

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



“Inhibidores nutricionales en leguminosas comestibles”

MA. ELENA ARTEAGA CRUZ

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1976



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CLAS TESIS 1976
ADM. U.C. 36
FECHA _____
FRENTE _____



QUIMICA

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA

PRESIDENTE	Prof. Ninfa Guerrero de Callejas
VOCAL	Prof. Enrique García Galeano
SECRETARIO	Prof. Angela Sotelo López
1er. SUPLENTE	Prof. Emilio Barraquán Hernández
2º SUPLENTE	Prof. Miguel Hernández Infante

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

Sub-Jefatura de Investigación Científica. Laboratorio de Bromatología. Centro Médico Nacional. I.M.S.S.

SUSTENTANTE	MA. ELENA ARTEAGA CRUZ
ASESOR	M. en C. ANGELA SOTELO
SUPERVISOR TECNICO	M. en C. MIGUEL HERNANDEZ INFANTE

A MIS PADRES

Con el cariño y respeto
que merecen.

A MIS HERMANOS

A MIS FAMILIARES Y AMIGOS

Con sincero agradecimiento a
mi maestra Angela Sotelo por
el apoyo que siempre me ha
brindado.

A todos mis compañeros y amigos
del laboratorio, que con su com-
prensión y armonía me ayudaron a
salir adelante en la realización
de mi tesis.

Doy las gracias a la Sub-Jefatura
de Investigación Científica. I.M.S.S.
por las facilidades prestadas en la
realización de esta tesis.

CONTENIDO

	Pág.
I. INTRODUCCION	1
II. GENERALIDADES	4
Composición	5
Valor Biológico	8
Digestibilidad	9
Factores Tóxicos	11
Eliminación de Factores Tóxicos por Efecto de Cocción .	27
III.OBJETIVOS	31
IV. PARTE EXPERIMENTAL	32
Materiales	32
Métodos	35
Análisis Bromatológico	35
Determinación de Inhibidores de Tripsina	45
Determinación de Hemaglutininas	52
Digestibilidad "in vitro"	54
V. RESULTADOS	57
VI. DISCUSION Y CONCLUSIONES	78
Discusión	78
Conclusiones	83
VII.BIBLIOGRAFIA	85

I. INTRODUCCION

Las leguminosas han sido uno de los primeros cultivos comestibles practicados por el hombre. Actualmente y desde hace muchos años, éstas ocupan un lugar muy importante en la alimentación mundial, principalmente en América Latina, parte de Africa y en la India. Su importancia se debe a su alto contenido proteico, a su gran aportación calórica y a su bajo costo en relación a las proteínas de origen animal.

El consumo de las leguminosas es muy variado en diferentes partes del mundo, incrementándose en aquellos países en desarrollo, en donde la disponibilidad de proteínas animales es limitada o en donde habiendo dichas proteínas, no las consumen por motivos culturales y religiosos. En muchos países, las leguminosas constituyen uno de los principales, o el principal componente de la dieta, tal es el caso de Japón, donde la soya en diferentes tipos de productos, es la leguminosa más importante, proporcionando aproximadamente el 12% de la ingestión de proteína total.

En encuestas realizadas sobre la alimentación familiar en 20 zonas de México, tanto urbanas como rurales, se encontró que el con

sumo de leguminosas, oscila de 11 a 70 g. por persona, refiriéndose sólo al frijol común, que es el que más se consume. Pero esto no es totalmente ilustrativo ya que se sabe que principalmente en las zonas rurales, el frijol común junto con el maíz, es la base de su dieta. Sin embargo, existen algunas desventajas en relación al consumo tan extendido e incrementado en la dieta mundial, pues como cualquier proteína vegetal, las proteínas de las leguminosas, tienen deficiencias en aminoácidos esenciales para el organismo humano (metionina), tienen baja digestibilidad y desafortunadamente, contienen un gran número de factores antinutricionales que impiden un máximo de aprovechamiento de esta fuente alimenticia.

Los factores antinutricionales, difieren tanto en calidad como en cantidad en el enorme número de variedades de leguminosas cultivadas.

Se han realizado al respecto, numerosísimos estudios en diferentes partes del mundo, con el objeto de inferir sobre su presencia, cantidad, efecto fisiológico, estructura y eliminación en diferentes variedades, tanto comestibles como silvestres. En tales estudios, se ha observado que el aprovechamiento de

estos alimentos se incrementa cuando se les somete a un proceso de cocción, debido a que casi todos los factores antinutricionales presentes, son termolábiles.

En base a lo anterior, en el presente trabajo se llevó a cabo un análisis, tanto cualitativo, como cuantitativo, de dos de los principales factores antinutricionales: inhibidores de tripsina y hemaglutininas, en variedades comestibles mexicanas. El estudio se realizó en muestras crudas y cocidas, con el fin de observar el efecto de cocción sobre estos factores antinutricionales.

II. GENERALIDADES

La deficiencia de proteínas en la alimentación humana, se incluye entre los problemas más serios de la actualidad. En América Latina principalmente, la población infantil sufre visiblemente las consecuencias de estas deficiencias.

Varios recursos tecnológicos han sido usados para obtener concentrados proteicos de alimentos vegetales y animales; las leguminosas entre ellos, fueron recomendadas como un producto de alto valor proteico (39).

Las leguminosas incluyen aproximadamente 600 géneros con cerca de 13 000 especies, de las cuales sólo 10 ó 12 tienen importancia nutricional y económica, excluyendo a la soya y al cacahuete.

La distribución de las leguminosas es mundial, se cultivan tanto en los trópicos, como en las regiones templadas, lo que se debe también a su gran utilidad en la agricultura, pues gracias a las bacterias nitrificantes presentes en sus raíces, tienen la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico mejorando así la composición del suelo. Su contribución al suministro mundial de proteínas es considerable, probablemente del orden de 8 % constituyendo por tanto un alimento importante, sobre todo en aquellos paí-

ses en desarrollo, en donde no hay suficiente cantidad de proteí
na animal.

La preferencia de uno u otro tipo de leguminosa está relacionada
posiblemente, con la disponibilidad de alimentos en la región, -
la cual a su vez, se ve influenciada por las condiciones ambien-
tales. Por ejemplo: Pisum, Vicia y Lens esculenta, son en gene-
ral más populares en el Medio Oriente. En América, el género -
Phaseolus es el más común, mientras que en el Lejano Oriente y -
Africa, las especies indias de Phaseolus, Dolichos, Vigna y Caja-
nus, son las más importantes (9,2).

Las leguminosas se consumen en varias formas, pero el método más
común de preparación, es por cocción de ellas en agua, con o sin
adición de sal, cebolla, ajo y aceite, durante 3 a 5 horas a pre-
sión atmosférica, hasta obtener un alimento de consistencia uni-
forme. Algunas variedades se consumen antes de que maduren, pe-
ro su contribución de proteínas a la dieta, es mucho menor (43).

COMPOSICION

Como se mencionó anteriormente, las leguminosas tienen gran im-
portancia desde el punto de vista nutricional, debido a su alto
contenido de proteínas que varía de 18 a 32 %, con excepción de
la soya y el cacahuate, los cuales después de la extracción de-

grasa, alcanzan hasta un 50 % de proteína. Su contenido proteico es casi el doble que el de los cereales y ligeramente superior al de la carne, pescado y huevo (9). Sin embargo, las proteínas de las leguminosas, son fuentes pobres en aminoácidos esenciales, principalmente aminoácidos azufrados como son metionina y cisteína. Muchas son también un tanto deficientes en triptófano e isoleucina. Por el contrario, las citadas proteínas tienen en general, un elevado contenido de lisina, que es un factor de gran importancia nutricional, cuando las leguminosas son consideradas como suplemento para cereales (2,3). En general, el contenido de aminoácidos en las proteínas de las leguminosas depende de la especie, variedad, localización y prácticas de manejo.

La proteína, se localiza en los cotiledones de las leguminosas en un 27 %, en los ejes embrionarios 48 % y en la cáscara 5 %. Como los cotiledones están en mayor peso, contribuyen en mayor proporción al total de proteínas (9). Estas proteínas, son principalmente globulinas, pero también se encuentran albúminas en algunas especies. Las globulinas constituyen 80 a 90 % de la proteína total, son proteínas solubles en soluciones salinas y han sido divididas operacionalmente en dos: legúminas y vicilinas. Boulter (7), encontró que la legúmina, es más rica que la vicilina en aminoácidos azufrados y triptófano, pero menor en isoleucina, li-

sina y fenilalanina. Una separación por electroforésis mostró que, la cantidad relativa de legúmina y vicilina, varía dependiendo de la especie (2, 3).

Se ha observado también, que algunas globulinas presentes en Phaseolus, se resisten a la hidrólisis por enzimas proteolíticas, razón por la cual la presencia de tales proteínas en los granos de leguminosas, puede ofrecer una explicación de la baja digestibilidad de las proteínas de estas semillas (9).

La otra fracción proteica de las leguminosas, son las albúminas, las cuales no han sido totalmente separadas y caracterizadas. Se encontró que estas proteínas, representan no más del 1 % de la proteína total de la semilla y se acepta generalmente, que varias enzimas de las semillas, se encuentran en esta fracción (7).

Además de su alto contenido de proteínas, las leguminosas se consideran buena fuente de tiamina, riboflavina y niacina. Son fuentes pobres de calcio pero relativamente altas en hierro. Algunas leguminosas contienen carotenos pero no contribuyen mucho a la vitamina A. Se ha encontrado también en menor cantidad ácido ascórbico, vitamina K y tocoferoles.

La mayoría de las leguminosas que comunmente consume el hombre,

contienen pocas grasas, alrededor de 1 a 2 %, pero hay algunas (soya y cacahuate), que constituyen fuentes importantes de estas sustancias. Las grasas de las leguminosas son en general ricas en ácidos grasos esenciales.

En su forma seca, producen casi tantas calorías por unidad de peso, como los cereales, pues contienen aproximadamente 60 % de carbohidratos que en general se utilizan y absorben bien (9). Sin embargo, a pesar de que las leguminosas constituyen una de las mejores fuentes de proteínas vegetales, es necesario hacer énfasis en lo que respecta a su bajo valor biológico, a su baja digestibilidad y a la presencia de factores antinutricionales.

VALOR BIOLÓGICO

Existen muchas variaciones en el valor biológico de las leguminosas, aún en variedades de la misma especie. Estas variaciones son difíciles de explicar debido a que hay muchos factores involucrados; sin embargo, es probable que el factor principal, sea la relativa baja concentración de aminoácidos azufrados en la proteína. La calidad de la proteína puede también ser afectada por otros factores tales como procesamiento para consumo y por almacenaje. En general, se considera una variación de 32 a 78% de valor biológico (9).

No obstante, se ha encontrado que el valor biológico de las leguminosas, puede ser mejorado por varios métodos:

- 1.- Agregando aminoácidos deficientes, en este caso, se adiciona metionina, que es el aminoácido deficiente en las leguminosas. El problema persiste en la estandarización de la cantidad añadida, que varía de 0.1 a 0.3 %.
- 2.- Por suplementación con otros alimentos de origen vegetal. La suplementación se lleva a cabo, entre dos o más proteínas, de tal manera que, el valor biológico de la mezcla resultante, sea superior al de cada proteína por separado. Este fenómeno se observa muy bien en la suplementación entre proteína de leguminosa y proteína de cereal.
- 3.- Por mejoramiento genético, en donde es necesario tomar en cuenta muchos factores como son: estandarización de técnicas analíticas, eliminación de factores responsables de la pobre digestibilidad, mejoramiento del nivel proteico, aumento de la producción, estudio de leguminosas no comestibles, etc.
(24, 37).

DIGESTIBILIDAD

Los nutricionistas, están concientes de la baja digestibilidad de la proteína de las leguminosas, que puede ser causada por una des

carga rápida del intestino o por una resistencia de la proteína a la hidrólisis por enzimas gastrointestinales. En cualquier caso, se están produciendo pérdidas significativas de nitrógeno en las heces, cuando los frijoles son consumidos (9).

Según informes de la F.A.O. (1958), la verdadera digestibilidad de las leguminosas guisadas adecuadamente, se encuentra entre 85 y 95 %, siendo la de los frijoles ligeramente más pobre que la de los chícharos. Naturalmente los métodos de elaboración de las leguminosas, las cantidades que se consumen y el estado del aparato digestivo, afectan la digestibilidad (2).

La digestibilidad, depende también de las condiciones de los frijoles y de su tiempo de cocción. El contenido de fibra cruda, es tomado como una medida de los porcentajes de carbohidratos no digeribles, los cuales pueden causar aumento en los desórdenes digestivos, principalmente la fermentación de éstos por enzimas bacterianas en el intestino.

Se han registrado estudios en los cuales se ha observado que la digestibilidad por la cocción es satisfactoria, pero la utilización de la parte digerible de las leguminosas, para síntesis proteica y crecimiento del cuerpo es considerablemente más baja que

la mayoría de las proteínas animales (36).

FACTORES TOXICOS

Existe un gran número de sustancias tóxicas en las diferentes variedades de leguminosas que son consideradas como inhibidores nutricionales. La mayoría de estos factores, son termolábiles, en tanto que otros son termoestables y de acuerdo a la toxicidad que presentan en estado crudo, las leguminosas se han clasificado en 3 grupos (21):

- 1.- Los que producen la muerte de los animales de experimentación en un lapso de 2 a 3 semanas: frijol.
- 2.- Los que producen mejor crecimiento si se consumen en forma cocida: soya.
- 3.- Los que producen crecimiento similar si se consumen en forma cocida o en forma cruda: Caupí, garbanzo y lenteja.

Estudios realizados parecen indicar que la mayoría de las sustancias tóxicas, se encuentran sólo en el grano crudo y se eliminan por métodos ordinarios de preparación. Así pues, cuando los frijoles crudos se alimentan en una dieta experimental, son tóxicos para los animales. Sin embargo, cuando los mismos fri-

joles se someten a un tratamiento de cocción, pueden ser ingeridos sin causar daños (9, 45).

Un informe de la F. A. O., nos dice que las sustancias tóxicas que se encuentran en varias leguminosas, limitan el consumo de éstas a las especies no tóxicas o a aquellas cuya toxicidad puede eliminarse o reducirse a límites seguros mediante una preparación y cocción adecuadas (9).

Entre los factores antinutricionales presentes en las leguminosas, tenemos: inhibidores de tripsina, hemaglutininas, glucósidos cianogénicos, factores bociogénicos, factores que producen; latirismo, favismo y lupinus, saponinas, alcaloides, otros inhibidores de proteasas, inhibidor de amilasa, factores que producen flatulencia, distrofia muscular, acción del ácido fítico y sustancias con propiedades hipocolesterolémicas.

INHIBIDORES DE TRIPSINA

Los inhibidores de tripsina, son uno de los factores antinutricionales más conocidos y estudiados. Son componentes de los granos de leguminosas que actúan inhibiendo a la tripsina que es una enzima proteolítica que se libera del páncreas al intestino delgado de hombres y animales. En algunos casos afecta también la acción

de la quimotripsina, provoca hipertrofia pancreática y contracción de la vesícula biliar. Al mismo tiempo, se manifiesta una depresión del crecimiento de los animales de experimentación (ratas, ratones y pollos), que se debe al resultado de la pérdida endógena de aminoácidos esenciales de un páncreas hiperactivo que responde en forma compensatoria a los efectos del inhibidor de tripsina en la cual la pérdida de metionina es muy aguda, pues por naturaleza las leguminosas son deficientes en este aminoácido (36, 29, 1).

Kakade y col. (29), encontraron que existe una relación cuantitativa entre la actividad antitriptica y el aumento del tamaño del páncreas y lo atribuyen al hecho de que la secreción pancreática, está controlada por el nivel de tripsina en el intestino delgado y que el efecto de los inhibidores de tripsina, es el de contra-restar este mecanismo por combinación con tripsina (35).

Por otro lado, la pobre utilización de las proteínas de las leguminosas ha sido también atribuida a la presencia de los inhibidores de tripsina. Jaffé (22) lo confirmó, al notar que las leguminosas con mayor actividad antitriptica mejoraban más la digestibilidad "in vivo" por el calentamiento. Sin embargo, Kakade (29) demostró que los inhibidores de tripsina contribuyen sólo con un 40 % tanto en la depresión del crecimiento, como en la hipertrofia pancreática.

La existencia de estos inhibidores de tripsina se ha demostrado por medio de un gran número de estudios realizados por varios autores, quienes los han aislado y purificado (58, 29, 1, 50, 8, 15) y en el caso concreto del haba, se ha visto que son glicoproteínas (52). Las leguminosas que presentan mayor contenido de inhibidores de tripsina son: la soya y el frijol negro. En referencias anteriores se encontró que en general, la actividad antitriptica, es mayor en la soya, seguida por Phaseolus vulgaris. El haba, lenteja, chícharo y garbanzo mostraron valores bajos (18, 48).

Rosa. 1
Se han reportado varios tipos de inhibidores de tripsina en Phaseolus vulgaris y la mayoría de ellos tienen en común pesos moleculares bajos y composición de aminoácidos caracterizada por un alto contenido de serina, ácido aspártico, alfa-cisteína y la ausencia de triptófano y carbohidratos (58).

Un estudio sobre el inhibidor de tripsina del haba (Vicia faba) (1), muestra valores bajos de nitrógeno, lo que explicaron por la evidencia de que existen carbohidratos en estos inhibidores, que sugieren altos pesos moleculares, no de una proteína simple, sino de una glicoproteína como se mencionó antes.

Kunitz (33) trabajando en harina de soya desengrasada, aisló una proteína que inhibía la acción proteolítica de la tripsina y

notó que la cristalización repetida de esta proteína, no alteraba su actividad.

Wagner y Riehm (56), indican que hay proteínas de bajo peso molecular que inhiben la acción de la tripsina y para comprobar su afirmación, aislaron parcialmente este inhibidor a partir del frijol blanco crudo (Phaseolus vulgaris) y a su vez, estudiaron sus propiedades fisicoquímicas y forma de acción, con los siguientes resultados: a) la purificación de la enzima baja la actividad a un 90 %; b) la fracción purificada demostró tener características afines a otras fracciones aisladas anteriormente y que también poseían actividad antitriptica; c) la fracción es rica en cisteína y baja en metionina; d) no contiene grupos tiol ni residuos de triptófano; e) por filtración en gel, la molécula nativa ha demostrado ser una simple cadena polipeptídica cuyo peso molecular determinado por ultracentrifugación, fue alrededor de -- 25 000 g Mol⁻¹ y f) observaron que por cada Mol de inhibidor, se inhibieron dos moléculas de tripsina.

Un estudio comparativo de 19 inhibidores de tripsina, por modificación química, muestran que la actividad inhibitoria de estas sustancias puede ser destruída por modificación de residuos de lisina en algunos y de arginina en otros, pues en estudios recientes sobre proteólisis parcial de inhibidores de tripsina, se ha

reportado la presencia de arginina y lisina en los sitios activos.

Algunos inhibidores naturales tienen actividad inhibitoria doble, con sitios activos independientes para tripsina y quimotripsina, como es el caso del inhibidor de tripsina del frijol lima (32).

Wilson (58), encontró que el inhibidor de tripsina del frijol común, también es un doble inhibidor que actúa inhibiendo simultáneamente una molécula de tripsina y una de elastasa.

Algunos otros autores, se refieren a un complejo de inhibidor de tripsina y quimotripsina, cuyo peso molecular promedio es 19 000 g Mol⁻¹. Este inhibidor cristalizado, es altamente activo en presencia de tripsina y quimotripsina pancreática de bovino (55, 57).

HEMAGLUTININAS

Se ha observado un alto grado de mortalidad en animales que han consumido leguminosas crudas, y el efecto no se debe a los inhibidores de tripsina, sino a sustancias que son capaces de aglutinar los eritrocitos de varias especies animales, denominadas lectinas o hemaglutininas (36), que son proteínas solubles en soluciones salinas y cuyo aislamiento lo han logrado varios autores, los cuales concuerdan en que la presencia de hemaglutininas, baja el valor biológico de las leguminosas. Sin embargo, se ha

reportado una pobre correlación entre la actividad hemaglutinante y la actividad depresora del crecimiento (53, 12, 25, 14).

En forma sintetizada, el efecto tóxico de las hemaglutininas está posiblemente relacionado con su acción sobre la mucosa y la absorción intestinal. Jaffé (30), sostiene que se combinan con las células externas de la pared intestinal, interfiriendo así con la absorción. La interacción de estas hemaglutininas y de las células de la mucosa, puede ser inhibida específicamente por azúcares.

Otra función de las hemaglutininas que se ha puesto en evidencia, es la actividad mitogénica sobre linfocitos periféricos humanos (31, 54, 16).

Se ha encontrado que algunas hemaglutininas del frijol, son resistentes a la actividad enzimática gastrointestinal, pues en estudios efectuados en ratas, se ha observado que las heces presentan acción hemaglutinante detectable, cuando los animales ingieren dietas de frijol crudo (26).

El análisis químico realizado indicó que las hemaglutininas son glicoproteínas (31). Sin embargo, en un estudio sobre las hemaglutininas de Vicia ervilia, se encontró que carecía de carbohidratos y de aminoácidos azufrados, pero era rica en aminoácidos ácidos e hidrofílicos (16). En el caso especial de la hemaglutinina

de lenteja, se reportó que contenía gran cantidad de ácido aspártico y residuos de treonina, así como la ausencia de cisteína. En este mismo estudio, se encontró que las hemaglutininas son glicoproteínas que contienen 1.5 % de glucosa y 0.5 % de glucosamina (54).

La purificación y análisis de la hemaglutinina de otra leguminosa, mostró que la lectina tiene grandes cantidades de aminoácidos básicos y ácidos, que no contienen metionina y aproximadamente 5 residuos de cisteína/Mol (44, 14).

Existen unas fracciones más tóxicas que otras, dentro de las leguminosas y aún entre variedades de la misma especie, hay diferente toxicidad; por ejemplo: el frijol rojo provoca la muerte de los animales, en tanto que el frijol blanco no lo hace. Las observaciones anteriores, pueden deberse a la presencia de diferentes hemaglutininas, las cuales, pueden ser caracterizadas por medio de una prueba simple con diferentes preparaciones de eritrocitos (27, 17).

Cuatro distintos tipos de hemaglutininas de frijoles, pueden ser distinguidas en diferentes variedades.

Tipo

- A Aglutina eritrocitos de conejo y eritrocitos tripsinizados de vaca.
- B Aglutina sólo eritrocitos de conejo.
- C Aglutina sólo eritrocitos tripsinizados de vaca.

D No aglutina ninguna de las sangres.

Los cuatro tipos son detectados con eritrocitos de hamster, tra
tados con pronasa. Los tipos A y C, son tóxicos al ser inyecta
dos en ratones. Se encontró también que sólo los extractos que
aglutinan sangre de conejo, pueden aglutinar sangre humana y de
cerdo.

Los cuatro tipos de frijoles conteniendo los cuatro tipos de he
maglutininas, se suministraron en forma de dietas a animales de
experimentación, observando que los tipos A y C, produjeron pér
didas de peso y la muerte, mientras que las de tipo B y D, no -
tuvieron signos de toxicidad (25).

En general, se ha demostrado que las leguminosas que aglutinan
sangre de vaca tripsinizada, son altamente tóxicas, llegando a
producir la muerte de los animales de experimentación. En huma
nos provocan vómitos, diarreas y náuseas (24, 36).

En trabajos anteriores, se hizo una determinación de la acción
hemaglutinante de diferentes leguminosas y se encontró que el
género Phaseolus vulgaris, da reacción positiva con eritrocitos
tripsinizados de vaca y conejo. La soya, arveja, garbanzo y
lenteja, tienen lectinas que sólo aglutinan las células rojas

de conejo (12).

Las hemaglutininas de las leguminosas, se destruyen por calentamiento en autoclave, aumentando así su valor biológico. La hemaglutinina purificada, es inactivada también, por acción de un calentamiento parcial (36).

La ebullición prolongada, también destruye la actividad hemaglutinante. Estudios anteriores indicaron que dicha actividad sobre los eritrocitos de conejo y humanos, es mucho más sensitiva al calentamiento, que la actividad tóxica, no obstante la actividad hemaglutinante persiste sobre eritrocitos de vaca tripsinizados. Por esta razón, las pruebas de aglutinación con sangre de vaca tripsinizada, es usada para detectar variedades tóxicas de frijol y también para observar la velocidad de destrucción del factor tóxico precalentado (35).

FACTORES BOCIOGENICOS

Se han observado signos de bocio en pollos y ratas que ingieren las leguminosas crudas y en niños alimentados con leche de soya, a pesar de que había sido calentada a temperatura de esterilización durante su manufactura (36). Lo anterior, puede ser debido a que la soya, es la leguminosa con mayor contenido de estos

factores (43).

Se asume que el mecanismo de acción de estos factores consiste en bloquear la acción de la tiroides impidiendo la absorción del yodo; además, se ha encontrado una pérdida mayor de tirosina en las heces, debido a que su reabsorción por el intestino, donde ha sido vertida por la bilis, es inhibida por la presencia de la soya cruda.

Particularmente, se observó que la actividad bociogénica del frijol de soya, es reducida considerablemente por calentamiento. Existen también propiedades bociogénicas en el cacahuete, en donde el tostado no tuvo efecto destructivo. Se encontró también que la actividad bociogénica de Phaseolus vulgaris, pero no de Pisum sativum, era eliminada por calentamiento (36).

GLUCOSIDOS CIANOGENICOS

Son sustancias que están presentes en ciertas leguminosas como el frijol lima, el garbanzo y el haba, que van acompañadas de una enzima que es capaz de hidrolizarlas para dar HCN (13, 36).

En el caso del haba, este glucósido es la vicianina que produce vicianosa, HCN y benzaldehído y en el frijol lima, es la faseolunatina que produce glucosa, HCN y acetona; en este último, la libe

ración de HCN, se lleva a cabo sólo cuando el frijol se comprime antes del remojo y cocción, por la acción de la beta-glucoxidasa. Obviamente, la inactivación de la enzima, se lleva a cabo por calentamiento.

Las cantidades de HCN que pueden ser liberadas, varían de 0.1 % en variedades comestibles a 0.3 % en variedades silvestres.

Se han dado a conocer algunas muertes esporádicas causadas por el consumo de un frijol con alto contenido de glucósidos cianogénicos, sometido a cocimiento aparentemente adecuado; sin embargo, no hay posibilidad de que existan en el organismo enzimas capaces de liberar el HCN de los glucósidos del frijol (13, 36).

Contreras y col. (13), investigando la concentración de glucósidos cianogénicos en diversas leguminosas de Chile, concluyeron que las semillas crudas contienen baja cantidad de estas sustancias, quedando inferior a los límites permitidos. Los frijoles presentaron valores más altos, por lo cual, uno de ellos, se eligió para medir la efectividad de diferentes tratamientos térmicos, de los cuales el que mejor resultado dio, fue cuando se sometió a la leguminosa a un remojo previo, seguido de tratamiento térmico por vía húmeda.

LATIRISMO

Es una enfermedad que está asociada al consumo de la leguminosa Lathyrus sativus y Swea pea, que se caracteriza por una parálisis espasmódica de los miembros inferiores (36, 43, 2).

En términos médicos, la parálisis del latirismo es de tipo espástica, debida a una lesión de la neurona motora superior, con repercusiones sobre los músculos piramidales. No afecta a otros órganos o tejidos, ni causa trastornos mentales.

Durante los últimos siglos esta enfermedad ha aparecido en Francia, España, Siria, Rusia y otros países, pero se le relaciona especialmente con la India, en donde se observó que la enfermedad se presentaba cuando las circunstancias obligaban a la gente a consumir grandes cantidades de Lathyrus sativus. Un dato curioso es que la enfermedad ataca predominantemente a los varones y rara vez a las mujeres.

Investigadores españoles, mostraron que el latirismo se puede curar suministrando metionina, aminoácido del que tanto los garbanzos, como las demás leguminosas son deficientes. Además indicaron que no existe peligro de latirismo cuando las semillas de Lathyrus sativus se consumen en cantidades pequeñas (2).

FAVISMO

Es una enfermedad causada por la ingestión de habas crudas (Vicia faba) o por aspirar el polen de la flor de dicha leguminosa (36, 43).

Sus manifestaciones clínicas principales son anemia hemolítica, hemoglobinuria e ictericia, acompañadas con frecuencia de una fiebre alta. En casos graves, puede sobrevenir la muerte en un lapso de 24 a 48 horas, dándose el índice de mortalidad más elevado entre los niños. Esta enfermedad se halla limitada casi por completo a personas que viven en la región mediterránea.

Todavía no se ha identificado el factor tóxico o alérgico, pero se ha comprobado que las víctimas sufren una anormalidad bioquímica heredada que afecta al metabolismo del glutatión de los glóbulos rojos y obedece a la disminución de la actividad de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (2, 36).

LUPINUS

Es producido por un alcaloide venenoso, no identificado de la harina de la leguminosa lupinus; la enfermedad se caracteriza por causar daños en el hígado y pérdida de peso (36).

SAPONINAS

Son sustancias que se encuentran en la soya (25,43), y su acción consiste en una interacción proteína-saponina, impidiendo el aprovechamiento de dicha proteína. Potter y Kummerow (46), dicen que la saponina (soyasapogenol^B) inhibe el crecimiento de pollos y que el efecto benéfico del calor se debe a una hidrólisis de la saponina a sapogenina no tóxica. En Cannaivalia gladiata y Canavalia ensiforme, existen saponinas que causan vómitos y náuseas a menos que se ingieran remojadas y cocidas (36).

OTROS INHIBIDORES DE ENZIMAS

Se ha encontrado en las leguminosas una globulina que interfiere en la acción hidrolítica de 7 proteasas diferentes. Su acción es específica, es baja pero se encuentra en mayor concentración que el inhibidor de tripsina (35, 49).

ACIDO FITICO

Se encuentra en las leguminosas y es importante porque parece intervenir en la absorción del hierro (24). Layrisse (34), reportó que a pesar de que los frijoles son buena fuente de hierro, no hay una buena absorción y disponibilidad de él, de lo cual, el

ácido fítico puede ser responsable. Es uno de los factores tóxicos termoestables de los frijoles.

DISTROFIA MUSCULAR

Se ha producido en animales que ingieren la leguminosa Kidney bean en estado crudo, debido a la presencia de un factor anti-vitamina E, que es lábil al calentamiento, pues este tratamiento disminuye el efecto (9).

FLATULENCIA

Steggerda y col. (51) en un estudio con humanos, notaron que cuando se ingerían frijoles, había una alteración en la fisiología normal del aparato digestivo y en consecuencia se estimulaba marcadamente la producción de gases.

Rockland y col. (47) indicaron que la primera causa de la flatulencia, era la producción de gases por una bacteria anaeróbica, Gram positiva presente en la región gastrointestinal, después de una estimulación por factores desconocidos en frijoles secos y, posteriormente, sugieren que el causante es el Clostridium perfringens, que es el principal microorganismo anaerobio intestinal.

En general, se ha observado que los compuestos más susceptibles de producir gas son la sacarosa, rafinosa y estaquinososa (51, 35).

Las formas en que se puede disminuir la flatulencia es por medio de una extracción alcohólica en el frijol blanco y por un tratamiento enzimático en la soya (24).

PROPIEDAD HIPOCOLESTEROLEMICA

No es un factor tóxico, pero vale la pena mencionarlo, porque baja el nivel de colesterol en la sangre, efecto que no se nota con otros vegetales como la papa o el trigo. La substancia responsable de este efecto parece estar en la fracción de lípidos o carbohidratos de leguminosas (19, 9).

En la soya se han dilucidado otros factores tóxicos como anticoagulantes, un principio diurético y una histona tóxica (4). El estudio de estos factores tóxicos, se ha dificultado debido a que es difícil aislar fracciones purificadas en cantidades suficientes y con una sola actividad bioquímica o bien a que una fracción aislada puede tener un efecto diferente a la de la combinación de principios activos presentes en las semillas y, finalmente, debido a la gran variabilidad que existe en las fracciones de una especie a otra.

ELIMINACION DE FACTORES TOXICOS POR EFECTO DE COCCION

Los efectos tóxicos de leguminosas pueden ser parcial o totalmen-

te eliminados por métodos apropiados de cocción. El calentamiento se manifiesta por un incremento general del valor nutritivo de las proteínas de dichas semillas, en las cuales existe más de un componente tóxico (5, 36).

Generalmente, la mejoría en el valor biológico por efecto de calentamiento depende de: a) temperatura; b) tiempo de calentamiento y c) humedad (36).

Es necesario también tomar en cuenta que el calentamiento en exceso, puede resultar en una reducción del valor nutricional, por lo que se considera importante conocer las condiciones de cocción que resulten en la destrucción de los factores antinutricionales con un mínimo de calentamiento. Se ha demostrado particularmente, que el género Phaseolus vulgaris, requiere un tratamiento de cocción más drástico que otras leguminosas. (28, 20, 9, 37, 38, 11).

En la literatura se han registrado diversos tratamientos, entre los cuales se encuentra el de Bressani y col. (10), que cocieron frijoles desde 10 hasta 180 minutos a 16 libras de presión y 121°C, con una relación sólido -líquido 1:2. Ellos encontraron que el mejor tiempo de cocción estuvo entre 10 y 30 minutos, pues los frijoles calentados ese tiempo, daban una relación de eficiencia proteica (PER) más elevado que en los frijoles crudos. Un tiempo mayor de cocción, disminuyó el valor nutritivo de la prote

ina, afectando la disponibilidad de lisina.

Patwardhan (43), encontró que los inhibidores nutricionales de leguminosas eran destruídos entre 15 y 30 minutos y que de todas ellas, sólo dos necesitaban previo remojo antes de la cocción para eliminar completamente la toxicidad del estado crudo, estas son Dolichos lablab y Phaseolus vulgaris.

Sin embargo, por otro lado, se encontró que en Phaseolus vulgaris con tratamiento térmico, la actividad antitriptica se elimina casi por completo cuando se usa calor húmedo y que el remojo previo no influye en los valores obtenidos (36).

Otros reportes nos indican que el inhibidor de tripsina y la hema-glutinina de la soya, son más lábiles al calor que la del frijol y el haba (36) y precisamente se ha tomado como la destrucción de la toxicidad cuando no existe ya actividad aglutinante en Phaseolus vulgaris (25).

Es interesante destacar también el experimento efectuado por Borchers y Ackerson (6), en el cual sometieron a un calentamiento en autoclave a 17 leguminosas, de las cuales 8 mejoraron su valor nutritivo y 9 no. Ellos pensaron que esos resultados podían deberse a que la sola destrucción de los inhibidores de tripsina, no elimina los otros factores o bien en algunas leguminosas están en mayor con

centración que en otras.

En un estudio realizado en Chile, se hizo la comparación de la calidad proteica de diferentes leguminosas, con tratamientos térmicos diferentes y se encontró que la mejor calidad corresponde al garbanzo, seguido de la soya, arveja, frijol y lenteja (42).

III. OBJETIVOS

- 1.- Determinar la composición química de 13 diferentes muestras de leguminosas comestibles, así como el contenido de dos de los principales factores tóxicos presentes: inhibidores de Tripsina y Hemaglutininas, que son los más importantes.
- 2.- Observar el efecto del tratamiento de cocción de las muestras sobre los inhibidores de tripsina, las hemaglutininas y sobre la digestibilidad "in vitro".
- 3.- Determinar la digestibilidad "in vitro" de las leguminosas y correlacionar la presencia de los inhibidores nutricionales con el estado crudo y cocido de las muestras.

IV. PARTE EXPERIMENTAL

1.- MATERIALES

1.1 Muestras empleadas.

Para el presente estudio se usaron 13 leguminosas comestibles: 10 variedades de frijol, el haba, el chícharo seco y la lenteja. En el cuadro IV-1 se enumeran las 13 muestras con su nombre científico y su lugar de origen.

Las 10 primeras muestras fueron proporcionadas por el Departamento de Leguminosas de Grano del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) en Chapingo Estado de México. El frijol ayocote fue una muestra procedente del Estado de Hidalgo y la lenteja y el chícharo seco fueron obtenidos en un mercado local del Distrito Federal. En el cuadro IV-2 se muestran las características agronómicas de las muestras estudiadas.

1.2 Tratamiento de las muestras.

a) Muestras crudas.- Las muestras se limpiaron y se molieron en un molino Arthur H. Tomas C.O. a 40 mallas y en forma de harina se hicieron directamente las determinaciones.

C U A D R O IV-1

MUESTRAS EMPLEADAS Y SU ORIGEN

Leguminosa	Nombre Científico	Origen
F. Villa Guerrero	<u>Phaseolus vulgaris</u>	Estado de México
F. Canario - 107	<u>Phaseolus vulgaris</u>	Estado de México
F. Negro - 172	<u>Phaseolus vulgaris</u>	Puebla
F. Japonés blanco	<u>Phaseolus vulgaris</u>	Japón
F. Jamapa - CH - 73	<u>Phaseolus vulgaris</u>	Veracruz
F. Bayo - 107	<u>Phaseolus vulgaris</u>	Estado de México
F. Delicias - 71	<u>Phaseolus vulgaris</u>	Chihuahua
F. Puebla - 182 - 1	<u>Phaseolus vulgaris</u>	Puebla
F. Pinto - 162	<u>Phaseolus vulgaris</u>	Hidalgo
Haba Tlaxcala - 12	<u>Vicia faba</u>	Tlaxcala
Lenteja	<u>Lens esculenta</u>	--
Chícharo seco	<u>Pisum sativum</u>	--
F. Ayocote	<u>Phaseolus coccineous</u>	Hidalgo

-- No se conoce su lugar de origen.

b) Muestras cocidas.- Otro lote de muestras limpias se sometió a un proceso de cocción durante 2 horas a temperatura de ebullición, agitando esporádicamente y recuperando el volumen cada

C U A D R O IV-2

CARACTERISTICAS AGRONOMICAS DE LAS MUESTRAS

Variedad	Lugar de cultivo	Hábito de crecimiento	Color de la flor	Color de la semilla	Ciclo vegetativo (días)	Rend./Hect. Kg.
F. Villa Guerrero	Edo. de México	Semiguía	Morado	Negro	110	2 500
F. Canario - 107	Edo. de México Bajío	Mata	Rosa	Canario	90	1 800
F. Negro - 172	Puebla, Tlaxcala	Guía	Morado	Negro	120	2 500
F. Japonés blanco	Japón	Mata	Blanco	Blanco	95	1 800
F. Jamapa - CH - 73	Ver., Tam., Nay.	Semiguía	Morado	Negro	110	2 250
F. Bayo - 107	Edo. de México Bajío	Semiguía	Blanco	Bayo	110	2 000
F. Delicias - 71	Chih., Zacatecas Durango	Semiguía	Blanco	Pinto	110	2 000
F. Puebla - 182-1	Puebla	Guía	Morado	Negro	125	2 000
F. Pinto - 162	Hidalgo	Guía	Blanco	Pinto	125	2 500
Haba Tlaxcala - 12	Tlaxcala	--	Morado	--	135	2 250
Lenteja	Bajío, Mich.	--	--	--	--	--
Chícharo seco	Bajío, Pue., Hgo.	--	--	--	--	--
F. Ayocote	Hgo., Tlax., Pue.	--	Morado	Rojo	--	--

15 minutos. La relación inicial semilla - agua fue 1:4 peso: volumen respectivamente. Una vez transcurrido el tiempo de cocción se separaron los granos y se pusieron a secar en charolas de aluminio durante una noche a 80 - 90°C. Las muestras secas se molieron en el mismo molino que las muestras crudas y se usaron para las determinaciones.

Por otro lado el agua de cocción de cada muestra se aforó a 250 ml, de donde se hicieron determinaciones de proteínas y de inhibidores de tripsina, con alicuotas de 5 ml y 1 ml respectivamente.

2.- METODOS

Tanto en las muestras crudas como en las muestras cocidas, se hicieron las siguientes determinaciones:

- Análisis Bromatológico.
- Determinación de Inhibidores de Tripsina.
- Determinación de Hemaglutininas.
- Digestibilidad "In vitro".

2.1 ANALISIS BROMATOLOGICO

El análisis bromatológico está constituido por 5 determinaciones, las cuales se llevaron a cabo siguiendo los métodos descritos por el A.O.A.C. (40):

- Humedad
- Cenizas
- Proteína cruda
- Grasa cruda
- Fibra cruda

HUMEDAD

Material

Estufa Thelco de vacío

Balanza Analítica

Desecador

Pesafiltros o charolas de aluminio.

Fundamento

Se basa en la pérdida de agua de la muestra por efecto de la temperatura. El dato se obtiene por diferencia de peso entre la muestra húmeda y la muestra seca.

Procedimiento

Los pesafiltros o charolas de aluminio se pusieron a secar en la estufa de vacío durante 2 horas o mas hasta obtener peso constante.

En las charolas a peso constante se pesaron de 3 a 5 g de muestra

y se llevaron a la estufa de vacío a una temperatura de 60 - 70°C durante 5 horas. Una vez transcurrido el tiempo, se sacaron las charolas y se colocaron en el desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y se pesaron.

Cálculos

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(A - B) 100}{A}$$

Donde: A = Peso de la muestra húmeda.

B = Peso de la muestra seca.

CENIZAS

Material

Mufla

Balanza Analítica

Desecador

Crisoles de porcelana

Tripié metálico

Triángulo de porcelana

Mechero.

Fundamento

Primeramente se lleva a cabo la destrucción de la materia orgánica para calcinar posteriormente hasta obtener las cenizas.

Procedimiento

Se pesaron de 3 a 5 g de muestra en los crisoles de porcelana, puestos previamente a peso constante. Los crisoles con muestra se colocaron en posición inclinada sobre un tripie con un triángulo de porcelana y se calentaron directamente con el mechero hasta la total carbonización de la muestra.

Una vez destruida la materia orgánica, se colocaron los crisoles en la mufla a una temperatura de 550°C, durante el tiempo necesario para obtener cenizas blancas o grises homogéneas. Se debe tener cuidado que la temperatura no exceda los 550°C, pues de lo contrario se produce la volatilización de los cloruros.

Obtenidas las cenizas se transfirieron los crisoles al desecador, se enfriaron y se pesaron.

Cálculos

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{A \times 100}{B}$$

Donde: A = Peso de las cenizas

B = Peso de la muestra original.

PROTEINA CRUDA. METODO DE KJELDAHL

Material

Aparato Macro-Kjeldahl. Digestor y Destilador LABCONCO.

Balanza Analítica

Matraces Kjeldahl de 500 ml

Matraces Erlenmeyer de 500 ml

Bureta

Reactivos

Mezcla digestiva

Solución de ácido bórico 0.5 % (con indicadores)

Solución de HCl 0.1 N

Solución de NaOH 60 %

Mezcla reactiva de selenio (Merck).

Preparación de reactivos

Mezcla digestiva.- A 300 ml de ácido sulfúrico se le adicionan 100 ml de ácido ortofosfórico y 3 g de sulfato cúprico, se mezclan perfectamente hasta la total disolución.

Solución de ácido bórico 0.5 % con indicadores.- 10 g de ácido bórico se disuelven en 1000 ml de agua destilada, se agregan 70 ml del indicador (a) y 20 ml del indicador (b), se agrega más agua hasta cerca del aforo, se ajusta el color a café rojizo y se afora a 2000 ml.

Indicador (a).- Solución de fenolftaleína al 0.1 % en alcohol etílico.

Indicador (b).- 33 mg de verde de bromocresol y 66 mg de rojo de metilo se disuelven y se aforan a 100 ml con etanol al 95 %.

Fundamento

El método consta de 2 fases: 1) Digestión, en la cual se lleva a cabo la destrucción de la materia orgánica y la fijación del nitrógeno como sulfato ácido de amonio; 2) Destilación, en donde se libera el nitrógeno, que se recibe en una solución de ácido bórico, formando el borato de amonio que se titula con solución de HCl 0.1 N.

Con los datos anteriores se obtiene el % de nitrógeno que multiplicado por el factor 6.25 nos da directamente el % de proteína cruda.

Procedimiento

Se pesaron aproximadamente 0.5 g de muestra y se colocaron en un matraz de Kjeldahl de 500 ml, se adicionaron 5 g de mezcla reactiva de selenio (catalizador), piedras de ebullición y 20 ml de mezcla digestiva. Se colocaron los matraces en el digestor y se calentaron durante 2,5 horas.

Transcurrido el tiempo de la digestión, se dejaron enfriar los matraces, se agregaron 200 ml de agua destilada fría, se agitaron y se dejaron reposar; después con mucho cuidado y resbalando por

las paredes se adicionaron 50 ml de NaOH al 60 % bien frío para que se estratifique, inmediatamente se colocaron los matraces en el destilador y se conectaron las trampas de vacío. El destilado se recibió en 150 ml de ácido bórico al 0.5 %, que se encontraba previamente en un matraz Erlenmeyer de 500 ml conectado a la salida del destilador. Al final de la destilación, se tituló el contenido del matraz con HCl 0.1 N y se anotaron los resultados.

Al mismo tiempo de la determinación, se hace también el análisis de un blanco de reactivos.

Cálculos

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(A-B) \times N \times \text{Meq. N}_2 \times 100}{\text{HCl}}$$

Peso de la muestra

Donde: A = ml de HCl 0.1 N usados para titular la muestra.

B = ml de HCl 0.1 N usados para titular el blanco de reactivos.

Meq. = Miliequivalente.

$$\% \text{ Proteína cruda} = \% \text{ Nitrógeno} \times 6.25$$

GRASA CRUDA

Material

Aparato de extracción de Gold-fish. LABCONCO.

Estufa Thelco de vacío

Balanza Analítica

Vasos de precipitados de borde esmerilado

Cartuchos de celulosa.

Reactivos

Eter anhidro

Fundamento

La volatilización y condensación del éter etílico anhidro sobre la muestra, produce una recirculación continua por medio de la cual se extrae todo el material soluble en él.

Procedimiento

Se pesaron de 2 a 3 g de muestra seca en los cartuchos de celulosa, que se colocaron en el aparato de extracción por medio de fundas de vidrio abiertas por ambos extremos.

Por otro lado se adicionaron 40 ml de éter anhidro en los vasos de borde esmerilado puestos previamente a peso constante y se conectaron al aparato con ayuda de anillos de rosca especiales,

para evitar que se escapara el éter. Cada cartucho de celulosa con la muestra quedó dentro de un vaso con éter.

El aparato consta de un sistema de calentamiento y otro de condensación. Se hizo funcionar aproximadamente 4 a 5 horas para llevar a cabo una extracción continua. Cuando la extracción se hubo completado se destiló el éter y los vasos con grasa se llevaron a la estufa a 60 - 65°C hasta obtener peso constante.

Cálculos

$$\% \text{ Grasa Cruda} = \frac{A \times 100}{B}$$

Donde A = Peso de la grasa.

B = Peso de la muestra.

FIBRA CRUDA

Material

Estufa Thelco de vacío

Mufla

Parrilla con agitador

Matraces Erlenmeyer de 1000 ml

Asbesto calcinado.

Reactivos

Acido sulfúrico 1.25 %

Hidróxido de sodio 1.25 %

Fundamento

Se usa una muestra desengrasada, la que se somete a un tratamiento ácido y posterior tratamiento básico. El residuo de esta hidrólisis es la parte no digerible o fibra cruda.

Procedimiento

Se pesaron de 2 a 3 g de muestra desengrasada y se colocaron en un matraz Erlenmayer de 1000 ml. Se adicionaron 0.5 g de asbesto calcinado y 200 ml de una solución de ácido sulfúrico 1.25 % hirviendo, se mantuvo la ebullición durante 30 minutos al cabo de los cuales se filtró sobre un paño de lino en un buchner y se lavó con agua destilada hasta que no diera reacción ácida.

Una vez lavado el residuo, se transfirió al matraz original, se adicionaron ahora 200 ml de hidróxido de sodio 1.25 % hirviendo y nuevamente se dejó hervir 30 minutos, se volvió a filtrar, se lavó con agua destilada hasta que no hubo reacción básica y finalmente se hizo un último lavado con 25 ml de alcohol etílico al 95 %.

El residuo limpio se colocó en un crisol de porcelana puesto previamente a peso constante y se llevó a la estufa para secarlo a 60 - 65°C durante 2 horas, después de las cuales se pasó al desecador, se dejó enfriar y se pesó. Posteriormente se colocó el crisol en la mufla para calcinar el residuo a 900°C. Se transfirió nuevamente al desecador se dejó enfriar y se pesó.

Cálculos

$$\% \text{ Fibra Cruda} = \frac{(A-B) 100}{C}$$

Donde: A = Peso del residuo seco.

B = Peso del residuo calcinado.

C = Peso de la muestra original.

El valor de CARBOHIDRATOS ASIMILABLES es un dato teórico que se obtiene por diferencia, restando al 100 % la suma de los valores de humedad, cenizas, proteína cruda, grasa cruda y fibra cruda.

2.2 DETERMINACION DE INHIBIDORES DE TRIPSINA

La determinación se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Kakade y col. (30), con algunas modificaciones.

Material

Balanza analítica

Potenciómetro

Baño maría con agitación y control de temperatura

Centrífuga

Espectrofotómetro.

Reactivos

* Solución amortiguadora de Tris 0.05 M pH = 8.2

* Solución BAPNA (Benzoil Arginina p-Nitroanilida) 3 mM

* Solución estándar de tripsina, 40 microgramos/ml

Acido acético 30 %.

* (Estos reactivos fueron adquiridos en la casa Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. U.S.A.).

Preparación de reactivos

Solución amortiguadora de Tris 0.05 M pH = 8.2 .- Se pesaron 0.5 g de Tris (Hidroximetil - aminoetano) y 2.94 g de cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Se disolvieron por separado en agua destilada y se mezclaron en un volumen total de 900 ml, se ajustó el pH a 8.2 y se aforó la solución a 1000 ml con agua destilada.

Solución BAPNA 3 milimolar .- Se hizo primeramente una solución

de BAPNA 0.04 Molar, para la cual se pesaron 870 mg de BAPNA y se disolvieron en 50 ml de dimetilsulfóxido. Se debe tener cuidado de que la disolución sea completa, pues de lo contrario los residuos de cristales no disueltos hacen precipitar al reactivo. La solución obtenida se puede guardar en refrigeración, para posteriormente obtener la disolución 3 milimolar.

La solución BAPNA 3 milimolar se preparó tomando 7.5 ml de solución BAPNA 0.04 Molar y aforando a 100 ml con solución amortiguadora de Tris (37°C). Esta última solución es la que se usó en la determinación y se preparó en el momento de ser usada.

Solución estándar de tripsina de 40 microgramos/ml .- Se pesaron exactamente 4 mg de tripsina (cristalizada 2 veces y libre de sales) y se disolvieron en 100 ml de ácido clorhídrico 0.001 M. Esta solución puede guardarse en refrigeración por 2 o 3 semanas sin pérdida de actividad.

Fundamento

Es una determinación "in vitro", que se basa en el uso de un sustrato cromógeno BAPNA y en la medición espectrofotométrica de la p-Nitroanilina, directamente a 420 nanómetros (5).

La tripsina en contacto con el sustrato benzoil arginina p-Nitroanilida, lo hidroliza liberando benzoil arginina y p-Nitroanilina

alícuota de 5 ml del sobrenadante y se aforó a 50 ml con agua destilada. Del extracto obtenido se emplearon alícuotas de 1 ml para la determinación. (1 mg de muestra/ml de extracto final).

Con objeto de observar la relación entre proteína e inhibidor de tripsina, se hizo también la determinación de proteínas en los mismos extractos.

Actividad antitriptica de las muestras

Los pasos a seguir en la determinación son los que se enumeran a continuación:

- 1.- Tomar alícuotas de 1 ml de cada uno de los extractos de las muestras por triplicado y colocarlas en tubos de ensaye.
- 2.- Adicionar 1 ml de solución estándar de tripsina a todos los tubos.
- 3.- Colocar los tubos en un baño de agua a 37°C.
- 4.- Agregar 1 ml de ácido acético 30 % a uno de los 3 tubos de cada muestra, que servirá como blanco correspondiente.
- 5.- Dejar reposar 5 minutos para estabilizar la temperatura.
- 6.- Agregar 2 ml de solución BAPNA 3 mM a todos los tubos.
- 7.- Nuevamente dejar reposar 15 minutos para que se lleve a cabo la reacción.
- 8.- Agregar 1 ml de ácido acético al 30 % a los tubos que no tienen, para detener la reacción.

- 9 .- Sacar los tubos del baño y agitar.
- 10.- Hacer la lectura a 420 nm.

Al mismo tiempo de la determinación se corrió una curva estándar de tripsina como se describe a continuación:

- 1.- Se tomaron alícuotas de 0.2 ml, 0.4 ml, 0.6 ml, 0.8 ml y 1.0 ml de solución estándar de tripsina, pipeteando por triplicado en tubos de ensaye.
- 2.- Se adicionó la cantidad de agua destilada necesaria a todos los tubos, para obtener un volúmen de 2 ml.
- 3.- Se siguieron los mismos pasos (a partir del número 3) usados en la determinación de la muestra.

Expresión de Actividad

La actividad antitriptica puede expresarse en dos diferentes formas:

- 1.- Los resultados de los problemas se leen directamente en la curva estándar y se reportan como microgramos de tripsina inhibida por mg de muestra.
- 2.- La actividad antitriptica se define también como el número de Unidades de Tripsina Inhibidas (UTI).

Una unidad de tripsina se define arbitrariamente como el aumento

de 0.01 unidades de densidad óptica (D.O.) que se absorben a 420 nanómetros (30).

Las UTI/mg de muestra se obtienen restando la densidad óptica de cada problema a la densidad óptica del último punto de la curva estándar, equivalente a 1 ml de solución estándar de tripsina. Posteriormente se hace la relación con 1 UT = 0.01 unidades de densidad óptica.

Ejemplo

D.O. del último punto de la curva estándar (1 ml) = 0.583

D.O. del problema (1 ml) = 0.323

(Tomando en cuenta que el problema lleva 1 ml de solución estándar de tripsina).

1 UT - 0.01 unidades de D.O.

1 UT - 0.01 unidades de D.O.

x - 0.583 unidades de D.O.

x - 0.323 unidades de D.O.

x = 58.3 UT

x = 32.3 UT

58.3 UT - 32.3 UT = 26.0 UTI / ml de extracto

Como la concentración del extracto es 1 mg/ml, tendremos como resultado:

26 UTI / mg de muestra

2.3 DETERMINACION DE HEMAGLUTININAS

La determinación se hizo de acuerdo al método descrito por Jaffé y col. (27).

Material

Sangre de vaca

Sangre de conejo

Sangre humana

Fundamento

Se basa en la propiedad que tienen los extractos de las leguminosas de provocar aglutinación en diferentes tipos de sangre.

Preparación de la muestra

Se pesó 1 g de muestra molida y se extrajo con 10 ml de NaCl 1.0 %, agitando mecánicamente durante 2 horas, después de las cuales se centrifugó 10 minutos a 2 000 rpm y se separó el sobrenadante para usarse en las determinaciones. La concentración del extracto es 100 mg / ml.

Preparación de la sangre

La sangre obtenida se colocó en un matraz con perlas de vidrio y se agitó para desfibrinar y evitar así la coagulación.

Se tomaron 5 ml de sangre desfibrinada en un tubo de ensaye y se le agregaron 10 ml de solución de tripsina 0.1 % en solución salina fisiológica (0.9 %), se colocó el tubo en un baño de agua a 37°C durante 30 minutos, al cabo de los cuales se centrifugó para eliminar el sobrenadante. Se lavó 3 veces con solución salina fisiológica (0.9 %) y se resuspendió en 10 ml de ella para usarse en las pruebas de aglutinación. El objeto del tratamiento con tripsina es aumentar la susceptibilidad de las células rojas a la aglutinación.

Procedimiento

Para la determinación se colocó una gota del extracto de la muestra en una superficie lisa, inocua y transparente para poder observar la aglutinación (vidrio), se le agregó una gota de la suspensión de células rojas, se mezclaron y visualmente se observó la aglutinación en un tiempo determinado (10 minutos).

La medición se hizo por comparación con un blanco, el cual se preparó con solución salina fisiológica (0.9 %) y la suspensión de células rojas.

Si la aglutinación de las células rojas es muy fuerte, se preparan diferentes diluciones del extracto de la muestra y se someten al mismo tratamiento hasta encontrar la dilución a la que ya no aglutinen.

La actividad hemaglutinante se reportó como la dilución máxima a la que aún aglutinan las células rojas.

2.4 DIGESTIBILIDAD " IN VITRO "

Esta determinación se realizó de acuerdo a lo reportado por Oke y col. (41).

Material

Baño maría con agitador y control de temperatura

Aparato Macro-Kjeldahl. Digestor y Destilador. LABCONCO.

Matraces Kjeldahl de 500 ml

Balanza Analítica.

Reactivos

Acido clorhídrico 0.1 N

Hidróxido de sodio 0.5 N

Pepsina

Pancreatina

Solución amortiguadora de fosfatos 0.2 Molar, pH = 8, 0.005 Molar de azida de sodio.

Fundamento

La determinación se basa en la hidrólisis de la muestra por acción

de enzimas digestivas (pepsina y pancreatina) que provocan la liberación de aminoácidos solubles, determinando antes y después de la digestión el contenido de proteínas.

Procedimiento

250 mg de muestra se suspendieron en 15 ml de HCl 0.1 N, conteniendo 1.5 mg de pepsina y se agitaron lentamente a 35°C por 3 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de agitación se neutralizó con NaOH 0.5 N y se trató con 4 mg de pancreatina en 7.5 ml de la solución amortiguadora de fosfatos 0.2 Molar, pH = 8, conteniendo 0.005 Molar de azida de sodio. Se agitó nuevamente durante 25 horas a 35°C, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante, se lavó el residuo con agua destilada y se usó para la determinación de nitrógeno por el método de Kjeldahl, para calcular el porcentaje de proteína no digerible.

Cálculos

$$\% \text{ Digestibilidad} = \frac{\text{Proteína total} - \text{Proteína no digerible}}{\text{Proteína total}} \times 100$$

V. RESULTADOS

1.- ANALISIS BROMATOLOGICO

Los resultados del análisis bromatológico de las muestras crudas se presentan en el cuadro V-1, en donde se puede observar que todas las leguminosas tienen aproximadamente la misma composición; sin embargo, en lo que respecta al contenido de proteínas, el haba sobresale por mostrar el valor más alto con 26,9 % y el frijol ayocote con 19.0 % resultó ser el de menor contenido. En general, todas las muestras presentaron valores que quedaron incluidos dentro del intervalo reportado en la literatura, el cual varía de 18 a 32 % (43, 9).

Los valores obtenidos para grasa, fueron pequeños, variando de 1 a 2 %. Los resultados de fibra cruda, fueron muy similares en todas las muestras, a excepción del haba, que por ser descascarada, presentó un menor contenido. Por último, se puede hacer resaltar que la lenteja presentó valores muy bajos para cenizas, grasa y fibra cruda.

En el cuadro V-2, se muestran los resultados de las determinaciones de humedad y proteínas, que se efectuaron en las muestras cocidas. En este cuadro se puede ver que la humedad disminuyó en todas las muestras cocidas y la proteína se mantuvo prácticamente constante, lo que se puede comprobar en la figura V-1.

Se hizo también la determinación de proteínas del agua de cocción, mostrándose los resultados en el cuadro V-3, en donde se ve claramente, que todas las muestras pierden una cantidad de proteína en el agua de cocción, siendo el frijol ayocote el que menos proteína pierde con 0.93 %, que representa el 4.8 % de la proteína total y el frijol jamapa, el que más pierde con 2.65 % que corresponde al 10.4 % de la proteína total. Estos datos se representan gráficamente en la figura V-2.

En el cuadro V-4 y la figura V-3, se muestra la cantidad de proteína que se solubiliza durante la extracción de las muestras crudas, para efectuar las determinaciones de inhibidores de tripsina. Se puede observar que la proteína soluble, constituye siempre más del 50 % de la proteína total y en algunos casos como en el haba, alcanza un valor de 78 %. Sin embargo, no existe ninguna relación entre inhibidores de tripsina y contenido de proteína soluble.

2.- INHIBIDORES DE TRIPSINA

El cuadro V-5, presenta los resultados de los inhibidores de tripsina en las muestras crudas y cocidas, así como el porcentaje de destrucción por efecto de cocción. En lo que respecta al resultado de las muestras crudas, se puede notar que el frijol ayocote y el frijol jamapa, presentaron los valores más altos con 21.5 y 21.3 UTI / mg de muestra respectivamente. En general, el género Phaseolus en forma cruda, presentó alto contenido de inhibidores de tripsina, pero los otros géneros, presentaron bajo contenido. Por ejemplo, el haba presentó un valor de 6.0 UTI / mg de muestra, la lenteja 1.8 UTI / mg de muestra y el chícharo seco no presentó actividad antitriptica, como se puede ver en la figura V-4.

Los resultados de los análisis de las muestras cocidas (2 horas a temperatura de ebullición), permiten observar que la cocción tuvo un efecto destructivo sobre los inhibidores de tripsina, razón por la cual, presentaron valores muy bajos; el frijol ayocote, presentó el valor más alto con 4.9 UTI / mg de muestra. En el caso del haba, que presentó un bajo contenido en forma cruda, la destrucción por efecto de cocción fue muy pequeña.

Lo anterior se puede observar más claramente, al revisar los porcentajes de destrucción, en donde se ve que en general, en todas

las muestras del género Phaseolus, se destruye más del 75 % de los inhibidores de tripsina totales en las muestras crudas, siendo el frijol jamapa el que presentó el porcentaje de destrucción más elevado con 88.1 %. Se puede hacer notar también, que mientras menor es el contenido de inhibidores de tripsina, el porcentaje de destrucción también se reduce.

En el cuadro V-6 y figura V-5, se presentan los resultados de los inhibidores de tripsina en el agua de cocción. Se puede notar, que el contenido de éstos es mínimo, siendo el agua de cocción del frijol ayocote el que más actividad presentó con 1.40 UTI / mg de muestra. En general, los inhibidores de tripsina solubles, constituyen de 3 a 5 % de los inhibidores de tripsina totales en las muestras crudas, con excepción del frijol ayocote y la lenteja que presenta mayores porcentajes con 6.5 y 10.8 UTI /mg de muestra respectivamente y el haba que presenta un porcentaje menor, con 1.7 UTI / mg de muestra.

3.- HEMAGLUTININAS

Los resultados de los análisis de las hemaglutininas de las muestras crudas y cocidas, se presentan en el cuadro V-7, en el cual, se ve claramente que todas las leguminosas crudas tienen poder aglutinante en los tres tipos de sangre tripsinizada, excepto el haba, la lenteja y el chícharo seco, que no aglutinaron la sangre

de vaca. Sin embargo, se puede hacer notar que el género Phaseolus, tiene un gran poder aglutinante, pues diluciones de 1:50 000 provocan aglutinación en sangre de conejo, que a su vez resultó ser la de mayor susceptibilidad, mientras que la de menor susceptibilidad, fue la sangre de vaca.

El haba, la lenteja y el chícharo seco, que no aglutinaron la san gre de vaca, presentaron también bajos valores de aglutinación en sangre humana en comparación con el género Phaseolus.

En lo que respecta a los resultados de las muestras cocidas, se observa que el tratamiento de cocción disminuyó el poder aglutinante de todas las leguminosas, notándose que en la sangre de va ca y en la sangre humana no hubo aglutinación, en cambio en la sangre de conejo permanece la actividad aglutinante, pero en menor grado, aunque todavía la dilución se considera elevada (1:1 000). En la figura V-6, se presenta en forma logarítmica los resultados de esta aglutinación, en la que prácticamente el género Phaseolus, tiene un comportamiento idéntico en esta prueba.

4.- DIGESTIBILIDAD " IN VITRO "

En el cuadro V-8 y la figura V-7, presentan los resultados de la determinación de la digestibilidad "in vitro" de las muestras crudas y cocidas. Se puede observar que la digestibilidad de las

muestras crudas es bastante elevada, sobresaliendo el haba con un 94.3 % y el frijol ayocote por el contrario, resultó ser el de menor digestibilidad con 80.3 %. Al mismo tiempo se puede ver que la cocción disminuye la digestibilidad "in vitro" en todas las muestras, siendo ésta más marcada en el frijol Delicias, que disminuye de 87.5 % a 61.7 %. En el caso del chícharo seco practicamente la digestibilidad no se ve afectada por la cocción.

VI.- DISCUSION Y CONCLUSIONES

1.- DISCUSION

El análisis bromatológico de las muestras estudiadas, resultó estar de acuerdo al análisis reportado anteriormente por otros autores (43, 9). Es necesario hacer notar el alto contenido proteico del haba (26.9 %), así como su bajo contenido de fibra cruda, debido a la potencialidad del uso de la proteína de esta leguminosa para la manufactura de productos de proteína texturizada (1).

Se postuló que al someter las muestras a un tratamiento de cocción, éstas perdieran parte de su proteína en el agua, de tal manera que el contenido proteico de las muestras cocidas fuera menor, sin embargo, en la práctica dicho contenido proteico permaneció casi constante respecto a las muestras crudas y en 7 de las 13 muestras estudiadas mostraron valores ligeramente superiores (figura V-1).

Por los resultados anteriores, se procedió a hacer también un

C U A D R O V-1

ANALISIS BROMATOLOGICO DE LAS MUESTRAS ESTUDIADAS
(gramos/100 gramos de muestra)

Muestras	Humedad	Cenizas	Proteínas	Grasa	Fibra cruda	Carbohi- dratos
F. Villa Guerrero	9.8	4.1	23.5	1.6	6.0	55.0
F. Canario - 107	10.2	4.2	21.9	1.4	6.6	55.7
F. Negro - 172	8.9	4.2	23.5	1.3	6.3	55.8
F. Japonés blanco	9.7	3.8	25.5	1.8	5.2	54.1
F. Janapa - CH - 73	9.3	4.1	25.3	1.7	5.0	54.6
F. Bayo - 107	9.7	4.2	20.1	1.7	5.3	59.1
F. Delicias - 71	8.8	4.2	25.8	1.9	5.0	54.2
F. Puebla - 182 - 1	9.0	3.8	24.5	1.5	4.2	57.0
F. Pinto - 162	9.2	3.5	20.6	1.7	5.1	59.9
Haba Tlaxcala - 12	9.3	3.7	26.9	1.6	1.5	57.0
Lenteja	10.2	2.4	24.9	1.0	4.1	57.6
Chícharo seco	9.5	2.2	23.1	1.3	6.6	57.3
F. Ayocote	9.9	3.8	19.0	1.5	4.9	60.9

C U A D R O V-2

ANALISIS DE LAS MUESTRAS COCIDAS
(gramos/100 gramos de muestra)

Muestras	Humedad	Proteínas
F. Villa Guerrero	8.9	24.7
F. Canario - 107	8.7	22.1
F. Negro - 172	8.8	23.9
F. Japonés blanco	8.6	25.3
F. Jamapa - CH - 73	8.8	24.9
F. Bayo - 107	9.2	19.7
F. Delicias - 71	6.7	26.3
F. Puebla - 182 - 1	7.9	24.4
F. Pinto - 162	7.4	21.3
Haba Tlaxcala - 12	8.6	25.8
Lenteja	8.0	24.6
Chícharo seco	7.5	23.8
F. Ayocote	4.9	19.2

C U A D R O V-3

DETERMINACION DE PROTEINAS DEL AGUA DE COCCION
(gramos/100 gramos de muestra)

Muestras	Proteínas
F. Villa Guerrero	2.3
F. Canario - 107	1.9
F. Negro - 172	1.8
F. Japonés blanco	2.2
F. Jamapa - CH - 73	2.7
F. Bayo - 107	1.4
F. Delicias - 71	2.2
F. Puebla - 182 - 1	1.9
F. Pinto - 162	1.3
Haba Tlaxcala - 12	1.7
Lenteja	2.2
Chícharo seco	1.3
F. Ayocote	0.9

C U A D R O V-4

CONTENIDO DE PROTEINAS DE LA EXTRACCION PARA
INHIBIDORES DE TRIPSINA EN LAS MUESTRAS CRUDAS

Muestras	Proteína total g/100g M.	Proteína soluble g/100g M.	% Proteína soluble	Proteína insoluble g/100g M.	% Proteína insoluble
F. Villa Guerrero	23.5	14.0	59.7	9.5	40.3
F. Canario - 107	21.9	14.0	63.9	7.9	36.1
F. Negro - 172	23.5	12.3	52.2	11.2	47.8
F. Japonés blanco	25.5	15.8	61.9	9.7	38.1
F. Jamapa - CH - 73	25.3	15.8	62.4	9.5	37.7
F. Bayo - 107	20.1	11.4	56.7	8.7	43.3
F. Delicias - 71	25.8	13.1	50.8	12.7	49.2
F. Puebla - 182 - 1	24.5	14.9	60.8	9.6	39.2
F. Pinto - 162	20.6	12.3	59.6	8.3	40.4
Haba Tlaxcala - 12	26.9	21.0	78.0	5.9	22.0
Lenteja	24.9	13.1	52.7	11.8	47.3
Chícharo seco	23.1	13.1	56.7	10.0	43.3
F. Ayocote	19.0	11.4	59.8	7.6	40.2

C U A D R O V-5

RESULTADOS DE INHIBIDORES DE TRIPSINA EN MUESTRAS CRUDAS Y COCIDAS

Muestras	Crudas UTI/mg. Muestra	Cocidas UTI/mg. Muestra	% Destrucción por cocción
F. Villa Guerrero	14.5	2.4	83.1
F. Canario - 107	11.8	2.7	78.9
F. Negro - 172	10.9	2.2	79.8
F. Japonés blanco	10.0	2.8	73.4
F. Jamapa - CH - 73	21.3	2.3	88.1
F. Bayo - 107	10.6	1.9	83.4
F. Delicias - 71	15.0	2.5	84.1
F. Puebla - 182 - 1	11.8	2.9	74.6
F. Pinto - 162	12.8	2.2	82.3
Haba Tlaxcala - 12	6.0	4.0	33.3
Lenteja	1.8	1.8	0.0
Chícharo seco	0.0	0.0	0.0
F. Ayocote	21.5	4.9	75.4

U T I = Unidades de Tripsina Inhibidas.

C U A D R O V-6

CONTENIDO DE INHIBIDORES DE TRIPSINA
EN EL AGUA DE COCCION

Muestras	UTI/mg. Muestra	% Inhibidores solubles
F. Villa Guerrero	0.7	4.6
F. Canario - 107	0.6	4.8
F. Negro - 172	0.5	5.0
F. Japonés blanco	0.5	4.7
F. Jamapa - CH - 73	0.7	3.1
F. Bayo - 107	0.5	5.0
F. Delicias - 71	0.7	4.4
F. Puebla - 182 - 1	0.6	4.9
F. Pinto - 162	0.5	3.8
Haba Tlaxcala - 12	0.1	1.7
Lenteja	0.2	10.4
Chícharo seco	0.0	0.0
F. Ayocote	1.4	6.5

U T I = Unidades de Tripsina Inhibida.

C U A D R O V-7

CONTENIDO DE HEMAGLUTININAS DE LAS MUESTRAS CRUDAS Y COCIDAS
(Dilución máxima a la que aún aglutinan)

Muestras	Muestras crudas			Muestras cocidas		
	Sangre humana	Sangre de conejo	Sangre de vaca	Sangre humana	Sangre de conejo	Sangre de vaca
F. Villa Guerrero	1:15000	1:50000	1:100	--	1:1000	--
F. Canario - 107	1:15000	1:50000	1:100	--	1:1000	--
F. Negro - 172	1:15000	1:50000	1:100	--	1:1000	--
F. Japonés blanco	1:15000	1:50000	1:50	--	1:1000	--
F. Jamapa - CH - 73	1:15000	1:50000	1:100	--	1:1000	--
F. Bayo - 107	1:15000	1:50000	1:50	--	1:1000	--
F. Delicias - 71	1:15000	1:50000	1:100	--	1:1000	--
F. Puebla - 182 - 1	1:15000	1:50000	1:100	--	1:1000	--
F. Pinto - 162	1:15000	1:50000	1:50	--	1:1000	--
Haba Tlaxcala - 12	1:300	1:15000	--	--	1:1000	--
Lenteja	1:200	1:15000	--	--	1:1000	--
Chícharo seco	1:200	1:15000	--	--	1:1000	--
F. Ayocote	1:3000	1:30000	1:100	--	1:1000	--

-- No aglutinaron

Dilución 1:10 del extracto = 100 mg/ml.

C U A D R O V-8

DIGESTIBILIDAD " IN VITRO "

Muestras	Crudas (%)	Cocidas (%)
F. Villa Guerrero	85.5	74.3
F. Canario - 107	87.6	75.0
F. Negro - 172	88.6	78.6
F. Japonés blanco	91.8	83.1
F. Jamapa - CH - 73	89.0	74.6
F. Bayo - 107	87.3	71.9
F. Delicias - 71	87.6	61.7
F. Puebla - 182 - 1	84.0	70.7
F. Pinto - 162	86.9	70.6
Haba Tlaxcala - 12	94.3	88.7
Lenteja	86.0	78.5
Chícharo seco	91.9	88.4
F. Ayocote	80.3	63.4

FIGURA V-1

CONTENIDO DE PROTEINAS DE LAS MUESTRAS
CRUDAS Y COCIDAS
(BASE SECA)

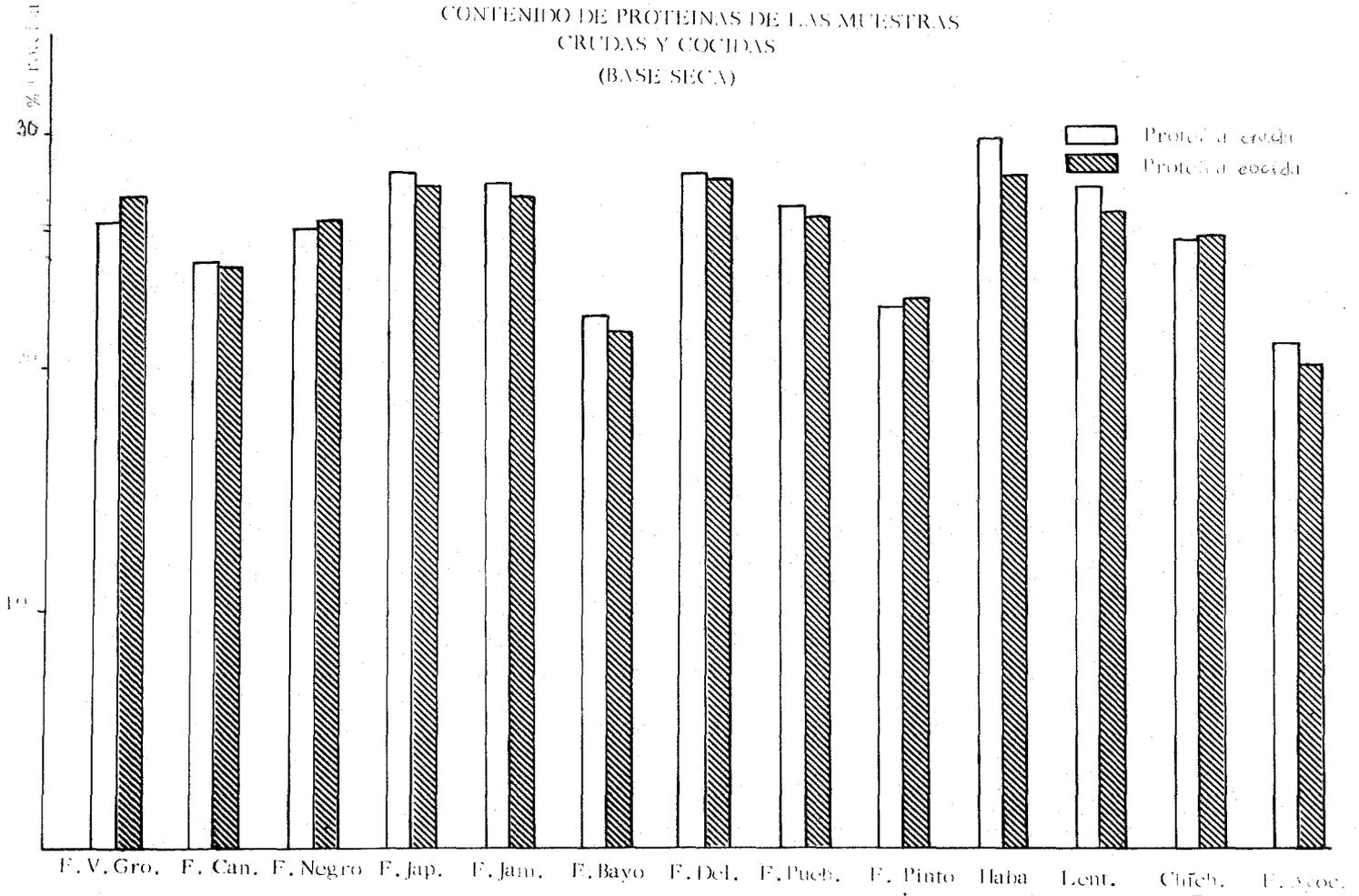


FIGURA V-2
 CONTENIDO DE PROTEINAS DE LAS MUESTRAS COCIDAS
 Y DEL AGUA DE COCCION (%)

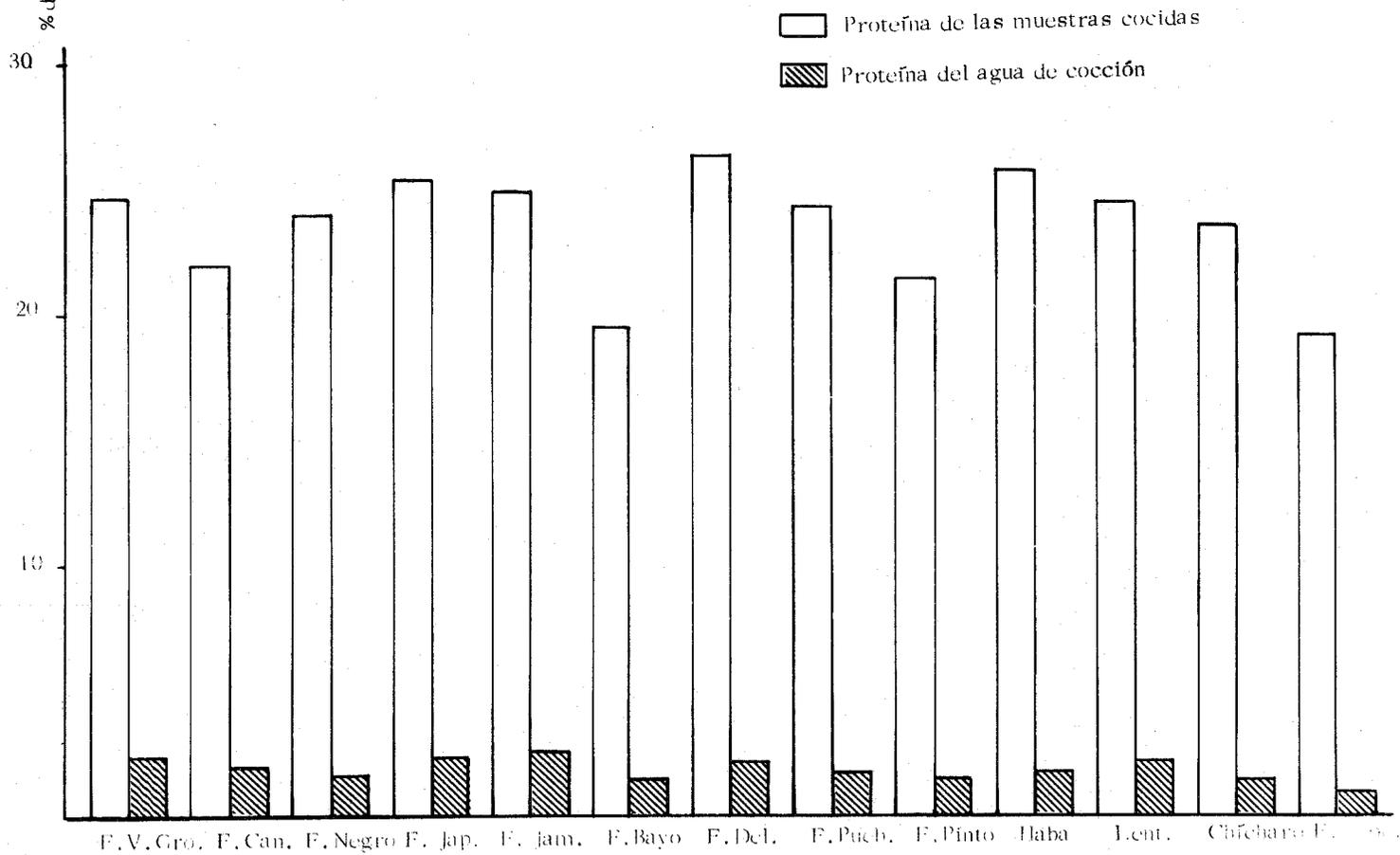


FIGURA V-3

CONTENIDO DE PROTEINAS DE LA EXTRACCION PARA INHIBIDORES DE TRIPSINA
EN LAS MUESTRAS CRUDAS

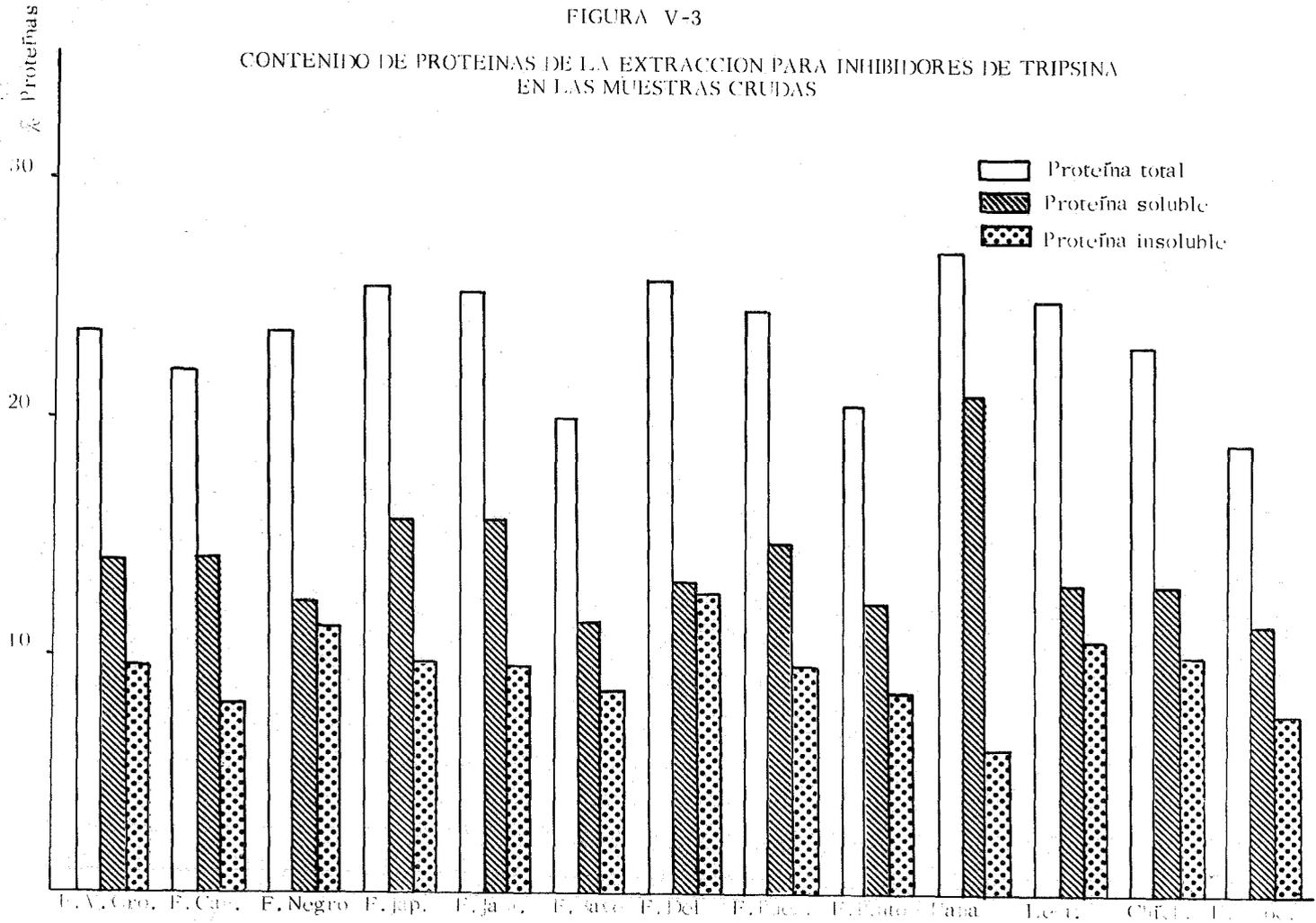
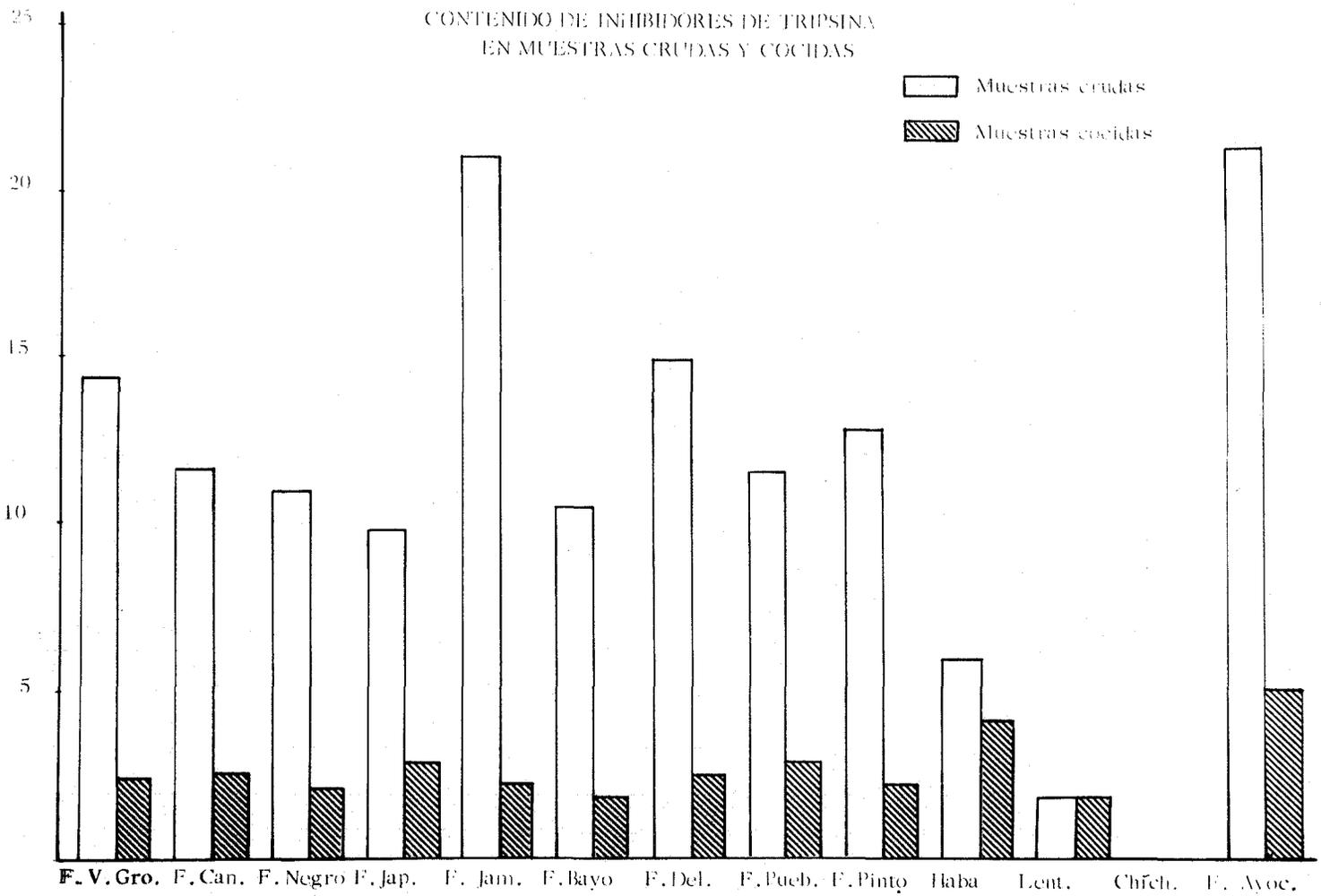


FIGURA V-4

CONTENIDO DE INHIBIDORES DE TRIPSINA
EN MUESTRAS CRUDAS Y COCIDAS

Muestras crudas
Muestras cocidas



UTI mg. muestra

FIGURA V-5

CONTENIDO DE INHIBIDORES DE TRIPSINA
EN MUESTRAS COCIDAS Y AGUA DE COCCION

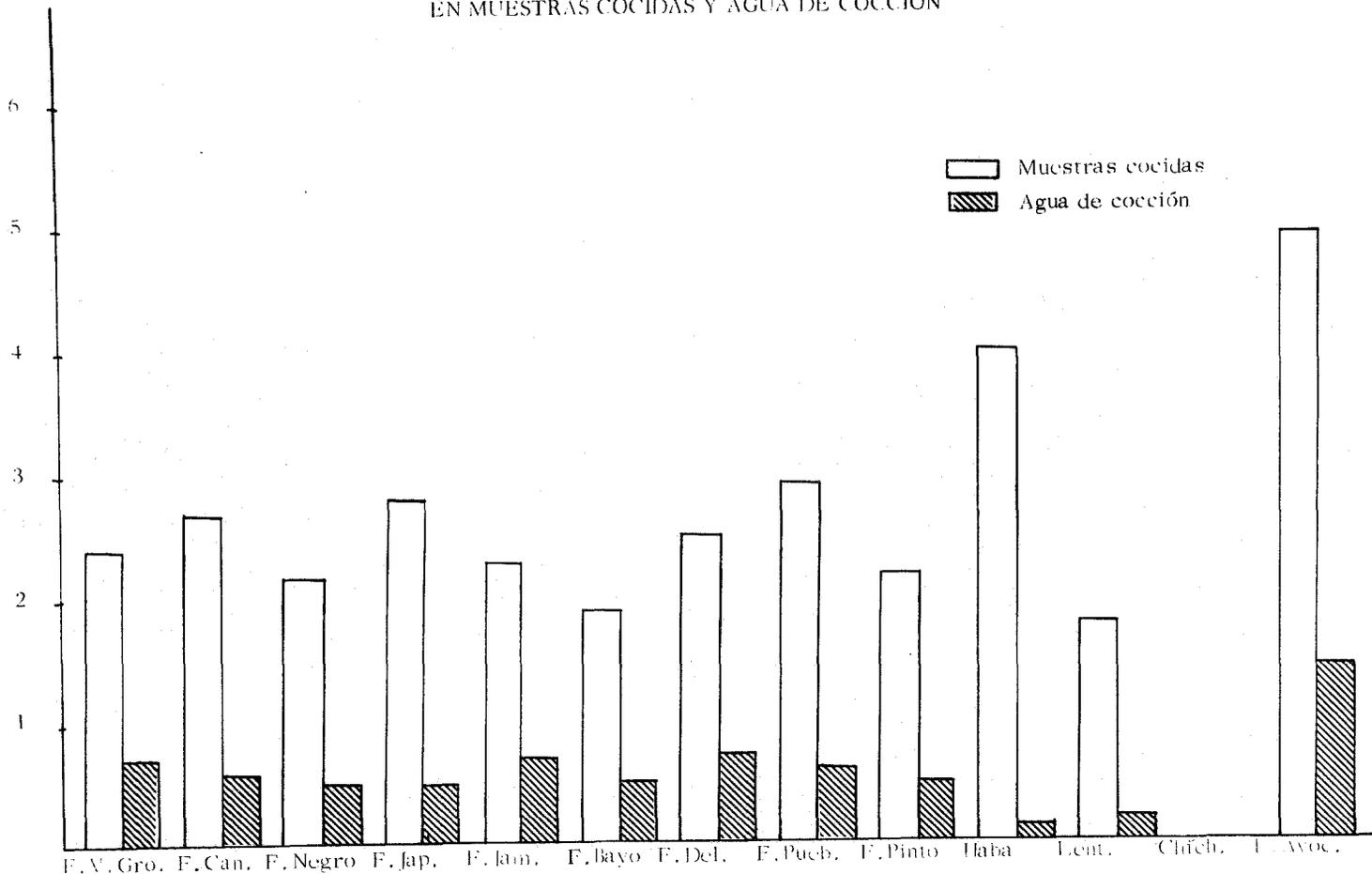
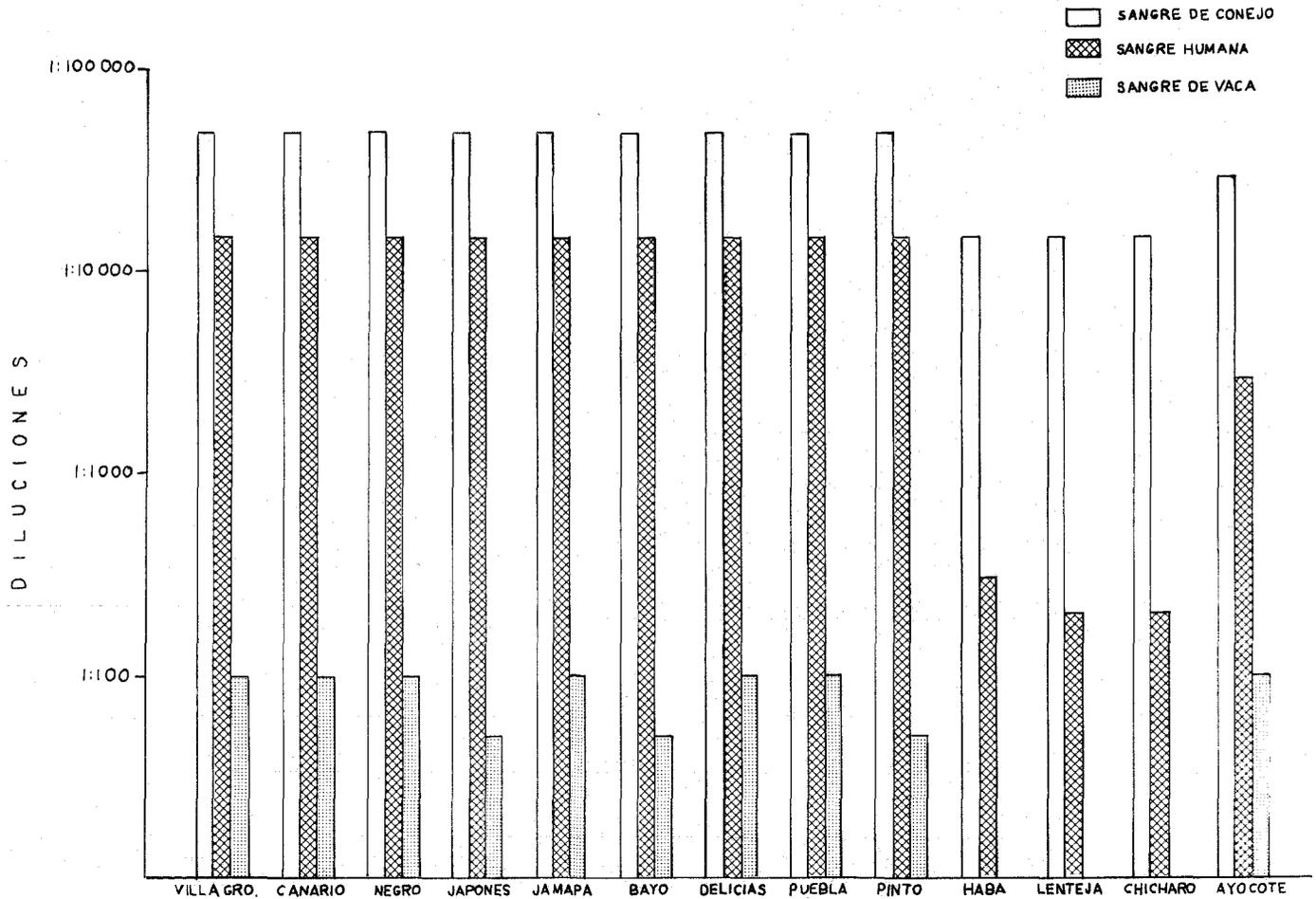
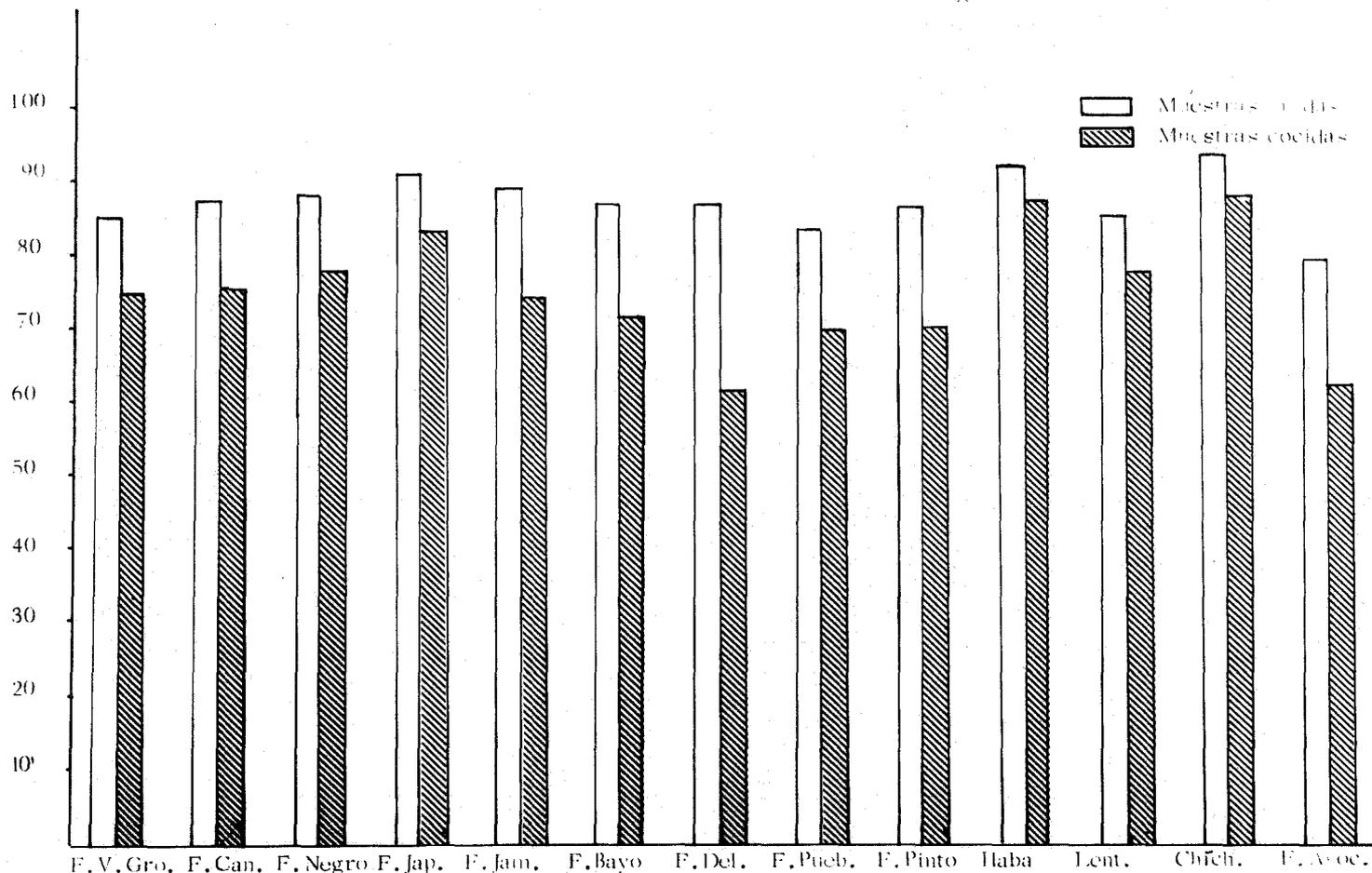


FIGURA V-6
 CONTENIDO DE HEMAGLUTININAS
 EN LAS MUESTRAS CRUDAS



DIGESTIBILIDAD DE MUESTRAS CRUDAS Y COCIDAS (%)



análisis de proteínas del agua de cocción y se observó que en to dos los casos hubo una cierta cantidad de proteína, aunque ésta fue mínima. Esto puede explicarse por el hecho de que la proteí na de las leguminosas está constituida principalmente por globu-
linas solubles en soluciones salinas (5,7) y como en este caso la cocción de las muestras se llevó a cabo en agua sola, la solu-
bilidad de la proteína fue casi nula.

Por otra parte, durante la extracción de las muestras para las determinaciones de inhibidores de tripsina, la solubilidad de la proteína de la leguminosa, fue en todos los casos mayor del 50 % de la proteína original lo que se debe principalmente a que dicha extracción se realiza a pH básico que facilita la solubilidad de la proteína (30).

Hay que tomar en cuenta que, probablemente en su mayoría, los in hibidores de tripsina y las hemaglutininas sean proteínas y la ex tracción de ellas no es 100 % por lo que puede ser que en la pro teína insoluble se tenga un porcentaje elevado de estos tóxicos, razón por la cual sería conveniente que se extrajera un mayor con tenido de proteínas.

Los altos contenidos de inhibidores de tripsina obtenidos princi palmente, entre el género Phaseolus crudo, puede ser una de las



QUINTO.

causas de la toxicidad en los animales de experimentación alimentados con estas leguminosas crudas. Sin embargo, muchos autores han comprobado que los inhibidores de tripsina, son factores termolábiles, que pueden ser parcial o totalmente eliminados por métodos apropiados de cocción (43, 39, 36, 1, 18, 17, 20), no obstante, se ha observado siempre una actividad remanente después de la cocción, que se debe posiblemente a la presencia de factores termoestables (20). El calentamiento se manifiesta en general, por un incremento en el valor nutritivo de las proteínas de las leguminosas.

La cocción de las muestras estudiadas se llevó a cabo durante 2 horas a temperatura de ebullición y presión atmosférica, disminuyendo en gran parte el contenido de inhibidores de tripsina en el género Phaseolus. Es necesario tomar en cuenta que el cocimiento casero de los frijoles se realiza en las mismas condiciones durante 4 a 5 horas, lo que probablemente ayuda a que la inactivación de los inhibidores de tripsina sea mayor, evitando así que el efecto tóxico de estas sustancias se manifieste, aunque éste posiblemente puede ejercer un daño en la calidad de la proteína.

Los líquidos de cocción de todas las muestras presentaron actividad antitriptica, alrededor de 3 a 5 % de los inhibidores de tripsina totales de las muestras crudas. En general, se puede obser-

var que la destrucción de los inhibidores de tripsina por efecto de cocción, se lleva a cabo casi totalmente y sólo existe una pequeña cantidad de ellos que son solubles.

Estudios realizados anteriormente, indican que cuando las legumininosas son calentadas sin agua en autoclave, el porcentaje de destrucción es menor que cuando son calentadas llevando agua en una relación 1:4, debido a que el agua actúa como transmisor del calor. Se observó también que el remojo previo a la cocción no influye sobre los valores obtenidos (18).

En animales de experimentación alimentados con leguminosas crudas, se presenta un alto grado de mortalidad, pero se ha comprobado que el efecto no se debe sólo a los inhibidores de tripsina, sino también a las hemaglutininas (36).

Como se pudo observar en los resultados, todas las leguminosas crudas presentaron aglutinación, pero sólo el género Phaseolus, aglutinó la sangre de vaca. De acuerdo a lo descrito por Jaffé (25), las leguminosas que aglutinan la sangre de vaca son tóxicas, por lo que se puede decir que las muestras del género Phaseolus estudiadas son tóxicas en estado crudo. Los otros tres géneros analizados no presentaron aglutinación en sangre de vaca, quedando incluídas dentro de las no tóxicas.

Se ha comprobado, que las hemaglutininas son sustancias termolá-

biles (36), que juegan un papel relativamente menor sobre el pobre valor nutritivo de las leguminosas (53).

La cocción efectuada en las muestras estudiadas destruyó completamente la actividad hemaglutinante de todas las muestras sobre sangre de vaca y sangre humana, pero no así sobre sangre de co-nejo. Sin embargo, como se describe para inhibidores de tripsina el tiempo normal de cocimiento para consumo es mayor que el estudiado, por lo que se puede esperar que la aglutinación presentada en las muestras cocidas sobre sangre de conejo, desaparezca completamente.

Los resultados nos indican que todas las leguminosas estudiadas en forma cocida, son no tóxicas aunque presenten aglutinación en sangre de conejo.

Por otro lado, los resultados de la digestibilidad "in vitro" de las muestras cocidas, en todos los casos presentaron valores menores a los obtenidos para muestras crudas. Estos resultados no pueden ser extrapolados en la digestibilidad "in vivo", en virtud de que las muestras crudas, principalmente los frijoles, provocan mortalidad en los animales de experimentación. Así mismo, los datos de digestibilidad obtenidos no tienen relación alguna con el contenido de inhibidores de tripsina o hemaglutininas.

En el caso de las muestras cocidas, en que existe destrucción de

los principales tóxicos nutricionales, es posible que sí exista entre la digestibilidad "in vivo" e "in vitro".

2.- CONCLUSIONES

En resumen por los resultados obtenidos en este trabajo se ha podido notar que todas las leguminosas en forma cruda son tóxicas, unas en mayor grado con respecto a otras, de ellas los frijoles del género Phaseolus presentaron los valores más elevados de inhibidores de tripsina y hemaglutininas, mientras que el chícharo seco resultó ser la menos tóxica.

El tratamiento de cocción efectuado, fue suficiente para destruir en un 90 % la presencia de los inhibidores nutricionales, destrucción que puede ser mayor cuando se prolonga la cocción, aunque este tratamiento puede afectar la calidad de la proteína por la ya conocida reacción de Maillard y que puede ser medida por la presencia de lisina disponible o quizás exista una relación entre la calidad de la proteína y la digestibilidad "in vitro" que se vió disminuída por el calentamiento.

Es necesario establecer por estudios biológicos la calidad de estas leguminosas y comprobar que los tóxicos remanentes no impi-

dan su máximo aprovechamiento con el objeto de poder hacer un uso más adecuado de estas fuentes vegetales que son ricas en proteínas y lo que es más ventajoso, que son de uso común y prácticamente tradicional en nuestro país.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Arjumand, S.W. y M. Stein. "Trypsin Inhibitor of Broad Bean (Vicia faba L.)". Qual. Plant. Pl. Fds. Hum. Nutr. XXIII 1/3 : 157 - 159, 1973.
- 2.- Aykroyd, W.R. y J. Doughty. "Las Leguminosas en la Nutrición Humana". Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, 1964.
- 3.- Baldi, G. y F. Salamini. "Variability of essential aminoacids content in seeds of 22 Phaseolus species". Theoretical and Applied Genetics 43 : 75 - 78, 1973.
- 4.- Bayoun, S.L. y E.L. Johnson. "Anticoagulant properties of unheated soybean meal in chick diets". Arch. Biochem. 42 : 355 1953.
- 5.- Bieth, J.; P. Metais y J. Warter. "Etude des proteases pancrea- tiques. I. Dosage la trypsine par la benzoilarginine p-nitro- anilide et sus aplicaciones". Ann. Biol. Clin. 24 : 787, 1966.
- 6.- Borchers, R. y C.N. Ackerson. "The Nutritive Value of Legume Seeds. II. Effect of Autoclaving and the Trypsin Inhibitor test for 17 species". J. Nutr. 41 : 339, 1950.
- 7.- Boulter, D.; I.E. Evans y E. Desbyshire. "Proteins of some legumes with reference to environmental factors and nutritio- nal value". Qual. Plant. Pl. Fds. Hum. Nutr. XXIII 1/3 : 239 - 250, 1973.
- 8.- Bowman, D.E. "Isolation and properties of a proteinase inhi- bitor of Navy beans". Arch. Biochem. Biophys. 144: 541 - 548 1971.
- 9.- Bressani, R. "Legumes in Human Diets and how they might be Improved". In: Nutritional Improvement of Food Legumes by Breeding. Max Milner (Ed.). Protein Advisory Group of United Nations Systems. New York, 1972.

- 10.- Bressani, R.; L.G. Elías y A.T. Valiente. "Effect of cooking and supplementation on the nutritive value of black beans (Phaseolus vulgaris L.)". Brit. J. Nutr. 17 : 69, 1963.
- 11.- Calloway, D.H. "Nutritional importance of legumes for human." (Summary). In: Nutritional Improvement of Food Legumes by Breeding. Max Milner (Ed.). Protein Advisory Group of the United Nations Systems. New York, 1972.
- 12.- Contreras, S. y M.A. Tagle. "Factores tóxicos de leguminosas cultivadas en Chile. IV. Hemagglutininas". Arch. Latinoam. Nutr. 24, 2 : 191 - 199, 1974.
- 13.- Contreras, S.; H. Araya; N. Pak y M.A. Tagle. "Factores tóxicos de leguminosas cultivadas en Chile. I. Glucósidos cianogénicos". Arch. Latinoam. Nutr. 23, 2 : 251 - 259, 1973.
- 14.- Dahlgren, K y J. Porath. "On the purification of phytohemagglutinins from Phaseolus vulgaris seeds". Arch. Biochem. Biophys. 137 : 306 - 314, 1970.
- 15.- Evans, R.J.; A. Puztai; W.B. Watt y P. Bover. "Isolation and properties of protein fractions from Navy bean (Phaseolus vulgaris) which inhibit growth of rats". Biochem. Biophys. Acta 303 : 175, 1973.
- 16.- Fornstedt, N. y J. Porath. "Characterization studies on a new lectin found in seeds". FEBS LETTERS 57, 2 : 187, 1975.
- 17.- Gagliardi, A.R.T. y H.Krieger. "Estude de sementes de leguminosas con actividad de fitohemagglutinina". An. Acad. Brasil Cienc. 45 : 3/4, 1973.
- 18.- Gallardo, F.; H. Araya; N. Pak y M.A. Tagle. "Factores tóxicos de leguminosas cultivadas en Chile. II. Inhibidores de Tripsina". Arch. Latinoam. Nutr. 24, 2 : 183 - 189, 1974.
- 19.- Grande, F.; J.T. Anderson y A. Keys. "Effect of carbohydrates of leguminous seeds wheat and potatoes on serum cholesterol concentration in man". J. Nutr. 86 : 313, 1965.

- 20.- Hernández, M. "Efecto de las condiciones de cocción sobre la actividad tóxica residual, disponibilidad de aminoácidos y valor proteínico de algunas leguminosas". Tesis de postgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos. INCAP. Guatemala, 1975.
- 21.- Jaffé, W.G. "Las semillas de leguminosas como fuentes de proteínas en América Latina". En: Conferencia sobre recursos proteínicos en América Latina. INCAP. Guatemala, 1970.
- 22.- Jaffé, W.G. "Protein digestibility and trypsin inhibitor activity of legume seeds". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 75 : 219, 1950.
- 23.- Jaffé, W.G. "Estudios sobre la inhibición del crecimiento de ratas causadas por algunas semillas de leguminosas". Arch. Venezolanas Nutr. 1 : 373, 1950.
- 24.- Jaffé, W.G. "Factors affecting the nutritional value of beans". In: Nutritional Improvement of Food Legumes by Breeding. Max Milner (Ed.). Protein Advisory Group of United Nations Systems. New York, 1972.
- 25.- Jaffé, W.G. y O. Brucher. "Toxicidad y especificidad de diferentes fitohemaglutininas de frijoles (Phaseolus vulgaris)". Arch. Latinoam. Nutr. 22. 2 : 267 - 281, 1972.
- 26.- Jaffé, W.G. y C.L. Vega Lette. "Heat labile growth inhibiting factors in beans (Phaseolus vulgaris)". J. Nutr. 94 : 203 - 210, 1968.
- 27.- Jaffé, W.G.; A. Levy y D.I. González. "Isolation and partial characterization of bean phytohemagglutinins". Phytochemistry 13 : 2685, 1974.
- 28.- Jaffé, W.G. y M.E. Flores. "La cocción de frijoles (Phaseolus vulgaris)". Arch. Latinoam. Nutr. 25, 1 : 79 - 90, 1975.
- 29.- Kakade, M.L.; D.E. Foffa y J.E. Liener. "Contribution of trypsin inhibitors to the deleterious effect of unheated soybean fed to rats". J. Nutr. 103 : 1772 - 1778, 1973.
- 30.- Kakade, M.L.; N. Simons y I.E. Liener. "An evaluation of natural vs synthetic substrates for measuring the antitryptic of soybean samples". Cereal Chem. 46 : 518 - 526, 1969.

- 31.- Kawaguchi, T.; I. Matsumoto y T. Asowwa. "Studies on hemagglutinine from Mackia amurensis seeds". J. Biol. Chem. 249, 9 : 2786 - 2792, 1974.
- 32.- Krahn, J. y F.C. Stevens. "Lima bean trypsin inhibitor limited protelysis by trypsin and chimotrypsin". Biochemistry 9, 13 : 2646 - 2652, 1970.
- 33.- Kunitz, M. "Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean". Science 101 : 668 - 669, 1945.
- 34.- Layrisse, M.C.; C. Martínez y M. Roche. "Effect of interaction of various foods on iron absorption". Am. J. Clin. Nutr. 21 : 1175, 1968.
- 35.- Liener, I.E. "Antirtiptic and other antinutritional factors in legumes". In: Nutritional Improvement of Food Legumes by Breeding. Max Milner (Ed.). Protein Advisory Group of United Nations Systems. New York, 1972.
- 36.- Liener, I.E. "Toxic factors in edible legumes and their elimination". Amer. J. Clin. Nutr. 11 : 281 - 298, 1962.
- 37.- Liener, I.E. "Factors affecting the nutritional value of beans". (Discussion). In: Nutritional Improvement of Food Legumes by Breeding. Max Milner (Ed.). Protein Advisory Group of United Nations Systems. New York, 1972.
- 38.- Molina, M.R.; G. de la Fuente y R. Bressani. "Interrelación entre tiempo de remojo, tiempo de cocci6n, valor nutritivo y otras características del frijol (Phaseolus vulgaris)". Arch. Latinoam. Nutr. 24, 4 : 469 - 483, 1974.
- 39.- Morais, E.; T. Santos; Dutra de Oliveira J.E. "Valor nutritivo de fracciones proteicas aisladas de frijoles". Arch. Latinoam. Nutr. 22, 4 : 547 - 560, 1972.
- 40.- Official Methods of Analysis. Eleventh Edition, Washington U.S.A., 1970.
- 41.- Oke, O.L. y I.B. Umoh. "Nutritive value of leaf protein. A note on the comparison of "in vitro" and "in vivo" methods". Nutrition Reports International 10, 6 : 397, 1974.

- 42.- Pak, N. y I. Borja. "Valor nutritivo de 4 variedades de frijol (Phaseolus vulgaris) cultivadas en Chile. Análisis comparativo con leguminosas de importancia en la alimentación chilena. Arch. Latinoam. Nutr. 23, 4:495 - 506, 1973.
- 43.- Patwardham, J.N. "Pulses and beans in human nutrition". Am. J. Clin. Nutr. 11: 12 , 1962.
- 44.- Poretz, R.D. "Purification and properties of the hemagglutinin from Sophora japonica seeds". Biochemistry 13: 250-256, 1974.
- 45.- Pope, H.O. y J.R. Patten. "The effect of raw soy bean on "in vitro" active and pasive acumulation by rat small intestine". Brit. J. Nutr. 33: 117 , 1975.
- 46.- Potter, G.C. y F. A. Kummerow. "Chemical similarity and biological activity of the saponine isolated from alfalfa and soybean". Sci. 120: 224, 1954.
- 47.- Rockland L.B.; B.L. Gardiner y D. Pieczarka. "Stimulation of gas production and growth of Clostridium perfringens type A (N. 3624) by legumes". J. Food Sci. 34: 411, 1969.
- 48.- Roy, D.N. y R.V. Bhat. "Trypsin inhibitor content in some varieties of soy bean (Glicine max L.) and sunflower seeds (Heleantus annuces L.)". J. Sci Food Agr. 25, 7: 765-769, 1974.
- 49.- Sakai, S. "Distribution of the proteinaceous inhibitor of ethylene synthesis in leguminous seeds". Plant. Cell. Physiol. 16: 529 - 532, 1975.
- 50.- Sakura, J.D. y S.N. Timasheff. "Association properties of trypsin inhibitors from Lima bean". Arch. Biochem. Biophys 159: 123 - 133, 1973.
- 51.- Steggerda, F.R.; E.A. Richards y J.J. Rackis. "Effects of various soybean products on flatulence in adult man". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121: 1235, 1966.
- 52.- Sultan Warsy A. y M. Stein. "Trypsin inhibitors of broad bean (Vicia faba)". Qualitas Plantarum 23 (1-3): 157, 1973. ✓

- 53.- "The effect of the selective removal of hemagglutinins on the nutritive value of soybeans". *Agr. and Food Chem.* 23, 3: 484, 1975.
- 54.- Toyoshima S. "Some properties of purified puytohemagglutinins from Lens culinaris seeds". *Biochem Biophys. Acta* 221: 514 - 521, 1970.
- 55.- Tursinaí A.; Y. Birk; A. Gertler y M. Rigbi. "A basic trypsin and chimotrypsin inhibitor from groundnuts (Arachis hypogaea)". *Biochem. et Biophys Acta* 263: 666 - 672, 1972.
- 56.- Wagner, L.P. y J.P. Riehm. "Purification and partial characterization of a trypsin inhibitor isolated from the Navy bean". *Arch. Biochem. Biophys.* 121: 672, 1976.
- 57.- Wang, D.A. "Crystalline protein proteinase inhibitor from pinto bean seeds". *Biochem et Biphys acta.* 392, 2: 583-596, 1975.
- 58.- Wilson, K.A. "The partial aminoacid sequence of trypsin inhibitor II from Garden bean, Phaseolus vulgaris, with location of the trypsin and elastase - reactive sites". *J. Biol. Chem.* 250, 11: 4261, 1975.