

7-365
e.1



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA



INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTROAMERICA Y PANAMA
(INCAP)

**EFFECTO DE LOS POLIFENOLES SOBRE LA
DIGESTIBILIDAD IN VIVO E IN VITRO
DE LA PROTEINA DEL FRIJOL**

DEIDAMIA RODRIGUEZ DE MORA



**CENTRO DE ESTUDIOS SUPERIORES EN NUTRICION Y CIENCIAS DE ALIMENTOS
(CESNA)**

CURSO DE POSTGRADO EN CIENCIAS Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Guatemala, Noviembre de 1982.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA
INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTRO AMERICA Y PANAMA

EFECTO DE LOS POLIFENOLES
SOBRE LA
DIGESTIBILIDAD IN VIVO E IN VITRO DE LA PROTEINA
DEL FRIJOL

T E S I S

DEIDAMIA RODRIGUEZ DE MORA

Previo a optar al grado de

MAESTRO

(Magister-Scientificae)

CURSO DE POSTGRADO EN CIENCIAS Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

CENTRO DE ESTUDIOS SUPERIORES EN NUTRICION Y CIENCIAS DE ALIMENTOS
(CESNA)

Guatemala, noviembre de 1982

INCAP T-365

**JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA
DE LA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

Decano	Dr. José Héctor Aguilar
Secretario	Lic. Lionel Carrillo Reeves
Vocal Primero	Lic. Luis Fernando Girón
Vocal Segundo	Lic. Francisco Monterroso
Vocal Tercero	Dr. Mario Roberto Molina
Vocal Cuarto	Br. Sergio Molina

COMITE INTERISTITUCIONAL DEL CESNA

Director del CESNA

Dr. Luis Octavio Angel

**Decano de la Facultad de Ciencias
Médicas**

Dr. Mario René Moreno Cambra

**Decano de la Facultad de Ciencias
Químicas y Farmacia**

Dr. José Héctor Aguilar

**Decano de la Facultad de Medicina
Veterinaria y Zootecnia**

Dr. Luis Felipe Rosales

Director de la Escuela de Nutrición

Dr. Luis Octavio Angel

**Directora del Curso de Postgrado en
Salud Pública con Enfoque en Nutri-
ción Materno-Infantil**

Dra. América de Fernández

**Director del Curso de Postgrado en
Bioquímica y Nutrición Humana**

Dr. Oscar Pineda

**Director del Curso de Postgrado en
Ciencias de Alimentos y Nutrición
Animal**

Dr. J. Edgar Braham

CÓMITE ASESOR DE TESIS

Dr. Roberto Gómez Brenes

Dr. Luiz G. Elías

Dr. Ricardo Bressani

Lic. Rafael Flores

Dr. Mario R. Molina

**"No hay satisfacción mayor que las
privaciones que nos imponemos para
la dicha de los que amamos."**

Séneca

A MIS HIJOS

Querube de los Angeles

Juan Pablo y

David Gustavo

A MIS PADRES

Atenógenes Rodríguez C.

María Trinidad R. de Rodríguez

AGRADEZCO DE UNA MANERA MUY ESPECIAL

AL DR. ROBERTO GOMEZ BRENES

AL LIC. RAFAEL FLORES

**por la orientación, dedicación, el constante
interés y estímulo en mi formación profesional**

AGRADECIMIENTO

- A los miembros del Comité Asesor de esta tesis por su orientación e invaluable ayuda**
- Al Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá**
- A las Comunidades Económicas Europeas**
- A la Universidad de San Carlos de Guatemala**
- A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia**
- Al Ministerio de Salud de Panamá**
- A mis profesores, por sus enseñanzas y amistad**
- A mis compañeros, en especial a la Lic. Mayela Bautista J.**
- A la Lic. Haydée J. de Angúlo cuyo ejemplo y dedicación al trabajo me ha impulsado a la superación en mi formación profesional**
- Al personal de la División de Ciencias Agrícolas y de Alimentos, reconociendo que sin su colaboración no hubiera sido posible la realización de este trabajo**
- A Carlos E. Amezquita, María Antonieta Rottman, Audél López y Carlos Calderón, por su amistad y constante apoyo**
- A la Familia Carías por el apoyo moral brindado durante mi estancia en Guatemala**

CONTENIDO

	pag.
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	3
III. OBJETIVOS	25
IV. JUSTIFICACION	26
V. MATERIALES Y METODOS	27
VI. RESULTADOS Y DISCUSION	34
VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	51
VIII. RESUMEN	53
IX. BIBLIOGRAFIA	57
X. APENDICES	67

LISTA DE CUADROS

- | | | |
|--------|----|--|
| CUADRO | 1 | Composición de las raciones utilizadas en el estudio de digestibilidad con ratas |
| CUADRO | 2 | Resumen estadísticos de los resultados de polifenoles totales (expresados como ácido tánico) por el Método de Folin-Denis |
| CUADRO | 3 | Prueba de Bartlett- Método de Folin-Denis; taninos expresados como microgramos de ácido tánico / ml de extracto |
| CUADRO | 4 | Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis- Método de Folin-Denis |
| CUADRO | 5 | Prueba de Bartlett- Método de Hagerman-Butler expresados como microgramos de ácido tánico / ml de extracto |
| CUADRO | 6 | Análisis de Varianza- Método de Hagerman-Butler |
| CUADRO | 7 | Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis |
| CUADRO | 8 | Resumen estadístico de los resultados de la determinación de taninos (expresados como ácido tánico) por el Método de Hagerman-Butler en frijoles blancos, negros y rojos |
| CUADRO | 9 | Ecuaciones de regresión entre el Método de Folin-Denis y Hagerman-Butler |
| CUADRO | 10 | Cambios de polifenoles en frijoles crudos durante el almacenamiento a 5 ^o C, expresados como ácido tánico (g %) |
| CUADRO | 11 | Cambios de compuestos polifenólicos en frijoles crudos y cocidos y secados con caldo y sin caldo |
| CUADRO | 12 | Contenido de nitrógeno y proteína cruda de los materiales utilizados en los ensayos de digestibilidad |
| CUADRO | 13 | Ingesta y excreción de nitrógeno y porcentaje de digestibilidad aparente |

- CUADRO 14** Análisis de Varianza de dos vías- Digestibilidad in vivo
- CUADRO 15** Contenido de polifenoles totales y porcentaje de digestibilidad aparente en dietas utilizadas en el ensayo con ratas
- CUADRO 16** Resultados del análisis estadístico para medir la reproducibilidad del método de digestibilidad in vitro en materias primas
- CUADRO 17** Resultados del porcentaje de Digestibilidad in vivo e in vitro en dietas
- CUADRO 18** Análisis de Varianza de dos vías - Digestibilidad in vitro
- CUADRO 19** Porcentaje de hidrólisis por la actividad de la tripsina en frijoles crudos y frijoles cocidos con caldo y sin caldo
- CUADRO 20** Ecuación de regresión entre la Digestibilidad in vivo e in vitro
- CUADRO 21** Digestibilidad estimada in vivo y su comparación con el valor de digestibilidad in vivo

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Preparación de frijol cocido
- Figura 2 Curva estándar de ácido tánico- Método de Folin-Denis
- Figura 3 Curva estándar de ácido tánico- Método de Hagerman-Butler
- Figura 4 Extracción de taninos en leguminosas
- Figura 5 Procedimiento de Digestibilidad in vitro
- Figura 6 Línea de regresión entre método de Folin-Denis y Hagerman-Butler para cada color de frijol
- Figura 7 Línea de regresión entre método de Folin-Denis y método de Hagerman-Butler para todos los colores de frijol
- Figura 8 Línea de regresión entre método de Folin-Denis y método de Hagerman-Butler para los valores de frijoles negros y rojos
- Figura 9 Interacción entre color y tratamiento sobre la digestibilidad in vivo
- Figura 10 Línea de regresión entre la Digestibilidad aparente y el contenido de polifenoles totales en 100 g de dieta
- Figura 11 Interacción entre color y tratamiento sobre la digestibilidad in vitro
- Figura 12 Curva de regresión cuadrática entre digestibilidad in vitro e in vivo

I. INTRODUCCION

Las leguminosas, al igual que los cereales, constituyen una importante fuente de proteínas en el mundo, principalmente en aquellas áreas en que, por razones culturales, religiosas o económicas, la disponibilidad y consumo de proteína de origen animal es limitada.

De las leguminosas, el frijol común (Phaseolus vulgaris) ocupa un lugar predominante entre los alimentos de mayor consumo, tanto en las zonas rurales como en las urbanas. Sin embargo, la eficiencia de utilización de sus proteínas esta limitada por su deficiencia en aminoácidos azufrados, la presencia de factores antinutricionales y su baja digestibilidad.

Se han formulado diversas hipótesis para explicar la baja digestibilidad de los frijoles lo cual hasta la fecha ha sido motivo de controversia. Posiblemente, los inhibidores enzimáticos como los taninos o polifenoles pueden ser parcialmente responsables de esta digestibilidad, pero estos compuestos en las leguminosas no han sido investigados profundamente, y hay pocos estudios en animales que indiquen que ellos afecten directamente la calidad nutricional. Sin embargo, hay evidencias que hacen pensar que son los polifenoles los que contribuyen más a la baja digestibilidad de la proteína del frijol.

La mayor dificultad que existe para estudiar a fondo estos compuestos en leguminosas radica en los métodos analíticos disponibles para su determinación,

los cuales no son específicos (76) para polifenoles, complicándose la situación debido a la tendencia de estos compuestos a oxidarse durante la preparación de la muestra.

Por otro lado, el estudio de la digestibilidad en ratas con dietas a base de leguminosas es costoso y requiere algún tiempo. Esto ha motivado a desarrollar métodos más rápidos y económicos como la digestibilidad in vitro con enzimas que permitan obtener información similar en corto tiempo.

Dada la importancia de las leguminosas en las dietas de la población latinoamericana y la poca información que existe sobre el efecto de los polifenoles sobre la digestibilidad de sus proteínas, se consideró de interés realizar este trabajo con el propósito de identificar aquella metodología analítica que fuera más apropiada para el estudio de los polifenoles, comparando al mismo tiempo su efecto sobre la digestibilidad proteínica in vivo e in vitro.

II. REVISION DE LITERATURA

Caracterización Química del Frijol

El frijol común (Phaseolus vulgaris) constituye una de las leguminosas más importantes para la nutrición humana en poblaciones de América Latina, Africa y Asia (12, 13, 59). Estudios realizados por Tandon y col (106) indican que el frijol representa aproximadamente un 30 % de la dieta de la población rural en América Latina.

Varios investigadores han demostrado que, desde el punto de vista de la composición química, las leguminosas poseen un alto potencial nutricional comparado con otros granos que constituyen la base de la alimentación de gran número de países latinoamericanos y de la India (13, 34, 77, 78). Su contenido proteínico varía desde 18 hasta 30 % del peso total del grano (5, 13, 36, 40, 57, 59, 62). Dicha proteína se halla localizada principalmente en los cotiledones y en los ejes embrionarios de la semilla (10, 55, 59, 99).

La proteína está constituida por albúmina, globulinas, prolaminas y glutelinas; de éstas, las globulinas se encuentran en mayor proporción. En relación a la composición de aminoácidos, ésta se halla sujeta a importantes variaciones entre especies y variedades de la misma especie (13). En la mayoría de leguminosas, la lisina está presente en cantidades próximas o que sobrepasan el nivel establecido por la "proteína de referencia", lo que indica que son fuen-

te de este aminoácido esencial (59). Por otro lado, tienen como aminoácido limitante a la metionina (33, 36, 57-59) cuya deficiencia es responsable en gran parte del crecimiento limitado de las ratas alimentadas con leguminosas. Aparte de la metionina, el frijol presenta cantidades limitantes de leucina y triptófano, en relación al Patron de Referencia de la FAO (13, 36, 53).

La fracción de carbohidratos es la más abundante en las semillas de leguminosas, representando aproximadamente del 60 al 65 % del peso del grano (89). Contienen de 3 a 8 % de fibra cruda y de 2.5 a 4.2 % de cenizas (13). Se les considera, además, una fuente de tiamina, riboflavina y niacina (2, 3, 26, 28, 58, 59).

Los frijoles son semillas con un contenido lipídico relativamente bajo, variando su concentración entre 1 y 6 % del peso total del grano. Como constituyente de la grasa se encuentra el ácido palmítico, linoleico y una pequeña cantidad de ácido esteárico y oleico. No obstante, poseen un porcentaje alto de ácidos esenciales (13, 40, 79). Se ha pensado que reacciones de oxidación y polimerización de estos ácidos pueden ser los responsables de su permeabilidad al agua, afectando entonces el tiempo de cocción (104).

Valor Nutritivo

El alto valor nutricional que sugiere la composición química de los frijoles es afectado principalmente por a) la presencia de factores antinutriciona-

les que inciden negativamente en la digestibilidad de sus proteínas y b) los aminoácidos azufrados que limitan la calidad de su proteína.

Con relación a la baja digestibilidad, se ha indicado como responsables a los inhibidores enzimáticos, hemaglutininas, algunas fracciones proteínicas resistentes a la hidrólisis enzimática, carbohidratos indigeribles, taninos o polifenoles, etc., siendo este aspecto motivo de controversia (19, 35, 73, 97, 105).

En general, la presencia de factores tóxicos o antinutricionales en la semilla de leguminosa se ha estudiado no sólo desde el punto de vista de toxicidad propiamente dicho, sino también como causa del bajo valor nutritivo.

Estudios e investigaciones realizadas sobre estas sustancias datan de principio de siglo. En 1894, Osborne (85) haciendo ensayos de solubilidad extrajo lo que él denominó toxoalbúmina. Desde entonces, se ha encontrado una gran cantidad de sustancias y factores tóxicos relacionados con la semilla de leguminosas que afectan directamente la digestibilidad de su proteína.

Innumerables estudios demuestran que estos factores son, en mayor o menor grado, susceptibles a la acción del calor (63, 81). La cantidad y calidad de estos factores antinutricionales difieren en gran medida entre variedades y aun entre especies de leguminosas.

De todos estos factores los más estudiados y conocidos han sido las hemaglutininas y los inhibidores enzimáticos.

Hemaglutininas

Son sustancias de naturaleza proteica de acción aglutinante frente a eritrocitos de diferentes especies animales. Se ha demostrado su efecto sobre la eficiencia de utilización de la proteína debido a que el cambio en el peso de los animales experimentales es inverso a la actividad aglutinante (61, 63). Las lectinas o hemaglutininas reaccionan con receptores específicos de la mucosa gastrointestinal, bloqueando la absorción de nutrimentos (68).

Las aglutininas del frijol son especialmente resistentes a la digestión enzimática en el tracto digestivo ya que se ha comprobado que las heces de animales que han consumido dietas con frijol crudo presentan una acción hemaglutinante.

Elías y col. (35) han demostrado que la actividad hemaglutinante presente en tres variedades de Phaseolus vulgaris está localizada en el endospermo y es anulada después de someter los frijoles a cocción a 121°C por 30 minutos y 16 libras de presión. Esto último ha sido confirmado por Bressani (17), Fernández (38), Liener (67) y Ordóñez (84).

Inhibidores Enzimáticos

Los inhibidores enzimáticos tienen como principal efecto detener el crecimiento en animales experimentales lo cual ha sido explicado por diferentes mecanismos: a) Inhibición de la proteólisis en el tubo digestivo (61), b) hi-

peritrofia del páncreas por aumento de la actividad secretoria de este órgano (68) y c) pérdidas endógenas de aminoácidos esenciales por la secreción pancreática aumentada (68).

En 1949, Tauber y col. (107) lograron aislar y purificar una proteína (globulina) de frijol de Lima (Phaseolus limensis) que era capaz de inhibir poderosamente la acción de la tripsina y en forma moderada la de la quimiotripsina siendo, además, excepcionalmente estable al calor.

Seidl y col. (97) aislaron una globulina de Phaseolus vulgaris (Kidney bean) diferente a los inhibidores de tripsina tradicionales la cual se distinguió por ser resistente a la acción hidrolítica de seis proteasas: pepsina, quimotripsina, tripsina, ficina, huraina y subtilina. Después de desnaturalizar la proteína por acción del calor aún retenía su acción inhibitoria. Seidl la denominó "Inhibidor de proteinasa inespecífico". Puesto que esta fracción constituye parte significativa del total de las proteínas del Kidney bean, los autores sugieren que esa globulina en particular sería responsable de la baja digestibilidad de dichos granos.

En las leguminosas crudas, los inhibidores de proteasas y las hemaglutininas podrían ser la causa de la baja digestibilidad (61, 63). Sin embargo, éstos no serían los responsables en los frijoles cocidos, ya que son termolábiles (17, 20, 35, 52, 63, 84).

Taninos y Polifenoles

Bressani y Elías (14) sugieren que hay dos tipos de actividad inhibitoria de la tripsina: a.- Los verdaderos inhibidores de tripsina que son termolábiles y b.- Los inhibidores de tripsina termorresistentes que probablemente son taninos o polifenoles.

Los taninos han sido clasificados en dos grupos basados en su estructura: taninos hidrolizables y taninos condensados. De los dos, los condensados son los más ampliamente distribuidos en las plantas (96).

Los taninos hidrolizables se desdoblán en glucosa y ácido gálico, por acción enzimática y en presencia de ácidos diluidos. Los taninos condensados son resistentes a la hidrólisis enzimática y por acción de los ácidos liberan catequinas y antocianinas (102).

Los vegetales contienen cantidades más o menos altas de compuestos fenólicos de distintos tipos (43). La función exacta de estos compuestos en plantas no está aún clara. Aunque, Suchorukow (103), en 1958, sugiere que la acción de los taninos es como un tipo de buffer o solución amortiguadora redox en la célula. White (111) reveló que los verdaderos taninos se encuentran raramente metabólicamente activos en los tejidos y considera que su papel es como protector de las plantas contra ataques microbianos y de insectos. Según Singleton y Kratzer (100) son parecidos a las glándulas de gossipol en la semilla de algo-

dón.

Su importancia radica en sus efectos adversos sobre el crecimiento de animales y sobre la utilización de la proteína así como de la energía metabolizable de forrajes (42, 73, 76, 113).

Los pigmentos vegetales, como las antocianinas y xantinas, están relacionados con estos compuestos fenólicos. En el frijol común (Phaseolus vulgaris) se ha encontrado una relación entre el color de la cáscara y el contenido de compuestos fenólicos (14, 38).

Los taninos tienen la propiedad, conferida por su estructura polifenólica, de formar complejos solubles e insolubles con las proteínas (109). El complejo es formado entre los grupos hidroxilo (-OH-) del polifenol y los grupos (-C=O-) de las uniones peptídicas de las proteínas (41, 44, 109).

La cantidad de formar complejos insolubles aumenta a medida que la cantidad de grupos hidroxilos del polifenol aumenta.

Se ha encontrado que una molécula de tanino puede unirse a dos o más grupos peptídicos mediante enlaces cruzados (105), y que enzimas tales como la tripsina, amilasa y lipasa, son inhibidas por el ácido tánico condensado, al formarse complejos entre éste y las enzimas. A esto se debe el efecto detrimental de los taninos, ya que las proteínas al ser precipitadas no pueden ser absorbidas y, por ende, el crecimiento de los animales disminuye (27, 110).

Esta inhibición enzimática demostró ser del tipo no competitivo por Goldstein y Swain (43) y posteriormente por Tamir y Alumot (105). El grado de inhibición dependerá de la afinidad del tanino para unirse a determinada enzima, basándose en el hecho de que diferentes taninos poseen tendencias a unirse con diferentes proteínas (44).

Se ha encontrado también que las enzimas inhibidas por los taninos son reactivadas después de la adición de polivinil-pirrolidona (PVP), compuesto que tiene la propiedad de unirse a los taninos vegetales (105). El efecto benéfico del PVP se debe a que existe una competencia entre éste y la proteína para la unión con los taninos. El PVP se une a los taninos debido a que su estructura guarda cierta similitud con el enlace peptídico (70).

La inhibición de las enzimas digestivas (tripsina, amilasa y lipasa) por taninos y la reactivación subsecuente con la adición de PVP ha sido estudiado por Tamir y Alumot, quienes encontraron que para la tripsina y la lipasa se obtenía una reactivación casi completa del complejo enzima-inhibidor con la adición del PVP (105).

Los estudios del efecto de los taninos en animales experimentales, han concluido que se observa una disminución del crecimiento de éstos, al ser incorporados dichos compuestos a sus dietas (27, 41, 42, 44).

Glick y Joslyn (41) observaron tanto una reducción en ingesta de alimentos

como una depresión del crecimiento. Encontraron que adicionando un 40 % de caseína y 5 % de ácido tánico a una dieta casi dobló el aumento del peso comparado con dietas conteniendo 20 % de caseína y 5 % de ácido tánico aun cuando se supone que una dieta con 20 % de caseína es óptima para el crecimiento. Concluyeron que el efecto del ácido tánico sobre el crecimiento era principalmente debido a una retención de nitrógeno, más bien que a una disminución en la ingesta alimenticia. En otro estudio (42) los mismos autores observaron los efectos del ácido tánico y compuestos relacionados sobre la absorción de proteínas en ratas.

El nivel de excreción de nitrógeno fecal fue mayor en animales que ingerían dietas adicionadas de 5 % de taninos condensados de quebracho; las dietas con 8 % de ácido gálico o 2 % de catequina tenían menor efecto sobre la excreción de nitrógeno fecal. El estudio de las enzimas proteolíticas del contenido intestinal y pancreático reveló que la proteína endógena constituye la mayor proporción de nitrógeno fecal y, además, las ratas habían desarrollado hipertrofia pancreática.

Las investigaciones de Tamir (105) demostraron que las ratas experimentaban una significativa depresión en el crecimiento cuando eran alimentadas con dietas a las que se les adicionaban extracto de algarrobo verde (taninos condensados) y encontraron altos niveles de nitrógeno insoluble en el contenido estoma-

cal, intestinal y en el colón, sugiriendo que este nitrógeno era de origen dietario.

La relación de inhibidores de tripsina y taninos ha sido estudiada por E-lías y col. (35), quienes encontraron que en los cotiledones de muestras de frijol común (Phaseolus vulgaris) con diferente color de cáscara, hay una mayor concentración de los verdaderos inhibidores de tripsina (termolábiles) y en las cáscaras hay una mayor concentración de inhibidores de tripsina estables, debido a la naturaleza de la pigmentación. Las cáscaras de los frijoles negros y rojos demostraron una mayor actividad del tipo termoestable que las cáscaras de frijoles blancos, lo cual correlaciona aún más con el mayor contenido de taninos en los frijoles coloreados.

De igual manera, los frijoles cocidos y sus caldos demostraron una actividad inhibitoria de tripsina del tipo termoestable. Se obtuvo una correlación altamente significativa entre la concentración de taninos en las cáscaras y la actividad inhibitoria de tripsina. Al final, los autores sugirieron que el color de la cáscara estaba relacionada con la calidad de los frijoles (35). Esto también fue demostrado por Fernández (39).

Metodología para la Determinación de Taninos o Polifenoles

Considerando que los taninos o polifenoles tienen importancia desde el punto de vista nutricional en leguminosas y cereales, su estudio se hace dificultoso

so por la tendencia de muchos fenoles a oxidarse durante la preparación de la muestra para la extracción de éstos.

Los métodos convencionales de secado de forrajes pueden causar cambios oxidativos en los taninos (43). Cuando agentes reductores se han adicionado a los solventes de extracción se ha obtenido una producción alta de compuestos fenólicos (64). Bate-Smith (7) encontró dificultades en la extracción de taninos de hojas de algunas especies de leguminosas herbáceas tal como Onobrychis viciifolia, pero la extracción mejoró al moler las muestras.

La molécula de taninos, por la presencia de grupos polares, es soluble en solventes polares como el agua e insoluble en solvente no polares como el cloroformo. Es ligeramente soluble en tipos de solventes intermedios como el acetato de etilo (96).

La extracción de taninos con mezclas acuosas de solventes orgánicos dependen del arreglo que tengan los enlaces del sustrato para poder competir con los sitios de las moléculas del solvente. La liberación de un tanino ligado se cree que depende del número de enlaces involucrados y debe continuar en orden de aumento de su peso molecular (76).

La relación de solvente-soluto a solvente-resistente en la extracción de taninos está determinada por la naturaleza de la concentración del solvente orgánico (76).

En los últimos años se han desarrollado una serie de métodos para evaluar los niveles relativos de compuestos polifenólicos en cereales y forrajes, los cuales han sido aplicados a leguminosas.

Entre los ensayos químicos más comúnmente utilizados para la estimación espectrofotométrica de taninos están: 1.- El método descrito por Burns en 1963 (24) que utiliza el reactivo de Folin-Denis (reducción del tungstato fosfomolibdico de sodio), que mide polifenoles totales, pero este reactivo también reacciona con otros constituyentes de las plantas tales como xantinas, aminoácidos y proteínas (76). 2.- El método de azul de Prusia descrito por Price y Butler en 1977 (87) modificado por Budini y col. (22), se basa en la formación de un complejo coloreado a partir de la adición de cloruro férrico y ferricianuro de potasio a extractos acuosos que contienen taninos. Este método es sensible y rápido para la determinación colorimétrica de fenoles totales, el cual puede ser aplicado a diferentes productos. La mayor ventaja es que los colores originales de los extractos no interfieren en las diluciones utilizadas. La más revelante desventaja es que éste o cualquier método redox carece de especificidad (22, 87). 3.- Los métodos de vainillina-ácido clorhídrico descrito por Burns en 1971 (25), modificado por Maxson y Rooney en 1972 (75), y vainillina-HCl con blancos de muestras y otras modificaciones descrito por Price y cols., en 1977 (88).

El ensayo de vainillina-HCl (Burns, 1971, (25)) es ampliamente utilizado para la medida cuantitativa de taninos condensados (o sus componentes monoméricos) en grano de sorgo. La principal ventaja de este método es su especificidad para un rango muy limitado de flavonoles y dihidrochalconas que tienen un simple enlace en la posición 2,3, y un grupo hidroxilo libre en la posición meta en el anillo beta (93), en contraste a métodos redox, por ejemplo es el de Folin-Denis (Burns, 1963) o Azul de Prusia (Price y Butler, 1977), que detectan cualquier fenol presente.

Sin embargo, Maxson y Rooney (75) evaluaron siete métodos para la determinación de taninos y llegaron a la conclusión de que los métodos de vainillina-HCl modificados tienen variación de día a día.

Los métodos de cromatografía y electroforesis también han sido utilizados para estudiar las características estructurales, químicas y de adsorptividad de los polifenoles (23).

Los ensayos bioquímicos basados en la habilidad de los taninos o polifenoles de precipitar proteínas son: 1.- Hemoanálisis, Bate-Smith, 1973 (7), basado en la precipitación de hemoglobina por los taninos. El inconveniente de este método es que utiliza sangre fresca recién sacada, y las saponinas y otros metabolitos de las plantas interfieren con el ensayo (Bate-Smith, 1977 (8)). 2.- Goldstein y Swain (43), 1965, sugirieron el método de la inhibición de la ac-

tividad de la beta-glucosidasa, pero los resultados del ensayo son difíciles de interpretar porque la relación entre la actividad enzimática y la formación del complejo insoluble no está aún bien establecida (45). 3.- Método de precipitación de proteína de Hagerman-Butler (45), está basado en la precipitación de la seroalbúmina bovina al ponerse en contacto con extractos metanólicos que contienen taninos. Este método es rápido y puede utilizarse tanto para taninos condensados como hidrolizables.

A pesar de toda esta metodología para la determinación de taninos ha prevalecido mucha confusión debido a que cada método es específico para un grupo (s) particular de polifenoles y se carece de un estándar adecuado. Además, los métodos de extracción y el tratamiento de las muestras afectan los valores analíticos obtenidos entre métodos. Esto ha hecho que las comparaciones cuantitativas de los niveles de taninos sean bastante difíciles (31).

Digestibilidad de la Proteína del Frijol

El grado al cual una proteína es utilizada es una función de su composición de aminoácidos y de su digestibilidad así como del requerimiento de aminoácidos del animal que ingiere la proteína. Los factores que afectan la utilización de la proteína por parte del organismo son: El grado al cual la proteína puede ser hidrolizada en el tracto digestivo, la utilización metabólica de los productos de la digestión (fracción absorbida) y la proporción de la

fracción absorbida que puede ser asimilada, es decir la fracción retenida.

La digestibilidad de la proteína se define como la cantidad de nitrógeno ingerido que es absorbido (82). Puede expresarse como un porcentaje:

$$\text{Digestibilidad} = \frac{\text{Nitrógeno ingerido} - \text{Nitrógeno fecal}}{\text{Nitrógeno ingerido}} \times 100$$

El valor así obtenido se denomina digestibilidad aparente, ya que parte del nitrógeno presente en las heces no se origina de la proteína a prueba sino que proviene de procesos metabólicos u otras fuentes como bacterias del tracto gastrointestinal, enzimas, células epiteliales, etc.. Para obtener la digestibilidad verdadera, es necesario determinar las pérdidas endógenas de la proteína estudiada cuando los animales en el ensayo ingieren una dieta libre de nitrógeno:

$$\text{Digestibilidad verdadera} = \frac{\text{Nitrógeno Ingerido} - (\text{N fecal} - \text{N endógeno})}{\text{Nitrógeno Ingerido}} \times 100$$

Los frijoles son difíciles de digerir y pueden dar origen a problemas digestivos; posiblemente, una de los factores que más afecta la utilización de las proteínas del frijol es su baja digestibilidad y hasta la fecha no se sabe con certeza si este efecto es debido a una descarga muy rápida del intestino, o a una resistencia de la proteína a la hidrólisis proteolítica de las enzimas gastrointestinales (2). Hay evidencia clara de que cuando se consumen estas leguminosas se presentan pérdidas significativas de nitrógeno en las heces (18).

Estudios realizados en niños alimentados con Phaseolus vulgaris en combi-

nación con otros alimentos como leche y maíz, demostraron que el nitrógeno fecal aumentó conforme la ingesta de nitrógeno de proteína de leche disminuyó. No todo el efecto debe atribuirse a la proteína del frijol, ya que ésta fue administrada conjuntamente con la de maíz. Sin embargo, las pérdidas de nitrógeno aumentaron y el frijol pudo ser responsable en cierto grado de dichas pérdidas (92).

Estudios con ratas han demostrado que al consumir frijol ocurre en el tracto intestinal un paso más rápido del alimento ingerido, demostrándose además que los causantes de este efecto eran cotiledones y no la cáscara del grano (49).

La baja digestibilidad de la proteína de las leguminosas de grano ha sido observada no solo entre especies, sino también entre variedades de una misma especie (58).

Es indudable que la digestibilidad mejora enormemente con la cocción (56); sin embargo, la digestibilidad del frijol cocido es todavía baja si se compara con las otras especies. Jaffé (58) encontró para el frijol negro una digestibilidad real de 76.8 % en tanto que para la soya este valor es de 86.4 %.

El género Vigna tiene una mejor digestibilidad que el Phaseolus. Vigna sinensis tiene niveles significativamente más bajos de inhibidores de tripsina que las especies Phaseolus. Aunque no se ha demostrado una correlación entre actividad de inhibidores de tripsina y digestibilidad de la proteína (19, 56) tal

actividad sí interfiere con el proceso proteolítico en el tracto gastrointestinal.

Las variaciones en la digestibilidad de la proteína de leguminosa de grano, es probablemente el resultado de varios factores que pueden ser inherentes a la semilla o ser el resultado del manejo y almacenamiento de la misma o de los procesos térmicos utilizados para preparar la semilla para evaluaciones biológicas (14). Los procesos térmicos dañan la proteína en términos de calidad. Por consiguiente, el tiempo de cocción es un factor que puede influir en la digestibilidad. La aplicación de calor puede ser interpretada como un doble efecto: primero, disminuye y elimina la actividad de los factores antinutricionales y segundo, aumenta la disponibilidad de aminoácidos de la proteína; el exceso de calor, sin embargo, disminuye la disponibilidad de los aminoácidos (98).

Estudios hechos por Molina y col. (80) muestran que los períodos de almacenamiento y largos tiempos de cocimiento de frijoles disminuyen la digestibilidad de sus proteínas, sin embargo, hay otros factores que influyen en ésta por lo que es absolutamente necesario estudiar más a fondo el problema de la baja digestibilidad del frijol (14).

Algunos estudios han sugerido que las leguminosas contienen fracciones de proteínas que son resistentes a la proteólisis, Jaffé y Hanning (62) encontraron que varias fracciones purificadas de proteínas del frijol eran resistentes a la

actividad hidrolítica de la pepsina y la papaína.

Como se mencionó anteriormente, Seidl y col. (97) informaron que una fracción globulínica de frijoles (Kidney bean) inhibía la actividad de las proteasas, aun después de severos procesos térmicos y era resistente a la acción de las enzimas proteolíticas. Por consiguiente, estos autores sugieren que la fracción globulínica es la responsable de la baja digestibilidad de la proteína total en semillas integrales molidas.

Contrario a este concepto, las globulinas totales aisladas de la variedad Rosinha-G2, exhibieron una digestibilidad alta de 80 - 90 %, que, por lo tanto, es mayor que la digestibilidad de las proteínas totales de la semillas (dato no publicado pero mencionado por Sgarbiere y col. (98)). La baja digestibilidad de la proteína del frijol de grano entero, según este mismo investigador, Sgarbiere (98), puede ser explicada por una o ambas de las siguientes aseveraciones:

- a.- Las proteínas que quedan en un residuo insoluble (que no se extraen con NaCl) que son de 20 a 30 % de la proteína total, son indigeribles disminuyendo, por consiguiente, la digestibilidad de la proteína cruda en todo el grano.
- b.- Las proteínas en las semillas molidas reaccionan con otros compuestos celulares en los tejidos formando compuestos indigeribles.

Por otro lado, los taninos o polifenoles también juegan un papel importante en la baja digestibilidad de la proteína del frijol.

Featherston (37) extrajo los taninos del grano de sorgo y estudió el efecto del sorgo (libre de taninos) en ratas y pollos. La digestibilidad de la proteína mejoró significativamente y, como respuesta, hubo un aumento en la ganancia de peso así como en la eficiencia. Un efecto contrario y un aumento en el peso de las heces se obtenía en animales que ingerían sorgo con alto contenido de taninos. Hay que señalar que el sorgo tiene mayor contenido de taninos condensados y los hidrolizables se encuentran en menor concentración.

A semejanza del sorgo, se ha demostrado que algunas leguminosas son ricas en taninos condensados y cuando se incluyen en las dietas de monogástricos influyen negativamente en la digestibilidad de la proteína.

Martin-Tanguy y cols. (74) estudiaron los taninos condensados en la semilla de Vicia faba L., concluyendo que éstos consistían de flavan-3-oles (catequina-galocatequina) y flavan 3,4- diols (leucocianidina-leucodelphinidina) y son oligómeros que varían en grado de polimerización. Sugirieron que los taninos condensados de Vicia faba L. deberían considerarse como el factor de depresión del crecimiento, responsable de la baja digestibilidad de los compuestos nitrogenados. Los taninos pueden afectar el crecimiento de animales por dos razones: su astringencia que disminuye el consumo del alimento y su habilidad de ligarse a las proteínas. Estos polímeros pueden tener un efecto inhibitorio en la digestibilidad de la proteína ya sea por la inhibición directa de las en-

zimas digestivas o por la formación de complejos indigeribles con las proteínas de los alimentos. El efecto de depresión depende de su grado de polimerización.

Los estudios de Linares y Bosque (69) indicaron que el contenido de taninos expresados como equivalente de catequina de frijoles cocidos y la digestibilidad determinada en ratas correlacionaron significativamente ($r=+0.4$).

En trabajos realizados por Hernández (51) se concluye que uno de los factores que influyen en la baja digestibilidad de las proteínas del frijol son los compuestos fenólicos y entre éstos las catequinas ejercen un mayor efecto.

Los trabajos anteriores indican que los taninos interfieren con la disponibilidad de nutrimentos, fundamentalmente con la proteína dietaria, formando compuestos insolubles e indigeribles mediante puentes de hidrógeno (46, 73, 109) o inactivando las enzimas, bloqueando de esta forma la absorción intestinal (42, 76). La inactivación enzimática conduce a hipersecreción por parte del páncreas con el consecuente aumento de tamaño de este órgano (66).

En síntesis podemos decir que son cuatro, posiblemente, los factores que de una manera u otra contribuyen a la baja digestibilidad de la proteína: 1.- Inhibidores de tripsina, 2.- Procesamiento, 3.- Ciertas fracciones proteínicas resistentes a la hidrólisis, y 4.- Presencia de sustancias que reaccionan con la proteína del frijol como los compuestos fenólicos.

Digestibilidad in vitro

El perfil de aminoácidos es importante en la evaluación de la calidad nutricional de una proteína y, por consiguiente, la digestibilidad de esa proteína es la determinante primordial de la disponibilidad de sus aminoácidos.

La digestibilidad de una proteína puede obtenerse por ensayos biológicos, siendo la rata el sujeto experimental más común. Sin embargo, el procedimiento es laborioso, requiere períodos largos de tiempo y es sumamente costoso (54).

Se han desarrollado muchos métodos in vitro para medir la digestibilidad de la proteína los cuales por su rapidez y sensibilidad son bastante aceptados.

Las enzimas proteolíticas han sido utilizadas para predecir la digestibilidad, habiéndose descrito tanto un sistema de enzimas de pepsina-pancreatina (1) como un sistema con papaína (21). Los resultados obtenidos concuerdan bien con la digestibilidad de la proteína in vivo, determinada en la rata. Posteriormente se desarrolló el sistema de papaína-tripsina (95) para la determinación de la digestibilidad de la proteína in vitro, y se encontró que también correlacionaba bien con la digestibilidad in vivo. Las técnicas in vitro (71) anteriores fueron modificadas, y se implementó un ensayo in vitro (54) de 10 minutos para determinar la digestibilidad aparente de la proteína, que utiliza las enzimas proteolíticas tripsina, quimotripsina y amino peptidasa. Se hizo una modificación posterior agregando una cuarta enzima (proteasa bacteriana), con

el propósito de poder predecir con mayor exactitud la digestibilidad de la proteína en los alimentos (94).

Para determinar la susceptibilidad a la hidrólisis proteolítica de la muestra se ha utilizado cambios de pH (54, 71, 94), la determinación de nitrógeno antes y después de la hidrólisis (90, 95), la medición espectrofotométrica del producto de hidrólisis realizada en electroforesis en gel (91) y la determinación de aminoácidos totales por un sistema automatizado antes y después de la hidrólisis (1). Todos estos métodos han sido aplicados en el estudio de diversas proteínas. La escogencia de un determinado método depende de las facilidades de cada laboratorio, de la habilidad del operador y de la exactitud que se desee en la determinación.

III. OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar si existe diferencia de polifenoles de frijoles de diferentes colores y su influencia sobre la digestibilidad de su proteína.

Objetivos Específicos

- 1.- Identificar el método analítico más reproducible y confiable para determinar los polifenoles del frijol.
- 2.- Desarrollar un método enzimático práctico y confiable para determinar in vitro la digestibilidad de la proteína del frijol.
- 3.- Estudiar en ratas el efecto del procesamiento térmico y la presencia del caldo de cocción sobre la digestibilidad de los frijoles de diferente color.
- 4.- Correlacionar los resultados de digestibilidad obtenidos tanto in vivo como in vitro con el contenido de polifenoles de los frijoles.
- 5.- Investigar la capacidad del método in vitro a desarrollar para detectar el efecto del procesamiento térmico y la presencia del caldo de cocción de los frijoles sobre la digestibilidad de su proteína.

IV. JUSTIFICACION

Los polifenoles han demostrado ser capaces de ejercer una actividad inhibitoria de las enzimas digestivas (105), teniendo además un efecto depresivo sobre el crecimiento de ratas y otros animales experimentales (27, 110). La metodología analítica empleada actualmente no es específica para polifenoles, y ha sido aplicada principalmente para sorgo, no así para leguminosas. Por lo tanto, la evaluación de métodos capaces de medir polifenoles basados en principios diferentes, sería de gran utilidad para cuantificar el posible efecto de estos compuestos sobre la digestibilidad del frijol, especialmente si se considera la enorme cantidad de variedades y especies de leguminosas que actualmente son consumidas por la población mundial. El color de los frijoles y el tratamiento térmico previo a su consumo, así como la presencia de factores antinutricionales y ciertos azúcares también han sido implicados como responsables de la baja digestibilidad de las proteínas del frijol. En fin, puede decirse que el estudio de las leguminosas es bastante complejo y que cualquier esfuerzo que se haga por conocerlas mejor o aumentar su valor nutritivo ayudaría en la nutrición de nuestros pueblos centroamericanos.

De igual manera, el desarrollo de métodos in vitro rápidos, sencillos y de bajo costo para evaluar la digestibilidad de esta proteína o de cualquier otro alimento que forme parte de la dieta de nuestros países sería de grandes beneficios en el área de nutrición, ciencia y tecnología de alimentos.

V. MATERIALES Y METODOS

Para este trabajo se utilizaron tres variedades comerciales de frijol común (Phaseolus vulgaris): blanco, negro y rojo.

Se trabajó con tres tipos de materiales; harina de frijol crudo, harina de frijol cocido y secado con caldo y harina de frijol cocido y secado sin caldo. En la Figura 1 se muestra la secuencia para obtener los materiales cocidos.

A.- Análisis Químicos

1.- Las muestras se analizaron por nitrógeno por el método de Kjeldahl (4) para determinar su contenido de proteína cruda. El porcentaje de humedad se determinó según los métodos de la AOAC. (4).

2.- Cuantificación de Polifenoles. Para la determinación cuantitativa de polifenoles se utilizaron dos métodos. El de Folin-Denis descrito por la AOAC (4) y el de precipitación de proteína de Hagerman-Butler (45). El primero de ellos utiliza el reactivo de Folin-Denis que contiene 10 % de tungstato de sodio, 2 % de ácido fosfomolibdico y 5 % de ácido fosfórico y una solución saturada de carbonato de sodio al 35 %. Después de 30 minutos de realizada la reacción, la intensidad del color desarrollado se midió con un colorímetro Spectronic 20 (Bausch & Lomb) a 760 nm de longitud de onda. Las lecturas obtenidas con las muestras se compararon con una curva estándar cuya linealidad puede apreciarse en la Figura 2, preparada con ácido tánico puro a concentraciones de 0.5, 1.0, 2.0 y

2.5 microgramos de ácido tánico por ml.

El segundo método es decir el de Hagerman-Butler, es un ensayo bioquímico que se basa en la precipitación de seroalbúmina por los taninos biológicamente activos de la muestra. Dicho precipitado se separa del sobrenadante por centrifugación, se redisuelve con dodecil sulfato de sodio y luego se hace reaccionar con cloruro férrico. Para este método se utiliza una solución de 0.100 g % de seroalbúmina de bovino, una solución al 1 % de dodecil sulfato de sodio con 5 % de trietanolamina y una solución 0.01 M de cloruro férrico. Después de 30 minutos de reposo, la intensidad del color desarrollado por la reacción entre el hierro y los taninos se mide en un colorímetro o espectrofotómetro a 510 nm de longitud de onda, comparándose los resultados con una curva estándar (Figura 3) que contiene 100, 200, 300, 400 y 500 microgramos de ácido tánico por ml.

Para la aplicación de este método a leguminosas se hicieron ensayos preliminares hasta encontrar la relación óptima para la extracción de taninos, que fue de 8, 4 y 2 g de muestra por cada 50 ml de metanol para frijoles blancos, negros y rojos respectivamente. Para obtener el rendimiento máximo de extracción en cada muestra, se realizaron tres extracciones sucesivas con el mismo solvente siguiendo el diagrama de la Figura 4. Cada muestra se agitó a temperatura ambiente por 25 minutos, con la ayuda de un agitador mecánico. Luego se centrifugó a 2,500 rpm durante 6 minutos, recolectándose el sobrenadante y

repetiendo la extracción en el residuo por dos veces más. El extracto metanólico obtenido se evaporó a un volumen de 45 ml en un horno de convección a la temperatura de 50°C. Luego se aforó con metanol a 50 ml. Del extracto concentrado se tomaron alícuotas, que variaron entre 1 y 10 ml según el color del frijol, las cuales se evaporaron a sequedad en un horno de convección a 50°C, resolviéndolas luego con 1 ml de metanol para proseguir las reacciones indicadas por el método de Hagerman-Butler.

La reproducibilidad de ambos métodos fue evaluada mediante el siguiente diseño experimental; se tomaron tres alícuotas de extracto de una misma muestra para un mismo día, representando tres niveles de concentración de taninos (bajo, intermedio y alto) durante 20 días consecutivos (6). Los resultados obtenidos con ambos métodos se analizaron estadísticamente para escoger aquella concentración que fuera más reproducible y confiable.

8.- Digestibilidad de la proteína del frijol

La determinación de la digestibilidad de la proteína de las muestras estudiadas se llevó a cabo siguiendo dos métodos: 1.- in vivo con ratas y 2.- in vitro con tripsina.

1.- Digestibilidad in vivo con ratas

Como base de comparación para la digestibilidad in vitro, se realizó este ensayo biológico con ratas de la raza Wistar de 28 días de edad proveniente de

la colonia animal del INCAP. Cada grupo incluía 8 ratas, 4 machos y 4 hembras, las cuales fueron alojadas en jaulas individuales de tela metálica. Para la distribución de las ratas en cada grupo se utilizó un diseño completamente aleatorizados con arreglo factorial 2 X 3 (86). El agua y el alimento fueron ofrecidos ad libitum.

El ensayo de digestibilidad tuvo una duración de 17 días. Al inicio del estudio tuvieron un período de recuperación de 7 días con una dieta de caseína que contenía 10 % de proteína. Al final de este período se les proporcionó las dietas experimentales. El período de adaptación a la nueva dieta duró 48 horas, siguiéndole el período experimental de recolección de heces. Las heces recolectadas se secaron en un horno con aire a 60°C, se pesaron y se molieron en mortero. Los datos sobre el cambio de peso e ingesta de alimento fueron recolectados al inicio y al final de este último período.

A las raciones y heces fecales de cada rata se les determinó el contenido de nitrógeno y humedad para calcular el porcentaje de digestibilidad aparente.

La composición de las dietas experimentales se detallan en el Cuadro 1. Se prepararon sustituyendo parte del almidón de la dieta basal por harina de frijol en cantidad suficiente para alcanzar un nivel de 10 % de proteína. A una parte de las dietas de frijol rojo y negro se le agregó 60 mg % de carmín para que sirviera como marcador de las heces fecales, en cambio se usó únicamente 30 mg de carmín por cada 100 g de dieta para aquellas preparadas con harina de

frijol blanco, caseína y leche descremada. Los controles de este ensayo estuvieron representados por dos grupos de ratas, uno alimentado con caseína y otro con leche descremada.

2.- Digestibilidad in vitro

La digestibilidad in vitro se llevó a cabo en todas las muestras de dietas del ensayo biológico utilizando tripsina como enzima proteolítica y ninhidrina como reactivo de coloración para cuantificar los productos de la digestión enzimática.

Los reactivos que se utilizaron en este método fueron los siguientes: buffer de fosfato pH 7.6 que se preparó con 0.234 g % de Na_2HPO_4 más 0.18 g % de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en agua destilada. Una solución de 0.050 g % de tripsina* en buffer pH 7.6; buffer pH 5.3 conteniendo 1 % de piridina 0.4 % de ácido acético en agua destilada; ninhidrina al 1 % en acetona; etanol al 75 %.

Procedimiento

Se pesó en duplicado una cantidad de muestra que contuviera 240 mg de proteína cruda, cada alícuota se colocó en un erlenmeyer de 125 ml de capacidad y se le agregó 10 ml de buffer de fosfato pH 7.6. Estas muestras se dejaron en refrigeración (5°C) por 2 horas, luego se le adicionó a cada una 20 ml de la solución de tripsina y se incubaron a 37°C en un baño maría con agitación constante durante 60 minutos. Transcurrido este tiempo se dejaron las muestras en

* Tripsina (páncreas de bovino), liofilizada, 3,000 N F unidades o 180 unidades TAME/mg; Quimotripsina ca. 0.5 %, Nutritional Biochemicals Corporation, Leveland, Ohio.

reposo por 5 minutos y se tomaron alícuotas de 40^μ microlitros del sobrenadante, las cuales se aplicaron en forma de banda transversal en un extremo de cintas de papel Whatman No. 1 de 3 cm de ancho y 57 cm de largo. La aplicación de la muestra se secó con ayuda de aire caliente. Las cintas se colocaron en una cámara de cromatografía y se realizó una cromatografía ascendente por una hora y 45 minutos, utilizando como solvente el buffer pH 5.3 descrito anteriormente. Al cabo de este tiempo las cintas se secaron por 10 minutos a 100^oC y se revelaron con ninhidrina al 1 %, desarrollándose el color en un horno a 100^oC por 5 minutos. La fracción separada del punto de aplicación contiene todos los aminoácidos libres de la muestra y aquéllos producidos por la digestión con tripsina. La fracción separada por cromatografía y teñida con ninhidrina se colocó en un tubo de ensayo y se extrajo el color por agitación con 15 ml de etanol al 75 %. La intensidad de color se midió luego en un colorímetro Spectronic 20 (Bausch & Lomb) a 570 nm de longitud de onda.

Este procedimiento se aplicó al mismo tiempo a muestras controles, es decir muestras a las cuales se les agregó todos los reactivos menos tripsina. Dichas muestras sin tripsina sirvieron para corregir las lecturas de las muestras con tripsina. Los detalles del procedimiento de este método pueden apreciarse en la Figura 5.

Cálculo para el % de hidrólisis o digestibilidad:

$$\begin{array}{l} \text{\% de hidrólisis} \\ \text{o} \\ \text{Digestibilidad} \end{array} = \frac{B - A}{B} \times 100$$

A = D. O. de muestras sin enzima / proteína de la muestra

B = D. O. de muestras con enzima / proteína de la muestra

D.O. = Densidad óptica.

C.- Análisis Estadísticos

Los análisis estadísticos llevados a cabo con los resultados obtenidos en este trabajo fueron:

- 1.- Medidas de variabilidad: varianza, desviación estándar y coeficiente de variación (29, 30, 86).
- 2.- Prueba de Bartlett (101) y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (30).
- 3.- Análisis de Varianza: para clasificación simple de una y dos vías (30, 86).
- 4.- Análisis de Correlación y Regresión (30, 86)

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

A.- Análisis Químico

Cuantificación de Polifenoles

Haeta la fecha se conoce muy poco sobre los compuestos polifenólicos de los frijoles de diferente color usados comúnmente para consumo humano. Para estudiar dichos compuestos es necesario contar con metodología analítica que pueda ser aplicable a este problema.

En este trabajo se procedió a evaluar estadísticamente dos métodos usados frecuentemente para la determinación de taninos en el sorgo, el método de Folin-Denis y el de Hagerman-Butler.

La precisión de un método es definida como la reproducibilidad expresada como desviación estándar y como coeficiente de variación (6, 50). La reproducibilidad es la capacidad de un método analítico de producir el mismo resultado en diferentes días cuando es ejecutado por diferentes técnicos usando diferentes juegos de reactivos (29). El coeficiente de variación es la desviación estándar expresada con relación al promedio (29, 50).

Método de Folin-Denis

En el Cuadro 2 se presentan los valores promedios, desviación estándar y coeficientes de variación de cada uno de los niveles de los tres colores de frijol. Se puede observar que el rango del coeficiente de variación para fri-

joles blancos es de 8 a 27 %; para frijoles negros de 7 a 15 % y para frijoles rojos de 5 a 12 %. El coeficiente de variación más bajo se obtuvo con el nivel de concentración más alto (10 ml de extracto), lo que indica que a este nivel el método es más reproducible.

La variabilidad que se encontró dentro de los tres niveles para cada uno de los frijoles, puede atribuirse a varios factores como son: aminoácidos, proteínas y xantinas que reaccionan positivamente con el reactivo de Folin-Denis (76) y a la constitución genética del grano que es intrínseco para cada organismo (9). Price y cols (88) encontraron una gran variabilidad en el contenido de polifenoles de los granos de una misma muestra de sorgo. Estos autores señalan que la variabilidad puede también ser atribuida a las pérdidas irregulares de los componentes del grano durante la molienda, y al contenido de taninos entre granos individuales de la misma especie. Es posible que a menor volumen de extracto, con el mismo peso de muestra, la proporción de componentes inherentes en la semilla capaces de reaccionar con el reactivo de Folin-Denis sea mayor que los polifenoles, lo que explicaría la variabilidad encontrada. La evaluación estadística de este método sugiere que se debe tomar 10 ml de extracto obtenido de 0.5 g de muestra para obtener la mejor precisión o sea mejor reproducibilidad de los resultados. Esta cantidad es 20 veces mayor que la cantidad de extracto recomendado por el método original AOAC (4).

El Cuadro 3 presenta los resultados estadísticos obtenidos por la prueba de Bartlett. Los χ^2_* (Jí cuadrado calculado) = 23.00, 12.07 y 13.86 fueron mayores que $\chi^2_{0.95;2} = 5.99$ para frijoles blancos, negros y rojos respectivamente, indicando que las varianzas de los tres niveles de cada color de frijol no son homogéneas. Sin embargo, los resultados obtenidos por la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Cuadro 4) muestra que los centros de distribución de cada nivel en los 3 colores son iguales. Se obtuvo una H^* (calculada) de 1.26, 4.04 y 4.67 menor que $\chi^2_{0.95;2} = 5.99$ para frijoles blancos negros y rojos respectivamente.

Método de precipitación de proteína (Hagerman-Butler)

Los resultados estadísticos de este método por la prueba de Bartlett se presentan en el Cuadro 5. Los χ^2_* para frijoles negros y rojos es de 0.08 y 0.16 menor que $\chi^2_{0.95;2} = 5.99$ respectivamente, por lo que la variabilidad en los tres niveles de ambos frijoles es igual, no siendo así para frijoles blancos cuya χ^2_* es de 10.88 mayor que $\chi^2_{0.95;2} = 5.99$. A los niveles a los que se usó el frijol negro y rojo se les hizo un análisis de varianza (Cuadro 6), el cual señaló que los centros de distribución de cada nivel son iguales ($F^* = 0.24$ y 0.59 , $P > 0.05$ para frijoles negros y rojos respectivamente), mientras que a los frijoles blancos se les hizo una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Cuadro 7). En este último caso se obtuvo que los promedios en los

tres niveles son diferentes ($H^* = 10.78$ $\chi^2_{0.95;2} = 5.99$). Esto puede atribuirse a que el cloruro férrico usado en este método forma un complejo con los compuestos fenólicos biológicamente activos, cuya coloración violeta depende de la naturaleza del fenol contenido en la muestra y del solvente usado (45). Es posible que las cantidades de polifenoles capaces de precipitar la proteína son tan mínimas que no son detectables por este método, o simplemente existe la posibilidad de que la muestra contenga otros tipos de compuestos fenólicos que no reaccionan con el cloruro férrico pero que sí puedan precipitar la proteína. En el Cuadro 8 se puede observar los promedios, desviación estándar y coeficiente de variación para los tres niveles de los tres colores de frijol. Los coeficientes de variación encontrados fueron de 17 a 27 % para los frijoles blancos y de 16 y 7 % para frijoles negros y rojos respectivamente. Es importante hacer notar que el coeficiente de variación fue menor para el mayor nivel de concentración en los frijoles blancos, mientras que para frijoles negros y rojos fue el mismo en los tres niveles. Sin embargo, tanto los blancos como los negros presentan coeficientes bastante altos. La gran variabilidad entre los niveles de ambos frijoles, blancos y negros, puede ser atribuida a que el grado de polimerización de los compuestos fenólicos, así como la presencia de fenoles de bajo peso molecular afectan el método de diferentes maneras, resultando estas discrepancias (45). Este método es más

preciso para los frijoles rojos, aunque debe tomarse en cuenta que dentro de la misma especie no todos los frijoles negros se comportan igual.

Para establecer la relación entre los métodos de Folin-Denis y Hagerman-Butler se efectuó una correlación con los valores obtenidos en el nivel más alto de concentración de polifenoles.

Las Figuras 6, 7 y 8 muestran las líneas de regresión entre los valores obtenidos para ambos métodos para cada color de frijol, para todos los colores y para los frijoles negros y rojos respectivamente. El Cuadro 9 presenta las ecuaciones de dichas regresiones. Puede notarse que aunque los métodos están basados en principios diferentes, la correlación con todos los valores de los tres frijoles fue significativa ($r = 0.72$ $P < 0.05$, $n=60$) pero ésta aumentó al excluir los frijoles blancos ($r = 0.84$ $P < 0.05$, $n=40$). Sin embargo, cuando se separó por color de frijol no hubo diferencia significativa debiéndose esto posiblemente al número de muestras.

Los polifenoles se encuentran en las plantas como metabolitos secundarios, raramente activos (111). Su habilidad de formar compuestos complejos y de precipitar las proteínas hace que sean importantes desde el punto de vista nutricional.

Price y colaboradores (88) encontraron que en sorgo almacenados a temperatura ambiente se produce una disminución en el contenido de polifenoles, deter-

minado por el método de vainillina-HCl, de este grano debido a que ocurre una oxidación de estos compuestos.

El Cuadro 10 presenta los resultados obtenidos con harina de frijol crudo. Se puede observar que el contenido de polifenoles totales determinados por el método de Folin-Denis, columna 1, es de 0.521, 1.142 y 1.383 g % para frijoles blancos, negros y rojos respectivamente. El contenido de polifenoles con actividad biológica (Hagerman-Butler), columna 3, es de 0.003, 0.035 y 2.827 g %, siendo los frijoles blancos los de menor contenido, seguido por los negros y rojos. En la columna 2 y 4 del mismo Cuadro se pueden observar los valores obtenidos 3 meses después, donde se nota que hubo un incremento en el contenido de polifenoles determinados por ambos métodos, con excepción de los frijoles rojos en los que disminuyó el contenido de polifenoles biológicamente activos. Esta variación puede ser debida a las condiciones de almacenamiento, a la forma física del grano u otros factores. Esto es un aspecto que debe ser estudiado con más detalle en el futuro. Los granos utilizados en este estudio estuvieron almacenados a 5°C hasta practicar los análisis químicos y el ensayo biológico.

El procesamiento térmico afecta los niveles relativos de polifenoles en el grano de leguminosas. En el Cuadro 11 se presentan los resultados obtenidos con frijoles cocidos y secados con caldo y sin caldo. Puede observarse

que con la cocción se reduce el contenido de polifenoles en los tres colores siendo esta reducción de 35.2, 31.4 y 36.6 % para frijoles rojos, negros y blancos respectivamente. Cuando se elimina el caldo de cocción estas pérdidas aumentan a 51.1, 39.8 y 49.9 %. En este mismo Cuadro puede observarse que la reducción de los polifenoles biológicamente activos por tratamiento térmico, es mayor en los frijoles rojos (95.7 %) siguiéndoles los negros (66.2 %) y los blancos (33.3 %).

Se hace notar que en las tres harinas el contenido de polifenoles totales y la actividad biológica de los mismos varía con la coloración de la cáscara del grano. Elías y cols (35) encontraron que la coloración de la testa del grano es la principal fuente de compuestos polifenólicos, estos compuestos fueron determinados por el método de Joslyn.

Los datos del Cuadro 11 indican que parte de los polifenoles se solubilizan en el caldo de cocción, lo cual está documentado (19, 32, 35). Es posible también que parte de las reducciones observadas pueda deberse a que estos compuestos orgánicos formen compuestos secundarios al reaccionar con proteínas, carbohidratos y otras sustancias (14) dando origen a lo que según Bressani y cols (16) podrían considerarse como taninos ligados.

Puede decirse que de los métodos evaluados el de Folín-Denis presentó la mayor reproducibilidad para todos los frijoles, aunque este método presenta la

desventaja de que el reactivo de Folin-Denis puede reaccionar con cualquier sustancia que tenga un grupo fenólico. Por otro lado, el método de precipitación de proteína de Hagerman-Butler es un ensayo bioquímico conveniente y reproducible, que puede proveer información de la actividad biológica de los taninos que contienen los alimentos, la cual no puede ser obtenida por ensayos químicos. Sin embargo, el grado de polimerización de los compuestos polifenólicos y los de bajo peso molecular probablemente afecten el método de diferentes maneras. La determinación de polifenoles en los materiales utilizados en este trabajo con el método de precipitación de proteína de Hagerman-Butler presentó una mejor reproducibilidad para los frijoles coloreados, no así para los blancos.

B.- Digestibilidad de la proteína del Frijol

1.- Digestibilidad en ratas

Desde el punto de vista de la composición química, las leguminosas poseen un potencial nutricional mayor comparado con otros granos (13, 34, 77, 78). El frijol común (Phaseolus vulgaris) constituye una de las leguminosas más importante para la nutrición humana en poblaciones de América Latina.

Los resultados del análisis de proteína cruda de las materias primas utilizada en los ensayos de digestibilidad se presenta en el Cuadro 12. El contenido de proteína cruda de las harinas de frijol cocido varió desde 24.25 %

para el frijol negro cocido y secado con caldo hasta 27.16 % para frijoles blancos cocidos y secados sin caldo.

Los datos de ingesta proteica y excreción fecal de nitrógeno así como los porcentajes de digestibilidad aparente de los frijoles cocidos y secados con caldo y sin caldo realizados en este estudio se presentan en el Cuadro 13. Se puede observar que en los frijoles cocidos y secados con caldo la ingesta de nitrógeno en g/7 días fue de 1.53 para los frijoles blancos y 1.34 tanto para frijoles negros como rojos. Mientras que con los frijoles cocidos y secados sin caldo, la ingesta de nitrógeno fue mayor (1.54) para los frijoles rojos, seguidos de los blancos (1.26) y los negros (1.12). En general, la ingesta promedio de nitrógeno fue mayor en los frijoles con caldo que en los sin caldo, hecho que se reflejó también en la excreción de nitrógeno que de 0.44 y 0.38 g/7 días para los frijoles con caldo y sin caldo respectivamente.

Al hacer el cálculo del porcentaje de digestibilidad aparente (D.A.) para frijoles con caldo se obtuvo valores de 73.21 ± 3.63 , 69.56 ± 4.96 y 64.51 ± 9.05 para frijoles blancos, rojos y negros respectivamente. Para los frijoles la digestibilidad fue de 71.97 ± 3.28 , 71.96 ± 2.78 y 68.83 ± 4.81 en el mismo orden, siendo los frijoles blancos de mayor digestibilidad que los rojos y éstos mayor que los negros. A la caseína le correspondió una digestibilidad de 92.43 ± 1.95 y a la leche descremada 86.34 ± 1.47 . En este ensayo se notó nuevamente

que los frijoles son mejores que los rojos y los negros.

Con el fin de establecer el efecto del color del frijol y el efecto del caldo de cocción sobre la digestibilidad de su proteína in vivo, se hizo un análisis de varianza de dos vías (86). El análisis señaló una interacción estadísticamente significativa ($F = 10.55$, $P < 0.05$) entre tratamiento (con caldo y sin caldo y color de frijol (Cuadro 14 y Figura 9), lo que significa que el efecto del tratamiento depende del color del frijol. Para investigar el tipo de dependencia se hicieron comparaciones de contraste utilizando el método de Scheffé (86). Los resultados de estas comparaciones indicaron que no habían diferencias estadísticamente significativas en Digestibilidad in vivo entre frijoles con caldo y sin caldo. Sin embargo, el frijol blanco con caldo mostró una digestibilidad superior ($P < 0.05$) al frijol negro con caldo. Todas las otras comparaciones no fueron estadísticamente significativas ($P > 0.05$). El hallazgo de no diferencias en la digestibilidad in vivo entre frijoles con caldo y sin caldo es controversial a lo encontrado en la literatura (14 - 16, 19, 35, 38, 56, 69, 112). Este hecho podría ser explicado en función del tamaño de muestra ($n = 8$ ratas por celda) utilizado en el presente estudio, ya que con este tamaño de muestra y la variabilidad encontrada ($s^2 = 18.92$, Cuadro 14), el procedimiento de Scheffé solo podía detectar diferencias ≥ 14.93 % comparando simultáneamente los 3 colores y diferencias ≥ 8.59 % comparando cualesquiera dos co-

lores.

Ahora bien, Bressani y Elías (14) han concluido que la digestibilidad de las leguminosas depende por lo menos de cuatro factores: factores antifisiológicos, tratamiento térmico, compuestos inherentes en las semillas y almacenamiento.

En leguminosas crudas, la baja digestibilidad de algunas especies es causada por factores antinutricionales como inhibidores de tripsina y hemaglutininas. Se ha señalado que el tratamiento térmico a que se someten las leguminosas tiene un doble efecto; por una parte disminuye y elimina la actividad de algunos factores antifisiológicos, mientras que por otro lado aumenta la disponibilidad de aminoácidos azufrados presentes en altas concentraciones en los inhibidores de tripsina, resultando en un incremento de la digestibilidad proteínica. No obstante, debe tenerse en cuenta, que el tratamiento excesivo puede disminuir la disponibilidad de ciertos aminoácidos, en particular la lisina (11). La destrucción de la estructura terciaria de ciertas proteínas resistentes a la proteólisis enzimática, así como la ruptura de paredes celulares puede originar un aumento en la digestibilidad. Minimizar, controlar o destruir el efecto de ciertas sustancias capaces de formar complejos, particularmente, con las proteínas, tendrá como efecto un incremento adicional en la digestibilidad (14).

En la cocción del frijol parte de los compuestos polifenólicos del grano se

solubilizan en el caldo de cocción. Los compuestos polifenólicos en el frijol común han sido considerados como uno de los factores antifisiológicos termorresistentes (14) que disminuyen la digestibilidad de su proteína. En el Cuadro 15 se presenta el contenido de polifenoles totales, determinados por el método de Folin-Denis, y la digestibilidad aparente de las dietas utilizadas en el ensayo con ratas. Se observa que tanto en frijoles con caldo como en frijoles sin caldo el porcentaje de D. A. es inversamente proporcional al contenido de polifenoles totales. El contenido de polifenoles para los frijoles con caldo fue de 0.357, 0.348 y 0.125 g/100 g de dieta correspondiéndole una D.A. de 64.51, 69.56 y 73.21 % para los frijoles negros, rojos y blancos respectivamente. Para los frijoles sin caldo los valores encontrados de polifenoles totales y D.A. fueron; 0.304, 0.257 y 0.098 g/ 100 g de dieta y 68.83, 71.96 y 71.97 % de digestibilidad para frijoles negros, rojos y blancos respectivamente.

Con el fin de establecer la relación entre el contenido de polifenoles totales (Folin-Denis) y la digestibilidad en ratas, se efectuó una correlación entre este indicador químico y la digestibilidad aparente de las dietas de frijol con caldo y sin caldo. Se encontró una correlación negativa significativa ($r = -0.39$, $P < 0.05$, $n = 48$). Esta línea de regresión puede observarse en la Figura 10, lo que refuerza la teoría de que los polifenoles juegan un papel impor-

tante como factores antinutricionales en los frijoles por tener afinidad por las proteínas. Sin embargo, se observa que la variabilidad de Y (r^2) de la línea de regresión es de 15 %, lo cual indica que a pesar de que hay una correlación significativa, no son los polifenoles los únicos que afectan la digestibilidad sino que posiblemente hay otros factores que influyen en ella.

2.- Digestibilidad in vitro

Debido a la necesidad de producir y mejorar los alimentos proteínicos para la creciente población mundial se ha constatado la necesidad de desarrollar métodos rápidos y adecuados de evaluación proteínica. Los ensayos biológicos con animales son laboriosos, costosos y consumen mucho tiempo. Como consecuencia, la evaluación in vitro ha cobrado más importancia y cada día se investiga para desarrollar nuevos métodos que proporcionen datos comparables a los ensayos biológicos. Sin embargo, es necesario determinar la forma en que estos métodos se correlacionen con los ensayos in vivo (83).

Los resultados estadísticos de reproducibilidad del método de digestibilidad in vitro desarrollado en este trabajo y descrito en la sección de Materiales y Métodos se presentan en el Cuadro 16. Puede observarse que el rango del coeficiente de variación fue de 5 a 10 %. A la caseína y a la leche descremada les correspondió el coeficiente de variación más bajo, mientras que a los frijoles les correspondió el coeficiente más alto. Esta diferencia en varia-

bilidad de los frijoles con respecto a la caseína puede atribuirse al hecho de que la caseína es una proteína bastante pura, mientras que el frijol es un material mucho más complejo, que contiene otros componentes que pueden tener efecto sobre el ensayo (inhibidores de proteasas, paredes celulares, etc.).

A las dietas utilizadas en el ensayo biológico con ratas se les aplicó este análisis in vitro, con el propósito de comparar resultados y poder predecir la digestibilidad de una proteína a partir de una digestibilidad in vitro; estos resultados se presentan en el Cuadro 17. Se observa que la mayor digestibilidad tanto in vitro como in vivo le correspondió a la caseína mientras que los frijoles mostraron la menor digestibilidad.

El porcentaje de digestibilidad in vitro para los frijoles con caldo fue de 51.83 ± 5.70 , 49.74 ± 3.99 y 43.32 ± 2.00 para los negros, rojos y blancos respectivamente, siendo el frijol negro el de mayor digestibilidad, seguido del rojo y luego del blanco.

También es de notar en este mismo Cuadro el efecto del caldo, ya que, en general, los frijoles sin caldo mostraron una mayor digestibilidad que los que fueron secados con su caldo de cocción. Los resultados obtenidos para frijoles sin caldo fueron de 66.20 ± 5.66 , 53.47 ± 7.58 y 52.03 ± 5.86 para los negros, blancos y rojos respectivamente. Como se observa el frijol blanco presentó la digestibilidad in vitro más baja que los frijoles coloreados, siendo esto contrario

a los valores obtenidos por métodos in vivo e in vitro (112) reportados en la literatura. Es posible que la clase de polifenoles u otros compuestos que se encuentran en el grano del frijol blanco interfiera en el método enzimático desarrollado en este trabajo. Además, esto podría indicar que en los frijoles de diferentes colores como los rojos y negros existen factores que no sólo inhiban la acción de la tripsina sino también a otras enzimas proteolíticas del tracto digestivo.

Con el fin de establecer diferencias entre los diferentes colores de frijol y entre tratamientos (con caldo y sin caldo) se efectuó un análisis de varianza de dos vías el cual señaló una interacción estadísticamente significativa entre color y tratamiento ($F = 557.50, P < 0.05$, Cuadro 18). Sin embargo, en la Grafica 11 se observa que los tres colores mejoraron su digestibilidad in vitro al removerles el caldo de cocción, y por lo tanto la interacción presente no se consideró importante. Basándose en este hecho el efecto del tratamiento fue significativo ($F = 490.08, P < 0.05$, Cuadro 18). Es decir, la digestibilidad mejora al removerle el caldo de cocción de los granos cocidos. Este análisis señaló también que hay diferencias significativas entre colores ($F = 242.55, P < 0.05$, Cuadro 18).

Al comparar los valores de digestibilidad in vitro con los de digestibilidad in vivo (Cuadro 17), se observa que los valores in vitro son más bajos que

los in vivo, lo cual se atribuye a que sólo se utilizó una enzima, mientras que la digestibilidad de las proteínas en el organismo se lleva a cabo por la acción de la pepsina en el estómago, seguida de la acción de las proteasas pancreáticas, las cuales convierten a las proteínas en péptidos cortos y en aminoácidos libres. Los péptidos cortos se degradan después completamente para dar aminoácidos libres por la acción de las peptidasas que se encuentran en la mucosa intestinal para ser luego absorbidos (65).

En el cuadro 19 se observa que el grado de hidrólisis alcanzado para frijoles cocidos y secados con caldo fue de 64 % y para frijoles sin caldo de 72 % con respecto al frijol crudo. Por lo tanto, se puede deducir que el tratamiento ejerce un efecto benéfico, mientras que el caldo tiene un efecto detrimental sobre la actividad proteolítica de la tripsina. La digestibilidad in vivo de los frijoles crudos está afectada principalmente por factores como he-maglutininas e inhibidores de tripsina, los cuales son destruidos en su mayoría por el calor. Sin embargo, quedan residuos termorresistentes que afectan la hidrólisis enzimática tanto in vivo como in vitro no pudiendo alcanzarse mayor digestibilidad con estos materiales.

Para verificar si había una relación entre los valores de digestibilidad in vivo e in vitro, se efectuó un análisis de regresión. El modelo cuadrático resultó ser altamente significativo ($r = 0.87$, $P < 0.05$, $n=64$), incluyendo los

valores de caseína y leche descremada. La ecuación de la regresión se presenta en el Cuadro 20, y en la Gráfica 12 se puede observar la curva de regresión cuadrática. El porcentaje del coeficiente de determinación (r^2) es de 75 %, lo que indica que se puede predecir un 75 % de la variabilidad in vivo a partir de la variabilidad in vitro con el método desarrollado en este estudio.

Sin embargo, excluyendo las proteínas de origen animal, el modelo cuadrático resultó no ser significativo ($r = 0.12$, $P > 0.05$, $n=48$).

En el Cuadro 21 se presentan los valores de digestibilidad aparente in vivo y los valores estimados de digestibilidad in vivo obtenidos con la ecuación de regresión a partir de los valores de digestibilidad in vitro. Como se observa, este método in vitro permite obtener estimaciones de la posible digestibilidad in vivo de muchos materiales como los frijoles sin tener que recurrir a animales experimentales. Por lo tanto puede decirse que el método de digestibilidad in vitro desarrollado en este trabajo es sencillo, reproducible y rápido.

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1.- Los métodos para la determinación de polifenoles evaluados en este trabajo mostraron ser reproducibles y confiables en el nivel más alto de concentración.

Para el método de Folin-Denis, la mejor reproducibilidad se obtuvo tomando 10 ml de extracto de una relación peso; volumen de 0.5 g;250 ml de agua destilada. Para el método de Hagerman-Butler fue de 10, 8 y 1 ml de extracto de frijol blanco, negro y rojo respectivamente, a partir de una relación peso a volumen de 8, 4 y 2 g;50 ml de metanol. Sin embargo este último, de acuerdo a lo observado con los frijoles de diferentes colores, es mejor para frijoles negros y rojos.

Se encontró una correlación significativa ($r=0.72$, $P<0.05$) entre ambos métodos, y fue más significativa ($r=0.84$, $P<0.05$) cuando se excluyeron los valores del frijol blanco obtenidos con ambos métodos.

2.- El contenido de polifenoles con ambos métodos varió con el color de la cáscara del frijol, con el tratamiento térmico y con la presencia o ausencia del caldo de cocción.

Sería de interés identificar las clases de polifenoles que se encuentran en los diferentes colores de frijol común para encontrar un método más específico y, por consiguiente, obtener estándares adecuados para poder relacionar la concentración de éstos al contenido de polifenoles identificados.

Además, se sugiere investigar con más detalles los cambios en la concentración de polifenoles en las leguminosas durante el almacenamiento a diferentes temperaturas y condiciones física del grano.

3.- Se notó que la digestibilidad in vivo de los frijoles mejoró al quitarles el caldo de cocción, aunque estadísticamente no se pudo comprobar esta mejora, debido al tamaño de la muestra que fue de 8. Por lo tanto, se sugiere aumentar el número de muestras y utilizar siempre que sea posible una misma variedad en todos los estudios para obtener resultados más uniformes.

Se encontró una correlación negativa significativa entre el contenido de polifenoles en 100 g de dieta (Folin-Denis) y digestibilidad in vivo de -0.39 ($P < 0.05$).

4.- El método de digestibilidad in vitro desarrollado en este trabajo mostro ser bastante reproducible. Es un método sencillo, económico y de fácil aplicación en los laboratorios de nuestros países. Se encontró una correlación altamente significativa ($r=0.87$, $P < 0.05$) entre la digestibilidad in vivo e in vitro, la ecuación encontrada para esta relación fue cuadrática. Se sugiere, sin embargo, la aplicación a otros tipos de alimentos, la utilización de otras enzimas proteolíticas además de la tripsina e investigar más sobre la digestibilidad in vitro del frijol blanco.

VIII. RESUMEN

El propósito de este estudio fue evaluar dos métodos para la cuantificación de polifenoles en leguminosas y desarrollar una metodología in vitro para determinar la digestibilidad de la proteína del frijol. Los materiales utilizados fueron frijol común (Phaseolus vulgaris) de color blanco, negro y rojo, de los cuales se obtuvieron harinas crudas, cocidas y secadas con caldo y sin caldo.

Para la cuantificación de polifenoles se utilizó el método de Folin-Denis que mide polifenoles totales y el método de precipitación de proteína de Hagerman-Butler que mide su actividad biológica.

La evaluación de ambos métodos consistió en determinar el contenido de polifenoles en las mismas muestras por 20 días consecutivos. Para este propósito se utilizó tres volúmenes de extracto de una misma muestra, equivalente a tres niveles de concentración (bajo, intermedio y alto).

Los resultados obtenidos por el método de Folin-Denis se analizaron estadísticamente por la prueba de Bartlett, la cual indicó que la variabilidad fue diferente en los tres niveles de cada uno de los colores de frijol. Sin embargo, la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis señaló que los promedios en los tres niveles de concentración para todos los frijoles eran iguales.

Para el método de Hagerman-Butler se encontró que la variabilidad y los

promedios en los tres niveles de frijoles negros y rojos eran iguales, no siendo así para los blancos.

El coeficiente de variación fue más bajo para el nivel de mayor volumen de extracto. Para el método de Folin-Denis fue de 5, 7 y 8 % para los frijoles rojos, negros y blancos respectivamente. Para el método de Hagerman-Butler fue de 7 % para los frijoles rojos, 16 % para los negros y 17 % para los blancos.

Se encontró una correlación significativa ($r=0.72$, $P < 0.05$, $n=60$) entre los dos métodos con el nivel de mayor concentración para todos los frijoles. Sin embargo, la correlación fue altamente significativa ($r=0.84$, $P < 0.05$, $n=40$) cuando se eliminaron los valores de los frijoles blancos.

Finalmente, se observó que el contenido de polifenoles con ambos métodos varió con el calor de la cáscara y que el tratamiento térmico redujo el contenido de aquéllos. En las harinas de frijol cocido y secados con caldo el porcentaje de pérdidas de polifenoles totales determinados por Folin-Denis alcanzó hasta un 37 % y se obtuvo hasta un 94 % de reducción para los polifenoles biológicamente activos determinados por el método de Hagerman-Butler. La mayor reducción de polifenoles se observó en los frijoles cocidos y secados sin caldo, los cuales alcanzaron hasta 51 y 96 % para polifenoles totales y biológicamente activos respectivamente.

En el ensayo con ratas se encontró que la digestibilidad de la proteína del

frijol con caldo fue de 73.21, 69.56 y 64.51 % para frijoles blancos, rojos y negros respectivamente. En frijoles sin caldo fue de 71.97 % para frijoles blancos, 71.96 % para los rojos y 68.83 % para los negros.

El análisis de varianza de dos vías efectuado en este ensayo, señaló que hay diferencias significativas entre los promedios de los diferentes colores de frijol, siendo el promedio de los frijoles blancos con caldo diferente a los negros y rojos, y el promedio de los frijoles negros sin caldo diferente a los blancos y rojos. Este análisis indicó también, que no hay diferencia significativas entre los frijoles con caldo y sin caldo.

Finalmente, se relacionó el contenido de polifenoles de las dietas con el porcentaje de digestibilidad in vivo, encontrándose una correlación negativa ($r = -0.39$) que aunque significativa a $P < 0.05$, resultó en un porcentaje del coeficiente de determinación (r^2) bajo (15 %).

En cuanto a la metodología de la digestibilidad in vitro desarrollada en este trabajo, su reproducibilidad se evaluó, determinando por 20 días, el porcentaje de hidrólisis en frijoles cocidos y en los controles de caseína y leche descremada, y se encontró un coeficiente de variación de 10 % para los frijoles y 5 % para los controles.

Este método se aplicó a las dietas utilizadas en el ensayo con ratas. Los valores obtenidos para frijoles con caldo fueron de 51.83, 49.74 y 43.32 % para

frijoles negros, rojos y blancos respectivamente. Para frijoles negros sin caldo fue de 66.20 %, para los blancos 53.47 % y para los rojos 52.03 %.

Para establecer diferencias entre colores y tratamientos (con caldo y sin caldo) se realizó un análisis de varianza de dos vías, encontrándose que el promedio de los frijoles blancos con caldo es diferente a los promedios de los negros y rojos. Y que el promedio de los negros sin caldo es diferente a los blancos y rojos. También indicó que hay diferencias significativas entre los frijoles con caldo y sin caldo.

Finalmente se encontró una correlación significativa ($P < 0.05$) entre el método in vivo e in vitro con un coeficiente de correlación de 0.87. La ecuación de regresión utilizada para calcular la digestibilidad in vivo a partir de la digestibilidad in vitro fue cuadrática, encontrándose una buena estimación de la digestibilidad aparente in vivo por el método in vitro desarrollado en este trabajo.

IX. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Akeson, W. R. y M. A. Stehman. "A pepsin pancreatin digest index of protein quality". J. Nutr., 83:257-261. 1964
- 2.- Altshul, A. M.. Processed plant protein foodstuffs. New York, Academic Press, Inc., 1958. pp.717-735.
- 3.- Arroyave, G.; J. Méndez y R. Bressani. "Contenido de diversos nutrientes en alimentos procedentes de Centroamérica". Arch. Ven. Nutr., 6:101-109. 1955.
- 4.- Association Official Agricultural Chemists, Washington, D. C.. Official methods of analysis of the AOAC. 12 th ed. Washington, D. C., 1975.
- 5.- Aykrod, W. R. y J. Doughty. Legume in human nutrition. Rome, Italy, FAO, 1964. pp. 39-40. (FAO, Nutritional Studies No. 19).
- 6.- Barnett, R. N. y W. J. Youden. "A revised scheme for the comparison of quantitative methods". Am. J. Clin. Pathol., 54:454-462. 1970.
- 7.- Bate-Smith, E. C.. Phytochemistry, 12:907. 1973. Citado por McLeod, M. N.. "Plant tannins; their role in forage quality". Nutr. Abstr. Rev., 44(11):804-815. 1974.
- 8.- _____ . Phytochemistry, 16:1421. 1977. Citado por Ann Hegerman y L. G. Butler. "Protein precipitation for the quantitative determination of tannins". J. Agric. Food Chem., 26(4):809-812. 1978.
- 9.- Braues, O.. Fitogenética aplicada. 5a. ed. México, Editorial Lamusa, S. A., 1981. pp. 65-79.
- 10.- Bressani, R.. "Legumes in the human diet and how they might be improved". En: Symposium of the Nutritional Improvement of Food Legumes by Breeding. Rome, Italy, 3-5 July, 1972. New York, John Wiley and Sons, 1973. pp. 15-42.
- 11.- _____ . "Effect of processing on the nutritional value of feeds in Central América". En: Effect of processing on the nutritional value of feeds. Proceeding of a symposium. Gainesville, Florida, January 11-13, 1972. Washington, D. C., National Academy of Science, 1973. pp. 452-477.

- 12.- _____; L. G. Elías. "Vegetable protein foods for developing areas". Adv. Food Res., 16:11-103. 1968.
- 13.- _____ y L. G. Elías. "Legume foods". En: New protein foods. Vol. 1, Technology. Aaron M. Altschul. ed. New York, Academic Press, 1974. pp. 230-297.
- 14.- _____ y L. G. Elías. "The problem of legume protein digestibility". En Nutritional standards and methods of evaluation for food legume breeders. Ottawa, Canada, International Development Research Centre, 1977. (IDRC-TS 7e).
- 15.- _____ y L. G. Elías. "The nutritional role of polyphenols in beans". En: Polyphenols in cereals and legumes. Proceeding of a Symposium held during the 36 th annual meeting of the Institute of Food Technologist, St. Louis, Missouri, 10-13 June, 1979. Editor Joseph H. Hulise. Ottawa, International Development Research Centre - IDRC- , 1979. pp. 61-68.
- 16.- _____; L. G. Elías y J. E. Braham. "Reduction of digestibility of legume proteins". En: Proceeding workshop Physiological Effects of Legumes in the Human diet, held in San Diego, California during the XII International Congress of of Nutrition. 1981. (In press).
- 17.- _____; L. G. Elías y A. Teresa Valiente. "Effects of cooking and of amino acid supplementation on the nutritive of black beans". Brit. J. Nutr., 17:69-78. 1963.
- 18.- _____; Marina Flores y L. G. Elías. "Aceptabilidad y valor nutricional de las plantas leguminosas de grano en la dieta humana". En: Seminario sobre el Potencial del Frijol y otras Leguminosas de grano Comestible en América Latina. Cali, Colombia, 26 de Feb.- 1 de Marzo, 1973. Cali, Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT 1975. pp. 13-28. (serie CS-2).
- 19.- _____; L. G. Elías y M. Molina. "Estudios sobre digestibilidad de la proteína de varias especies leguminosas". Arch. Latinoam. Nutr., 27(2):215-231. 1977.
- 20.- Brochers, R. y C. W. Ackerson. "The nutritive value of legume seeds; effect of autoclaving and the trypsin inhibitor test for 17 species". J. Nutr., 41:339-345. 1977.
- 21.- Buchanan, R. A. y M. Byers. "Interference by cyanide with the measurement of papain hydrolysis". J. Sci. Food Agric., 20:364-367. 1969.

- 22.- Budini, R.; D. Tonelli y S. Girotti. "Analysis of total phenol using the Prussian Blue method". J. Agric. Food Chem., 28:1236-1238. 1980.
- 23.- Bullard, R. E.; J. O. York y S. R. Kilburn. "Polyphenolic changes in ripening bird-resistant sorghums". J. Agric. Food Chem., 29:973-981. 1981.
- 24.- Burns, E. E.. "Methods of tannin analysis for forage crop evaluation". Georgia Agricultural Experimental Station. Technical-Bulletin N. S. 32. 1963. 14 p..
- 25.- _____ . "Method for estimation of tannin in grain sorghum". Agro-nomy Journal, 63:511-512. 1971.
- 26.- Cowan, J. W. y Z. I. Sabry. "Nutritive value of middle eastern foodstuffs. II. Composition of pulse, seeds, nuts and cereal products of Lebanon". J. Sci. Food Agric., 17:82-85. 1966.
- 27.- Chang, S. J. y H. L. Fuller. "Effect of tannin content of grain on their feeding value for growing chicks". Poultry Sci., 43:30-36. 1964.
- 28.- Daniel, L. y L. C. Norris. "The riboflavin, niacin and thiamine content of dried leguminous seeds". J. Nutr., 30:31-36. 1945.
- 29.- Dharam, M.. Total quality control in the clinical laboratory. St. Louis, Missouri. The C. V. Mosby Company. 1977. 23 p..
- 30.- Downie, N. M. y R. W. Heath. Métodos estadísticos aplicados. México, Har-la, S. A.. 1971. pp. 293-294.
- 31.- Earp, C. F.; J. O. Akengbala, S. H. Ring y L. W. Rooney. "Evaluation of several methods to determine tannins in sorghum with varying kernel characteristics". Cereal Chem., 58(3):234-238. 1981.
- 32.- Elías, L. G. y R. Bressani. "Nutritional factors affecting the consumption of leguminous seeds". Arch. Latinoam. Nutr., 24:365-378. 1974.
- 33.- _____ ; R. Bressani y J. A. del Busto. "Evaluación de la calidad de la proteína de alimentos de bajo contenido proteínico". Arch. Latinoam. Nutr., 24(1):81-96. 1974.
- 34.- _____ ; R. Bressani y H. Miranda. "Composición química y valor nutritivo de algunas leguminosas de grano". Turrialba, 26:375-380. 1976.
- 35.- _____ ; Dolores de Fernández y R. Bressani. "Possible effects of

seed coat polyphenolics on the nutritional quality on bean protein". J. Food Sci., 44(2):524-527. 1979.

- 36.- _____ y Delia A. Navarrete. "Nutritive value of Central American beans. IV. The essential amino acid content of samples of black bean, red beans, rice bean and cowpeas of Guatemala". J. Food Sci., 26: 525-528. 1961.
- 37.- Featherston, W. y J. Rogler. "Influence of tannins on rats and chicks". Nur. Rep. International, 11(6):491-497. 1975.
- 38.- Fernández, Dolores de. Estudios sobre los posibles efectos de los pigmentos de frijol sobre la calidad nutricional de la proteína. Tesis (Magister Scientifiae). - Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia- INCAP/ CESNA- Curso de Postgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos. Guatemala, 1973. pp. 41, 63.
- 39.- Fernández Botrán, G. R.. Factores antinutricionales en semillas de leguminosas (Phaseolus vulgaris) y su posible relación con el contenido de taninos y polifenoles asociados. Tesis (Químico Biólogo)- Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia- INCAP/ CESNA- Guatemala, 1979. 53 p..
- 40.- Food and Agriculture Organization of the United Nations. Legumes in human nutrition. Report of the FAO Committee. Rome, Italy, 1964. 139 p. (FAO Nutritional Studies No. 19).
- 41.- Glick, Z. y M. Joslyn. "Food intake depression and metabolic effects on tannic acid in the rat". J. Nutr., 100:509-515. 1970.
- 42.- _____ y M. Joslyn. "Effects of tannic acid and related compound on the absorption and utilization of protein in the rat". J. Nutr., 100:516-520. 1970.
- 43.- Goldstein, J. L. y I. Swain. Phytochemistry, 4:185. 1965. Citado por Tamir y Alumot. "Inhibition of digestive enzymes by condensed tannins from green and ripe carobs". J. Sci. Food Agric., 20:199-202. 1969.
- 44.- Gustavson, K. H.. J. Polym. Sci., 12:317. 1954. Citado por Tamir y Alumot. "Inhibition of digestive enzymes by condensed tannins from green and ripe carobs". J. Sci. Food Agric., 20:199-202. 1969.
- 45.- Hagerman, A. E. y L. Butler. "Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins". J. Agric. Food Chem., 26(4):809-812. 1978.

- 46.- Haslam, E.. "Polyphenol-protein interaction". Biochem. J., 139:205-288. 1974.
- 47.- Hegsted, D. M.; R. C. Mills, C. A. Elvehjem y E. B. Hart. "Choline in the nutrition of chicks". J. Biol. Chem., 138:459-466. 1941.
- 48.- _____ y B. O. Juliano. "Difficulties in assessing the nutritional quality of rice protein". J. Nutr., 104:772-781. 1974.
- 49.- Hellendoorn, E. W.. "Intestinal effects following ingestion of beans". Food Technol., 23(795):87-92. 1969.
- 50.- Henry, R.. Clinical Chemistry, principles and techniques. New York, Harper and Row, Publishers, 1964. pp. 122-126.
- 51.- Hernández Fernández, Eloísa M.. Significancia de la presencia de taninos y polifenoles asociados en la digestibilidad de las proteínas del frijol (Phaseolus vulgaris) en humanos. Tesis (Magister Scientifícae)- Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia- INCAP/ CESNA- Curso de Postgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos. Guatemala, 1980. 53 p..
- 52.- Hernández I., M.. Efecto de las condiciones de cocción sobre la actividad tóxica residual, disponibilidad de aminoácidos y valor proteínico de algunas leguminosas. Tesis (Magister Scientifícae)- Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia- INCAP/ CESNA- Curso de Postgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos. Guatemala, 1976. 65 p..
- 53.- Hintz, H. F.; D. F. Hogue y L. Krook. "Toxicity of red kidney beans (Phaseolus vulgaris) in the rat". J. Nutr., 93:77-86. 1967.
- 54.- Hsu, H. W.; D. L. Vaval, L. D. Satterlee y G. A. Miller. "A multienzyme technique for estimating protein digestibility". J. Food Sci., 42(5): 1269-1273. 1977.
- 55.- Ischino, K. y M. Ortega. "Fractionation and characterization of major reserve proteins from seeds of Phaseolus vulgaris". J. Agric. Food Chem., 23(3):529-531. 1975.
- 56.- Jaffé, W.. "Protein digestibility and trypsin inhibitory activity of legume seeds". Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 75:219-220. 1950.
- 57.- _____. "Limiting essential amino acids of some legume seeds". Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 71:398-399. 1949.

- 58.-_____. "El valor biológico de algunas leguminosas de importancia en la alimentación venezolana". Arch. Ven. Nutr., 1:107-126. 1950.
- 59.-_____. "Las semillas de leguminosas como fuente de proteína en América Latina". En: Recursos Proteínicos en América Latina. M. Béhar y R. Bressani. ed. Guatemala, INCAP, 1970. pp. 228-241.
- 60.-_____; P. Bodowsky y G. Gorra. "El valor vitamínico de algunas leguminosas venezolanas". Arch. Ven. Nutr., 1:375-378. 1950.
- 61.-_____ y G. Camejo. "La acción de una proteína tóxica aislada de caracas negras (Phaseolus vulgaris) sobre la absorción intestinal en ratas". Acta Cient. Venez., 12:59-61. 1961.
- 62.-_____ y K. Hanning. "Fractionation of proteins from kidney beans". Arch. Bioch. Biophys., 109:80-91. 1965.
- 63.-_____ y C. Vega-Lette. "Heat labile growth inhibiting factors in beans". J. Nutr., 94:203-210. 1969.
- 64.- Khanna, S. K.; P. N. Viswanathan, P. S. Krishnan y G. G. Sanwal. Phytochemistry, 7:1513. 1968. Citado por McLeod, M. N.. "Plant-tannins; their role in forage quality". Nutr. Abstr. Rev., 44(11):804-815. 1974.
- 65.- Lehninger, A. L.. Bioquímica. 2a. ed. F. Calvet Prats y J. Bozal Fes. Barcelona, Ediciones Omega, S. A., 1981. pp. 572-573.
- 66.- Leung, J.; T. Fenton, M. Mueller y A. Cladinin. "Condensed tannins of rapeseed meal". J. Food Sci., 44(5):1313-1316. 1979.
- 67.- Liener, I. E.. "Toxic factors in edible legumes and their elimination". Am. J. Clin. Nutr., 11:281-299. 1962.
- 68.-_____. "Significance for humans of biologically active factors in soy beans and other legumes". J. Am. Oil Chem. Soc., 56(3):121-129. 1979.
- 69.- Linares, Sonia y Concepción de Bosque. Evaluación de estándares nutricionales y tecnológicos de 20 variedades de Phaseolus vulgaris. Tesis (Magister Scientifcae)- Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia- INCAP/ CESNA- Curso de Postgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Guatemala, 1980. 52 p..

- 70.- Loomis, W. D. y J. Battaille. Phytochemistry, 5:423. 1966. Citado por Tamir y Alumot. "Inhibition of digestive enzymes by condensed tannins from green and ripe carobs". J. Sci. Food Agric., 20:199-202. 1969.
- 71.- Maga, J. A.; K. Lorenz y D. Onayemi. "Digestive acceptability of proteins as measured by the initial ratio in vitro proteolysis". J. Food Sci., 38:173-174. 1973.
- 72.- Manna, L. y S. M. Hauge. "A possible relationship of vitamin B₁₃ to orotic acid". J. Biol. Chem., 202:91-96. 1953.
- 73.- Marquardt, R.; A. Ward, L. Campbell y P. Canefield. "Purification and characterization of a growth inhibitor in faba beans (Vicia faba L. var. minor)". J. Nutr., 107:1313-1324. 1977.
- 74.- Martin-Tanguy, J.; J. Guillaume y A. Kossa. "Condensed tannins in Horse bean seeds: chemical and apparent effects on poultry". J. Sci. Food Agric., 28:757-765. 1977.
- 75.- Maxson, E. D. y L. W. Rooney. "Evaluation of methods for tannin analysis in sorghum grain". Cereal Chem., 49:719-729. 1972.
- 76.- McLeod, M. M.. "Plant-tannins; their role in forage quality". Nutr. Abstr. Rev., 44(11):804-815. 1974.
- 77.- Meiners, Ch.; N. Derise, H. Lau, S. Ritchey y E. Murphy. "Proximate composition and yield of raw and cooked mature dry legumes". J. Agric. Food Chem., 24(6):1122-1125. 1976.
- 78.- _____; N. Derise, H. Lau, S. Ritchey y E. Murphy. "The content of nine mineral elements in raw and cooked mature dry legumes". J. Agric. Food Chem., 24(6):1126-1130. 1976.
- 79.- Michelsen, O. y M. G. Yong. "Naturally occurring toxicants in foods". Fed. Proc., 25:104-123. 1965.
- 80.- Molina, M. R.; G. de la Fuente y R. Bressani. "Interrelationship between storage, soaking, cooking time, nutritive value and other characteristics of the black beans (Phaseolus vulgaris)". J. Food Sci., 40:587-591. 1975.
- 81.- Muelenare De, H.. "Effect of heat-treatment on the hemagglutinating activity of legumes". Nature, 201:1029-1030. 1964.

- 82.- National Research Council, Washington, D. F.. Evaluation of protein quality. Washington, D. C., National Academy of Sciences, 1963. 74 p. (NRC, Publication No. 1100).
- 83.- Oke, O. L. e I. B. Umoh. "Nutritive value of leaf protein; a note on the comparison of in vitro and in vivo methods". Nutr. Rept. Intl., 10 (6);397-403. 1974.
- 84.- Ordóñez, M. E.. Factores antifisiológicos de especies de Phaseolus vulgaris y su efecto sobre el crecimiento y otros parámetros de ratas albinas, Tesis (Magister Scientifical)- Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia- INCAP/ CESNA-Curso de Postgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Guatemala, 1976. 65 p..
- 85.- Osborne, T. B.. J. Am. Chem. Soc., 16;633, 703-757. 1894. Citado por Evans, R. J. y H. Kerr. "Protein isolation extration and precipitation of nitrogenous constitutens of dry navy beans". J. Agric. Food Chem., 11;26-29. 1961.
- 86.- Ott, L.. An introduction to statistical methods and data analysis. North Scituate, Massachusetts, Duxbury Press, 1977.
- 87.- Price, M. L. y L. G. Butler. "Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain". J. Agric. Food Chem., 25(6);1268-1273. 1977.
- 88.- _____; S. Van Seayoc y L. G. Butler. "A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain". J. Agric. Food Chem., 26(5);1214-1218. 1978.
- 89.- Rao, S.. "Nature of carbohydrates in pulses". J. Agric. Food Chem., 24(5); 958-960. 1976.
- 90.- Remachandra, G.; T. Virupaksha y M. Shadesksraswamy. "Relationship between levels and in vitro protein digestibility in Finger millet". J. Agric. Food Chem., 25(5);1101-1104. 1977.
- 91.- Romero, J. y D. Ryan. "Susceptibility of the major storage protein of the bean (Phaseolus vulgaris,L.) to in vitro enzymatic hidrolisis". J. Agric. Food Chem., 26(4);784-788. 1978.
- 92.- Rosales arzú, Ana maría. Estudios sobre la calidad proteínica del frijol y las tres fracciones derivadas por solubilidad diferencial, en niños pre-escolares. Tesis (Licenciado en Nutrición)- Universidad de San Car-

los de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia- INCAP/CES-NA- Escuela de Nutrición. Guatemala, 1976. 60 p..

- 93.- Sarkar, S. K. y R. E. Howarth. "Specificity of the vanillin test for flavanols". J. Agric. Food Chem., 24:317-320. 1976
- 94.- Satterlee, L. D.; H. F. Marshall y J. M. Tennyson. "Measuring protein quality". J. Am. Oil Chem. Soc., 56:103-109. 1979.
- 95.- Saunders, R. M.; M. A. Connor, A. N. Booth, E. M. Bickoff y G. E. Kohler. "Measurement of digestibility of alfalfa concentrates by in vivo and in vitro methods". J. Nutr., 103:530-535. 1973.
- 96.- Schanderl, S. H.. Method in food analysis. Joslyn, M. A., ed.. London, Academic Press, 1970. 701 p..
- 97.- Seidl, D.; M. Jaffé y W. Jaffé. "Digestibility and proteinase inhibitory action of a kidney bean globulin". J. Agric. Food Chem., 17(6): 1318-1320. 1969.
- 98.- Sgarbiere, E.; P. Antunes y L. Almeida. "Nutritional evaluation of four varieties of dry beans (Phaseolus vulgaris)". J. Food Sci., 44:1306-1308. 1979.
- 99.- Singh S.; H. P. Singh y K. C. Sikka. "Distribution of nutrients in the anatomical parts of common Indian pulses". Cereal Chem., 45:13-18. 1969.
- 100.- Singleton, V. L. y F. H. Kratzer. "Toxicity and related physiological activity of phenolic substances of plant irigin". J. Agric. Food Chem., 17(3):497-510. 1970.
- 101.- Steel, R. y J. H. Torrie. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. U.S.A. 2a. ed. McGraw Hill, Inc. R.R. Donnelly sons Company, 1960. pp. 471-472.
- 102.- Strumeyer, D. y M. Malin. "Condensed tanning in grain sorghum; isolation, fractionation and characterization". J. Agric. Food Chem. 23(5):909-913. 1975.
- 103.- Suchrukow, K.. "Beitrage zur physiologic der pflanzlichen resistenz". Berlin Germany. Citado por McLeod, M. N.. "Plant tannins; their role in forage quality". Nutr. Abstr. Rev., 44:804-815. 1974.

- 104.- Takayama, K. K.; D. Munetta y A. E. Wiese. "Lipid composition of dry beans and its correlation with cooling time". J. Agric. Food Chem., 13: 269-272. 1965.
- 105.- Tamir, M. y E. Alumot. "Carob tannins growth depression and levelness of insoluble nitrogen in the digestive tract of rat". J. Nutr., 100: 573-580.
- 106.- Tandon, O.; R. Bressani y N. S. Scrimshaw. "Nutritive value of beans. Nutrients in Central American beans". J. Agric. Food Chem., 5:137-142. 1957.
- 107.- Tauber, H.; B. Kershaw y R. Wright. "Studies on the growth inhibitor fraction on Lima beans and isolation of a crystalline heat-stable trypsin inhibitor". J. Biol. Chem., 179:1155-1162. 1949.
- 108.- United Nations University. Nutritional evaluation of protein foods. Report of a working group sponsored by the International Union of Nutritional Sciences and the United Nations University World Hunger Programme, Food and Nutrition Bulletin supplement 4. Editores P. L. Pellet y V. R. Young. United Nations University, Japan, 1980.
- 109.- Van Buren, J. P. y W. B. Robinson. "Formation of complexes between protein and tannic acid". J. Agric. Food Chem., 17:772-777. 1969
- 110.- Vohra, P.; F. H. Kratzer y M. A. Joslyn. "The growth depressing and toxic effects of tannins to chicks". Poultry Sci., 45:135-142. 1966.
- 111.- White, T.. J. Sci. Food Agr., 8:377. 1957. Citado por McLeod M. N.. "Plant tannins; their role in forage quality". Nutr. Rev., 44(11): 804-815. 1974.
- 112.- Wolzak M., Arlene. Evaluación de Digestibilidad y calidad proteínica por métodos rápidos y su correlación con ensayos convencionales en la rata. Tesis (Magister Scientifcae). -Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia- INCAP/CESNA- Curso de Postgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos. Guatemala, 1973.
- 113.- Yapar, Z. y D. Cladinin. "Effects of tannins in rapeseed meal on its nutritional value for chick". Poultry Sci., 51:222-228. 1972.

X. APENDICE

CUADRO 1

Composición de las raciones utilizadas en el estudio de digestibilidad con ratas

Ingredientes	g %
Harina de frijol cocido	cantidad suficiente para 10 g de proteína
Caseína	cantidad suficiente para 10 g de proteína
Leche descremada	cantidad suficiente para 10 g de proteína
Aceite de algodón, g	5
Minerales (47), g	4
Aceite de bacalao, ml	1
Almidón	cantidad para ajustar a 100 g
Vitaminas (72)	5 ml/100 g de dieta

CUADRO 2

Resumen estadístico de los resultados de polifenoles totales (expresados como ácido tánico) por el Método de Folin-Denis

Color de Frijol	ml de extracto ^a	$\bar{x}^b \pm D.E.^{c,1}$ mcg/ml	C.V. ^{d,2} %
Blanco	2.5	9.84 \pm 2.68	27
	5.0	10.27 \pm 1.38	13
	10.0	10.41 \pm 0.86	8
Negro	2.5	23.54 \pm 3.51	15
	5.0	24.04 \pm 2.16	9
	10.0	22.83 \pm 1.58	7
Rojo	2.5	28.90 \pm 3.35	12
	5.0	28.43 \pm 2.24	8
	10.0	27.67 \pm 1.38	5

^a 0.5 g de muestra a volumen de 250 ml.

^b promedio.

^c desviación estándar.

^d coeficiente de variación.

¹ Promedios iguales (Kruskal-Wallis).

² Variabilidad son diferentes (Bartlett).

CUADRO 3

Prueba de Bartlett - Método de Folin-Denis; taninos expresados como mcg de ácido tánico/ml de extracto

Frijol	serie	g.L.	S.C.	s^2	$\log s^2$	$(n-1) \log s^2$	$1/n-1$
Blanco	1	19	136.3494	7.1763	0.8559	16.2621	0.0526
	2	19	35.9971	1.8946	0.2775	5.2728	0.0526
	3	19	14.1868	0.7467	-0.1269	-2.4102	0.0526
Total Común		<u>57</u>	<u>186.5333</u>	3.2725	0.5149	<u>19.1247</u> 29.3482	<u>0.1578</u>
$X^{2*} = 23.00 > X^2(0.95; 2) = 5.99 P < 0.05$							
Negro	1	19	243.2888	12.3310	1.0910	20.7290	0.0526
	2	19	88.3833	4.6518	0.6676	12.6848	0.0526
	3	19	47.2613	2.4874	0.3957	7.5192	0.0526
Total Común		<u>57</u>	<u>369.9334</u>	6.4901	0.8122	<u>40.9330</u> 46.2982	<u>0.1578</u>
$X^{2*} = 12.07 > X^2(0.95; 2) = 5.99 P < 0.05$							
Rojo	1	19	213.4482	11.2341	1.0505	19.9603	0.0526
	2	19	94.9543	4.9976	0.6988	13.2765	0.0526
	3	19	35.9934	1.8944	0.2775	5.2720	0.0526
Total Común		<u>57</u>	<u>344.3959</u>	6.0420	0.7812	<u>38.5087</u> 44.5274	<u>0.1578</u>
$X^{2*} = 13.86 > X^2(0.95; 2) = 5.99 P < 0.05$							

g.L. = grados de libertad.

S.C. = suma de cuadrados.

s^2 = varianza.

X^{2*} = ji cuadrado calculado.

X^2 = valor de la distribución teórica de ji cuadrado.

CUADRO 4

Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis - Método de Folin-Denis

Frijol	nivel	\bar{x}^* mcg/ml ^a	Orden	\bar{x}^* del orden	n
Blanco	1	9.8402	627	31.35	20
	2	10.2741	602	30.10	20
	3	10.4141	601	30.05	20
Total					$\overline{60}$
$H^* = 1.26 < X^2(0.95; 2) = 5.99 \quad P > 0.05$					
Negro	1	23.5417	632	31.60	20
	2	24.0434	690	34.50	20
	3	22.8320	508	25.40	20
Total					$\overline{60}$
$H^* = 4.04 < X^2(0.95; 2) = 5.99 \quad P > 0.05$					
Rojo	1	28.8969	700	35.00	20
	2	28.4257	631	31.60	20
	3	27.6653	499	24.95	20
Total					$\overline{60}$
$H^* = 4.67 < X^2(0.95; 2) = 5.99 \quad P > 0.05$					

\bar{x}^* = promedio.

H^* (calculado) = se interpreta como si fuera una distribución con grados de libertad igual al número de muestras menos uno.

X^2 = valor de la distribución teórica de ji cuadrado.

a = microgramos de ácido tánico/ml de extracto.

Prueba de Bartlett - Método de Hagerman-Butler expresados como mcg de ácido tánico/ml extracto

Frijol	serie	g.L.	S.C.	s ²	log s ²	(n-1) log s ²	1/n-1
Blanco	nivel 1	19	45.6749	2.3039	0.3625	6.8868	0.0526
	nivel 2	19	16.3270	0.8594	-0.0658	-1.2503	0.0526
	nivel 3	19	11.4050	0.6003	-0.2216	-4.2110	0.0526
Total Común		<u>57</u>	<u>73.4078</u>	1.2879	0.1099	<u>1.4255</u> 6.2624	<u>0.1578</u>
$X^{2*} = 10.88 > X^2(0.95; 2) = 5.99 \text{ P} < 0.05$							
Negro	nivel 1	19	411.4477	21.6551	1.3356	25.3756	0.0526
	nivel 2	19	366.5948	19.2945	1.2854	24.4232	0.0526
	nivel 3	19	368.2595	19.3821	1.2874	24.4605	0.0526
Total Común		<u>57</u>	<u>1146.3020</u>	20.1106	1.3034	<u>74.2593</u> 74.2949	<u>0.1578</u>
$X^{2*} = 0.08 < X^2(0.95; 2) = 5.99 \text{ P} > 0.05$							
Rojo	nivel 1	19	31,068.101	1635.1632	3.2136	61.0576	0.0526
	nivel 2	19	26,434.165	1391.2718	3.1434	59.7248	0.0526
	nivel 3	19	30,954.867	1629.2036	3.2120	61.0276	0.0526
Total Común		<u>57</u>	<u>88,457.133</u>	1551.8795	3.1909	<u>181.8100</u> 181.8790	<u>0.1578</u>
$X^{2*} = 0.16 < X^2(0.95; 2) = 5.99 \text{ P} > 0.05$							

g.L. = grados de libertad.
 S.C. = suma de cuadrados.
 s² = varianza.
 X^{2*} = ji cuadrado calculado.
 X² = ji cuadrado crítico.

CUADRO 6

Análisis de Varianza - Método de Hagerman-Butler

Frijoles negros:

Origen de Variación	g.L.	S.C.	C.M.	F	F crítica al 5%
entre niveles	2	9.978	4.989	0.24*	3.17
dentro niveles	57	1146.376	20.112		
Total	59	1156.354			

* no significativo.

Frijoles rojos:

Origen de Variación	g.L.	S.C.	C.M.	F	F crítica al 5%
entre niveles	2	1,037.26	518.63	0.59*	3.17
dentro niveles	57	49,792.08	873.55		
Total	59	50,829.08			

* no significativo.

g.L. = grados de libertad.

S.C. = suma de cuadrados.

C.M. = cuadrados medios.

F = valor de la distribución teórica de F.

CUADRO 7

Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis

Frijol blanco	nivel	\bar{x}^* mcg/ml	Orden	\bar{x}^* del Orden	n
	1	5.8051	775.5	38.78	20
	2	5.0821	619.5	30.98	20
	3	4.5644	435.0	21.75	20
Total					60

$$H^* = 10.78 \chi^2 (0.95; 2) = 5.99 \quad P < 0.05$$

\bar{x}^* = promedios

H^* = se interpreta como una distribución de χ^2 con grados de libertad igual al número de muestras menos uno.

CUADRO 8

**Resumen estadístico de los resultados de la determinación de taninos
(expresados como ácido tánico) por el método de Hagerman-Butler en
frijoles blancos, negros y rojos**

Color de frijol	ml de extracto	\bar{x}^a mcg/ml	+ D.E.^{b,1}	C.V.^{c,2} %
Blanco	2.5	5.81	+ 1.55	27
	5.0	5.08	+ 0.93	18
	10.0	4.56	+ 0.77	17
Negro	2.0	28.18	+ 4.65	16
	4.0	29.12	+ 4.39	15
	8.0	28.35	+ 4.40	16
Rojo	0.25	574.70	+ 40.44	7
	0.50	566.41	+ 37.30	7
	1.00	565.41	+ 40.36	7

a = promedio.

b = desviación estándar.

c = coeficiente de variación.

1 = Promedios iguales (ANOVA) excepto frijol blanco (Kruskal-Wallis).

2 = Variabilidades iguales excepto frijol blanco (Bartlett).

CUADRO 9

Ecuaciones de regresión entre el Método de Folin-Denis y Hagerman-Butler

Ecuación de regresión	r	Significancia	n
(X = método de Folin-Denis; Y = método de Hagerman-Butler)			
<u>Frijoles blancos</u>			
Y = 6.843 + (-0.219) X	-0.24	N.S.	20
<u>Frijoles negros</u>			
Y = 45.551 + (-0.754) X	-0.27	N.S.	20
<u>Frijoles rojos</u>			
Y = 891.095 + (-11.768) X	-0.40	N.S.	20
<u>Todos los frijoles</u>			
Y = -318.341 + (25.496) X	0.72	S.	60
<u>Frijoles negros y rojos</u>			
Y = -1733.759 + (80.427) X	0.84	S.	40

N.S. = no significativo (P > 0.05).

S. = significativo (P < 0.05).

CUADRO 10

Cambios de polifenoles en frijol crudo durante el almacenamiento a 5°C, expresados como ácido tánico (g %)

	1 marzo F.D. $\bar{x} * \pm D.E. **$	2 junio F.D. $\bar{x} * \pm D.E. **$	3 marzo H.B. $\bar{x} * \pm D.E. **$	4 junio H.B. $\bar{x} * \pm D.E. **$
Frijol				
Rojo	1.383 \pm 0.07	1.419 \pm 0.05	2.827 \pm 0.208	1.771 \pm 0.038
Negro	1.142 \pm 0.08	1.262 \pm 0.02	0.035 \pm 0.006	0.074 \pm 0.003
Blanco	0.521 \pm 0.04	0.527 \pm 0.02	0.003 \pm 0.001	0.012 \pm 0.001

F.D. = Folin-Denis.

H.B. = Hagerman-Butler.

* = promedio.

** = desviación estándar.

CUADRO 11

**Cambios de compuestos polifenólicos en frijoles crudos y cocidos
y secados con caldo y sin caldo**

(gramos de ácido tánico por 100 g)

Frijol	Color de frijol		
	Rojo	Negro	Blanco
	(Folin-Denis)*		
Crudo	1.419	1.264	0.527
Con caldo	0.919	0.866	0.334
% de Reducción	35.2	31.4	36.6
Sin caldo	0.694	0.760	0.264
% de Reducción	51.1	39.8	49.9
	(Hagerman-Butler)*		
Crudo	1.177	0.074	0.012
Con caldo	0.076	0.032	0.009
% de Reducción	93.5	56.8	25.0
Sin caldo	0.051	0.025	0.008
% de Reducción	95.7	66.2	33.3

* gramos de ácido tánico por 100 g.

CUADRO 12

Contenido de nitrógeno y proteína cruda de los materiales utilizados en los ensayos de digestibilidad

Frijol cocido y secado	Color	% de nitrógeno		% de proteína cruda (% N x 6.25)	
		$\bar{x}^* \pm$	D.E. **	$\bar{x}^* \pm$	D. E. **
Con caldo	Rojo	4.2322	± 0.06	26.45	± 0.37
	Negro	3.8804	± 0.08	24.25	± 0.47
	Blanco	4.2767	± 0.02	26.73	± 0.13
Sin caldo	Rojo	4.3133	± 0.02	26.96	± 0.45
	Negro	4.0016	± 0.05	25.01	± 0.30
	Blanco	4.3506	± 0.07	27.16	± 0.42

* promedio.

** desviación estándar.

CUADRO 13

Ingesta y excreción de nitrógeno y porcentaje de digestibilidad aparente

Material	Ingesta de N		Excreción de N		D. A.*** %	
	$\bar{x}^* \pm$	D.E.**	$\bar{x}^* \pm$	D.E.**	$\bar{x}^* \pm$	D.E.**
Caseína	2.08	± 0.32	0.16	± 0.03	92.43	± 1.95
Leche descremada	2.00	± 0.26	0.27	± 0.05	86.34	± 1.47
Frijol con caldo:						
Blanco	1.53	± 0.56	0.41	± 0.15	73.21	± 3.63
Rojo	1.34	± 0.30	0.41	± 0.10	69.56	± 4.96
Negro	1.34	± 0.49	0.49	± 0.23	64.51	± 9.05
Frijol sin caldo:						
Blanco	1.26	± 0.56	0.36	± 0.18	71.97	± 3.28
Rojo	1.54	± 0.55	0.43	± 0.16	71.96	± 2.78
Negro	1.12	± 0.37	0.34	± 0.10	68.83	± 4.81

* promedio.

** desviación estándar.

*** digestibilidad aparente.

CUADRO 14

Análisis de varianza de dos vías - Digestibilidad in vivo

Origen de variación	g.L.	S.C.	C.M.	F	F crítica al 5%
Tratamiento (con caldo y sin caldo)	1	40.15	40.15	2.17	4.08
Color	2	294.11	147.06	7.77	3.21
Tratamiento x color	2	398.04	199.02	10.55*	3.21
error	42	794.86	18.92		
Total		<u>1527.15</u>			

* significativo.
g.L.= grados de libertad.
S.C.= suma de cuadrados.
C.M.= cuadrados medios.
F. = valor de la distribución teórica de F.

CUADRO 15

Contenido de polifenoles totales y porcentaje de digestibilidad aparente
en dietas utilizadas en el ensayo con ratas

Frijol	Color	Polifenoles totales (Folin-Denis)		D. A.*** %
		\bar{x}^*	\pm D.E.**	$\bar{x}^* \pm$ D.E.**
Con caldo	Negro	0.357	\pm 0.02	64.51 \pm 9.05
	Rojo	0.348	\pm 0.01	69.56 \pm 4.96
	Blanco	0.125	\pm 0.01	73.21 \pm 3.63
Sin caldo	Negro	0.304	\pm 0.01	68.83 \pm 4.81
	Rojo	0.257	\pm 0.01	71.96 \pm 2.78
	Blanco	0.098	\pm 0.01	71.97 \pm 3.28

* promedio.
** desviación estándar.
*** digestibilidad aparente.

CUADRO 16

Resultados de análisis estadístico para medir la reproducibilidad del método de Digestibilidad in vitro en materias primas

Materiales	\bar{x}^* + $\frac{\%}{\%}$ D.E.**	C.V.*** %
Caseína	93.96 + 3.48	5
Leche descremada	85.12 + 4.98	5
Frijol cocido:		
Blanco	44.17 + 4.93	10
Negro	47.68 + 4.76	9
Rojo	44.19 + 3.57	10

* promedio.
 ** desviación estándar.
 *** coeficiente de variación.

CUADRO 17

Resultados del porcentaje de digestibilidad in vivo e in vitro en dietas

Dietas a base de:	Digestibilidad <u>in vitro</u>			Digestibilidad <u>in vivo</u>		
	\bar{x}^*	+ %	D.E.**	\bar{x}^*	+ %	D.E.**
Caseína	92.60	+ 2.99		92.43	+ 1.95	
Leche descremada	87.57	+ 2.72		86.34	+ 1.47	
Frijoles con caldo:						
Negro	51.83	+ 5.70		64.51	+ 9.05	
Rojo	49.74	+ 3.99		69.56	+ 5.14	
Blanco	43.32	+ 2.00		73.21	+ 3.63	
Frijoles sin caldo:						
Negro	66.20	+ 5.66		68.83	+ 4.81	
Rojo	52.03	+ 5.86		71.96	+ 2.78	
Blanco	53.47	+ 7.58		71.97	+ 3.28	

* promedio.
 ** desviación estándar.

CUADRO 18

Análisis de varianza de dos vías - Digestibilidad in vitro

Origen de variación	g.L.	S.C.	C.M.	F	F crítica al 5%
tratamiento (con caldo y sin caldo)	1	986.09	986.09	490.08*	4.08
color	2	976.07	488.04	242.55*	3.21
tratamiento x color	2	2243.50	1121.75	557.50	3.21
error	42	84.51	2.01		
Total		4290.17			

* **significativo.**

g.L. = grados de libertad.

S.C. = suma de cuadrados.

C.M. = cuadrados medios.

F. = valor de la distribución teórica de F.

CUADRO 19

**Porcentaje de hidrólisis por la actividad de la tripsina en frijoles
crudos y frijoles cocidos con caldo y sin caldo**

Frijol	Color		
	Blanco	Negro	Rojo
	% de digestibilidad <u>in vitro</u>		
Crudo	30.20	18.82	18.10
Con caldo	43.32	49.74	51.85
% de hidrólisis	23.00	63.70	63.60
Sin caldo	53.47	66.20	52.03
% de hidrólisis	34.20	71.60	65.20

CUADRO 20

Ecuación de regresión entre la digestibilidad in vivo e in vitro

Ecuación	r	r ²	D.E.*	Significancia
(X = digestibilidad <u>in vitro</u> ; Y = digestibilidad <u>in vivo</u>)				
Y = 117.440 + (-1.775)X + (0.016) X ²	0.87	75.0	5.06	S**

* desviación estándar.

** significativo (P<0.05).

r = coeficiente de correlación.

r² = coeficiente de determinación.

CUADRO 21

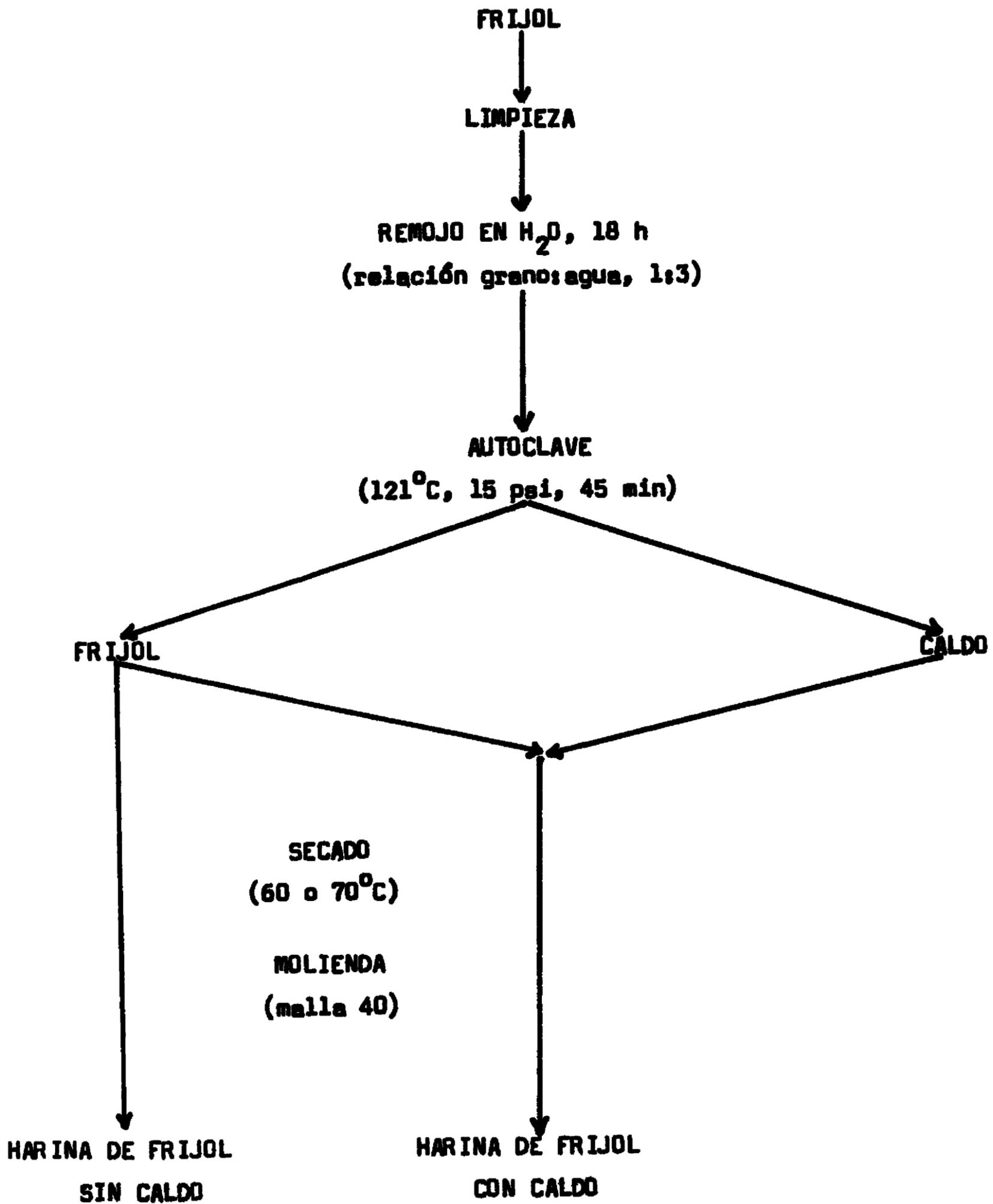
Digestibilidad estimada in vivo y su comparación con el valor in vivo

Muestra	Digestibilidad <u>in vivo</u> (%)	Dig. estimada <u>in vivo</u> (%)
Caseína	92.43	90.40
Leche descremada	86.34	84.80
Frijol con caldo:		
Blanco	73.21	70.58
Negro	64.51	68.88
Rojo	69.96	68.96
Frijol sin caldo		
Blanco	69.08	69.08
Negro	68.83	70.50
Rojo	71.96	68.88

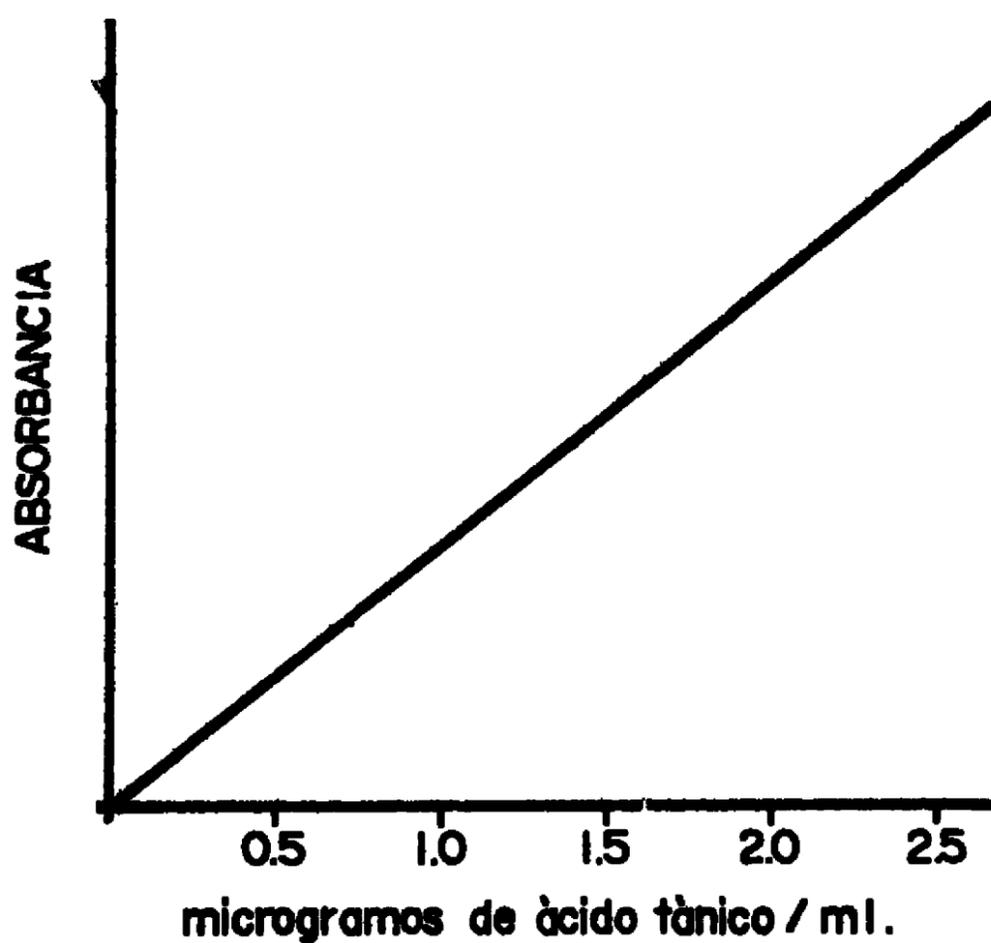
* digestibilidad estimada in vivo obtenida por la ecuación de regresión presentada en el Cuadro 20.

FIGURA 1

Diagrama de flujo
PREPARACION DE FRIJOL COCIDO

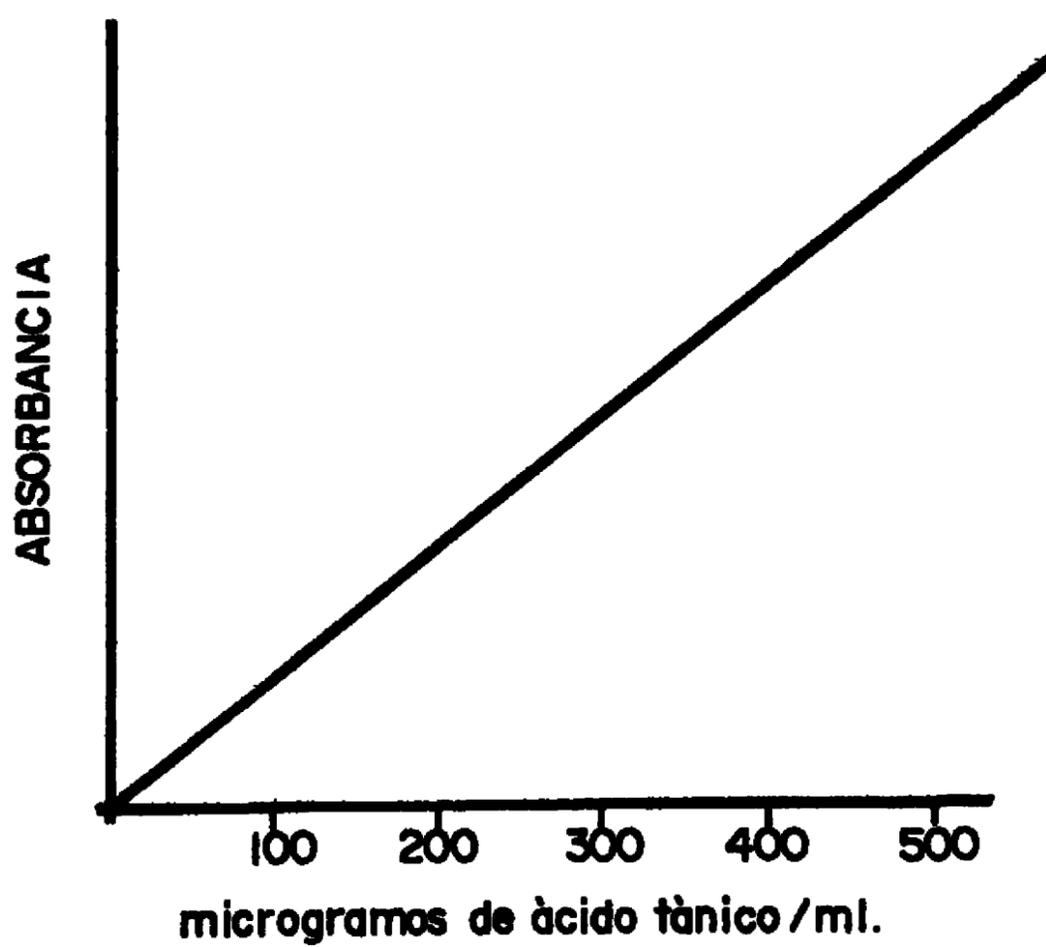


CURVA ESTANDAR DE ACIDO TANICO - METODO FOLIN-DENIS



(figura-2)

CURVA ESTANDAR DE ACIDO TANICO - METODO HAGERMAN-BUTLER



(figura-3)

FIGURA 4

Diagrama de Flujo
EXTRACCION DE TANINOS EN LEGUMINDSAS

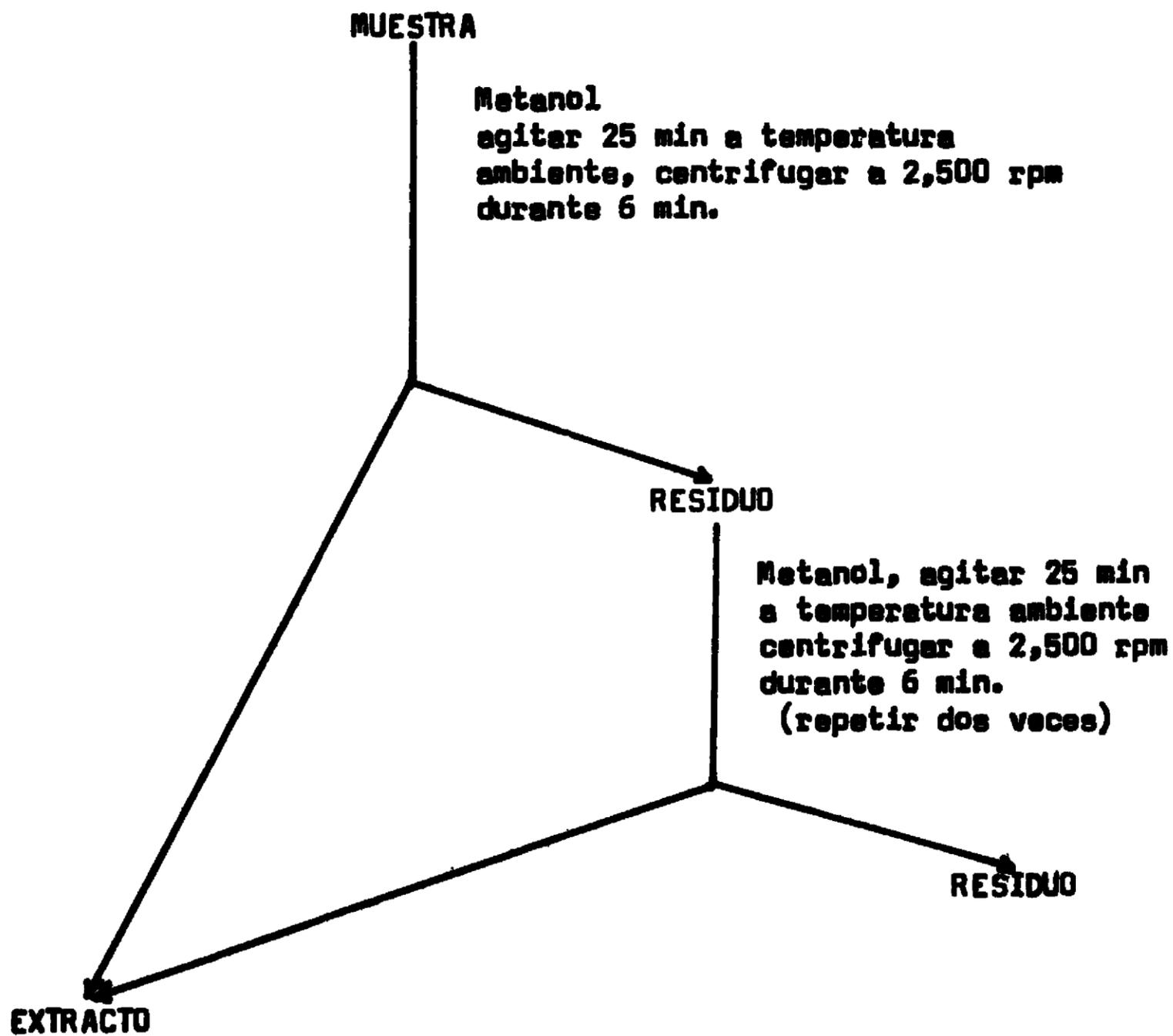
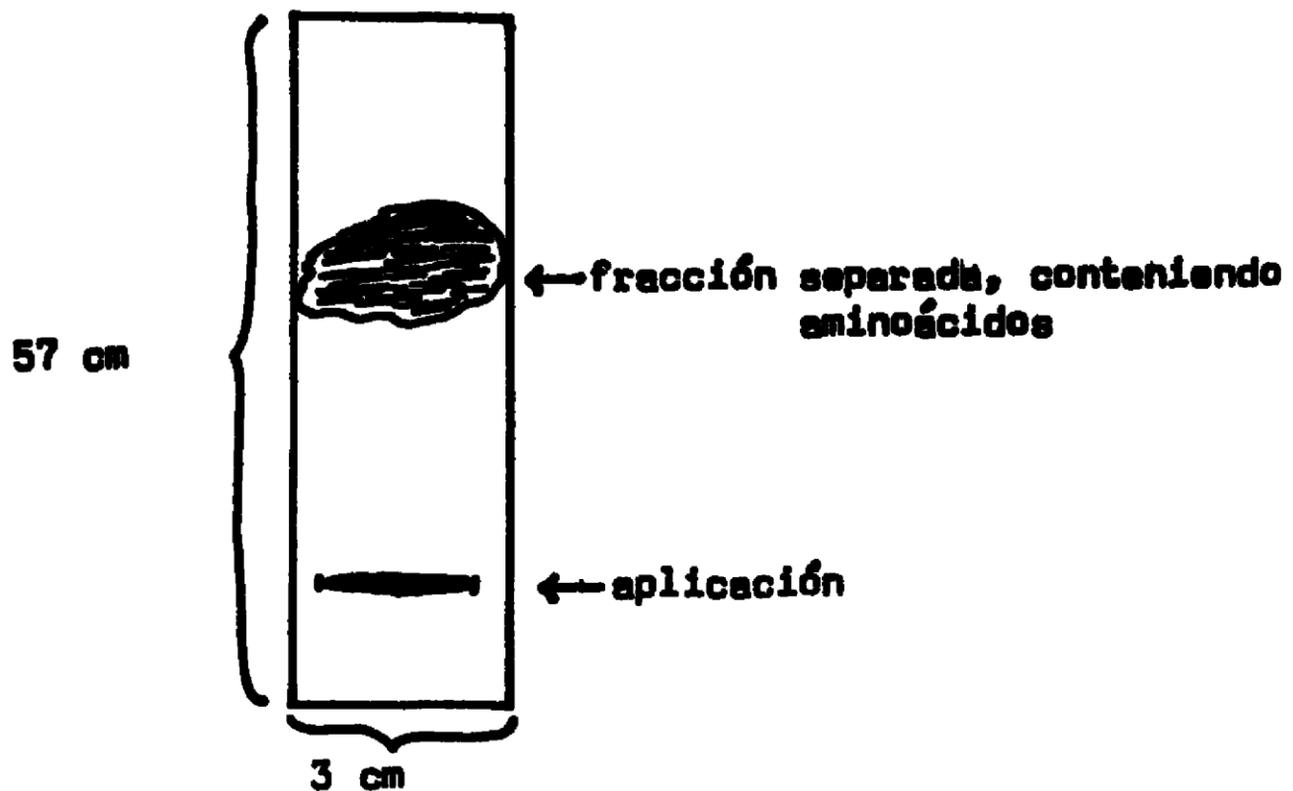
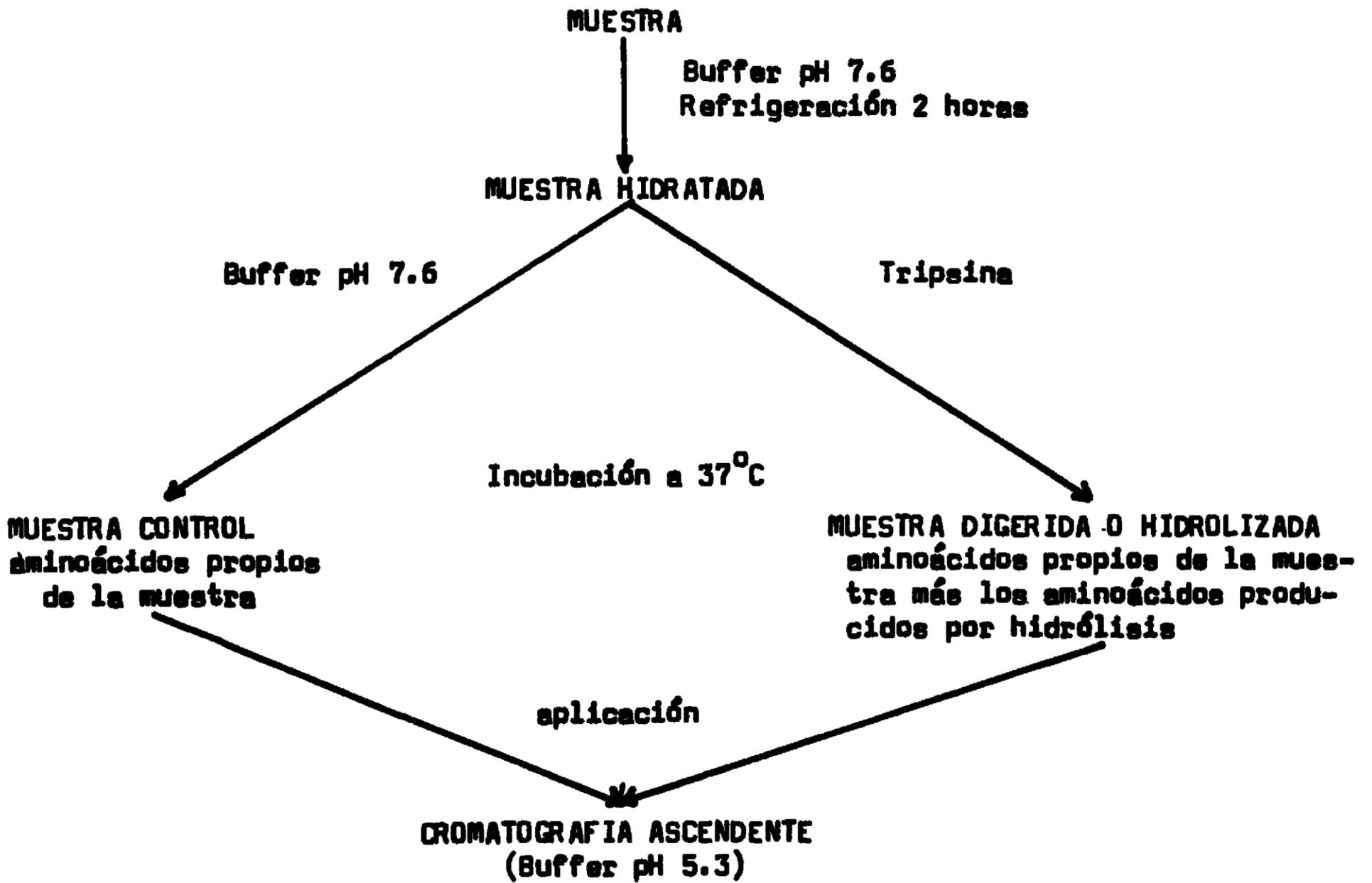


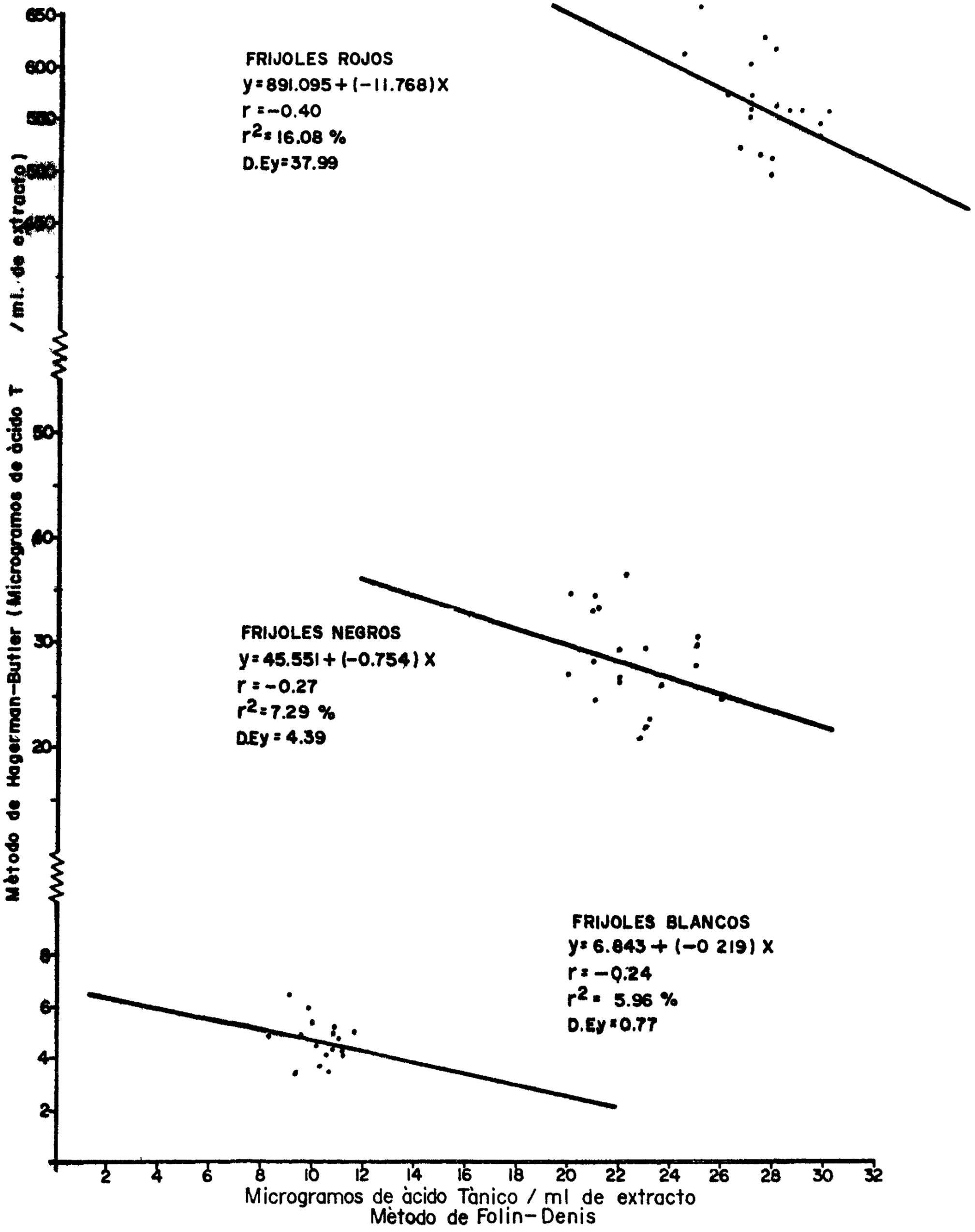
FIGURA 5

Diagrama de flujo

PROCEDIMIENTO DE DIGESTIBILIDAD IN VITRO

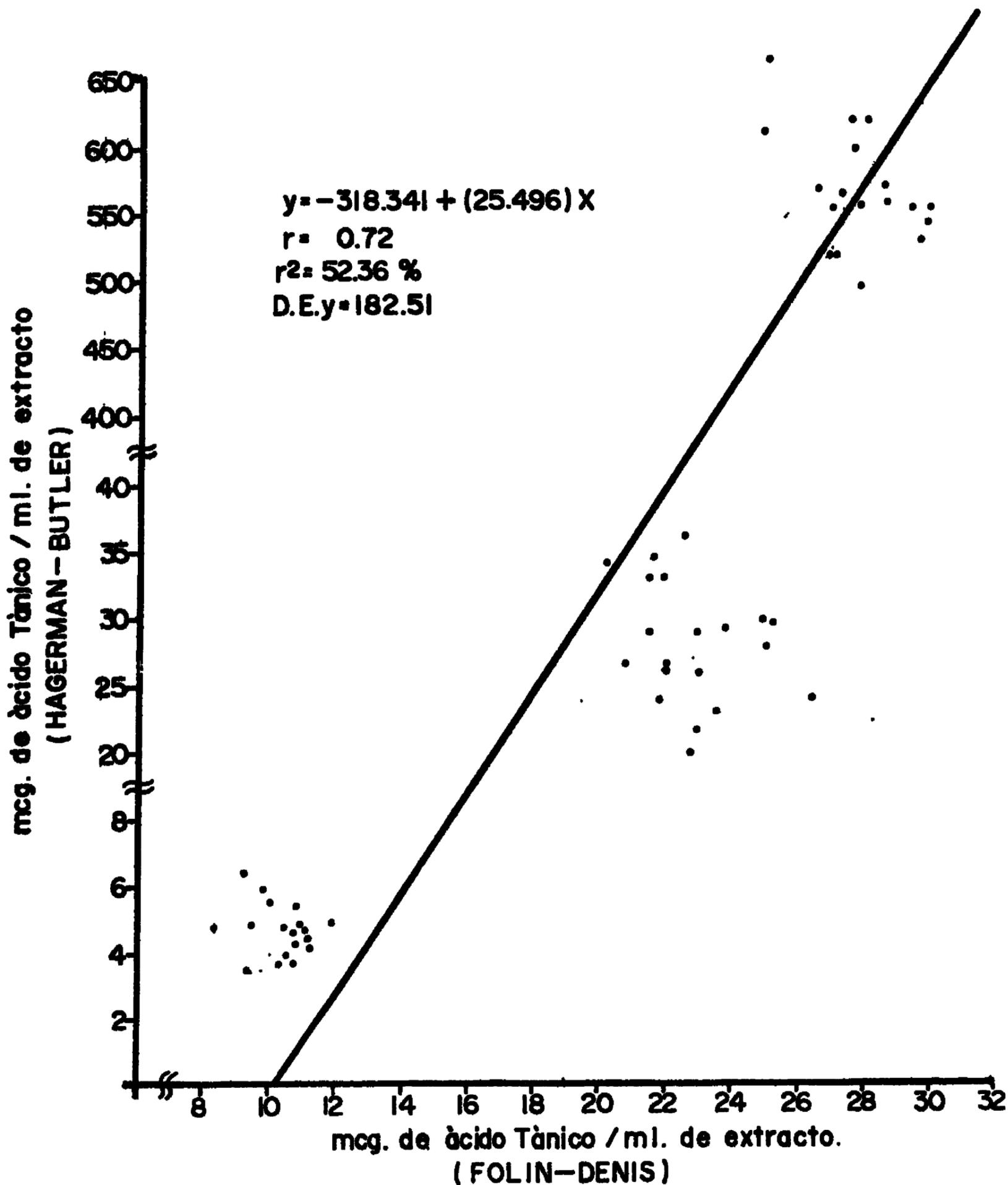


LINEAS DE REGRESION ENTRE METODO DE FOLIN-DENIS Y HAGERMAN-BUTLER ,
PARA CADA COLOR DE FRIJOL



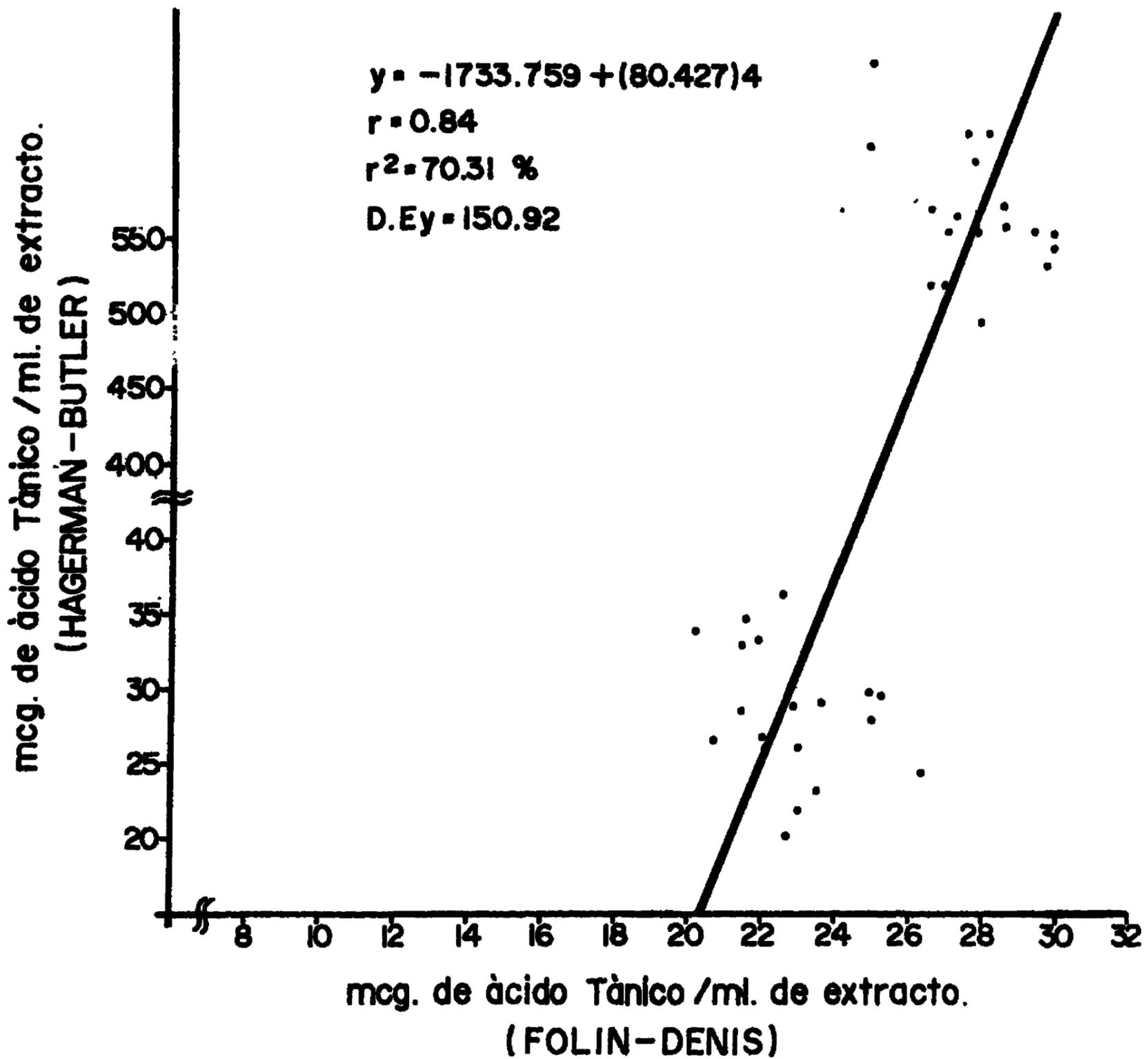
(figura-6)

**LÍNEA DE REGRESION ENTRE METODO DE FOLIN-DENIS Y HAGERMAN-BUTLER
PARA TODOS LOS COLORES DE FRIJOL**



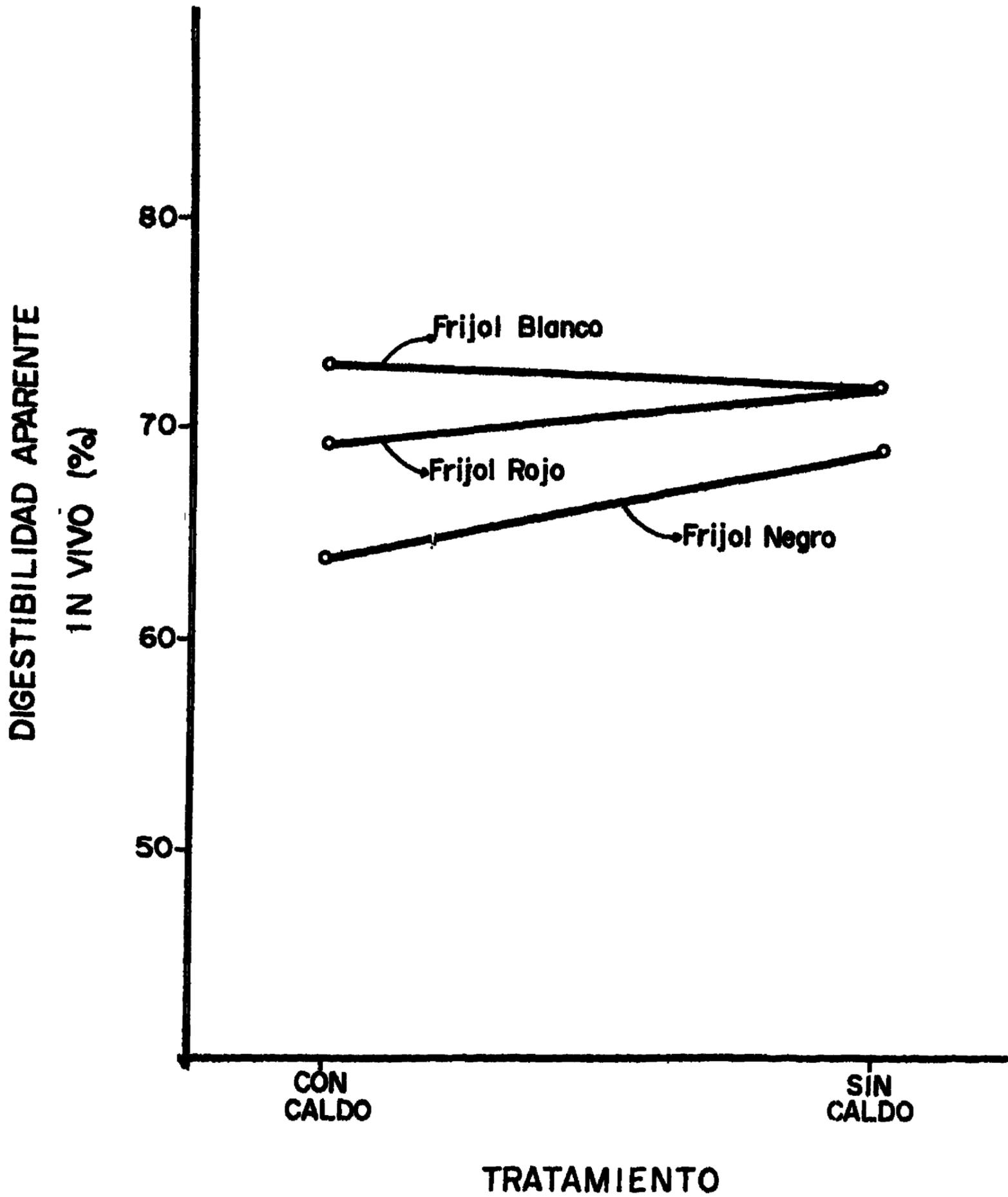
(figura - 7)

Línea de Regresión entre el Método de Folin-Denis y Hagerman-Butler,
para los valores de frijoles Negros y Rojos



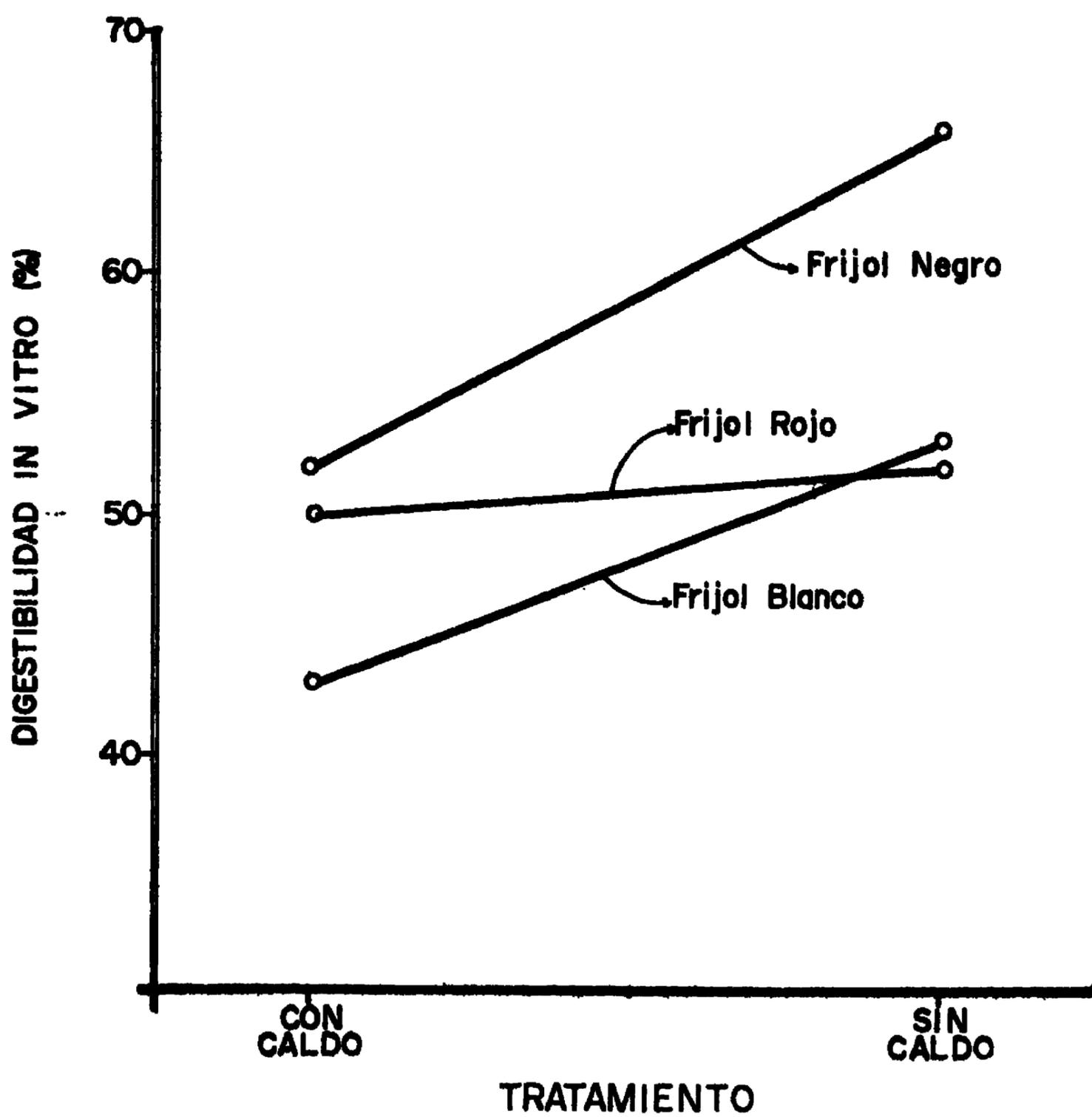
(figura-8)

INTERACCION ENTRE COLOR Y TRATAMIENTO SOBRE LA DIGESTIBILIDAD IN VIVO



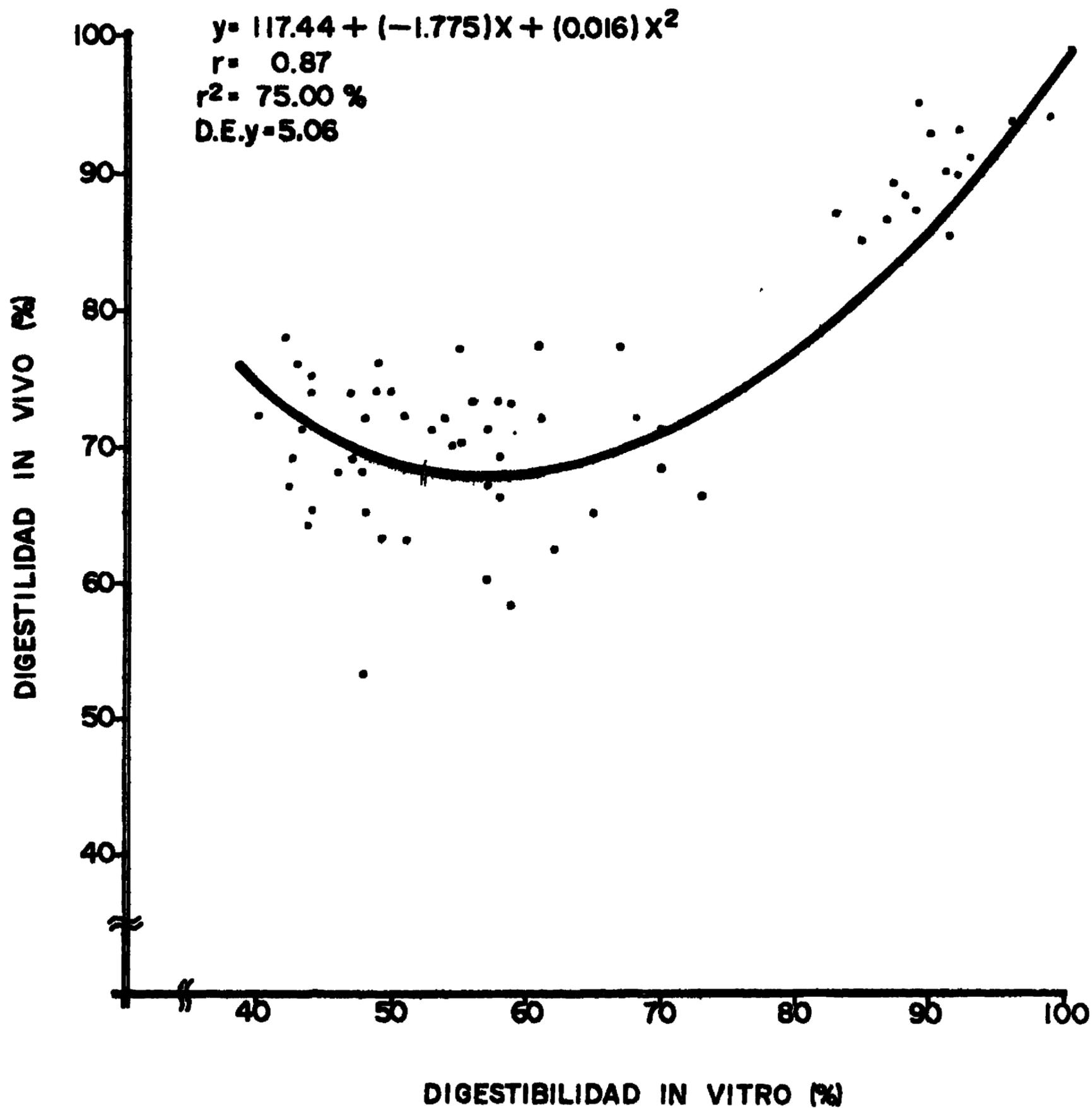
(figura-9)

INTERACCION ENTRE COLOR Y TRATAMIENTO SOBRE LA DIGESTIBILIDAD IN VITRO



(figura-11)

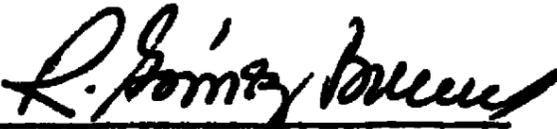
CURVA DE REGRESION CUADRATICA ENTRE
DIGESTIBILIDAD IN VITRO E IN VIVO



(figura-12)


Deydamia Rodríguez de Mora

Vo.Bo. Comité de Tesis


Dr. Roberto Gómez Brenes


Dr. Luiz G. Elías


Dr. Ricardo Bressani

R. Flores
Lic. Rafael Flores


Dr. María R. Molina

Imprímase:


Dr. José Héctor Aguilar A.
Decano de la Facultad de
Ciencias Químicas y Farmacia