



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN LAS INCLUSIONES
DE POLIFENOLES DE LA TESTA DE
Phaseolus vulgaris L.
DURANTE EL ENDURECIMIENTO Y SU REVERSIÓN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA

SALVADOR NOGUEZ ORTIZ

TUTORA: CLARA ESQUIVEL HUESCA

2011





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Noguez

Ortiz

Salvador

55 13 76 96 48

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de ciencias

Biología

78264371

2. Datos del tutor

Dra.

Clara

Esquivel

Huesca

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Patricia

Guevara

Fefer

4. Datos del sinodal 2

Dra.

Sonia

Vázquez

Santana

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Helia Reyna

Osuna

Fernández

6. Datos del sinodal 4

Dra.

Marcela Esperanza

Aguilar

Morales

7. Datos del trabajo escrito

Cambios morfológicos en las inclusiones de polifenoles de la testa de
Phaseolus vulgaris L. durante el endurecimiento y su reversión

85p

2011

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Clara Esquivel Huesca en el Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Institucionales

- A la Universidad Nacional Autónoma de México que por su carácter de ser publica y para todos, me brindó conocimiento universal, principios y valores para servir a la sociedad.
- Al proyecto PAPIIME: EN 103504 “Microscopía: física y aportaciones en la biología” por el apoyo económico para la compra de material y aparatos utilizados en la realización del presente trabajo.
- Al Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias de la UNAM por facilitar sus instalaciones y equipo necesario para la realización de este proyecto y realizar el presente trabajo.
- A la Dra. Clara Esquivel Huesca, Dra. Helia Reyna Osuna Fernández, Dra. Dra. Marcela Esperanza Aguilar Morales, Dra. Patricia Guevara Fefer y Dra. Sonia Vázquez Santana por sus comentarios y sugerencias al trabajo escrito.
- A la M. F. P. Ana Isabel Bieler Antolín y al Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias por las facilidades ofrecidas durante la toma de micrografías en el microscopio fotónico.
- A la Dra. Clara Esquivel Huesca por la toma de fotografías de los aparatos usados en este proyecto y por la proporción de micrografías para ilustración en algunos antecedentes.

Personales

- Agradezco a mis padres: María Ortiz Méndez y Ángel Noguez Escobar (Finado) por su apoyo incondicional en todos los actos de mi vida, por siempre alentarme a la superación tanto personal como académica y por darme apoyo en la parte emocional.
- A mis hermanos: Marelda, Araceli, Ma. Olga, Leobardo Ángel, Martha, Javier y Yolanda, por la libertad que me han brindado al dejarme decidir en el aspecto cultural.
- A la Dra. Clara Esquivel Huesca por brindarme su amistad y compañerismo, así como su excepcional orientación en el desarrollo de esta tesis que fue determinante en mi superación tanto académica como personal.
- A mi tía Isabel Ortiz Méndez por los momentos en que hizo con nosotros vivencia familiar y me alentó para desarrollarme en mi vida de todo ámbito.
- A todos los profesores o académicos que han apoyado al estudiante que con la adversidad encima, lo alientan y que sólo basta con unos momentos de atención para que él tenga el estímulo necesario para desarrollar y concluir su tan anhelado nivel de estudio.

A cada redescubrimiento

el asombro es el encuentro por saber

un detalle u otro ha de acontecer

de la mente que no soslaye

la vitalidad de las variables es menester

Salvador Noguez Ortiz

2010

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS	1
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
ANTECEDENTES	5
1) Biología de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	5
a) Posición taxonómica	5
b) Descripción botánica del género <i>Phaseolus</i>	6
c) Ontogenia de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	6
d) Semilla	7
e) Germinación del frijol	8
f) Microestructura de la testa	11
g) Microestructura del cotiledón	12
• Pared celular	12
• Membrana Plasmática	12
• Plasmodesmos	12
• Cuerpos proteicos	13
• Esquinas	13
• Granos de almidón	13
• Núcleo	13
2) Importancia alimenticia del frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	15
3) Procesamiento del frijol para el consumo humano	18
A) La imbibición de las semillas como un proceso previo a la cocción relacionada con el reblandecimiento	18

B) Cambios estructurales en frijol que se producen durante la cocción	19
4) Fenómeno del endurecimiento del frijol	21
5) Reversión del fenómeno del endurecimiento	27
6) Polifenoles	29
A) Origen de los polifenoles en plantas	30
B) Clasificación de los Polifenoles	32
C) Características químicas de los polifenoles	34
D) Localización de los polifenoles	38
E) Funciones de los polifenoles en plantas	41
JUSTIFICACIÓN	42
OBJETIVOS	43
MATERIALES Y METODOS	44
1) Método para la determinación del contenido de humedad en semillas	46
2) Método para la conservación de los frijoles frescos	48
3) Método de endurecimiento acelerado	48
4) Método de reversión del endurecimiento	51
5) Método de imbibición	53
6) Procesamiento de muestras para microscopía fotónica:	53
A) Fijación	54
B) Enjuague	54
C) Deshidratación	54
D) Infiltración	54

E) Inclusión	54
F) Microtomía	54
G) Pruebas histoquímicas:	54
a) Para detección de polifenoles	55
b) Para detección de taninos	55
7) Determinación de los tiempos de cocción	55
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
1) Descripción de la microestructura de la testa en frijoles frescos y pruebas histoquímicas para polifenoles	58
2) Comparación de testas en estado fresco: secas y embebidas	60
3) Testas de semillas de frijol sometidas a endurecimiento acelerado	62
4) Testas de semillas de frijol sometidas a endurecimiento acelerado y después a reversión: secas y embebidas.	63
5) Pruebas histoquímicas para polifenoles en cortes de testa de <i>Phaseolus vulgaris L.</i>	68
6) Tabla de los tiempos de cocción	69
A) Frijoles secos	70
B) Frijoles sometidos a imbibición	70
C) Frijoles secos comparados con los frijoles embebidos	71
CONCLUSIONES	72
PROPUESTA PARA ESTUDIOS FUTUROS	73

Palabras clave: Frijol, inclusiones, polifenoles, testa, endurecimiento y reversión del endurecimiento.

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

- Fig. 1 Flor y vainas de frijol
- Fig. 2 Semilla de frijol
- Fig. 3 Germinación del frijol
- Fig. 4 Hojas trifoliadas del frijol
- Fig. 5 Germinación de la semilla y crecimiento de la plántula del frijol
- Fig. 6 Corte de la testa de frijol *Phaseolus vulgaris*
- Fig. 7 Corte de cotiledón de *Phaseolus vulgaris*
- Fig. 8 Diagrama de flujo de las posibles causas que contribuyen al endurecimiento del frijol
- Fig. 9 Estructura tridimensional de un fenol simple y un polifenol
- Fig. 10 Biosíntesis de polifenoles en plantas
- Fig. 11 Sección longitudinal de la testa de frijol cultivar Michigan 800
- Fig. 12 Diagrama general del método
- Fig. 13 Método de determinación del contenido de humedad de las semillas
- Fig. 14 Recipiente para lograr el endurecimiento acelerado y también la reversión del mismo
- Fig. 15 Metodología para lograr el endurecimiento acelerado
- Fig. 16 Metodología para lograr la reversión del endurecimiento acelerado
- Fig. 17 Cocinador Mattson en olla de peltre, modificado por Esquivel en 1994 para determinar los tiempos medios de cocción (T_{50})
- Fig. 18 Cocinador Mattson modificado por Esquivel en 1994 antes de introducirse en la olla de peltre. En la parte derecha se ve un acercamiento para mostrar los frijoles con las varillas sobre ellos.
- Fig. 19 **A** Corte transversal de testa de semilla de *Phaseolus vulgaris* L. cultivar Flor de Junio, teñido con azul de toluidina donde se muestran sus tres estratos: el esclerénquima en empalizada (**e**), las flechas señalan los polifenoles en el lumen triangular; el estrato de las células reloj de arena (**r**) y el parénquima (**p**), en el que se ven las

- inclusiones (**i**) de los polifenoles en color azul en este corte y café oscuro en la prueba histoquímica de Permanganato de Potasio en **B**. Los polifenoles del tipo taninos los vemos con una coloración rojo ladrillo con la prueba de vainillina en **C**. 600X
- Fig. 20 Reacción positiva al permanganato de potasio para detectar polifenoles en corte longitudinal de testas de frijoles testigos frescos secos (**TFs**), en: **A**; y en testas de frijoles testigos frescos embebidos (**TFe**) en **B**. El esclerénquima en empalizada (**e**), el estrato de células reloj de arena (**r**) y el parénquima (**p**) son mostrados. 400X
- Fig. 21 Polifenoles de las inclusiones en testas de frijoles sometidos a endurecimiento y después a reversión del endurecimiento en cortes después de la prueba con permanganato de potasio: **A**, 1.5 meses de endurecimiento acelerado y luego 6 meses de reversión en estado seco; **B**, 1.5 meses de endurecimiento acelerado y 6 de reversión embebidos; **C**, 3 meses de endurecimiento acelerado y 6 de reversión en estado seco y **D**, 3 meses de endurecimiento acelerado y 6 meses de reversión embebidos. En **B** y en **C** se muestran rupturas en el esclerénquima en empalizada (→). También se muestran los estratos: **e**: esclerénquima; **r**: células reloj de arena; y **p**: parénquima con sus inclusiones **i**
- Cuadro 1 Producción de frijol a nivel mundial
- Cuadro 2 Producción de frijol a nivel mundial en los años 2004 a 2008
- Cuadro 3 Cambios bioquímicos ocurridos durante las etapas del endurecimiento del frijol
- Cuadro 4 Antocianinas
- Cuadro 5 Polifenoles clasificados por número y tipo de subcomponentes fenólicos
- Cuadro 6 Resultados de la prueba para polifenoles
- Cuadro 7 Tabla de los tiempos medios de cocción

RESUMEN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en los países en vías de desarrollo, representa una fuente proteica muy barata. Sin embargo existen graves pérdidas cuando al almacenarse a alta humedad y temperatura se desarrolla el fenómeno del endurecimiento que provoca: (1) el aumento del tiempo de cocción y por lo tanto un mayor gasto energético, (2) la calidad nutritiva se reduce y (3) hay una pobre aceptación entre los consumidores. El endurecimiento afecta principalmente al cotiledón, pero la cubierta seminal (testa) juega también un papel muy importante debido a que en ella se encuentran polifenoles, que contribuyen al sabor y firmeza de los frijoles para su consumo. Durante el endurecimiento hay un incremento en el contenido de estos polifenoles, los cuales pudieran intervenir formando complejos con proteínas y otros componentes que pudieran participar en el endurecimiento y también en la reversión de este fenómeno. El propósito de esta investigación fue determinar los cambios morfológicos en las inclusiones de polifenoles en las células de la testa *in situ* de *Phaseolus vulgaris* L., durante el endurecimiento y la reversión de este fenómeno en el cultivar de frijol Flor de Junio. Se analizaron testas de frijoles secos y embebidos, en estado fresco y sometidos a endurecimiento acelerado (durante 1.5 y 3 meses) y en la reversión del endurecimiento (durante los 6 meses posteriores). Se incluyó en resina hidrofílica JB4. Se realizaron cortes histológicos en ultramicrotomo y se practicaron pruebas histoquímicas cualitativas para detección de polifenoles de tipo taninos. Las pruebas histoquímicas fueron positivas en el lumen de las células del esclerénquima en empalizada, algo en el estrato de las células reloj de arena y en las inclusiones del parénquima. Se propone que los polifenoles de tipo taninos están relacionados con el fenómeno del endurecimiento y con su reversión, porque existen cambios cualitativos en la morfología de las inclusiones de los polifenoles de la testa (aumento o disminución en la densidad, un aspecto vítreo y por su movilización durante la imbibición) tanto de los frijoles secos como embebidos, ya sean endurecidos o los sometidos a reversión del endurecimiento.

INTRODUCCIÓN

La palabra frijol es una derivación del español antiguo “frisol”, que proviene del Catalán “fesol” y éste a su vez proviene del latín *Phaseolus*, de donde toma su nombre científico (Casanueva, 2005), aunque originario de México su nombre náhuatl “Etl” no se difundió junto con él. En América Latina, de las 52 especies descritas del género *Phaseolus*, alrededor de 40 son originarias de México (Castillo *et al*, 2006). Este país es centro de origen, domesticación y diversificación del grano (Casanueva, 2005).

El frijol *Phaseolus vulgaris* L. es una leguminosa ampliamente distribuida y conocida en el mundo. El suministro de frijol, especialmente en los países en vías de desarrollo se torna estratégico dado que es una fuente de proteínas, calorías y otros nutrientes (Carmona, 2007). En México, el frijol ocupa un lugar importante como fuente rica y económica de proteínas y calorías, junto con el maíz, representan la base de la alimentación de los mexicanos y se complementan debido a que algunos aminoácidos que le faltan a uno los tiene el otro. Es la segunda semilla más producida en dicho país, debido a su alto contenido de carbohidratos (55 a 65 % del peso seco), representando una fuente de alto contenido energético (Osorio *et al*, 2003).

Después de la cosecha, el frijol se puede consumir en estado fresco o almacenarlo para su consumo y venta posterior. Si las condiciones de almacenamiento no son las adecuadas, se desarrolla el fenómeno del endurecimiento, conocido en el idioma inglés como “*Hard to cook*” (duro de cocer). Este fenómeno se presenta cuando los frijoles se almacenan en condiciones de más de 75% de humedad relativa y a más de 25 °C, produciendo grandes pérdidas económicas debido a que ni el ama de casa ni el industrial los aceptan. El ama de casa tendría que gastar más energético (leña, carbón, petróleo, electricidad o gas) para lograr la cocción de los frijoles endurecidos, y el industrial no lo acepta ni para hacer harina para el alimento del ganado, debido a que es dura y de consistencia arenosa (Vázquez *et al*, 1991; Guzmán *et al*, 2002; Tovar *et al*, 2005).

Se han hecho investigaciones cuyo objetivo principal ha sido llevar a cabo la reversión del endurecimiento y se ha logrado que dicha reversión sea parcial, reduciendo los tiempos de cocción (Ramirez, 1990; Hentges *et al*, 1990; Tovar, 1997).

La dureza del frijol se ha atribuido principalmente a los cotiledones y no se ha puesto mucha atención a la cubierta seminal o testa, ésta podría representar una barrera fisicoquímica para la hidratación o imbibición de los frijoles. Los componentes de esta cubierta como los polifenoles, podrían contribuir también al endurecimiento y quizá estar relacionados en su reversión (Srisuma *et al*, 1989). Es necesario hacer estudios que esclarezcan el papel que juegan o no los polifenoles en el fenómeno del endurecimiento de las semillas del frijol.

ANTECEDENTES

1) **Biología de *Phaseolus vulgaris* L.**

a) Posición taxonómica

La posición taxonómica del frijol según Cronquist, 1981 es la siguiente:

Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Subfamilia	Papilionoideae
Tribu	Phaseoleae
Subtribu	Phaseolinae
Género	<i>Phaseolus</i>
Especie	<i>Phaseolus vulgaris</i>

b) Descripción botánica del género *Phaseolus*

El frijol común pertenece al género *Phaseolus* es una planta herbácea autógama, de crecimiento tanto determinado como indeterminado, anual, aunque hay también variedades perennes. Se cultiva en zonas templadas y tropicales. Esta característica permite agruparlas en las denominadas especies termófilas dado que no soportan bajas temperaturas. El ciclo vegetativo del frijol puede variar entre 80 días en variedades precoces y 180 días en variedades trepadoras. Las formas plurianuales pueden vivir entre 2 y 4 años. Dicho lapso se encuentra determinado sobre todo por el genotipo de la variedad, hábito de crecimiento, clima, suelo, radiación solar y fotoperiodo (Cronquist, 1981; Reyes *et al*, 2008).

c) Ontogenia de *Phaseolus vulgaris* L.

Este término se refiere al desarrollo del individuo, en especial al período embrionario. Para entenderlo es necesario tomar en cuenta la morfología floral del frijol. El frijol presenta inflorescencias tipo racimo, las flores son pediceladas y pequeñas de color morado, rosa o blanco, presentan cinco sépalos y cinco pétalos, diez estambres (nueve filamentos de los estambres están fusionados y uno es libre) el pistilo es gamosépalo. Las flores permanecen cerradas favoreciendo el mecanismo de autopolinización, debido a que las anteras están al mismo nivel que el estigma y además ambos órganos están envueltos completamente por la quilla. Al ocurrir la dehiscencia de las anteras, habitualmente con las flores aún cerradas, el polen cae directamente sobre el estigma; una vez ocurrida la polinización se produce una rápida apertura de las flores. Las primeras flores en abrir o presentar la antesis, son las que tienen mayor probabilidad de transformarse en vainas normales que son los frutos dehiscentes que contienen las semillas del frijol (Cronquist, 1981). Fig. 1.



Figura 1. Flor y vainas del frijol. Izquierda botón floral, al centro flor abierta y derecha vainas en diferentes etapas de maduración.

(http://3.bp.blogspot.com/_jPEmqjRT1uo/R8C438zFxzI/AAAAAAAAA5UQ/CvYtRGrg1aU/s200/Ejotes.jpg)

Después de la recolección, se procede al secado y las semillas se desvainan, éstas se almacenan para siembra posterior o para consumo.

d) Semilla

El frijol tiene una cubierta seminal formada de los tegumentos del óvulo. Esta testa es fuerte y parcialmente impermeable al agua, impide la evaporación excesiva del agua de las partes internas de la semilla y con frecuencia no permite la entrada de parásitos e impide daños mecánicos. El embrión consiste de un eje embrionario con dos cotiledones grandes y carnosos y carece de endospermo. El eje embrionario está compuesto por el hipocótilo al cual están unidos los cotiledones, la radícula y la plúmula (Vázquez *et al*, 1997).

En la superficie de la testa pueden verse varias estructuras:

- Hilo o hilio. Una cicatriz que queda al separarse la semilla del funículo.
- Micrópilo. Un pequeño poro cercano al hilio.
- Rafe. Un reborde en la semilla producido por el abultamiento del haz vascular en su recorrido por la testa, Fig. 2 (Mateos, 1991; Tovar, 1997).

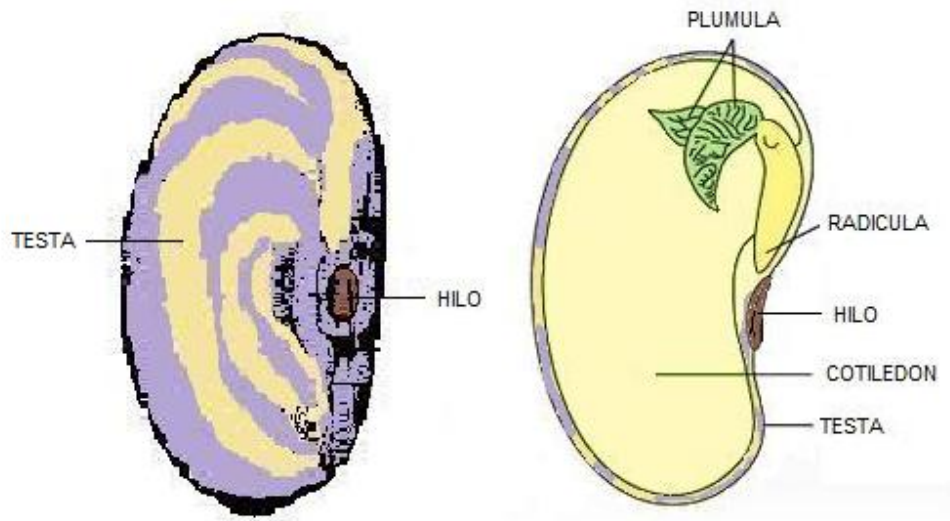


Figura 2. Semilla de frijol: Izquierda, vista exterior de la semilla completa. Derecha vista interior de la semilla, solo se muestra un cotiledón. (Ilustración Clara Esquivel Huesca)

e) Germinación del frijol

Las semillas de frijol presenta una germinación epígea es decir, el hipocótilo se extiende y hace que la semilla emerja del suelo, conservando por un tiempo los cotiledones, que además de almacenar nutrientes realizan funciones fotosintéticas durante el crecimiento temprano de la plántula (Fig. 3).



Figura 3. Germinación del frijol. Izquierda semillas germinando. Derecha plántula con hojas primarias y aún se ven los cotiledones de color verde por la actividad fotosintética. (Tomado de http://commons.wikimedia.org/wiki/file:Stamboon_poortg.jpge y http://commons.wikimedia.org/wiki/file:Stamboon_poortg.kiemplnat.jpg)

La radícula se desarrolla para formar la raíz primaria. La testa de la semilla puede permanecer cubriendo parte de los cotiledones y después desprenderse, lo cual permite la expansión de las hojas cotiledonarias y comienza a alargarse el epicótilo y aparecen las hojas primarias, posteriormente aparecen las hojas trifoliadas, Fig. 4. Más tarde el resto de las hojas se encuentran en posición alterna y son compuestas y trifoliadas.



Figura 4 Hojas trifoliadas del frijol.

(Tomado de <http://www.deperu.com/imagenes/?pal=frijol>)

En las axilas, tanto de los cotiledones, como de las hojas primarias y las de las hojas compuestas, se presenta un complejo de yemas axilares, éstas pueden dar origen a una rama secundaria, o en ciertos nudos, en la época reproductiva a una inflorescencia. La porción del tallo comprendida entre dos nudos se le denomina entrenudo (Mateos, 1991). Fig. 5.

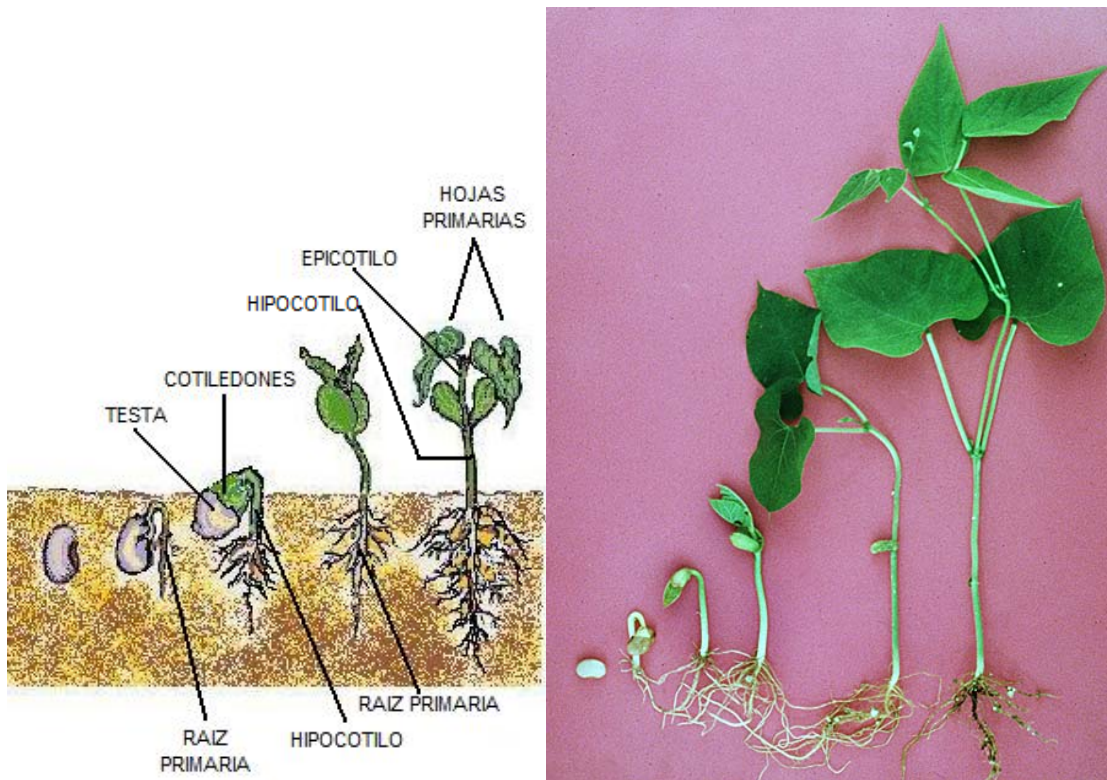


Figura 5 Germinación de la semilla y crecimiento de la plántula del frijol.
(Fotografía derecha tomada de:
<http://picsdigger.com/keyword/germinacion%20del%20frijol>)
[27/10/2010]

f) Microestructura de la testa

Los cortes observados al microscopio fotónico de campo claro muestran que la cubierta seminal o testa del frijol está conformada por tres estratos:

- El más externo es el esclerénquima en empalizada (**EE**) con células en forma de poliedros rectangulares con un lumen triangular que puede presentar o no algún contenido.
- El segundo estrato está formado por las células esclerenquimatosas en forma de reloj de arena que reciben este nombre por su forma.
- El tercer estrato, está formado por el parénquima que al degradarse se observan los restos de varias paredes celulares de forma irregular y algunas de éstas contienen inclusiones de polifenoles (Esquivel *et al*, 1992; 1994).
-

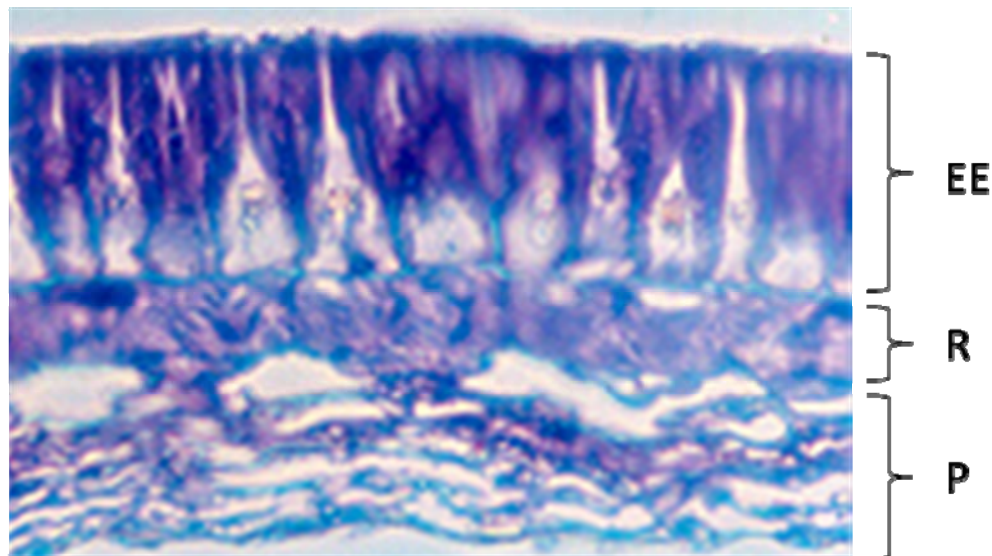


Figura 6 Corte de la testa de frijol *Phaseolus vulgaris* L. cultivar Michigan 800 en la que se muestran sus estratos: **EE**, esclerénquima en empalizada; **R**, células reloj de arena; **P**, parénquima. (Tomado de Esquivel *et al*, 1992.)

g) Microestructura del Cotiledón

Las células cotiledonarias presentan los siguientes componentes:

- Pared celular

Es gruesa e interrumpida por los plasmodesmos (Esquivel, 1992) Fig. 7. Está formada por microfibrillas de celulosa, hemicelulosa, agua, proteínas, lignina (en frijoles endurecidos), fenoles, iones, lípidos, etc. También contiene del 5 al 10% de compuestos polifenólicos en la forma de complejos polisacáridos proteína polifenol, además de ciertos polisacáridos neutros (González de la Concha, 1994), algunos de estos son insolubles y en leguminosas son: galactomananos, xiloglucanos y galactanos, que actúan como sustancias de reserva (Brett y Hillman, 1985).

En general la pared celular consta de tres partes fundamentales: 1) La sustancia intercelular o lámina media, 2) La pared celular primaria; 3) La pared celular secundaria. Las células cotiledonarias sólo presentan pared celular primaria y las contiguas se unen por medio de la lámina media; compuesta por sustancias pécticas, (Stanley y Aguilera, 1985). Por su naturaleza primaria, estas paredes poseen la capacidad de extensión, incrementando rápidamente su superficie durante el crecimiento celular (Arbo y González, 2010).

- Membrana Plasmática

Formada por una delgada bicapa lipoproteica que aparentemente mantienen su estructura durante la desecación de la semilla por el reemplazamiento de las interacciones establecidas con el agua por los OH de los azúcares acumulados durante el desarrollo de ésta membrana (Burke, 1986).

- Plasmodesmos

Son canales abiertos que comunican el citoplasma de una célula cotiledonaria con otras, su función es intercambiar sustancias en forma selectiva entre las células (Esquivel *et al*, 1992; 2004). Están formados por bandas delgadas de citoplasma de forma cilíndrica que penetran las membranas plasmáticas y paredes celulares de dos células adyacentes (Hall *et al*, 1984; Karp, 1993).

- Cuerpos Proteicos

Los cuerpos proteicos contiene empacadas las proteínas de reserva rodeadas por una membrana simple en las semillas de dicotiledóneas (Müntz, 1982). Estos son semiesféricos, su tamaño varía; en *Phaseolus* presentan un diámetro promedio de 10 μm (Pernollet, 1978), contienen globulinas de tipo faseolina y vicilina, ácido fítico y enzimas hidrolíticas, como las proteasas y fitasas, también contienen cationes y ácido ribonucleico y componentes menores como el ácido oxálico, azúcares y lípidos (Müntz, 1982; Santino *et al*, 1992; Esquivel *et al*, 1992).

- Esquinas

Estas estructuras están formadas por las paredes celulares de tres células contiguas que se unen formando un espacio triangular con sus respectivos ángulos (Esquivel *et al*, 1992; y Esquivel *et al*, 1994).

- Granos de Almidón

Los granos de almidón son oblongos y de diferentes tamaños (entre 20 y 50 μm), dependiendo de la especie, muestran capas concéntricas de amilosa (moléculas lineales) y amilopectina (moléculas ramificadas) alrededor de un punto llamado hilo, el cual puede estar en el centro del grano o a un lado. Cuando el grano de almidón se hidrata el hinchamiento diferencial de estos dos componentes acentúa la formación de capas (Esau, 1993; Esquivel *et al*, 1992; 1994).

- Núcleo

En algunas células cotiledonarias se alcanza a observar el núcleo como una masa viscosa amorfa de material rodeado por la envoltura nuclear y en ciertas ocasiones se ve el nucléolo alrededor del cual se ven grumos de cromatina compacta entre el nucleoplasma (Hall *et al*, 1984; Karp, 1993; Esquivel *et al*, 1992; 1994).

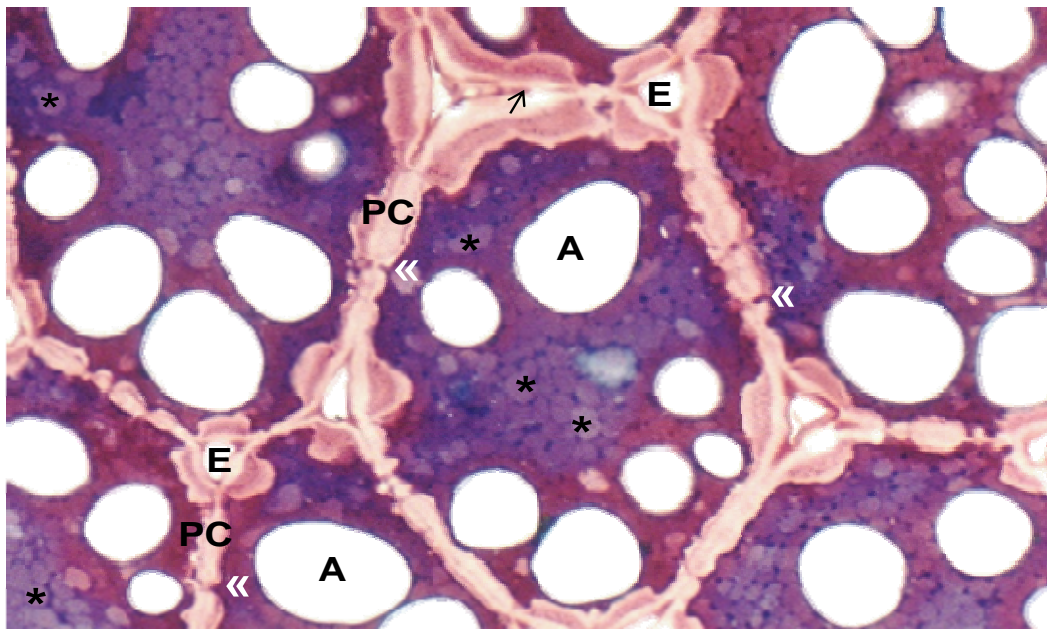


Figura 7 Corte del cotiledón de *Phaseolus vulgaris*. Se muestra la microestructura de las células cotiledonarias; PC, paredes celulares, A, Almidones, *, Cuerpos Proteicos, <<, plasmodesmos; E, esquinas. Tomado de Esquivel, 2004.

2) Importancia alimenticia del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

Como se mencionó anteriormente, esta leguminosa es ampliamente distribuida y conocida en el mundo. El cuadro 1 muestra que México se ha mantenido entre los primeros cinco lugares como productor de frijol a nivel mundial. Esto es debido a las características fisicoquímicas que presenta: como el tamaño, color, uniformidad, sabor, tiempo de cocción y contenido de proteína, que están relacionadas con su mejor calidad culinaria y nutricional (Allende *et al*, 2006).

Sin embargo la producción ha mermado debido a alteraciones climáticas así como al mal manejo de la semilla, pero sobre todo a la deficiente calidad de almacenamiento que repercute por invasión de hongos por la alta humedad y otros daños como los producidos por insectos. Si el almacenamiento no cumple con estándares de temperatura y humedad la semilla pierde su valor nutritivo y deja de ser fuente de proteínas y carbohidratos tanto para consumo humano, como para forraje, afectando la economía del productor. En nuestro país existen en forma natural condiciones climáticas adversas que contribuyen a la deficiente calidad del almacenamiento como ejemplo las zonas tropicales, sin embargo y a pesar de las pérdidas por un almacenamiento deficiente y que el 87% de las siembras son de temporal, como ya mencionó, nuestro país se ha logrado mantener entre los cinco primeros lugares de la producción en el mundo Cuadro 1 y 2.

Año	País	Producción (Toneladas métricas)	Lugar
1990	India	4,084,900	1°
	México	1,287,364	5°
1991	India	3,529,000	1°
	México	1,378,519	4°
1992	India	3,870,400	1°
	México	718,574	4°
1993	India	3,274,700	1°
	México	1,287,573	3°
1994	Brasil	3,369,364	1°
	México	1,364,239	4°
1995	India	3,440,000	1°
	México	1,270,915	5°
1996	India	3,507,800	1°
	México	1,349,098	4°
1997	India	2,955,800	1°
	México	965,056	5°
1998	India	2,750,000	1°
	México	1,260,658	5°
1999	Brasil	2,830,915	1°
	México	1,059,156	6°
2000	Brasil	3,038,238	1°
	México	887,868	6°
2001	India	2,570,000	1°
	México	1,062,970	5°
2002	Brasil	3,017,280	1°
	México	1,333,730	5°

Cuadro 1 Producción de frijol a nivel mundial en los años 1990 a 2002. Tomado de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), mencionado en SAGARPA, 2007.

PRINCIPALES PAÍSES PRODUCTORES DE FRIJOL
(Toneladas)

País	2004	2005	2006	2007	2008
Brasil	2,967,007	3,021,641	3,457,744	3,169,360	3,460,867
India	2,883,900	2,630,800	3,270,000	3,930,000	3,930,000
Myanmar	1,659,000	1,680,000	1,750,000	2,500,000	2,500,000
Estados Unidos	806,850	1,234,770	1,099,830	1,150,808	1,159,290
México	1,163,400	826,892	1,385,784	993,943	1,122,720
China	1,758,489	1,806,862	1,559,850	1,233,005	1,121,151
Tanzania	626,340	450,000	500,000	480,000	480,000
Uganda	455,000	478,000	424,000	435,000	440,000
Argentina	151,278	169,257	322,775	328,249	336,779
Kenia	277,501	382,307	531,800	427,996	265,006

Cuadro 2 Producción de frijol a nivel mundial en los años 2004 a 2008. Tomado de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).

Fuentes: <http://faostat.fao.org>
<http://portal.veracruz.gob.mx/pla/portal/docs/PAGE/COVECANICIO/IMAGENES/ARCHIVOSPDF/ARCHIVOSDIFUSION/MONOGRAFIA%20FRIJOL2010.PDF>

Phaseolus vulgaris L. es la leguminosa más consumida, generalmente como granos enteros cocidos, y se les conoce con diversos nombres: frijol, caraotas, judías, alubias, etc. La semilla está constituida por 20-28% de proteínas, éstas le confieren propiedades funcionales que van a determinar el uso de dicho alimento en una formulación cuando se destina como alimento (Sangronis *et al*, 2004). Al cosechar la semilla de frijol; una parte se utiliza como grano para consumo humano o animales de granja; y la otra parte como semilla para el siguiente período de siembra (Díaz *et al*, 2003). Los destinados al consumo humano, se almacenan durante tiempos largos y tienden a endurecerse, por lo cual no son bien aceptados para su venta. Debido a este fenómeno de endurecimiento las semillas tardan en ablandarse y requieren mayor gasto de combustible para su cocimiento (Mateos, 1991). Todo esto produce un bajo valor nutricional y cambios a nivel estructural y fisiológico de la semilla. Estos cambios se deben a la presencia de polifenoles, sustancias presentes en la mayoría de las plantas estudiadas (Iniestra *et al*, 2005).

3) Procesamiento del frijol para el consumo humano

El frijol para el consumo humano puede procesarse de diferentes formas.

Algunos se pueden comer crudos o hervidos como en el caso de los ejotes es decir las vainas aún verdes. La mayoría de los frijoles se consumen como grano después de que han madurado y secado en la vaina. Pueden consumirse al momento de la cosecha o después de almacenarse durante algún tiempo. Generalmente es recomendado que para la cocción se realice el siguiente procedimiento:

- 1) Se limpian, se enjuagan y se someten a cocción, sin someterlos al remejo, generalmente con frijoles frescos.
- 2) Otra forma es que después de enjuagarlos se dejen remojando durante un tiempo que puede variar, pero generalmente es entre 12 y 24 horas de imbibición en el agua, después se tira el agua de remojo y se ponen a cocer en agua nueva.

A) La imbibición de las semillas como un proceso previo a la cocción relacionada con el reblandecimiento

La imbibición de los granos de frijol para consumo humano a través del remojo en agua tiene como propósito reblandecerlos y reducir el tiempo de cocción para obtener un producto suave y palatable tanto en la preparación doméstica como en la industrial y comercial. (Desphande y Cheryan, 1986; Jaffé y Flores, 1974).

Las semillas al remojarse introducen el agua a través la testa, el hilum o hilo y el micrópilo que juntos forman un sistema integral de absorción-remoción de sustancias de las semillas (Sefa Dedeh *et al*, 1978). La práctica comercial más común involucra el remojo de las semillas de leguminosas en agua, seguida de un proceso térmico en una solución de NaCl al 2%. (Mc Donald *et al*, 1988; García-

Vela y Stanley, 1989a; Pérez y Acosta, 2002; Plhak *et al* 1989; Quast y Da Silva, 1977).

Se han identificado algunas en semillas endurecidas durante el proceso de la imbibición:

- Una disminución de la capacidad de la semilla almacenada para distribuir el agua a los cotiledones y cambios estructurales y bioquímicos como consecuencias de reacciones específicas inducidas durante el almacenamiento. Se observó que en frijoles endurecidos con temperatura mayor de 25°C y humedad relativa de 75 % o más, el agua absorbida por las semillas se queda atrapada entre la testa y los cotiledones, mientras que en el frijol fresco el agua se distribuye uniformemente (Tovar, 1997; González de la Concha, 1994). Esta diferencia en la distribución del agua es debida probablemente a que la cinética de humectación de los componentes de la semilla sea diferente en el frijol fresco y en el frijol endurecido y por consecuencia, la sensibilidad térmica de la semilla varíe.
- Existen algunos cambios químicos que ocurren en el frijol durante las diferentes etapas del proceso. Debido a que los compuestos químicos como son las proteínas, el almidón, las pectinas y los polifenoles se modifican en los cotiledones durante el almacenamiento del frijol en condiciones adversas de alta humedad y alta temperatura (González de la Concha, 1994).

B) Cambios estructurales en el frijol que se producen durante la cocción

Cuando el frijol se utiliza para consumo humano, éste es cocido, involucrando un tratamiento térmico en el que ocurren cambios estructurales en la semilla. A la fecha se reportar principalmente los cambios en los cotiledones y no se reportan los cambios ocurridos en la testa. En cotiledones se mencionan cambios como la fractura y solubilización de la lámina media, con lo cual las células se separan, disminuyendo la rigidez de las semillas. En el citoplasma, las proteínas se desnaturalizan y se facilita la gelatinización de los gránulos de almidón (García-Vela y Stanley 1989b; Bernal-Lugo y Leopold, 1992a). Estos cambios

fisicoquímicos inducidos por el calor producen el reblandecimiento de la semilla, la pérdida de la toxicidad debida a los compuestos antinutricionales (los inhibidores de proteasa, las lectinas, los taninos, fitatos y contenido de fibra), la adquisición de sabor agradable y un incremento en la digestibilidad (González de la Concha, 1994; Bernal-Lugo, 1994; Tovar, 1997; Del Pino y Lajolo, 2003; Díaz, 2003).

Tovar (1997) mencionó que la solubilización del material intercelular depende tanto de la cantidad de calcio y magnesio como de la interacción de éstos con las sustancias pécticas y el tamaño de polisacáridos, por lo que el cambio en la solubilidad de las pectinas observado durante la cocción, debe estar relacionado con una disminución en el contenido de cationes divalentes de la lámina media y/o con una disminución en el grado de polimerización de las sustancias que la forman.

La disminución de iones divalentes como los de calcio y magnesio en la pared celular podría realizarse a través de un proceso que involucra su quelación (fijación o secuestro de iones metálicos formando compuestos estables llamados quelatos) por el ácido fítico, molécula con alta densidad de carga negativa; o bien por un proceso de intercambio iónico (ion divalente por monovalente), si la primera sugerencia está contribuyendo a la suavización térmica del frijol, el contenido de fitato de calcio y magnesio (compuesto insoluble) debe ser mayor en el frijol cocido que en el frijol crudo. Se ha observado que el contenido de fitato insoluble no se modifica durante la cocción (Bernal-Lugo *et al*, 1992b), sin embargo la cantidad de sodio y potasio encontrada en el grano cocido disminuye notablemente. También la cantidad de pectina presente en el grano cocido fue menor que en el grano no cocido. Los datos antes mencionados apoyan la propuesta de que durante la cocción del frijol, la solubilización de la lámina media se realiza a través de la despolimerización térmica de la pectina y por un intercambio de iones divalentes por monovalentes. De lo anterior se concluye que cualquier factor que modifica cualitativa o cuantitativamente los componentes de la pared celular y/o la susceptibilidad de los gránulos de almidón a la gelatinización o estabilidad térmica de las proteínas afectará en forma importante el proceso de cocción. Al ser la testa la estructura más externa de la semilla desempeña un papel importante en el

control de la captación y distribución del agua (Bernal Lugo *et al*, 1992b; Tovar, 1997).

4) Fenómeno del Endurecimiento del frijol

Los frijoles mantenidos bajo ciertas condiciones favorables de almacenamiento: a 4°C y con un contenido de humedad en la semillas entre 13 y 18 %, permanecen frescos durante meses o incluso años (Burr *et al*, 1968; Esquivel *et al*, 1992). Bernal-Lugo, 1994 menciona que mantuvo los frijoles frescos secos recién cosechados con un contenido de humedad 8-10% en el grano, pero no menciona la temperatura.

Si las condiciones de almacenamiento son adversas el frijol se endurece. Uno de los ejemplos más claros es la pérdida de la calidad de los granos (término utilizado cuando la semillas se destina para la alimentación) es el fenómeno del endurecimiento del frijol, que se refiere a la dureza para la cocción (conocido como “hard to cook” en ingles); su desarrollo está asociado a condiciones deficientes de almacenamiento (Bressani, 1982; Aguilera y Ballivian, 1987; Ramírez, 1987; Tovar *et al*, 1994).

Este fenómeno se manifiesta como un aumento en el tiempo necesario para la suavización de la semilla durante el proceso de cocción y también como una disminución de las cualidades organolépticas y nutritivas (Liu *et al*, 1992; Molina *et al*, 1975; Molina *et al*, 1976; Bernal-Lugo y Leopold, 1992a). Se induce cuando el grano es almacenado en humedades relativas altas (**HR** 60%) y temperaturas altas (**T**>20°C); en estas condiciones los contenidos de agua del grano varían del 13 al 18% según la **HR** y la **T** en el almacén, contribuyendo también el tiempo en el que se desarrolla el endurecimiento (Jackson y Varriano – Marston, 1981; Bernal-Lugo *et al*, 1990).

Los frijoles endurecidos son granos difíciles de cocer y aunque es de uso común embeberlos para reblandecerlos; se ha determinado que embeben agua igual que los frijoles normales, pero requieren de un mayor tiempo de cocción, por lo que la

imbibición no está relacionada con el tiempo de cocción (Burr *et al*, 1968; Molina *et al*, 1976).

El fenómeno de endurecimiento involucra mecanismos que comprenden tanto factores físicos, como químicos y estructurales (Hentges *et al*, 1991; Richardson y Stanley 1991) Fig. 8.

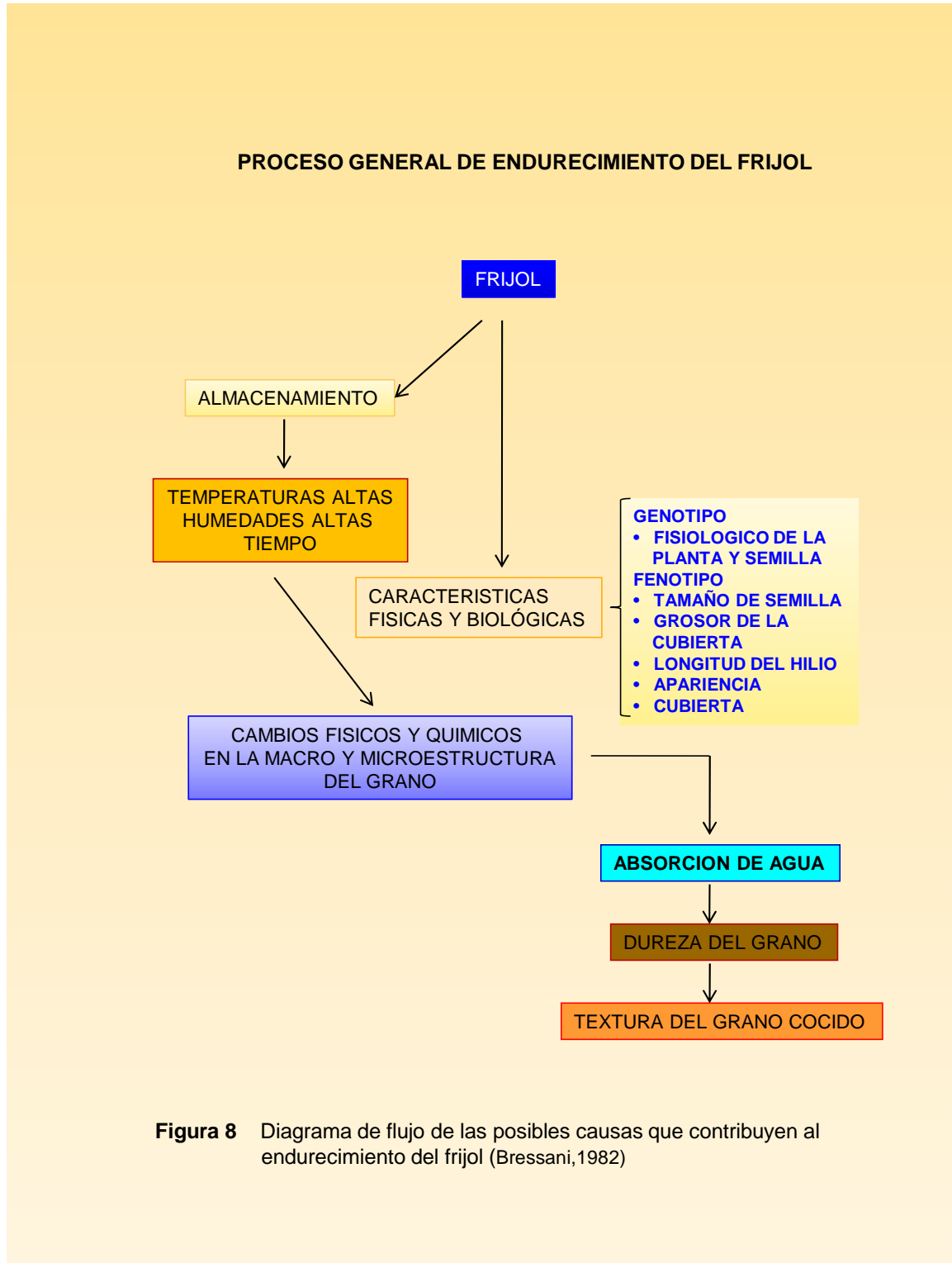


Figura 8 Diagrama de flujo de las posibles causas que contribuyen al endurecimiento del frijol (Bressani, 1982)

En la zona del Trópico de nuestro país existen las condiciones climáticas naturales en las que, el fenómeno del endurecimiento se desarrolla normalmente, en un tiempo comprendido entre uno y medio, y tres meses de almacenamiento (Díaz de León, 1989).

En 1987, Ramírez (investigador mexicano), tomó en cuenta la importancia económica que involucra este fenómeno y señaló la necesidad de una serie de investigaciones, entre las que mencionó:

- 1) “El efecto de las condiciones de almacenamiento sobre el endurecimiento de las variedades mexicanas de frijol”
- 2) “Las causas bioquímicas del endurecimiento del frijol”
- 3) “Los cambios ultraestructurales y su correlación con la función, en el fenómeno del endurecimiento de diferentes variedades mexicanas de frijol”
- 4) “La evaluación de la calidad nutritiva y posibles usos del frijol endurecido”

Refiriéndose al efecto de las condiciones de almacenamiento relacionadas con el endurecimiento del frijol y sus causas bioquímicas, estudió el efecto de la humedad, la temperatura y el tiempo de almacenamiento en el desarrollo del endurecimiento del grano de siete variedades de frijol mexicano y encontró que hubo diferencias entre las variedades, determinando que en general la temperatura tiene un efecto definitivo sobre este fenómeno, ya que a mayor temperatura mayor es el endurecimiento y este efecto está en relación directa con el periodo de almacenamiento y con el fenotipo del frijol. Sus resultados coinciden con los de varios investigadores (Jackson y Varriano – Marston, 1981; Hincks y Stanley, 1986; Hincks *et al.* 1987; Ramírez, 1987; Ramírez, 1990).

Respecto a las causas bioquímicas del endurecimiento, Bernal Lugo, en sus publicaciones de 1990 a 1994, encontró que el endurecimiento del frijol es un proceso enzimático en el que participan diversas hidrolasas y al menos un grupo de oxidasas. Este fenómeno produce un deterioro que inicia con un aumento en el contenido de agua de la semilla por efecto de la alta humedad relativa. Dicho aumento permite la acción de diversas enzimas. La actividad del agua se presenta

cuando es igual o mayor que 0.6% (Bernal-Lugo, 1994). En el endurecimiento pueden distinguirse tres etapas: Inicial, intermedia y avanzada.

Los cambios ocurridos durante estas etapas en el modelo presentado por Bernal-Lugo se resumen en el siguiente cuadro.

ETAPAS	ENZIMAS ACTIVADAS	CAMBIOS PROVOCADOS
<p>Inicial</p> <p>En zonas templadas</p> <p>Temperaturas menores de 25°C</p>	<p>AW = 0.2 -0.4</p> <p>Enzimas:</p> <p>Lipasas y lipoxigenasas</p> <p>Proteasas o peptidasas</p> <p>Fitina y fitasa se vierten al citoplasma</p>	<p>-Degradación membranal</p> <p>-Ruptura de los cuerpos proteicos</p> <p>-Son hidrolizadas en forma espontanea</p>
<p>Intermedia</p> <p>En zonas Semitropicales</p> <p>HR de 65%</p> <p>T 24°C</p>	<p>AW = 0.6 – 0.8</p> <p>Aparte de las enzimas que se activan en la etapa inicial, se activan las hidrolasas:</p> <p>Fitasa y glucosidasas</p>	<p>Número de cuerpos proteicos decrece, niveles de fosfatos, de iones inorgánicos y los azúcares solubles aumentan en el citoplasma. Estos cambios producen aumento en la termoestabilidad de las proteínas del citoplasma y en la temperatura de gelatinización del almidón y por tanto un aumento en el tiempo de cocción.</p> <p>La liberación de iones fosfato y iones divalentes, especialmente calcio, durante la hidrólisis espontanea o enzimática de la fitina, contribuirán en forma negativa al tiempo de cocción del frijol debido a que el calcio al ser movilizado estabiliza a la lámina media.</p>
<p>Avanzada</p> <p>En zonas Tropicales</p> <p>Alta HR 75%</p> <p>y alta T>25°</p>	<p>AW = No se ha determinado</p> <p>Las enzimas de las etapas anteriores se encuentran activas y presentan una velocidad de reacción entre el 30 al 50% de la máxima que presentaría si el agua no fuera una limitante.</p> <p>Se encuentran activadas las polifenol oxidasa y la pectin metil esterasa.</p>	<p>Se pueden dar interacciones: Proteína-fenol o carbohidrato-fenol en la pared celular provocando que la pared celular se estabilice.</p> <p>Al aumentar el número de sitios de interacción pectina-calcio, la pectina metil esterasa también contribuya a la estabilización de la lámina media.</p>

AW = Acción del agua

Cuadro 3. Cambios bioquímicos ocurridos durante las etapas del endurecimiento del frijol

En el frijol fresco cultivar Ojo de Cabra, se ha demostrado que los gránulos de almidón están asociados a vesículas que contienen fenoles. Si durante el almacenamiento estas vesículas se rompen, su contenido queda libre en el citoplasma y disponible para interactuar con las macromoléculas presentes en este compartimiento celular (Esquivel *et al*, 1992). Este tipo de modificación química explicaría la disminución de digestibilidad observada en el almidón y proteínas de semillas endurecidas. También se ha encontrado que los niveles de ácido fítico, cuerpos proteicos y proteínas, disminuyen en el frijol difícil de cocer. (González de la Concha, 1994; Reyes-Moreno *et al*, 2000).

Además se ha comprobado que el almacenamiento, cuando las condiciones ambientales son: de alta humedad y alta temperatura induce cambios en los ácidos fenólicos (Srisuma *et al*, 1989).

5) Reversión del fenómeno del endurecimiento

Existen pocos estudios referentes a la reversión del fenómeno de endurecimiento pero diferentes investigaciones han mostrado que este fenómeno se puede revertir cambiando las condiciones de almacenamiento (Ramirez, 1990; Hentges *et al*, 1990; Tovar *et al*, 1993; Tovar, 1997).

Ramírez (1990) logró la reversión de este fenómeno almacenando los granos de frijol a humedad relativa alta (75-85%) y baja temperatura (8-15°C) y posteriormente Hentges *et al*, en el mismo año lograron la reversión tanto en frijol como en chícharo pero bajo las siguientes condiciones: humedad relativa alta (71%) y baja temperatura (6.5°C).

Tovar (1997), logró la reversión del endurecimiento cuando los frijoles se almacenaron a 75% HR Y 8°C. Esta reversión podría deberse a que las biomoléculas y/o microestructuras modificadas durante el endurecimiento regresan a su estado original o bien a que se realizan otras modificaciones que facilitan la termo suavización . Así que solamente se necesita bajar la temperatura de almacenamiento de los frijoles endurecidos para lograr la reversión del endurecimiento y por lo tanto disminuir su tiempo de cocción.

En estos trabajos se evaluaron los efectos de la reversión sobre los tiempos de cocción en diversos cultivares de frijol. Tovar en 1997, logró casi la reversión completa hasta los tres meses de endurecimiento, después de este tiempo el endurecimiento aparentemente tiene dos componentes uno reversible y otro irreversible. En el elemento reversible permite que los frijoles se ablanden con el tratamiento térmico, lo que no se dio en los frijoles endurecidos durante seis meses almacenados a HR del 75% y T de 29°C. En Flor de Mayo remojado se observó la reversión del endurecimiento hasta los tres meses almacenados bajo las siguientes condiciones: HR del 75% y T de 29°C, sin embargo ésta fue menor que la de los frijoles secos, lo que evidencia la intervención del agua como agente que favorece el endurecimiento, ya que los de seis meses de almacenamiento para lograr el endurecimiento, revertidos y remojados no se cocieron después de siete horas.

En aspectos químicos, se ha investigado el efecto de sales monovalentes y agentes quelantes; Liu *et al*, 1992 al emplear soluciones de tetra acetato disodico (EDTA) en el remojo de chícharo de vaca endurecidos por 12 meses, revertieron el endurecimiento totalmente, y cuando se remojaron las semillas en ácido tetra acético (EGTA), lograron la reversión del endurecimiento de manera parcial. Para medir la suavización de los chícharo de vaca endurecidos se utilizó el aparato denominado Instron (Liu *et al*, 1992).

En otra investigación, Aguilera y Rivera (1992) también utilizaron sales y agentes quelantes en el remojo de frijol negro endurecido y al observar la micro estructura de las células cotiledonarias en el microscopio electrónico de barrido, notaron que la separación celular no se modificó con el remojo, pero la morfología externa de la pared celular se alteró, aunque no precisaron qué tipo de cambios se presentaron. El desarrollo del defecto “Hard to Cook” o fenómeno del endurecimiento, se suponía que era una condición permanente en semillas de leguminosas, pero ya se demostró que puede revertirse y acortar el tiempo de cocción después de cambiar las condiciones del almacén: temperatura baja y alta

humedad (6.5°C, 71% HR.). La reversión del endurecimiento del frijol puede lograr varios beneficios económicos y nutricionales, así en vez de descartar las semillas que pudieran ser duras de cocerse o utilizarlas como alimento para los animales, pueden continuar empleándose para consumo humano. Los mecanismos responsables de provocar el fenómeno del endurecimiento, no es probable que sean los mismos que los de la reversibilidad; aunque varios de los mismos componentes que primero han aumentado el tiempo de cocción, son los implicados en la reversión de este fenómeno, excepto que supone diferentes vínculos químicos, enzimáticos etc. (Aguilera y Rivera, 1992)

6) Polifenoles

Los polifenoles son fitoquímicos de bajo peso molecular, es decir un grupo de sustancias químicas encontradas en plantas, caracterizadas por la presencia de más de un grupo fenol por molécula. El término fitoquímico se refiere, precisamente a aquellos compuestos presentes en los alimentos que no nutren pero presentan una actividad biológica que beneficia a la salud humana. También son metabolitos secundarios de los más numerosos y distribuidos por toda la planta, con más de 800 estructuras conocidas en la actualidad (Davies, 1969; Dewick, 1995; ACE, 2010). Figura 9.

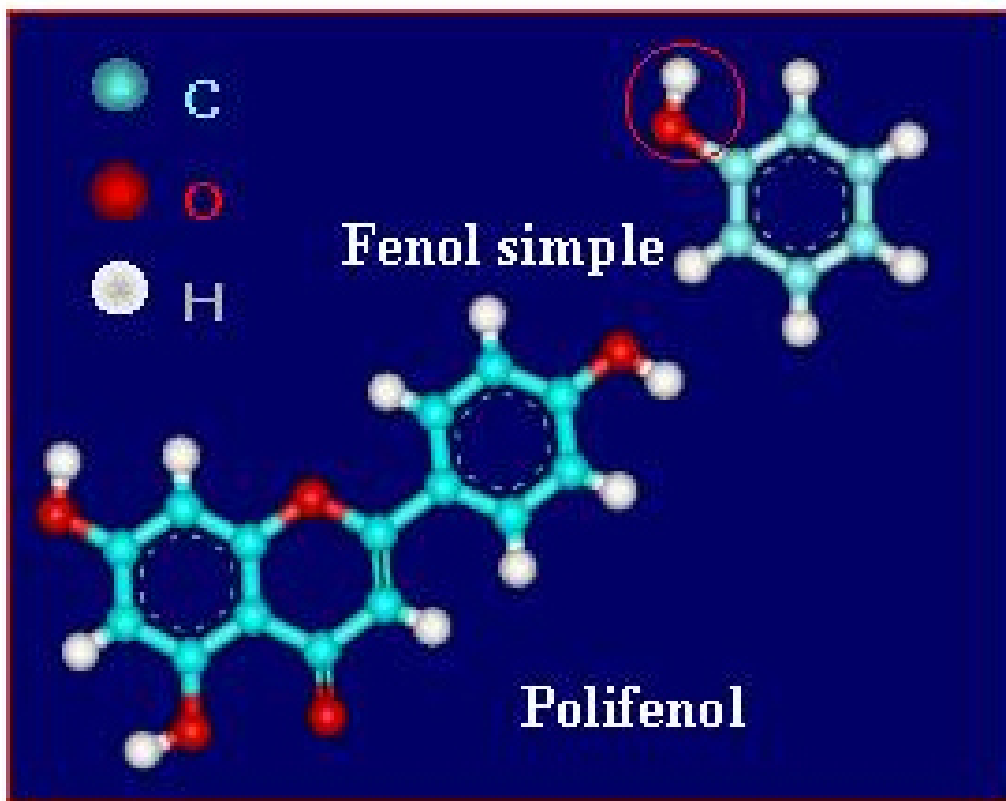


Figura 9 Estructura tridimensional de un fenol simple y un polifenol.

(http://www.acenologia.com/figs55_ciencia2.htm)

A) Origen de los polifenoles en plantas

Participan dos rutas metabólicas, la vía de los policétidos, minoritaria en plantas superiores, y la vía del ácido siquímico. A veces, ambas vías pueden participar conjuntamente en la formación de fenoles complejos. La vía de los policétidos discurre de un modo similar a la de los ácidos grasos; sobre una molécula de arranque, o cebador, que en la mayoría de los casos es el acetyl CoA se van adicionando sucesivamente unidades de malonilCoA, con pérdida de un átomo de carbono, de modo que por cada malonil utilizado se integran dos átomos de carbono. Las enzimas que participan se hayan asociadas, formando un complejo multienzimático que cataliza todos los pasos de la biosíntesis, y los compuestos que abandonan el complejo son los ácidos policétidos íntegramente formados. Pero estas estructuras, donde se da una alternancia de átomos con y sin oxígeno,

son muy inestables, y en las plantas se estabilizan originando compuestos aromáticos de tipo fenólico.

La ruta del ácido siquímico Figura 10, que es dependiente de luz, se inicia en los plastos por condensación de dos productos típicamente fotosintéticos, la eritrosa 4-P con el fosfoenolpiruvato (PEP), y por diversas modificaciones se obtiene el ácido siquímico, del cual derivan directamente algunos fenoles en los vegetales. Pero la vía del ácido siquímico normalmente prosigue, y la incorporación de una segunda molécula de PEP conduce a la formación de fenilalanina, que por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL) se transforma en el ácido transcinámico. Posteriormente, el ácido cinámico es transformado en ácido *p*-cumárico por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel de anillo aromático y la acción de una CoA ligasa lo transforma en *p*-cumaroilCoA, que es el precursor de la mayoría de los fenoles de origen vegetal, entre los que se encuentran los polifenoles del vino.

La acción de la PAL es fundamental para la vida de las plantas y por ello está estrictamente modulada. Entre otros factores, esta enzima es activada por la luz, y depende además de la concentración de diferentes hormonas vegetales. También, en general, la actividad PAL aumenta cuando a los vegetales se les somete a situaciones de estrés, como la falta de agua, infecciones fúngicas o bacterianas y radiaciones UV. Otro factor que activa la enzima PAL es el frío, y por ello, las plantas sometidas a bajas temperaturas suelen presentar coloraciones rojizas en tallos y hojas. También es conocido que al florecer las plantas en primaveras que siguen a inviernos muy fríos, las flores desarrollan colores muy intensos (Palazón *et al*, 2001).

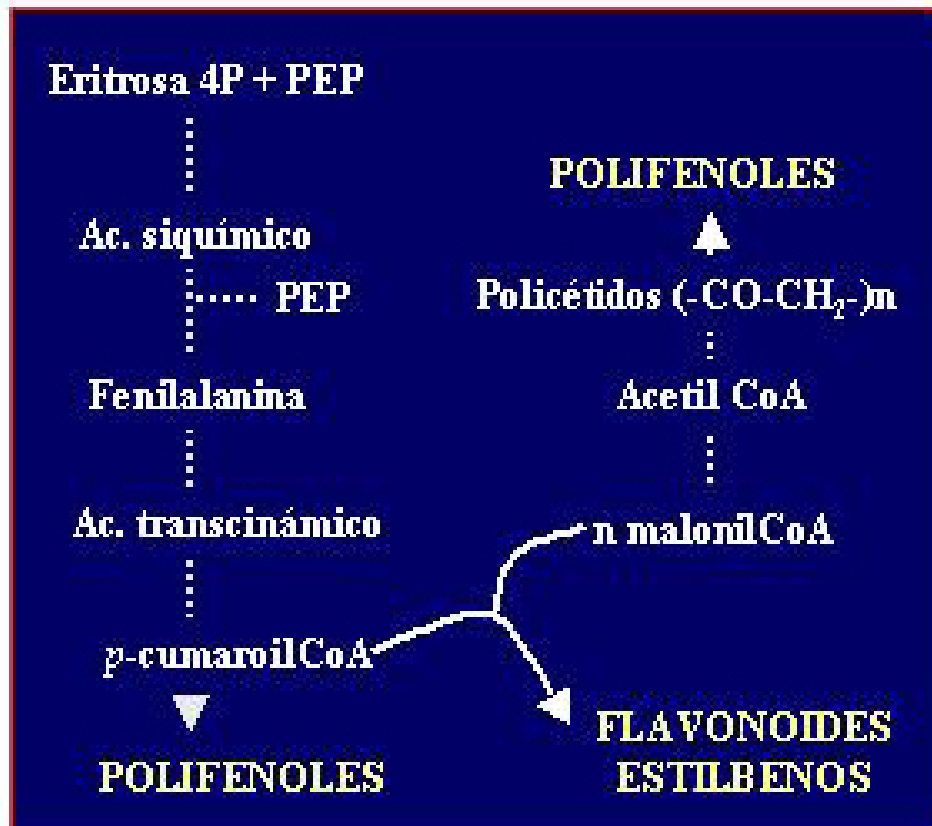
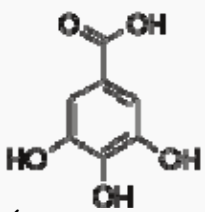
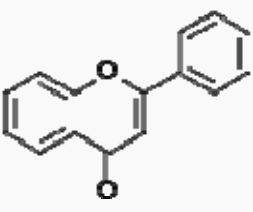
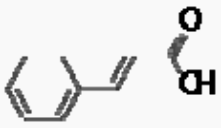


Figura 10 Biosíntesis de polifenoles en plantas (http://www.acenologia.com/figs55_ciencia2.htm)

B) Clasificación de los Polifenoles

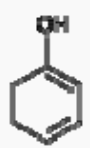
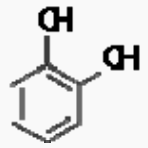
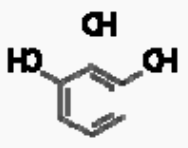
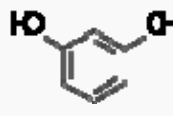
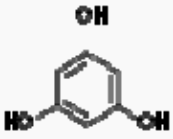

La subdivisión de polifenoles en taninos, ligninas y flavonoides se originan de la variedad de unidades simples polifenoles derivadas de los metabolitos secundarios de las plantas de la ruta del ácido siquímico así como en las divisiones clásicas basadas en la importancia relativa de cada componente base en los diferentes campos de estudio. La química de los taninos se originó debido a la importancia del ácido tánico para la industria del curtido; las ligninas por la química del suelo y la estructura de plantas; y los flavonoides por el estudio de los metabolitos secundarios de plantas que sirven como defensa de los vegetales y también forman parte del color de las flores y de las semillas por ejemplo las antocianinas, como se muestra en el siguiente cuadro:

Unidad base:	 Ácido gálico	 Flavona	 Ácido cinámico
Clase/Polímero:	Taninos hidrolizables	Flavonoide, taninos condensados	Ligninas

Cuadro 4 Antocianinas

(<http://es.wikipedia.org/wiki/Polifenol>)

Los polifenoles son también agrupados y clasificados por el tipo y número de subcomponentes fenólicos presentes, como se ve en el siguiente cuadro:

					
Fenol	Pirocatecol	Pirogalol	Resorcinol	Floroglucinol	Hidroquinona
Ejemplos: ligninas derivadas de ácido cumárico, kaempferol	Ejemplos: catequina, quercetina y ligninas derivadas de ácido ferúlico, ésteres de hidroxitirosol	Ejemplos: galocatequinas, taninos, miricetina, ligninas derivadas de alcohol sinapil	Ejemplos: resveratrol	Ejemplos: casi todos los flavonoides	Ejemplos: arbutina

Cuadro 5 Polifenoles clasificados por número y tipo de subcomponentes fenólicos.
(<http://es.wikipedia.org/wiki/Polifenol>)

La unidad fenólica puede ser esterificada o metilada. También se la puede encontrar dimerizada o polimerizada, creando una nueva clase de polifenol. Por ejemplo el ácido elágico es un dímero del ácido gálico y forma la clase de elagitaninos, o una catequina y una galocatequina pueden combinarse para formar el compuesto rojo teaflavina, proceso que puede resultar en la clase de tearubiginas marrones del té (ACE, 2010; Isaza, 2007; Dewick, P. M. 1995)

Se sabe que están presentes también en muchos granos aparte del té verde, frutas y verduras. En el caso de granos comestibles como el frijol se han encontrado: fenoles, antocianinas e isoflavonas (Isaza, 2007).

Los polifenoles naturales pueden ir desde moléculas simples (ácido fenólico, fenilpropanoides, flavonoides), hasta compuestos altamente polimerizados (ligninas, taninos). Los taninos se encuentran ampliamente en plantas vasculares, angiospermas asociados a tejidos maderables. Reaccionan habitualmente con las proteínas formando copolímeros insolubles en agua. Los taninos industriales son sustancias de origen vegetal que tienen habilidad para hacer entrecruzamientos con proteínas; por esta cualidad se utilizan en el curtido de pieles.

Químicamente hay dos tipos principales de taninos: taninos condensados y los hidrosolubles (Isaza, 2007).

Los flavonoides representan el subgrupo más común y ampliamente repartido y entre ellos los flavonoles. Al estar ampliamente distribuidos en el reino vegetal, constituyen parte integral de la dieta tanto en humanos como en animales (Dewick, 1995).

C) Características Químicas de polifenoles

Son grupos o tipos de fenoles que tienen como base una estructura polifenólica capaz de interactuar con las proteínas para formar complejos que tienden a ser más fuertes a medida que aumenta el peso molecular del polifenol. El complejo se forma entre los grupos –OH del polifenol y los grupos –CO de la uniones peptídicas de las proteínas (Mondragón y González, 1977). También otras macromoléculas como los carbohidratos y almidones de la pared celular forman

fácilmente éstos complejos fuertes y selectivos. Los compuestos fenólicos se encuentran en casi todo el reino vegetal estudiado; en su mayor parte en forma de glucósidos o ésteres. Estos fenoles resultan de sustituir átomos de hidrógeno del núcleo bencénico por grupos hidroxilo (-OH) (Esau, 1985; Davies, 1969).

Según sea el número de estos grupos que contengan el núcleo se clasifican en fenoles monovalentes, divalentes, etc. Los fenoles tienen la propiedad de dar productos coloreados con los agentes oxidantes, lo que se aprovecha para caracterizarlos. Así, por ejemplo, con soluciones de cloruro férrico dan coloraciones violetas, azules, verdes, rojas, etc. (Lenz, 1980).

Fenol. (C₆ H₅ – OH)

Es el más importante de los compuestos fenólicos y, también, se le llama ácido fénico, hidroxibenceno y ácido carbólico (carbo: carbón; óleum: aceite). Descubierta por Runge, en 1834 (Lenz, 1980).

El fenol es sólido, cristalino, incoloro, muy poco soluble en agua; soluble en alcohol, éter, cloroformo, glicerina, etc. Es muy corrosivo y venenoso. Expuesto a la luz y al aire adquiere color rojizo. Funde a 41° C, pero, pequeñas cantidades de agua abaten su punto de fusión y, por ello, suele encontrarse líquido en los laboratorios. Es un ácido débil, pues hasta el CO, lo desaloja de sus compuestos (fenatos), y por tanto, no ataca a los carbonatos. Se obtiene en grandes cantidades entre los productos de la destilación del alquitrán de hulla. También tiene gran demanda para la preparación de ácido pícrico o trinitrofenol (explosivo). Derivados de los fenoles más interesantes son los halogenados, los nitrados y los sulfonados. Se obtienen por acción directa de los halógenos, del ácido nítrico fumante, o del ácido sulfúrico concentrado, sobre los fenoles, con lo cual los correspondientes grupos entran a sustituir átomos de hidrógeno en el núcleo bencénico (Lenz, 1980).

Los compuestos fenólicos pueden clasificarse en tres grupos basándose en el número de anillos aromáticos de la molécula (Davies, 1969):

Fenoles con un anillo aromático.

Un ejemplo sencillo es el ácido gálico que está ampliamente distribuido en las plantas. El ácido gálico es un inhibidor del ácido – deshidrosiquímico – reductosa de las semillas del guisante y es posible que la producción de ácido gálico inhiba la formación del ácido siquímico y derivados.

Fenoles con dos anillos aromáticos.

Este grupo comprende los flavonoides, isoflavonoides y rotenoides. Todos los flavonoides contienen una unidad de diaril – propano ($C_6 - C_3 - O_6$) y se clasifican según la estructura del compuesto unido a la molécula en C3. Los anillos del benceno se denominan A y B; el anillo A, que generalmente responde al modelo hidroxilo del floroglucinol, forma un anillo de pírano con una unidad C_3 en las antocianidinas, y un anillo de pirona en las flavonas etc.

Compuestos fenólicos poliméricos.

Los Taninos.

El término tanino se acuñó históricamente por el uso empírico que se daba a algunos extractos vegetales para el proceso de tanaje o conversión de las pieles de animales en cuero desde hace más de cien años. El desarrollo de las modernas técnicas instrumentales para la elucidación estructural de sustancias orgánicas, permitió el inicio científico en el área de polifenoles vegetales, término sugerido por el doctor Edwin Haslam en lugar de taninos (Isaza, 2007). El término “Tanino” (sensu lato) involucra a un grupo diverso de compuestos fenólicos, solubles en agua, capaces de unirse a proteínas, dando como resultado la formación de complejos solubles e insolubles (Ricco *et al*, 2003).

Los Taninos son un grupo heterogéneo de compuestos polihidroxifenólicos cuyos pesos moleculares oscilan entre 600 y 2000 D se distinguen dos grandes grupos principales según su estructura química:

Los Taninos hidrolizables que por hidrólisis dan carbohidratos, generalmente glucosa, y ácidos fenólicos (por ejemplo, ácido gálico). Estos taninos pueden subdividirse en:

- 1) Galotaninos, por ejemplo los taninos Truco (*Quercus infectoria*) y de Zumaque (*Rhus coriaria*) en los que el ácido gálico es el principal compuesto fenólico producido por hidrólisis, y
- 2) Los elágitaninos, por ejemplo, mirobalanos (*Terminitia chebula*) que producen por hidrólisis ácido elágico y también ácido gálico.

Taninos no hidrolizables o condensados que contienen pocos carbohidratos y se convierten en flobafenos amorfos insolubles por la acción de los ácidos minerales. Los taninos condensados son polímeros de leucoantocianinas o de catequinas o polímeros de flavonoides mezclados.

Esta definición de los Taninos está de acuerdo con el punto de vista de White y define taninos utilizados en la industria (Davies, 1969). Cuando se le da un sentido botánico, el término tanino tiene un significado algo distinto refiriéndose a la sustancia astringente contenida en la nuez de agallas, en las cortezas de la encina, olmo, sauce y otros árboles, y en la raspa y hollejo de la uva y otros frutos (García, 2004). Las siguientes pruebas demuestran la presencia de taninos en las plantas:

1. El compuesto debe formar precipitados con la gelatina, alcaloides y formaldehído más ácido clorhídrico.
2. Absorberá fuertemente el polvo de la piel desecada.
3. Dará un color rojo al ser tratado con vainillina y un ácido fuerte.
4. A ser tratado con ácido en caliente dará un precipitado rojo.

5. Tiene un sabor marcadamente astringente, este le sirve a la planta como defensa pues evita que sean comidos por los insectos. Siguiendo estos criterios, las leucoantocianinas podrían ser responsables de muchas reacciones de los taninos (Davies, 1969).

D) Localización de Polifenoles

Los compuestos fenólicos se encuentran en casi todos los vegetales estudiados; en su mayor parte en forma de glucósidos o ésteres, como se mencionó en el apartado de polifenoles, se localizan distribuidos en toda la planta como metabolitos secundarios y se han encontrado en más del 60% de las especies vegetales donde se ha investigado su presencia. Los taninos son particularmente abundantes en las hojas de muchas plantas; en el xilema, floema y peridermis de tallos y raíces; aunque con frecuencia se piense que los flavonoides son pigmentos exclusivos de flores y frutos inmaduros; en la cubierta de las semillas; y en las excrecencias patológicas parecidas a agallas (Esau, 1993).

Sin embargo parece ser que ningún tejido carece completamente de taninos, y estos pueden ser identificados en las células meristemáticas. A veces las células que contienen tanino se hallan asociadas con haces vasculares y se presentan abundantemente en áreas donde el tejido vascular termina en tejidos de almacenamiento o en células secretoras de nectarios (Esau, 1993).

Los taninos pueden hallarse en células aisladas o bien en formaciones especiales denominadas sacos taníferos. Las células taníferas forman a menudo sistemas conectados. En las células individuales el tanino se encuentra en el protoplasto y también puede hallarse impregnando las membranas, como sucede en el tejido suberoso. Dentro del protoplasto, los taninos son ingredientes comunes de las vacuolas (Esau, 1993), o también pueden presentarse en el citoplasma propiamente dicho en forma de pequeñas gotitas, que eventualmente pueden fusionarse.

Los taninos se consideran como sustancias que protegen al protoplasto contra la desecación, putrefacción y destrucción por los animales (herbívoros); como sustancias de reserva relacionadas de manera no determinada con el metabolismo del almidón; como sustancias asociadas a la formación y transporte de azúcares; como antioxidantes; y como coloides protectores que mantienen la homogeneidad del citoplasma (Esau, 1993).

También los fenoles actúan como inhibidores del crecimiento de las plantas, aunque se han encontrado algunas estructuras, que de forma específica lo activan, al inhibir la degradación de una hormona vegetal que es la auxina. Particularmente, las semillas acumulan importantes cantidades de fenoles en sus cubiertas que actúan como un filtro para que el oxígeno no llegue al embrión, inhibiendo su germinación. Además, suelen acumularse en las capas más superficiales de los vegetales y captan hasta el 90% de las radiaciones UV, impidiendo los efectos nocivos de estas en los tejidos internos de la planta. Pero las acciones más características de estos compuestos son establecer relaciones químicas de las plantas con su entorno. Es decir las relaciones entre plantas, las relaciones con insectos o vertebrados y las relaciones con microorganismos. Los fenoles son componentes de esencias y pigmentos de las flores que confieren aromas y coloraciones atractivos de insectos, con lo que se favorece el proceso de floración, en las plantas polinizadas por insectos. Del mismo modo, los fenoles también confieren aromas y colores a los frutos que los hacen apetecibles para los herbívoros, con lo que se favorece la dispersión de semillas con las heces. Las plantas compiten entre ellas para preservar sus territorios y en esta lucha (alelopatía), participan los fenoles, como el ácido salicílico, que sintetizan algunas especies vegetales y son tóxicas para otras, impidiendo por ello su desarrollo. A nivel de microorganismos, las plantas se defienden del ataque de patógenos sintetizando fitoalexinas, mayoritariamente polifenoles, que son tóxicos para los microorganismos y su presencia previene las infecciones (Palazón *et al*, 2001).

También los compuestos fenólicos son algunas de las sustancias tóxicas más abundantes en las plantas. Se han hecho estudios en plantas que sirvieron como alimento a animales y que contenían altos compuestos fenólicos y otros ingredientes antinutricionales (Aw y Swanson, 1985). Como se mencionó antes, los taninos son compuestos fenólicos de alto peso molecular que, cuando se presentan en alimentos pueden causar alteraciones en el metabolismo. Los taninos junto con otros ingredientes de plantas (ácido fítico, ácido oxálico, glicosinolatos y gossipol), reducen la solubilidad en la interferencia de la utilización de los minerales, también éstas sustancias o compuestos inactivan o aumentan los requerimientos de algunas vitaminas: A, D, E y K, antivitaminas, tiamina, ácido nicotínico, piridoxina y cianocobalamina (Quintero *et al*, 2000).

Los compuestos fenólicos como los taninos condensados son algunas de las sustancias tóxicas más abundantes en las leguminosas tales como: frijol común, haba, garbanzo, lenteja, frijol soya y frijol caupí o chícharo salvaje. Dentro de este grupo, los taninos condensados son los más perjudiciales, desde el punto de vista nutricional, porque reducen el crecimiento en animales rumiantes y también la digestibilidad de la proteína y los aminoácidos. Además, provocan alteraciones en la absorción de azúcares y en la inhibición de enzimas digestivas, debido a que forman fácilmente complejos fuertes y selectivos con las proteínas y otras macromoléculas, como los carbohidratos y almidones de la pared celular (Scull y Savón, 2003).

Esta propiedad de los taninos condensados permite que puedan unirse a la fracción fibrosa y causar una sobreestimación de su contenido, por lo que en algunas especies de leguminosas es difícil distinguirlos de la lignina.

Scull y Savón (2003) mencionó que la gran diversidad de estos compuestos fenólicos dispersos en los tejidos vegetales y sus diferentes estructuras químicas han provocado el desarrollo de un gran número de técnicas analíticas para su identificación y cuantificación. Las espectroscópicas fueron las que primero se

desarrollaron, y aún son de gran utilidad, ya que brindan suficiente información nutricional. (Scull y Savón, 2003).

En la testa de las semillas también se pueden encontrar taninos. En las células del esclerénquima en empalizada constituido de células hexagonales, de paredes celulares gruesas y lignificadas, algunos autores han observado taninos. En las semillas frescas de *Phaseolus vulgaris* L., cultivar “Ojo de cabra”, Esquivel y colaboradores (1992), observaron taninos en el esclerénquima en empalizada tanto de la testa como de la zona hilar y también en las inclusiones del parénquima, sin embargo encontraron que hay frijoles que no presentan taninos por tener testa de color blanco como en el cultivar Michigan 800 (Fig. 6).

E) Funciones de los polifenoles en las plantas

Los fenoles desempeñan importantes funciones fisiológicas en los vegetales, en general y debido a su condición de polifenoles se oxidan con mucha facilidad y actúan como antioxidantes.

En el género *Vitis* este papel lo desempeña principalmente el resveratrol que es un estilbeno, mientras que en la mayoría del resto de vegetales las fitoalexinas son principalmente isoflavonoides.

También los fenoles protegen a las plantas generando sabores (principalmente amargos) o texturas (los taninos) que resultan desagradables para los herbívoros, por lo que este tipo de animales se nutren de otras plantas (ACE, 2010).

JUSTIFICACIÓN

El fenómeno del endurecimiento en *Phaseolus vulgaris* L. se atribuye generalmente a cambios físico-químicos y estructurales de las células cotiledonarias; sin embargo, la participación de la testa en el endurecimiento para cocción de los granos, involucra el incremento en la polimerización de fenoles durante el almacenamiento del frijol a alta humedad y alta temperatura. Existen estudios de la estructura de la testa, pero no están enfocados a determinar si realmente se presentan cambios estructurales en las inclusiones de los polifenoles de ésta para relacionarlos con el fenómeno del endurecimiento. En el presente trabajo se propuso cumplir con los siguientes objetivos.

OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERAL

Determinar los cambios morfológicos que presentan *in situ* las inclusiones de polifenoles en la testa de *Phaseolus vulgaris* L. cultivar Flor de Junio, durante el fenómeno del endurecimiento y su reversión.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el contenido de humedad en semillas de *Phaseolus vulgaris* L. frescos recién cosechados.
- Evidenciar la presencia y tipo de polifenoles que se encuentran en la testa de semillas frescas de *P. vulgaris* L.
- Conservación de las semillas de frijoles en estado fresco.
- Lograr el endurecimiento acelerado de los frijoles sometidos a alta humedad y alta temperatura durante: mes y medio y tres meses.
- Lograr la reversión de las semillas de frijoles sometidos a endurecimiento acelerado, manteniéndolos a alta humedad y baja temperatura.
- Determinar los tiempos medios de cocción (T_{50}) en semillas de frijoles endurecidos y en semillas con reversión del endurecimiento.
- Determinar la relación entre los cambios morfológicos de las inclusiones de polifenoles en la testa con los tiempos medios de cocción (T_{50}) de semillas de frijoles frescos, endurecidos y sometidos a reversión del endurecimiento, tanto en estado seco como embebidos.

MATERIALES Y METODOS

Esta investigación se hizo con semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Flor de Junio de la región de Tecozautla, Hidalgo de la cosecha primavera-verano 1995. Primero se determinó el contenido de humedad de la semilla recién cosechadas y sometidas al secado (frescas), y después se trabajó con lotes de semillas en estado fresco (Testigos), endurecidas y sometidas a reversión del endurecimiento (Experimentales). Cada uno de estos los lotes fueron estudiados tanto en estado seco como embebidos en agua destilada y se procesaron para su estudio en microscopia fotónica después de someter los cortes a coloración de rutina y a pruebas histoquímicas y por último a las semillas de los mismos lotes se les determinó el tiempo de cocción. Fig. 12

METODO

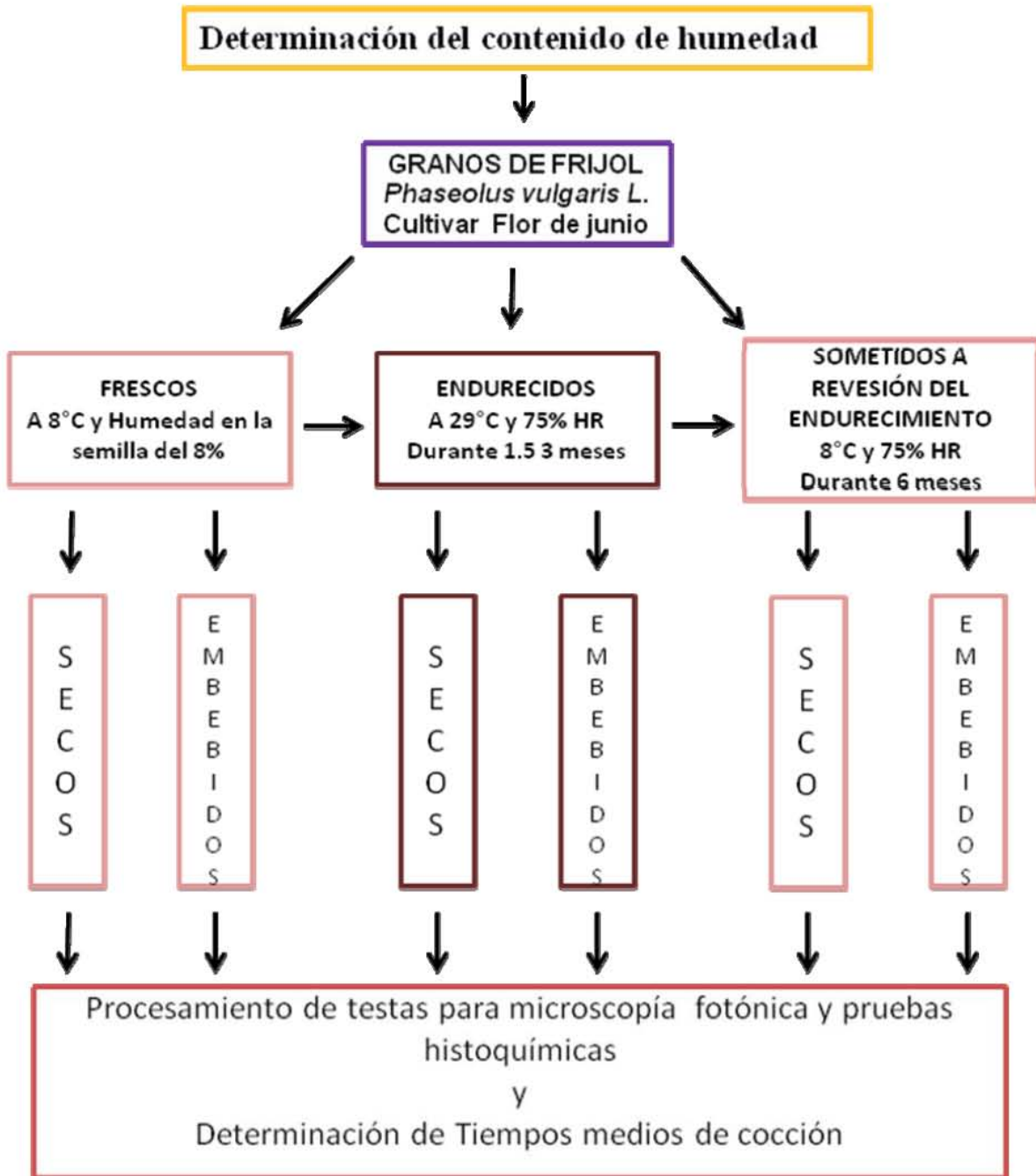


Figura 12 Diagrama general del método.

1) Método para la determinación del contenido de humedad en semillas

Para esta determinación se siguió el método descrito por Moreno (1984) Fig. 13:

1. Se utilizaron cajas de petri o de aluminio, verificando que las tapas sellaran perfectamente y que cada base de éstas coincidiera con la tapa del mismo número para no variar el peso al confundir las tapas.
2. Se colocó en cada caja 1 g de semillas manteniéndose a 130°C utilizando una Mufla hasta que el peso se mantuviera constante, las determinaciones se realizaron por cuadruplicado, Fig. 13.
3. La humedad se determinó de la siguiente forma:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_i(c+s) - P_f(c+s)}{P_f(c+s) - P(c)}$$

En donde:

P_i = Peso inicial

c = caja

s = semilla

P_f = peso final

P(c) = peso de la caja

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD DE LAS SEMILLAS



Figura 13 Método de determinación del contenido de humedad de las semillas

2) Método para la conservación de los frijoles Frescos

Después de la cosecha y secado las semillas fueron almacenadas en frascos herméticamente cerrados a 8°C con un contenido de humedad en el grano del 8% determinado como se mencionó en el punto 1 de la metodología y se les colocó una muñeca de Silica gel para evitar que se humedecieran, la cual fue cambiada frecuentemente. Muestras de estos granos fueron tomadas para el procesamiento de testas tanto las semillas secas como embebidas y se procesaron para su estudio en microscopía fotónica y para hacer las pruebas histoquímicas. Otras muestras de granos se tomaron también tanto secos como embebidos para la determinación de los tiempos medios de cocción (T_{50}).

3) Método de Endurecimiento acelerado

Para lograr el endurecimiento acelerado se utilizaron los dispositivos modificados por la Dra. Clara Esquivel Huesca en 1994 Fig.14. Se colocaron 2 lotes de semillas con cuatro frascos para cada lote. En cada uno se pusieron 125 semillas de frijoles en bolsas de malla de plástico, en total 500 semillas para cada lote y se mantuvieron en la boca del frasco con anillos de acero inoxidable que se sostenían a presión, de tal manera que nunca tocara la solución saturada de cloruro de sodio para lograr la humedad relativa al 75%, siguiendo el método descrito por Ramírez (1990, Fig. 14). Posteriormente estos frascos se colocaron en estufa a 29 °C, durante 1.5 y 3 meses; Lote I y lote II respectivamente Fig.15. Se estos lotes se tomaron muestras para el estudio de la microestructura y las pruebas histoquímicas.

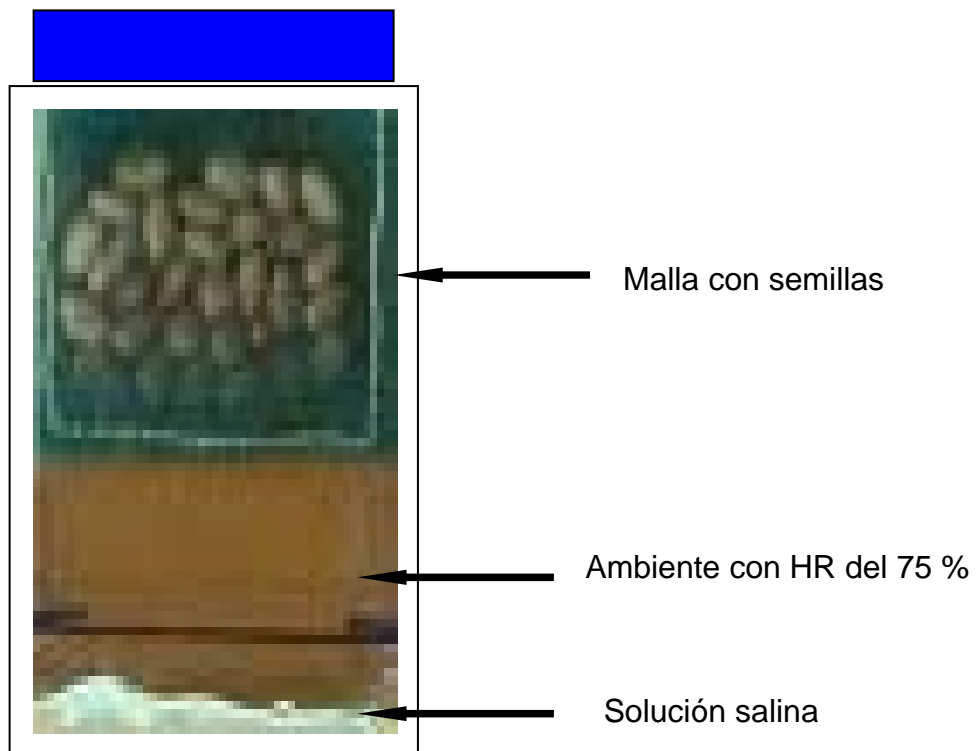


Figura 14. Recipiente para lograr el endurecimiento acelerado de las semillas y también para la posterior reversión del endurecimiento..

Método de Endurecimiento acelerado

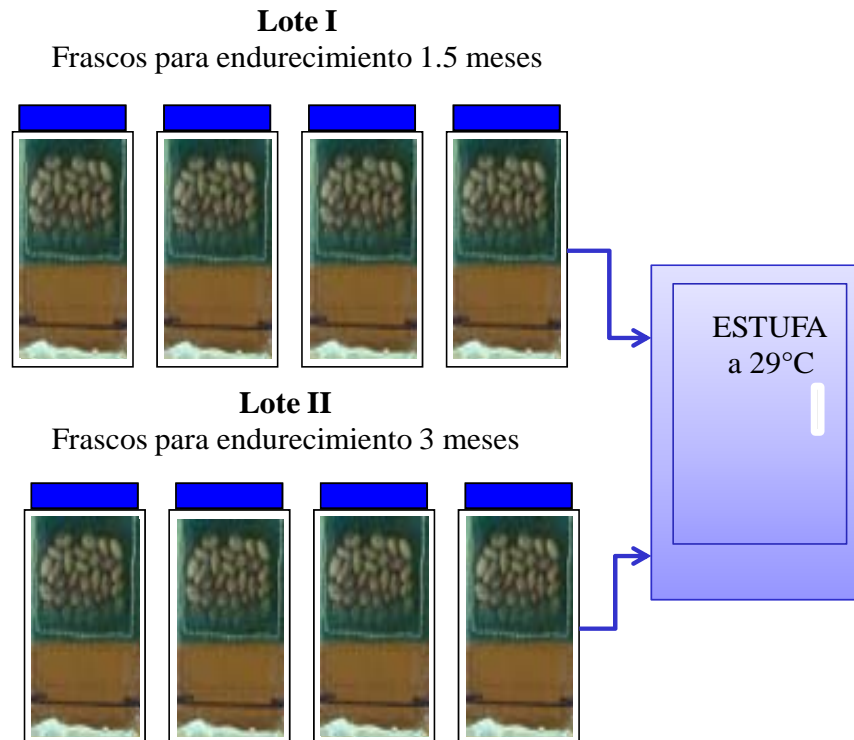


Figura 15 Metodología para lograr el endurecimiento acelerado
Lotes experimentales : Para endurecimiento de 1.5 meses y para 3 meses, con cuatro frascos para cada uno que contenían 125 semillas en total de 500 semillas para cada lote.

4) Método de Reversión del Endurecimiento

Para lograr la reversión del endurecimiento, los frascos con frijoles ya endurecidos por 1.5 y 3 meses, fueron colocados en refrigeración a 8 °C y a las mismas condiciones de humedad relativa (**HR 75%**) durante 6 meses, siguiendo el método y criterios de Ramírez, 1990 y Hentges, *et al*, 1990. Fig. 16.

Método de reversión del endurecimiento

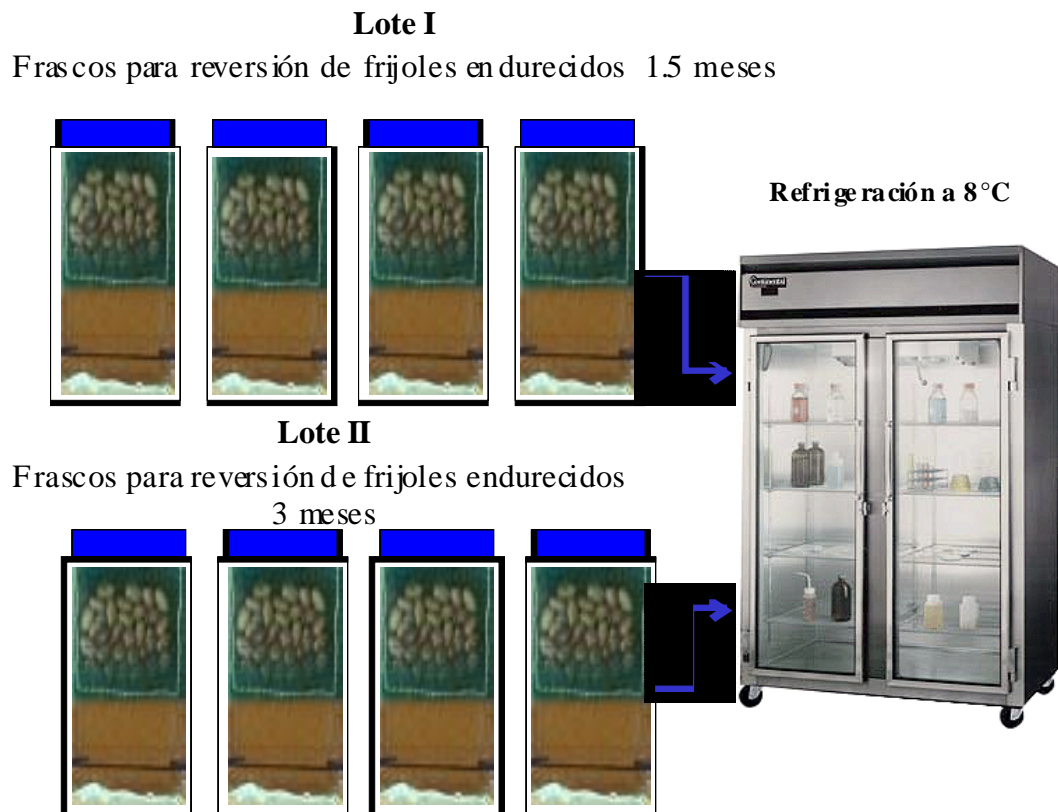


Figura 16 Método de reversión del endurecimiento

Lotes experimentales : **Lote I**, para reversión del endurecimiento acelerado de 1.5 meses y **Lote II** para reversión del endurecimiento acelerado de 3 meses. Cada uno de los frascos con 125 Semillas. Posteriormente se colocaron a 8°C y 75 % de humedad relativa.

5) Método de imbibición

Como se mencionó en los antecedentes, la imbibición de los granos para consumo humano implica el remojo, el cual se hizo embebiéndolos en agua destilada durante 24 horas y colocándolos en frascos de vidrio. Se les agregó el agua de tal forma que el volumen de ésta fuera el triple del volumen de los granos. Este método consistió en remojar 25 granos para colocarlos posteriormente en el cocinador Mattson (Fig. 17) y se hicieron cuatro repeticiones para después obtener los tiempos medios de cocción T_{50} .

6) Procesamiento de muestras para microscopía fotónica

Para estudiar los cambios morfológicos de las inclusiones de polifenoles en la testa del frijol, fue necesario tener como testigo las testas de frijoles en estado fresco seco y fresco embebido en agua destilada así como también en los lotes experimentales se tuvieron que comparar las testas de frijoles sometidos a endurecimiento y reversión del mismo, también en estado seco y embebidos.

Se sometieron a procesamiento muestras de testas de la parte meridional de los granos de frijoles de los siguientes lotes:

- Frijoles Testigos

Se mantuvieron los granos frescos, a 8 °C con una humedad en el grano del 8%.

Las testas de estos frijoles testigos en estado fresco secas, es decir, sin remojo previo a la cocción se denominaron (**TFs**), y testigos frescas y embebidas (remojadas durante 24 horas en agua destilada antes de la cocción). (**TFe**).

- Frijoles Experimentales endurecidos

Testas de semillas experimentales endurecidas durante mes y medio y tres meses a 29°C a HR del 75%: tanto experimentales secas (**Es**) como experimentales embebidas en agua destilada (**Ee**).

- Frijoles Experimentales sometidos a reversión del endurecimiento

Testas de granos sometidos a reversión del endurecimiento a 8°C con **HR** del 75%: tanto en estado seco, las cuales denominamos revertidas experimentales secas (**REs**) como las experimentales revertidas embebidas (**REe**) fueron cortadas en trocitos no mayores de 3mm y se sometieron al procesamiento para el estudio de su microestructura: siguiendo los pasos del método para inclusión de la muestras de testas en JB4 como se describe enseguida:

A) Fijación

Las muestras de testa de todos los tratamientos fueron fijadas por inmersión en Glutaraldehido-Paraformaldehido 3:1.5% con sacarosa 0.06 M en amortiguador de s-colidina 0.05 M a pH 7.2 durante 24 hrs. a 4°C.

B) Enjuague

Esta solución se preparó a partir de la solución madre de amortiguador de s-colidina 0.05 M a pH 7.2 diluyéndola volumen a volumen en agua destilada. Se realizaron seis enjuagues de cinco minutos cada uno y se procedió a hacer la deshidratación.

C) Deshidratación

Esta se hizo en acetona graduales: 30, 50, 70, 85, 96% durante 15 min en c/u y en acetona al 100% tres cambios de 15 min c/u.

D) Infiltración

Se realizó en la mezcla del Componente **A** de JB4 más catalizador durante 24h a temperatura ambiente.

E) Inclusión

Las muestras se incluyeron en la mezcla del componente **A** más catalizador y el componente **B** de JB4 en cápsulas de gelatina a temperatura ambiente.

F) Microtomía

Se hicieron cortes con cuchilla de vidrio en ultramicrotomo MT2B Sorvall DUPON Instruments entre 2 a 5 µm. Estos cortes se tiñeron con azul de toluidina y también se realizaron algunas pruebas histoquímicas.

G) Pruebas Histoquímicas

- a) Para detectar polifenoles.-Se hizo con Permanganato de Potasio al 2% en solución acuosa. Se colocaron varias gotas directamente sobre los cortes montados en los portaobjetos durante 15 min, por último se enjuagó por goteo con agua destilada. (Esquivel, 2010 en preparación)

- b) Para detectar taninos.-Se practicó la prueba de vainillina-HCl al 10% en etanol absoluto. Se colocaron gotas directamente sobre los cortes montados en los portaobjetos más gotas de HCl 6 M sobre cada corte y se enjuagó por goteo con agua destilada. (Esquivel, 2010 en preparación)

7) Determinación de los tiempos de cocción

Los tiempos medios de cocción (T_{50}) fueron determinados con un método homogéneo que consistió en utilizar una adaptación que hizo Esquivel *et al*, (1994) al aparato conocido como “Cocinador Mattson”. Fig. 17.

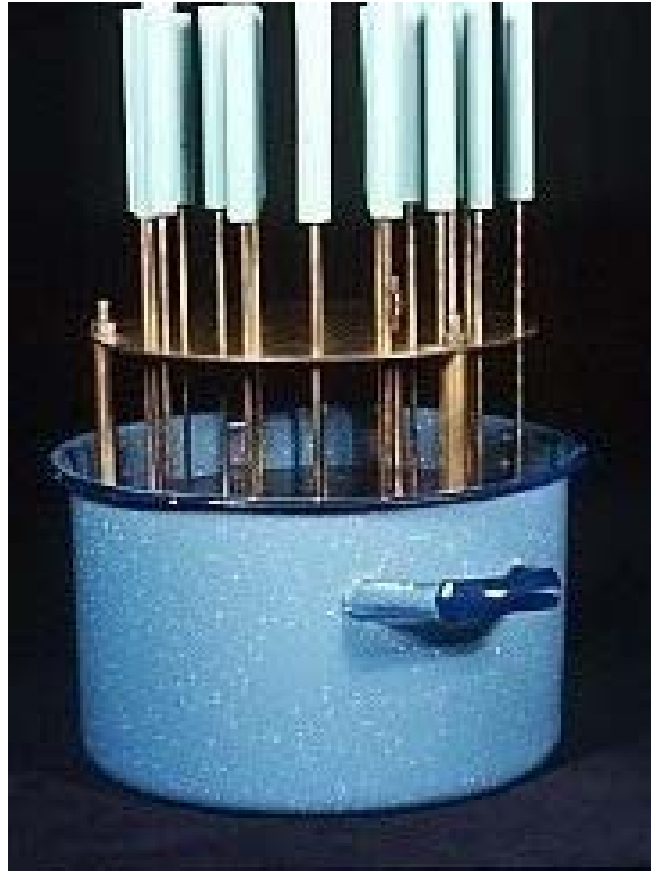


Figura 17 Cocinador Mattson en olla de peltre, modificado por Esquivel *et al* en 1994 para determinar los tiempos medios de cocción (T_{50})

Este cocinador Mattson modificado consiste de tres discos metálicos, sostenidos por tornillos o espárragos. Los dos discos superiores de lámina de latón de 1/16 de pulgada y un diámetro de 20 cm. El tercer disco de la parte inferior y de acero inoxidable, es del mismo diámetro que los superiores, pero de un grosor de ¼ de pulgada, este lleva 25 perforaciones de 3/8 de pulgada de diámetro superior y 5/12 de pulgadas de diámetro inferior, en estas se colocaron los frijoles y sobre ellos unas varillas de latón de 25 cm de largo y 1/8 de pulgada de diámetro con un extremo en punta y el otro redondeado. Las dos placas superiores también llevan 25 perforaciones que coinciden con las 25 de la placa inferior. A través de estas perforaciones se colocaron las varillas con la punta sobre las semillas y sobre su

extremo redondeado se colocaron contrapesos de hierro desmontables de 12 mm. de diámetro por 34 mm de largo y un peso de 82g. Fig. 18



Figura 18 Cocinador Mattson modificado por Esquivel en 1994 antes de introducirse en la olla de peltre. En la parte derecha se ve un acercamiento para mostrar los frijoles con las varillas sobre ellos.

En ollas de peltre se puso a hervir agua destilada. Los cocinadores Mattson que contenían las 25 semillas se introducían en el momento de ebullición, siendo este el tiempo inicial. Luego se determinaron los tiempos medios de cocción (T_{50}), es decir cuando el 50% de las varillas atravesaban los frijoles, indicando su cocción (Tiempo final = T_{50}). Estas pruebas se realizaron por cuadruplicado para obtener el promedio.

Los T_{50} se determinaron a los lotes: Testigos frescos secos (**TFs**), Testigos frescos embebidos (**TFe**), Experimentales secos (**Es**), Experimentales embebidos (**Ee**), Revertidos experimentales secos (**REs**) y Revertidos experimentales embebidos (**REe**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1) Descripción de la microestructura de la testa en frijoles frescos y pruebas histoquímicas para polifenoles

La microestructura de la testa de frijoles en estado fresco embebido en agua destilada por 24 h, se muestra en la Fig. 19 A en un corte transversal mostrando tres estratos de células que la conforman:

El primer estrato corresponde al esclerénquima en empalizada, tiene una sola capa de células de forma de prisma por el plano de corte y se ven rectangulares con un lumen triangular.

El segundo estrato está conformado por una capa de células conocidas como células reloj de arena. Son de forma prismática rectangulares y su lumen tiene forma de reloj de arena, de ahí su nombre. En este estrato se encuentran cristales de oxalato de calcio.

El tercer estrato corresponde al parénquima que es contiguo a los cotiledones, está formado por varias capas de paredes celulares en su mayoría sin el contenido celular y otras con inclusiones azul turquesa (después de la tinción con azul de toluidina) que corresponden a polifenoles de tipo taninos que fueron evidenciados por las pruebas histoquímicas como se describe más adelante, al igual que el contenido encontrado en el lumen triangular de las células del esclerénquima en empalizada y también con trazas de este contenido en las células reloj de arena.

La prueba histoquímica de permanganato de potasio para compuestos polifenólicos, dio positivo en el lumen triangular del esclerénquima en empalizada señalado con flecha (→) en la figura, algo del contenido de las células reloj de arena y en las inclusiones del parénquima Fig. 19 B.

En figura 19 C se muestran los resultados de la prueba histoquímica para detectar taninos en el lumen triangular del esclerénquima en empalizada, algo del

contenido del lumen de las células reloj de arena y en las inclusiones del parénquima, también señalado con flecha (→)

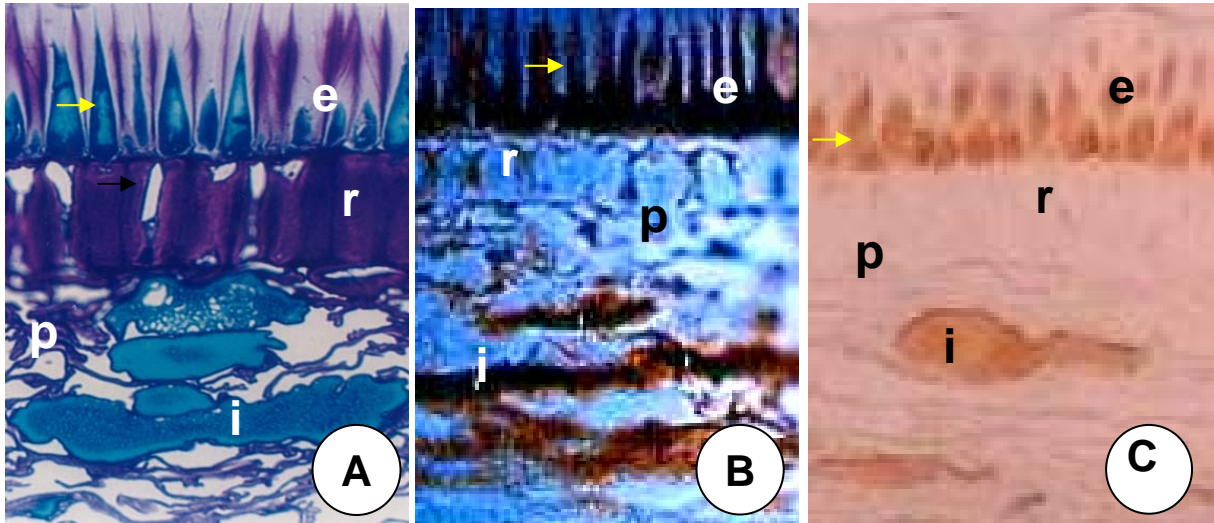


Figura 19. A Corte transversal de testa de semilla de *Phaseolus vulgaris* L. cultivar Flor de Junio, teñido con azul de toluidina donde se muestran sus tres estratos: el esclerénquima en empalizada (e), las flechas señalan los polifenoles en el lumen triangular; el estrato de las células reloj de arena (r) y el parénquima (p), en el que se ven las inclusiones (i) de los polifenoles en color azul en este corte y café oscuro en la prueba histoquímica de Permanganato de Potasio en B. Los polifenoles del tipo taninos los vemos con una coloración rojo ladrillo con la prueba de vainillina-HCl en C. 600X

En el presente estudio, se mostraron *in situ los polifenoles de tipo taninos*, por su reacción positiva a la prueba histoquímica con vainillina-HCl en las figuras anteriores y con estos resultados corroboramos que en el frijol Flor de Junio existen estos compuestos en el lumen triangular del esclerénquima en empalizada y en las i (inclusiones del parénquima).

2) Comparación de testas en estado fresco: secas y embebidas

Los resultados de la prueba histoquímica para polifenoles con permanganato de potasio de las muestras de testas de frijoles testigos frescos secos (**TFs**) y las de frijoles testigos frescos embebidos (**TFe**) los vemos en la figura 20 **A**. Con esta prueba histoquímica, en las **TFs** (20 **A**), fue positiva para polifenoles en el lumen triangular (flecha) del estrato de las células de esclerénquima en empalizada (**e**). En el siguiente estrato, es decir, el de las células reloj de arena (**r**), la reacción fue escasa. En las inclusiones (**i**) de las células del parénquima (**p**), la reacción fue marcadamente positiva: algunas inclusiones en color café oscuro, en otras este color sólo se observó en la periferia y en el interior un color ámbar. En la figura 20 **B**, en las **TFe**, debido a la imbibición se solubilizaron y se removieron los compuestos polifenólicos, aunque no en su totalidad. Al ser removidos estos polifenoles tiñeron todo este estrato en color café más tenue debido a su menor densidad y la solubilización. Se observa una reacción ligeramente positiva en el estrato de las células **r**, probablemente también a la solubilización y remoción de los polifenoles. En las inclusiones **i** del parénquima **p**, la prueba fue positiva solamente en algunas zonas debido a que con el remojo se removió gran parte del contenido de estas inclusiones.

Comparando las testas de las semillas en estado seco con las embebidas, el aspecto vítreo y la mayor densidad de las inclusiones del esclerénquima en empalizada de las semillas frescas secas desaparece por la remoción de los taninos hidrosolubles y solamente se observan los que no fueron removidos por el agua de imbibición (taninos condensados).

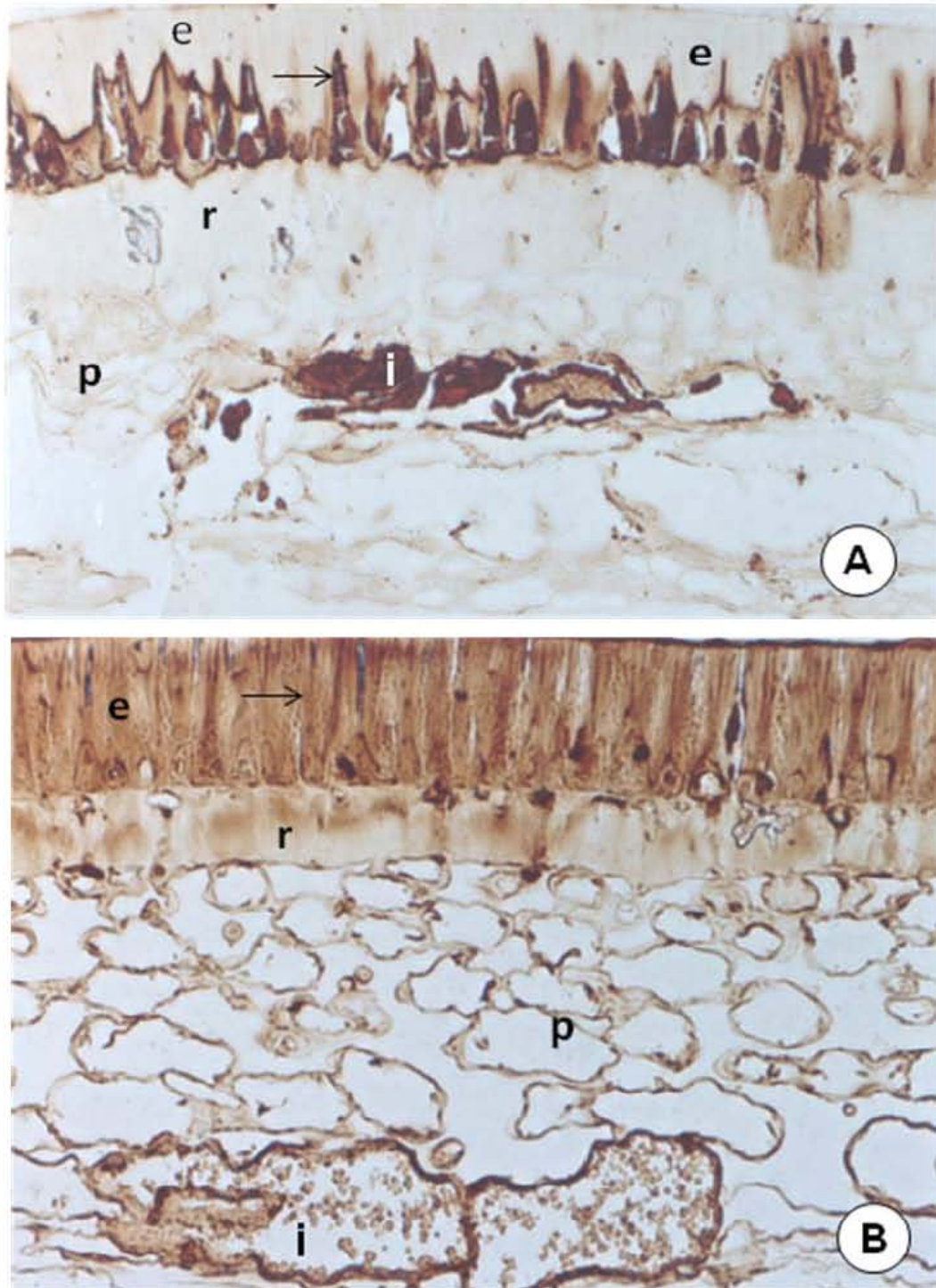


Figura 20. Reacción positiva al permanganato de potasio para detectar polifenoles en corte longitudinal de testas de semillas de frijoles testigos frescos secos (TFs), en: **A**; y en testas de frijoles testigos frescos embebidos (TFe) en **B**. El esclerénquima en empalizada (**e**), el estrato de células reloj de arena (**r**) y el parénquima (**p**) son mostrados. 400X

En estudios previos (Varriano-Marston y Jackson, 1981; Aguilera y Rivera, 1992; Tovar, 1997), mostraron que al ser removidos los polifenoles durante la imbibición y el hecho de eliminar el agua de remojo, sustituyéndola por agua limpia, dificulta o disminuye la esterificación de los compuestos fenólicos con los polímeros componentes de la pared celular, lo que facilita la suavización de los granos durante el proceso térmico (cocción) como se ve que coincide con los resultados obtenidos en el cuadro 6, donde se muestra la disminución de los tiempos de cocción.

Al revisar la literatura referente a la imbibición previa a la cocción (Desphande y Cheryan, 1986; Esquivel, *et al*, 1992; Esquivel *et al*, 1994; Tovar, 1997) no se encontraron resultados en los que se compare la microestructura de la testa de frijoles secos y embebidos, por lo que consideramos que en esta investigación los resultados hacen la primera contribución en este tipo de estudio.

3) Testas de semillas de frijol sometidas a endurecimiento acelerado

Los frijoles cultivar Flor de Junio sometidos a endurecimiento durante 1.5 y 3 meses de almacenamiento, estuvieron tan endurecidos que no fue posible obtener cortes completos; probablemente debido al estado vítreo que se presenta en algunos componentes como polifenoles y algunos azúcares que mellaban las cuchillas y al hacer los cortes sólo salían tiras de éstos, además quedaba flotando material granuloso en el agua de la barquilla de las cuchillas, por esta razón no se presentan sus micrografías.

Resultados semejantes a los de este estudio fueron reportados por Tovar (1997) quién trabajó con el mismo cultivar pero ella incluyó sus muestras en resina epóxica y reportó que la dureza se incrementa a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento, esto se manifestó como un aumento en la resistencia del tejido al corte, de tal manera que a partir de los tres meses de almacenamiento y

aún usando una cuchilla de diamante para realizar los cortes estos no se lograban obtener (Tovar, 1997).

4) Testas de semillas de frijol sometidas a endurecimiento acelerado y después a reversión: secas y embebidas.

En la figura 21 se muestran los cortes longitudinales de testas de frijoles sometidos a endurecimiento acelerado y después a reversión del endurecimiento: tanto las testas de frijoles en estado seco (**A** y **C**), como las de los embebidos (sometidos a remojo: **B** y **D**). En esta figura se muestran los resultados obtenidos de la prueba histoquímica con permanganato de potasio para polifenoles. En **A** se muestran las testas sometidas a 1.5 meses de endurecimiento acelerado y luego 6 meses de reversión en estado seco; debido a la dureza desarrollada por el tratamiento, solamente se pudieron obtener cortes en los que se observaron las inclusiones (**i**) del parénquima (**p**) evidenciando los polifenoles hidrosolubles y condensados, con su densidad y aspecto vítreo característico del estado seco. Analizando los tiempos de cocción que muestran la dureza en el cuadro 7, el tiempo para estos frijoles sometidos al tratamiento de reversión después de 1.5 meses de endurecimiento secos fue de 2.40 h, tiempo intermedio entre el obtenido para el de los testigos frescos secos de 2.21 h y los endurecidos secos (1.5 meses) sin reversión que fue de 2.60 h. Esto nos muestra que hubo una reversión parcial, porque este tiempo nunca igualó al de los testigos frescos secos.

En **B**, se muestra la imagen obtenida de la testa de 1.5 meses de endurecimiento acelerado y 6 meses de reversión y embebidas; mostrando los estratos del esclerénquima en empalizada (**e**) con rupturas señaladas con flecha (→); el de las células reloj de arena (**r**) y el parénquima (**p**) con sus las inclusiones (**i**). A pesar de que los tiempos de cocción del cuadro 7 no mostraron reversión, si se pudieron obtener los cortes en los que se evidenciaron los polifenoles condensados. Este resultado apoya lo dicho por Bernal-Lugo en 1994, que dijo que el proceso de remojo es independiente del proceso térmico al que se someten los frijoles durante la cocción; es decir que durante la imbibición en el remojo los

frijoles se reblandecieron, por eso si se pudieron obtener los cortes, pero al someterlos a la cocción, estos nuevamente se endurecieron probablemente debido a los eventos moleculares asociados al endurecimiento del frijol, donde los polifenoles pudieran jugar un papel importante al reaccionar con proteínas y con almidones los cuales pueden favorecer el fenómeno del endurecimiento durante la cocción, es de hacer notar que en los frijoles sometidos a reversión y embebidos el tiempo de cocción fue mayor (2.63 h) que en los testigos embebidos (1.20 h) y los endurecidos 1.5 meses y embebidos (1.86 h).

En la imagen de la figura **C**, se muestra el corte longitudinal de testa de frijoles sometidos a 3 meses de endurecimiento acelerado y 6 meses de reversión en estado seco. Aunque también con mucha dificultad como en el caso de los frijoles de 1.5 meses de endurecimiento secos, sí se lograron cortar los estratos, del esclerénquima en empalizada (**e**) y el de las células reloj de arena (**r**), pero se observa que hay rupturas en el esclerénquima en empalizada señaladas con flecha (\rightarrow). Tomando en cuenta los resultados obtenidos en este estudio, consideramos que estas rupturas se deben a que las testas de frijoles en estado seco son más duras (T_{50} 3.05 h) que las de los frijoles embebidos (T_{50} 3.66 h) correlacionándose con los resultados obtenidos en el cuadro 7. Se observan las inclusiones (**i**) del parénquima (**p**) con la prueba histoquímica de permanganato de potasio mostrando su positividad a los polifenoles hidrosolubles y condensados.

La figura **D**, muestra un corte longitudinal de testa de frijoles sometidos a 3 meses de endurecimiento acelerado y 6 meses de reversión y embebidos. Se observan bien conformados tres estratos de la testa de los frijoles; seguramente por la reversión del endurecimiento y la imbibición (T_{50} de 2.96 h en los endurecidos y de 2.66 h en los endurecidos y sometidos a reversión, lo cual mostró un 10 % de reversión, ver el cuadro 7) que contribuyen al reblandecimiento. La conservación de la morfología de los tres estratos de la testa sugiere que el tratamiento de reversión fue efectivo y además la prueba de permanganato de potasio mostró los polifenoles condensados. Comparando las testas de los frijoles secos de las micrografías **A** y **C** y las de los frijoles embebidos de **B** y **D**, es importante hacer notar que en los frijoles embebidos sí se lograron obtener los cortes del estrato del

esclerénquima en empalizada (**e**), sin embargo en los del estado seco fue muy difícil debido a que éste se rompía o se disgregaba al hacer los cortes por la dureza adquirida por los frijoles debido al tratamiento al que fueron sometidos, probablemente esto se puede atribuir a la mayor densidad y el estado vítreo que presentan los polifenoles. También se observó que en los cortes de testas de frijoles embebidos, el remojo remueve los taninos hidrosolubles, nótese las áreas claras en las inclusiones del parénquima y el color más claro en la zona de las inclusiones del lumen triangular del esclerénquima (**e**) donde fueron removidos los taninos hidrosolubles hacia el agua de remojo, pues ésta adquirió color café característico de ellos y también hacia el interior del frijol hacia los cotiledones, probablemente acelerando algunos procesos bioquímicos mencionados en otras investigaciones (Esquivel *et al*, 1992; González de la Concha, 1994; Tovar, 1997) y los que no se remueven son los taninos condensados.

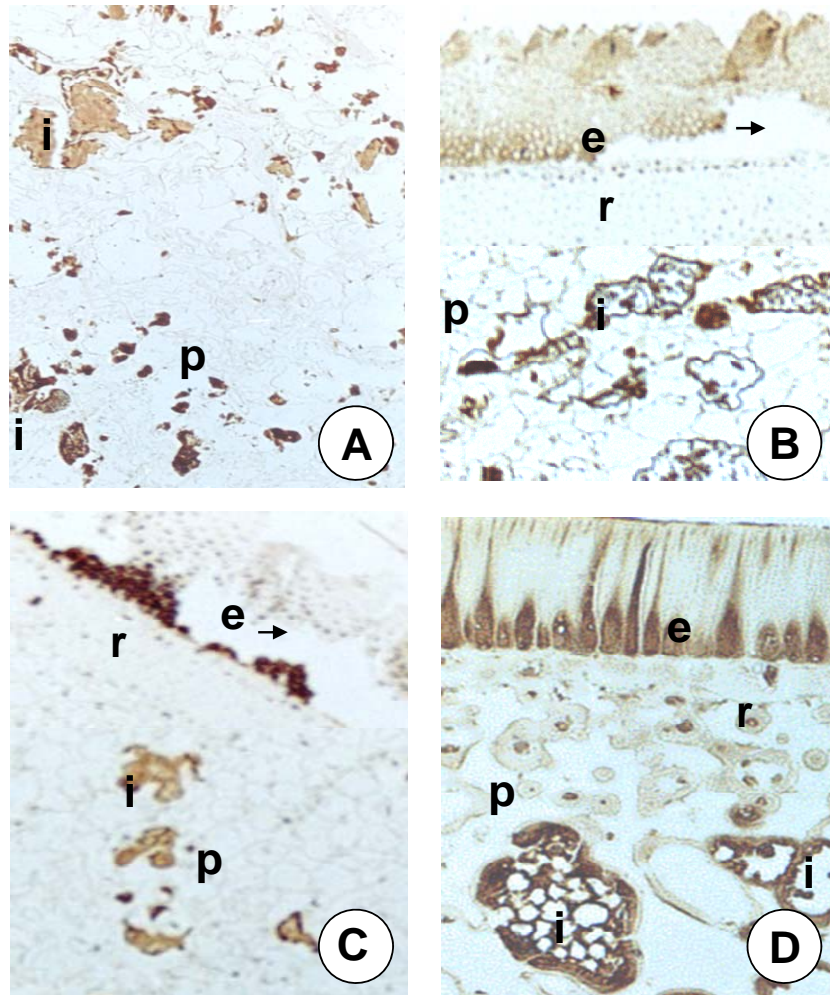


Figura 21 Polifenoles de las inclusiones en testas de frijoles sometidos a endurecimiento y después a reversión del endurecimiento en cortes después de la prueba con permanganato de potasio: **A**, 1.5 meses de endurecimiento acelerado y luego 6 meses de reversión en estado seco; **B**, 1.5 meses de endurecimiento acelerado y 6 de reversión embebidos; **C**, 3 meses de endurecimiento acelerado y 6 de reversión en estado seco y **D**, 3 meses de endurecimiento acelerado y 6 meses de reversión embebidos. En **B** y en **C** se muestran rupturas en el esclerénquima en empalizada (→). También se muestran los estratos: **e** : esclerénquima; **r** : células reloj de arena; y **p** : parénquima con sus inclusiones **i**.

Estos resultados coinciden con los obtenidos en estudios anteriores referentes a la reversión del endurecimiento de frijoles realizados por Hentges en 1990 y Tovar en 1997 y concuerdan con las conclusiones a las que llegaron estos autores; respecto a que es probable que los mecanismos que provocan el endurecimiento en los frijoles, no son los mismos que promueven su reblandecimiento; es decir, consideramos que son eventos independientes, porque probablemente, hay vínculos químicos y enzimáticos diferentes en cada uno de estos eventos, debidos al cambio de las condiciones de almacenamiento, nótese que en estas investigaciones incluyendo la de este estudio solamente se cambió la temperatura.

A continuación en el cuadro 6 se resumen los resultados obtenidos con la prueba histoquímica de permanganato de potasio para polifenoles en los frijoles; Testigos frescos; almacenados para endurecimiento durante 1.5 y 3 meses y los endurecidos (1.5 y 3 meses) y después sometidos al tratamiento de reversión del endurecimiento.

5) Pruebas histoquímicas para polifenoles en cortes de testa de *Phaseolus vulgaris* L.

En el siguiente cuadro se resumen los resultados obtenidos con la prueba histoquímica para polifenoles. En general se observó que los polifenoles hidrosolubles fueron removidos durante el remojo y solamente se observaron en los cortes los polifenoles condensados, tanto en los lotes testigos como en los experimentales.

Tratamiento del grano	Secos (sin remojo)	Remojados (embebidos)
Testigos Frescos	Polifenoles: Hidrosolubles y condensados	Polifenoles Condensados
Almacenados 1.5 meses para endurecimiento	No fue posible obtener cortes	No fue posible obtener cortes
3 meses de almacenamiento para endurecimiento	No fue posible obtener cortes	No fue posible obtener cortes
Almacenados 1.5 meses para endurecimiento y 6 meses de reversión	Polifenoles: Hidrosolubles y condensados	Polifenoles Condensados
3 meses de almacenamiento para endurecimiento y 6 meses de reversión	Polifenoles: Hidrosolubles y condensados	Polifenoles Condensados

Cuadro 6. Resultados de la prueba para polifenoles

6) Tabla de los tiempos de cocción

En cuadro 7 se muestra la calidad de cocción de los frijoles (tomando en cuenta la textura, suavidad y palatabilidad) con los registros de los T_{50} (tiempos medios de cocción), en frijoles que fueron sometidos a dos condiciones de almacenamiento: 1) para endurecimiento acelerado y 2) reversión del endurecimiento y a dos tratamientos previo a la cocción: en estado seco y embebidos.

TIEMPOS MEDIOS DE COCCIÓN (T_{50})

Calidad de cocción de Frijoles del cultivar Flor de Junio sometidos a dos condiciones de almacenamiento: para endurecimiento acelerado y la reversión del endurecimiento.						
Tiempo medios de cocción (h)¹						
Tratamiento del grano	Sin remojo (secos)			Remojados con Agua destilada (embebidos)		
Testigos (Frescos)	2.21			1.20		
Condición de grano/ t de almacenamiento	end ²	rev ³	rev [%]	end ²	rev ³	rev [%]
1.5 meses de end. acelerado	2.60	2.40	7.6	1.86	2.63	*141
3 meses de end. acelerado	3.25	3.05	6.1	2.96	2.66	10

t tiempo

end endurecimiento

rev reversión

¹ Promedio de cuatro repeticiones

² Lotes de frijoles almacenados a 29° C de temperatura y 75% de Humedad Relativa (HR)

³ Lotes de frijoles almacenados a 8° C de temperatura y 75 % de HR, durante 6 meses.

% de reversión, tomado como 100% el T_{50} de los frijoles endurecidos.

*Nótese que no hubo reversión, al contrario hubo aumento del tiempo de cocción

Cuadro 7 Tabla de los tiempos medios de cocción.

A) Frijoles secos

- El aumento del tiempo de endurecimiento acelerado es proporcional al tiempo de cocción; conforme aumenta el tiempo de almacenamiento (t) aumenta el T_{50} , comparado con el de los testigos frescos secos.
- Las condiciones para reversión (6 meses de almacenamiento a 8°C de temperatura, humedad relativa del 75%) mostraron su efectividad con la disminución de los T_{50} comparándolos con los de los frijoles endurecidos, sin embargo, estos fueron mayores al compararlos con los testigos frescos secos.
- El porcentaje de reversión mostró que hubo reversión parcial reflejada en la disminución de los tiempos de cocción, pero estos nunca se igualaron a los de los testigos frescos.

B) Frijoles sometidos a imbibición

- El aumento del tiempo para lograr el endurecimiento acelerado también fue proporcional al aumento en el tiempo de cocción, comparado con el de los testigos frescos embebidos.
- No hubo reversión en los frijoles endurecidos por 1.5 meses, nótese en el cuadro 7 que el dato del T_{50} de los frijoles sometidos a condiciones de reversión fue mayor (2.63 h) que el de los endurecidos y embebidos (1.86 h) y que el de los testigos embebidos (1.20 h). Sin embargo, en el caso de los frijoles endurecidos durante 3 meses, si se nota la reversión, pues el dato del T_{50} fue menor (2.66 h) que el de los endurecidos durante los 3 meses y embebidos (2.96), aunque no menor que el de los testigos embebidos (1.20h).
- El porcentaje de reversión en los frijoles sometidos a endurecimiento durante 1.5 meses, se incremento en 41% (2.63 h) arriba del 100% representado por el tiempo de cocción de los frijoles endurecidos embebidos (1.86h); en vez de ser menor, sin embargo en los frijoles almacenados durante 3 meses de endurecimiento acelerado el T_{50} sí disminuyó de 2.96 h a 2.66 h, es decir hubo un porcentaje de reversión del 10%.

C) Frijoles secos comparados con los Frijoles embebidos

- El T_{50} de los testigos frescos secos (2.21 h) fue mayor que el de los frescos embebidos (1.20); es decir que la dureza disminuye con el remojo.
- Los T_{50} de granos de frijol sometidos a endurecimiento acelerado durante 1.5 y 3 meses fueron mayores en seco (2.60 h y 3.25 h) que los de los embebidos (1.86 h y 2.96 h).
- Los T_{50} de granos de frijol sometidos a reversión después del endurecimiento durante 1.5 meses fue mayor en los embebidos (2.63 h) que en los secos (2.40 h), contrario a lo que se esperaba: que disminuyera el tiempo de cocción con el remojo. El aumento fue del 41%, es decir no hubo reversión.
- Los T_{50} de granos de frijol embebidos sometidos a reversión después del endurecimiento durante 3 meses (2.66 h) fue menor que en los secos (3.05 h), es decir que se notó el reblandecimiento por haber sometido los granos a la reversión, el porcentaje de reversión fue de 10%.

CONCLUSIONES

- Se propone que los polifenoles de tipo taninos están relacionados con el fenómeno del endurecimiento y con su reversión, porque existen cambios cualitativos en la morfología de las inclusiones de los polifenoles de la testa (aumento o disminución en la densidad, un aspecto vítreo y por su movilización durante la imbibición) tanto de los frijoles secos como embebidos, ya sean endurecidos o los sometidos a reversión del endurecimiento.
- Tanto en frijoles frescos como endurecidos y sometidos a reversión del endurecimiento, la imbibición remueve solamente los taninos hidrosolubles de la testa en el lumen triangular del esclerénquima en empalizada, en las células reloj de arena, y en las inclusiones del parénquima.
- El endurecimiento de los frijoles es proporcional al tiempo de almacenamiento en alta humedad (75% de HR) y alta temperatura (29°C).
- El endurecimiento es más drástico en frijoles al mes y medio, que a los tres meses, aunque se sometan a reversión lo cual se reflejó en los T_{50} .
- Después de tres meses de endurecimiento acelerado y seis de reversión en frijoles embebidos hay reparación de los componentes celulares de la testa.
- La reversión y la imbibición contribuyen al reblandecimiento después de 3 meses de endurecimiento acelerado y seis de reversión, más no, en los de mes y medio de endurecimiento acelerado y seis de reversión.
- La reversión solamente fue parcial en los frijoles sometidos a endurecimiento y también en los que se sometieron a reversión después de endurecidos, pues nunca se igualaron los tiempos de cocción con los

obtenidos en los frijoles testigos frescos tanto en estado seco como embebidos.

PROPUESTA PARA ESTUDIOS FUTUROS

En este trabajo se mostraron "*in situ*" los polifenoles hidrosolubles y condensados de la testa con pruebas histoquímicas y también se determinó que fueron del tipo taninos. Se propone para estudios futuros hacer un estudio químico en el que se determinen los polifenoles tanto en testas como en cotiledones haciendo los mismos tratamientos con el propósito de correlacionar los estudios químicos con los obtenidos en este estudio.

También sería útil un estudio a nivel de ultraestructura utilizando microscopía electrónica de transmisión con pruebas citoquímicas específicas para polifenoles tanto hidrosolubles como condensados y los de tipo taninos.

BIBLIOGRAFIA

ACE [Acenología. Revista de Enología Científica y Profesional]. 2010. Esquema de la biosíntesis de polifenoles en plantas. Ciencia y Tecnología. Núm 117. Página en red: <http://www.acenologia.com/index.htm> [02 /07/2010]

Aguilera J. M., and A. Ballivian. 1987. A kinetic interpretation of textural changes in black beans during prolonged storage. Journal of Food Science. 52: 691-695

Aguilera J. M, and R. Rivera. 1992 Hard to cook defect in black beans; hardening rates, water imbibition and multiple mechanism hypothesis, Food Research International 25: 101 – 108.

Allende, A., G., Acero, G., M. G., Padilla, R., J. S., Mayek, P., N. 2006. Comportamiento agronómico y características físico-químicas del grano de frijol en Aguascalientes. Rev. Fitotec. Méx. 29(1):89-93.

Arbo, M. M. y González, A. M. 2010. Morfología de Plantas vasculares. Botánica Morfológica. Hipertextos del Área de Biología. Página en red: <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema7/7-2pared1.htm>. [01/07/2010]

Aw, T. L. and Swanson, B. G., 1985. Influencia de taninos en la digestibilidad y calidad de proteína de *Phaseolus vulgaris*. Journal of Food Science. 5:67-75.

Bernal-Lugo, I., G Prado C. Parra E. Moreno, J. Ramírez, and Velazco. 1990 Phytic acid hydrolysis and bean susceptibility to estorage induced hardening Journal of Food Biochenistry 14: 253 – 261

Bernal-Lugo I, and A. Leopold, 1992a. Changes in soluble carbohydrates during seed storage. Plant Physiol. 98: 1207-1210.

Bernal-Lugo I., A. Castillo., F. Díaz de León, E. Moreno, and J. Ramírez. 1992b. Does phytic acid influence cooking rate in common beans. *Journal of Food Biochemistry*. 15: 367-374.

Bernal-Lugo I. 1994. Eventos moleculares asociados al endurecimiento del frijol. Cuadernos posgrado Fac. de Química UNAM México 129-141.

Biosíntesis de polifenoles en plantas

http://www.acenologia.com/figs55_ciencia2.htm

[03/11/2010]

Bressani, R. 1982. Introducción al simposio sobre el problema de endurecimiento del frijol. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 32 (2): 215-216.

Brett, C., and Hillman, J. R. 1985. *Biochemistry of plant cell walls*. Cambridge University Press. London.

Burr, H. J., Kon, S. y Morris , H. J. 1968. Cooking rates of dry beans as influenced by moisture content, temperature and time storage. *Food Technology*. 23:336-338.

Burke, M. 1986. The glass state survival of the anhydrous biological sistem In: C. Leopold "Membranes, metabolism and dry organism" Ithaca; Cornell University Press. 358-363.

Carmona, V. G. 2007. Factores de calidad, almacenamiento y efecto de endurecimiento en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Página en red: [http://www.mercanet.cnp.go.cr/Calidad/Poscosecha/Investigaciones/Granos B%E1sicos/frijol.htm#FRIJOL1](http://www.mercanet.cnp.go.cr/Calidad/Poscosecha/Investigaciones/Granos_B%E1sicos/frijol.htm#FRIJOL1) [19/09/2007]

Casanueva, H. 2005. Contigo arroz y frijol. Cuadernos de Nutrición. 28(3): 125-135.

Castillo, M. M., Ramírez, V. P., Castillo, G. F., Miranda, C. S., 2006. Diversidad morfológica de poblaciones nativas de frijol común y frijol ayocote del oriente del Estado de México. Rev. Fitotec. Méx. 29(2): 11-119.

Cronquist, A. J. 1981. And integrated system of classification of flowering plants. Columbia Univ. Press. New York. 1262p.

Davies, D. D. 1969. Bioquímica vegetal. Omega. Barcelona. 504p.

Del Pino, V. H. y Lajolo, F. M., 2003. Efecto inhibitorio de los taninos del frijol carioca (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre la digestibilidad de la faseolina por dos sistemas multienzimáticos. Cienc. Technol. Aliment., Campinas 23(1): 49-53.

Desphande S. and M. Cheryan. 1986. Microstructure and water uptake of phaseolus and winged beans Journal of Food Science. 51: 1218 – 1223.

Dewick, P. M. 1995. *The Biosynthesis of Shikimate Metabolites*, Natural Product Reports 12:579-607. Página en red:

["http://es.wikipedia.org/wiki/Polifenol"](http://es.wikipedia.org/wiki/Polifenol), [30/07/2010]

Díaz de León, F. 1989. Relación entre el grado de metilación de la pectina y el tiempo de cocción en algunas variedades de frijol. Tesis Licenciatura. Fac. de Ciencias UNAM.

Díaz, M. F., Padilla C., Verona T., González A., Noda , A. 2003. Caracterización bromatológica de especies y variedades de leguminosas temporales con posibilidades en la alimentación animal. Rev. Cubana. Ciencia Agrícola. 37. (4): 453-457.

Engleman, M. 1979. Contribuciones al conocimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en México. Colegio de Posgraduados. Chapingo, México. 140 p.

Esau K. 1985. Anatomía vegetal. Omega. Barcelona. 780p

Esau K. 1993. Anatomía de las plantas con semilla. Ed. Hemisferio sur. Uruguay. 512p.

Estructura tridimensional de un fenol simple y un polifenol.

http://www.acenologia.com/figs55_ciencia2.htm

[03/11/2010]

Esquivel, H. C., López L. Márquez G. J. Mateos G. and Bernal-Lugo I. 1992 Chemical composition and structure of two Mexican bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars in relation to cooking time. *Pyton* 53: 143-153.

Esquivel, H. C., Tovar M. E. y Márquez-Guzmán, J. 1994. Análisis Estructural de la Reversión del Fenómeno del Endurecimiento en *Phaseolus vulgaris* L. VI Congreso Latinoamericano de Botánica. Mar de Plata, Argentina.

Esquivel, H. C., 2004. Microtomía y tinción simultáneas en resina hidrofílica: LRWhite. XXVIII Congreso Nacional de Histología. Ponencia UAM Iztapalapa, México, D.F.

Esquivel, H. C., Zarzosa, P. A. y Govea, A. G. 2010. El ABC de la microtecnia para microscopía. Las prensas de Ciencias. Facultad de Ciencias, UNAM *en vías de publicación*.

FAO [Organización para la Agricultura y la Alimentación], 2009. Monografía del frijol. Páginas en red:

<http://faostat.fao.org> Consulta de bases de datos de producción mundial y comercio internacional de frijol.

<http://portal.veracruz.gob.mx/pls/portal/docs/PAGE/COVECAINICIO/IMAGENES/ARCHIVOSPDF/ARCHIVOSDIFUSION/MONOGRAFIA%20FRIJOL2010.PDF>
[03/11/2010]

Flor y vainas de frijol. Imágenes.

(http://3.bp.blogspot.com/_jPEmqjRT1uo/R8C438zFxzI/AAAAAAAAA5UQ/CvYtRGr g1aU/s200/Ejotes.jpg)

García, D. E. 2004. Principales factores antinutricionales de las leguminosas forrajeras y sus formas de cuantificación. *Pastos y Forrajes.*, 27. (2): 101-116.

García-Vela L. and Stanley. D. W. 1989a. Water holding capacity in hard to cook beans (*Phaseolus vulgaris*): effect of ph and ionic strength. *Journal of Food Science* 54: 1080 – 1081.

García-Vela L. and Stanley. D. W. 1989b. Protein desnaturalization and starch gelatinization in hard to cook beans. *Journal of Food Science.* 54: 1284 – 1286

Germinación y crecimiento de la plántula del frijol. Imágenes

<http://picsdigger.com/keyword/germinacion%20del%20frijol>
[27/10/2010]

Germinación del frijol. Izquierda. Imagenes

http://commons.wikimedia.org/wiki/file:Stamboon_poortg.jpge y
http://commons.wikimedia.org/wiki/file:Stamboon_poortg.kiemplnat.j

González de la Concha S. 1994. Efecto del deterioro en los niveles de biomoléculas que participan en la protección del estado seco de la semilla (*Phaseolus Vulgaris*). Tesis de Maestría. Fac. Ciencias. UNAM

Guzmán M., S. H., Acosta G., J. A., Álvarez M., M. A., García D., S., Loarca P., G. 2002. Calidad alimentaria y potencial nutracéutico del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Agric. Tec. Méx. 28(2): 159-173.

Hall, J., T. Flowers and R. Roberts. 1984. Plant cell structure and metabolism. Longman. New York.

Hentges D. L. Weaver C. M. and S. S. Nielsen. 1990. Reversibility of the hard to cook defect in dry beans (*Phaseolus vulgaris*) and cowpeas (*Vigna unguiculata*). Journal of Food Science. 55(5): 1474-1476.

Hentges D. L. Weaver C. M. and S. S. Nielsen. 1991. Changes of selected physical and chemical components in the development of hard to cook bean defect. Journal of Food Science. 56: 436 – 442.

Hincks M. J. and D. Stanley. 1986. Multiple mechanisms of bean hardening. Journal of Food Technology. 21: 731-750

Hincks, M., Mc Cannel, A., and Stanley, D. 1987 Hard to cook defect in black beans. soaking and cooking processes. J. Agric. Food Chem. 35(4) 576-583.

Hojas trifoliadas del frijol. Imágenes.

<http://www.deperu.com/imagenes/?pal=frijol>

[23/06/2010]

Iniestra G., J. J., Ibarra P., F. J., Gallegos I., J. A., Rocha G., N. E. y González L., R. F. 2005. Factores antinutricionales y actividad antioxidante en variedades mejoradas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*). *Agrociencia.*, 39. 6: 603-610.

Isaza M. J. H., 2007. Taninos o polifenoles vegetales. *Sciencia y Technica.* 33:13-18.

Jackson M., and E. Varriano – Marston. 1981. Hard to cook phenomenon in beans: effects of accelerated on water absorption and cooking time, *Journal of Food Science* 46: 799 – 903

Jaffé, W. G., Flores, M. E. 1974. La cocción de frijoles, (*Phaseolus vulgaris*). *Arch. Latinoamer. Nutr.* 79-90.

Karp G. 1993. *Biología Celular.* McGraw-Hill. México.

Lenz R., A. 1980. *Química orgánica elemental.* Ed. Patria. México. 552 p.

Liu K., R. Dixon H. Yen, R. Shewfelt, and K. Mc Watters. 1992. Hard to cook defect in cowpeas: storage – induced and treatment-induced development. *Journal of Food Science.* 57 (5): 1155-1160.

Mateos C., G. C. 1991. Estructura e histoquímica de la semilla madura de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. con 50 % de imbibición, en relación al fenómeno de endurecimiento. Tesis de Licenciatura. Fac. de Ciencias. UNAM.

Mc Donald M., C. Vertucci, and E Roos. 1988. Seed coat regulation of soybean seed imbibitions. *Crop Science* 28: 987 – 992.

Molina M., M. G. de la Fuente, and R. Bressani 1975. Interrelationships between storage, soaking time, cooking time, nutritive value and other characteristics of the black bean (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Food Science* 40: 587 – 591.

Molina M., M. Baten, R. Gomez-Brenes, K. King, and R. Bressani. 1976. Heat treatment; a process to control the development of the hard to cook phenomenon in black beans (*Phaseolus vulgaris*) *Journal of Food Science*. 41: 661-666.

Mondragón, M. C. y González, D. I. 1977. Caldos de frijoles en relación a su contenido de aminoácidos y polifenoles. *Arch. Latinaomer. Nutr.* 41-62.

Moreno, E. 1984. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Instituto de Biología. UNAM. México.

Müntz, K. 1982. Nucleic Acids and proteins in plants I structure, Biochemistry and physiology of proteins. *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series.* 14 A. Sringer-Verlang. New York.

Osorio D, P., Méndez M., G., Agama A., E., Islas H., J. J., Sánchez M., J. y Belo P. L. A. 2003. Biodisponibilidad del almidón en dos variedades comerciales de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y en frijoles industrializados. *Agrociencia* 37: 565-573.

Palazón J., Cusidó R. M. y Morales C. 2001. Metabolismo y significación biológica de los polifenoles del vino. **ACE** Rev. de Enología. 9: 1-8. Página en red: http://www.acenologia.com/ciencia55_2.htm [24/03/2010]

Esquemas en:

http://www.acenologia.com/figs55_ciencia2.htm#arriba [24/03/2010]

Pérez H., P. y Acosta G., J. A. 2002. Permeabilidad de la testa y la porción micrópilo – hilio en semilla de frijol silvestre y cultivado. *Rev. Fitotec. Méx.*, 25. (1): 57-63.

Pernollet, J. 1978. Protein bodies of seeds: Ultrastructure, Biochemistry, biosynthesis and degradation. *Phytochemistry*. 17:1473-1480.

Plhak L. K. Caldwell and D. Stanley. 1989. Comparison of methods used to characterize water imbibitions in hard to cook beans. *Journal of Food Science* 54: 326 – 329.

Quast, D. G. and Da Silva, S. D. 1977. Temperature dependence of hidration rate and effect of hidratation on the cooking rate of dry legumes. *Journal of Food Science*. 42(5): 1299-1303.

Quintero, P., L. G., Pezzato, L. E., Carvalho, M., E., Barros, M. M., Massamito F., W. 2000. Acao do tanino na digetibilidadade de dietas pela Tilapia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Scientiarum*. 22(3):677-681.

Ramírez, G. J. 1987. Endurecimiento del frijol. *Memorias del Encuentro Latinoamericano Sobre el Almacenamiento y Conservación de granos Básicos*. Ciudad de México. 175-182.

Ramírez, G. J. 1990. Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre el endurecimiento del grano de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis de Doctorado. Fac. de Ciencias. UNAM.

Reyes-Moreno C.; Okamura-Esparza J.; Armienta Rodelo, E.; Gomez Garza R. M.; Milan-Carrillo J. 2000. Hard-to-cook phenomen in chickpea (*Cicer arietinum* L): Effect of acelrated storage on quality. *Plant Foods for Human Nutrition*. 55, (3): 229-241

Reyes, R. E.; Padilla, E. L. E.; Pérez, V. O y López, J. P. 2008. Historia, naturaleza y cualidades alimentarias del frijol. *Investigación Científica*. 4(3): 1-21.
Página en red:

http://www.estudiosdeldesarrollo.net/administracion/docentes/documentos_personales/15599InvestigacionCientificaVol4No3_1.pdf [01/06/2010]

Ricco, R. A., Vai, V. M., Sena, G. A., Wagner, M. L. y Gruñí, A. A. 2003. Taninos condensados de *Ephedra ochreatea* Miers (Ephedraceae). *Acta Farm. Bonaerense* 22 (1): 33-37.

Richardson, J. and D. Stanley. 1991. Relationship of loss membrane functionality and Hard to cook defect in age beans. *Journal of Food Sciences*. 56: 590-591.

SAGARPA [Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación]. 2007. Página en red:

<http://www.sagarpa.gob.mx/v1/cgcs/boletines/2007/octubre/imprimir/B239.htm>
23/09/2007]

Sangronis, E. Machado, C., Cava, R. 2004. Propiedades funcionales de las harinas de leguminosas (*Phaseolus vulgaris* y *Cajan cajan*) germinadas *Interciencia*. 29. (2): 80-85.

Santino A., G. Daminati, A. Vitale, and R Bollini. 1992. The α amilasa inhibitor of bean seed: Two step proteolytic maturation in the protein storage vacuoles of the developing cotyledon. *Physiologia Plantarum* 85: 425-432.

Scull, I., L. Savón, 2003. Determinación de polifenoles totales y taninos condensados en harina de forraje de cuatro variedades de *Vigna unguiculata*. *Rev. Cubana de Ciencia Agrícola*. 37. (4): 403-407.

Sefa – Dedeh, S., D. M. Stanley, P. M. Voisey. 1978. Effects of soaking time and cooking conditions on texture and microstructure of cowpeas (*Vigna unguiculata*). *Journal of Food Science*. 43: 1832 – 1838.

Srisuma, N., Hammerschmidt, R., Ubersax, M. A., Ruengsakulrach, S., Bennink, M. R. 1989. Storage Induced changes of phenolic acids and the development of hard to cook in dry beans (*Phaseolus vulgaris*, var. Seafarer). *Journal of Food Science*. 54. (2): 311-314.

Stanley D. And J. Aguilera. 1985. A review of textural defects in cooked reconstituted legumes-the influence of structure and composition. *Journal of Food Biochemistry* 9: 277-323

Tovar J.; Fernández P.; M., Blanco M. A. 2005. Digestibilidad in vitro del almidón en preparaciones cocidas y molidas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Interciencia*. 30 (12): 1-10.

Tovar, M. M. E.; Esquivel H. C., Bernal-Lugo., y Márquez G. J. 1993. Reversión del endurecimiento en *Phaseolus vulgaris* L.: Estudio Estructural. XII Congreso Mexicano de Botánica. La Botánica Mexicana hacia el siglo XXI. Mérida Yucatán, Del 3 al 8 de octubre.

Tovar, M. M. E, Esquivel H. C. y Márquez G. J. 1994. Estructura de testa y cotiledones durante el endurecimiento y su reversión en *Phaseolus vulgaris* L. XVIII Congreso Nacional de Histología. Fac. de Ciencias, Circuito Exterior, UNAM, Del 26 al 28 de Septiembre.

Tovar M., M. E. 1997. Determinación de los cambios estructurales relacionados con el fenómeno de reversibilidad del endurecimiento en dos cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis de Doctorado. Fac. de Ciencias. UNAM.

Varriano – Marston, E., and Jackson, G. M. 1981. Hard to cook phenomenon in beans: structural changes during storage and imbibition. *Journal of Food Science*. 46: 1379-1385.

Vázquez, C. M. G., Ortega D. M. L., Estrada L. E. 1991. Harina de frijol endurecido (*Phaseolus vulgaris* L.) en la preparación de pan. Arch. Latinoamer. Nutr. 41(4): 620-630.

Vázquez, Y. C., Orozco, A., Rojas, M., Sánchez, M. E., Cervantes, V. 1997. La reproducción de las plantas: semillas y meristemas. La Ciencia para todos. 67p.

Pagina en red:

<http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/157/htm/lcpt157.htm> [27/10/2010]