



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**ESTUDIO DE POLISACÁRIDOS DE PARED CELULAR DE TESTA  
DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris L.*) CON DIFERENTE  
TOLERANCIA AL ATAQUE DE INSECTOS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
INGENIERA EN ALIMENTOS**

**PRESENTA:  
GALVÁN ZARAZÚA PATRICIA**

**ASESOR M. EN C. ENRIQUE MARTÍNEZ MANRIQUE**

**CUAUTITLÁN IZCALLI. EDO, DE MEX.**

**2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U.N.A.M.  
**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**  
SUPERIORES CUAUTITLÁN



**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ**  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la **Tesis**:

Estudio de polisacáridos de pared celular de testa de frijol (Phaseolus vulgaris L.) con diferente tolerancia al ataque de insectos

Que presenta la pasante: Patricia Galván Zarazúa  
Con número de cuenta: 304150766 para obtener el Título de: Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 06 de Diciembre de 2011.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	<b>NOMBRE</b>	<b>FIRMA</b>
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
<b>VOCAL</b>	Dra. Susana Patricia Miranda Castro	
<b>SECRETARIO</b>	M. en C. Enrique Martínez Manrique	
<b>1er SUPLENTE</b>	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
<b>2do SUPLENTE</b>	Dr. Abraham Méndez Albores	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).  
HHA/pm

# Agradecimientos

A mis padres por todo su apoyo, por guiar mis pasos, por darme la fuerza para seguir y motivarme a cada momento, a mis hermanos por compartir su tiempo, por las asesorías, por compartir desvelos y brindarme su apoyo incondicional.

A Enrique Martínez Manrique por su tiempo dedicado a la revisión de este trabajo, por sus asesorías y amistad

A mis amigas; Idalia, por hacerme reír a cada momento, por siempre contar con tus consejos y compañía, gracias por ser tan especial para mí y por comprender cada una de mis palabras y acciones, a Diana, Mariela, Yazmin, Mara y Yeni por compartir cada uno de esos momentos especiales, por su amistad incondicional.

A los sinodales por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

Al doctor Francisco Montiel por sus asesorías y compañía durante las jornadas de experimentación

A todos los miembros del laboratorio 8 de la unidad multidisciplinaria de investigación por haber contribuido a la realización de este trabajo, por cada uno de los momentos compartidos.

Gracias a todos por comprenderme y haberme compartido su tiempo

Para la que por mucho fue la mujer más importante de mi vida, por estar siempre a mi lado, por hacerme lo que soy, porque me enseñaste a ser cada vez mejor, para ti, no me queda más que regalarte esta frase.

“And throughout all Eternity I forgive you, you forgive me”

William Blake

## ÍNDICE

Índice de figuras.....	iii
Índice de tablas.....	iv
RESUMEN.....	v
INTRODUCCIÓN .....	vi
1 ANTECEDENTES.....	1
1.1 Generalidades del frijol.....	1
1.1.1 Estructura de la semilla de frijol.....	2
1.1.2 Morfología.....	4
1.2 Importancia del frijol.....	5
1.2.1 Consumo de frijol.....	5
1.2.2 Producción de frijol.....	6
1.2.3 Comercialización del frijol.....	7
1.3 Composición química y aporte nutrimental.....	8
1.4 Almacenamiento.....	12
1.4.1 Importancia.....	12
1.4.2 Tipos de almacenes.....	12
1.4.3 Daños ocasionados por mal almacenamiento.....	14
1.5 Pared celular.....	18
1.5.1 Función.....	18
1.5.2 Organización y composición.....	18
1.5.2.1 polisacáridos de pared celular.....	19
1.5.2.2. Proteínas de pared celular.....	22
1.5.3 Interacción entre componentes de la pared celular.....	22
1.5.4 Influencia de la solubilidad de los componentes de la pared celular en su fraccionamiento.....	24
1.5.5 Influencia de la dureza de pared celular en la susceptibilidad al ataque de insectos.....	25
2 OBJETIVOS.....	27
3 MATERIALES Y METODOS.....	28
3.1 Material biológico.....	29
3.1.1 Preparación de la muestra.....	29
3.2 Aislamiento de la pared celular.....	30
3.3 Extracción de los polisacáridos de la pared celular.....	30
3.3.1 Fraccionamiento de la pared celular.....	31

3.4	Cuantificación de azúcares totales por el método de Fenol-Sulfúrico.....	32
3.5	Cuantificación de ácido galacturónico.....	32
3.6	Cuantificación del contenido de proteína por el método de Lowry.....	33
3.7	Cuantificación de compuestos fenólicos.....	34
3.8	Precipitación de polisacáridos.....	34
3.9	Disolución de polisacáridos secos.....	35
3.10	Cromatografía de intercambio iónico.....	35
3.11	Cromatografía de filtración en gel.....	36
3.12	Cuantificación e identificación de azúcares neutros por HPLC.....	37
3.13	Análisis estadístico.....	37
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
4.1	Determinación de la composición química de los polisacáridos solubles de la pared celular de la testa de dos variedades de frijol.....	38
4.1.1	Cuantificación de azúcares totales y ácido galacturónico de los polisacáridos solubles de la pared celular.....	38
4.1.2	Cuantificación de compuestos fenólicos y proteínas en las fracciones solubles de los polisacáridos de pared celular.....	40
4.1.3	Cuantificación de proteínas y fenoles a los polisacáridos precipitados de la pared celular re-disueltos en agua.....	41
4.1.4	Cuantificación de azúcares totales y ácido galacturónico a polisacáridos precipitados con etanol al 85%, de la pared celular.....	41
4.2	Cromatografía de intercambio iónico.....	44
4.3	Cromatografía de filtración en gel.....	48
4.4	Cuantificación e identificación de azúcares neutros por HPLC.....	51
5	CONCLUSIONES.....	55
6	BIBLIOGRAFÍA.....	57
7	ANEXOS.....	64
7.1	ANEXO 1.....	64
7.2	ANEXO 2.....	65
7.2	ANEXO 3.....	65

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Variedades de frijol con diferente tamaño y color .....	2
<b>Figura 2.</b> Estructura de la semilla de frijol .....	3
<b>Figura 3.</b> Diferentes variedades de frijol .....	4
<b>Figura 4.</b> Principales productores de frijol a nivel mundial .....	6
<b>Figura 5.</b> Evolución de la producción mundial de frijol .....	6
<b>Figura 6.</b> Frijol infestado por <i>Z. subfasciatus</i> .....	15
<b>Figura 7.</b> Estructura de pared celular .....	19
<b>Figura 8.</b> Estructura de celulosa .....	20
<b>Figura 9.</b> Estructura de pectina .....	21
<b>Figura 10.</b> Estructura de xilanos.....	22
<b>Figura 11.</b> Frijol Mayocoba cosecha 2009, Sinaloa .....	29
<b>Figura 12.</b> Frijol Negro Jamapa cosecha 2009, Jalisco. ....	29
<b>Figura 13.</b> Micromolino de cuchillas .....	29
<b>Figura 14.</b> Obtención de residuo insoluble en alcohol de la testa de frijol .....	30
<b>Figura 15.</b> Fraccionamiento de la pared celular de testa de frijol con diferentes solventes.....	31
<b>Figura 16.</b> Columna para cromatografía de intercambio iónico .....	36
<b>Figura 17.</b> Columna para cromatografía de permeacion en gel. ....	36
<b>Figura 18.</b> Cromatografía de HPLC.....	37
<b>Figura 19.</b> Cromatografía de intercambio iónico de los polisacáridos obtenidos con Trans-1,2-diaminociclo-hexano N, N', N'-tetra-ácido acético (CDTA) de las variedades de frijol negro Jamapa y Mayocoba. ....	45
<b>Figura 20.</b> Cromatografía de intercambio iónico de los polisacáridos obtenidos con KOH 1% de las variedades de frijol negro Jamapa y Mayocoba .....	46
<b>Figura 21.</b> Cromatografía de Intercambio Iónico de los polisacáridos obtenidos con KOH 20% de las variedades de frijol Negro Jamapa y Mayocoba .....	47
<b>Figura 22.</b> Cromatografía de filtración en gel de los polisacáridos obtenidos con Trans-1,2-diaminociclo-hexano N, N', N'-tetra-ácido acético (CDTA) de las variedades de frijol negro Jamapa y Mayocoba .....	48
<b>Figura 23.</b> Cromatografía de filtración en gel de los polisacáridos obtenidos con KOH 1% de las variedades de frijol negro Jamapa y Mayocoba .....	49
<b>Figura 24.</b> Cromatografía de filtración en gel de los polisacáridos obtenidos con KOH 20% de las variedades de frijol negro Jamapa y Mayocoba .....	50

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de frijol.....	2
<b>Tabla 2.</b> Consumo del frijol en diferentes países .....	5
<b>Tabla 3.</b> Composición química promedio del frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris L.</i> ) .....	8
<b>Tabla 4.</b> Perfil de aminoácidos esenciales de frijol .....	10
<b>Tabla 5.</b> Cuantificación de ácido galacturónico y azúcares totales de diferentes fracciones de la pared celular de la testa de frijol Negro Jamapa y Mayocoba.....	39
<b>Tabla 6.</b> Cuantificación de proteínas y compuestos fenólicos de diferentes fracciones de la pared celular de la testa de frijol Negro Jamapa y Mayocoba .....	40
<b>Tabla 7.</b> Cuantificación de ácido galacturónico y azúcares totales de polisacáridos precipitados con etanol de las diferentes fracciones de la pared celular de testa de frijol negro Jamapa y Mayocoba... ..	42
<b>Tabla 8.</b> Cuantificación de ácido galacturónico y azúcares totales de polisacáridos hidrolizados de las diferentes fracciones de pared celular de testa de frijol negro Jamapa y Mayocoba. ....	51
<b>Tabla 9.</b> Cuantificación e identificación de azúcares totales de polisacáridos hidrolizados de las diferentes fracciones de pared celular de testa de frijol negro Jamapa y Mayocoba.....	52

## RESUMEN

El frijol es un alimento importante para la dieta de la población mexicana como fuente principal de proteína, especialmente en los estratos más pobres. Debido a que este grano se consume durante todo el año, necesita almacenarse, sin embargo, en México se tiene un sistema de almacenamiento deficiente; lo que provoca pérdida de su calidad, entre otras causas, por la infestación de los granos por insectos.

En trabajos previos se evaluó la susceptibilidad de diferentes variedades comerciales de frijol al ataque del gorgojo del frijol y se encontró que dos variedades eran muy susceptibles (Bayo y Negro Jamapa) y dos poco (Flor de Mayo y Mayocoba). En otro trabajo, se evaluó la facilidad de extracción de los principales componentes de la pared celular de la testa de estas cuatro variedades; los resultados mostraron que la facilidad de extracción fue mayor en las variedades susceptibles comparado con las variedades poco susceptibles y que las dos variedades más contrastantes fueron Negro Jamapa y Mayocoba. Es por eso que en este trabajo se caracterizaron químicamente los polisacáridos de la pared celular de testa de estas dos variedades de frijol para evaluar si existían diferencias entre ellos debidas a su susceptibilidad al ataque de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman). Para realizar este trabajo, se usaron dos variedades de frijol comercial: Mayocoba (MC) que no es susceptible al ataque del gorgojo del frijol y negro Jamapa (NJ) que sí lo es. A partir de la testa de estas semillas, se obtuvo una fracción rica en paredes celulares mediante una extracción con metanol en ebullición, la cual se denominó residuo insoluble en alcohol (RIA). Se realizó la extracción de los polisacáridos de pared celular utilizando solventes con diferente poder de extracción como CDTA (Trans-1,2-diaminociclo-hexano N, N', N'-tetra-ácido acético) y KOH a dos concentraciones (1 y 20 %) y se evaluó su composición química, su tamaño y la distribución del ácido galacturónico. Los resultados mostraron que la composición química de los polisacáridos de la variedad NJ fue diferente a los de MC. Los polisacáridos de la pared celular de frijol MC presentaron una distribución de ácido galacturónico que permite una mayor interacción iónica con otros componentes de la pared celular, además, de un mayor tamaño, en comparación a frijol NJ, principalmente en la fracción soluble de KOH al 20%. Estas características de los polisacáridos de pared celular de la testa de ambas variedades de frijol sugieren que la pared celular de Mayocoba es más fuerte que la de Negro Jamapa, y por lo tanto, existe una relación con su susceptibilidad al ataque de *Zabrotes subfasciatus*.

## INTRODUCCIÓN

El frijol es una leguminosa de la especie *Phaseolus vulgaris L.*, originaria de México y Centroamérica. En México, el cultivo del frijol junto con el maíz, representa toda una tradición productiva y de consumo, cumpliendo diversas funciones de carácter alimentario y socioeconómico (Vargas, 2006; SAGARPA 2000). El 68 % de su producción se destina en forma directa al consumo final. La forma en que se comercializa la mayor parte de la producción de frijol, es a granel o en costales, por lo cual debe ser almacenado para su distribución (Munguía, 2010; Programa Regional Postcosecha, 1999). En México existe un sistema de almacenamiento deficiente, sobre todo entre los pequeños productores, que son más del 90% de los productores en el país. Un mal almacenamiento provoca disminución en la calidad del frijol, que se refleja en pérdidas económicas para el productor; por eso el grano debe mantenerse fresco, seco y protegido de insectos, hongos y roedores (SAGARPA, 2000; Acosta-Gallegos y Pérez, s.f.).

Los insectos son importantes agentes biológicos que pueden causar daños a los granos, tanto en el campo como durante el almacenamiento, reduciendo drásticamente su calidad. Si la población de insectos crece en forma desmesurada, además de reducir la calidad del grano, se producirá un incremento en su temperatura y humedad, que le afecta (Arias, 1993). Se estima que anualmente se pierde entre el 5 y el 25% de la producción total de maíz, trigo y frijol, principales granos básicos del país, a causa del ataque de insectos (SAGARPA, 2005).

Algunas investigaciones que se han realizado respecto a este tema, han encontrado que las plantas han desarrollado estrategias de defensa que obstaculizan la acción de los insectos, mediante la producción de inhibidores de tripsina y de quimiotripsina (Payan, 2003; Kluh *et al.*, 2004; Gatehouse *et al.*, 1987). Otros trabajos señalan que las lectinas, han estado implicadas como factores de antibiosis contra los insectos (Macedo *et al.*, 2002). Pero otra posibilidad, que se ha estudiado poco, es la resistencia que genera la cubierta externa de las semillas. Los mecanismos de defensa involucran un componente bioquímico y uno físico; esto es, la estructura de la cubierta y la textura de la superficie respectivamente (Villaseñor *et al.*, 1992). La resistencia de las semillas en especies de leguminosas es atribuida a la

rugosidad y dureza de la testa. Por otra parte, se sabe que la pared celular determina la dureza de la testa.

Rodríguez (2011) reportó que existía una relación directa entre diversos componentes de la testa de diferentes variedades comerciales de frijol y su susceptibilidad al ataque del gorgojo del frijol. Mientras que Moreno (2008), determinó que la facilidad de extracción de los componentes de la pared celular de la testa de cuatro variedades de frijol tenía una relación con su susceptibilidad al ataque del gorgojo del frijol. Sin embargo, no se sabe exactamente qué es lo que los hace o no susceptibles.

Por lo tanto, es importante el tratar de identificar el o los componentes moleculares que intervienen en la resistencia del grano, ya que, conocer más sobre estos eventos moleculares que determinan mayor o menor resistencia al ataque de insectos podrá ayudar a disminuir las pérdidas de la calidad del frijol durante el almacenamiento y evitar el uso de compuestos tóxicos y contaminantes como los insecticidas usados actualmente.

Con base en estos antecedentes, en el presente trabajo se planteó, caracterizar químicamente los polisacáridos de la pared celular de testa de dos variedades de frijol para evaluar si existen diferencias entre ellos debidas a su susceptibilidad al ataque de *Zabrotes subfasciatus*. Para realizar este trabajo se utilizarán dos variedades de frijol comercial: Mayocoba (MC) y Negro Jamapa (NJ). Se aislarán los polisacáridos de la pared celular de la testa de cada uno de ellos y se les analizará por cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de permeación en gel y cromatografía de líquidos de alta resolución, para determinar, la distribución de ácido galacturónico, el tamaño de los polisacáridos y cuantificar la composición de los diferentes azúcares que forman los diferentes polisacáridos.

## 1 ANTECEDENTES

### 1.1 Generalidades del frijol

El frijol es una leguminosa de la especie *Phaseolus vulgaris* L., originaria de México y Centroamérica, donde se han encontrado vestigios con una antigüedad de más de 7,000 años. Se han identificado dos sitios principales en las cuales se comenzó a cultivar, uno en el altiplano Mexicano (valle de Tehuacán, Puebla) y en los Andes Sudamericanos en Perú (Blancas, 2001).

Es una planta anual y herbácea; existen alrededor de 80 especies de frijol silvestre en el continente americano, de las cuales en México se encuentran aproximadamente 50, sólo cuatro de ellas fueron domesticadas para servir como alimento y se conservan actualmente en tierras americanas (Solórzano-Vega, 1994), estas son: *Phaseolus vulgaris* o frijol común, *Phaseolus coccineus* o frijol ayocote, *Phaseolus acutifolius*, frijol tepari, *Phaseolus lunatus* o frijol lima originarios de Perú (Soriano, 2006).

Para su crecimiento óptimo se requieren temperaturas medias entre 16-24°C, el crecimiento se detiene con temperaturas inferiores a los 10°C, muriendo la planta con heladas (Engleman, 1991; SAGARPA, 2008).

Actualmente, el frijol constituye un alimento importante para la dieta de la población mexicana como fuente de proteína, minerales y vitaminas. Gracias a su amplia adaptación, el frijol se puede producir en todas las regiones agrícolas del país, en diversos sistemas de producción y épocas del año (Vargas, 2006; SAGARPA, 2008). Su clasificación taxonómica se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de frijol

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Dicotiledóneas</i>
Orden	<i>Fabales</i>
Familia	<i>Leguminosae</i>
Genero	<i>Phaseolus</i>
Especie	<i>Phaseolus vulgaris</i>

Fuente: Soriano, 2006

### 1.1.1 Estructura de la semilla de frijol

Las semillas de frijol suelen diferir en cuanto a forma, tamaño y color (Figura 1), pudiendo ser reniformes, redondas, esféricas o cilíndricas y siendo las variedades silvestres más pequeñas que las domesticadas (García, 1994).

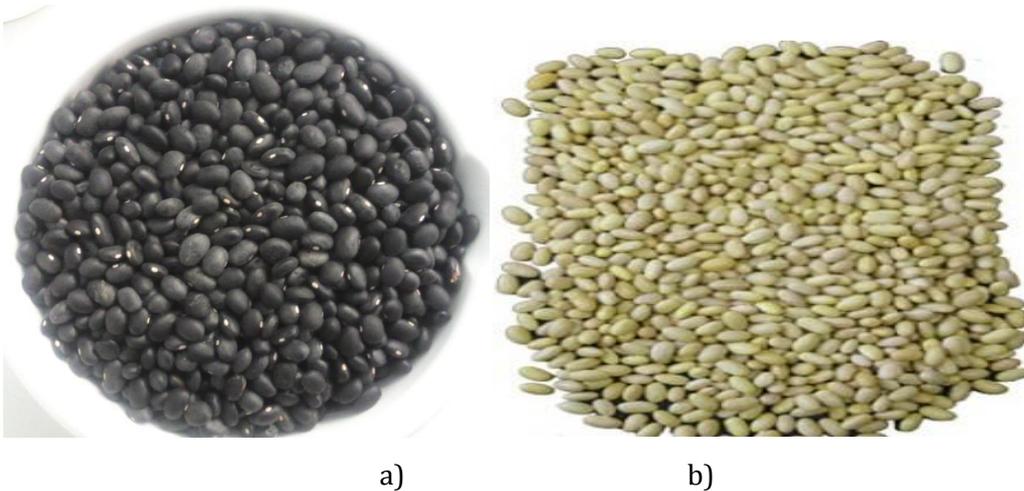


Figura 1. Variedades de frijol con diferente tamaño y color a) frijol negro Jamapa, b) frijol Mayocoba.

En el frijol común, la semilla madura consta de un embrión y de la cubierta de la semilla o testa (Figura 2). El embrión a su vez consiste de un eje embrionario y dos cotiledones. Estos componentes cuentan respectivamente con los siguientes porcentajes del peso seco de la semilla: cubierta o testa del 6-8%, cotiledones aproximadamente el 90% y eje embrionario del 1-2% (Macrae *et al.*, 1993).

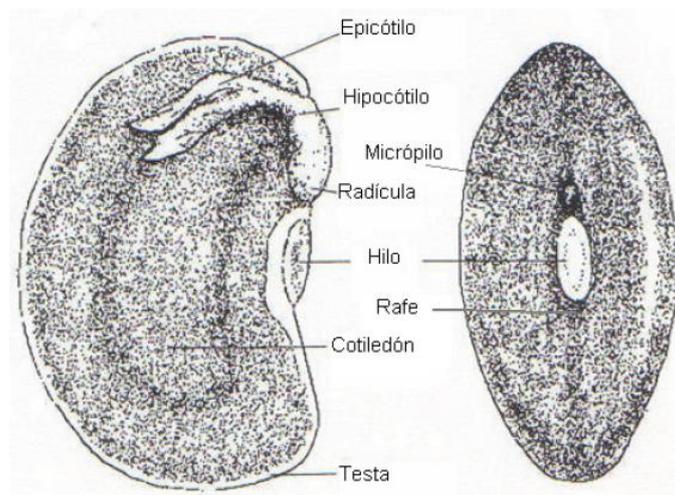


Figura 2. Estructura de semilla de frijol (Macrae *et al.*, 1993).

La capa más externa de la semilla es la cubierta o testa, ésta cubierta tiene diversas funciones como se muestra en la Tabla 2, entre las cuales se encuentran dar protección a las estructuras que integran el embrión y protegerlo de posibles daños causados por exceso de absorción de agua, contaminación microbiana o ataques de insectos. La estructura externa, además suele presentar algunas pequeñas formaciones superficiales conocidas como hilo, micrópilo y rafe.

La estructura interna de la semilla contiene al embrión, mismo que incluye dos cotiledones y el eje embrionario. Los cotiledones contienen la mayoría de los nutrientes que posee la semilla; son estructuras abultadas las cuales contienen los almidones de reserva y proteínas, además de ser el componente mayoritario en cuanto a volumen y peso seco de la semilla. Por otro lado, está el eje embrionario que incluye el epicotilo, el hipocotilo y la radícula. (Macrae *et al.*, 1993).

#### Principales funciones de la testa de frijol

Controlar el grado de impermeabilidad del grano al agua y a los gases
Mantener unidas las partes internas de los granos
Proteger las partes internas contra choques y abrasiones

Servir como barrera a la entrada de microorganismos e insectos en la semilla
Regular la velocidad de rehidratación de la semilla, evitando o disminuyendo posibles daños causados por las presiones desarrolladas durante la absorción
Regular la velocidad de los cambios gaseosos (oxígeno y gas carbónico)
Regular la germinación

(Arias, 1993)

### 1.1.2 Morfología

Existen más de doscientas variedades de frijol, de diferentes colores, volumen, sabor y composición química (Figura 3). El frijol en todos sus grados de calidad se designa de acuerdo a su coloración en las siguientes clases: negros, en los que se encuentran las variedades de Jamapa, Querétaro y San Luis, entre los claros se encuentran: azufrado, alubia, amarillo mostaza, flor de mayo, flor de junio, bayo, peruano y garbancillo y entre otras clases se encuentran bayo berrendo, bayo blanco, flor de abril, manzano y pinto delicias (NMX-FF-038-SCFI-2002).

Los más consumidos son generalmente de color rosa, negro, café o blanco, y sus nombres como se conocen en el mercado son: azufrados, bayo gordo, blanco, canelo, cócona, mexicano, negro, ojos de liebre, palacio, rosita, flor de mayo, peruano, negro Jamapa y xinacalteca, entre otros.



Figura 3. Diferentes variedades de frijol

FUENTE: <http://prietasnotes.blogspot.com/2010/>

## 1.2 Importancia del frijol

### 1.2.1 Consumo de frijol

El frijol es una leguminosa de gran importancia en la dieta de la población mexicana debido a su alto contenido proteico, especialmente en los estratos sociales más pobres (Chamba, 1985); ya que los frijoles son menos caros que los productos de origen animal y tienen una considerable vida de anaquel en comparación con algunos productos de origen animal, frutas y vegetales, siempre y cuando sean almacenados en condiciones apropiadas (Morrow, 1991).

Como producto básico, su demanda va en aumento con el crecimiento demográfico sin llegar a satisfacerlo, en la Tabla 3 se muestra el consumo *per capita* en diversos países, de esta leguminosa.

Por otro lado, el frijol representa una fuente económica de proteína en poblaciones donde su disponibilidad es baja; además de que en los últimos tiempos el consumo de este grano ha generado un gran interés en poblaciones conscientes de su salud, ya que posee fibras del tipo soluble que son muy convenientes para aportar a la dieta una ingesta satisfactoria de fibras o por ejemplo para el control de pacientes diabéticos (Ibáñez, 2009).

Tabla 3. Consumo del frijol en diferentes países (Muller, 1998)

País	g de frijol/día
Brasil	66
México	49
Uganda	34
Guatemala	29
Chile	13
Turquía	11
Estados unidos	9
Argentina	2

### 1.2.2 Producción de frijol

En México, el cultivo del frijol junto con el maíz, representa toda una tradición productiva y de consumo, cumpliendo diversas funciones de carácter alimentario y socioeconómico (SAGARPA 2000). El 68 % de su producción se destina en forma directa al consumo final, en el 32% restante se encuentran mermas ocasionadas al trasladarse de la zona productora a los centros de consumo, además de frijol utilizado como semilla, o para transformación industrial. Asimismo, su consumo es generalizado entre amplias capas de la población de ingresos bajos, medios y hasta superiores (SAGARPA, 2000).

La producción de frijol a nivel nacional se realizó principalmente en Sinaloa (139,358 ton.), Nayarit (69,894 ton.) y Chiapas (28, 236 ton.) para el ciclo otoño-invierno 2007/2007, mientras que para el ciclo primavera-verano 2007/2007, los principales estados productores fueron Zacatecas con 12,439, Chiapas con 2,108 y San Luis Potosí con 75 toneladas. México es el cuarto país productor de frijol del mundo, reportando 315,050 toneladas a nivel nacional hasta agosto de 2007 (SAGARPA, 2007).

Por otro lado, la India, Brasil y China tienen mayor producción que México (Figura 4), y se reportan incrementos en la producción mundial, como se observa en la Figura 5 según datos reportados por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2005).

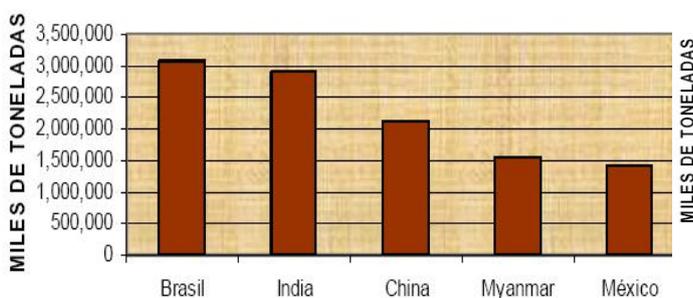


Figura 4. Principales productores de frijol a nivel mundial (FAO, 2005).

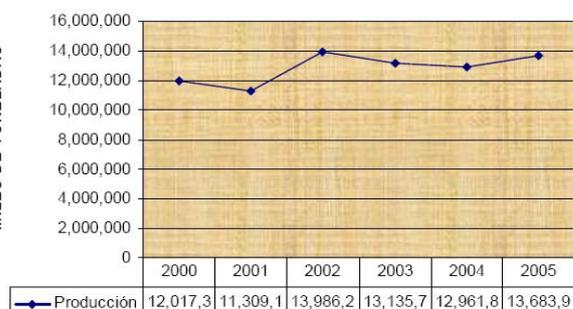


Figura 5. Evolución de la producción mundial de frijol (FAO, 2005)

### 1.2.3 Comercialización del frijol

La comercialización del frijol se realiza de manera ineficiente desde varias décadas atrás, debido a la falta de información y alternativas que plantean los diferentes mercados regionales, así como, a la falta de conocimiento relacionado con los hábitos de consumo de nuestra población, la baja calidad en la presentación del producto, deficiencia en procesos de transformación, deficientes métodos de almacenamiento, la falta de estrategias para una mejor comercialización y distribución del mismo, todo esto repercute negativamente en el precio pagado al productor por su grano (SAGARPA, 2000).

La forma en que se comercializa la mayor parte de la producción de frijol, es a granel o en costales, sin que tenga alguna clasificación o limpieza, además, no recibe un adecuado transporte, almacenamiento y proceso de transformación, por lo cual al final de todo el sistema de comercialización se obtiene un producto de baja calidad (SAGARPA, 2000).

Los principales aspectos que han afectado la comercialización del grano son:

1. Costos altos en la movilización de sus cosechas debido a la lejanía que existe entre las principales zonas de consumo y las de producción.
2. Un alto grado de intermediarios, existentes en la primera etapa de su comercialización, que repercute negativamente en los intereses, tanto de los productores, como de los consumidores del grano.
3. Recomposición interna de la oferta nacional.
4. Insuficientes apoyos a la comercialización de esta leguminosa en el mercado nacional.

### 1.3 Composición química y aporte nutrimental

Para el valor nutritivo hay tres aspectos fundamentales a considerar: 1) composición de aminoácidos, 2) factores antinutrimientales y 3) digestibilidad (estrechamente relacionada con el contenido de sustancias antinutrimientales) y facilidad para la cocción y procesado. Esta leguminosa se puede consumir como una verdura fresca con la vaina o más frecuentemente como grano seco. En este último caso generalmente el grano se tiene en remojo, que va de 12 a 24 horas y luego se somete a cocción antes de consumirlo. Su contenido de fibras solubles lo hace especialmente interesante en relación con el control de la colesterolemia; además, la fibra soluble contribuye al desplazamiento de los alimentos a través del sistema digestivo, siendo además fuente de vitaminas y minerales como: tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B<sub>6</sub>, ácido fólico, calcio, hierro, cobre, zinc, fósforo, potasio y magnesio. El frijol se compone mayoritariamente de carbohidratos y proteínas, y en menor medida de lípidos y minerales, como se observa en la 4.

Tabla 4. Composición química promedio del frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*)

Nutrientes	%
Humedad	10.4
Proteínas	22.6
Lípidos	1.5
Carbohidratos	57.6
Celulosa	4.73
Minerales	3.7

Fuente: James, 1981

**Carbohidratos:** Sirven de reserva energética y constituyen la fracción principal en los granos de las leguminosas, 55 a 65% del peso seco en promedio. De ellos, el almidón es el principal constituyente, seguido de la fibra dietética y cantidades pequeñas de oligosacáridos (Bravo *et al.*, 1998). El almidón del frijol sirve como

aporte de energía y de estructuras carbonadas para síntesis posteriores en el metabolismo (González *et al.*, 2005).

Las células del frijol son una importante fuente de fibra dietética, la cual está formada principalmente por carbohidratos complejos no digeribles, como la celulosa, hemicelulosa, pectina de las células vegetales, y lignina, que no es un carbohidrato. La fibra dietética ha sido definida como el conjunto de lignina y polisacáridos no hidrolizados por las enzimas endógenas del tracto digestivo de los humanos. (Rodríguez *et al.*, s.f.).

La fibra tiene un efecto especial en la función intestinal debido a sus propiedades:

- Habilidad para absorber agua e hincharse
- Capacidad de formar geles
- Facultad de intercambiar cationes
- Aptitud para absorber moléculas orgánicas (como las sales biliares) del intestino

**Lípidos:** Los glóbulos de grasa se encuentran entre la red que forman las proteínas y los carbohidratos en cada cotiledón, encontrándose principalmente triglicéridos. Los lípidos de frijol común pueden contener apreciables cantidades de ácidos grasos libres y en general tienen potenciales altos de oxidación (Parrish y Leopold, 1978). Los lípidos en el frijol común muestran una cantidad significativa de variabilidad en la composición de ácidos grasos y contienen cantidades substanciales de ácidos grasos insaturados (Patte *et al.*, 1982), ácido oleico (7 a 10%), linoleico (21 a 28%) y linolénico (37 a 54%) son los principales ácidos grasos insaturados. También contienen ácidos grasos saturados como el ácido palmítico, el cual puede estar en un rango de 10 a 15 % del total de lípidos (Exler *et al.*, 1977).

**Proteínas:** las proteínas son uno de los componentes de los alimentos más importantes, las cuales al digerirse dan lugar a los aminoácidos y una vez absorbidos vuelven a conformar proteínas que cumplen funciones como catálisis enzimática, transporte, almacenamiento, movimiento, soporte mecánico, protección inmune, control del desarrollo y la diferenciación, entre otras (Casanueva *et al.*, 2001).

El frijol proporciona entre un 20 a 30% de proteína dependiendo de la variedad. La importancia de su proteína, no solo se debe a su cantidad sino a su calidad. Es una proteína con un alto contenido de Lisina, que es uno de los aminoácidos estratégicos en la nutrición y los niveles de esta, son superiores a los de todos los cereales, que junto con el frijol, forman parte importante de la dieta del mexicano. Aunque se ha reportado que la fracción proteínica de la albúmina presenta una baja disponibilidad biológica en metionina y cisteína. Los estudios indican que la mayor parte de las proteínas del grano son globulinas (75%) y albúminas (Moreno-Pérez, 1995). El frijol tiene altos contenidos de aminoácidos esenciales (Tabla 5).

Tabla 5. Perfil de aminoácidos esenciales de frijol

Aminoácidos	g/100 g proteína
Isoleucina	4.3
Leucina	7.5
Lisina	6.2
Metionina	1.0
Fenilalanina	5.4
Tirosina	3.1
Treonina	5.2
Valina	5.1
Triptófano	1.4

Fuente: White, 1955.

**Vitaminas y minerales:** En general las leguminosas son buenas fuentes de vitaminas del grupo B. En cuanto a los minerales, son ricas en calcio, hierro, cobre, zinc, potasio, magnesio y fósforo (Méndez, 2003), y su asimilación depende de la acción inhibitoria del ácido fítico (Programa Regional Postcosecha, 1999). El frijol contiene más caroteno, tiamina, riboflavina y ácido nicotínico que las frutas (Cornejo, 1993). En 100 gramos de frijoles crudos hay cerca de 5 miligramos de vitamina C.

**Oligosacáridos:** Son polímeros de azúcar con menos de diez monosacáridos en una molécula, pueden ser reductores o no-reductores. Los oligosacáridos no reductores más abundantes son la rafinosa, estaquiosa y verbascosa, éstos son importantes porque provocan un mal estomacal conocido como flatulencia (Cornejo, 1993).

**Compuestos tóxicos y antinutrimientales:** El frijol presenta factores antinutrimientales que incluyen inhibidores enzimáticos, factores de flatulencia, taninos y ácido fítico y compuestos tóxicos como hemaglutininas. La cocción elimina por completo las hemaglutininas, mientras que el inhibidor de tripsina es el más resistente al calor (Mendoza, 2002). La presencia de factores antinutrimientales reduce su valor biológico; pero es importante mencionar que estos compuestos son inactivados durante la cocción (González *et al.*, 2005; Munguía, 2010).

## 1.4 Almacenamiento

### 1.4.1 Importancia

Una de las principales causas del almacenamiento es la necesidad de lograr la disponibilidad del grano durante todo el año, ya que hay épocas en las que éste no se produce; sin embargo, debido a su alta demanda es necesario contar con grandes cantidades del mismo como reserva, ya que este problema tiene repercusiones económicas debido a que mientras exista carencia el precio que deberá pagarse para lograr obtenerlo será mayor, por otra parte, es necesario almacenarlo si la producción es alta, ya que entonces se tiene un excedente.

El almacenamiento es una de las operaciones más importantes que hay que cuidar en los granos, ya que un mal almacenamiento provoca pérdidas en su peso, calidad nutricional, germinación, calidad de cocción y mercadeo lo que conlleva a pérdidas económicas (Munguía, 2010; Programa Regional Postcosecha, 1999); por lo tanto, el propósito del almacenamiento es preservar la calidad de los productos agrícolas después de su cosecha, limpieza y secado.

La disminución en la calidad del frijol durante el almacenamiento representa pérdidas económicas para el productor, ya que el valor comercial del grano disminuye, además el endurecimiento ocasionado por el mal almacenamiento dificulta la estandarización de los procesos al igual que del producto terminado, lo que demerita considerablemente la calidad del producto endurecido, porque requiere un mayor gasto de energía para la cocción (Bernal-Lugo, 1987).

### 1.4.2 Tipos de almacenes

Existen diferentes tipos de almacenes para depositar granos y estos deben cumplir con las siguientes características:

- Controlar la temperatura con la finalidad de frenar los procesos bioquímicos de degradación, esta temperatura debe ser menor a 10 °C
- Impermeables
- Herméticos para evitar la entrada de aves, insectos y roedores

- Dotados de ventilación regulable
- Sin salientes ni rincones en que puedan depositarse el polvo y los residuos del producto
- Carentes de lumbreras u otras zonas por las que pueda penetrar la luz a través de la cubierta a fin de evitar que se creen lugares de elevadas temperaturas en la parte superior de los productos almacenados
- Preparados para que puedan instalarse algunos ventiladores que emitan aire hacia el interior a través de orificios murales, así como provistos de canalizaciones en el suelo para las necesidades especiales del almacenamiento a granel

En México se utilizan diferentes formas para el almacenamiento de granos, desafortunadamente, un almacenamiento deficiente con frecuencia se puede observar en regiones de escasos recursos económicos, principalmente lugares en los que la producción de frijol se destina para el autoconsumo y con esto hay pérdidas considerables por el almacenamiento inadecuado.

Independientemente del tipo de almacén o de recipiente que se utilice, el producto debe mantenerse fresco, seco y protegido de insectos, aves, hongos y roedores (SAGARPA, 2000), se debe controlar, además, antes y durante el almacenamiento el estado de conservación de los granos y el grado de infestación por insectos, y aplicar cuando sea necesario un tratamiento contra los mismos.

El contenido de humedad para almacenar con seguridad al frijol se encuentra en 11%, en equilibrio con 65% de humedad relativa, ya que esta humedad es límite en la cual los factores bióticos del medio ambiente empiezan a ser desfavorables a la conservación del grano almacenado (Ramírez, 1981).

En México, no se ha dado gran importancia al almacenamiento de granos, ya que un almacén bien equipado tiene costos muy elevados y éste tendría que ser agregado al valor económico, por ello los granos en nuestro país pueden sufrir pérdidas y deterioro por las condiciones de temperatura y humedad relativa altas que se tienen en las zonas productoras más importantes. Además, la carencia de equipo para secar, limpiar y mantener los granos en buen estado durante su transporte y almacenamiento hacen su conservación lo más desfavorable posible y por lo tanto, vulnerables al ataque por roedores y aves que merman las cosechas de manera cualitativa y cuantitativa (Moreno, 1995).

En México, no existen cifras precisas que indiquen el volumen de pérdida de granos y semillas durante su almacenamiento; sin embargo, se estima que anualmente se pierde entre el 5 y el 25% de la producción total de maíz, trigo y frijol, principales granos básicos del país (SAGARPA, 2005).

#### **1.4.3 Daños ocasionados por mal almacenamiento**

Existen riesgos inminentes durante el almacenamiento de granos debido a que fácilmente pueden sufrir daños de diversos tipos, siendo susceptibles a ser infestados por plagas.

Hay diferentes tipos de daños, pueden ser directos, a causa de golpes o quebraduras, además de contaminación por restos de materiales anteriormente almacenados, o bien, los más comunes, daños indirectos, principalmente ocasionados por calentamiento y migración de humedad a causa de la presencia o infestación de aves, roedores o insectos.

Los insectos son importantes agentes biológicos que pueden causar daños a los granos, tanto en el campo como durante el almacenamiento, reduciendo drásticamente su calidad. Si la población de insectos crece en forma desmesurada,

además de reducir la calidad del grano, se produce un incremento en su temperatura y humedad, que le afecta (Arias, 1993).

Los insectos de granos almacenados más perjudiciales son aquellos que se alimentan del embrión y que destruyen el poder germinativo de la semilla. Los insectos que viven en el interior del grano se alimentan principalmente de los cotiledones, lo que provoca la reducción parcial o total de las reservas alimenticias y hace que el grano pierda su vigor y genere una planta débil o incapaz de sobrevivir en el campo, además, el grano disminuye su calidad nutrimental y modifica sus propiedades de procesamiento cuando es destinado al consumo humano (Arias, 1993).

Los insectos de almacén comúnmente se encuentran presentes en silos, trojes y depósitos en general, por lo que el grano puede contaminarse fácilmente por contacto con producto ya infestado.

Uno de los insectos con fundamental importancia en el almacenamiento del frijol en México es *Zabrotes subfasciatus* (Figura 6) ya que tiende a dañar gravemente el grano, ocasionando pérdidas a raíz de la reducción del peso y pérdida de la calidad y viabilidad de la semilla del frijol. El grado de pérdida es absolutamente variable y depende del período y de las condiciones de almacenamiento (Macedo *et al.*, 2000).



Figura 6. Frijol atacado por *Z. subfasciatus* (Boheman).

FUENTE: <http://www.infojardin.com/>; <http://www.centreinar.org.br>

Debido a la susceptibilidad que presenta el frijol ante la infestación de algunos insectos es de primordial importancia contar con estrategias para disponer de un frijol de calidad en todo momento que sea requerido, por ello, es necesario proteger los granos de agentes que alteren negativamente su calidad, principalmente previniendo y controlando la infestación de los granos, para ello se hace uso de medidas preventivas, considerando mantener granos sin daños, medidas higiénicas en los almacenes, control de temperatura y humedad del almacén; sin embargo para los productores estas implementaciones generan un alto costo de inversión. Por otra parte, también se intentan disminuir las pérdidas, utilizando variedades poco susceptibles al ataque de este insecto.

Algunas investigaciones que se han realizado respecto a este tema, han encontrado que uno de los factores que genera resistencia al ataque de *Zabrotes subfasciatus* en el frijol, es la presencia de inhibidores de  $\alpha$ -amilasa, pues se ha observado una relación directa entre variedades con mayor abundancia de este inhibidor y un menor ataque del insecto (Silva *et al.*, 2000). También se ha determinado que las plantas han desarrollado estrategias de defensa que obstaculizan la acción de los insectos, mediante la producción de inhibidores de tripsina y de quimotripsina (Payan, 2003; Klueh *et al.*, 2004; Gatehouse *et al.*, 1987). Otros trabajos señalan que las lectinas, han estado implicadas como factores de antibiosis contra los insectos (Macedo *et al.*, 2002).

Otra posibilidad, que se ha estudiado poco, es la resistencia que genera la cubierta externa de las semillas, que juega un papel importante en la protección de estas contra el ataque del brúquido. Los mecanismos de defensa involucran un componente bioquímico y uno físico; esto es, la estructura de su pared celular y la textura de la superficie (Villaseñor *et al.*, 1992). La resistencia de las semillas en especies de leguminosas es atribuida a la rugosidad y dureza de la testa.

Por otra parte, se sabe que la pared celular determina la dureza de la testa, pues su grosor es consecuencia de la acumulación de celulosa y lignina, que son componentes de la pared celular. Sin embargo, no se sabe exactamente qué es lo que le confiere resistencia al frijol.

Por lo tanto, es importante el tratar de identificar el o los componentes moleculares que intervienen en la resistencia del grano, ya que, conocer más sobre estos eventos moleculares que determinan mayor o menor resistencia al ataque de insectos podrá ayudar a disminuir las pérdidas de la calidad del frijol durante el almacenamiento y evitar el uso de compuestos tóxicos y contaminantes como los insecticidas usados actualmente.

## 1.5 Pared celular

### 1.5.1 Función

La principal función de la pared celular es dar rigidez, forma y tamaño a la célula; pero también es capaz de facilitar y regular el crecimiento celular y su división en tejidos expandidos, ayuda en el transporte intercelular, protege al protoplasto del daño ambiental, brinda protección contra microorganismos extraños, previene la difusión de iones y agua del exterior a la membrana celular, sirve como un medio de comunicación entre células, forma canales para la circulación de fluidos y puede actuar como estructura de almacenamiento (García y Peña, 1995; Waldron, 2003; Cosgrove, 2006).

Muchos de los polisacáridos no almidonosos presentes en las plantas se encuentran en las paredes celulares, y todas ellas tienen pared celular primaria y lámina media (Carpita y Gibeau, 1993; McDougall *et al*, 1996).

### 1.5.2 Organización y composición

La pared celular del frijol se encuentra conformada por:

- a) **Lámina media:** Es una zona libre de celulosa que se inicia como "placa celular", en el momento de la división celular. Forma una capa intercelular amorfa entre las paredes celulares de células adyacentes; su función es mantener unidas a las células vegetales individuales y se compone principalmente de compuestos pépticos (ácido péptico: unión de moléculas de ácido galacturónico (enlaces  $\alpha$  1-4) esterificadas con metanol) y cuando tienen baja esterificación se conocen como pectatos o ácido péptico, los cuales tienen la capacidad de unirse a iones calcio. Sus funciones son: determinar la porosidad de la pared celular, proveer de una superficie de carga que modula el pH y el balance iónico, y servir como receptor de moléculas que emiten señales para desarrollar respuesta a organismos simbióticos, patógenos e

insectos (Carpita y Gibeaut, 1993; McDougall *et al.*, 1996; García y Peña, 1995; Lodish *et al.*, 2005).

b) **Pared primaria:** es una estructura delgada que se forma después de la división celular, antes de que la célula complete su crecimiento, es una estructura que se expande y se acomoda durante el crecimiento de la célula, rodea al protoplasto e incluye a la membrana plasmática. En su nivel más sencillo tiene cuatro componentes principales; celulosa, polisacáridos no celulósicos (pectinas y hemicelulosas), proteínas (como la extensina) y polifenoles (Carpita y Gibeaut, 1993; McDougall *et al.*, 1996). En lo que respecta a su organización espacial, se distinguen principalmente dos fases: la fase microfibrilar y la fase amorfa o matriz de polisacáridos (Cosgrove, 2005).

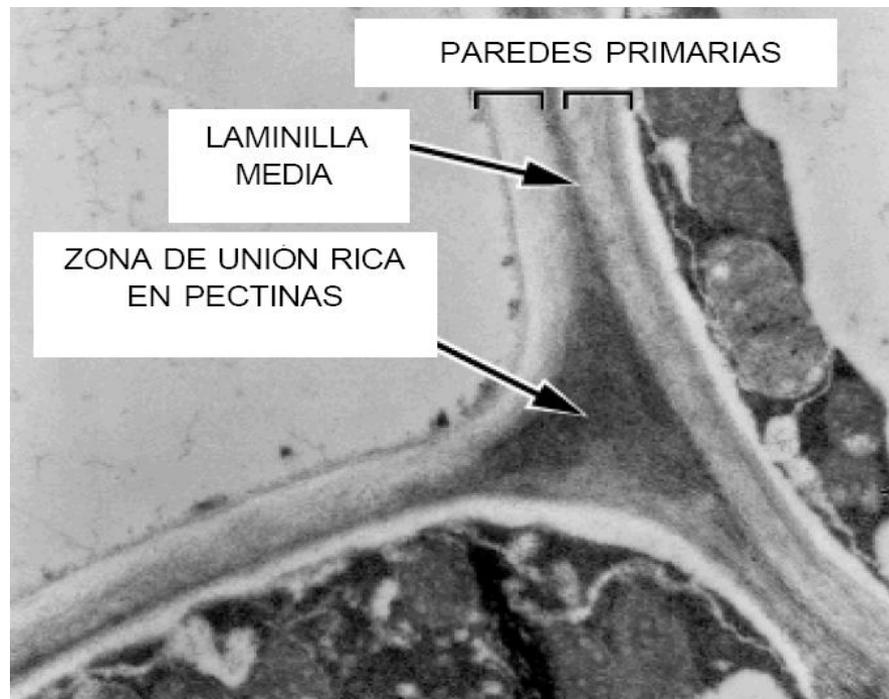


Figura 7. Estructura de pared celular  
Fuente: Vicente, 2004

### 1.5.2.1 Polisacáridos de pared celular

Se han agrupado en tres categorías: celulosas, péctinas y hemicelulosas, de los cuales estas últimas se asocian a proteínas y compuestos fenólicos.

### a) Celulosa

La celulosa es el más abundante y uno de los más conocidos polisacáridos presentes en las plantas; las fibras de celulosa forman el componente más resistente de la pared celular tanto a la hidrólisis química como a la enzimática. Están compuestas de cadenas no ramificadas de  $\beta$ -(1-4)- D-glucano, unidas por enlaces glicosídicos. En la pared celular un número variable de estas moléculas se unen para formar las estructuras denominadas microfibrillas, las cuales pueden mantenerse juntas y estables por formación de enlaces internos de puentes de hidrógeno (Cosgrove, 2005; Lodish et al., 2005).

La función de este polímero es la de formar el esqueleto y proveer de la forma y fuerza a la pared celular, para conferirle rigidez y resistencia a la ruptura, mientras que las sustancias pécticas y las hemicelulosas le proporcionan plasticidad (Carpita y Gibeaut, 1993).

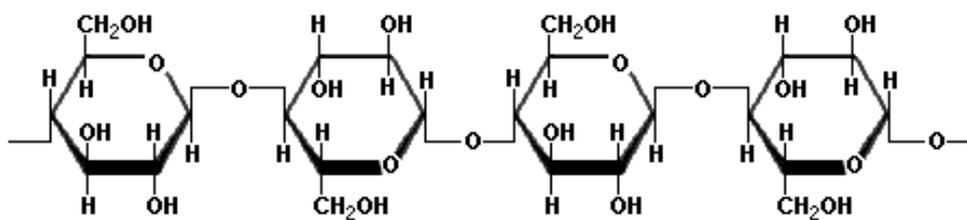


Figura 8. Estructura de celulosa

Fuente: <http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohidratos2.html>

### b) Pectinas

Constituyen un grupo heterogéneo de polisacáridos que se encuentran principalmente en la lamina media y en la pared celular primaria de plantas dicotiledóneas como el frijol (Brett y Waldron, 1990) y que de manera característica contienen azúcares ácidos como el D-galacturónico que están unidas por enlaces  $\alpha$ -(1-4), algunos de cuyos grupos carboxílicos están esterificados ya sea con metanol (metoxilados) ó con ácido acético (acetilados) y azúcares neutros como ramnosa, arabinosa y galactosa (Blancas, 2001).

La pectina cuenta con tres dominios característicos: homogalacturonanos, formados de cadenas no ramificadas de residuos de ácido galacturónico (García y

Peña, 1995); un segundo dominio formado por los ramnogalacturonanos tipo I, que representan el grupo más abundante en dicotiledóneas y están constituidos por una estructura formada por la repetición del disacárido galacturonil-ramnosil, del cual alrededor del 50% de la ramnosa presenta ramificaciones de azúcares entre los que predominan galactosa y arabinosa formando galactanos, arabinanos o arabinogalactanos (Carpita y Gibeaut 1993), y un tercer dominio constituidos por los ramnogalacturonanos tipo II, este dominio es escaso en la pared celular primaria y está formado por un eje rico de ácido galacturónico y con cadenas laterales que contienen 11 diferentes azúcares.

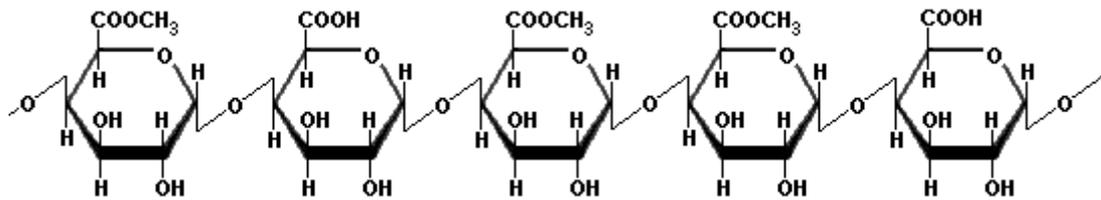


Figura 9. Estructura de pectina

Fuente: <http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohidratos2.html>

### c) Hemicelulosas

Las hemicelulosas están presentes tanto en paredes celulares primarias como secundarias y pueden unirse mediante puentes de hidrogeno a la celulosa. Incluyen a los xilanos que es un polisacárido formado por xilosas, representan el 5% de la pared celular primaria de dicotiledóneas y el 20% de las paredes celulares secundarias en dicotiledóneas. También los xiloglucanos, están presentes en este grupo y forman el 20% de las paredes celulares primarias de dicotiledóneas (Fry, 1988). Los xiloglucanos poseen una estructura base muy similar a la de la celulosa, ya que está constituida por una cadena lineal de residuos de glucosa unidos por enlaces tipo  $\beta$ -(1-4), y que a su vez contiene numerosos grupos laterales que pueden consistir de residuos de  $\alpha$ -D-xilosa,  $\alpha$ -L-arabinosa o  $\beta$ -D-galactosa, dependiendo de la especie, aunque en ocasiones a la galactosa se le adiciona una  $\alpha$ -L-fucosa. Ya que el esqueleto principal no varía entre los xiloglucanos de diferentes plantas y tejidos, la clasificación de éstos se realiza con base a la naturaleza de las ramificaciones.

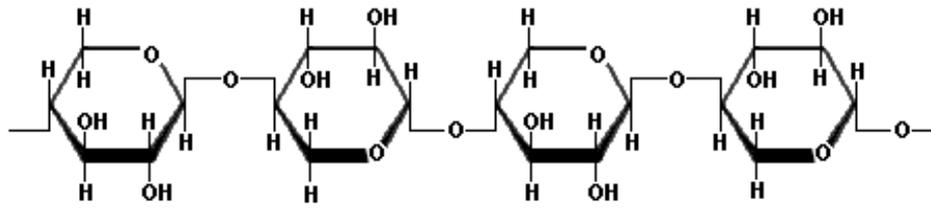


Figura 10. Estructura de xilanos

Fuente: <http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohidratos2.html>

### 1.5.2.2 Proteínas de pared celular

Las proteínas de la pared celular pueden ser estructurales o enzimas (Cosgrove, 1997). Las proteínas estructurales han sido divididas en tres clases principales: proteínas ricas en prolina, en glicina o proteínas conjugadas con pequeños oligosacáridos que dan lugar a las glicoproteínas, mismas que a su vez son ricas en un aminoácido poco usual como la hidroxiprolina. Dentro de este último grupo se localizan las extensinas, que son la familia de proteínas de la pared celular más estudiadas (Srivastava, 2002).

Por otro lado, las proteínas enzimáticas están distribuidas a lo largo de la pared celular. Muchas de estas enzimas parecen ser proteínas solubles, ya que son extraídas por solventes acuosos, las enzimas localizadas en la pared celular incluyen en general actividades de sintasas, transferasas, peroxidasas, invertasas e hidrolasas (Srivastava, 2002; Minic y Jouanin, 2006)

### 1.5.3 Interacción entre componentes de la pared celular

Los componentes de la pared celular se unen entre sí por medio de enlaces covalentes, iónicos e interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno. Aunque se tiene el conocimiento de los enlaces químicos e interacciones fisicoquímicas que se presentan en la pared celular es difícil identificar con certeza los tipos de enlaces y los sustituyentes presentes en la intrincada estructura que constituye la pared celular (Talbot y Ray, 1992; Carpita y Gibeau, 1993).

En los modelos actuales de organización de polímeros en paredes celulares primarias, se propone que las microfibrillas están embebidas en una matriz de proteínas y polisacáridos no celulósicos entreteljidos como xiloglucanos y posiblemente arabinosilanos y glucomanos (Talbot y Ray, 1992; Carpita y Gibeaut, 1993). Se ha previsto que una proporción de estos polisacáridos están unidos por puentes de hidrógeno a las superficies de microfibrillas de celulosa y como consecuencia de su longitud, son capaces de interactuar con la superficie de más de una microfibrilla y así actúan como un pegamento entre ellas.

Dentro de la matriz hay varias posibilidades de formación de puentes de hidrógeno entre polisacáridos y varias opciones de interacciones iónicas y salinas entre polisacáridos y proteínas (Iiyama *et al.*, 1994).

Los enlaces iónicos son la forma de unión más frecuente entre los polímeros que contienen grupos con carga eléctrica, ejemplos de lo anterior son:

- a) el enlace iónico entre la extensina, con carga neta positiva, y los galacturonanos, cargados negativamente
- b) el enlace que ocurre entre las cadenas del ácido galacturónico con los iones de calcio y que actúan como puentes iónicos entre residuos de galacturonano cargados negativamente (Jarvis, 1982).

Todas estas fuerzas no covalentes son necesarias para alcanzar una estabilidad. La interacción entre los polímeros y sus enlaces mantiene la integridad de la pared celular, y explica parcialmente sus propiedades fisicoquímicas, el aprovechamiento nutricional de los polisacáridos por los herbívoros, su uso comercial potencial, los mecanismos de las plantas para la tolerancia de factores adversos, etc. (Fry, 1986).

#### 1.5.4 Influencia de la solubilidad de los componentes de la pared celular en su fraccionamiento

La extracción de cada grupo de polisacáridos de la pared celular es dependiente de sus características químicas, de las interacciones con los otros componentes y de su localización en la red de compuestos; por ejemplo, las sustancias pécticas son solubles en agua caliente, disoluciones acuosas ligeramente acidificadas, y en disolución acuosa de oxalato de amonio o de otros agentes quelantes como el ácido ciclohexano-trans-1,2-diamino-N, N, N', N'- tetracetato (CDTA) (O'Nelly *et al.*, 1990). Sin embargo, la composición y proporción extraída de las sustancias pécticas se modifica con el método y disolvente utilizado para su extracción, así como con el tipo de tejido de la planta y con el estado de desarrollo de la pared celular (Seveldran *et al.*, 1985).

De acuerdo a su solubilidad en agua, las pectinas se clasifican en tres tipos: las protopectinas, polímeros de alto peso molecular insolubles en agua; los ácidos pectínicos o pectinas altamente metiladas, solubles en el agua (Mc Feeters y Armstrong, 1984) y los ácidos pécticos o pectinas poco metiladas (pectatos), que pueden interaccionar con iones y cuya solubilidad depende de la cantidad de cationes a ellos asociados (Hudson y Buesscher, 1986).

Las hemicelulosas son por definición, insolubles en agua, pero se disuelven en álcalis, las moléculas menos ramificadas tienden a requerir álcalis más fuertes para solubilizarse (Moreno, 2008). Las hemicelulosas se pueden extraer con NaOH o KOH, los cuales rompen enlaces éster, pero no por agentes quelantes en frío (Cosgrove, 2005). De las hemicelulosas solubilizadas, una parte precipita al neutralizar la solución en las que están solubilizadas (hemicelulosa A), el resto se obtiene precipitándolas con etanol frío agregado al sobrenadante (hemicelulosa B) (Southgate, 1976; Peña y Ortega, 1984 y 1986). La hemicelulosa A se caracteriza por tener alto peso molecular, insolubilidad en agua fría y bajo contenido de ácido glucourónico y arabinosa; al contrario, la hemicelulosa B que contiene moléculas

de bajo peso molecular, altamente ramificadas y solubles en agua, con alto contenido de ácido glucourónico y arabinosa (Dekker, 1979).

La hidrólisis de hemicelulosas genera diferentes hexosas (como glucosa, galactosa, manosa), pentosas (como xilosa y arabinosa) y en ocasiones ácidos urónicos (como ácido galacturónico) (Krishnamurthy, 1999).

Para la solubilización de la celulosas se utiliza una solución muy concentrada, alrededor de 20% o 4M, de NaOH o KOH y solo se solubiliza parcialmente; la  $\alpha$ -celulosa es insoluble en 17.5% de NaOH; y generalmente queda en el residuo o fracción de la pared celular que no se solubiliza. La celulosa aún con el uso de ácidos y temperatura es difícil de hidrolizarse (Dekker, 1979).

#### **1.5.5 Influencia de la dureza de pared celular en la susceptibilidad al ataque de insectos**

Uno de los atributos de principal interés es la dureza de la pared celular, ya que esta influye directamente en el grado de susceptibilidad del frijol al ataque de diversos insectos, cuya resistencia es atribuida a la rugosidad y dureza de la testa, siendo esta la primer barrera que deben penetrar los insectos. A su vez, la dureza de la testa está determinada por la estructura y composición de la pared celular, ya que su grosor es consecuencia de la acumulación de lignina y celulosa que se encuentra en ella, suministrando la lignina un mayor grosor y resistencia en comparación a las paredes celulares conformadas por pectina y celulosa.

En estudios previos se evaluó la tolerancia de diferentes variedades comerciales de frijol al ataque del gorgojo del frijol (*Zabrotes subfasciatus Boheman*), y se encontró que dos variedades eran más susceptibles (Bayo y Negro Jamapa) y dos más eran menos susceptibles (Flor de Mayo y Mayocoba) al ataque del gorgojo del frijol. Además, se encontró una correlación positiva entre el contenido de cenizas y taninos del grano así como el grosor de la cascara con la ovoposición, y una correlación positiva entre el contenido de proteínas y la emergencia; sin embargo,

estos resultados no explicaban satisfactoriamente la tolerancia de los frijoles al insecto, y como la mayor correlación se encontró con factores relacionados con la dureza de la testa, se propuso evaluar el principal componente celular que determina la fuerza del tejido vegetal, es decir, la pared celular (Rodríguez, 2011).

En otra investigación se evaluó la facilidad de extracción de los principales componentes de la pared celular de la testa de las dos variedades susceptibles y las dos menos susceptibles al ataque del gorgojo del frijol (Bayo y Negro Jamapa y Mayocoba y Flor de Mayo respectivamente). Los resultados mostraron que la facilidad de extracción fue mayor en las variedades susceptibles comparado con las variedades menos susceptibles y que las dos variedades mas contrastantes fueron Negro Jamapa, donde fue más fácil obtener las fracciones de pared celular, lo que indica una menor interacción química entre ellos y una pared celular menos rígida; y Mayocoba, donde fue más difícil solubilizar los componentes de pared celular, indicando una mayor interacción química entre ellos y por lo tanto una pared celular más rígida (Moreno, 2008).

Es por esto que se tiene particular interés en caracterizar los polisacáridos de ambas variedades contrastantes en su susceptibilidad (Negro Jamapa y Mayocoba) para determinar la influencia de estos componentes en la susceptibilidad de ambas variedades al insecto, a través del análisis de las interacciones entre los componentes de sus paredes celulares.

## 2 OBJETIVOS

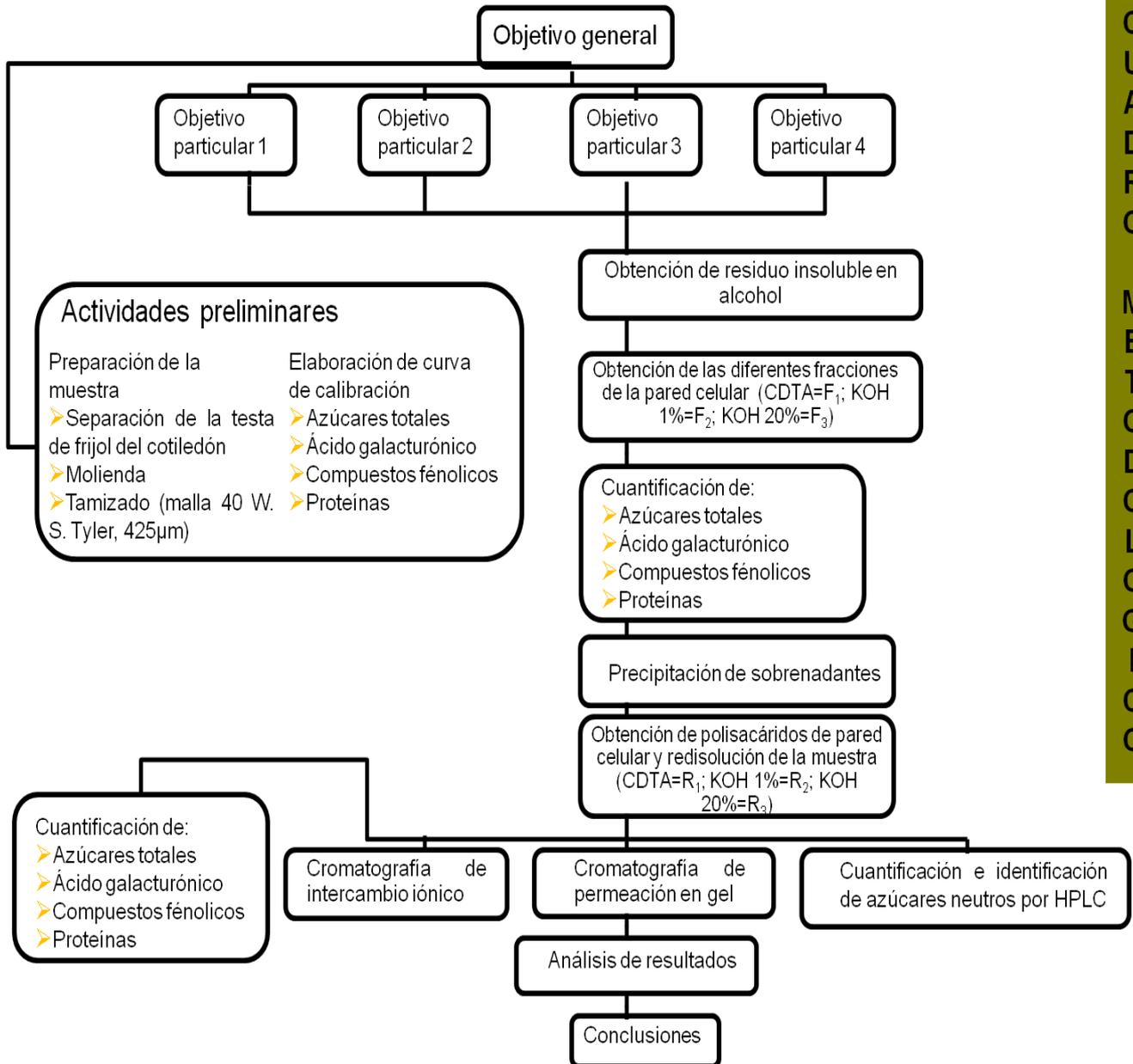
### OBJETIVO GENERAL

Caracterizar químicamente los polisacáridos de pared celular de testa de dos variedades de frijol (Negro Jamapa y Mayocoba) para evaluar si existen diferencias entre ellos debidas a su susceptibilidad al ataque de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman).

### OBJETIVOS PARTICULARES

1. Cuantificar químicamente los diferentes polisacáridos de pared celular de testa de frijol Negro Jamapa y Mayocoba para evaluar si existen diferencias entre ellos.
2. Determinar la distribución del ácido galacturónico en los polisacáridos de pared celular de testa de las dos variedades de frijol para evaluar si tiene una relación con la susceptibilidad al ataque del gorgojo del frijol.
3. Evaluar si el tamaño de los polisacáridos de pared celular de testa de frijol Negro Jamapa es diferente al del frijol Mayocoba y esto influye en su susceptibilidad al *Zabrotes subfasciatus*.
4. Cuantificar la composición de los azúcares que forman los diferentes polisacáridos obtenidos de la pared celular de testa para identificar diferencias en su composición.

### 3 MATERIALES Y METODOS



### 3.1 Material

En este trabajo se emplearon dos variedades de frijol comercial: Mayocoba (Figura 11) y Negro Jamapa (Figura 12) las cuales, al ser infestadas con *Zabrotes subfasciatus* en trabajos previos, se observó que Negro Jamapa fue muy susceptible al ataque del gorgojo mientras que Mayocoba fue poco susceptible.

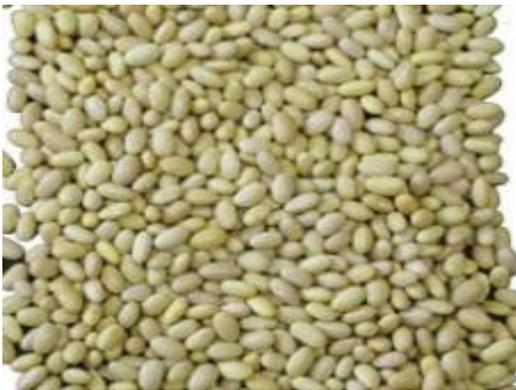


Figura 11. Frijol Mayocoba cosecha 2009, Sinaloa



Figura 12. Frijol Negro Jamapa cosecha 2009, Jalisco.

#### 3.1.1 Preparación de la muestra

Se removieron el eje embrionario y los cotiledones de ambas variedades de frijol, con ayuda de navajas de un solo filo, para obtener únicamente la testa o cubierta exterior de los frijoles. La testa se congeló con nitrógeno líquido y se molió en un mortero. Posteriormente se utilizó un micromolino de cuchillas marca Arthur H. Thomas Co., con un motor de  $\frac{1}{4}$  HP de 1725 RPM (Figura 13), con una malla # 40 W. S. Tyler. (425 $\mu$ m) para obtener la harina.



Figura 13. Micromolino de cuchillas

### 3.2 Aislamiento de la pared celular

A partir de 10 gramos de harina de testa, se obtuvo una fracción rica en paredes celulares mediante una extracción con metanol al 80%, ya que en general los polisacáridos son insolubles en alcoholes a esta concentración, además, el calor inactiva las enzimas; por lo tanto, la extracción se realizó con metanol en ebullición y agitación por una hora (Figura 14), lo cual se denominó residuo insoluble en alcohol (RIA) y se realizó como se indica a continuación: Se colocaron 2.5 g de la harina en un matraz con tapón, al que se le adicionaron 4 volúmenes de metanol al 80% y la solución se llevó a ebullición durante una hora con agitación magnética, se centrifugó la muestra a 3219 g durante 15 minutos y se eliminó el metanol por decantación, a las mismas condiciones se realizaron una serie de lavados utilizando etanol al 85% (5 lavados), hasta obtener un residuo de etanol claro, el disolvente de lavado se desechó (aproximadamente 50 mL), y con ayuda de un desecador con vacío, se secó la muestra hasta llegar a peso constante.

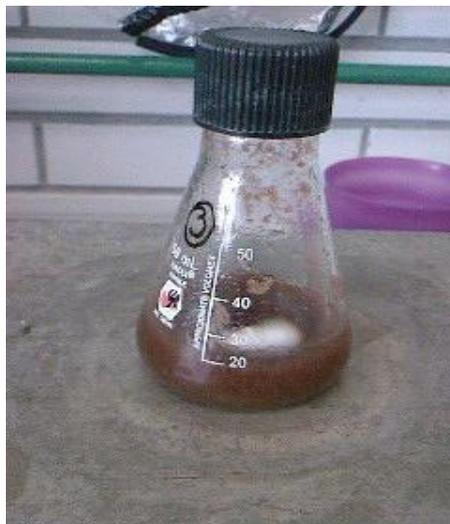


Figura 14. Obtención de residuo insoluble en alcohol

### 3.3 Extracción de los polisacáridos de la pared celular

Para la extracción de la pared celular se utilizaron disolventes con diferente polaridad, siendo el CDTA (Trans-1,2-diaminociclo-hexano N, N', N'-tetra-ácido acético) de baja polaridad, contrario al KOH, que se utilizó a 2 diferentes

concentraciones (1 y 20 %), como lo propone Méndez (2003) y Blancas (2001) en trabajos previos, se decidió implementar estos disolventes debido a su diferente afinidad con los polisacáridos de pared celular.

### 3.3.1 Fraccionamiento de la pared celular

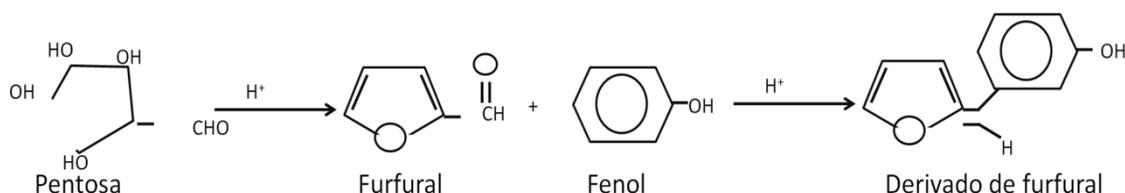
Se colocó 1g de residuo insoluble en alcohol en un matraz con tapón de rosca, a cada una de las muestras se le añadieron 10 mL de CDTA a pH 8, y se sometieron a agitación magnética durante 19 horas (Figura 15), se centrifugaron (centrifuga IEC Centra 4B) durante 10 minutos a 2706 g, se midió el volumen del sobrenadante obtenido y se guardó, se realizó un lavado con etanol al 85% y se centrifugó a 2706 g durante 5 minutos, para obtener la primer fracción (F<sub>1</sub>), Posteriormente se añadieron a la pastilla resultante, 10 mL de KOH al 1% además de 3mg/mL de borohidruro de sodio, esta mezcla se sometió a una atmósfera de nitrógeno gas durante 5 minutos y la muestra se agitó durante 2 horas, se centrifugó por 10 minutos a 2706 g, se midió el volumen del sobrenadante y se guardó, nuevamente se realizó un lavado con etanol al 85% y se centrifugó a 2706 g durante 5 minutos, para obtener la segunda fracción (F<sub>2</sub>). Se repitió el mismo procedimiento de KOH al 1% pero ahora utilizando KOH al 20% (F<sub>3</sub>). Al finalizar, se colocaron las pastillas resultantes en cajas metálicas y se secaron hasta llegar a peso constante en un desecador por vacio (Anexo 1).



Figura 15. Fraccionamiento de la pared celular de testa de frijol con diferentes disolventes

### 3.4 Cuantificación de azúcares totales por el método de Fenol-Sulfúrico

Se utilizó el método Fenol-Sulfúrico que se fundamenta en la reacción específica de carbohidratos con un grupo reductor más fenol en un medio fuertemente ácido para formar un compuesto colorido (amarillo-naranja) derivado del furfural (Dubois *et al.*, 1956) y que se muestra a continuación:

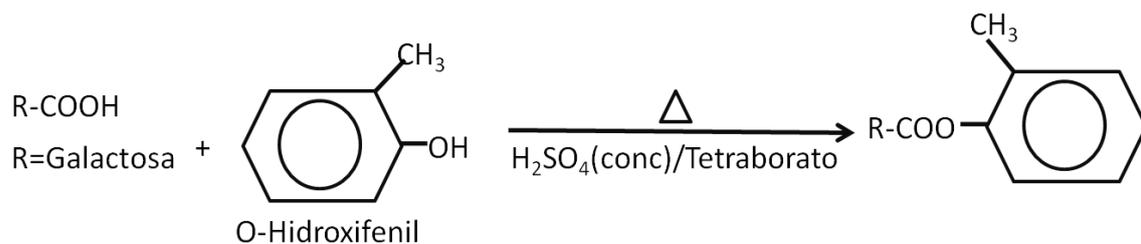


Se tomaron alícuotas de cada fracción (por triplicado) a las cuales se les adicionó agua desionizada suficiente para 500  $\mu$ L, se adicionaron 300  $\mu$ L de fenol acuoso al 5% (p/v), mas 1.8 mL de ácido sulfúrico concentrado directamente a la muestra y se agito enérgicamente, se dejó reposar durante 10 min a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ$ ) y se cuantificó en un espectrofotómetro Sequoia-Turner, Modelo 340 a una longitud de onda de 485 nm.

Para obtener las concentraciones de las diferentes fracciones a partir de las absorbancias obtenidas, fue necesario realizar una curva de calibración, utilizando un estándar de glucosa a una concentración de 200  $\mu$ g/mL.

### 3.5 Cuantificación de ácido galacturónico

Se cuantificó ácido galacturónico por el método colorimétrico propuesto por Blumenkrantz y Asboe-Hansen (1973), el cual se fundamenta en la reacción de carbohidratos con un grupo carboxilo más o-hidroxifenil que en un medio oxidante agresivo (ácido sulfúrico calentado) con tetraborato forma un compuesto colorido (amarillo-naranja) cíclico que se muestra enseguida:



Se tomaron alícuotas de cada fracción (por triplicado) a las cuales se les adicionó agua destilada suficiente para 400  $\mu\text{L}$ , se colocaron las muestras en un baño de hielo, donde posteriormente se les adicionó 2.4 mL de una solución de tetraborato de sodio 0.0125 M en ácido sulfúrico concentrado, se agitaron cada una de las muestras y se dejaron enfriar durante 1 minuto, posteriormente se colocaron directamente en agua en ebullición durante 5 minutos, para nuevamente dejar enfriar durante 1 minuto en un baño de hielo y finalmente agregar 40  $\mu\text{L}$  de NaOH al 5% (p/v) al control y 40  $\mu\text{L}$  de o-hidróxifenil al 0.15% (p/v) a la muestra, se agitó y dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se cuantificaron las muestras en un espectrofotómetro Sequoia-Turner, Modelo 340 a una longitud de onda de 520 nm.

Para obtener las concentraciones de las diferentes fracciones ( $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_3$ ), a partir de las absorbancias obtenidas, fue necesario realizar una curva de calibración, utilizando un estándar de ácido galacturónico a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### 3.6 Cuantificación del contenido de proteína por el método de Lowry

El método de Lowry se basa en la reacción de las proteínas con el reactivo de Folin (conformado por molibdato y tungstato sódico), realizándose un proceso de oxidoreducción que se acompaña de la formación de un color azul característico (Lowry *et al.*, 1951).

- Se tomaron alícuotas de cada fracción ( $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_3$ ) por triplicado a las cuales se les adicionó agua destilada suficiente para 1000  $\mu\text{L}$ , se agregó 1000  $\mu\text{L}$  de

reactivo "A" (NaOH 0.8 N, SDS al 10%, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10%, CuSO<sub>4</sub> al 0.1%, tartrato de sodio y potasio al 0.2 %) además de 1000 µL de reactivo "B" (1mL de Folin/5mL de H<sub>2</sub>O), se agitó y dejó desarrollar el color durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se cuantificaron las muestras en un espectrofotómetro LKB Biochrom Ultrospec II a una longitud de onda de 750 nm.

Previamente se realizó una curva de calibración utilizando un estándar de albúmina bovina 1 µg/ml, para conocer la concentración de proteína presente en la muestra.

### 3.7 Cuantificación de compuestos fenólicos.

La cuantificación de compuestos fenólicos se basa en una reacción colorimétrica de oxido-reducción en la cual el agente oxidante utilizado es el reactivo de Folin (molibdato y tungstato sódico) (Gracia, 2008).

Se tomaron alícuotas de cada fracción (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>) por triplicado a las cuales se les adicionó 3750 µL de agua destilada, además de 250 µL de Folin y 500 µL de solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, se agitó y dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se cuantificaron las muestras en un espectrofotómetro LKB Biochrom Ultrospec II a una longitud de onda de 760 nm.

Previamente se realizó una curva de calibración utilizando un estándar de ácido tánico (0.005g en 50 mL H<sub>2</sub>O), para conocer la concentración de compuestos fenólicos presente en la muestra.

### 3.8 Precipitación de polisacáridos

Se añadió a cada uno de los sobrenadantes obtenidos en el apartado 3.3.1 (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>) 10 mL de etanol al 85%, y se colocaron en un baño de hielo con la finalidad de contribuir a la precipitación de las muestras, posteriormente se centrifugaron a 2706 g durante 10 minutos, se lavaron con acetona y se centrifugaron a las mismas

condiciones, se colocaron las pastillas en cajas metálicas, mismas que se introdujeron en un desecador por vacío hasta llegar a peso constante.

### 3.9 Disolución de polisacáridos secos

Se tomó una porción de los polisacáridos secos y se disolvieron con agua, utilizando una relación de 1mg/mL, para posteriormente cuantificar a cada una de estas soluciones, azúcares totales, ácido galacturónico, proteínas y compuestos fenólicos.

### 3.10 Cromatografía de intercambio iónico

Con el fin de poder conocer y analizar la distribución de ácido galacturónico, se empacó una columna cuya fase estacionaria fue la resina dietil-amino-etil-celulosa (Sigma) ya que tiene propiedades intercambiadoras debido al pequeño número de grupos carboxilo que contiene su estructura, y como eluyentes; solución amortiguadora de fosfatos 10mM pH=6.5 y soluciones de NaCl a 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 N, siguiendo la metodología propuesta por Blancas (2001).

Posteriormente se adicionó 1 mL de solución redisuelta de polisacáridos ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ), a la cual se le añadieron aproximadamente 35 mL de buffer de fosfatos (342 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  aforados a 250 mL, 571.9 mg de  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  aforados a 250 mL; mezclar 60 mL de solución de  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  con 200 mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), la elución se realizó colectando fracciones del mismo volumen y utilizando concentraciones crecientes de NaCl (0.25, 0.5, 0.75 y 1 N).

A cada una de las fracciones se le determinó azúcares totales por el método de fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956), así como ácido galacturónico por el método colorimétrico (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973).



Figura 16. Columna para cromatografía de intercambio iónico

### 3.11 Cromatografía de filtración en gel

Para determinar y analizar el tamaño de los polisacáridos contenidos en cada una de las diferentes fracciones ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ) de la pared celular se utilizó una columna con una fase estacionaria del gel Sephacryl S-400 (Pharmacia) y como eluyente amortiguador de acetato de amonio 200mM pH=5, siguiendo la metodología propuesta por Ibáñez (2009).



Figura 17. Columna para la cromatografía de filtración en gel.

### 3.12 Cuantificación e identificación de azúcares neutros por HPLC

Se realizó en un cromatógrafo marca Waters modelo 60F, con un detector de índice de refracción marca Waters modelo 410, con una columna de 4.6 mm x 25 cm, con una fase estacionaria de Supelcosil LC-NH<sub>2</sub> (5 micrones) y una fase móvil isocrática de acetonitrilo: agua (85:15), a una temperatura de 35 a 40°C, a un flujo de 1.2 ml/min (Moreno, 2009).

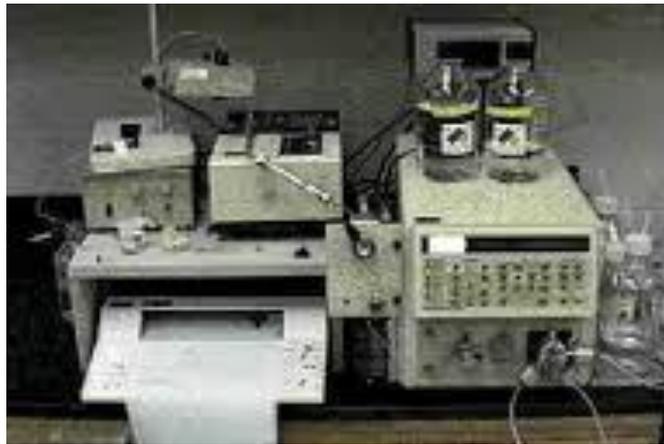


Figura 18. Cromatografía para HPLC

### 3.13 Análisis estadístico

Para todas las pruebas se realizó una prueba de rango múltiple t- student con un nivel de significancia de 0.05. Todas las pruebas se realizaron por triplicado y se calculó su valor promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 4.1 Determinación de la composición química de los polisacáridos solubles de la pared celular de la testa de dos variedades de frijol

Con la finalidad de conocer la composición química de los polisacáridos de pared celular obtenidos mediante su solubilización con diferentes solventes (Apartado 3.3), se realizó la cuantificación de azúcares totales y ácido galacturónico (Tabla 5) en las fracciones solubles ( $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_3$ ). Por otra parte, para determinar el grado de contaminación, de estos polisacáridos, por otros compuestos químicos presentes en la pared celular de la testa del frijol, como fenoles y proteínas (Champ *et al.*, 2003; Martínez-Valverde *et al.*, 2000), se cuantificaron estos compuestos (Tabla 6). En todos los casos, se realizaron curvas de calibración (ver anexos 2 y 3), para poder cuantificar la concentración de cada componente químico mencionado antes, en las diferentes muestras.

#### 4.1.1 Cuantificación de azúcares totales y ácido galacturónico de los polisacáridos solubles de la pared celular

Para determinar la composición de los diferentes polisacáridos que componen la pared celular de la testa del frijol, y tratar de sugerir su estructuración, se cuantificó el contenido de azúcares totales y ácido galacturónico (Tabla 5) en cada fracción ( $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_3$ ), ya que dependiendo de las propiedades químicas de los disolventes utilizados y del tipo de interacción que haya entre estos polisacáridos, reflejará el contenido de los mismos, considerando que a mayor interacción química, la relación es directa con una pared celular más fuerte (Moreno, 2008).

Las cuantificaciones de azúcares totales y ácido galacturónico de los sobrenadantes obtenidos del fraccionamiento ( $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_3$ ) de la pared celular de testa de frijol con los diferentes disolventes (Apartado 3.3) de cada una de las variedades evaluadas se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Cuantificación de ácido galacturónico y azúcares totales de diferentes fracciones de pared celular de testa de frijol Negro Jamapa y Mayocoba.

g/100 g RIA		A.T.c	A.G.c	A.N.	A.N./A.G.
N J	<b>CDTA</b>	1.40+/- 0.06 <sup>a*</sup>	0.92 +/- 0.22 <sup>a</sup>	0.48 <sup>a</sup>	0.52 <sup>a</sup>
	<b>KOH 1%</b>	3.36 +/- 0.53 <sup>a</sup>	2.20 +/- 0.52 <sup>a</sup>	1.16 <sup>a</sup>	0.53 <sup>a</sup>
	<b>KOH 20%</b>	6.37 +/- 0.94 <sup>a</sup>	0.32 +/- 0.17 <sup>a</sup>	6.05 <sup>a</sup>	18.90 <sup>a</sup>
	<b>Residuo (%)</b>	78.4 <sup>a</sup>	N.D.	N.D.	N.D.
Rendimiento (%)		89.5 <sup>a</sup>	N.D.	N.D.	N.D.
MC	<b>CDTA</b>	1.71 +/- 0.34 <sup>b</sup>	0.61 +/- 0.72 <sup>b</sup>	1.10 <sup>b</sup>	1.80 <sup>b</sup>
	<b>KOH 1%</b>	1.52 +/- 0.68 <sup>b</sup>	0.21 +/- 0.14 <sup>b</sup>	1.31 <sup>a</sup>	6.24 <sup>b</sup>
	<b>KOH 20%</b>	2.43 +/- 0.58 <sup>b</sup>	0.12 +/- 0.02 <sup>b</sup>	2.31 <sup>b</sup>	19.25 <sup>a</sup>
	<b>Residuo (%)</b>	83.4 <sup>a</sup>	N.D.	N.D.	N.D.
Rendimiento (%)		89.1 <sup>a</sup>	N.D.	N.D.	N.D.

\*Medias con diferentes letras entre mismas fracciones de las dos diferentes variedades indican diferencia estadísticamente significativa ( $P \leq 0.05$ ). N.D.= No determinada, RIA= Residuo insoluble en alcohol, NJ=negro Jamapa, MC=Mayocoba, A.T.c.=Azúcares totales corregidos, A.G.c.=Ácido galacturónico corregido, A.N.=Azúcares neutros, A.N./A.G.=Azúcares neutros/ácido galacturónico.

Los resultados mostraron que la variedad Negro Jamapa tuvo mayor contenido de ácido galacturónico en cada una de las diferentes fracciones de pared celular, en comparación con la variedad Mayocoba y estas diferencias son estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ), este resultado es más claro al observar la relación azúcares neutros vs ácido galacturónico (AN/AG) (Tabla 5).

El mayor contenido de ácido galacturónico implica la presencia de pectinas, las cuales están relacionadas con una pared celular con menos fuerza, debido a que los enlaces entre éstos polisacáridos son más débiles (iónicos, puentes de hidrógeno) que los que forman las hemicelulosas o celulosa (covalentes) (Carpita, 2000). Por otra parte, la facilidad de extracción de los polisacáridos fue mayor en la variedad Negro Jamapa, pues la cantidad obtenida de cada fracción ( $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_3$ ), determinada

como azúcares totales, es mayor en las fracciones solubles de KOH al 1 y 20% (F<sub>2</sub> y F<sub>3</sub>), es decir, es más fácil solubilizar estas fracciones. Además, al comparar los residuos obtenidos de ambas variedades se observó que son altos; sin embargo, en la variedad Mayocoba se obtuvo un mayor residuo, que es la parte de la pared celular que no se solubiliza y le confiere mayor rigidez al tejido por estar formada por celulosa cristalina, porque aun con soluciones muy concentradas como KOH al 20%, estas celulosas solo logran solubilizarse parcialmente, quedando la mayor cantidad de las mismas en el residuo o fracción de pared celular que no logró solubilizarse (Vicente, 2004). Estos resultados se pueden relacionar con la menor tolerancia al ataque de insectos del frijol Negro Jamapa en comparación con la variedad Mayocoba (Moreno, 2008), ya que se ha reportado que a mayor dureza de la testa es más difícil que la larva del insecto penetre al grano (Villaseñor *et al.*, 1992).

#### 4.1.2 Cuantificación de compuestos fenólicos y proteínas de diferentes fracciones de pared celular de testa de frijol Negro Jamapa y Mayocoba

Como se mencionó antes, se determinó el grado de impurezas en cada una de las fracciones solubles (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>) de polisacáridos, cuantificando proteínas solubles y compuestos fenólicos (Tabla 6), ya que en la pared celular, y sobre todo de testa, éstos son los dos grupos de compuestos químicos más abundantes después de los azúcares (Champ *et al.*, 2003; Dueñas *et al.*, 2006).

Tabla 6 Cuantificación de proteínas y compuestos fenólicos de diferentes polisacáridos solubles en fracciones de pared celular de testa de frijol Negro Jamapa y Mayocoba.

g/100 g RIA		Proteínas	Compuestos fenólicos
NJ	<b>CDTA</b>	1.02 +/- 0.29 <sup>a*</sup>	0.42 +/- 0.15 <sup>a</sup>
	<b>KOH 1%</b>	3.72 +/- 1.39 <sup>a</sup>	0.65 +/- 0.17 <sup>a</sup>
	<b>KOH 20%</b>	1.14 +/- 0.35 <sup>a</sup>	0.93 +/- 0.31 <sup>a</sup>
MC	<b>CDTA</b>	0.17 +/- 0.08 <sup>b</sup>	0.24 +/- 0.02 <sup>b</sup>
	<b>KOH 1%</b>	0.37 +/- 0.15 <sup>b</sup>	0.18 +/- 0.04 <sup>b</sup>
	<b>KOH 20%</b>	1.90 +/- 0.67 <sup>b</sup>	0.40 +/- 0.11 <sup>b</sup>

\*Medias con diferentes letras entre mismas fracciones de las dos diferentes variedades indican diferencia estadísticamente significativa (P ≤ 0.05). RIA= Residuo insoluble en alcohol, NJ=negro Jamapa, MC=Mayocoba.

En todas las fracciones solubles ( $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_3$ ) se obtuvieron impurezas tanto de proteínas como de fenoles. Estas impurezas fueron mayores para todas las fracciones, en la variedad Negro Jamapa fueron, aproximadamente 8% mas, en comparación con la variedad Mayocoba (3.26%) (Tabla 6). Por lo tanto, estos resultados nos muestran la necesidad de eliminar esas impurezas de las muestras, para poder analizar mejor los polisacáridos obtenidos del fraccionamiento de la pared celular. Esto se logró precipitando con etanol al 85% los polisacáridos presentes en los sobrenadantes (Peña-Valdivia y Ortega-Delgado, 1984).

#### **4.1.3 Cuantificación de proteínas y fenoles a los polisacáridos precipitados de la pared celular re-disueltos en agua**

Una vez precipitados los sobrenadantes de cada una de las fracciones ( $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_3$ ), se re-disolvió en agua una muestra de los polisacáridos obtenidos y se cuantificaron proteínas solubles y fenoles para ambas variedades de frijol. Los resultados mostraron que no se detectó ninguno de los dos compuestos en las fracciones re-disueltas de ambas variedades ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ), es decir, al precipitar los sobrenadantes con etanol al 85%, se logró eliminar las impurezas que representaban estos compuestos, que previamente habían sido identificados en cada una de las fracciones ( $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_3$ ). Por lo tanto, las muestras de polisacáridos que componen las diferentes fracciones de la pared celular de la testa de las dos variedades de frijol estudiadas, podrían analizarse correctamente.

#### **4.1.4 Cuantificación de azúcares totales y ácido galacturónico a polisacáridos precipitados, por etanol al 85%, de la pared celular**

Nuevamente se realizó la cuantificación de azúcares totales y ácido galacturónico a los polisacáridos precipitados, para determinar que tanto había cambiado su composición con respecto a lo encontrado antes de precipitarlos.

Al cuantificar la composición química de los polisacáridos precipitados (Tabla 7), se encontró que el contenido de ácido galacturónico fue mayor en la variedad Negro Jamapa en relación a la variedad Mayocoba, es decir, la composición de los polisacáridos fue similar a la encontrada en las fracciones solubles.

Tabla 7. Cuantificación de ácido galacturónico y azúcares totales de polisacáridos precipitados con etanol de las diferentes fracciones de pared celular de testa de frijol Negro Jamapa y Mayocoba.

mg/100 mg de Polisacáridos precipitados		A.T.c	A.G.c	A.N.	A.N./A.G.
N J	<b>CDTA</b>	20.1 +/- 0.01 <sup>a</sup>	14.1 +/- 0.01 <sup>a</sup>	6.0 <sup>a</sup>	0.43 <sup>a</sup>
	<b>KOH 1%</b>	28.9 +/- 0.01 <sup>a</sup>	28.7 +/- 0.02 <sup>a</sup>	0.2 <sup>a</sup>	0.001 <sup>a</sup>
	<b>KOH 20%</b>	10.4 +/- 0.003 <sup>a</sup>	3.7 +/- 0.01 <sup>a</sup>	6.7 <sup>a</sup>	1.81 <sup>a</sup>
MC	<b>CDTA</b>	17.1 +/- 0.01 <sup>b</sup>	8.0 +/- 0.01 <sup>b</sup>	9.1 <sup>b</sup>	1.14 <sup>b</sup>
	<b>KOH 1%</b>	18.7 +/- 0.01 <sup>b</sup>	6.7 +/- 0.01 <sup>b</sup>	11.4 <sup>b</sup>	1.70 <sup>b</sup>
	<b>KOH 20%</b>	26.8 +/- 0.29 <sup>b</sup>	1.2 +/- 0.001 <sup>b</sup>	25.6 <sup>b</sup>	21.33 <sup>b</sup>

\*Medias con diferentes letras entre mismas fracciones de las dos diferentes variedades indican diferencia estadísticamente significativa ( $P \leq 0.05$ ). NJ=negro Jamapa, MC=Mayocoba, A.T.c.=Azúcares totales corregidos, A.G.c.=Ácido galacturónico corregido, A.N.=Azúcares neutros, A.N./A.G.=Azúcares neutros/ácido galacturónico.

Aunque la variedad Negro Jamapa tuvo, aparentemente, mayor cantidad de polisacáridos secos, determinados como azúcares totales, que Mayocoba, esto no fue así; lo que sucedió es que, los polisacáridos de la pared celular de Mayocoba fueron menos solubles en agua y la cuantificación fue incompleta, debido a que el contenido de celulosa en la variedad MC es mayor en comparación a NJ (Silva-Cristóbal, 2007). Como se sabe, la pared celular está compuesta de diferentes polisacáridos entre los que se encuentran, fibras de celulosa que forman el componente más resistente de la pared celular, y le confieren rigidez y resistencia a la ruptura y también se conoce que estos compuestos son insolubles en agua (Southgate, 1976; Peña-Valdivia y Ortega-Delgado, 1984), lo que nos sugieren estos resultados es, que los polisacáridos obtenidos de la pared celular de la testa

de MC son de este tipo y por lo tanto forman una pared celular más fuerte y consecuentemente son poco solubles en agua.

Por otra parte, al obtener un contenido considerablemente mayor de ácido galacturónico en la variedad Negro Jamapa, en comparación al frijol Mayocoba, es posible afirmar que la abundancia de ácido galacturónico, responsable de proveer de plasticidad a la pared celular (Carpita y Gibeaut, 1993; Carpita, 1996) ocasiona que la rigidez sea menor, ocasionando que la función de su pared como mecanismo de defensa ante los insectos sea deficiente en comparación al frijol Mayocoba, y que influye en que este último sea menos susceptible al ataque de insectos (Moreno, 2008).

## 4.2 Cromatografía de intercambio iónico

Con el fin de poder conocer la distribución de ácido galacturónico, en los polisacáridos precipitados de las fracciones de pared celular obtenidas ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ), se analizaron por cromatografía de intercambio iónico, monitoreando el comportamiento de cada uno de ellos, a través de la cuantificación de azúcares totales y ácido galacturónico.

Se colectaron fracciones de 2.5ml. En las primeras diez fracciones se usó como eluyente amortiguador de fosfatos, en las siguientes diez se usó NaCl 0.25 N, en diez más NaCl 0.5 N, en las cinco fracciones siguientes NaCl 0.75 N y en las últimas cinco NaCl 1N. La distribución del ácido galacturónico en los polisacáridos evaluados se reflejaría en la elución de la siguiente manera: las fracciones sin ácido galacturónico eluirían en las diez primeras fracciones, en las siguientes diez fracciones aumentaría la fuerza de unión del ácido galacturónico, en los polisacáridos analizados, a la fase estacionaria de la columna y esta fuerza se incrementaría conforme la muestra eluyera en mayor concentración de cloruro de sodio; lo cual sería un reflejo de la longitud de la cadena de homogalacturonano presente, esto se determinó a través de la calibración de la columna, utilizando estándares de pectina, glucosa y ácido galacturónico. De tal forma que las pectinas que interaccionen con mayor fuerza con los grupos cargados de la resina tendrán regiones de ácido urónico de una mayor longitud, que aquellos que se unen menos (Blancas, 2001).

La distribución que se representa gráficamente en la Figura 19, muestra presencia de polisacáridos solubles en CDTA ( $R_1$ ) con poco ácido galacturónico en la variedad Mayocoba y sin ácido en Negro Jamapa (Figura 19a), ya que eluyeron con la solución amortiguadora sin fuerza iónica (diez primeras fracciones). La fracción principal para la variedad NJ eluyó con NaCl 0.25N mientras que para MC lo hizo con NaCl 0.5N. El contenido de ácido galacturónico (Figura 19b) coincidió con el de azúcares totales (Figura 19a). Los polisacáridos de la variedad NJ necesitaron

menor fuerza iónica para eluir, mientras que para MC fue más alta. Esto nos indica que la capacidad de interacción, a través de enlaces iónicos del grupo carboxilo del ácido galacturónico con otros compuestos iónicos de la pared celular como cationes, proteínas, fenoles, etcétera, será mayor en los polisacáridos de la variedad MC que la de NJ.

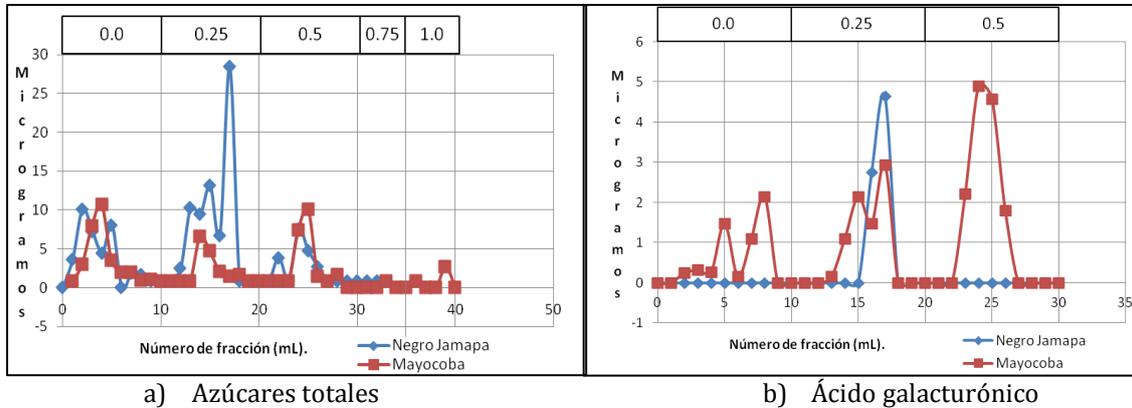


Figura 19. Cromatografía de intercambio iónico de los polisacáridos obtenidos con CDTA de las variedades de frijol Negro Jamapa y Mayocoba.

Los polisacáridos solubilizados en la fracción de KOH 1% ( $R_2$ , Figura 20), muestran un comportamiento diferente a la fracción de CDTA ( $R_1$ , Figura 19). El contenido de azúcares totales, fue mayor en todos los casos para MC (Figura 19a), mientras que el contenido del ácido galacturónico fue similar (Figura 20b).

Nuevamente se presentaron polisacáridos que no necesitaron de fuerza iónica para eluir, los cuales, aunque tienen ácido galacturónico en estas fracciones (Figura 20 b), seguramente se encuentra disperso en la cadena del polisacárido y no forma regiones de homogalacturonano (Muñoz, 2006; Blancas, 2001). La mayor cantidad se obtuvo con NaCl 0.25 N, representando polisacáridos con fuerza iónica baja para ambas variedades, además, se encontraron en menor cantidad polisacáridos que necesitaron de NaCl 0.5N para eluir en la variedad Mayocoba, y mínimas cantidades, para la variedad Negro Jamapa, obtenidas con esta misma concentración. Lo que nos sugieren estos resultados es que, los polisacáridos de la variedad MC tienen regiones de homogalacturonano que provocan una mayor

interacción iónica con la columna, mientras que los polisacáridos de NJ aunque tienen semejante cantidad de ácido galacturónico se encuentran dispersos en la cadena o sus grupos carboxilo se encuentran metilados, lo que ocasiona que su fuerza para unirse iónicamente a la columna sea menor (Muñoz, 2006; Blancas, 2001).

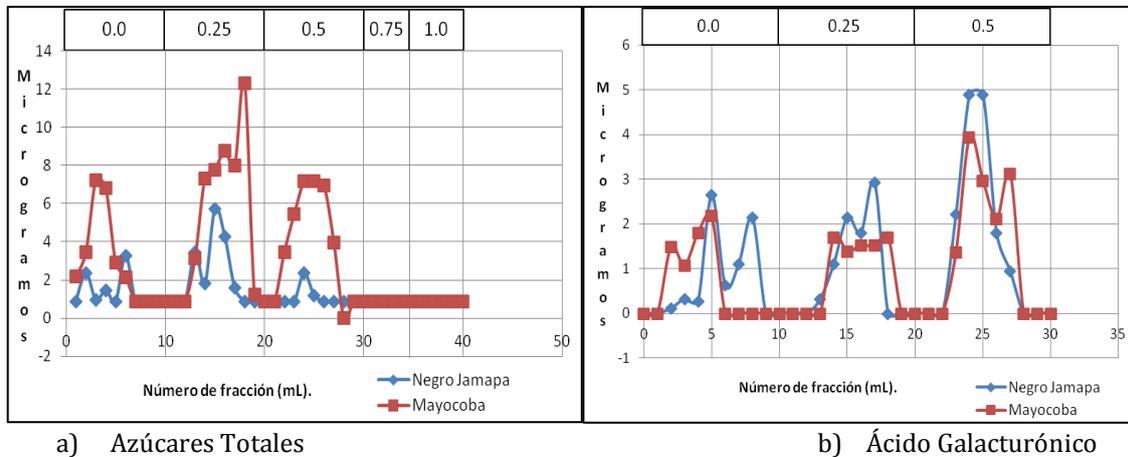


Figura 20. Cromatografía de Intercambio Iónico de los polisacáridos obtenidos con KOH 1% de las variedades de frijol Negro Jamapa y Mayocoba.

Al analizar los polisacáridos solubilizados en la fracción de KOH 20% (R<sub>3</sub>, Figura 21) se observó que fueron notablemente menores en comparación a los cuantificados en las fracciones de CDTA (R<sub>1</sub>) y KOH 1 % (R<sub>2</sub>) (Figuras 19 y 20 respectivamente), esto se debió a que los polisacáridos fueron poco solubles en agua, en la cual era necesario disolverlos para poder eluirlos en la columna de intercambio iónico (Figura 21a). Además no se pudo detectar ácido galacturónico en ninguna de las dos variedades (Figura 21b), sólo se detectaron azúcares totales, esto fue algo esperado porque en esta fracción el contenido de pectinas es menor, pues principalmente está compuesta por residuos de celulosa, que son polisacáridos de difícil solubilización (Vicente, 2004). En estos resultados se observó mayor cantidad de azúcares en NJ que en MC, probablemente porque la pared celular de esta última variedad contiene mayor cantidad de celulosa en comparación a la variedad Negro Jamapa y por eso fue más difícil lograr su solubilización y cuantificación (Silva-Cristóbal, 2007) (figura 21).

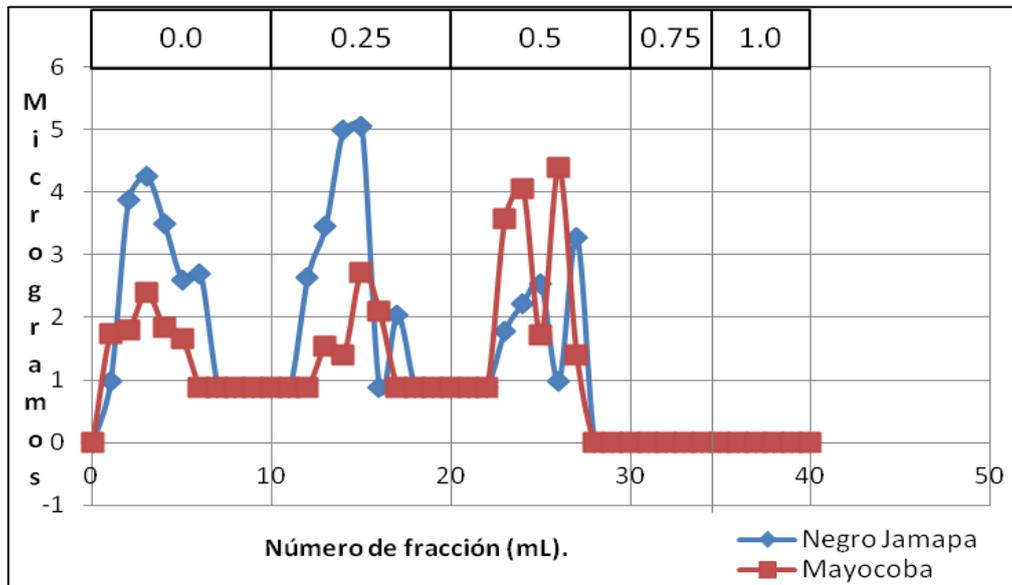


Figura 21. Cromatografía de Intercambio Iónico de los polisacáridos obtenidos con KOH 20% de las variedades de frijol Negro Jamapa y Mayocoba. Cuantificación de azúcares totales

Los resultados obtenidos indican que los polisacáridos de la pared celular de la variedad MC tiene una distribución de ácido galacturónico que permite una mayor interacción iónica con otros componentes de la pared celular, lo cual, podría reflejarse en una mayor fuerza de ésta y por lo tanto, tener una relación con la menor susceptibilidad al ataque de insectos que tiene esta variedad (Moreno, 2009; Rodríguez, 2011), ya que al estar más fuerte la pared celular de la testa de éste frijol dificultaría la penetración de la larva del insecto.

### 4.3 Cromatografía de filtración en gel

Para analizar el tamaño de los polisacáridos obtenidos del fraccionamiento de la pared celular de la testa de las dos variedades de frijol estudiadas, se analizaron las diferentes fracciones de polisacáridos obtenidas por precipitación ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ) mediante cromatografía de filtración en gel, monitoreando el comportamiento de cada una de ellas, a través de la cuantificación de azúcares totales y ácido galacturónico.

En esta prueba se usó NaOH 0.1 M como eluyente y con base en los estándares de dextranas utilizados, se determinó que los polisacáridos de mayor peso molecular eluían primero y los de menor peso eluían al final, los pesos moleculares de los marcadores se muestran en las gráficas (Figuras 22, 23 y 24).

El contenido de azúcares totales en la fracción de pared celular obtenida con CDTA ( $R_1$ , Figura 22a) presentó un comportamiento similar para ambas variedades. Lo que se muestra es la presencia de polisacáridos de alto peso molecular (500 y 200kDa).

Pero la variedad MC presentó más polisacáridos de menor peso molecular (6kDa) que Negro Jamapa. La cuantificación de ácido galacturónico indica (Figura 22b) que los polisacáridos identificados tuvieron muy poca cantidad de este ácido, sin embargo los de 500 y 200 kDa presentaron mayor contenido.

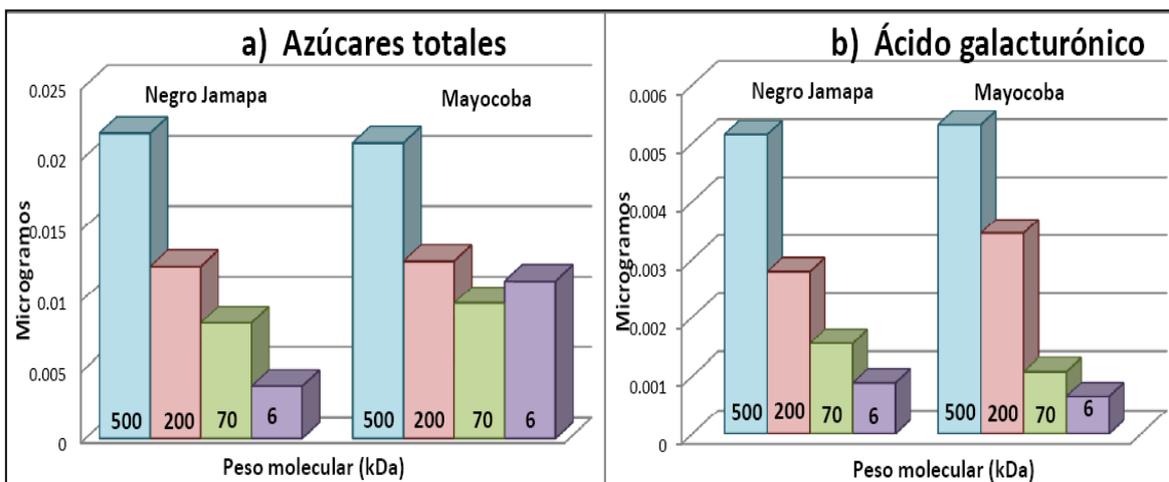


Figura 22. Cromatografía de filtración en gel de los polisacáridos obtenidos con CDTA de las variedades de frijol Negro Jamapa y Mayocoba.

Estos resultados y los obtenidos en la columna de intercambio iónico, nos indican que la fracción obtenida con CDTA ( $R_1$ ), de la pared celular de las dos variedades de frijol, tiene pectinas de alto peso molecular pero las de MC tienen regiones de homogalacturonano que les permiten mayor interacción iónica (Figura 19 y 22).

En la fracción KOH 1% ( $R_2$ , Figura 23), es posible apreciar que las dos variedades muestran presencia de polisacáridos de alto peso molecular (500 kDa), sin embargo MC tiene el doble que NJ; además NJ tiene aproximadamente 25% más de polisacáridos de 200 y 70 kDa (Figura 23a), que NJ para esta fracción ( $R_2$ ). La cuantificación de ácido galacturónico indica que los polisacáridos de ambas variedades tienen bajos contenidos de este compuesto (Figura 23b).

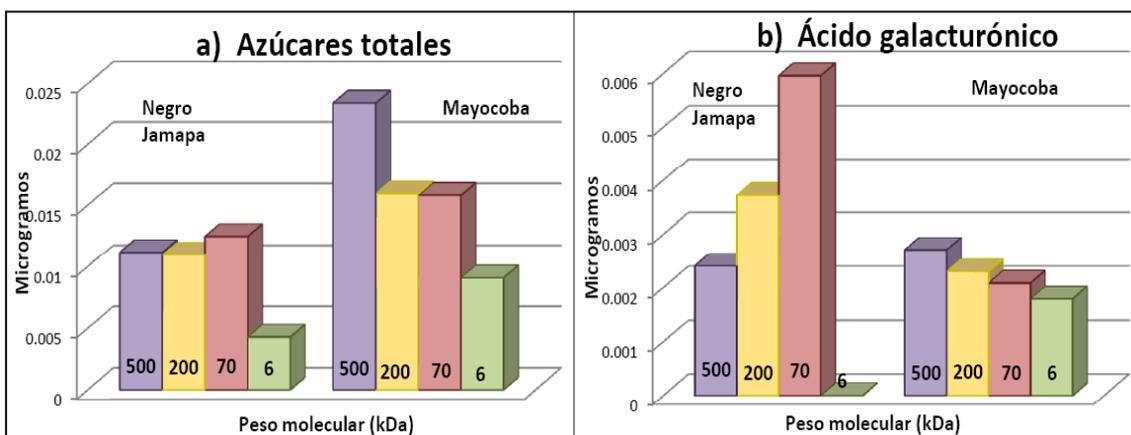


Figura 23. Cromatografía de filtración en gel de los polisacáridos obtenidos con **KOH 1%** de las variedades de frijol Negro Jamapa y Mayocoba.

Además, los polisacáridos de alto peso molecular tienen regiones de homogalacturonano presentándose en menor medida que las fracciones de CDTA (Figura 22).

Para la fracción KOH 20% ( $R_3$ , Figura 24) el contenido de polisacáridos fue mayor para MC en todos los casos, que para NJ; los polisacáridos de alto peso molecular (500kDa) de MC fueron ligeramente mayores en comparación a NJ, para los de 200 kDa fueron tres veces mayores en la variedad MC y los de 70kDa fueron casi 20 veces más en MC en comparación con NJ (Figura 24a).

Este comportamiento tiene la misma tendencia que las cuantificaciones de polisacáridos totales realizadas anteriormente (Tabla 7), en donde se observó también que el contenido de polisacáridos totales, en esta fracción de KOH 20% (R<sub>3</sub>) es mayor en la variedad Mayocoba respecto a Negro Jamapa.

Además, se obtuvieron contenidos de ácido galacturónico muy bajos para ambas variedades (Figura 24b), pero sobre todo en NJ. En la variedad MC, el contenido de ácido galacturónico fue mayor en los polisacáridos de menor peso molecular. Estos resultados fueron esperados, pues los polisacáridos obtenidos con un álcali tan fuerte como la que se utilizó en esta parte de la investigación, se sabe que normalmente son hemicelulosas y celulosas los cuales no contienen ácido galacturónico (Dekker, 1979, Carpita, 2000).

Además, estos resultados coinciden con los obtenidos al cuantificar azúcares totales en los polisacáridos precipitados (Tabla 7), en donde se habían obtenido contenidos de ácido galacturónico muy bajos para ambas variedades, siendo ligeramente mayores en la variedad Negro Jamapa.

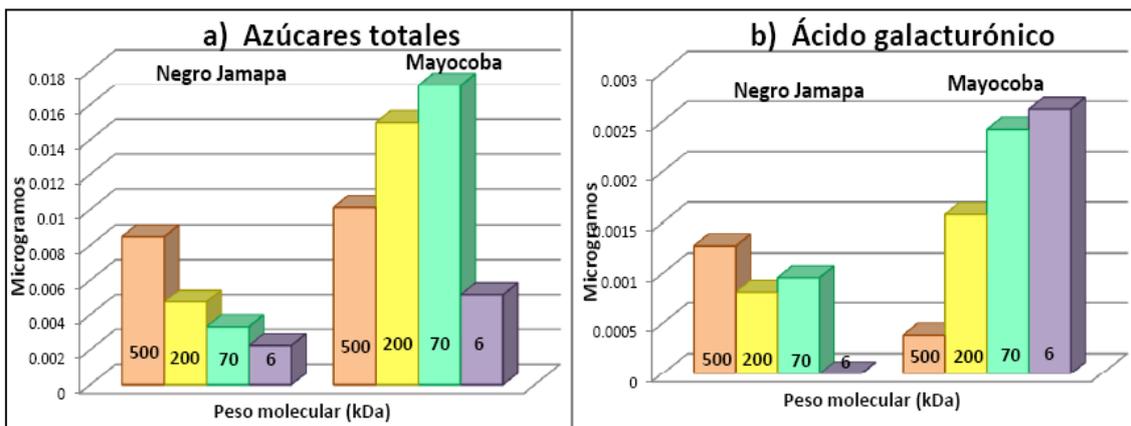


Figura 24. Cromatografía de filtración en gel de los polisacáridos obtenidos con KOH 20% de las variedades de frijol Negro Jamapa y Mayocoba.

Por otra parte, el hecho de que los polisacáridos sean de mayor peso molecular en la variedad MC y que estén principalmente compuestos por azúcares neutros, nos habla de una pared celular más fuerte y por lo tanto con mayor resistencia que la presente en la variedad NJ (Moreno, 2009).

#### 4.4 Cuantificación e identificación de azúcares neutros por HPLC

Para poder conocer el tipo de polisacáridos presentes en la pared celular de las dos variedades de frijol bajo estudio, se realizó la identificación de los diferentes azúcares neutros presentes en cada una de las fracciones obtenidas (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>) por medio de una cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Para tener un punto de comparación del contenido de azúcares de las muestras, se cuantificaron azúcares totales y ácido galacturónico a las muestras hidrolizadas antes de ser inyectadas en el HPLC, obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Cuantificación de ácido galacturónico y azúcares totales de polisacáridos hidrolizados de las diferentes fracciones de pared celular de testa de frijol Negro Jamapa y Mayocoba.

µg/mg de polisacáridos precipitados		A.T.c	A.G.c	A.N.	A.N./A.G.
<b>NJ</b>	CDTA	61.1 <sup>a</sup>	25.4 <sup>a</sup>	35.7 <sup>a</sup>	14.1 <sup>a</sup>
	KOH 1%	213.5 <sup>a</sup>	43.7 <sup>a</sup>	169.9 <sup>a</sup>	38.9 <sup>a</sup>
	KOH 20%	200.7 <sup>a</sup>	6.10 <sup>a</sup>	194.6 <sup>a</sup>	318.9 <sup>a</sup>
<b>Extracto seco</b>		126.0 <sup>a</sup>	10.4 <sup>a</sup>	115.6 <sup>a</sup>	111.1 <sup>a</sup>
<b>MC</b>	CDTA	120.2 <sup>b</sup>	9.20 <sup>b</sup>	111 <sup>b</sup>	120.7 <sup>b</sup>
	KOH 1%	133.9 <sup>b</sup>	42.5 <sup>a</sup>	91.4 <sup>b</sup>	21.5 <sup>b</sup>
	KOH 20%	259.5 <sup>b</sup>	13.1 <sup>b</sup>	246.4 <sup>b</sup>	188.1 <sup>b</sup>
<b>Extracto seco</b>		100.6 <sup>b</sup>	10.7 <sup>a</sup>	89.9 <sup>b</sup>	84.4 <sup>b</sup>

Medias con diferentes letras entre mismas fracciones de las dos diferentes variedades indican diferencia estadísticamente significativa ( $P \leq 0.05$ ). NJ=negro Jamapa, MC=Mayocoba, A.T.c.=Azúcares totales corregidos, A.G.c.=Ácido galacturónico corregido, A.N.=Azúcares neutros, A.N./A.G.=Azúcares neutros/ácido galacturónico.

Al cuantificar la composición química de los polisacáridos hidrolizados (Tabla 8), se encontró un contenido de ácido galacturónico ligeramente mayor en la variedad Negro Jamapa en relación a la variedad Mayocoba, es decir, la composición de los polisacáridos fue similar a la encontrada en las fracciones solubles.

Los resultados de los polisacáridos obtenidos con CDTA, mostraron la presencia principalmente de Ramnosa, Xilosa y en menor medida Galactosa y Glucosa en la variedad NJ. Mientras que en MC, se cuantificó mayor cantidad de Ramnosa; poca cantidad de Arabinosa y Galactosa y no se determinó Xilosa y Glucosa (Tabla 9).

Tabla 9. Cuantificación e identificación de azúcares totales de polisacáridos hidrolizados de las diferentes fracciones de pared celular de testa de frijol Negro Jamapa y Mayocoba.

%	Negro Jamapa					
	Ramnosa	Xilosa	Arabinosa	Glucosa	Galactosa	Ácido galacturónico
CDTA	31.94	30.86	ND	8.67	4.84	23.66
KOH 1%	30.25	20.11	18.58	ND	ND	29.05
KOH 20%	ND	56.47	23.24	12.20	ND	8.07
EXTRACTO	ND	ND	47.31	ND	ND	52.68
%	Mayocoba					
	Ramnosa	Xilosa	Arabinosa	Glucosa	Galactosa	Ácido galacturónico
CDTA	41.61	ND	12.28	ND	2.46	44.97
KOH 1%	42.82	ND	7.15	ND	7.11	42.90
KOH 20%	ND	40.9	16.5	31.6	ND	11
EXTRACTO	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Debido a que el principal polisacárido de pared celular que está formado por ramnosa es el ramnogalacturonano I (RGI), que contiene una cadena principal de residuos de ramnosa y ácido galacturónico con ramificaciones de arabinosa y galactosa (Carpita, 2000). Es posible afirmar que el principal polisacárido presente en esta fracción de CDTA en las dos variedades de frijol es RGI, si se considera el contenido de ácido galacturónico cuantificado en la muestra hidrolizada, el cual

debía ser equivalente al contenido de ramnosa. Es importante señalar que se encuentra aproximadamente el doble de este compuesto en la variedad MC.

Por otra parte, en los polisacáridos solubles en KOH 1% también se identificó principalmente ramnosa en las dos variedades, solo que en NJ también se encontró xilosa y arabinosa en una cantidad importante. Entonces, en estas fracciones se podría sugerir la presencia de RGI en las dos variedades pero en MC aproximadamente 25% más de este compuesto que en NJ y en esta última variedad además la presencia de xilanos y arabinanos (Carpita, 2000).

Estos resultados están de acuerdo con los resultados de cromatografía de filtración en gel, que indicaban polisacáridos de mayor peso molecular como sería el RGI, y también con la columna de intercambio iónico que sugiere cadenas con ácido galacturónico relativamente cercanas, no de homogalacturonanos pero si intercalados como se encuentran en el RGI.

Si comparamos estos resultados con los obtenidos en la cromatografía de filtración en gel y la de intercambio iónico, podemos decir que la variedad MC tiene RGI de alto peso molecular y NJ tiene RGI pero de menor peso molecular en comparación con MC. Para la variedad MC, al ser RGI de mayor peso molecular, las cadenas tienen una mayor fuerza de unión a la columna que NJ (Muñoz, 2006).

En los polisacáridos solubles en KOH 20% se identificaron principalmente xilosa, arabinosa y glucosa, lo que nos sugiere la presencia de xiloglucanos que son cadenas de glucosa-xilosa y arabinanos, y en la variedad NJ además se tienen xilanos (Bustamante, 2009).

La presencia de xiloglucanos fue mayor en MC y según lo reportado en cromatografía de filtración en gel, fueron polisacáridos de bajo peso molecular.

En relación a la susceptibilidad al ataque de insectos por parte de las dos variedades de frijol con la composición de polisacáridos de las diferentes fracciones de pared celular; lo que se puede decir es que, el RGI se ha propuesto que está relacionado con una pared celular más resistente (Weightman *et al.*, 1994), sobre todo si tiene cadenas laterales de galactosa, como sería el caso de los polisacáridos identificados en MC (Pérez, 2006). Esto se observó tanto para la fracción obtenida con CDTA como con KOH 1%. Mientras que en la fracción de KOH 20% la variedad MC tuvo polisacáridos del tipo de xiloglucanos de alto peso molecular, característicos de las hemicelulosas las cuales le dan mayor fuerza a la pared celular (Mateos-Aparicio, 2008).

Estos resultados indican que la variedad MC tiene polisacáridos característicos de una pared celular más fuerte que la de la variedad NJ, y que por lo tanto, sí existe una relación entre la composición de polisacáridos de pared celular de la testa del frijol con la susceptibilidad al ataque del gorgojo del frijol.

## 5 CONCLUSIONES.

- La composición de azúcares de las fracciones solubles de pared celular de la testa de las variedades de frijol Negro Jamapa y Mayocoba son diferentes y en general NJ tiene mayor contenido de ácido galacturónico que MC.
- La composición química de los polisacáridos presentes en la pared celular de la variedad Negro Jamapa fue diferente a los de Mayocoba, los polisacáridos de NJ fueron más abundantes y con mayor cantidad de ácido galacturónico que los de la variedad MC.
- Los polisacáridos presentes en la variedad Mayocoba tiene regiones con alta concentración de ácido galacturónico que les proporcionan una mayor capacidad de interacción iónica que los que contiene Negro Jamapa, lo que puede reflejarse en una pared celular más fuerte por parte de Mayocoba que es la variedad menos susceptible al ataque del gorgojo del frijol
- El tamaño de los polisacáridos presentes en la pared celular de la testa de la variedad Mayocoba es mayor a los de Negro Jamapa, sobre todo los que se obtuvieron con la fracción soluble en KOH al 20% que es la que más contribuye a una mayor fuerza de la pared celular
- Los polisacáridos de la variedad Mayocoba y Negro Jamapa están formados por ramnogalacturonano I, pero la variedad MC tiene mayor cantidad que NJ, ambas variedades tienen xiloglucanos y negro Jamapa tiene además xilanos y arabinanos

- Estas características químicas y fisicoquímicas de los polisacáridos de pared celular de la testa de las dos variedades analizadas, nos indican que son diferentes en cuanto a composición química, tamaño y distribución en la pared celular, además sugieren que la pared celular de la testa del frijol Mayocoba es más fuerte que la de Negro Jamapa y como esta última variedad es más susceptible al ataque del gorgojo del frijol, se puede concluir que sí existe una relación entre la composición de polisacáridos de la pared celular de estas variedades y su susceptibilidad al ataque de *Zabrotes subfasciatus*.

## 6 BIBLIOGRAFIA

1. Acosta-Gallegos J. A. y Pérez H. P. (s.f.). **“Situación del cultivo de frijol común en México. Producción e investigación”**  
Disponible en:  
[http://www.campomexicano.gob.mx/portal\\_siap/Integracion/EstadisticaDerivada/ComercioExterior/Estudios/Perspectivas/Frijol00-05.pdf](http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/EstadisticaDerivada/ComercioExterior/Estudios/Perspectivas/Frijol00-05.pdf)
2. Altug, T. (2003) **“Introduction to toxicology and food”**. CRC Press Boca Raton Florida. pp 47-48
3. Arias C. (1993). **“Manual de Manejo Postcosecha de granos a nivel rural”**. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Oficina para América Latina y el Caribe; Santiago Chile. Departamento de Agricultura. Fecha de consulta: 28 de septiembre 2011  
Disponible en:  
[URL:\(a\)http://www.fao.org/docrep/X5027S/x5027S01.htm#Composicion%20quimica%20del%20grano.](http://www.fao.org/docrep/X5027S/x5027S01.htm#Composicion%20quimica%20del%20grano)
4. Bender, D. (1995) **“Introducción a la Nutrición y el Metabolismo”** Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. pp 204-207
5. Bernal-Lugo, I. (1987) **“Endurecimiento del frijol: Causas y naturaleza del fenómeno”** Boletín de educación bioquímica. Vol. 6, 71-77
6. Blancas, M. V. H. (2001). **“Estudio de las modificaciones en la pectina que ocurren durante el remojo de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*)”**. Tesis de Química de Alimentos. Facultad de Química. UNAM. México. p. 18.
7. Blumenkrantz, N. y Asboe-Hansen, G. (1973). **“New method for quantitative determination of uronic acids”**. Analytical Biochemistry, 54: 484-489.
8. Bowles, D. J. (1990). **“Defense-related proteins in higher plants”**. Annual Review Biochemistry 59:873-907.
9. Bustamante, Claudia. (2009). **“Caracterización de la actividad  $\beta$ -xilosidasa en frutos climatéricos y no-climatéricos. Análisis de su expresión y regulación hormonal”**. Tesis de doctorado. Instituto de Investigaciones

- Biotechnológicas-Instituto Tecnológico de Chascomús, Universidad Nacional de San Martín, Buenos Aires, Argentina. 127pp.
10. Carpita, N.C. (1996). **"Structure and biogenesis of the cell walls of grasses"**. Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology. 47:445-476.
  11. Carpita N. and Gibeaut D. (1993). **"Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth"**. The Plant Journal. 3 (1): 1-30.
  12. Carpita, N. and McCann, L. (2000). **"The cell wall"**. In: **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Eds. Buchanan B. Gruissem W. Jones R., American Society of Plant Physiology, USA. pp. 52-108.
  13. Casanueva, E.; Kaufer-Horwitz M.; Pérez. L. and Arrollo P. (2001), **"Nutriología Médica"**, Editorial Medica Panamericana, 2 ° ed. México, D.F. pág. 452, 462-463, 482-483, 493-496.
  14. Champ, M., Langkilde, A-M., Brouns, F., Kettlitz, B. and Collet, L. B. Y. (2003). **"Advances in dietary fibre characterization. 1. Definition of dietary fibre, physiological relevance, health benefits and analytical aspects"**. Nutrition Research Review. 16:71-82.
  15. Cosgrove D. J. (2005). **"Growth of the plant cell wall"**. Nature Reviews, 6, 850-861.
  16. Dekker, R. F. H. (1979). **"The hemicellulase group of enzymes"** p. 93-108. In J. M. V. Blanshard; J. R: Mitchell (Eds.). Polysaccharides in Food. Butterworths. London, Great Britain. P. 93-108.
  17. Dubois, M., Gilés, K., Hamilton J., Rebers P., Smith, F. (1956), **"Colorimetric method for determination of sugar and related substances"**. Analytical Chemistry, 28(3):350-356.
  18. Dueñas, M.; Hernández, I. and Estrella, I. (2006). **"Assessment of in vitro antioxidant capacity of the seed coat and the cotyledon of legumes in relation to their phenolic contents"**. Food Chemistry. 98:95-100.

19. Engleman, M. (Editor). (1991). **“Contribuciones al conocimiento del frijol (Phaseolus) en México”**. Colegio de Postgraduados, Texcoco pp 83-92, 101-111, 113-119.
20. Exler, J.; Avena, R. y Weihrauch, J. (1977). **“Comprehensive evaluation of fatty acids in foods”**. Journal of the American Dietetic Association. 71:412-414.
21. FAO. (1990-2000). **“Situación actual y perspectiva de la producción de Frijol en México”**. Fecha de consulta: 30 de septiembre 2011  
Disponibile en: [www.fao.org](http://www.fao.org)
22. FAO. (1993). **“La ingeniería en el desarrollo - Manejo y tratamiento de granos postcosecha”**. Fecha de consulta: 3 de octubre 2011  
Disponibile en: [www.fao.org](http://www.fao.org)
23. González Iniestra J.L.; Pérez Ibarra F.J.; Guzman Rocha N.E.; Infante Gallegos J.A.; Laredo Gonzalez R.F. (2005). **“Factores Antinutricios y Actividad oxidante en variedades mejoradas de frijol común (Phaseolus vulgaris)”**. Agrociencia ISSN 1405-3195. Vol. 39 N0.6. 603-610. URL  
Disponibile en:  
[http://biblioteca.universia.net/html\\_bura/ficha/params/id/2090690.html](http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/id/2090690.html)
24. Goodwin, T. W.; E. I. Mercer. (1990). **“Introduction to plant biochemistry”**. Permagon Press. Oxford, England. 677 pp.
25. Gracia, N. M. A. (2008) **“Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales”**. Tesis. Universidad Autónoma de Querétaro. Fecha de consulta: 18 de octubre 2011  
Disponibile en:  
[http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias2007/56\\_1UA\\_QGarciaNava.pdf](http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias2007/56_1UA_QGarciaNava.pdf)
26. Ibáñez, L.Y. (2009) **“Detección de hemicelulasas y su participación en la calidad culinaria de las semillas de frijol”**. Tesis de Química de Alimentos. Facultad de Química. UNAM. México. pp. 61.

27. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall R.J. (1951). **“Protein measurement with the folin phenol reagent”**. Journal of Biological Chemistry 193, 265-275.
28. Macedo, R. M. Ligia; Machado, F. M. G.; Camillo, N. J. y Maragoni, S. (2002). **“Talisia esculenta lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae)”**. Biochemical et Biophysical Acta. 1571:83-88.
29. Macrae R., Robinson R. K., Sadler M. J. (1993). **“Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition”**. Academic Press. California, USA. Vol 1, pp. 317-321
30. Martínez-Valverde, I.; Periago, M. J. y Ros, G. (2000). **“Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta”**. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 50(1):5-18.
31. Mateos-Aparicio, I. C. (2008). **“Aprovechamiento de subproductos de leguminosas para la obtención de productos funcionales. Comparación de metodologías para la caracterización de la fibra alimentaria”**. Tesis de doctorado. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Madrid España. 254 p.
32. Méndez, V. R. F. (2003) **“Influencia del remojo en las pectinas de la lámina media del cotiledón de los frijoles”**. Tesis de Química de Alimentos. Facultad de Química. UNAM. México. pp. 31-32.
33. Moreno, R.V. (2008). **“Relación entre la pared celular de la testa de diferentes variedades del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y la sensibilidad a *Zabrotes subfasciatus* (Boheman)”**. Tesis de Ingeniería en Alimentos, FES-Cuautitlán, UNAM. México. 69 p.
34. Muller, H. y Tubin, G. (1998) **“Nutrición y ciencia de los alimentos”** Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España. pp. 143-271
35. Munguía, P.M. (2010). **“Influencia del deterioro del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) provocado por un mal almacenamiento sobre su calidad**

- nutrimental**". Tesis Ingeniería en Alimentos. FES-Cuautitlán, UNAM. México. 83 p.
36. Muñoz, O. M. (2006). ***Extracción y caracterización de polisacáridos con actividad anticoagulante a partir de algas colectadas en Baja California sur, México***". Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. La paz, Baja California, México. 80 p.
37. Mutschler, M. A.; Bliss, F. A. (1981). " **Inheritance of bean seed globulin content and its relationship to protein content and quality**" Crop Science. 21:289-294.
38. Parrish, D. J. and A. C. Leopold, (1978). " **On the mechanism of aging of soybean seeds**". Plant Physiology, 61:365-368.
39. Patte, H. E.; D.K. Salunkhe; S.K. Sathe and Reddy, N.R. (1982). " **Legume lipids**". Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 17:07.
40. Peña-Valdivia, C.B.; Ortega-Delgado, M.L. (1984). " **Unavailable carbohydrates in common bean cotyledon (*Phaseolus vulgaris L.*) Canario group**". Plant Foods from Human Nutrition 34:87-95.
41. Peña-Valdivia, C.B.; Ortega-Delgado, M.L. (1986). " **Partial chemical composition, free soluble sugars and unavailable carbohydrates in the embryonic axis and seed coat of (*Phaseolus vulgaris L.*) Canario group**". Qualitas Plantarum Plant Foods from Human Nutrition 36:27-34.
42. Perez-Almeida, I., Carpita, N. C. (2006). " **Las  $\beta$ -Galactosidasas y la dinámica de la pared celular**". *Interciencia*. 31(7):476-483.
43. Pilnik, W. and Voragen, A.G.J. (1970). " **Pectin substances and other uronides**". Hulme, A. C. (Ed.), *The Biochemistry of fruits and their products*, Academic Press, New York, pp. 53-87.
44. Programa Regional Postcosecha (1999) " **Estructura de los cereales y leguminosas**". Fecha de consulta: 15 octubre 2011  
Disponible en: <http://www.postcosecha.net/>
45. Programa regional POSTCOSECHA (1999) " **Recomendaciones para Almacenamiento: Problemas y Manejo**". Fecha de consulta: 15 octubre 2011

Disponible en: <http://www.postcosecha.net/>

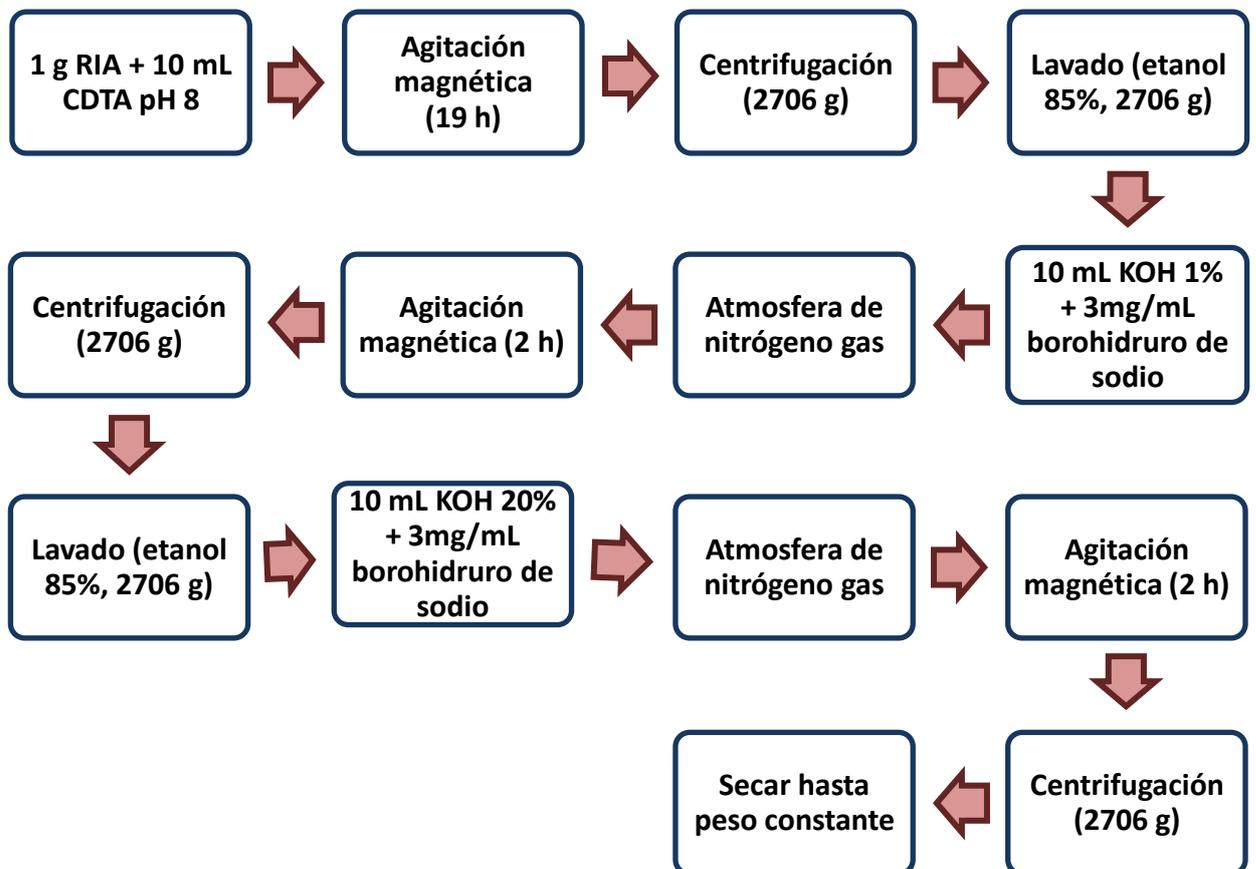
46. Rodríguez P., García, J., de Blas, C. **“Fibra soluble y su implicación en nutrición animal: enzimas y probióticos”**. Departamento de biotecnología y departamento de producción animal. Universidad Politécnica de Madrid.
47. Rodríguez, V. M. (2011). **“Respuesta de diferentes variedades comerciales de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) al ataque del gorgojo pinto del frijol *Zabrotes subfasciatus* y su relación con el contenido de factores antinutrimientales del frijol”**. Tesis de Ingeniería en Alimentos, FES-Cuautitlán, UNAM. México.
48. Ryan, C.A. (1990) **“Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens”**. Ann. Rev. Phytopathol. 28:425-449.
49. SAGARPA, (2005). Servicio de información y estadísticas agroalimentaria y pesquera (SIAP), con información de las delegaciones de la SAGARPA en los estados. Fecha de consulta: 28 septiembre 2011  
Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx>
50. Sathe, S.K.; Deshpande, D.S.S. and Salunkhe, D.K. (1985).” **Dry beans of phaseolus: a review. II. Chemical composition: carbohydrates, fiber, minerals, vitamins and lipids”**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 46:1389.
51. Sgarbieri, V.C.; Antunes, P.L.; Almeida, L. D. (1979) **“Nutritional evaluation of four varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris*)”**. Journal of Food Science, 44:1306-1308.
52. Shibamoto, T. Bjeldanes, L. (1996) **“Introducción a la toxicología de los alimentos”**, Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. pp 71-75.
53. Silva-Cristóbal, Lorena (2007). **“Estudio de la digestibilidad de carbohidratos y capacidad antioxidante de leguminosas de mayor consumo en México”**. Tesis de Maestría, Yautepec, Morelos, Instituto Politécnico Nacional, México.
54. Silvestre, A. (1993) **“Toxicología de los alimentos”** Editorial Hemisferio Sur Buenos Aires, 2º edición. pp 74-78.

55. Southgate, D.A.T. (1976). **“Determination of Food Carbohydrates”**, Applied Science: London, pp 105-106.
56. Vance, C.P.; Kirk, T. K. and R. T. Sherwood. (1980). **“Lignification as a mechanism of disease resistance”**. Annual Review of Phytopathology. 18:259-288.
57. Vargas, M.; Muragia, J.; Martínez, R. y Acosta, J. (2006) **“Colección Núcleo de Phaseolus vulgaris”** INIFAP. Catálogo de accesiones de la forma domesticada. Centro de Investigaciones Regionales del Centro Campo Experimental Valle de México. Libro Técnico No. 10. México, D.F. pp 1-7.
58. Vicente, R. A. (2004). **“Efecto de tratamientos térmicos de alta temperatura sobre calidad y fisiología postcosecha de frutillas (Fragaria x ananassa Dutch.)”**. Tesis Facultad de Ciencias Exactas. UNLP-CONICET. Argentina. 235 pp.
59. Villaseñor Valenzuela, J. A. y Vera, G. J. (1992). **“La testa del frijol de la variedad Negro Jamapa como defensa contra el ataque de Zabrotes subfaciatus (Coleoptera: Bruchidae)”**. Agrociencia. (3): 39-49.
60. Weightman, R.M.; Renard, C.M.G.C. y Thibault, J.F. (1994). **“Structure and properties of the polysaccharides from pea hull. Part 1: Chemical extraction and fractionation of the polysaccharides”**. Carbohydrate Polymers, 24: 139-148.
61. White, L. P.; Alvistur, E.; Dios, C. and Viñas, E. (1955). **“Nutrient and protein quality of quinoa and cañihua, edible seed products of the Andes mountains”** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 3:351-534.
62. <http://prietasnotes.blogspot.com/2010/>
63. <http://www.infojardin.com/>
64. <http://www.centreinar.org.br>

## 7 ANEXOS

### 7.1 ANEXO 1

Diagrama de extracción de los polisacáridos de la pared celular de la testa de las dos variedades de frijol en estudio

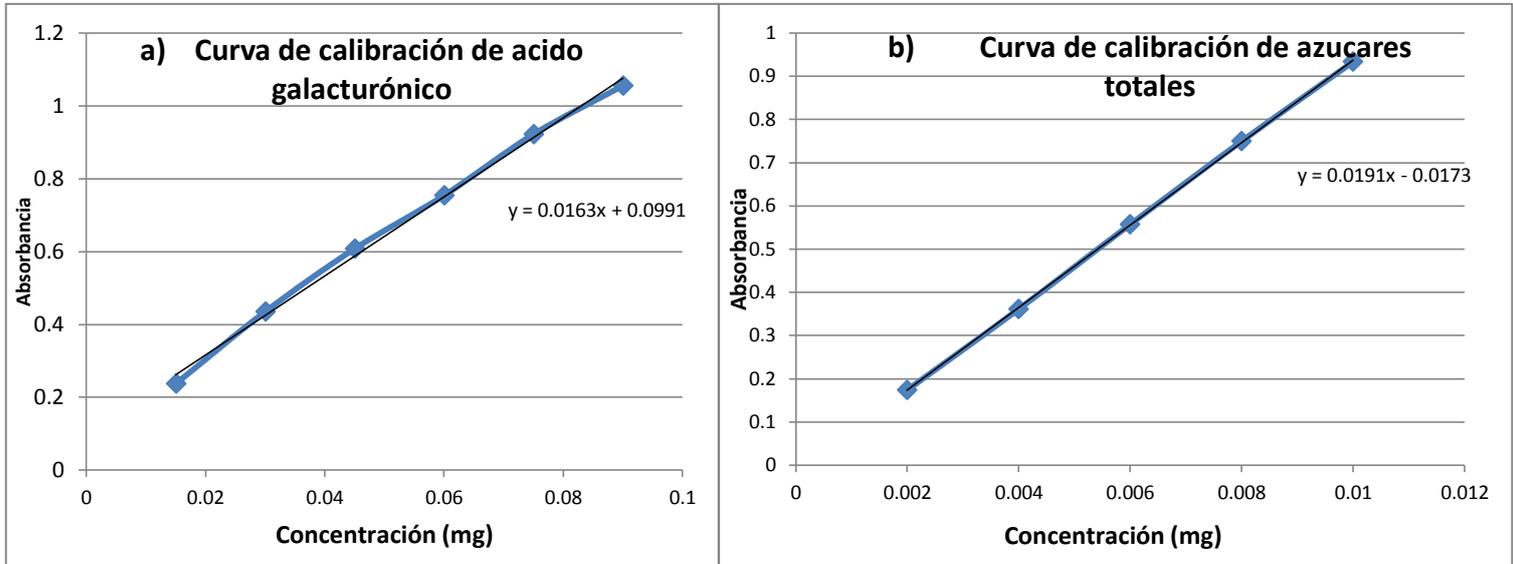


RIA= residuo insoluble en alcohol

CDTA=Trans-1,2-diaminociclo-hexano N, N', N'-tetra-ácido acético

## 7.2 ANEXO 2

## Curva de calibración de Azúcares Totales y Ácido Galacturónico



## 7.2 ANEXO 3

## Curva de calibración de Compuestos Fenólicos y Proteínas

