



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

***EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA GERMINACIÓN EN EL CONTENIDO DE
PROTEÍNA, SU DISPONIBILIDAD Y FACTORES TOXICOS NATURALES EN DOS
LEGUMINOSAS CONSUMIDAS EN VILLAHERMOSA, TABASCO: *Phaseolus
vulgaris* Y *Vigna unguiculata****

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

VALERIA JOCABETH HIGUELDO LÓPEZ



MÉXICO, D.F.

2014



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: M. en C. Bernardo Lucas Florentino
VOCAL: M. en C. Lucia Cornejo Barrera
SECRETARIO: Q.F.B. Juan Diego Ortiz Palma Pérez
1er. SUPLENTE: Dra. Iliana Elvira González Hernández
2do. SUPLENTE: M. en C. Tania Gómez Sierra

SITIOS DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: ANEXO LABORATORIO 4C, EDIFICIO A, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM Y LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE ALIMENTOS, CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE LA DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS, UJAT.

ASESOR DEL TEMA: M. EN C. BERNARDO LUCAS FLORENTINO



SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. LILÍ RODRÍGUEZ BLANCO



SUSTENTANTE:

Valeria Jocabeth Higueldo López



Este trabajo forma parte de los proyectos UJAT-Exb-130 y UJAT-2009-C05-44, financiados por PROMEP y PFICA-UJAT

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Química, por ser cuna de mi sueño hecho realidad.
- A mi madre, por ser siempre mi mejor amiga y consejera; por los desvelos, paciencia, esfuerzos y por creer en mí hasta el último momento. ¡Gracias por ser mi mejor ejemplo de vida! ¡iiiTe amo mami!!!
- Al maestro Bernardo Lucas, por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, por el apoyo constante, por compartir su conocimiento y su gran amistad.
- A la Dra. Lilí Rodríguez, por hacernos partícipe de su proyecto de investigación. Dra., usted y Don Luis me hicieron sentir como en casa. ¡Gracias a ambos por su apoyo incondicional, por sus consejos y la amistad que me brindaron en su momento!
- Al los profesores que conforman el jurado asignado, por aceptar ser partícipes de la revisión del presente trabajo.
- A Antonio Béaz, por haberme brindado tiempo extra para poder realizar el trabajo experimental, por sus enseñanzas y las experiencias compartidas.
- A Ana Lilia Zárate, por apoyo técnico brindado, por las mañanas de café y hacer más amena mi estancia en el laboratorio.
- A David, por estar conmigo en este último proceso y apoyarme en todos los sentidos. Fuiste el motor y me diste las fuerzas para llegar a la cima. ¡iGracias por tu compañía, por darle color a mi vida, por tu amor y hacer de esto un compromiso compartido!!
- A todos los amigos y compañeros que vivieron conmigo, de cerca o lejos, esta experiencia: Nancy, Ale, Ana Gabriela, Mónica, Mara, Irais, Mirna, Andrea, Gustavo, Ricardo, Isaac, Ivan en especial a:

- Gabriela Contreras: Por todos estos años de amistad e inolvidables momentos. ¡Que nos dure para siempre!
- Edgar Espada: porque aun lejos siempre estás en mente y corazón. Por siempre creer en mí... ¡Gracias!
- Hugo Emilio: ¡Gracias por siempre ser el amigo incondicional en las buenas y en las malas, y por tu gran corazón!
- Abraham Sánchez: Mi action man que brinda los mejores consejos y acompaña en las luchas más guerreras. ¡Gracias por compartir tu perseverancia y abrirme tu corazón!

DEDICATORIA

- A mis padres, por haberme brindado amor, valores, educación, respeto, apoyo y comprensión. Ustedes son los cimientos de mi vida y todo lo que soy.
- A mis hermanas Brenda y Nancy, por ser ejemplo de mujer y fortaleza, y por darme el mejor regalo en la vida: mis sobrinos.
- A mis hermanos Oscar y Andrés, por siempre creer en mí y apoyarme. Por ser ejemplo de valor, fortaleza y alegría.
- A mis sobrinos Minely, Lisset, Dayana y Josafat. Espero sea ejemplo de que pueden lograr lo que sea que se propongan ¡¡¡Los quiero!!!
- A David, porque la siguiente meta es la tuya. ¡Y vamos por más!

ÍNDICE

SECCIÓN	PÁGINA
1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	3
2.1 General.....	3
2.2 Particulares.....	3
3. Antecedentes.....	4
3.1 Generalidades de las leguminosas.....	4
3.2 <i>Phaseolus vulgaris</i>	5
3.3 <i>Vigna unguiculata</i>	8
3.4 Factores tóxicos.....	11
3.5 Semillas y germinación.....	15
4. Material y métodos.....	19
4.1 Obtención y almacenamiento de las leguminosas.....	19
4.2 Germinación y obtención de la harina de las semillas germinadas.....	20
4.3 Obtención de las harinas de semillas sin germinar.....	20
4.4 Determinación de proteína cruda.....	21
4.5 Digestibilidad <i>in vitro</i>	24
4.6 Determinación de ácido fítico.....	28

4.7 Determinación de inhibidores de tripsina.....	31
4.8 Determinación cuantitativa de lectinas (hemaglutininas).....	36
4.9 Diseño experimental y análisis estadístico.....	42
5. Resultados y discusión.....	43
5.1 Proteína y digestibilidad.....	43
5.2 Factores tóxicos.....	47
5.3 Interrelación de la disponibilidad de la proteína con la presencia de factores tóxicos.....	53
6. Conclusiones.....	56
7. Literatura citada.....	57

1. INTRODUCCIÓN

Las leguminosas son una familia de plantas más utilizadas por el hombre en su alimentación. En el mundo existen más de 18 000 especies de leguminosas, pero solo veinte de éstas son de importancia económica y alimenticia. Estas semillas fueron domesticadas desde hace 7 000 años (año 5000 a.C.), por ser una excelente fuente de nutrimentos, ya que en ausencia de proteína de origen animal, la combinación de estas con cereales es una buena alternativa alimenticia.

En África y Latinoamérica, ***Phaseolus vulgaris*** es la leguminosa más consumida, generalmente como granos enteros cocidos, y se le conoce con diversos nombres según la región. Las leguminosas son fuente de proteína, de algunas vitaminas como tiamina, riboflavina, niacina y ácido fólico, además de que proporcionan hierro, fósforo, calcio, magnesio y potasio.

No obstante las anteriores características, las leguminosas contienen algunos factores tóxicos, siendo los de mayor importancia los siguientes:

- Inhibidores de Tripsina: los cuales causan un retraso en el crecimiento o un índice bajo de la eficiencia proteínica.
- Lectinas: las cuales interfieren con la absorción de nutrientes y a mediano plazo se comportan como enterotoxinas.
- Ácido Fítico: cuya acción se basa en la formación de complejos insolubles con proteínas y minerales, convirtiéndolos en no asimilables por el organismo.

En diversos estudios se ha descrito a la germinación como un proceso biológico, sencillo y económico que permite eliminar o inactivar de manera natural algunos factores tóxicos y aumenta la digestibilidad de proteínas y almidones en leguminosas, puede incrementar la asimilación de las vitaminas del complejo B y mejorar la digestibilidad de los hidratos de carbono; en

consecuencia se obtienen granos germinados con mayor valor nutricional y diferentes características sensoriales y funcionales.

En zonas rurales, como es el caso de Comalcalco Tabasco, el cultivo de leguminosas criollas como frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) y frijol pelón (*Vigna unguiculata*), constituyen la fuente principal de proteína de origen vegetal. Entre los agricultores de bajos recursos, la producción de especies criollas es la más importante debido a características como el sabor, calidad de cocción, estabilidad de rendimiento *per se* y adaptabilidad local. Además, según información proporcionada por los productores, el frijol pelón es la leguminosa de grano más consumida en esta región después del frijol negro.

Actualmente, las leguminosas se enfrentan a modificaciones importantes ante una sociedad cambiante, incluidos los hábitos alimenticios, a consecuencia del urbanismo, la migración y el empleo, así como el paso de una economía cerrada a una economía global, lo cual está ejerciendo presiones en diversas etapas de la cadena de producción, comercialización, transformación y consumo.

Para México, el frijol es un producto estratégico en el desarrollo rural, debido a que conjuntamente con el maíz, representa toda una tradición productiva y de consumo, cumpliendo diversas funciones de carácter alimentario y socioeconómico que le han permitido trascender hasta la actualidad.

La importancia de este trabajo de tesis, radica en demostrar el beneficio nutricional que se espera obtener con la germinación de estas leguminosas, en particular de las variedades pelón corazón negro y pelón ombligo café (*Vigna unguiculata*), que a pesar de ser cepas criollas, se puede esperar mucho de ellas con fines alimenticios y hacer este proceso recomendable para aplicarlo en la industria alimentaria con la finalidad de ofrecer a los consumidores un nuevo producto de alto valor nutritivo y con propiedades funcionales.

2. OBJETIVOS:

2.1 General

Evaluar el efecto de la germinación en el contenido de los factores tóxicos naturales en granos de frijol negro (*Phaseolus vulgaris*), frijol pelón corazón negro y frijol pelón ombligo café (*Vigna unguiculata*) y la biodisponibilidad de la proteína dietética.

2.2 Particulares

- 2.2.1 Cuantificar el contenido de proteína y la biodisponibilidad de este nutriente, en las semillas sin germinar y germinadas.
- 2.2.2 Cuantificar el contenido de ácido fítico, inhibidores de tripsina y lectinas en granos de frijol sin germinar y germinado.
- 2.2.3 Con los resultados obtenidos, concluir si la germinación es un proceso que ayude a mejorar la calidad de las semillas de leguminosas estudiadas.

3. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades de las leguminosas

Las leguminosas (o fabáceas) comprenden 650 géneros y alrededor de 18 000 especies y son la familia más grande de plantas de flores después de las compuestas (***Asteraceae***) y las orquídeas (***Orchidaceae***). Aunque se extienden en todos los hábitats terrestres, desde el ecuador hasta los bordes de los desiertos secos y fríos, tienen gran parte de su diversidad centrada en áreas de topografía variada con climas estacionales (Financiera Rural, 2011; Polhill y Raven, 1978).

Esta familia es una de las más importantes desde el punto de vista económico, ya que nos ofrece una amplia gama de fuentes de alimentos, principalmente de las semillas maduras, además de madera y forraje (Harbone *et al.*, 1971). Todas las leguminosas son muy parecidas en cuanto a sus características nutrimentales, ya que son muy ricas en proteínas, hidratos de carbono y fibra, mientras que el contenido de lípidos es relativamente bajo. Aportan el 20 % de la proteína consumida en todo el mundo y contienen dos veces más proteína que los cereales en una porción. La concentración de almidón varía, de 25 a 30 % en soya y cacahuete, hasta 60 % en el frijol, en el cual este componente es resistente a la digestión por enzimas humanas; esta característica es muy interesante, ya que nos da un índice glucémico bajo, el cual es benéfico para las personas que padecen diabetes (FENALCE, 2010; Casanueva *et al.*, 2001).

Hoy se sabe que las leguminosas fueron de los primeros alimentos en ser cultivados domésticamente por el hombre, gracias a restos de cultivos que datan de hace unos 10 mil años encontrados en Tailandia. También

los antiguos pobladores de México ya cosechaban diversos tipos de frijoles desde hace unos siete mil años.

La versatilidad de las leguminosas y el hecho de que puedan secarse y guardarse fácilmente por largos periodos sin que pierdan sus propiedades, permitió a las primeras sociedades resistir los meses de invierno e hizo posible la exploración, aumentando considerablemente la autonomía del hombre (FAO, 2009).

3.2 PHASEOLUS VULGARIS

Su nombre científico fue asignado por Lineo en 1753. Pertenece a la tribu **Phaseolae** de la subfamilia Papilionoidae dentro del orden Rosales y la familia Leguminosae. El género **Phaseolus** incluye aproximadamente 35 especies, de las cuales cinco son cultivadas: **P. vulgaris L, P. lunatus, P. coccineus L, P. polyanthus y P. acutifolius** (Reyes *et al.*, 2008; FAO, 2007; Harborne *et al.*, 1971).

El frijol es una semilla comestible originaria de América, la cual se ha cultivado desde hace ocho mil años y nuestro país es considerado como uno de los centros de origen de diversos tipos de frijol, siendo el principal **Phaseolus vulgaris**. A nivel mundial existen 180 especies de este género, de los cuales aproximadamente 180 provienen de América (González, 2001; FAO, 2009).

En México existen cerca de 70 variedades de esta especie, los cuales están distribuidos en siete grupos: negros, amarillos, blancos, morados, bayos, pintos y moteados; pero por la preferencia del consumidor se clasifica en Azufrado, Mayocoba, Negro Jamapa, Peruano, Flor de Mayo y Junio, Garbancillo, Manzano, Negro San Luis, Negro Querétaro y Pinto. Por producción se divide en cuatro variedades principalmente, negros 30 %, pinto 15 %, claros 13 %, azufrado 9 % y el 33 % restante en otras

variedades. Durante el 2011 las principales entidades productoras fueron Zacatecas, Nayarit y Chiapas (SAGARPA, 2012).

La siembra y cosecha de frijol es una de las principales actividades de la economía campesina en varias regiones del país, es de mucha importancia como generador de ingresos y empleo rural y como producto básico en la dieta alimenticia de la población por su alto contenido de proteínas, que varía del 20 al 30 % de acuerdo con la variedad y la región donde se produce, elementos minerales y aminoácidos esenciales (metionina (0.17 a 0.53 %), lisina (1.69 a 2.44 %), triptófano (0.14 a 0.22 %), (FAO, 2007). En la **Tabla 1** se muestra la composición química del grano de frijol (FAO, 1993).

Tabla 1. Composición química del frijol

COMPONENTE	CANTIDAD *(g/100g de frijol)
Agua	11.2 %
Proteína	22.3*
Lípidos	1.5 *
Hidratos de carbono	
Totales	61.2*
Fibra	4.4*
Cenizas	3.8*

Reyes *et al.* (2008) menciona que el mayor consumo de fríjol en el mundo se manifiesta en regiones con estándares de vida bajos, principalmente en naciones en vías de desarrollo.

En la zona norte de México se consume las variedades azufradas, que se cultivan principalmente en el estado de Sinaloa; la mayor parte del frijol

negro se cultiva en los estados de Nayarit y Zacatecas, y la mayor demanda de estas semillas está concentrada en las zonas centro y sur del país.

Nutricionalmente hablando del frijol, presenta alto contenido de proteína (20 a 30 %), y ésta se caracteriza por su alto contenido en lisina (6.4 a 7.6 g/100 g de proteína) y de fenilalanina mas tirosina (5.3 a 8.2 g/100 g de proteína), cantidades que satisfacen todos los requerimientos mínimos recomendados por la FAO. Sin embargo, el frijol es deficiente en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína), por lo que complementa el valor nutricional de las proteínas de los cereales (Chaidez *et al.*, 2010; Mederos, 2006; Fraile, 2007). De igual manera, aportan vitaminas hidrosolubles, especialmente tiamina, riboflavina, niacina y folacina. A continuación en la **Figura 1** se presenta la flor de ésta especie de leguminosa, que es distintiva y permite en parte su clasificación botánica y en la **Figura 2** se presenta la figura del corte longitudinal de la semilla del frijol (*Phaseolus vulgaris L.*).

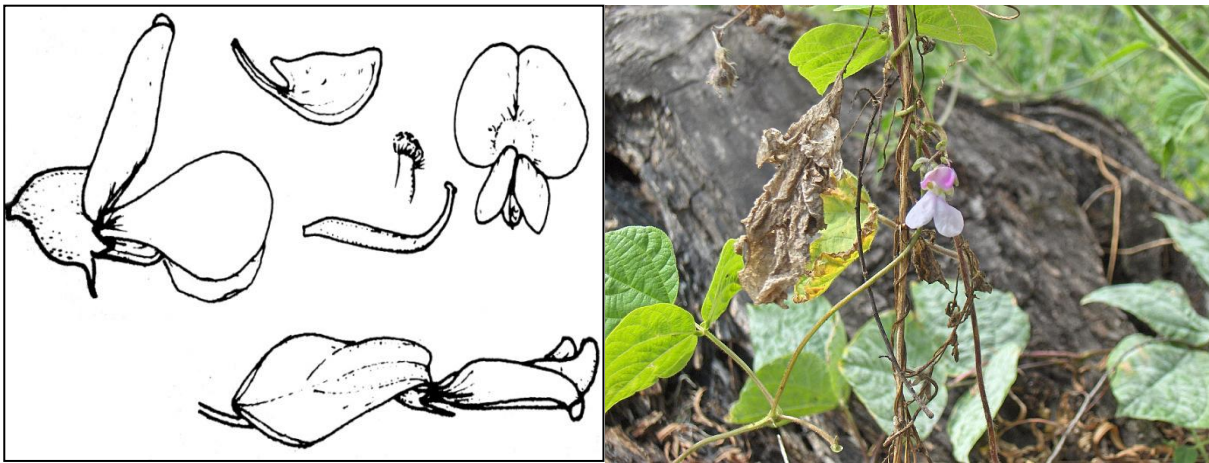


Figura1. Flor de *Phaseolus vulgaris*

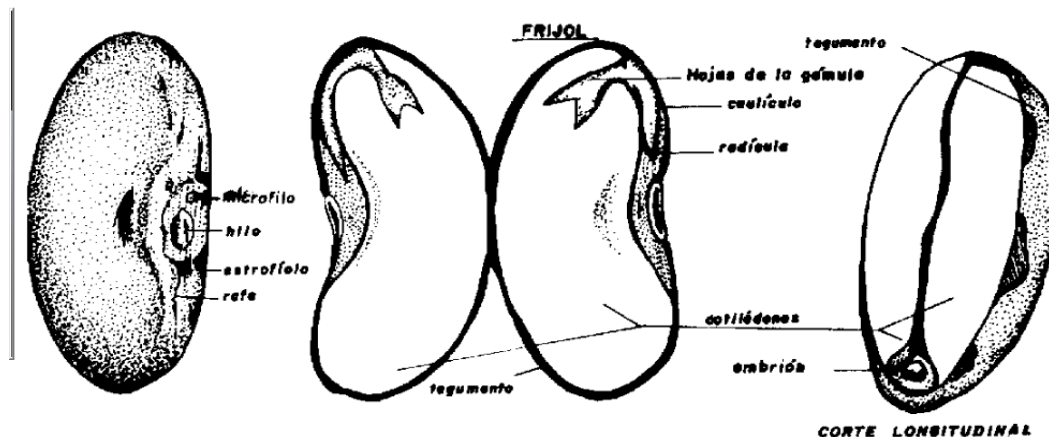


Figura 2. Grano de *Phaseolus vulgaris*

3.3 VIGNA UNGUICULATA

También perteneciente a la familia *Papilionaceae* y a la subtribu *Phaseoleae*, es una de las especies de frijol consumidas en las zonas rurales de México y otras partes del mundo como Cuba, Venezuela, India y África (Karuppanapandian, 2006). Este frijol es originario de África Centro-Occidental y cultivado en regiones semi-áridas, en rotación o asociación con cereales, posee adaptabilidad a zonas tropicales bajas con elevadas temperaturas (>25°C) y pocas precipitaciones (Medina *et al.*, 1996).

En México, el frijol caupí o pelón (*Vigna unguiculata L. Walp*) es cultivado en la región de la Chontalpa, Tabasco, en particular las variedades corazón negro y ombligo café y junto con el frijol común han sido la principal fuente de proteína de origen vegetal entre la población rural del estado, a pesar de las condiciones climatológicas desfavorables (Lagunes *et al.*, 2008).

Algunos estudios previos realizados en el trópico y subtropico han demostrado que la especie *Vigna unguiculata* posee gran potencial agronómico y nutricional como fuente de alimento no convencional; su composición química es bastante parecida a la del frijol común (*Phaseolus*

vulgaris), y aunque *Vigna* contiene valores más altos de proteína (21 a 22.5% según Miquilena, 2012) el contenido de aminoácidos esenciales es bastante similar, ya que también carece de aminoácidos azufrados (López y Bressani, 2008; Díaz *et al.*, 2007). En la **Tabla 2** se muestra el perfil de aminoácidos reportado por Miquilena (2012) para el frijol *Vigna unguiculata* en sus variedades blanco y negro.

Tabla 2. Perfil de aminoácidos (g/100 g proteína) en harinas de dos variedades de frijol *Vigna unguiculata*

Aminoácido	Frijol negro	Frijol blanco
Acido aspártico	12.65	12.22
Acido glutámico	17.77	17.86
Serina	4.39	5.03
Glicina	4.71	4.51
Histidina	4.10	3.77
Arginina	5.16	6.35
Treonina	3.90	3.66
Alanina	4.56	4.42
Fenilalanina+Tirosina	10.38	10.28
Metionina+Cisteína	1.69	1.81
Valina	6.75	5.94
Isoleucina	2.77	2.97
Leucina	7.79	7.96
Prolina	4.32	3.98
Lisina	8.10	7.90

Las variedades de **Vigna** poseen cáscara gruesa y un sabor descrito como “tierra” que los diferencia del sabor de **Phaseolus vulgaris**. Se ha sugerido que esta característica sensorial se debe a la presencia de polifenoles (aproximadamente 0.1 mg ácido tánico/g de muestra) (López y Bressani, 2008; Martínez *et al.*, 2002). En la **Figura 3** se muestra la flor de ésta especie, las cuales son asimétricas y color blanco amarillento.

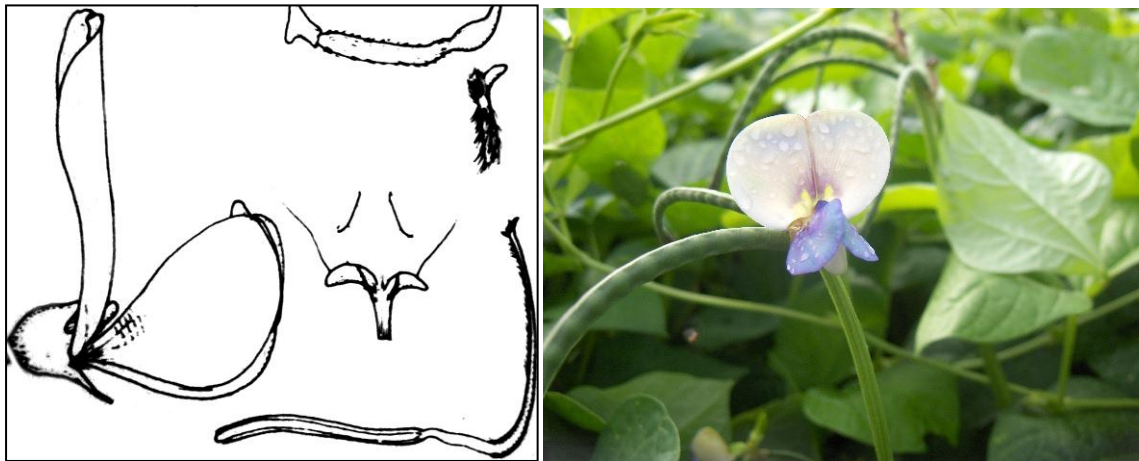


Figura 3. Flor de **Vigna unguiculata**

En la actualidad el consumo de proteína animal ha declinado debido a su alto costo; en consecuencia ha surgido la posibilidad de incrementar las cantidades de proteína de origen vegetal en la dieta humana. En tal sentido, el frijol del género **Vigna**, del grupo de leguminosas de grano, posee un alto valor nutritivo en cuanto al contenido de proteína se refiere (Medina *et al.*, 1996; Karuppanapandian, 2006).

3.4 FACTORES TÓXICOS

Pese a las características y ventajas que encontramos en los alimentos de origen vegetal, estos contienen más de un compuesto nocivo para la salud del consumidor. Estas sustancias dañinas (Valle y Lucas, 2000) se pueden dividir en dos grupos dependiendo del efecto que producen en el organismo:

- Agente tóxico: es cualquier sustancia xenobiótica capaz de producir algún cambio fisiológico y/o anatómico a corto plazo, el cual no puede revertirse por simple fortificación o suplementación del alimento que lo contiene. Ejemplo: alcaloides.
- Agente antinutricional: son aquellas sustancias presentes en los alimentos que tienen la capacidad de interactuar con un nutrimento, disminuyendo así su biodisponibilidad; y a largo plazo es capaz de producir una anomalía fisiológica y/o anatómica que en la mayoría de los casos es irreversible. En la mayoría de los casos el propio nutrimento puede actuar como antagonista, por lo que una fortificación de este en la etapa temprana del efecto dañino podría atenuar o eliminar el problema. Ejemplos: ácido fítico, inhibidores de tripsina y lectinas.

ACIDO FITICO

El ácido fítico o ácido mioinositol hexafosfórico (IP₆) y sus sales derivadas, constituyen la mayor reserva de fósforo en algunas plantas. Posee una estructura con doce protones reemplazables y una alta densidad negativa por los grupos fosfato, lo cual le facilita formar complejos estables con cationes divalentes a un pH neutro que es normalmente el que presenta un alimento (Martínez *et al.*, 2002; Jane y Triana, 1994).

En la **Figura 4** se muestra la estructura del ácido fítico, donde se puede observar cómo es que interacciona este factor tóxico con las proteínas, y minerales de los alimentos.

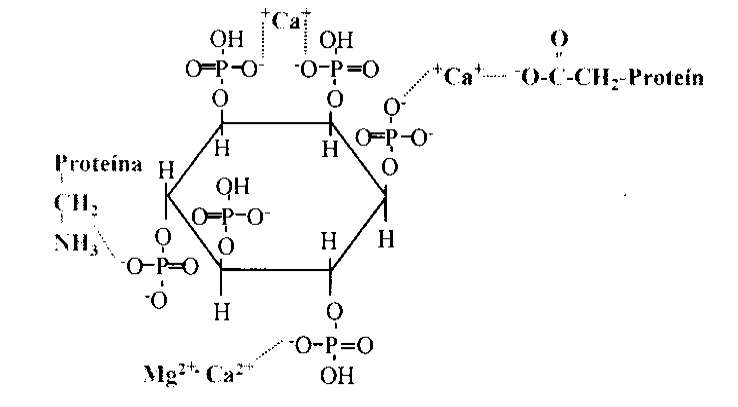


Figura 4. Estructura del ácido fítico

Desde el punto de vista nutricional, el interés del ácido fítico se debe principalmente a su capacidad de formar complejos con minerales esenciales que se encuentran en los alimentos (Cu, Zn, Fe, K, Mg y Ca), lo que disminuye la absorción intestinal y la biodisponibilidad de estos minerales para el hombre y los animales monogástricos; ya que estos no están provistos de suficiente actividad de fosfatasas endógenas (fitasas) que sean capaces de liberar los minerales de la estructura del fitato. También interacciona con residuos básicos de proteínas formando complejos proteína-fitato y proteína-fitato-mineral, evitando reacciones enzimáticas a nivel digestivo. Sin embargo, se ha demostrado que durante el procesamiento de los alimentos y la digestión, la cantidad final de ácido fítico disminuye significativamente como consecuencia de su hidrólisis enzimática o química (Elizalde *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2002; Valle y Lucas, 2000).

Varios estudios han demostrado que las formas menos fosforiladas (IP3, IP2, IP1) favorecen la absorción intestinal de minerales; disminuyen el índice glicémico inhibiendo la acción de las amilasas; quelan radicales 3^+ y 2^+ de Fe y Zn previniendo el cáncer de colon; actúan como antioxidantes inhibiendo la peroxidasa y previenen la formación de cálculos renales al reducir la formación de cristales de hidroxapatita (Elizalde *et al.*, 2009).

INHIBIDORES DE TRIPSINA

Son compuestos de naturaleza proteínica termolábiles que alteran la digestión de las proteínas, inhibiendo la acción de las enzimas digestivas que se encargan de la hidrólisis de las proteínas que ingerimos en la dieta. Se encuentran en el aparato digestivo de algunos animales, pero principalmente se pueden encontrar en alimentos de origen vegetal, donde se cree pueden jugar un papel de defensa en las plantas (Alizadeh *et al.*, 2012).

Los inhibidores de proteasa se han clasificado en 10 familias en base a su peso molecular, homología de la secuencia de aminoácidos y el contenido de cisteína, siendo tres las más ampliamente distribuidas: las familias Bowman-Birk, Kunitz y de la papa-1. Los más conocidos son los que reaccionan con proteasas de serina, como la tripsina y la quimotripsina, siendo los inhibidores de tripsina son los más estudiados; además presentan mayor resistencia al calor que los inhibidores de quimotripsina. En las leguminosas encontramos inhibidores de tipo Kunitz, con peso aproximado de 20 kDa y los de Bowman-Birk de 7 kDa, a donde pertenecen la mayoría de los inhibidores de proteasas (Alizadeh *et al.*, 2012).

Con base a la literatura, el efecto más importante de los inhibidores de proteasas es la inhibición del crecimiento o un índice bajo en la Eficiencia

Protéica (PER), producida principalmente por la inactivación de la tripsina y la quimotripsina, debido a la formación de complejos estables e inactivos; ocasionando una hidrólisis incompleta de las cadenas peptídicas y por consiguiente, una disminución en la digestibilidad de la proteína. Conjuntamente se ocasiona un aumento en la secreción pancreática de enzimas digestivas como tripsina, amilasa y quimotripsina, las cuales son ricas en aminoácidos, principalmente azufrados como la cisteína y la metionina, además que ocasiona la subutilización de la proteína dietaria (Alizadeh *et al.*, 2012; Elizalde *et al.*, 2009).

La actividad de este factor tóxico puede eliminarse utilizando tratamientos térmicos, proceso biológicos como la germinación y la fermentación, ya que se lleva a cabo la desnaturalización de estas proteínas y mejora la digestibilidad (Elizalde *et al.*, 2009).

LECTINAS

Las lectinas se definen como proteínas o glicoproteínas, de origen no inmune, capaces de reconocer e interaccionar reversiblemente con hidratos de carbono en solución o de superficies celulares.

Las lectinas vegetales, también llamadas fitohemaglutininas, cumplen funciones de transporte e inmovilización de hidratos de carbono; por esto, algunas lectinas reconocen hidratos de carbono que forman parte específica de determinados grupos sanguíneos humanos (Rodríguez *et al.*, 2004).

El interés de su estudio se debe a las diversas actividades biológicas que pueden inducir, tales como aglutinación de eritrocitos humanos y animales (hemaglutinación), aglutinación de células malignas, actividad inmunosupresora, etc. Gracias a esta propiedad se han convertido en

herramientas útiles no sólo para la purificación de polisacáridos, glicoproteínas y glicolípidos, sino también para evidenciar la topología de superficies celulares y los cambios inducidos por transformaciones de las mismas. Su participación en la fase inicial del proceso de reconocimiento de posibles microorganismos patógenos han sido los más ampliamente considerados (Castresana *et al.*, 1987).

Basado en su capacidad para unirse específicamente a los hidratos de carbono, las lectinas se han propuesto para ser responsables de la adsorción específica de bacterias en la superficie de la planta y participar en la encapsulación de los agentes patógenos en los espacios intercelulares de los tejidos vegetales. La mayoría de los estudios llevados a cabo con el fin de establecer la función de las lectinas, se han llevado a cabo en las semillas de la planta donde estas proteínas se acumulan. Sin embargo, la presencia de lectinas disminuye drásticamente durante el desarrollo de la planta y se convierte en indetectable en algunos tejidos. Por otra parte, la unión de las lectinas y la mucosa intestinal produce cambios en la actividad de las enzimas digestivas, ocasionando hipersecreción de la proteína endógena debido a la descamación de células dañadas, un aumento en la producción de mucinas y una pérdida de proteínas del plasma en el lumen intestinal; además, existe la posibilidad que, debido al daño que provocan las lectinas a la mucosa intestinal, algunas bacterias puedan encontrar una ruta de ingreso al sistema circulatorio y de esta forma infecten órganos internos (Elizalde *et al.*, 2009).

3.5 SEMILLAS Y GERMINACIÓN

Las semillas son la unidad de reproducción sexual de las plantas, constituyen el mecanismo de perennización por el que las plantas perduran generación tras generación. Su función es multiplicar y perpetuar la especie a la que

pertenecen, siendo uno de los elementos más eficaces para que esta se disperse en tiempo y espacio (Doria, 2010).

La semilla es una fuente de alimento básico para animales, pero también, mediante la producción agrícola, la semilla es esencial para el ser humano, ya que la principal fuente energética está constituida por semillas, directa o indirectamente. En la **Figura 5** podemos observar las partes de la semilla, en ellas se encuentran las reservas que sostendrán a la futura planta durante sus primeras etapas de vida.

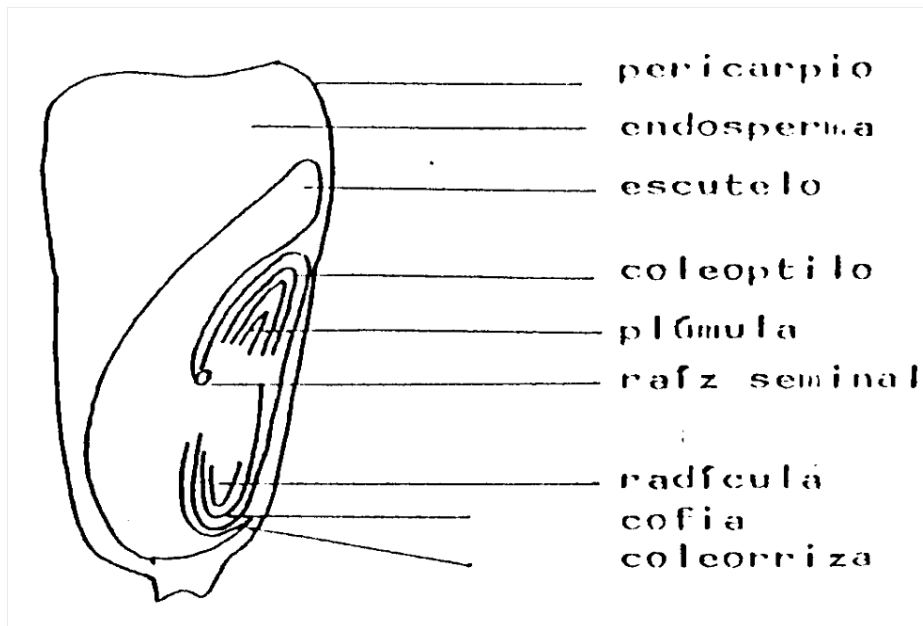


Figura 5. Partes de la semilla

Cuando las semillas viables en estado de quiescencia (reposo) se embeben con agua, comienzan una serie de eventos que culminan con la emergencia de la radícula; esto significa que el proceso de germinación se cumplió exitosamente. La germinación incluye numerosos eventos, como la hidratación de la proteína, cambios estructurales subcelulares, respiración, síntesis macromoleculares y elongación celular. No incluye el crecimiento de la planta, que comienza cuando se termina la germinación (Celis *et al.*,

2010). En la **Figura 6** se muestra el esquema de germinación de la semilla de ***Phaseolus vulgaris***, donde se ilustra el reinicio del crecimiento del embrión y la ruptura de la cubierta protectora que se genera por la emergencia de la radícula.

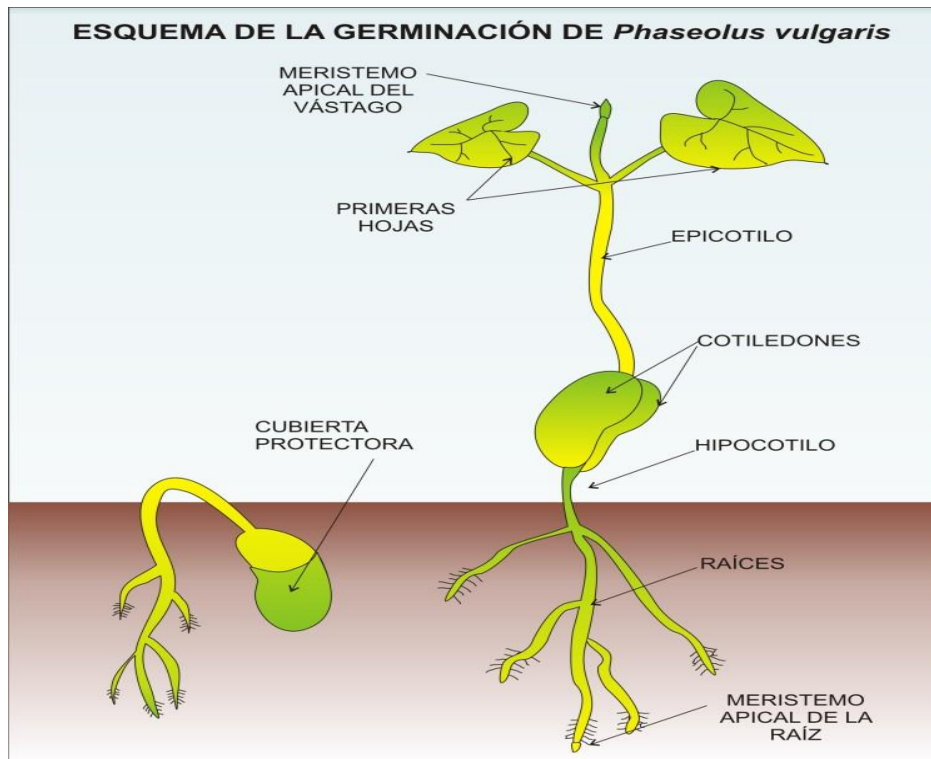


Figura 6. Esquema de germinación de *Phaseolus vulgaris*.

Después, el crecimiento continuo del embrión depende del flujo de productos de la hidrólisis de compuestos cotiledonares o reservas extraembrionarias, como las del embrión, que posee un elevado contenido de almidón constituido por células muertas a excepción de las filas más externas que constituyen la capa de la aleurona, que son capaces de sintetizar proteínas. El endospermo sirve como depósito de reservas (almidón, proteínas, fitato, etc.) que permite el desarrollo del eje embrionario durante la germinación (Lallana *et al.*, 2005).

Además de estos compuestos, contienen algunos otros considerados factores tóxicos para los seres vivos que las consumen, ya que causan algún daño en algún órgano o disminuyen la biodisponibilidad de los nutrientes. Pero con la germinación se ha observado en diversos estudios una disminución de estos, y como consecuencia un aumento en los nutrientes (Ayet *et al.*, 1997).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Obtención y almacenamiento de las leguminosas

Las semillas maduras de frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) y las dos variedades de frijol pelón *Vigna unguiculata* (ombligo café y corazón negro) utilizadas en el presente estudio (**Figura 7**), se adquirieron con productores del Municipio de Comalcalco, Tabasco; uno de los mayores productores de estas leguminosas criollas junto con Cunduacán y Cárdenas; donde las condiciones climatológicas son: temperatura de 26 °C y un promedio de humedad relativa anual del 80 %. Se realizó una selección de semillas eliminando cualquier materia extraña, semillas incompletas, fracturadas y de tamaño irregular. Para la conservación y almacenamiento de las semillas de las leguminosas, se utilizaron técnicas tradicionales (almacenamiento del frijol con vaina o solo la semilla, almacenamiento en costales). Para la limpieza de semillas se utilizó hipoclorito de sodio al 1 % (Lagunes *et al.*, 2008).



Figura 7. Semillas de leguminosas utilizadas en este estudio; 1) *Phaseolus vulgaris* variedad frijol negro, 2) *Vigna unguiculata* variedad Corazón negro y 3) *Vigna unguiculata* variedad Ombligo café.

4.2 Germinación y obtención de la harina de las semillas germinadas

Las semillas seleccionadas se sometieron a un proceso de germinación de acuerdo a la metodología establecida por Rodríguez (2011), en un equipo adaptado como germinadora para este estudio (Rodríguez *et al.*, 2010a).

Las semillas germinadas se secaron a 55 ± 2 °C durante toda la noche (12 a 18 h), en un equipo adaptado como secador de baja temperatura, para el presente estudio (Rodríguez *et al.*, 2010b). Una vez terminado el periodo de secado se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se molieron en un molino Pulvex MINI 100. Los germinados molidos se pasaron a través de un tamiz malla 100 para obtener la harina; la cual se guardó en frascos de vidrio a 4 °C, hasta su uso.

4.3 Obtención de harinas de semillas sin germinar (cero días de germinación)

Las semillas de las leguminosas seleccionadas (0 días de germinación), se pesaron en una balanza granataria (Scout* Pro 400 g), se lavaron tres veces con agua purificada, se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % (v/v) durante 30 min; posteriormente fueron lavadas nuevamente de tres a cuatro veces con agua purificada hasta alcanzar pH neutro. Se drenaron y se pre-molieron en un molino Tor-Rey M-12-FS, posteriormente se sometieron al proceso de secado para la obtención de la harina y conservación previo a su análisis; como se describió para las leguminosas germinadas.

4.4 DETERMINACION DE PROTEINA CRUDA

Fundamento:

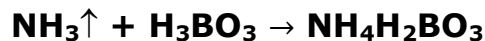
El método empleado usualmente para la determinación de nitrógeno en alimentos, es el método microKjeldahl (AOAC, 2005) que consiste en una oxidación de la materia orgánica por acción del ácido sulfúrico y calor para formar dióxido de carbono, agua y sulfato ácido de amonio. Cuando la oxidación se ha completado se enfría, se diluye y con una solución alcalina libera el nitrógeno como amoniaco. El amoniaco obtenido después de la digestión se destila y se recibe en una disolución de ácido bórico, el cual al final se titula para conocer la cantidad de nitrógeno contenida en la muestra.

En resumen, el método puede ser dividido en tres procesos básicos:

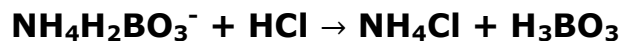
- Digestión: La descomposición de la materia orgánica en la muestra



- Destilación: Es la adición de un exceso de álcali a la mezcla ácida de digestión para convertir el NH_4^+ en NH_3 , seguido por la ebullición y condensación de NH_3 gaseoso, el cual es recibido en una disolución de concentración conocida de ácido bórico



- Cuantificación: Con el volumen gastado en la titulación



se calcula el porcentaje de nitrógeno y posteriormente se calcula la cantidad de proteína en la muestra.

El peróxido de hidrógeno es adicionado al final del periodo de digestión para obtener una oxidación completa.

Equipo y material:

- Digestor TECATOR, modelo Ab-20/40
- Dispositivo de destilación TECATOR, Kjeltex Auto 1030 Analyzer
- Tubos de digestión Tecator de 100 mL
- Balanza analítica Sartorius Analytic

Reactivos:

- Mezcla digestiva (**a**)
- Peróxido de hidrógeno al 30 %
- Sulfato de potasio (R.A.)
- Solución de NaOH al 40 %
- Solución de ácido bórico con indicadores (**b**)
- Solución de HCl 0.01N valorada

(**a**). Disolver 3 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 20 mL de agua destilada y una vez que esté bien disuelta la sal, se agregan 50 mL de ácido ortofosfórico (H_3PO_4), a continuación se adicionan con mucho cuidado y resbalando por la pared del recipiente 430 mL de ácido sulfúrico concentrado.

Esta mezcla se deja agitando por aproximadamente 30 minutos

(**b**). Se pesan 10 g de ácido bórico y se coloca en un matraz aforado de 1 L; se adiciona agua hasta disolverlo y a continuación se adicionan 10 mL

del indicador B (100 mg de verde de bromocresol en 100 mL de metanol) y 7 mL del indicador de rojo de metilo (100 mg de rojo de metilo en 100 mL de alcohol metílico). Se ajusta el color a un tono café rojizo con ácido o álcali según se requiera y se afora a 1 L con agua destilada.

Procedimiento:

Digestión de la muestra

Se pesaron aproximadamente 50 mg de muestra y se depositó en el tubo de digestión, se agregaron aproximadamente 0.5 g de sulfato de sodio y 3 mL de mezcla digestiva; se pone el tubo en el digestor por espacio de 15 min (340 °C) y después de ello se saca del digestor a que se enfríe para poder adicionarle 1.5 mL de H₂O₂ y nuevamente colocarlo en el digestor que se encuentra a 370 °C. Se considera que la digestión se ha llevado a cabo cuando el tubo no muestra manchas ni puntos negros y además la mezcla de digestión es transparente con un ligero tono verde-azuloso.

Destilación y titulación

Una vez efectuada la digestión se dejó enfriar y se procedió a realizar la destilación en el destilador Kjeltex. En este aparato se lleva a cabo la destilación y titulación de la muestra.

Cálculos:

Para realizar los cálculos es conveniente correr un blanco, donde se sustituye la muestra por el equivalente en peso de glucosa o sacarosa; tratándose en la misma forma que las muestras.

$$\% N_2 = \frac{(P-B) \times N \times meq \times 100}{m} \qquad \% \text{ Proteína} = \% N_2 \times F$$

Dónde:

P = mL de la titulación de la muestra

B = mL de la titulación del blanco

N = normalidad de la solución de HCl

Meq = miliequivalente de nitrógeno (0.014)

m = peso de la muestra (en gramos)

F = factor de conversión (6.25)

4.5 DIGESTIBILIDAD *in vitro*

Fundamento:

El procedimiento *in vitro* se ha desarrollado para remplazar el procedimiento *in vivo*, tratando de simular la digestión natural para determinar la biodisponibilidad de las proteínas sin recurrir a ensayos biológicos con el manejo de animales. La metodología de la AOAC (2005) se fundamenta en la digestión de las proteínas del alimento por proteólisis, utilizando enzimas (tripsina, pepsina y α -quimotripsina) que liberan H^+ debido a la ruptura del enlace peptídico, disminuyendo así el pH. Asumiendo esta correlación entre la liberación H^+ y la digestibilidad de la proteína, ésta puede evaluarse por el registro de la disminución del pH, mientras más bajo sea el valor de pH nos indica que es más digerible la proteína.

Equipo:

- Balanza analítica Sartorius Analytic
- Termocirculador a 37 °C, Grant Mod. 5E-10
- Termocirculador a 55 °C, VWR Scientific Mod. 1112
- Potenciómetro con electrodo de calomel, Thermo Scientific Mod. Orion 3 Star
- Agitador , Corning Mod PC-310

Material:

- Vasos para digestibilidad
- Manguera de hule para agua

Reactivos:

- HCl diluido
- NaOH diluido
- Caseína liofilizada
- Solución de enzimas A
- Solución de enzima B

Preparación de reactivos:

Solución de enzimas A:

Se disolvieron en agua destilada las unidades BAEE requeridas de las siguientes enzimas y se llevaron a un volumen final de 10 mL en un matraz aforado

- Tripsina pancreática porcina tipo IX (Sigma T-0134), 227 040 unidades BAEE (cálculo 1).
- Pepsina de mucosa gástrica porcina (Sigma P-7000), 2 321 unidades (cálculo 2)

- α -quimotripsina pancreática bovina tipo II (Sigma C-1421), 1 860 unidades BAEE (cálculo 3).

Nota: En la preparación de la solución enzimática, la pepsina de mucosa gástrica porcina (Sigma P-7000) sustituye a la peptidasa intestinal porcina grado 1; enzima propuesta en la metodología de la AOAC (2005).

Solución de enzima B:

Se disolvieron 65 unidades de caseína de proteasa bacteriana (Sigma P-5147) con 10 mL de agua desionizada en un matraz aforado de 10 mL (cálculo 4).

Cálculos

1. La Tripsina pancreática porcina tipo IX (Sigma T-0134) tiene 16 700 unidades BAEE por 1 mg de proteína; siendo equivalente a 1 mg de tripsina

$$\frac{1 \text{ mg de proteína} \times 227\,040 \text{ unidades BAEE}}{16\,700 \text{ unidades BAEE}} \times \frac{1 \text{ mg de tripsina}}{1 \text{ mg de proteína}} = 13.595 \text{ mg de tripsina}$$

2. Un gramo de pepsina contiene 424 unidades/mg de peptidasa, por lo tanto para disolver 2 321 unidades de pepsina se requiere:

$$\frac{(1 \text{ mg peptidasa} * 2\,321 \text{ unidades})}{424 \text{ unidades}} = 5.47 \text{ mg proteasa}$$

3. Una unidad de α -quimotripsina hidroliza un μ mol de BTEE (N-bezoil-L-Tirosina etil ester) por minuto a pH 7.8 a 25 °C. Contiene 57.24 unidades/mg de α -quimotripsina, por lo tanto, para disolver 1 860 unidades de α -quimotripsina se requiere:

$$\frac{(1 \text{ mg } \alpha - \text{ quimotripsina} * 1\,860 \text{ unidades BAEE})}{57.24 \text{ unidades BAEE}} = 32.495 \text{ mg } \alpha - \text{ quimotripsina}$$

4. Cada mg de proteasa tiene 5.9 unidades. Se necesitan 65 unidades de caseína de proteasa, por lo tanto:

$$\frac{1 \text{ mg pepsina} * 65 \text{ unidades}}{5.9 \text{ unidades}} = 11.017 \text{ mg pepsina}$$

5. El porcentaje de digestibilidad se obtiene al sustituir el valor de la lectura del pH de la muestra en la siguiente fórmula; con la condición de que el control de caseína muestre un valor de pH igual a 6.42 ± 0.05 .

$$\text{Digestibilidad (\%)} = 234.84 - 22.56(\text{pH})$$

Procedimiento:

Se pesó en el vaso digestor la muestra o caseína (que se utilizó como control cuantitativo) la cual debe de proveer 10 mg de nitrógeno proteínico y se le añadieron 10 mL de agua destilada, se colocó en agitación a 37 °C durante una hora, posteriormente se midió el pH y se ajustó a 8.0 ± 0.03 con HCL o NaOH según fuera necesario. Inmediatamente se adiciono 1.0 mL de la solución de enzimas A, la cual permaneció 10 minutos en agitación, posteriormente se cambió la temperatura a 55 °C y se añadió la solución de enzima B, permaneciendo en agitación por 9 minutos, al término se cambió la temperatura a 37 °C durante 1 min y se mide inmediatamente el pH. Con este dato ya podemos calcular el % de digestibilidad (cálculo 5).

4.6 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO FÍTICO (Frühbeck *et al.*, 1995):

Fundamento:

La metodología se basa en la purificación del extracto de ácido fítico por medio de una resina de intercambio aniónico, la cual permite eliminar fracciones de inositol que comúnmente se incluyen en otros métodos, permitiendo así la cuantificación real del ácido fítico. La determinación colorimétrica se basa en la formación del complejo entre el fosfato del ácido fítico y el Fe^{3+} proveniente del complejo colorido FeCl_3 -sulfosalicílico, por lo tanto se mide la disminución de la absorción.

Equipo:

- Balanza analítica Sartorius Analytic
- Potenciómetro Thermo scientific Mod. Orion 3 star
- Agitador magnético Corning Mod PC-310
- Agitador tipo Vortex Lab-line
- Espectrofotómetro Genesys™ 10

Material:

- Tubos de ensaye
- Jeringas de 3 mL
- Vasos de precipitado

Reactivos:

- Solución HCl 0.65 N
- Solución NaCl 0.1 N
- Solución NaCl 0.7 N

- Estándar de ácido fítico Sigma P8810-106
- Reactivo de Wade
- Fibra de vidrio
- Resina de intercambio aniónico AG2-X8, 200-400 mesh Bio Rad No. 140-2451

Procedimiento:

- **Preparación de columnas de intercambio iónico:** a las jeringas se les colocó en el fondo un tapón de fibra de vidrio de aproximadamente 0.5 cm de espesor; se pesaron 0.5 g de resina y se hidrató con 0.6 mL de agua desionizada, posteriormente se agregó a la jeringa cuidando que quedara asentada uniformemente. Ya empacada se adicionaron 15 mL de NaCl 0.7 N para eliminar cualquier impureza y finalmente se realiza un lavado con 30 mL de agua desionizada, cuidando de dejar liquido en la superficie (aproximadamente 0.5 cm de altura arriba de la resina empacada) para que no se seque y quede lista para usarse.

- **Preparación de la curva patrón:** se preparó una solución stock de ácido fítico que contenga 1 mg de ácido fítico/ mL pesando 0.0640 g y llevando a un aforo de 50 mL con agua desionizada. A partir de ella se prepararon soluciones que tuvieran 5, 10, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$

- **Preparación del reactivo de Wade:** se pesaron 0.03 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0.3 g de ácido sulfosalicílico y se colocaron en un matraz volumétrico de 100 mL y se llevó a aforo con agua desionizada.

- **Preparación de las muestras:** se pesó 1 g de muestra y se agregaron 20 mL de HCl 0.65 N para llevar a cabo la extracción. Se corroboró que la mezcla tuviera un pH entre 0 y 1. Posteriormente se sometió a agitación a 400 rpm durante 2 horas a temperatura ambiente,

pasado el tiempo se transfirió el extracto obtenido a tubos para ser centrifugados a 12 000 rpm por 30 min. Se recolecto el sobrenadante y se tomó una alícuota de 1 o 5 mL dependiendo de la muestra, la cual se llevó a un aforo de 25 mL. El pH se ajustó a 6 para después tomar 10 mL y transferirlos cuantitativamente a la columna. El lavado de la columna se realizó con 15 mL NaCl 0.1N. El ácido fítico se recuperó pasando por la columna 15 mL de NaCl 0.7 N.

- **Determinación del contenido de ácido fítico:** se tomaron 3 mL de los extractos recuperados, de las soluciones estándar y se colocaron en tubos de ensaye, se les adicionó 1 mL de reactivo de Wade, se sometió a agitación por 5 segundos y se procedió a leer la absorbancia a una longitud de onda de 500 nm en el espectrofotómetro; para el blanco de reactivos se sustituyó el volumen del extracto por agua desionizada.

Cálculos:

Se obtuvo el promedio de la absorbancia del blanco; se realizó la curva de calibración mgAF/ mL vs absorbancia corregida, la cual se obtuvo de la siguiente manera:

$$\textit{Absorbancia corregida} = \textit{absorbancia blanco} - \textit{absorbancia muestra}$$

$$\frac{g \textit{ muestra}}{mL \textit{ NaCl}} = \frac{g \textit{ muestra}}{20mL \textit{ HCl}} * \frac{mL \textit{ alícuota HCl}}{25mL \textit{ H2O}} * \frac{10mL \textit{ H2O}}{15mL \textit{ HCl}}$$

$$\frac{\mu g \textit{ AF}}{mL \textit{ NaCl}} = \frac{\textit{absorbancia corregida} - \textit{ordenada}}{\textit{pendiente}}$$

$$\% AF \left(\frac{g AF}{100 g muestra} \right) = \frac{\mu g AF}{mL NaCl} * \frac{1 g AF}{10^6 \mu g AF} * \frac{mL NaCl}{g muestra} * 100$$

4.7 DETERMINACION DE INHIBIDORES DE TRIPSINA

Fundamento:

La técnica es la utilizada por Kakade *et al.* (1974), la cual se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso de la muestra (conformado por solución de NaOH 0.01 N y muestra) sobre una solución estándar de tripsina.

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

Una unidad de tripsina (U.T.) es arbitrariamente definida como un incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm por 10 mL de mezcla de reacción descritas por Kakade *et al.* La actividad de inhibidores de tripsina se expresa en términos de unidades de tripsina inhibida (U.T.I.).

Equipo:

- Potenciómetro Thermo scientific Mod. Orion 3 star
- Parrilla de agitación magnética con calentamiento "WiseStir" modelo SMHS-3
- Espectrofotómetro Genesys™ 10

- Mezclador de tubos Vortex
- Baño con recirculación de agua "Grant"
- Balanza analítica Sartorius Analytic

Material:

- Tubos de ensaye
- Gradilla para tubos
- Agitador magnético
- Buretas

Reactivos:

- NaOH 0.01 N
- Solución amortiguadora de TRIS, pH 8.2 , 0.05 M (a)
- Solución BAPNA (b)
- Ácido acético al 30 %
- Solución estándar de tripsina (c)
- HCl 0.001 N

(a) 6.05g de TRIS (hidroximetil-amino-metano P.M. 121.14) y 2.94 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, se disuelven en 900 mL de agua destilada. Se ajusta el pH a 8.2 y se afora a un volumen de 1 L.

(b) 100 mg de α -N Benzoil- DL-arginina -p-nitroanilida-HCl (BAPNA) se disuelven en 2.5 mL de dimetilsulfoxido y se diluye a 250 mL con amortiguador TRIS previamente calentado a 37 °C. **NOTA:** ESTA SOLUCIÓN DEBE SER PREPARADA EL MISMO DÍA Y CUANDO ESTE EN USO DEBE MANTENERSE A 37 °C.

(c) Se pesan con mucha exactitud 4 mg de tripsina bovina (SIGMA T-8253) y se disuelve en 200 mL de HCl 0.001 N.

Esta solución contiene 20 μg de tripsina por mL y debe ser almacenada en refrigeración donde puede durar de 2 a 3 semanas sin pérdida apreciable de actividad.

Procedimiento:

A) Preparación del extracto:

Se pesa 1 gramo de muestra finamente molida y desengrasada (<5 % de grasa) en un vaso de precipitado y se le adiciona 45 mL de NaOH 0.01 N, a esta suspensión se le ajusta el pH a 9.6 ± 0.2 y se afora con agua a 50 mL.

A continuación se transvasa a un vaso que contenga un magneto, para poder agitar la suspensión mecánicamente en la parrilla de agitación por espacio de 2.5 horas a 300 rpm Después de este tiempo se quita el magneto y se deja media hora en reposo, y por simple decantación se separa el sobrenadante eliminando el residuo insoluble. El sobrenadante debe ser diluido hasta el punto de que 1 mL produzca una inhibición de 40 a 60 %; este requisito es indispensable para reducir la desviación estándar relativa.

B). Determinación de la actividad:

Porciones de 0.0, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8 mL de extracto directo o diluido se pipetea en tubos de ensaye por duplicado y ajustado el volumen a 2.0 mL con agua destilada, se introducen al Baño María a 37 ° C. Se adicionan 2.0 mL de solución estándar de tripsina (previamente mantenida a 37 ° C) y se incuba por espacio de 10 min.

A continuación se adicionan 5 mL de solución de BAPNA (a 37 °C) a cada tubo y se mantiene dicha mezcla de reacción por 10 minutos exactos (con cronómetro). La reacción enzimática se detiene por la adición de 1 mL de ácido acético al 30 %; el cual debe homogeneizarse inmediatamente.

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

Sin embargo es necesario cerciorarse que el filtrado este transparente.

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

Nota: Cuando se trabaja con el extracto directo, es común que se arrastren coloraciones indeseables que pueden interferir en la determinación; por lo que se considera conveniente tomar una alícuota más de cada una de las porciones, las cuales servirán como sus respectivos blancos. A estos tubos, una vez adicionados los 2 mL de solución de tripsina, inmediatamente después se les adiciona 1.0 mL de ácido acético al 30 % y por último los 5.0 mL de solución de BAPNA, en estos tubos no es necesario llevar un control de tiempo.

Cálculos:

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

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

Como se tiene una serie de alícuotas del extracto, se tiene a su vez una serie de valores de U.T., los cuales al restar este valor al dato de referencia, se obtiene la actividad remanente y con este se puede obtener las unidades de tripsina inhibida (U.T.I.) y por consiguiente se puede calcular el valor de U.T.I. / mL de cada una de las alícuotas.

Si los inhibidores son de tipo Kunitz, cuando se grafica la actividad enzimática inhibitoria (U.T.I. / mL) como una función de la alícuota del extracto de prueba, se observa una correlación lineal negativa, de donde se puede obtener el valor extrapolado (intercepto del eje de las ordenadas), correspondiente al valor cero de la solución inhibitoria.

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

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

Es conveniente reportar las unidades de inhibición por mg de muestra:

$$\frac{UTI}{mg} \text{ muestra} = \frac{B * F * 50}{1\ 000\ mg}$$

Dónde:

B = valor extrapolado o promedio en U.T.I. / mL

F = Factor de dilución, el cual depende de la (s) dilución (es) realizada (s).

Cuando se trabaja el extracto directo F=1

$$F = \frac{A_1}{a_1} * \frac{A_2}{a_2}$$

Dónde: A_i = aforo (s)

a_i =alícuota (s)

4.8 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LECTINAS (HEMAGLUTININAS) (Lucas, 1993).

Fundamento:

La metodología utilizada es una técnica de microdilución seriada, donde se detectan las lectinas aprovechando su capacidad de aglutinación de los eritrocitos de sangre, en particular de hámster, expresando los resultados en forma cuantitativa con respecto a una referencia, que en este caso es la lectina comercial de ***Phaseolus vulgaris*** (faseolotoxina).

Se determina la cantidad mínima del extracto acuoso de una muestra que produce aglutinación de los glóbulos rojos; este valor se relaciona con la cantidad de mínima de lectina de referencia que produce prueba positiva de aglutinación, definiéndose como una unidad hemaglutinante (UHG) el equivalente a 1 mg de dicha lectina (Lucas y Sotelo, 1993).

Equipo:

- Parrilla de agitación múltiple, Corning Mod.
- Centrifuga, Eppendorf Mod. 5702
- Incubadora a 36 ± 1 °C, Blue-M Mod.
- Espectrofotómetro, Sequoia-turner Mod.
- Adaptador para celdas de 12x80 mm (apertura 1 cm²)
- Balanza analítica, Sartorius Mod. A210-P

Material:

- Tubos graduados para centrífuga de 15 mL
- Microdilutor de 50 μ L
- Pipeta automática multicanales
- Placas de microtitulación tipo "V"
- Filtro de vidrio de porosidad gruesa
- Dispositivo para lectura de placas
- Embudos
- Vasos de precipitados de 50 mL
- Agitador magnético
- Matraz aforado de 10 mL

Reactivos:

- Lectina de ***Phaseolus vulgaris*** (Sigma L-8754)
- Solución anticoagulante (Heparina 1 000 UI)
- Solución salina de NaCl al 1 %
- Solución salina de NaCl al 0.9 %
- Solución de proteasa (Sigma P-5147) al 0.2 % en solución salina al 0.9 %

Procedimiento

Preparación del extracto:

Se pesa 0.1g de muestra molida finamente en un mortero, (<5 % de grasa) y se suspende en 10 mL de solución salina al 1 %, se realiza la extracción con agitación usando un agitador magnético durante 2 horas a 300 rpm. El

extracto se centrifuga a 3000 rpm durante 15 minutos; el sobrenadante se separa con un filtro de vidrio y se lava el residuo con solución salina al 1 %; finalmente el extracto filtrado se lleva al volumen inicial de 10 mL.

Preparación de la sangre

La sangre del hámster obtenida por vía ocular se coloca en un matraz Erlenmeyer de 50 mL con solución anticoagulante, posteriormente se transvasa a tubos de centrifuga, para lavarla tres veces con solución salina al 0.9 % en una proporción 1:5 sangre:solución salina. Se centrifuga durante 10 minutos a 1 500 rpm y se elimina el sobrenadante por decantación. Después del último lavado se mide en el tubo la cantidad del paquete de eritrocitos y se diluye al 4 %, para lo cual por cada 1 mL de paquete de eritrocitos se adicionan 24 mL de solución salina al 0.9 %.

Sensibilización de los eritrocitos

Por cada 10 mL de la suspensión de glóbulos rojos al 4 % se adiciona 1 mL de la solución de proteasa al 0.2 %, se agita suavemente para su homogeneización y se coloca en la incubadora a 36 ± 1 °C por espacio de 1 hora, después del tiempo estipulado se elimina el sobrenadante de proteasa centrifugando a 1 500 rpm por 10 minutos; se lava nuevamente el paquete de eritrocitos tres veces con solución salina al 0.9 % y se resuspende el paquete de eritrocitos ya lavados al 4 %.

Ajuste de la suspensión de eritrocitos

Se toma 0.1 mL de la suspensión de glóbulos rojos ya sensibilizados y se adiciona 4.0 mL de solución salina al 0.9 %. Se lee el porcentaje de transmitancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 620 nm,

utilizando como blanco la solución salina al 0.9 %. La lectura que se debe obtener es de 25 ± 1 % de transmitancia.

Microtitulación

En las placas de microtitulación tipo "V" se coloca en cada pozo de una hilera 100 μ L de solución salina al 0.9 %, utilizando la micropipeta multicanal y evitando tocar las paredes del pozo.

Para realizar la microdilución seriada, se llena el microdilutor de 50 μ L introduciéndolo en el extracto de la muestra problema y al sacarlo se elimina el extracto adherido al vástago del microdilutor con papel absorbente; se coloca el extracto del microdilutor en el primer pozo de la hilera, introduciendo y rotándolo sin excesiva presión y se pasa con cuidado a los siguientes pozos.

Lo anterior también se realiza para la solución diluida 1:100 de lectina de ***Phaseolus vulgaris*** que sirve de referencia para la determinación cuantitativa. Se utiliza como blanco negativo de lectinas, una hilera que solo contiene solución salina al 0.9 %.

Con un pipetero de gota se coloca en cada pozo 50 μ L de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizados, se gira la placa en forma circular y se coloca en la incubadora a 36 ± 1 °C durante una hora.

Lectura

Se coloca la placa de microtitulación sobre el dispositivo de lectura y se observa por el espejo el fondo de los pozos de cada hilera; se reporta la máxima dilución que presenta prueba positiva de aglutinación de la muestra problema y del estándar de ***Phaseolus vulgaris***.

Cálculos:

La máxima dilución que presenta aglutinación se denomina título (t) de la muestra. La prueba se efectúa por triplicado como mínimo para tener una mayor representación y confiabilidad de la determinación. Se obtiene el promedio de los títulos de las diferentes lecturas y se redondea al número entero más cercano.

- a) Se calcula el límite de detección del método usando como referencia la faseolotoxina (Sigma L-8754); para lo cual, es necesario conocer la cantidad de lectina que se utiliza realmente en la determinación y se calcula con la siguiente fórmula:

$$E = M \times D$$

Dónde:

E= Cantidad de lectina para el primer pozo de la hilera respectiva (expresada en μg)

M=Concentración de lectina en la solución diluida (expresada en $\mu\text{g}/\text{mL}$)

D= Cantidad de alícuota tomada por el microdilutor (expresada en μL)

Conociendo este dato se pudo efectuar el cálculo para obtener el límite de detección del método.

$$L = 2 \left(\frac{E}{3^t} \right)$$

Dónde:

L= Límite de detección, cantidad mínima de lectina que produce prueba positiva de aglutinación (expresada en μg)

t= Título o el promedio de los títulos redondeado al entero inmediato

b) Con el resultado del límite de detección, se calculan las unidades hemaglutinante (UHG) de la muestra problema, para lo cual es necesario calcular la cantidad real utilizada de la muestra problema en el primer pozo de la hilera respectiva como se realizó anteriormente, pero expresada en mg; a su vez se calcula la cantidad mínima de muestra que produce prueba positiva de aglutinación (título de la muestra problema).

$$MA = 2 \left(\frac{e}{3^t} \right)$$

Dónde:

MA= Cantidad mínima de muestra que produce aglutinación (expresada en mg)

e= Cantidad de muestra en el primer pozo

t= Título o el promedio de los títulos redondeado al entero inmediato

Con los datos anteriores se determinó la concentración equivalente de lectina, que tiene la muestra problema de acuerdo a la siguiente expresión.

$$LE = \frac{L}{MA}$$

Dónde:

LE= Cantidad de lectina de referencia expresada en µg/mg de muestra que también es equivalente a 1 mg de lectina/g de muestra.

Si por definición se establece que una unidad de hemaglutinación (UHG) es equivalente a 1 mg de faseolotoxina bajo las condiciones establecidas, se puede expresar los resultados en UGH/g de muestra.

4.9 Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 3 x 4 y tres repeticiones. Se utilizaron tres leguminosas de consumo humano, frijol negro (*Phaseolus vulgaris*), y dos variedades de frijol pelón (*Vigna unguiculata*); a cuatro tiempos de germinación (0, 2, 4 y 6 días). Después de someter las leguminosas a un proceso de germinación bajo condiciones controladas de temperatura (25 ± 2 °C), en obscuridad y humedad (70 a 80 %); se obtuvieron las harinas de las leguminosas, para llevar a cabo las determinaciones analíticas por triplicado. Los datos se analizaron mediante un ANOVA utilizando el software SPSS V 14.0 para Windows®. Para cada tratamiento se realizaron tres repeticiones. También se realizaron comparaciones múltiples de medias de Duncan, con un $\alpha=0.05$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Proteína y digestibilidad

En la **Tabla 3** se presentan los resultados para el frijol pelón corazón negro, donde se puede observar que el contenido de proteína cruda presenta un aumento significativo estadísticamente conforme avanza el tiempo de germinación, obteniendo la mayor cantidad en el sexto día de germinación, mayor a la cantidad reportada por Ramos de Vega (2006), donde solo obtuvo un 7 % de aumento; mientras que la digestibilidad no tuvo el mismo comportamiento, ya que hay una disminución al segundo día y un aumento considerable al cuarto día de germinación, que es donde se observa el valor más alto de porcentaje de digestibilidad de la proteína.

Tabla 3. Contenido de proteína y digestibilidad para el frijol pelón corazón negro^a

Tiempo ^b (Días)	Proteína (g/100 g muestra) (N x 6.25)	Digestibilidad <i>in vitro</i> (% Digestibilidad)
0	21.43 ± 0.30 ^A	66.02 ± 1.66 ^B
2	22.82 ± 0.72 ^B	63.08 ± 0.57 ^A
4	27.41 ± 0.60 ^C	68.42 ± 1.38 ^C
6	28.19 ± 0.52 ^C	61.65 ± 0.26 ^A

^a Se presenta el valor promedio ± desviación estándar (n = 3) y letra mayúscula diferente dentro de la columna indica diferencia significativa estadística

^b Días de germinación, donde cero corresponde al grano sin germinar

La absorción de agua por la semilla desencadena una secuencia de cambios metabólicos que incluye la respiración y síntesis proteínica, y por tanto, la formación de enzimas hidrolíticas que son las que promueven la movilización de sustancias de reservas. La hidrólisis de proteínas de reserva está catalizada por diferentes tipos de enzimas proteolíticas, a medida que progresa el proceso de germinación, las fracciones proteínicas de reserva se transforman en otras de menor peso molecular, como péptidos y aminoácidos. Estos aminoácidos liberados son utilizados para la síntesis de nuevas proteínas. Es por esto que la cantidad de proteína aumenta de forma significativa con el avance de la germinación (Doria, 2010; U. P. V., 2014).

En la **Tabla 4** se observa la misma tendencia de aumento en la cantidad de proteína con el proceso de germinación del frijol pelón ombligo café, llegando a un máximo de 28.25 g de proteína/100 g de muestra; pero la digestibilidad no lleva el mismo comportamiento, de hecho, el último tiempo de germinación registra incluso un nivel más bajo que el inicial, y a los dos y cuatro días no muestra diferencia significativa con respecto al día cero.

Dentro de las enzimas que se generan en la germinación, se encuentran las amilasas, encargadas de degradar los hidratos de carbono presentes en la semilla, en este caso, el almidón. Las amilasas degradan el almidón a glucosa, utilizada como fuente de energía (ATP), progresivamente hasta prácticamente su desaparición. Esta disminución en la cantidad de hidratos de carbono conlleva a una concentración de los demás componentes, razón por la cual observamos un aumento en la cantidad de proteína determinada (U. P. V., 2014).

Tabla 4. Contenido de proteína y digestibilidad para el frijol pelón ombligo café^a

Tiempo^b (Días)	Proteína (g/100 g muestra) (N x 6.25)	Digestibilidad <i>in vitro</i> (% Digestibilidad)
0	17.87 ± 0.46 ^A	61.73 ± 1.69 ^B
2	22.43 ± 0.92 ^B	61.28 ± 0.69 ^B
4	25.04 ± 0.20 ^C	61.95 ± 0.79 ^B
6	28.25 ± 0.47 ^D	58.12 ± 0.47 ^A

^a Se presenta el valor promedio ± desviación estándar (n = 3) y letra mayúscula diferente dentro de la columna indica diferencia significativa estadística

^b Días de germinación, donde cero corresponde al grano sin germinar

La digestibilidad de la proteína depende de muchos factores y varía en cada especie; aun con un adecuado tratamiento culinario, sigue siendo pobre su aprovechamiento a comparación con la proteína de origen animal, ya que, como mencionamos antes, existen factores tóxicos, como el ácido fítico) que interactúan con ellas, evitando la completa digestión (Nwokolo, 1996).

Por otra parte, durante la germinación se lleva a cabo la movilización de proteínas de reserva que están almacenadas en los cuerpos proteínicos de los cotiledones, razón por la cual aumenta la proteína con el tiempo de germinación (Dávila *et al.*, 2003).

En la **Tabla 5** se presentan los resultados obtenidos para el frijol negro, de la cual se puede observar que conforme avanza el tiempo de germinación se incrementó el contenido de proteína pero en menor proporción que el presentado para las variedades de ***Vigna unguiculata***, incluso en el tiempo

intermedio no se notó diferencia significativa en este parámetro. También presenta un comportamiento irregular de la digestibilidad de la proteína, incluso, el día seis de germinación presenta el menor valor de digestibilidad la cual no muestra diferencia con la muestra sin germinar (día cero).

Tabla 5. Contenido de proteína y digestibilidad para el frijol negro

Tiempo^b (Días)	Proteína (g/100g muestra) (N x 6.25)	Digestibilidad <i>In vitro</i> (% Digestibilidad)
0	19.43 ± 0.48 ^A	59.47 ± 0.34 ^A
2	20.27 ± 0.62 ^A	68.12 ± 0.51 ^C
4	21.78 ± 0.24 ^A	65.11 ± 1.69 ^B
6	23.78 ± 0.14 ^C	57.74 ± 0.45 ^A

^a Se presenta el valor promedio ± desviación estándar (n = 3) y letra mayúscula diferente dentro de la columna indica diferencia significativa estadística

^b Días de germinación, donde cero corresponde al grano sin germinar

Según Chaparro *et al.* (2010), la germinación induce cambios en la concentración de la proteína y su digestibilidad de manera particular en cada tipo de semilla; estos investigadores obtuvieron una disminución en el contenido de proteína para la quinua con el avance de la germinación, un comportamiento irregular en soya y guandul, y una tendencia de aumento para el amaranto, pero un aumento de la digestibilidad tanto en quinua como en guandul y soya (en condiciones similares a las utilizadas en el presente trabajo).

El contenido de proteína de las tres harinas aumenta de forma muy marcada con el proceso de germinación de seis días, siendo más significativo en el caso de la harina germinada de frijol pelón Ombligo

café. Por otra parte, el ANOVA realizado para los tres tipos de harinas de leguminosas (frijol negro, frijol pelón ombligo café y frijol pelón corazón negro), los cuatro tiempos y la interacción leguminosas-tiempos de germinación, establece que existen diferencias altamente significativas ($p < 0.01$); es decir que las tres harinas de leguminosas germinadas tienen contenidos de proteínas diferentes en las distintas variedades de frijol estudiadas; detectándose el mayor porcentaje de proteína en la harina de la variedad de frijol pelón ombligo café (28.25 ± 0.47), a los seis días de germinación; observándose un aumento de proteína con respecto al paso del tiempo. Comportamiento similar reportado por Osman (2007), Díaz *et al.* (2007), Rivas-Vega *et al.* (2006), Khatoon y Prakash, (2006), y Díaz *et al.* (2004); quienes realizaron estudios en germinados de *Vigna sp.* y *Phaseolus sp.*; no obstante estos autores también reportan que los valores para los parámetros bromatológicos presentan ligeras variaciones, incluso entre especies y variedades similares. En el presente trabajo se observó que la variedad de frijol pelón ombligo café, presentó el mayor aumento de proteína a los seis días de germinación con un 58 % (28.25 g) de incremento en relación a la harina del frijol sin germinar; mientras que las otras dos leguminosas tuvieron valores menores en el mismo tiempo de germinación, 31.54 % (28.19 g) para la variedad corazón negro y un 22.39 % (23.78 g) para frijol negro.

5.2 Factores tóxicos

En la **Tabla 6** se presentan los resultados obtenidos de los factores tóxicos para la variedad corazón negro, donde se observa una disminución en la cantidad de factores tóxicos a mayor tiempo de germinación como era de esperar, datos que concuerdan con lo reportado por Vidal-Valverde *et al.*

(1994) para lentejas, donde también presentaron disminución en la cantidad de ácido fítico y menor actividad de inhibidores de tripsina en las semillas germinadas. Referente a las lectinas, estas no se detectaron en esta variedad de ***Vigna unguiculata***, a diferencia de la mayoría de las leguminosas que si las presentan, considerando que la técnica utilizada tiene una sensibilidad alta (Lucas y Sotelo, 1993).

Es importante resaltar que la cantidad presente de inhibidores de tripsina en el grano sin germinar presenta un riesgo en su consumo, ya que se encuentra arriba del límite máximo permitido establecido ($LMP \leq 10$ UTI/mg) de acuerdo a la metodología propuesta por Kakade *et al.* (1974), pero desde el segundo día de germinación ya no habría problemas por este factor tóxico (Van der Heiden *et al.*, 1999).

Tabla 6. Factores tóxicos frijol pelón corazón negro^a

Tiempo^b (Días)	Ácido fítico (g/100 g de muestra)	Inhibidores de tripsina^c (UTI/mg)	Lectinas^d (UHG/g)
0	0.74 ± 0.03 ^D	12.25 ± 0.07 ^C	ND
2	0.37 ± 0.01 ^C	7.11 ± 0.35 ^B	ND
4	0.25 ± 0.02 ^B	7.33 ± 0.34 ^B	ND
6	0.16 ± 0.01 ^A	6.45 ± 0.42 ^A	ND

^a Se presenta el valor promedio ± desviación estándar (n = 3) y letra mayúscula diferente dentro de la columna indica diferencia significativa estadística

^b Días de germinación, donde cero corresponde al grano sin germinar

^c Valor expresado en unidades de tripsina inhibida por mg de muestra (**UTI/mg**)

^d Valor expresado en unidades de hemaglutinación por gramo de muestra (**UHG/g**)

ND= no detectado

Esta disminución se debe a los mecanismos fisiológicos de desarrollo de las plántulas, ya que una de las funciones de los inhibidores de tripsina es el proceso de autorregulación proteolítica o de almacenamiento en el organismo que los contiene (De Dios *et al.*, 2009).

La germinación induce la activación de las fitasas endógenas de las semillas, que producen una degradación del contenido en ácido fítico (Frontela *et al.*, 2008).

En la **Tabla 7** se puede observar que para el frijol pelón ombligo café, se presenta inicialmente una cantidad muy baja de ácido fítico y también se nota una disminución en la cantidad con el avance de la germinación, de hecho, al cuarto día ya no se detecta con el método utilizado; es cuando se presenta el valor más bajo de inhibidores de tripsina, que desde el tiempo cero observamos que la cantidad de este factor está abajo del LMP; tampoco se detectó la presencia de lectinas, caso semejante al frijol pelón corazón negro.

Este comportamiento concuerda con la función fisiológica que presentan estos factores (ácido fítico, inhibidores de tripsina, lectinas), los cuales juegan un papel de defensa para la planta; por lo cual conforme la planta se va desarrollando empieza el aumento de algunos factores antinutricionales, para jugar así su papel biológico como mecanismo de defensa y reserva de nutrientes en la nueva planta.

Tabla 7. Factores tóxicos frijol pelón ombligo café^a

Tiempo^b (Días)	Ácido fítico (g/100 g muestra)	Inhibidores de tripsina^c (UTI/mg muestra)	Lectinas^d (UHG/g muestra)
0	0.29 ± 0.00 ^B	8.45 ± 0.39 ^C	ND
2	0.16 ± 0.00 ^A	6.43 ± 0.30 ^B	ND
4	ND	5.84 ± 0.17 ^A	ND
6	ND	8.59 ± 0.17 ^C	ND

^a Se presenta el valor promedio ± desviación estándar (n = 3) y letra mayúscula diferente dentro de la columna indica diferencia significativa estadística

^b Días de germinación, donde cero corresponde al grano sin germinar

^c Valor expresado en unidades de tripsina inhibida por mg de muestra (**UTI/mg**)

^d Valor expresado en unidades de hemaglutinación por gramo de muestra (**UHG/g**) ND= no detectado

Nwokolo *et al.* (1996), reportan la presencia de lectinas en ***Vigna unguiculata*** en un rango de 33.5 a 98.9 UHG/mg de proteína, considerando este investigador un nivel de lectinas bajo cuando se encuentran en el rango de 33.5 a 49.6 UHG/mg de proteína, y medio en un rango de 80.4 a 98.9 UHG/mg de proteína. En el caso de las variedades estudiadas en este trabajo, no presentaron este tipo de factor tóxico, lo que en cierta forma indica una menor toxicidad.

Para el caso del frijol negro (***Phaseolus vulgaris***) se pueden observar en la **Tabla 8**, que los resultados para los factores tóxicos, no muestra la tendencia de disminuir con el tiempo de germinación como fue para el caso de las variedades de ***Vigna***; además, cabe mencionar que tanto los

inhibidores de tripsina como las lectinas, tanto en el grano sin germinar como germinado, presentan un riesgo su consumo (Garcíafigueroa, 1998; Kakade *et al.*, 1974).

Tabla 8. Factores tóxicos frijol negro^a

Tiempo^b (Días)	Ácido fítico (g/100g muestra)	Inhibidores de tripsina^c (UTI/mg de muestra)	Lectinas^d (UHG/g muestra)
0	1.46 ± 0.02 ^D	19.40 ± 0.51 ^C	8.04 ± 0.00
2	0.82 ± 0.02 ^B	19.59 ± 0.16 ^C	8.04 ± 0.00
4	1.26 ± 0.05 ^C	10.72 ± 0.11 ^A	8.04 ± 0.00
6	0.74 ± 0.03 ^A	17.03 ± 0.25 ^B	8.04 ± 0.00

^a Se presenta el valor promedio ± desviación estándar (n = 3) y letra mayúscula diferente dentro de la columna indica diferencia significativa estadística

^b Días de germinación, donde cero corresponde al grano sin germinar

^c Valor expresado en unidades de tripsina inhibida por mg de muestra (**UTI/mg**)

^d Valor expresado en unidades de hemaglutinación por gramo de muestra (**UHG/g**)

Otros estudios confirman que las semillas de frijol contienen una cantidad significativa de lectinas, se detectan a través de todo el ciclo de vida de la planta y se observa una fuerte reducción de esta durante la primer semana de crecimiento, pero también observan la rápida pérdida de proteína de *Phaseolus vulgaris* (Rodríguez *et al.*, 2004), datos que no concuerdan con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Resultados de otros investigadores mostraron que la concentración de lectinas disminuye bruscamente durante las primeras semanas del crecimiento de las plantas, alcanzando el valor más bajo en la etapa de

hoja trifoliada y aumentando durante las siguientes fases del desarrollo de la planta. Sin embargo, otros trabajos indican la presencia de lectinas en todos los tejidos de la planta a través de cada fase del ciclo de vida, por lo que en cierta forma no se puede establecer una tendencia en la presencia de estos factores tóxicos en el material biológico estudiado (Castresana *et al.*, 1987).

Según la literatura, las diferencias en el consumo de las reservas de la semilla durante la germinación y emergencia pueden deberse a variación entre las recolectas, en el funcionamiento de los órganos de la semilla durante la germinación y en la eficiencia de los procesos de translocación de nutrientes (Celis *et al.*, 2010).

Una de las fases de la germinación corresponde al metabolismo, en la cual se lleva a cabo la movilización de las reservas, el ácido fítico es su principal reserva de fósforo, esta puede ser una razón por la cual la cantidad de ácido fítico encontrada en los diferentes tiempos de germinación varía (Doria, 2010).

5.3 INTER-RELACIÓN DE LA DISPONIBILIDAD DE LA PROTEÍNA CON LA PRESENCIA DE LOS FACTORES TÓXICOS.

Para el frijol pelón corazón negro se puede observar en conjunto la digestibilidad y la cantidad de ácido fítico; a pesar de no obtener el comportamiento esperado de la digestibilidad, se puede tomar el cuarto día como buen tiempo de germinación, ya que es donde se obtuvo la mayor disponibilidad de proteína y una muy baja cantidad de ácido fítico, la cual no genera problemas en el organismo.

Es importante señalar que el contenido de ácido fítico en cereales y leguminosas está influido por varios factores, como son la variedad del grano, zona de cultivo, calidad de molienda, etc., por lo cual en un mismo tipo de muestra pueden existir valores diferentes (Martínez *et al.*, 2002).

También se observó que en el cuarto día se obtiene una mayor disponibilidad de la proteína, y aunque la cantidad de inhibidores de tripsina no sea la menor, es una cantidad que no causa efecto dañino en el organismo. Los cambios en la biodisponibilidad puede deberse a la presencia de otros factores tóxicos como las lectinas que en este caso no fueron detectadas por el método utilizado, pero en la literatura existen reportes de que están presentes en las variedades de ***Vigna unguiculata*** (Nwokolo, 1996).

En el caso del frijol pelón ombligo café, se puede observar que no hay una interrelación directa de la digestibilidad de la proteína con el ácido fítico e inhibidores de tripsina, pero el valor más alto de digestibilidad coincide con el valor más bajo de inhibidores de tripsina, que se da al cuarto día de germinación, además, el ácido fítico ya no fue detectado por el método utilizado a partir de este cuarto día.

Ayet *et al.* (1997) reportan en su trabajo de investigación que la cantidad de ácido fítico se redujo un 70 % con respecto al contenido inicial, después de 6 días de germinación en muestras de lentejas (***Lens culinaris***). En el presente estudio, para el frijol pelón ombligo café, se obtuvo un mayor porcentaje de disminución, ya que a partir del cuarto día ya no fue detectado por el método utilizado, tomando en cuenta que es de alta sensibilidad.

De acuerdo al contenido de ácido fítico e inhibidores de tripsina después del proceso de germinación, se esperaría que la digestibilidad proteínica hubiera incrementado conforme el tiempo de germinación, lo que podría indicar que hay otros factores que pueden estar afectando este parámetro, como taninos entre otros (Estrada *et al.*, 2007; Ayet *et al.*, 1997).

Por último, para los datos que corresponden al frijol negro, tampoco se observa una tendencia continua de aumento de digestibilidad o disminución de los factores tóxicos, de hecho, en la **Tabla 8** se observa que la cantidad de UHG/g muestra no cambiaron con el proceso de germinación.

En cuanto al ácido fítico, este presenta mayor cantidad que los otros frijoles estudiados, desde la semilla sin germinar hasta después del proceso, lo que podría verse reflejado en el bajo contenido de proteína y su poca disponibilidad (Badui, 1994). Aun así, se observó que al segundo día de germinación se obtiene la mayor disponibilidad de la proteína y un contenido bajo de ácido fítico, que no representa daño al consumirlo.

Ayet *et al.* (1997), observaron en lentejas que la cantidad de ácido fítico no disminuyó después de tres días de germinación, pero si se redujo en gran medida después de los seis días en condiciones de oscuridad a 20 °C, aumentando la calidad nutricional de esta semilla. En este estudio,

para el frijol negro, el sexto día fue donde se obtuvo la menor cantidad de este factor tóxico.

La cantidad de inhibidores de tripsina presenta un riesgo para la salud en cualquier punto de la germinación, por lo que se puede decir que no favoreció de manera considerable el proceso de germinación.

Lo mismo sucedió con la cantidad de lectinas en el frijol negro, ya que no se observa cambio alguno en ningún tiempo de germinación.

Tal vez sería conveniente aumentar los días de germinación para el frijol negro y observar si hay cambio o disminución de factores tóxicos, o en su caso aplicar un proceso térmico después de la germinación, ya que tanto lectinas como inhibidores de tripsina son termosensibles.

6. CONCLUSIONES

- Con el proceso de germinación se logró un incremento del contenido de proteína de un 17.87 a 28.25 g a los 6 días de germinación (correspondiente a un 58 % de incremento de proteína), con respecto a la harina de frijol sin germinar, presentándose el mayor aumento en las variedades de frijol pelón.
- El proceso de germinación generó un comportamiento irregular en la digestibilidad de la proteína. El mayor aumento en la digestibilidad se presentó a los dos días de germinación para la muestra de frijol negro, y a los cuatro días para las dos variedades ***Vigna unguiculata***.
- La cantidad de ácido fítico disminuyó casi al 50 % en el segundo día de germinación en los tres tipos de frijol, con lo cual se corrobora que este proceso biológico es adecuado para disminuir este factor antinutricional en estas leguminosas.
- Las lectinas no se vieron afectadas por el proceso de germinación en el caso del frijol negro en las condiciones de trabajo.
- Los inhibidores de tripsina muestran comportamiento irregular, presentando la variedad ombligo café la menor cantidad de inhibidores, y el frijol negro presentando la mayor cantidad aun después del proceso de germinación.
- No se observa relación directa entre la digestibilidad y los factores tóxicos, aunque en algunos casos se observa una disminución estadísticamente significativa en los factores tóxicos.

7. LITERATURA CITADA

- 1) Alizadeh, H., Leung, D.W.M. y Edwards, Y. (2012). Changes in trypsin inhibitory activity of developing seed parts and pod red kidney bean. *Agronomy New Zealand*, 42: 171-180.
- 2) Ayet, G., Burbano, C., Cuadrado, C., Pedrosa, M., Robredo, L., Muzquiz, M., de la Cuadra, C., Castaño, A. y Osagie, A. (1997). Effect of germination, under different environmental conditions on saponins, phytic acid and tannins in lentils. *Journal Science Food Agricultural*, 74: 273-279.
- 3) Badui, S. (1994). *Química de los Alimentos*. México D.F. Alhambra Mexicana 3ª edición, pág. 125-139, 320-322, 372-373, 631-633
- 4) Casanueva E., Kaufer, H.M., Pérez, B. y Arroyo, P. (2001). *Nutriología Médica*. México, D. F. Editorial Médica Panamericana 2ª edición, pág. 452, 462-463, 482-483, 493-496.
- 5) Castresana, M.C., Serra, M.T., Rodríguez, J.F. y Tejerina, G. (1987). Distribution of lectin during the life cycle of ***Phaseolus vulgaris L.*** *Plant Science*, 48:79-88.
- 6) Celis, R., Peña, C., Luna, M. y Aguirre, J. (2010). Caracterización morfológica de las semillas y consumo de reservas durante la emergencia de plántulas de frijol (***Phaseolus vulgaris L.***) silvestre y domesticado. *Revista Facultad de Agronomía*, 27: 61-87.
- 7) Chaidez, L., Barrón, J., Canett, R., Cárdenas, J. y Galaviz, S. (2010). *Evaluación de la calidad protéica de nuevas*

*variedades de frijol (**Phaseolus vulgaris**) del Estado de Durango mediante metodología **in vivo***. Memorias del VII Congreso del Noreste y III Nacional de Ciencias Alimentarias y Biotecnología. Nutrición, Nutraceuticos y Productos Funcionales (pp. 1269-1284), Hermosillo Sonora, México.

- 8) Chaparro, D., Pismag, R., Elizalde, A., Vivas, N. y Erazo, C. (2010). Efecto de la germinación sobre el contenido y digestibilidad de proteína en semillas de amaranto, quinua, soya y guandul. Facultad de Ciencias Agropecuarias, 8(1): 35-42.
- 9) Dávila, M., Sangronis, E. y Granito, M. (2003). Leguminosas germinadas o fermentadas: alimentos o ingredientes de alimentos funcionales. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 53(4): 348-354.
- 10) Díaz, M.F., Torres, V., Gonzáles, A. y Noda, A. (2004). Biotransformations in the germination of *Vigna unguiculata*. Cuban Journal of Agricultural Science, 38(1): 87-92.
- 11) Díaz, M. F., Martín-Cabrejas M.A., González A., Torres V. y Noda A. (2007). Biotransformación de ***Vigna unguiculata*** durante el proceso de germinación. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 41(2): 168-174.
- 12) De Dios, E.A., Porrilla, P.Y. y Chaparro, D.C.C. (2009). Factores antinutricionales en semillas. Facultad de Ciencias Agropecuarias, 7(1): 45-54.
- 13) Doria, J. (2010). Generalidades sobre las semillas: conservación y almacenamiento. Cultivos Tropicales, 31(1): 74-85.

- 14) Elizalde, A., Porrilla, Y. y Chaparro, D. (2009). Factores antinutricionales en semillas. Facultad de Ciencias Agropecuarias, 7(1): 45-54.
- 15) Estrada, G., Guillén, G., Olivares, J.E., Díaz, C., Alvarado, X. y Sánchez, F. (2007). La transformación genética y genómica del frijol. Biotecnología, 14: 281-290.
- 16) Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO (1993). Manual de manejo poscosecha de granos a nivel rural. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/x5027s/x5027S00.htm#Contents>
Fecha de consulta: agosto 2014.
- 17) FAO (2007). Manual Técnico: Buenas Prácticas de Agricultura (BPA) en la producción de frijol voluble. Centro de investigación La Selva. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/010/a1359s/a1359s00.htm> Fecha de consulta: junio 2012.
- 18) FAO (2007). Manejo de malezas en leguminosas y hortalizas. Capítulo 14. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/T1147S/t1147s0i.htm> Fecha de consulta: noviembre 2011.
- 19) FAO (2009). Chef contra el hambre. Segundo recetario internacional. Legumbres. Fondo de Cultura Económica Chile S. A. Salesianos Impresores S. A. pp. 7-9, Chile.
- 20) Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas, FENALCE (2010). El cultivo del frijol, historia e importancia. El cerealista, edición mayo-junio, pp. 30-31.
- 21) Financiera Rural (2011). Monografía del frijol. Boletín disponible en:

http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documentos/Monografias/Monograf%C3%ADa-Frijol-2011_vc.pdf Fecha de consulta: 04/10/2012.

- 22) Fraile, M. E., García, S., Martínez B. y Slomianski, R. (2007). Nutritivas y apetecibles: conozca de leguminosas comestibles. Parte I. hojas, vainas y semillas. *Contactos*, 66: 27-35.
- 23) Frontela, C., Ros, G. y Martínez, C. (2008). Empleo de fitasas como ingrediente funcional en alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 58(3): 215-220.
- 24) Frühbeck, G., Alonso, R., Marzo, F. and Santidrian S. (1995). Modified method for the indirect quantitative analysis of phytate in foodstuff. *Analytical Biochemistry*. 225: 206-212.
- 25) Garcíafigueroa, Y. (1998). Desarrollo de una metodología cuantitativa para la determinación de lectinas en frijoles y su correlación con su toxicidad subaguda. Tesis de la Facultad de Química, UNAM, México, D.F.
- 26) González Paredes P. (2001). Efecto del procesamiento con calor sobre la cuantificación de lectinas de frijol y su toxicidad remanente. Tesis, Facultad de química, UNAM, México D. F.
- 27) Harbone, J. B., Boulter D., Turner, B. L. (1971). *Chemotaxonomy of the leguminosae*. Academic Press. pp. 1-7, 16, 367-371. London.
- 28) Horwitz, W. (2005). *Official methods of analysis of the Association Official Analytical Chemists*. Published of AOAC International, 16th edition, chapter 12,p. 7; chapter 45, pp. 78.
- 29) Hotz, C. y Gibson, R. S. (2007). Traditional food-processing and preparation practices to enhance the bioavailability of

- micronutrients in plant-based diets. *Journal of Nutrition*, 137(4):1097-1100.
- 30) Jane, W. y Triana, T. (1994). Soluble and insoluble Fe, Zn, Ca, and Phytates in foods commonly consumed in northern Mexico. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 2204-2209.
- 31) Kakade, M., Rackis, J., Mc. Ghee, J. y Puski, G. (1974). Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. *Cereal Chemistry*, 51: 376-382.
- 32) Karuppanapandian, T., Karupudurai, T., Sinha, P.B., Haniya, A.M.K. y Manoharan, K. (2006). Phylogenetic diversity and relationships among cowpea (***Vigna unguiculata L. Walp***) landraces using random amplified polymorphic DNA markers. *General and Applied Plant Physiology*, 32(3-4): 141-152.
- 33) Khatoon, N. y Prakash, J. (2006). Nutrient retention in microwave cooked germinated legumes. *Food Chemistry*, 97:115-121.
- 34) Lagunes-Espinoza, L. del C., Gallardo-López. H., Becerril-Hernández, H. y Bolaños-Aguilar, E.D. (2008). Diversidad cultivada y sistema de manejo de ***Phaseolus vulgaris*** y ***Vigna unguiculata*** en la región de la Chontalpa, Tabasco. *Revista Chapingo serie Horticultura*, 14(1): 13-22.
- 35) Lallana, V., Elizalde, J. y García, L. (2005). Germinación y latencia de semillas y yemas. Cátedra de fisiología vegetal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Entre Ríos. N° 11 pp. 2-20; Oro Verde, Paraná.
- 36) Latournerie, M.L., De la Cruz, Y.M., Tuxill, J., Mendoza, E., Arias, R.L.M. y Chávez, S.J.L. (2005). Traditional systems of

- seed bean and squash storage in Yaxcaba Yucatán. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 28(1): 47-53.
- 37) Lucas, B. y Sotelo, A. (1993). A useful modification of the haemagglutination method for screening of lectins in legume seeds. *2th International Workshop on ANFs. In legume seeds. EAAP Publication No. 70*, pp.71-74.
- 38) López, G.C.M. y Bressani, R. (2008). Uso de cowpea (***Vigna unguiculata***) en mezclas con frijol común (***Phaseolus vulgaris***) en el desarrollo de nuevos productos alimenticios. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 58(1): 71-80.
- 39) Martínez, B., Ibáñez, V. y Rincón, F. (2002). Ácido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 52(3): 219-231.
- 40) Medina, F., Chang, W., Bracho, J., Mann, M. y Esparza, D. (1996). Efecto de la edad y el genotipo sobre el crecimiento del área foliar en el frijol (***Vigna unguiculata (L) Walp.***). *Revista Facultad de Agronomía*, 13: 61-72;
- 41) Mederos, Y. (2006). Indicadores de la calidad en el grano de frijol (***Phaseolus vulgaris***). *Cultivos Tropicales*, 27(3): 55-52.
- 42) Miquilena, E. y Higuera, A. (2012). Evaluación del contenido de proteína, minerales y perfil de aminoácidos de harinas de ***Cajanus cajan, Vigna unguiculata y Vigna radiata*** para uso en la alimentación humana. *Revista Científica UDO Agrícola*, 12(3): 730-740.
- 43) Nwokolo, E. y Smart, J. (1996). Food and feed from legumes and oilseeds. First edition. Ed. Chapman & Hall. Pp. 5, 6, 8, 9, 229-239; London.

- 44) Osman, M.A. (2007). Effect of different processing methods, on nutrient composition, antinutritional factors, and *in vitro* protein digestibility of *Dolichos Lablab* Bean [*Lablab purpureus* (L) Sweet]. *Pakistan Journal of Nutrition*, 6(4): 299-303.
- 45) Polhill, R.M. y Raven, P.H. (1978). *Advances in legume systematic. Part 1.* Royal Botanic Gardens, Kew Publishing. pp. 1,27, 55, 191-.203.q
- 46) Ramos De Vega, M. y Sangronis E. (2006). Influencia de la germinación en la composición de ***Phaseolus vulgaris*** y ***Vigna sinensis***. *Agronomía Tropical*, 56(4): 531-537.
- 47) Reyes, E., Padilla, L., Pérez, O. y López, P. (2008). Historia, naturaleza y cualidades alimentarias del frijol. *Revista Investigación Científica*, 4(3): 1-21.
- 48) Rivas-Vega M.E., Goytortúa-Bores, J. M., Ezquerro-Brauer, M.G.L., Salazar-García, E., Cruz-Suárez, L. E., Nolasco, H. y Civera-Cerecedo, R. (2006). Nutritional value of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) meals as ingredients in diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). *Food Chemistry*, 97: 41.
- 49) Rodríguez-Blanco, L. (2011). Efecto de la germinación sobre el contenido nutrimental y factores antinutricionales de leguminosas de consumo humano (Informe Técnico Final UJAT-EXB-130). *División Académica de Ciencias Agropecuarias, UJAT*. Villahermosa Tabasco, México.
- 50) Rodríguez-Blanco, L., Miranda-Cruz, E. y Hernández-Sánchez, L. (2010a). Prototipo: Germinadora para muestras analíticas. *Cuerpo Académico Biotecnología y Calidad Alimentaria* (En

consolidación). *División Académica de Ciencias Agropecuarias, UJAT*. Villahermosa Tabasco, México.

- 51) Rodríguez-Blanco, L., Miranda-Cruz, E. y Hernández-Sánchez, L. (2010b). Prototipo: Secador de baja temperatura. Cuerpo Académico Biotecnología y Calidad Alimentaria
- 52) Rodríguez, M.V., Riquelme, B., Valverde, J. y Gattuso, S. (2004). Caracterización del efecto aglutinante de lectinas de la familia de las fabáceas sobre los eritrocitos humanos mediante el análisis de imágenes. *ANALES AFA*, 16: 247-248.
- 53) SAGARPA (2012). Estiman duplicar producción de frijol en 2012. Boletín disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/Paginas/2012B393.aspx> Fecha de consulta: 29/09/2012.
- 54) Sangronis, E., Machado, C. y Cava, R. (2004). Propiedades funcionales de las harinas de leguminosas (***Phaseolus vulgaris*** y ***Cajan cajan***) germinadas. *Interciencia*, 29(2): 80-85.
- 55) Secretaría de economía. (2012). Análisis de la cadena de valor del frijol. Disponible en: http://www.economia.gob.mx/files/comunidad_negocios/industria_comercio/analisis_cadena_valor_frijol.pdf Fecha de consulta: 28/05/2012.
- 56) Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera, SIAP, (2005). Situación actual y perspectiva del frijol en México 2000-2005. Documento disponible en: http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/EstadisticaDerivada/ComercioExterior/Estudios/Perspectivas/Frijol00-05.pdf Fecha de consulta: 09/11/2011.

- 57) Sotelo, A., Mendoza, J. y Argote R.M. (2002). Contenido de ácido fítico en algunos alimentos crudos y procesados. Validación de un método colorimétrico. Revista de la Sociedad Química de México, 46(4): 301-306.
- 58) Universidad Politécnica de Valencia (2014). Parte III: tema 17: Germinación de semillas. Documento disponible en:
http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas/tema_17.htm
Fecha de consulta: 03/10/2014.
- 59) Valle, P. y Lucas, B. (2000). Toxicología de alimentos. Instituto Nacional de Salud Pública. Centro Nacional de Salud Ambiental. pp. 60-66, 72-77, 93; México D. F.
- 60) Van der Heijden, K., Younes, M., Fishbein, L. y Millers, S. (1999). International food safety handbook (Science, International regulation and control). Marcel Dekker Inc. pp. 369-380; New York.
- 61) Vidal-Valverde C., Frías J., Estrella, I., Gorospe, M.J., Ruiz R. y Bacon, J. (1994). Effect of processing on some antinutritional factors of lentils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42: 2291-2295.
- 62) Wagner, J.R. y Sobral, P.A. (2011). Estabilidad de emulsiones preparadas con proteínas de sueros de soja. Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay, 6: 21-23.