vesícula electrotransparente (V). 1 (3.5h); 2 (6h); 3 (12h); 4 (24h) y 5 (36h)

AGUA ALOTROPIZADA (Lámina 2)

a) La pared celular y la lámina media

A las 3.5 horas de remojo, las paredes celulares se encontraban destruidas por el proceso de inclusión y corte, en algunas zonas las paredes celulares se observaron muy electrodensas, esto probablemente debido a que las macromoléculas que conforman las fibras de celulosa, se encontraban muy duras en este tiempo de remojo debido al estado vítreo de la semilla, la lámina media estaba poco organizada, además de que la electrodensidad de las paredes no permitió su adecuada observación (Fig. A6). En el siguiente tiempo de remojo (6 horas), ya se pudieron observar paredes celulares bien organizadas aunque con ondulaciones, la lámina media se encontraba muy bien organizada (Fig. A7). Al observar los cambios en las 12 horas de remojo, las paredes celulares estaban rotas, ocasionalmente se observó la lámina media (Fig. A8). En el tiempo correspondiente a 24 horas de remojo, las paredes celulares están mejor integradas y con zonas engrosadas, ocasionalmente las paredes están muy electrodensas. La lámina media está bien definida (Fig. A9). En el último tiempo de remojo (36 horas), la pared celular está bien integrada aunque muy electrodensa, por este motivo la lámina media no se pudo observar. Las zonas electrodensas en las paredes celulares tal vez sean ocasionadas por los cambios en la conformación de las moléculas de las paredes celulares o bien debido a la salida del contenido almidonoso de los gránulos de almidón (Fig. A10).

b) Esquinas y espacios intercelulares.

Al inicio del remojo (3.5 horas), se observaron pocas esquinas por lo difícil de la obtención de los cortes en este tiempo, y se encontraban con o sin contenido (Fig. B6). A las 6 horas las paredes celulares cercanas a las esquinas que conforman los espacios intercelulares estaban bien organizadas. Los espacios presentaban contenido en su interior (Fig. B7). A las 12 horas los espacios que se originaron por la separación de la lámina media presentaban contenido y ocasionalmente no lo presentaban (Fig. B8). En el remojo de 24 horas, las esquinas presentaban contenido granular y las paredes celulares contiguas eran gruesas y electrodensas (Fig. B9). Finalmente a las 36 horas de remojo las esquinas no poseen contenido y las paredes celulares próximas, eran más gruesas y electrodensas respecto a los tiempos de remojo anteriores (Fig. B10).

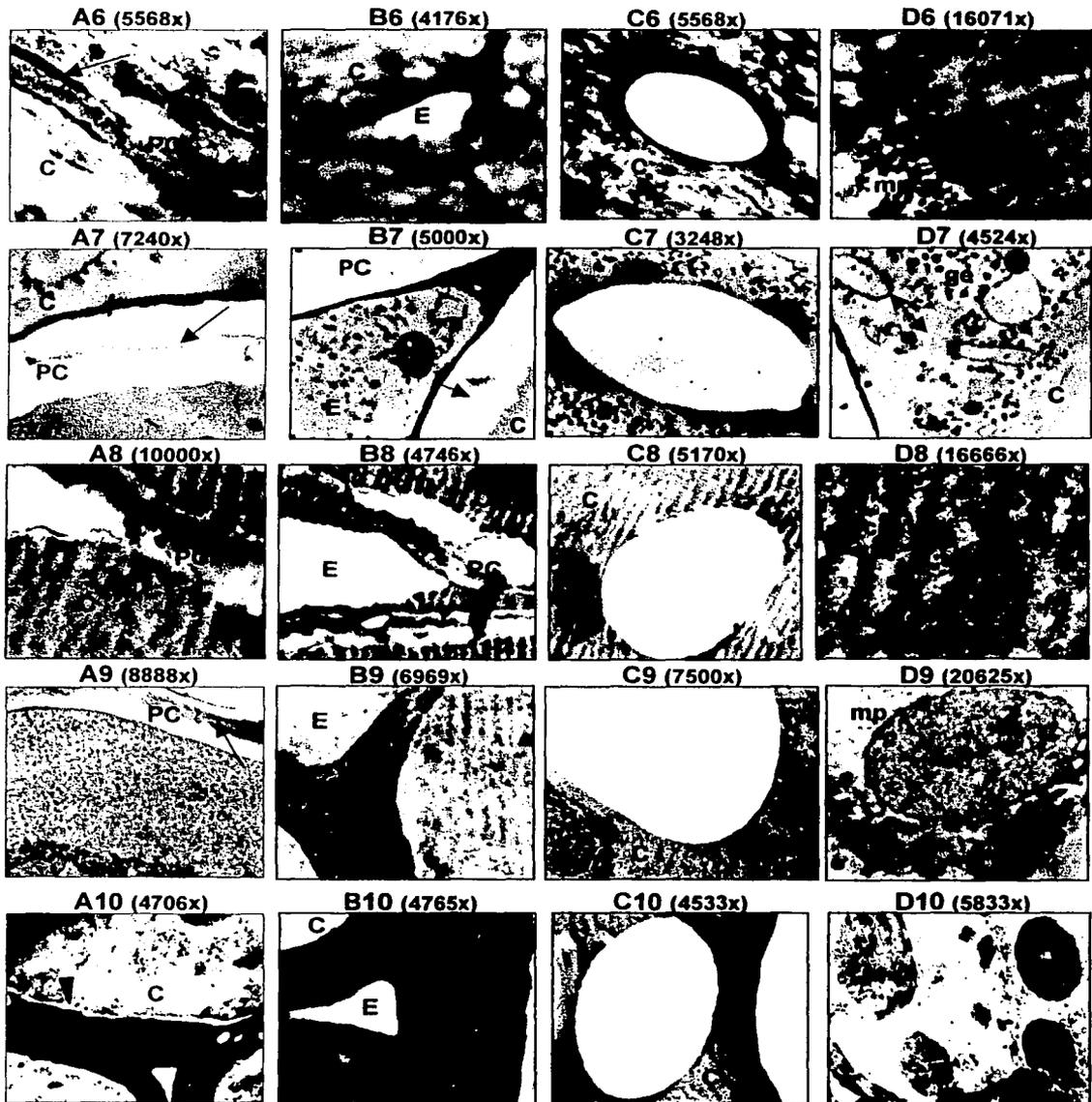
c) Los gránulos de almidón

A las 3.5 horas de remojo debido al estado vítreo de la semilla, se dificultó la observación de los gránulos de almidón, se observaron grandes cuerpos ovalados electrotransparentes que además presentaban a su alrededor un halo electrodenso (Fig. C6). A las 6 horas los gránulos de almidón se pudieron observar mejor, aunque no presentaban halo solo sustancia electrodenso en su interior y a su alrededor (Fig. C7). A las 12 horas el material fue difícil de cortar, tal vez debido a que estaba más reblandecido, se observaron huecos con algo de sustancia electrodenso a su alrededor (Fig. C8). A las 24 horas se encontraron gránulos electrotransparentes sin presentar halo, solo poca sustancia electrodenso a su alrededor (Fig. C9). A las 36 horas los gránulos de almidón eran de forma irregular ya que había algunos muy alargados, de igual manera se observó sustancia electrodenso en el citoplasma (Fig. C10).

d) Los cuerpos protéicos

A las 3.5 horas los cuerpos protéicos no estaban definidos, se observaron gránulos electrodensos de la matriz protéica del citoplasma (Fig. D6), esto tal vez se debió principalmente por el estado vítreo de la semilla. A las 6 horas los cuerpos protéicos aún no se encontraban bien definidos, aunque hay huellas de su reorganización, ya que en el citoplasma se observan algunos cuerpos esféricos con interior poco electrodenso (más claro), y junto de ellos se hallaban cisternas de RER, con gránulos más pequeños y más electrodensos. Las observaciones en este tiempo son muy similares a lo hallado en el remojo después de 12 horas con agua destilada (Fig. D7). A las 12 horas por la dificultad en la obtención de los cortes, los cuerpos protéicos no se pudieron observar ya que no se distinguen en la misma matriz citoplásmica, esto es un indicio de que el AA tiene un efecto reblandecedor en la semilla (Fig. D8). Hasta las 24 horas es que los cuerpos protéicos se observan mejor integrados con contenido electrodenso, aunque sin subestructuras en su interior. Los cuerpos protéicos se encuentran perfectamente delimitados y algunos presentan partículas más electrodensas en su interior (Fig. D9). A las 36 horas los cuerpos protéicos estaban bien conformados y electrodensos, y aunque no se observó el globoide, se presentaron zonas de autólisis por algunas vesículas electrotransparentes en el interior de los cuerpos protéicos (Fig. D10).

LAMINA 2. Micrografías del cotiledón de garbanzo *Cicer arietinum*; remojo con agua alotripizada



A.- Pared celular (PC) B.-Esquina (E) C.- Hueco de/o gránulo de almidón D.- Cuerpos Protéicos (cp). PC2, pared celular secundaria; C, citoplasma; flecha, lámina media. ge, gránulos electrodensos; se, sustancia electrodensa; H, halo electrodensa; mp, matriz protéica; C, citoplasma; cabeza de flecha, cisternas de RER. 6 (3.5h); 7 (6h); 8 (12h); 9 (24h) y 10 (36h)

SOLUCION SALINA (Lámina 3)

a) La pared celular y la lámina media

A las 3.5 horas de remojo las paredes se encontraban bien integradas, gruesas, y muy electrodensas tal vez debido a los cambios en la conformación de polisacáridos en la pared al entrar en contacto con las sales inorgánicas de la solución, o bien debido al contenido vertido por los gránulos de almidón en las paredes celulares y en el citoplasma, por este motivo no se pudo observar la lámina media (Fig. A11). A las 6 horas las paredes ya no estaban tan electrodensas, aunque presentaban ondulaciones y separación de la membrana plasmática; la lámina media no estaba bien definida (Fig. A12). A las 12 horas las paredes celulares presentaron una serie de canales electrodensos posiblemente ocasionado por el material vertido por los cuerpos almidonosos; había separaciones bien definidas de la lámina media creando grandes espacios intercelulares (Fig. A13). A las 24 horas las paredes eran gruesas y electrodensas, en algunas zonas la pared celular presentaba grandes ondulaciones hacia el citoplasma y había paredes celulares separadas de la membrana plasmática; las paredes celulares se encontraban muy deterioradas debido tal vez al reblandecimiento por la acción de las sales en el material glucoprotéico de la pared celular (Fig. A14). A las 36 horas las paredes celulares eran gruesas y deformadas, con material electrodenso en algunas zonas; había también destrucción masiva de paredes y en varias zonas se presentan grandes ondulaciones hacia la membrana celular, la lámina media se encontraba deformada, y solo se observaron sus rastros en algunas zonas (Fig. A15).

b) Esquinas y espacios intercelulares

A las 3.5 horas los espacios intercelulares poseen poco contenido aunque presentan algunos cuerpos electrodensos en su interior. A las 6 y 12 horas los aspectos son muy parecidos, ya que en ambos tiempos se presentan espacios intercelulares con poco contenido, más bien son espacios de aire originados por la destrucción de células (Figs. B12 y B13). A las 24 y 36 horas ya no fue posible la observación de espacios intercelulares.

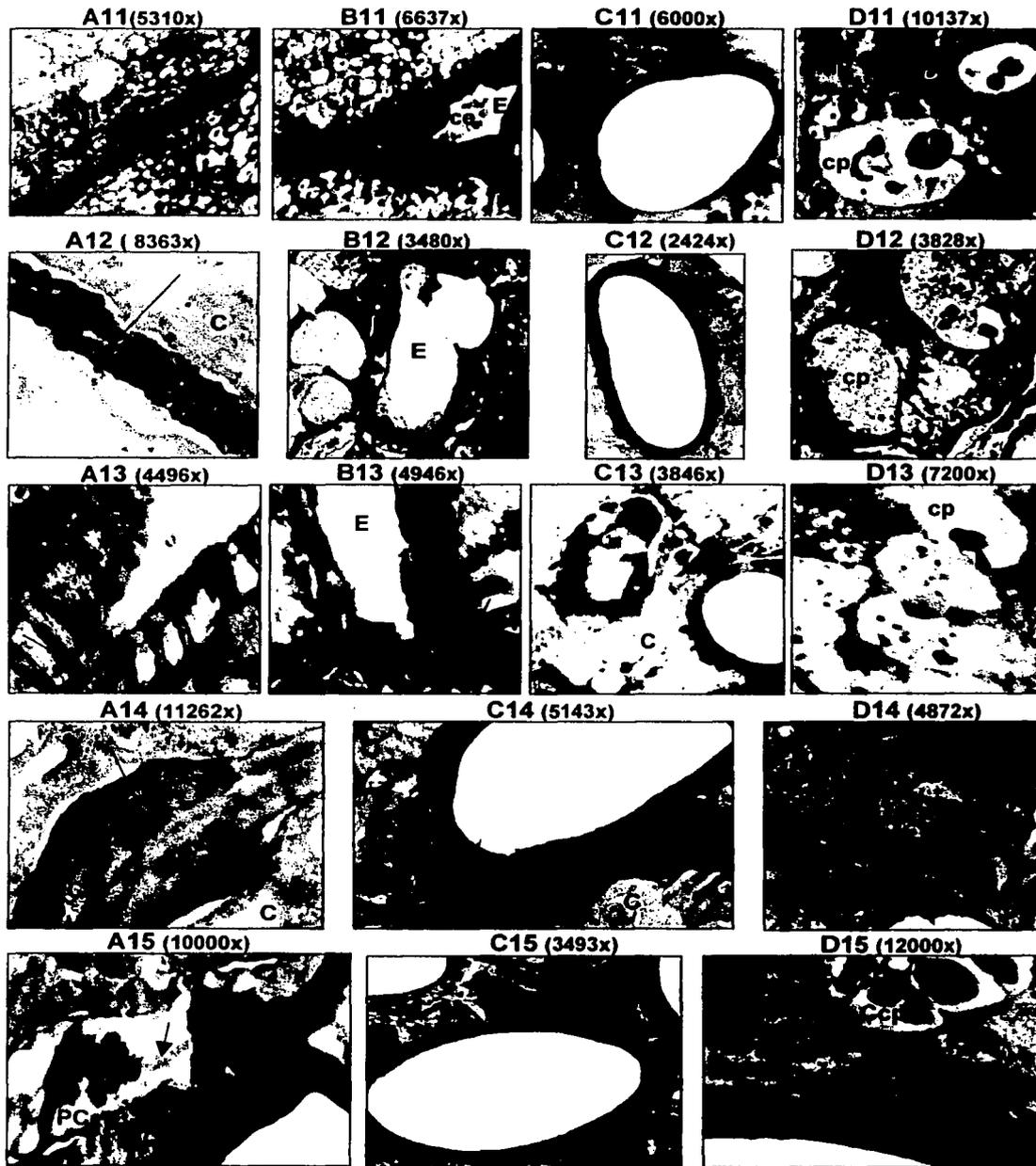
c) Los gránulos de almidón

En todos los tiempos de remojo se observaron gránulos amorfos rodeados por un halo y ocasionalmente con material electrodenso en su interior; además siempre se encontraban muy cercanos a la pared celular, adicionalmente se observó material electrodenso en la matriz citoplásmica próxima a los gránulos almidonosos. Los cambios observados en la forma de los gránulos de almidón desde las 3.5 horas ocurren de igual manera en otras estructuras celulares cotiledonarias como lo son la pared celular y los cuerpos protéicos (Figs C11 a C15).

d) Los cuerpos protéicos

Al igual que los gránulos de almidón, los cuerpos protéicos ya presentaban grandes cambios desde los primeros tiempos de remojo, se observaron gránulos electrodensos en su interior y algunas vesículas electrotransparentes de autólisis; esto sugiere que la acción de la SS sobre los cuerpos protéicos y en general la matriz citoplásmica presenta destrucción que se observó también desde las 3.5 horas de remojo; en este y en los tiempos avanzados del tratamiento, la coalecencia de los cuerpos protéicos es muy similar (Figs D11- D15). A las 24 y 36 horas a pesar de que la coalecencia de los cuerpos protéicos es muy parecida con los tiempos anteriores, se observó que la matriz proteica presentaba multivesículas con cuerpos electrodensos en su interior; además se observaron cuerpos con contenido espiralado parecido a los cuerpos mieloides en el citoplasma (no mostrado aquí).

LAMINA 3. Micrografías del cotiledón de garbanzo *Cicer arietinum*; remojo con solución salina



A.- Pared celular (PC). B.-Esquina (E). C.- Hueco de/o gránulo de almidón. D.- Cuerpos Protéicos (cp). C, citoplasma; flecha, lámina media. se sustancia electrodensa; H, halo electrodensoso; C, citoplasma; cabeza de flecha, multivesículas; Ccp, coalescencia de cuerpos protéicos. 11 (3.5h); 12 (6h); 13 (12h); 14 (24h) y 15 (36h)

VI. DISCUSION.

La textura de las semillas de las leguminosas se atribuye principalmente a los cambios microestructurales de éstas. La textura de la semilla del garbanzo bajo tratamiento para reblandecerla al igual que en otras leguminosas, es una consecuencia directa del arreglo de los componentes estructurales determinados por la composición química de la semilla, ocasionado por los diferentes procesos de preparación, entre estos el remojo y la cocción, siendo además una característica importante para su consumo (Stanley y Aguilera, 1985; Esquivel et al., 1992, 2001 y 2002; González et al., 1997; Clemente et al. 1998; Berrios et al., 1999; Brito et al. 2000; Klamczynska et al. 2001).

Los resultados del efecto que el AD, el AA y la SS sobre la ultraestructura de los cotiledones de las semillas de garbanzo fresco en el presente trabajo, se encuentran resumidos en la tabla 4 (Anexo 9). Las observaciones obtenidas, demuestran que en el remojo se presentan cambios que contribuyen con el reblandecimiento previo a la cocción de las semillas, y que estos fueron ocasionados por la acción del remojo de las soluciones usadas, en distintos tiempos y a temperatura ambiente.

Existen pocos trabajos que detallan la ultraestructura de las semillas de leguminosas (Pernollet, 1978; Varriano-Marston y Michael, 1981; Hara-Nishimura et al., 1999; Hsieh et al., 1999), debido tal vez a los obstáculos a los que se deben enfrentar para la obtención de los cortes ultrafinos; además, las propiedades naturales de estas semillas tales como el contenido inicial de agua y los mecanismos de protección presentes durante la dormancia como lo es el estado vítreo, son factores importantes que hay que tomar en cuenta en un análisis adecuado por el MET.

En el presente estudio, la obtención de los cortes de las muestras de cotiledones frescos de garbanzo remojados con AD y AA fue difícil sobre todo en los primeros tiempos de remojo (3.5 y 6 horas); aquí la lámina media era mucho más estable que las paredes celulares, por lo que la fuerza aplicada por el ultramicrotomo para cortar el tejido, fue mayor. En otro trabajo se midió la fuerza necesaria para cortar semillas de la leguminosa comúnmente nombrada "judía" (*Vigna unguiculata*), dicha fuerza disminuyó en proporción

al tiempo de remojo; los autores manifestaron que esto depende del contenido inicial de humedad de la semilla y el grosor de la testa, además mencionaron que hubo una reducción de la fuerza aplicada que puede estar relacionada a la rápida absorción del agua por la semilla (ésta alcanzó un equilibrio a partir de las 12 horas de remojo), así mismo observaron que el rango de absorción del agua por parte de los componentes de la semilla remojada es muy lento y hubieron muy pocos cambios en la textura al alcanzar el punto de saturación (Sefa-Dedeh et al.1978). Este equilibrio, coincide con estudios previos acerca de la imbibición de semillas de frijol (Esquivel et al., 1992, 2001, 2002; González et al., 1997; Lemus et al., 2001) y semillas de garbanzo remojadas en AD (Clemente et al., 1998; Klamczynska et al. 2000; Garduño, datos no publicados), en donde la hidratación de dichas semillas alcanza un punto de equilibrio (curva de hidratación), después de las 12 horas (Anexo 10). Paralelamente las observaciones de la ultraestructura de las semillas de garbanzo en el presente trabajo, corroboraron el comportamiento de imbibición durante el remojo en AD antes descrito, en donde además la pérdida paulatina del estado vítreo de las células cotiledonarias del garbanzo ocasionado por el reblandecimiento, facilitó la obtención de los cortes y la observación de la ultraestructura en general (Herman et al. 1981; Chrispeels y Herman, 2000). Los cambios en la ultraestructura cotiledonaria provocados por su reblandecimiento indicaban que conforme transcurrió el tiempo de remojo, la interacción de las moléculas de agua con los componentes estructurales del cotiledón, permitió que se llevara a cabo la actividad de ciertas enzimas (Bernal, 1994).

En un análisis previo de la microestructura de semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*), remojadas en AD y analizada a nivel de MO, se reportó que tanto en semillas secas como en semillas hidratadas, las paredes tienden a romperse cuando se les aplica una presión, provocando con esto que el contenido celular se vierta al medio (Kon, 1979); sin embargo, al confrontar estos resultados con las observaciones de la ultraestructura del garbanzo difieren, ya que a este nivel no se presentó tal situación y sólo se detectaron regularmente cambios en la forma de las paredes, en algunas zonas éstas estaban plegadas aunque bien conformadas; ocasionalmente se exhibieron separaciones de la membrana plasmática, pero al parecer esto no se debió a la ruptura de las paredes, sino más bien a que las células cotiledonarias aún no se hidrataban por lo que éstas mantuvieron el estado vítreo natural de las semillas. Se puede considerar que estas diferencias sean por el proceso de preparación de las muestras o mejor aún a las técnicas

de fijación, deshidratación, inclusión y de corte, ya que en otras investigaciones realizado para el análisis de cotiledones de frijol y de garbanzo remojados en AD por MO, mediante una técnica similar a la usada en este trabajo, no reportaron la presencia de paredes celulares rotas (Esquivel et al., 1992, 2001, 2002; Tovar, 1997; Garduño, sin publicar).

De igual manera, Varriano-Marston y Michael (1981), realizaron un estudio por el cual detallaron los cambios microestructurales y ultraestructurales en semillas frescas y almacenadas de *P. vulgaris* remojadas en $^3\text{H}_2\text{O}$ (agua pesada o radioactiva 0.66 $\mu\text{Ci/ml}$). En los cambios ultraestructurales, estos autores pudieron identificar claramente a la pared celular y algunas zonas del plasmalema; la hidratación del mismo modo provocó cambios en los cuerpos protéicos (hinchamiento) y fueron claramente visibles, además observaron que los cuerpos protéicos estaban rodeados por numerosos microcuerpos con una membrana sencilla y con inclusiones densas en su interior. Con respecto a los microcuerpos que estos autores detallan, es muy probable que formen parte de vesículas membranosas derivadas del Retículo Endoplásmico Rugoso (Herman et al. 1981; Chorasipeels y Herman, 2000;). Estas observaciones, concuerdan en parte con las realizadas en este trabajo, ya que efectivamente al irse incrementando la hidratación de los cotiledones del garbanzo en los tratamientos con AD y AA, se facilitó la observación de los cuerpos protéicos, los cuales aumentaban de tamaño y eran más electrodensos al transcurrir el remojo. En las semillas remojadas con AD, la ultraestructura de los cuerpos protéicos se pudo apreciar mejor a las 24 horas, ya que incluso se logró observar ocasionalmente una subestructura semejante al globoide, descrito en los cuerpos protéicos de los tejidos de reserva de otras plantas. De acuerdo a Pernollet (1978), no se ha reportado la existencia de inclusiones como lo son el globoide y el cristaloides; en los cuerpos protéicos de los cotiledones de la mayoría de las leguminosas, este autor sugiere que el ácido fítico y la mayoría de los cationes de estas semillas, se encuentran unidos a la matriz protéica homogénea de los cuerpos protéicos. Obviamente los resultados obtenidos en el presente estudio, no corroboran lo manifestado por este autor respecto a la ausencia del globoide en las leguminosas, ya que además de haberse observado esta subunidad dentro de una zona electrotransparente del cuerpo protéico, en otras áreas se observaron también vesículas autolíticas electrotransparentes bien zonificadas, lo que sugiere que la acción hidrolítica se inicia en algún lugar determinado del cuerpo protéico. Nuestros resultados concuerdan con los trabajos de Hsieh et al. (1999), apoyados en los estudios de Lott y Buttrose (1977), quienes corroboraron la presencia de una gran

inclusión electrodensa, dentro de una zona irregular electrotransparente de la matriz de los cuerpos protéicos de algunas leguminosas, a la cual reconocieron como el globoide, en contraste con el estudio arriba citado de Pernollet. En este rubro, sería de interés confirmar estos resultados por medio de análisis citoquímicos adicionales.

En el análisis de los cotiledones de garbanzo tratados con AA, se reveló que en general la ultraestructura guarda un comportamiento muy semejante a la del testigo (tratamiento con AD), aunque al parecer el aumento en el efecto dieléctrico del agua provocado por la alotropía (Muñoz, et al., datos por publicar), ocasionaron cambios en un tiempo anterior respecto al AD, como bien se puede apreciar en las Figuras A3 y A7 (remojo en AD, 12 horas y AA, 6 horas respectivamente), en donde se observó un aspecto similar, lo que sugiere que la imbibición de las semillas de garbanzo en AA podría ser más rápida que en AD y de igual manera esto afectaría al proceso de cocción. Estas observaciones se corroboraron indirectamente, mediante el estudio realizado por Garduño (comunicación personal) en donde se obtuvo la curva del tiempo medio de cocción (T-50) de las semillas remojadas en AA, que a diferencia de las tratadas con AD, se cocieron en un menor tiempo (Anexo 11). Sin embargo, los hallazgos observados en el mismo estudio por medio de MO, en donde los cotiledones de garbanzo remojados en AA presentaron paredes celulares destruidas y aparentes separaciones de la lámina media, no coincidieron con las observaciones a nivel ultraestructural del presente trabajo, ya que se reveló que tales separaciones, eran más bien destrucciones de las paredes celulares; que al inicio del remojo, se debieron muy probablemente al estado vítreo y en tiempos posteriores (a partir de las 12 horas), tal vez a que el tejido ya estaba más hidratado. Adicionalmente a esto, la estabilidad del cemento lamelar se conservó tanto en AD como en AA sin sufrir efecto alguno por el remojo, ya que la lámina media se pudo observar bien estructurada y al igual que otros autores, se considera que las sustancias pécticas se solubilizan por acción de otros tratamientos como lo son el térmico durante el proceso de cocción, o el químico durante el remojo con soluciones salinas (Stanley y Aguilera, 1985; Esquivel et al., 1992, 2001 y 2002; Clemente et al. 1998; Berrios et al., 1999; Brito et al. 2000; Klamczynska et al., 2001).

En general y al igual que en otros trabajos sobre las reacciones de transferencia del agua en las semillas de garbanzo, las diferencias observadas entre las células cotiledonarias secas e hidratadas en AD así como en AA en el presente estudio, se lograron apreciar

claramente y fue un indicio de que la penetración del agua en la semilla se hizo de manera uniforme desde las epidermis hacia el centro del cotiledón (Sayar et al., 2000). En los resultados observados de las células cotiledonarias del garbanzo remojadas en AA en este trabajo, sugieren que este método puede ser usado como otra alternativa efectiva para reblandecer a las semillas antes de cocerlas.

Paralelamente a la interacción del agua con las enzimas de las células cotiledonarias durante el remojo, el contenido de minerales en las semillas de las leguminosas, también ha sido considerado como un factor importante que afecta a la textura (Crean y Haisman, 1963; Chang, 1977; Ganesh et al., 1978; Kon, 1979; Varriano-Marston y De Omana, 1979; Varriano-Marston y Michael, 1981; Berríos et al., 1999). Como ya se detalló con anterioridad, las semillas de garbanzo principalmente contienen P, K, Ca, Mg y en menor proporción Zn, Cu, Fe y Mn, (Jambunathan y Singh, 1981); y a pesar de que la testa presenta un alto contenido de Ca, Hung et al. (1993), han sugerido que ésta no es una barrera relevante que afecte la absorción del agua en las semillas de garbanzo.

Debido a que los cambios en la estructura de las semillas de las leguminosas parecen ser provocados por la interacción de las moléculas de las soluciones de remojo, con las biomoléculas y los minerales que integran a las paredes celulares y otros organelos, en el presente trabajo también se analizaron los cambios en la ultraestructura de los cotiledones de garbanzo por efecto de la solución salina (SS) de Rockland y Metzler (1967) modificada por González et al., (1997), quienes recomiendan esta solución para disminuir de manera significativa el tiempo de cocción de las semillas de algunas leguminosas; y cuya acción parece estar muy relacionada con la intervención de los minerales contenidos en la semillas.

Tal y como se mencionó en los antecedentes, la SS es una mezcla de sales utilizada para obtener semillas cocidas en un menor tiempo ("quick cooking beans"). La mayoría de los resultados reportados a la fecha se han obtenido en frijoles de lima (*P. lunatus*), aunque existen también resultados del remojo de *P. vulgaris* que es una semilla importante en la dieta de los mexicanos y otros países latinoamericanos. A pesar de esto, los cambios estructurales ocasionados por la SS no han sido claramente identificados, aunque se han realizado algunos trabajos donde se analizaron los cambios que esta solución ocasionó en la microestructura de algunas leguminosas, por medio de MO y MEB (Rockland y

Jones 1974; Hahn et al., 1977; Rockland et al., 1977). En estos trabajos, los autores encontraron que la estructura y apariencia de las semillas tratadas con SS, no mostraron grandes diferencias al compararse con semillas remojadas en AD; en ambos tratamientos los cambios estructurales encontrados a nivel de MEB, fueron la presencia de paredes celulares regularmente rotas y gránulos de almidón esféricos empaquetados en una estructura en forma de panal, además observaron que los espacios entre los gránulos eran ocupados presumiblemente por una matriz proteica de partículas irregulares, aunque en los resultados obtenidos por medio de MO, dicha matriz parecía un poco más granular en la muestra remojada en SS y no lograron distinguir los límites entre las paredes de las células adyacentes, pues parecían estar continuas con la lámina media, excepto entre las esquinas formadas por tres o más células. Estos resultados no concuerdan del todo con los obtenidos en el presente trabajo, ya que a nivel ultraestructural se observó que el aspecto entre las células de los cotiledones de garbanzo remojado con AD y SS son muy diferentes; de igual manera se observó que en algunas zonas las paredes se encontraban muy deformadas e incluso rotas, aunque lo más significativo fue el hecho de que ocasionalmente la lámina media de algunas paredes si se separó, tal vez a que la SS afectó probablemente a las sustancias pécticas. En otra investigación sobre el remojo de semillas de garbanzo en soluciones salinas carbonatadas, Clemente et al. (1998), sugirieron que esto se pudo deber principalmente, a la posible interacción de los iones carbonato de esas soluciones con los biopolímeros de las células cotiledonarias, lo que provocó el aumento en la solubilización de la pectina de la lámina media.

Varriano-Marston y De Omana (1979), propusieron algunos mecanismos por los que se pudieron presentar los cambios microestructurales en frijol negro (*P. vulgaris*), en semillas que remojaron por separado con cada sustancia que compone a la solución formulada por Rockland y Metzler, y que es lo que puede ocurrir en las semillas de garbanzo estudiadas. Estos autores expresaron que la absorción de agua por las semillas, estaba determinada por el pH (alcalino) inicial de las soluciones y que este disminuye durante el remojo a causa de la ionización de los componentes celulares. Por otra parte, también explicaron que los cationes divalentes como el Mg, juegan un papel importante en la estructura de las sustancias pécticas, y que el flujo de iones se ve alterado debido a que las semillas pueden ganar o perder minerales; propusieron además, que los iones son redistribuidos entre la estructura celular. Igualmente, sugirieron que el Na participaba activamente en el intercambio de iones con el K y el Mg, uniéndose finalmente al cemento celular y a los

cuerpos protéicos. Manifestaron también que la pérdida de Mg por parte de las sustancias pécticas, podría estar implicada cuando los cuerpos protéicos mostraban un incremento en la unión de este ión tal vez ocasionado por la quelación de la fitina durante el remojo con $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$; de igual manera el nivel de P en el cemento intercelular y los cuerpos protéicos, aumentó con las soluciones de sales en general. Propusieron que esto pudo ser además un factor importante en el subsecuente reblandecimiento logrado durante la cocción, ya que el intercambio iónico provocó la fácil solubilización de las sustancias pécticas y debido a los puentes de hidrógeno resultantes, fueron fácilmente separados por la acción del calor. Sin embargo, y por el contrario, ellos observaron que en las semillas remojadas con agua corriente y agua desionizada, las células perdieron cantidades significativas de Na y de sustancias pécticas que se relacionan directamente con la pérdida de Mg y K. Finalmente estos autores apoyaron el hecho de que en las semillas remojadas en SS, se llevó a cabo una mayor pérdida de iones que incluso durante el proceso de cocción. En el presente trabajo es muy probable que la solubilización de las sustancias cementantes de la lámina media por el efecto del intercambio iónico, haya provocado la separación de la lámina media de las células cotiledonarias del garbanzo durante el remojo en SS, sin embargo sería de utilidad la realización de pruebas citoquímicas adicionales que corroboren la acción de los iones sobre los cambios en la ultraestructura de la lámina media.

Un acontecimiento relevante observado en el presente trabajo, fue que a diferencia de los otros tratamientos con AD y AA, la obtención de los cortes ultrafinos en las muestras de cotiledón tratadas con SS no presentó dificultad alguna y los cambios de la ultraestructura fueron evidentes desde las 3.5 horas de remojo; al parecer esto fue debido posiblemente a que el estado vítreo de las semillas de garbanzo se perdió a los pocos minutos de remojo con esta solución en particular y cuyos componentes interactuaron con las estructuras cotiledonarias.

Un factor que limita la calidad de los valores nutritivos de los cereales y las leguminosas que ha sido considerado por varios autores, es la interacción que presenta el ácido fítico con las proteínas, las vitaminas y algunos minerales. Los fitatos interfieren con el metabolismo de los minerales, creando una fuente de inositol y fosfato inorgánico al hidrolizarse, aunque por otro lado se ha demostrado que la presencia de iones libres de fitatos, no pueden prevenir el deterioro en la textura ocasionado por los iones Ca y Mg, ya

que estos también intervienen con otros componentes celulares como lo son las proteínas, el ácido urónico contenido en la pared celular y las pectinas poco esterificadas de la lámina media de las semillas. Por tal motivo, un alto nivel de fitato en las semillas solamente aminora los efectos de las aguas duras (compuestas por Ca y Mg), sin tener una gran influencia sobre la textura de la semilla (Crean et al., 1963; Chang, 1977); en el caso de las semillas almacenadas en condiciones adversas, los fitatos sí repercuten de manera negativa en la textura de las semillas provocando su endurecimiento (Michael y Varriano-Marston, 1981; Hussain et al., 1989; Hentges et al., 1991; Liu et al., 1992). Las observaciones en el presente trabajo sugieren que es muy probable que el efecto de estas sustancias, hayan ocasionado en parte, la presencia de algunas zonas electrodensas en las paredes celulares y el citoplasma de los cotiledones del garbanzo, aunque la utilización de un análisis cuantitativo más preciso corroboraría tal efecto en la ultraestructura de las semillas de garbanzo.

Con respecto a las observaciones de la ultraestructura los gránulos de almidón, al parecer en los cotiledones remojados en AD y AA, esta se modificó muy poco. Al inicio del remojo en AD (3.5 horas), los gránulos no pudieron ser observados debido al estado vítreo como se mencionó con anterioridad, ya que al realizar los cortes, los gránulos probablemente fueron extraídos en su totalidad dejando solo huecos en el citoplasma, esto coincide con lo propuesto por Stanley y Aguilera (1985), sobre la resistencia que estos componentes celulares de las leguminosas presentan al hinchamiento y a la ruptura. Conforme transcurrió el tiempo de remojo, estas estructuras se pudieron observar mejor; al parecer esto fue en parte gracias a la pérdida paulatina del estado vítreo, ya que se observaron mejor a partir de las 12 horas. La electrodensidad observada en la pared celular y el citoplasma durante los últimos tiempos de remojo en ambas soluciones (a las 36 horas), así como en la forma y tamaño de los gránulos de almidón y de los cuerpos protéicos, sugiere la interacción de algunas enzimas con las biomoléculas de estas estructuras.

Paralelamente a los cambios antes descritos, durante el remojo también se lleva a cabo la solubilización de azúcares. Sánchez-Mata et al. (1999), determinaron el contenido total de azúcares en semillas de garbanzo remojadas en agua, encontrando que solo los azúcares más solubles como lo son los monosacáridos y disacáridos tales como la fructuosa y la sacarosa respectivamente fueron los más abundantes; respecto a la glucosa, la ribosa, la galactosa y la maltosa, las encontraron en menor proporción, al igual que la estaquiosa y

la rafinosa. Tales hallazgos proponen el efecto que el agua de remojo tiene sobre el contenido de carbohidratos en las estructuras cotiledonarias, y es muy probable que en la ultraestructura de los cotiledones descrita en el presente trabajo, estas sustancias provoquen la presencia de algunas zonas electrodensas observadas como un efecto "pregelatinizante" de los gránulos de almidón.

Como se mencionó anteriormente y a pesar de que varios autores coinciden en que el proceso de gelatinización se presenta solo durante la cocción de las semillas a temperaturas elevadas (a partir de los 40°C), los cambios en la forma y tamaño de los gránulos de almidón, han sido también considerados como características de dicho proceso (Silva et al., 1981; Stanley y Aguilera, 1985; Bernal, 1994; Gonzalez De La Concha, 1994; Hsieh et al., 1999; Klamczynska et al., 2001). En el caso de las semillas de garbanzo tratadas con SS en el presente trabajo, se observó que los gránulos de almidón, a comparación de las semillas remojadas con AD y AA, presentaron cambios en su forma y tamaño, y estaban rodeados además por un halo más electrodenso desde los primeros tiempos de remojo (3.5 horas); además de esto, se presentaron grandes zonas electrodensas tanto en las paredes celulares como en el citoplasma. Estas observaciones sugieren que la interacción de las moléculas de la SS, provocaron algún efecto en la ultraestructura de los gránulos de almidón, ocasionando tal vez que su contenido se haya vertido al citoplasma y posteriormente se hubiese desplazado hacia las paredes celulares de los cotiledones. Además la electrodensidad de la ultraestructura cotiledonaria del garbanzo observada aquí, supone también la presencia de otras sustancias que podrían ser determinadas por medio de análisis citoquímicos; gracias a los resultados de las observaciones a nivel de MO realizadas por Garduño (comunicación personal) en semillas de garbanzo remojadas en SS al aplicarles las pruebas de APS (para detectar polisacáridos insolubles) y azul negro de naftol (para detectar proteínas), se puede esperar con mayor probabilidad que la SS pueda provocar la digestión parcial de las sustancias almidonosas en los gránulos de almidón, previamente a la gelatinización de estas estructuras durante el proceso de cocción (Stanley y Aguilera, 1985; Köskel et al., 1999).

Se ha comprobado que el remojo de las semillas, también afecta a la posterior gelatinización de los gránulos de almidón en el proceso de cocción. Kon (1979), observó que la temperatura de remojo disminuye el tiempo en que los gránulos de almidón de los

frijoles de california se gelatinizan durante el proceso de cocción; observó que la persistente birrefringencia de los gránulos indicaba que la gelatinización era lenta; de igual forma encontró que el almidón que no ha sido gelatinizado, es mucho menos susceptible a la digestión enzimática que el ya gelatinizado.

Es muy probable que las características de las soluciones de remojo empleadas en el trabajo aquí presentado, afecten aunque de diferente manera a la digestibilidad enzimática de las proteínas, esto es un hecho relevante ya que junto con los cambios en la ultraestructura de los gránulos de almidón de los cotiledones de garbanzo, se favorecería la posterior gelatinización de los gránulos de almidón en un tiempo y temperatura menores durante la cocción. Con base a la curva del tiempo medio de cocción (T_{50}) obtenida en semillas de garbanzo previamente remojadas en AD, AA y SS (Esquivel et al., 2002. Anexo 11), indirectamente se sugiere que los tratamientos de remojo induzcan algún efecto sobre los gránulos de almidón y las otras estructuras celulares cotiledonarias. Esta situación se mantiene de igual manera en correlación con lo expresado por Bernal (1994), sobre el hecho de que "cualquier factor que modifique cualitativa o cuantitativamente los componentes de la pared celular y/o la susceptibilidad de los gránulos de almidón a la gelatinización o la estabilidad térmica de las proteínas, afectará en forma importante el proceso de cocción". Los resultados del presente trabajo podrían ser comprobados adicionalmente, al analizar la birrefringencia mediante el microscopio de luz polarizada, de los gránulos de almidón de cotiledones previamente remojados en SS. En el caso de las semillas tratadas con AA, se observaron algunos efectos aunque no tan claros, de los cambios en la forma y tamaño de los gránulos de almidón que de igual manera, correspondería analizar con más detalle mediante otras pruebas de confirmación.

La electrodensidad de la ultraestructura observada en los últimos tiempos de remojo de AD y AA, muy probablemente se debió a que las células cotiledonarias inician una etapa de autofagocitosis provocada por un efecto adverso al remojo prolongado en las semillas de garbanzo; este evento es estructural y bioquímicamente diferente a la apoptosis de las plantas en general, y se debe muy probablemente a la acción enzimática cuyo efecto inmediato, es la degradación de las biomoléculas estructurales del cotiledón (Dove, 2001).

VII. CONCLUSIONES

1. El remojo de las semillas de garbanzo en el agua alotropizada (AA) y en la solución salina (SS) de Rockland y Metzler modificada por González et al. (1997), es un proceso que afecta a la ultraestructura de los cotiledones del garbanzo, debido a sus propiedades físicas y químicas.
2. Al igual que en el tratamiento con el testigo (AD), el remojo con AA provoca la disminución paulatina del estado vítreo, facilitando con esto, la mejor observación de la ultraestructura celular cotiledonaria.
3. El análisis de la ultraestructura de los cuerpos protéicos contenidos en los cotiledones del garbanzo remojados en AD, confirmó la presencia del globoide, que es la subestructura en la cual se deposita el ácido fítico y los cationes necesarios durante el proceso de germinación de la semilla.
4. El AA afectó más rápidamente a la ultraestructura de las semillas que el testigo, debido probablemente al mayor efecto dieléctrico de las moléculas del agua alotropizada.
5. La SS, provocó un mayor efecto reblandecedor en la textura de las semillas con respecto a los otros tratamientos usados, gracias a esto la obtención de los cortes ultrafinos se logró más fácilmente y de igual manera, el análisis de la ultraestructura desde los primeros tiempos de remojo (3.5 horas), no reveló el estado vítreo natural de la semilla.
6. El remojo en SS, afectó principalmente a la ultraestructura de los cuerpos protéicos y en algunas zonas de la pared celular hubo separación de la lámina media, esto de igual manera provocó cambios en la forma y tamaño de los gránulos de almidón, lo que sugiere un efecto previo que puede repercutir en la gelatinización del almidón durante el proceso de cocción.

VIII. LITERATURA CONSULTADA

1. Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (ASERCA). 1997. El Garbanzo Mexicano. *Claridades Agropecuarias*. No. 42. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. México. 44 P.
2. Bernal L. I. 1994. Eventos moleculares asociados al endurecimiento del frijol. Cuadernos de posgrado. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. (34): 129-141 pp.
3. Bravo L., Siddhuraju P. y Saura-Calixto F. 1999. Composition of underexploited indian pulses. comparison with common legumes. *Food Chemistry*. 64:185-192.
4. Brito de E. S., Pezoa G. N., Gallao M. I., Cortelazzo A. L., Fevereiro P. S. y Braga M. R. 2000. Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation, drying and roasting. *Journal of the science of food and agriculture*. 81: 281-288.
5. Brown, T. L., Le May, H. E. Jr y Bursten B.E. 1997. Chemistry, the central science. Editorial Prentice-Hall, Inc. 7th Edition. U.S.A. 244-45 pp.
6. Buchanan, B. B., Whilhelm G. y Jones, R. L. 2000. Biochemistri and molecular biology of plants. The american society of plant physiologist. USA. 1343 pp.
7. Cassis Nosthas, M. L. y J. Morales de León. 1995. El garbanzo (*Cicer arietinum*) en Cuadernos de Nutrición 18 (5): 11-16.
8. Chang, R. 1977. Phytate: removal from whole dry beans by enzymatic hidrolisis and diffusion. *Journal of Food Science*. 42 (4):1098-1101.
9. Chispeels M.J. y Herman E.M. 2000. Endoplasmic reticulum-derived compartments function in storage and as mediators of vacuolar remodeling via a new type of organelle, precursor protease vescicles. *Plant Physiology*. 123: 1227-1233.
10. Clemente A., J. Vioque, Sanchez-Vioque R., Pedroche J., Bautista J., Millan F. 1998. Effect of Processing on water absorption and softening kinetics in chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. *Journal of Scientific Food Agriculture*. 78: 168-174.
11. Crean, D. E .S. Y Haisman, D. R. 1963 The interaction between phytic acid and divalent cations during the cooking of dried peas. *Journal of Scientific Food Agriculture*. 14: 824-833.

12. Dang J. J., Arcot y A. Shorasestha. 2000. Folate retention in selected processed legumes. *Food Chemistry* 68: 295-298.
13. De J. Berrios, J. Swanson, B. G. Cheong W. A. 1999. Physico-Chemical Characterization Of Stored Black Beans (*Phaseolus Vulgaris* L.) *Food Research International*. 32. 669-676.
14. De Miguel G. E. 1991. El Garbanzo una alternativa para el seco. Ediciones Mundi Prensa. España. 134 pp.
15. Derek, B. J. y Black M. 1994. Seeds. Physiology of development and germination. Plenum Press 2d. Ed. U.S.A. 445. pp.
16. Desphande S. S., y Cheryan M. 1986. Microstructure and water uptake of *Phaseolus* and winged beans. *Journal of Food Science*. 51 (5): 1218-1223.
17. Dove A. W., 2001. The new way to eat beans. *Journal Of Cell Biology*, 154, (5), September 3: 903-903.
18. Esquivel C., Lopez L., Marquez J., Mateos G. y Bernal Lugo I. 1992. Chemical composition and structure of two mexican beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars in relation to cooking time. *Phyton*. 53 (2): 143-153.
19. Esquivel H. C. y Márquez G. J. 2000. Movilización de los taninos de la testa del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) durante el remojo con solución salina. XXIV Congreso Nacional de Histología, Sociedad Mexicana de Histología, A. C. 25-27 De Octubre. Programas y resúmenes. 46 pp.
20. Esquivel, H. C., F. Garduño. 2001. Cambios en la microestructura del cotiledón del cultivar "Tubutama" de *Cicer arietinum* y su relación con los tiempos de cocción; usando dos soluciones y diferentes tiempos de remojo. XV Congreso Mexicano de Botánica. 14-19 de octubre. Programas y Resúmenes. 104 pp.
21. Esquivel, H. C., F. Garduño, J. J. Serrano y Márquez G. J. 2002. El remojo usando dos soluciones en relación con los tiempos de cocción y los cambios en la ultraestructura del cotiledón del cultivar "Tubutama" de *Cicer arietinum* L. VIII Congreso Latinoamericano De Botánica; II Congreso Colombiano De Botánica. 13-18 De Octubre. Resúmenes. 97 pp.
22. Fleming S. E. 1981. A study of relationships between flatus potential and carbohydrate distribution in legume seeds. *Journal of Food Science* 43: 794-803.
23. Ganesh Kumar K., Venkataraman L. V., Jaya T. V. y Krishnamurthy K. S. 1978. Cooking characteristics of some germinated legumes: changes in phytins, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ and pectins. *Journal Of Food Science*. 43: 85-88.

24. Garduño, A. F. Cambios en la microestructura del cotiledon del cultivar "tubutama" de *Cicer arietinum* L. y su relación con los tiempos de cocción; usando dos soluciones y diferentes tiempos de remojo (tesis en proceso).
25. González A. R., Márquez J. y Esquivel H. C. 1997. Influencia de la solución salina de Rockland y Metzler modificada en la microestructura de testa y cotiledón de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) XXI Congreso Nacional de Histología. Sociedad Mexicana de Histología, A. C. 15-17 de octubre. Programas y Resúmenes. 46 pp.
26. González de la C. S. 1994. Efecto del deterioro en los niveles de biomoléculas que participan en la protección del estado seco de la semilla de *Phaseolus vulgaris*. Tesis de Maestría. Fac. De Ciencias. UNAM.
27. Gray H. B. y Haight, G. P. Jr. 1983. Principios básicos de Química. Editorial Reverté, S.A. México, D.F. 20-4.
28. Hara-Nishimura, Shimada T., Hatano k., Takehuchi Y., y Nishimura, M. 1998. Transport of storage proteins to protein storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulating vesicles. *The Plant Cell*. 10: 825-836.
29. Hahn D. M., Jones F. T. y Rockland L. B. 1977. Light and scanning electron microscope studies on dry beans. Extracellular gelatinization of lima beans starch in water and mixed salt solution. *Journal of Food Science*. 42 (5): 1204-1212.
30. Hentges D. L., Weaver W. M., y Nielsen S. S. 1991. Changes of selected physical and chemical components in the development of the hard-to-cook bean defect. *Journal of Food Science*. 56: 436-442.
31. Herman, E. M., B. Baumgartner, y Chispeels M. J. 1981. Uptake and apparent digestion of cytoplasmic organelles by protein bodies (protein storage vacuoles) in mung bean cotyledons. *European Journal of Cell Biology*, June 1, 24(2): 226-35.
32. Hosney R. C. 1994. Principles of cereal science and technology. St. Paul Mn: Aacc. 2nd. Edition. Pags.40-45.
33. Hsieh H. M., Swanson B. G. y Lumpkin T. A. 1999. Starch gelatinization and microstructure of azuki an granules prepared from whole abraded or ground beans. *Lebensm-Wiss U Technol*. 32: 469-480.
34. Hsu K. H., Kim C. J. y Wilson L. A. 1983. Factors affecting water uptake of soybean during soaking. *Cereal Chemistry*. 60 (3): 208-211.
35. Hung T. V., Liu L. H., Black R. G. y Trehwella M. A. 1993. Water absorption in cheackpea (*C. arietinum*) and field pea (*P. sativum*) cultivars using the Peleg Model. *Journal of Food Science*. 58 (4): 848-852.

36. Hussain A., Watts B. M., Bushuk W. 1989. Hard to cook phenomenon in beans: changes in protein electrophoretic patterns during storage. *Journal of Food Science*. 54: 1367-1390.
37. Jambunathan R. y Singh U. 1981 studies on desi and kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) Cultivars. 3. Mineral and trace element composition. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 29: 1097-1093.
38. Keshava K., Bhat y Suvendu Bhattacharya. 2001. Deep fat frying characteristics of chickpea flour suspensions. *International Journal of Food Science and Technology*. 36: 499-507.
39. Klamczynska B., Czuchajowska Z., Baik Byung-Kee. 2001. Composition, soakin, cookin properties and thermal characteristics of starch of chickpeas, wrinkled peas and smooth peas. *International Journal of Food Science and Technology*. 36: 563-572.
40. Kon S., 1979. Effect of soaking temperature on cooking and nutritional quality of beans. *Journal of Food Science* .Vol. 44: 1329-1340.
41. Köksel H., Sivri D., Scanlon M. G. Y Bushuk W. 1999. Comparision of phisical properties of raw and roasted chickpeas (leblebi). *Food Research International*. 31 (9): 659-665.
42. Kozlowski T. T. 1972. Seed Biology. Academic Press, N.Y. Usa.
43. Lee C, Kim C y Yang H. 1983. Microstructure and hydrodinamic properties of soybean protein bodies in solutions. *Journal of Food Science*. 48: 695-702.
44. Lehninger A. L. 1980. Bioquímica. Editorial Omega. Barcelona, España. 1117 pp.
45. Lemus, T. A., Esquivel C., González M. R., y Márquez G. J. 2001. La microestructura de células cotiledonarias de *P. vulgaris* cultivar "Perla" en relación con la absorción a diferentes tiempos de remojo en solución salina modificada. XXV Congreso Nacional de Histología. Sociedad Mexicana de Histología, A. C. 24-26 de Octubre. Programas y Resúmenes. 37 pp.
46. Liener, I. E. 1961. Toxic factors in edible legumes and their elimination. *American Journal of Clinical Nutrition*. 11: 281-298.
47. Liu K. S., Mc Watters K. H., Philipps R. D. 1992. Protein insolubilization and thermal destabilization during storage as related to hard-to-cook defect in cowpeas. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 40: 2483-2487
48. Macdonald S. G. G. y Burns D.M. 1978. Física para las ciencias de la vida y de la salud. Fondo Educativo Interamericano. México, 589 p.

49. Marconi E., Ruggeri S., Cappelloni M., Leonardi D. y Carnovale E. 2000. Physicochemical, nutritional and microstructural characteristics of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) following microwave cooking. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 48 (12): 5986-5994 Pp.
50. Mateos H. M. 1996. El cultivo del garbanzo *Cicer arietinum* L. en México. Universidad Autonoma De Chapingo.
51. Mc Kelvery, J. P. 1993. Solid state physics. Krieger Publishing Company. USA. 503 pp.
52. Michael Jackson G. y Varriano-Marston E. 1981. Hard to cook phenomenon in beans: effects of accelerated storage on water absorption and cooking time. *Journal of Food Science*. 46: 799-803.
53. Milan-Carrillo J., Reyes-Moreno C., Armienta-Rodelo E., Carabez-Trejo A. y Mora-Escobedo R. 2000. Physicochemical and nutritional characteristics of extruded flours from fresh and hardened chickpeas (*Cicer arietinum* L.) *Lebensm-Wiss U Technol*. 33: 117-123.
54. Mortimer, C. E. 1983. Química. Grupo Editorial Iberoamerica, S.A. De C.V. México, D.F. 768 pp.
55. Muñoz, A. N., Passian A., L. Martínez Pérez, E. López-Sandoval, C. Vázquez-López, J. L. Jimenez Perez y T. L. Ferrell. (por publicar). Induced changes on the dielectric function of "allotropized" water detected by absorption spectra of gold islands at the surface plasmon resonance. *Journal of Sensors and Actuators*.
56. Otto T., Baik B., Czuchajowska Z. 1997. Microstructure of seeds, flours and starches of legumes. *Cereal Chemistry*. 74 (4): 445-451
57. Pellett P. L. 1986. Global Perspectives On Hunger And Nutrition. Dry Area Agriculture, Food Science And Human Nutrition, Eds D.F. Nygaard And P.L. Pellett. Pergamon Press, New York. 1- 54
58. Pernollet J. C. 1978. Protein bodies of seeds: ultrastructure, biochemistry, biosynthesis and degradation. *Phytochemistry*. 17: 1473-1480.
59. Quast, D. G. y da Silva, S. D. 1977. Temperature dependence of hydration rate and effect of hydration on the cooking rate of dry legumes. *Journal of Food Science*. 42 (5): 1299-1303.
60. Reheman Z Y Shah W. 2001. Tanin contents and protein digestibility of black grams (*Vigna mungo*) after soaking and cooking. 2001. *Plants foods for human nutrition*. 56: 265-273.

61. Reyes-Moreno C., Carabez-Trejo A., Paredes-Lopez O., Ordorica-Falomir C. 1994. Physicochemical and structural properties of two bean varieties which differ in cooking time and the HTC characteristics. *Lebens Wiss Technol.* 23: 331-336.
62. Reyes-Moreno C., J. Okamura-Esparza, E. Armienta-Rodelo, R. M. Gomez-Garza Y J. Milan-Carrillo. 2000. Hard-to-cook phenomenon in chickpeas (*Cicer Arietinum* L.): Effect of accelerated storage on quality. *Plant Foods For Human Nutrition.* 55: 229-241.
63. Rockland, L. B. y E. A. Metzler. 1967. Quick cooking lima and other dry beans. *Food Technology.* 21 (3a): 344-48.
64. Rockland, L. B. y Jones, F. T. 1974. Scanning electron microscope studies on dry beans. Effects of cooking on the cellular structure of cotyledons in rehydrated large lima beans. *Journal of Food Science.* 39: 342-346.
65. Rockland, L. B., Jones, F. T. y Hahn D. M. 1977. Light and scanning electron microscope studies on dry beans: extracellular gelatinization of lima bean starch in water and mixed salt solution. *Journal of Food Science.* 42 (5): 1204-1212.
66. Rockland L. B. y Radke T. M. 1981. Legume protein quality. *Food Technology.* 35 (3): 79-82.
67. Sánchez-Mata M., Camara, M. y Diez-Marquez C. 1999. Effect of domestic processes and water hardness on soluble sugars content of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) *Food Chemistry.* 65: 331-338.
68. Sayar S., Turhan M., y Gunasakeran S. 2001. Analysis of chickpea soaking by simultaneous water transfer and water-starch reaction. *Journal Of Food Engineering.* 50: 91-98.
69. Sefa-Dedeh S., Stanley D. y Voisey P.. 1978. Effect of soaking time and cooking conditions on texture and microstructure of cowpeas (*Vigna unguiculata*). *Journal of Food Science.* 43: 1832-1838.
70. Silva C., Bates R. y Deng J. 1981. Influence of soaking and cooking upon the softening and quality of black beans (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Food Science.* 46: 1716-1720.
71. Singh, K. B. 1997. Chickpea (*Cicer Arietinum* L.). *Field Crops Research.* 53: 161-170.
72. Stanley D. Y J. M. Aguilera. 1985. A review of textural defects in cooked reconstituted legumes-the influence of structure and composition. *Journal Of Food Biochemistry.* 9: 277-323.

73. Tovar M. E. 1997. Determinacion de los cambios estructurales relacionados con el fenomeno de reversibilidad del endurecimiento en dos cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Tesis De Doctorado. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
74. Uma-Reddy M., Pshpamma P. 1986. Effect of storage on aminoacid and biological quality of protein in different varieties of pigeon pea, green gram and chickpea. *Nutr Rep Int.* 33: 1020-1029.
75. Varriano-Marston E. y De Omana E. 1979. Effects of sodium salt solutions on the chemical composition and morphology of black beans (*Phaseolus vulgaris*) *Journal of Food Science.* 44 (2): 531.
76. Varriano-Marston E. y Michael J. G. 1981. Hard to cook phenomenon in beans: structural changes during storage and imbibition. *Journal of Food Science.* 46: 1379-1385.
77. Vitale A y Bollini R. 1995. Legume storage proteins seed development and germination. Ed. Kigel Jaime And Galili Gad, Marcel Dekker, Inc. U.S.A.
78. <http://www.recetario.com>. Técnicas de cocción según España © 1997-2000. Carmen Ccastro Baldellou.
79. <http://www.fao.org>
80. origening.htmlindex.htmmailto:unpeg@docs.ccs.net.mx
81. <http://omega.ilce.edu.mx>.
82. [http://www.delphion.com/cgi-bin/viewpat.cmd/US05522992 ?OUT FORMAT=pdf&MODE=fstv](http://www.delphion.com/cgi-bin/viewpat.cmd/US05522992?OUT_FORMAT=pdf&MODE=fstv)



IX. ANEXOS

ANEXO 1

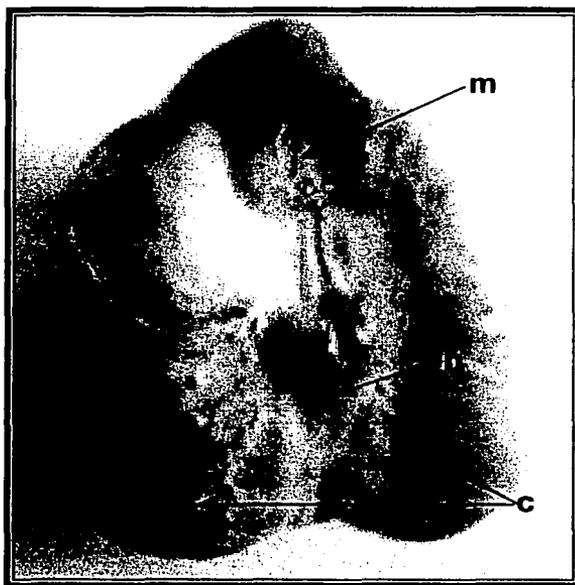


Fig. 1 Estructura de la semilla de garbanzo donde se observan: c, cotiledones; h, hilio; m, micrópilo; t, testa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO 2

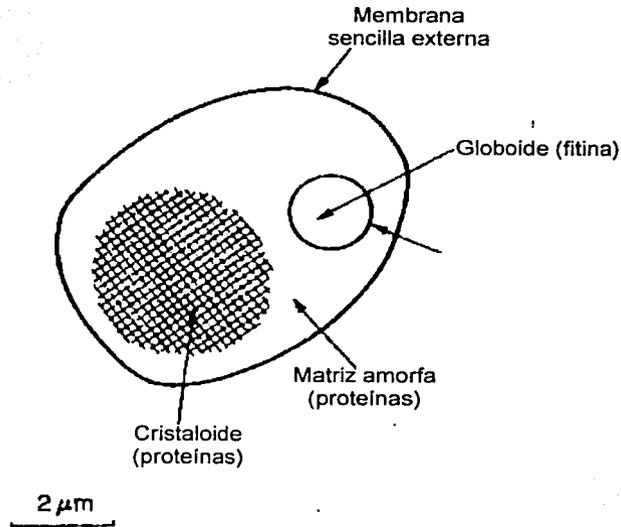


FIG. 2 Esquema de un cuerpo protéico típico, presentando ambos tipos de inclusiones. Extraído de Pernollet, 1978.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO 3

		LEGUMINOSAS						
		Garbanzo	Frijol negro	Frijol bayo	Alubia	Lenteja	Haba	Soya
VALORES NUTRITIVOS	ENERGIA (kcal)	373.0	332.0	332.0	332.0	331.0	354.0	403.0
	PROTEINAS (g)	20.4	21.8	22.7	20.3	22.7	22.6	34.1
	LIPIDOS (g)	6.2	2.5	1.8	2.8	1.6	2.2	17.7
	HIDRATOS DE CARBONO (g)	61.0	55.4	58.5	58.6	58.7	63.1	33.5
	FIBRA DIETARIA (g)	5.0	4.0	4.0	4.3	5.2	3.0	12.5
	CALCIO (mg)	105.0	183.0	200.0	132.0	74.0	49.0	226.0
	HIERRO (mg)	8.9	4.7	5.7	6.7	5.8	7.3	8.4
	TIAMINA (mg)	0.7	0.6	0.7	0.5	0.7	0.9	1.1
	RIBOFLAVINA (mg)	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.3	0.3
	NIACINA (mg)	1.5	1.8	1.7	2.0	2.0	2.3	2.2

Tabla 1. Composición aproximada de las semillas de garbanzo fresco y otras leguminosas (g/100g de peso seco). Según Hernández y Chávez, reportado por Cassi y Morales de León, 1995.

ANEXO 4

N °	P A I S	(M t)
1	India	5,320,000
2	Turquía	590,000
3	Canadá	450,000
4	Pakistán	397,000
5	Australia	256,000
6	Irán	250,000
7	México	240,000
8	Etiopía	175,734
9	Myanmar	119,269
10	Siria	89,301

Tabla 2. Producción mundial de garbanzo, en el 2002.
<http://www.FAO.org>

ANEXO 5

N °	País	(M t)
1	Australia	246,519
2	México	207,093
3	Turquía	153,953
4	Canadá	149,212
5	Iran	123,522
6	E. U. A.	29,613
7	Tanzania	8,990
8	Singapur	8,375
9	Siria	7,533
10	Rusia	6,335

Tabla 3. Exportación mundial de garbanzo, en el 2002.
<http://www.FAO.org>

ANEXO 6

RECETAS

(tomado de: <http://recetario.com>)

El Lavado:

Las semillas pueden contener polvo y cuerpos extraños que se deben eliminar antes de prepararlas, para ello se limpian por medio de un tamiz y posteriormente se enjuagan muy bien.

Remojo:

Una vez lavadas y escurridas, las semillas se pasan a un recipiente amplio, porque durante el remojo, aumentan mucho su tamaño. Se cubren con 3 veces su volumen de agua templada con una pizca de sal. Se retiran los ejemplares que floten. Es preferible no sobrepasar las 12 hr de remojo ya que, pasado este tiempo, las semillas no se suavizan más y sólo pierden sabor. Si hay que dejarlas más tiempo, a las 12 hr se les cambia el agua. En ningún caso deben tenerse en agua más de 24 hr.

Enjuagado:

Antes de cocinarlas, se escurren y se pasan bajo el agua fría para eliminar unos azúcares que sueltan durante el remojo y que hacen que resulten indigestas.

Remojo rápido:

No es el método ideal, pero resulta útil si no se ha podido hacer el remojo tradicional largo y con agua fría. Las legumbres enjuagadas se ponen en una cazuela amplia con el triple de su volumen de agua y se dejan en el fuego con la cazuela tapada. Después de que hiervan durante 3 minutos se apaga el fuego. Deben reposar durante 40-60 minutos con la cazuela tapada; a continuación se escurren y se utilizan normalmente.

Estofado:

Todos los ingredientes se ponen en crudo. Las legumbres previamente remojadas y escurridas, se colocan en una olla con pimiento rojo y verde, cebolla, ajo, tomate pelado y sin semillas, todo bien picado. Se cubren de agua y se cuecen.

Guisado:

Las legumbres, una vez remojadas y escurridas, se ponen en una olla con unas rodajas de cebolla, ajo y una cucharada de aceite de oliva. Se cubren con agua y se cuecen a fuego lento hasta que estén tiernas. En ese momento se añade un refrito hecho con cebolla, pimiento y ajo picados, tomate y lo que indique la receta, además de aceite y pimentón. Se deja que dé unos hervores, se rectifica de sal y se sirve. Si por falta de tiempo se utilizan legumbres precocidas, conviene tener en cuenta que precisan unos minutos de cocción para alcanzar el punto; por ello, una vez sacadas del frasco, se enjuagan.

Cocción:

Los garbanzos, al contrario que el resto de las legumbres, se ponen a cocer en agua tibia con un pellizco de sal y se debe añadir siempre agua caliente para que no se rompa el hervor, ya que un cambio en la temperatura del líquido de cocción podría hacer que se endurezcan aún después de la cocción.

ANEXO 7

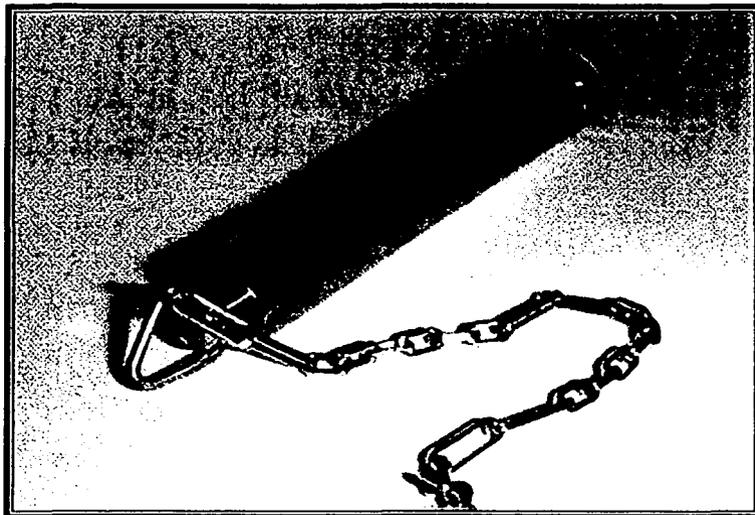


Fig. 3 Celda alotrópica personal. Fuente: Folleto del proveedor.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO 8

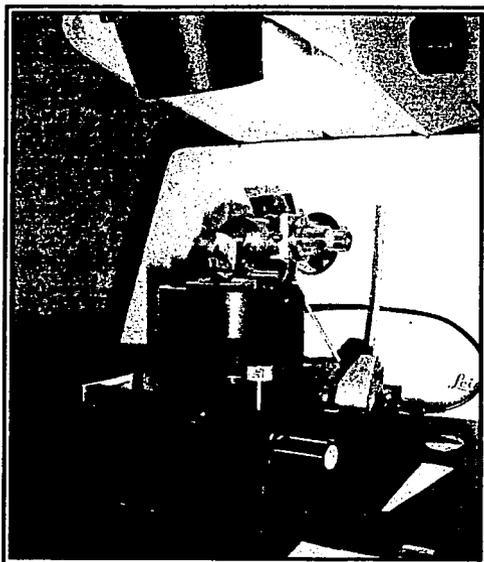


Fig. 4 Ultramicrotomo LEICA ULTRACUT R

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALI
DE LA BIBLIOTECA

ANEXO 9

TIEMPO REMOJO (horas)	PARED CELULAR (PC)		
	AD	AA	SS
3.5	PC CONSERVAN SU ORGANIZACIÓN GENERAL. PRESENTAN PLEGAMIENTOS, LÁMINA MEDIA BIEN DEFINIDA Fig A 1.	PC DESTRUIDAS, NO SE APRECIARON PC ELECTRODENSAS, LÁMINA MEDIA POCO ORGANIZADA Fig. A 6.	PC ORGANIZADAS, GRUESAS Y ELECTRODENSAS. SIN LÁMINA MEDIA Fig. A 11.
6	PC BIEN ORGANIZADAS, LÁMINA MEDIA BIEN DEFINIDA Fig. A 2.	PC BIEN DEFINIDA Y CON ONDULACIONES, LÁMINA MEDIA BIEN ORGANIZADA Y FIRMEMENTE UNIDA Fig. A 7.	PC NO ELECTRODENSAS, CON ONDULACIONES, LAMINA MEDIA POCO ORGANIZADA Y NO UNIDA Fig. A 12.
12	PERDIDA DE CONFORMACION DE PC Y DE LAMINA MEDIA Figs. A 3 y B 3.	PC NO DEFINIDAS, LAMINA MEDIA OCASIONAL Fig. A 8.	PC ACANALADAS DEFORMADAS Y ELECTRODENSAS, LAMINA MEDIA SEPARADA Fig. A 13.
24	PC MEJOR INTEGRADAS, LAMINA MEDIA BIEN DEFINIDA Fig. A 4.	PC ENGROSADAS Y MEJOR INTEGRADAS, LAMINA MEDIA BIEN DEFINIDA Fig. 9.	PC GRUESAS Y MEJOR INTEGRADAS, CON ONDULACIONES AL CITOPLASMA, LAMINA MEDIA OCASIONAL Fig. A 14.
36	PC BIEN INTEGRADAS, CON MATERIAL ELECTRODENSO. NO SE APRECIA LAMINA MEDIA Fig. A 5.	PC BIEN INTEGRADAS Y MUY ELECTRODENSAS, NO SE APRECIA LAMINA MEDIA Fig. A 10.	PC GRUESAS DEFORMADAS Y ZONAS MUY ELECTRODENSAS. DESTRUCCION MASIVA Y ONDULACIONES DE LA MEMBRANA CELULAR. LAMINA MEDIA DEFORMADA O RASTROS. Fig. A 15.

Tabla 4. Cambios en la ultraestructura de la pared celular (PC) del cotiledón de *Cicer arietinum* L. (garbanzo) cultivar "Tubutama" después del remojo en agua destilada (AD), agua alotropizada (AA) y solución salina de Rockland y Metzler modificada (SS).

TIEMPO REMOJO (horas)	ESQUINAS Y ESPACIOS INTERCELULARES		
	AD	AA	SS
3.5	CONFORMACION REGULAR, CON MATERIAL DE POSIBLE ORIGEN PEPTICO Fig. B 1 y B 2	DIFICIL DE OBSERVAR, ALGUNOS ESPACIOS PRESENTABAN CONTENIDO Y OTRAS NO. Fig. B 6	CONFORMADAS POR PAREDES CELULARES ELECTRODENSAS, EN EL INTERIOR DE ESPACIOS CONTENIDO CON CUERPOS ELECTRODENSOS Fig. B 11
6		MATERIAL BIEN ORGANIZADO, EL CONTENIDO CON CUERPOS ELECTRODENSOS O PROTEICOS. Fig. B 7	ESPACIOS INTERCELULARES CON MATERIAL POCO ORGANIZADO, PAREDES CELULARES DESTRUIDAS Fig: B 12 Y B 13
12	CONFORMACION IRREGULAR, CON CONTENIDO EN SU INTERIOR Fig. B 3	MATERIAL DIFICIL DE OBSERVAR, PAREDES CELULARES QUE LAS CONFORMAN CON SEPARACION DE LAMINA MEDIA Fig. B 8	
24	CONFORMACION MAS REGULAR, CON CONTENIDO DE GRANULOS ELECTRODENSOS EN SU INTERIOR Fig. B 4	CON PAREDES CELULARES ENGROSADAS Y CONTENIDO DE LOS ESPACIOS GRANULAR EVIDENTE. Fig. B 9	NO SE APRECIAN ESPACIOS INTERCELULARES POR EL REBLANDECIMIENTO
36	CONFORMADAS POR PAREDES CELULARES DESTRUIDAS Y ELECTRODENSAS, SIN CONTENIDO EN SU INTERIOR Fig. B 5	PAREDES CELULARES GRUESAS Y EN INTERIOR DE ESQUINAS SIN CONTENIDO. Fig. B 10	

Tabla 5. Cambios en la ultraestructura de esquinas y/o espacios intercelulares (E) del cotiledón de *Cicer arietinum* L. (garbanzo) cultivar "Tubutama" después del remojo en agua destilada (AD), agua alotropizada (AA) y solución salina de Rockland y Metzler modificada (SS).

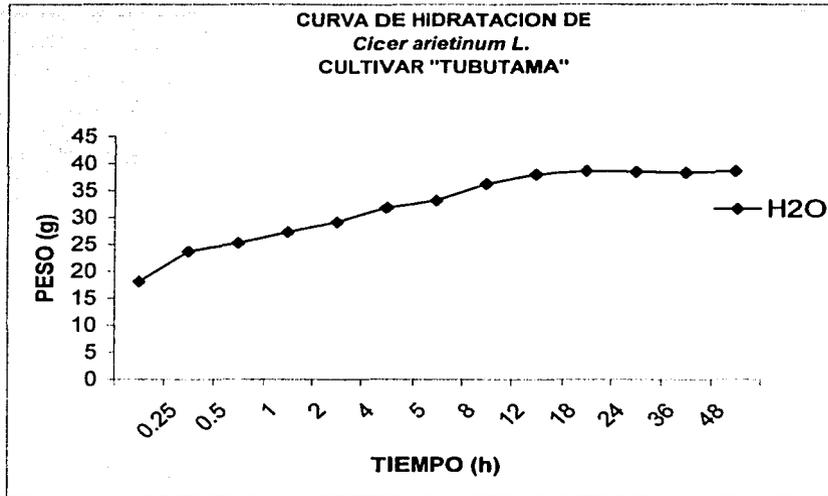
TIEMPO REMOJO (horas)	GRANULOS DE ALMIDON		
	AD	AA	SS
3.5	NO SE OBSERVARON GRANULOS DE ALMIDON, SOLO HUECOS Fig. C 1	GRANULOS ELECTRO-TRANSPARENTES, CON HALO ELECTRODENSO ALREDEDOR Fig. C 6	GRANULOS AMORFOS, RODEADOS POR HALO ELECTRODENSO Y CERCANOS A PARED CELULAR Fig. C 11
6	GRANULOS OVALADOS Fig. C 2	GRANULOS OVALADOS SIN HALO ELECTRODENSO ALREDEDOR Fig. C 7	SIMILAR AL ANTERIOR Fig. C 12
12	GRANULOS RODEADOS DE SUSTANCIA ELECTRODENSA Fig. C 3	HUECOS CON SUSTANCIA ELECTRODENSA ALREDEDOR Fig. C 8	SIMILAR AL ANTERIOR Fig. C 13
24	GRANULOS CON MEMBRANAS TRANSLUCIDAS Y HALO ELECTRODENSO Fig. C 4	GRANULOS ELECTRO-TRANSPARENTES Y MATERIAL ELECTRODENSO CERCANO Fig. C 9	SIMILAR AL ANTERIOR Fig. C 14
36	GRANULOS ELECTROTRANSPARENTES, DEFORMADOS Y RODEADOS DE CITOPLASMA ELACTRODENSO Fig. C 5	GRANULOS IRREGULARES Y ALARGADOS CON MATERIAL EN EL CITOPLASMA VECINO Fig. C10	SIMILAR AL ANTERIOR Fig. C 15

Tabla 6. Cambios en la ultraestructura de los gránulos de almidón del cotiledón de *Cicer arietinum* L. (garbanzo) cultivar "Tubutama" después del remojo en agua destilada (AD), agua alotropizada (AA) y solución salina de Rockland y Metzler modificada (SS).

TIEMPO REMOJO (horas)	CUERPOS PROTEICOS (CP)		
	AD	AA	SS
3.5	NO DEFINIDOS, ALGUNOS CUERPOS ESFERICOS QUE CONTIENEN GRANULOS DE BAJO CONTRASTE Y RESTOS DE RER Fig. D 1	NO DEFINIDOS AL IGUAL QUE LA MATRIZ PROTEICA Fig. D 6	CP BIEN DEFINIDOS, DELIMITADOS POR MEMBRANA; GRANULOS ELECTRODENSOS EN EL INTERIOR. VESICULAS DE AUTOLISIS. DESTRUCCION DE MATRIZ PROTEICA CITOPASMICA Fig. D 11
6	CUERPOS MEJOR CONFORMADOS Y CON MATERIAL ELECTRODENSO EN SU INTERIOR Fig. D 2	SEMEJANTE AL RESULTADO DE AD 12 HORAS, CON POCA ORGANIZACION DEL MATERIAL DENTRO DE LOS CP Fig. D 7	SIMILAR AL ANTERIOR Fig. D 12
12	SIMILAR AL ANTERIOR Fig. D 3	NO SE OBSERVARON POR REBLANDECIMIENTO Fig. D 8	SIMILAR AL ANTERIOR Fig. D 13
24	CP BIEN DEFINIDOS, ELECTRODENSOS. GRANULO ELECTRODENSO ALOJADO EN UNA ZONA DE BAJA DENSIDAD (GLOBOIDE) Fig. D 4	CP BIEN DEFINIDOS, DELIMITADOS POR MEMBRANA; ELECTRODENSOS Y SIN GLOBOIDE Fig. D 9	MATRIZ PROTEICA PRESENTA CUERPOS ELECTRODENSOS BIEN CONFORMADOS DENTRO DE MULTIPLES VESICULAS GRANDES ELECTROTRANSPARENTES CON CUERPOS ELECTRODENSOS. EL CITOPLASMA PRESENTA CUERPOS CON MATERIAL ESPIRALADO (TIPO CUERPOS MIELOIDES) Fig. D 14 y Fig. D 15
36	CP CONTIENEN UNA O MAS VESICULAS ELECTROTRANSPARENTES, SIN GLOBOIDE EN SU INTERIOR Fig. D 5	CP ELECTRODENSOS BIEN CONFORMADOS, CON UNA O MAS VESICULAS GRANDES ELECTROTRANSPARENTES SIN GLOBOIDE Fig. D 10	

Tabla 7. Cambios en la ultraestructura de los cuerpos proteicos (CP) del cotiledón de *Cicer arietinum* L. (garbanzo) cultivar "Tubutama" después del remojo en agua destilada (AD), agua alotropizada (AA) y solución salina de Rockland y Metzler modificada (SS).

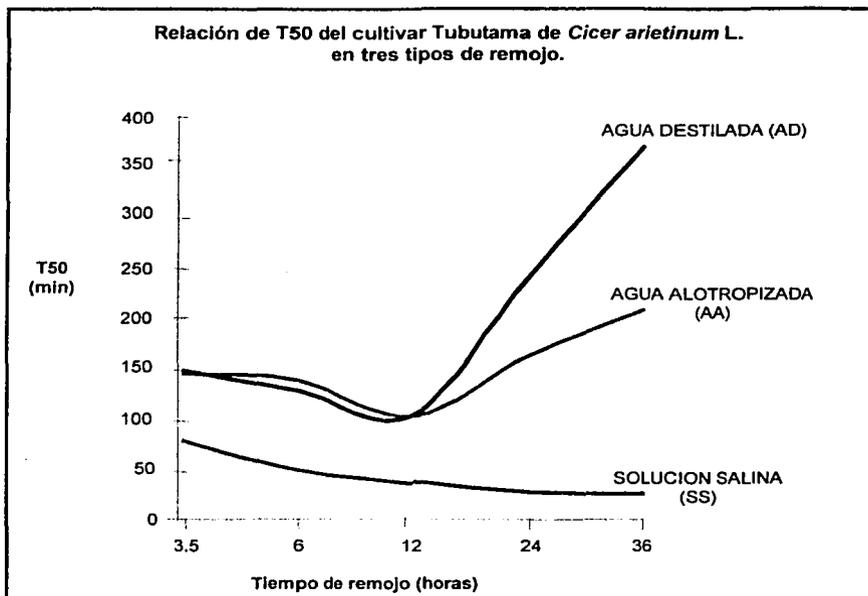
ANEXO 10



Curva de hidratación de *Cicer arietinum* L. (garbanzo) cultivar "Tubutama", en la cual se observa que se alcanza el equilibrio a después de las 12 horas. Cortesía de Esquivel et al., 1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO 11



Curvas de los tiempos medios de cocción (T_{50}), de semillas previamente remojadas de *Cicer arietinum* L.; presentando un comportamiento similar entre el testigo (AD) y el remojo con AA, donde se observó un menor T_{50} en esta última; con SS los T_{50} obtenidos fueron menores respecto a las dos anteriores (Esquivel et al., 2002).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN