

**Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia**

**DESARROLLO DE UN METODO PARA LA
CUANTIFICACION DE INHIBIDORES DE
TRIPSINA EN FRIJOL COMUN
(Phaseolus vulgaris). PARA SU APLICACION
EN CONTROL DE CALIDAD.**

JOSE ROMEO DE LEON ARRIBAS

Guatemala, Abril 1992

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

DESARROLLO DE UN METODO PARA LA CUANTIFICACION DE
INHIBIDORES DE TRIPSINA EN FRIJOL COMUN (*Phaseolus
vulgaris*). PARA SU APLICACION EN CONTROL DE CALIDAD



T-561

Guatemala, Abril 1, 1992

**JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

DECANO	LICDA. CLEMENCIA DEL PILAR GALVEZ DE AVILA
SECRETARIO	LIC. JOSE FRANCISCO MONTERROSO SALINAS
VOCAL I	LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR
VOCAL II	LICDA. THELMA ESPERANZA ALVARADO DE GALLARDO
VOCAL III	LIC. MIGUEL ORLANDO GARZA SAGASTUME
VOCAL IV	BR. TANEA RUBI RAMOS CASTELLANOS
VOCAL V	BR. HECTOR EDMUNDO DIAZ MEJIA

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Instituto de Centro América y Panamá, por su valiosa colaboración en la realización de esta investigación, especialmente el Dr. Roberto Cuevas y el Ing Leonardo de León.

A mi padres por su apoyo en todos mis estudios realizados.

C O N T E N I D O

CAP.		PAGINA
I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCION	3
III.	ANTECEDENTES	5
	III.1 Importancia y Composición Química de las Leguminosas	5
	III.2 Factores Antinutricionales	7
	III.3 Inhibidores de Proteinasas	7
	III.4 Inhibidores de Tripsina en Frijoles y su Relación con Inhibidores en Soya	10
	III.5 Métodos para Cuantificación de Inhi- bidores de Tripsina	12
IV.	JUSTIFICACION	21
V.	OBJETIVOS	23
VI.	HIPOTESIS	24
VII.	MATERIALES Y METODOS	25
	VII.1 Universo de Trabajo	25
	VII.2 Procedimiento	27
VIII.	RESULTADOS	33
IX.	DISCUSION DE RESULTADOS	46
X.	CONCLUSIONES	68
XI.	RECOMENDACIONES	70
XII.	BIBLIOGRAFIA	74
XIII.	ANEXOS	83

I. R E S U M E N

En la presente investigación se realizaron variaciones del método utilizado para la determinación cuantitativa de inhibidores de tripsina en soya; el cual se utilizaba indiferentemente para el frijol negro (*Phaseolus vulgaris*); pues los inhibidores de tripsina entre ambas leguminosas son muy similares químicamente. Los resultados obtenidos por este método no eran confiables, ni reproducibles. Se realizaron cambios al método para desarrollar una mejor metodología para el frijol crudo y cocido. Dentro de las variables introducidas al método tenemos: tamaño de partícula, solvente de extracción, factor de dilución, y tiempo de extracción. Los cálculos se llevaron a cabo por el método de CUEVAS y CHEYRAN, y KAKADE et al. para el frijol crudo; pudiéndose utilizar cualquiera pues los resultados obtenidos son similares. Mientras que para el frijol cocido únicamente se realizó por el método de KAKADE et al.

El Buffer de Fosfato pH 7.6, una hora de agitación, y 50 ml de Buffer por gramo de muestra (diluída 1 ml en 10 ml de H₂O) obtuvo los mejores resultados para el frijol crudo; mientras que el NaOH 0.1N, 3 horas de agitación y 50 ml de NaOH por gramo de muestra (sin diluir), fue para

el frijol cocido. El tamaño de partícula no tiene mayor efecto en el método.

El frijol cocido, sin embargo no mostró resultados muy reproducibles debido a la poca concentración de IT, ya que el método no es reproducible a pequeñas concentraciones de IT.

Aspectos tales como diferencias entre ambos métodos de cálculo, efecto del blanco, tamaño de las alicuotas en la medición espectrofotométrica, y porcentaje de inhibición son factores importantes que deben tomarse en cuenta para la determinación de IT.

II. INTRODUCCION

En Guatemala, como en otros países iberoamericanos, el frijol es uno de los alimentos más consumidos desde épocas remotas, por su sabor característico y especial. Esta leguminosa es consumida a nivel popular (1,2,3), y en todos los estratos sociales (2). Puede ser preparada en diferentes formas, siendo a la vez altamente nutritiva (4, 5). Por estas razones, ha sido motivo de estudio e investigación en diferentes áreas como química, agricultura, nutrición y otras, encontrándose similitudes con otras leguminosas (4,5).

En el frijol se han descubierto, al igual que en otras leguminosas, ciertos factores antinutricionales, entre los cuales están los que provocan inhibición de enzimas digestivas, como la tripsina (4,5,6). Se ha encontrado que estos inhibidores son proteínas de carácter termolábil (7); sin embargo, después de un calentamiento, aún persiste una fracción residual (8).

La metodología utilizada hasta ahora para la determinación cuantitativa de inhibidores de tripsina en frijol común, es la misma que la utilizada en la soya, la cual

también es una leguminosa (9,10). Aunque se han publicado muchos trabajos. Los cuales han modificado el método original de Kunitz (6). se han encontrado ciertos errores significativos (9,10,11,12). En el frijol, estos problemas se encuentran más acentuados, lo cual puede deberse a las diferencias químicas y físicas entre ambas leguminosas (5,

En este trabajo de investigación. se hicieron ciertas modificaciones al método estándar de la American Association of Cereal Chemists. AACC (13). para obtener resultados más precisos y exactos, tanto para el frijol negro crudo, como para el cocido. Se estudiaron las siguientes variables como: tamaño de partícula, tiempo y pH de extracción, relación soluto-solvente y tipo de solvente, determinando qué variables afectan al método. De este modo se planteó un procedimiento mejorado para la determinación cuantitativa de inhibidores de tripsina en frijol negro (Phaseolus vulgaris).

III. ANTECEDENTES

III.1 IMPORTANCIA Y COMPOSICION QUIMICA DE LAS LEGUMINOSAS

El frijol negro (Phaseolus vulgaris) ha constituido una de las fuentes más importantes de nutrientes en América Central (14). El consumo de frijol provee del 20 al 30% del total de la proteína ingerida (4). Las leguminosas son también fuente de nutrientes para una gran parte de la población mundial (15), calculándose que la cantidad de proteína proveniente de las mismas es semejante a la derivada del trigo (15). La complementación de cereales y leguminosas en proporciones adecuadas, resulta en mezclas que contienen una calidad proteica superior que la de los componentes por si mismos (4).

En Latinoamérica, Asia y Africa, varias instituciones internacionales y varios autores (4,16,17) han señalado a las leguminosas como importantes fuentes de nutrientes para los pueblos mal nutridos. En Guatemala, el consumo del caldo de frijol en niños de uno a cinco años es alto y va disminuyendo con la edad, a la vez que aumenta el consumo de frijol cocido (1,3). Tanto el caldo como el frijol pueden proveer a un adulto con 4 y 13% del requerimiento de

energía y proteínas, respectivamente, en un consumo diario de 70 gramos (18).

El frijol está formado por tres partes anatómicas: el cotiledón, que representa el mayor porcentaje en materia seca (90.5%); luego la cáscara (7.7%) y por último los ejes embrionarios (1.8%) (8). El cotiledón y los ejes embrionarios representan las partes más importantes del frijol, pues en ellas se concentra el mayor porcentaje proteico (19). El contenido proteico crudo en leguminosas varía de 18% a 32% (4,20), siendo mayor el contenido de globulinas que el de albúminas (20).

En lo referente a carbohidratos, las leguminosas contienen de un 3% a 8% de fibra cruda, y de 57% a 65% de carbohidratos solubles totales, siendo el almidón la fracción mayoritaria (aproximadamente un 30%-40%) (8).

Las leguminosas en general contienen poca grasa, variando de 1% a 6%, la cual está localizada en los esferosomas; en lo que respecta a minerales, el hierro y fósforo son encontrados en cantidades elevadas (21,22), mientras que el contenido de calcio es bajo (4). Sin embargo, la disponibilidad de éstos aún no se conoce (4,16).

En aminoácidos, el contenido de lisina es alto, mientras que existe deficiencia en aminoácidos azufrados como metionina (4). También se han reportado cantidades bajas de leucina y triptófano (4,23). Por último, las leguminosas son buena fuente de vitaminas como tiamina, riboflavina y niacina (24,25).

III.2 FACTORES ANTINUTRICIONALES

Entre los factores antinutricionales presentes en el frijol están: fitohemaglutininas, factores bociógenos, factores latíricos, factores que causan favismo, saponinas, taninos, y factores que causan flatulencia (4). Varios de estos factores son destruidos por calor, pero aún así, se ha observado que después de cocido, la digestibilidad del frijol es baja (26).

III.3 INHIBIDORES DE PROTEINASAS

Los inhibidores de proteinasas, especialmente de tripsina, son encontrados en muchos materiales biológicos y han sido estudiados extensamente (27). Muchos de ellos están presentes en las semillas, pero no están restringidos necesariamente a las mismas. Las semillas de la familia de leguminosas y tubérculos de Solonacea, son fuentes ri-

cas de inhibidores de proteinasas. Existe diversidad de inhibidores y la especificidad hacia diversas enzimas proteolíticas es amplia. Varias clases diferentes de inhibidores pueden estar presentes en un mismo tejido. La multiplicidad de inhibidores de proteinasas, puede atribuirse en parte a una asociación de unos cuantos monómeros en cada planta (28).

El significado fisiológico de los inhibidores podría involucrar un mecanismo de defensa contra insectos depredadores, regulación del metabolismo y síntesis de proteína (6,29). Los pesos moleculares de inhibidores en plantas se encuentran entre un rango de 3,000 a 25,000.

Muchos de ellos han sido aislados en forma pura y se ha caracterizado la composición aminoácida, las características químicas de los sitios reactivos, y la naturaleza de los complejos formados con proteinasas (6).

La tripsina es una enzima proteolítica; su precursor tripsinógeno es formado en las células exocrinas del páncreas y es secretado dentro del duodeno. El tripsinógeno es transformado a tripsina por la enzima enteroquinasa (30). La tripsina es bastante estable a pH 2.3. La hidrólisis enzimática involucra enlaces de grupo carboxilo

de lisina o argnina con independencia de la longitud o secuencia de la cadena (30). La formación de la proteína puede ser inhibida por iones calcio, el cual previene la agregación de las moléculas de tripsina (30).

La presencia de inhibidores de tripsina está bien establecida en semillas de legumbres (31,32). Se han aislado y caracterizado varios inhibidores tripticos de leguminosas (29,33), encontrándose pesos moleculares de 8000 con alta concentración de cistina (20%).

Racis (34,35) aisló en la soya dos inhibidores de tripsina designándolos como SBTIA₁ y Kunitz (33). Birk (36) aisló también otro inhibidor insoluble en acetona, que ahora es referido como inhibidor Bowman-Birk. Se han aislado otros inhibidores, pero de menor importancia (37). Los dos inhibidores prevalentes (Kunitz y Bowman-Birk) difieren marcadamente en tamaño, composición aminoacídica, estructura y propiedades (6). El inhibidor Kunitz es una proteína globular con un peso molecular de 8000 (37) Este inhibido tiene dos enlaces disulfuro, siendo solamente uno esencial para su actividad con la tripsina (38). El inhibido Bowman-Birk se enlaza a la tripsina por un enlace simple péptido con Lys-X o Arg-X (37).

Los inhibidores de tripsina son proteína globulares, y como tales, al ser expuestas a temperaturas altas y soluciones ácidas o básicas, sufren desnaturalización, lo cual es evidenciado por una pérdida de solubilidad en su punto isoeléctrico o en soluciones salinas. La gradual desnaturalización es acompañada por una correspondiente pérdida de su habilidad de inhibir la acción de la tripsina (33). La desnaturalización rompe los enlaces disulfuro los cuales son los centros reactivos (33).

A mayor porcentaje de humedad, en general para todas las leguminosas, los tiempos y temperaturas de cocción para inactivar los inhibidores de tripsina se ven disminuídos (37,39).

Collins y Sanders (40) encontraron que en frijoles de soya la cantidad de inhibidores de tripsina se ve incrementada, conforme avanza la maduración.

III.4 INHIBIDORES DE TRIPSINA EN FRIJOLES Y SU RELACION CON INHIBIDORES EN SOYA

En diferentes variedades de frijoles, incluyendo Phaseolus vulgaris, se han aislado varios inhibidores. Whittaker y Sgarbie (27) aislaron tres iso-inhibidores. Un iso-

inhibidor es aquel que posee modificaciones (reemplazo o adición) de residuos de aminoácidos en el sitio reactivo (6). Esos iso-inhibidores fueron muy similares entre sí, solamente distinguibles por análisis de aminoácidos y tuvieron concentraciones altas de cistina. En el frijol "garden" (Phaseolus vulgaris) se aislaron tres iso-inhibidores, los cuales fueron estrechamente semejantes en peso molecular a los inhibidores aislados de los frijoles lima, navy, mung y kidney (todos Phaseolus) y el inhibidor Bowman-Birk de soya. Ellos poseen en común peso molecular bajo (8000-10000), altos contenidos de ácido aspártico, serina y cistina y pequeñas cantidades de valina, metionina, fenilalanina y tirosina (41). Esta similitud se extendió a la estructura primaria, con parcial homología en la secuencia aminoacídica del segundo iso-inhibidor extraído con el inhibidor cuatro del frijol lima (41), y el iso-inhibidor Bowman-Birk de la soya (36). Los iso-inhibidores uno y tres tuvieron como sitios activos a la lisina y arginina respectivamente, lo cual está íntimamente relacionado con los sitios activos de los inhibidores de soya.

Pusetai (42) aisló un inhibidor de tripsina al frijol kidney (Phaseolus vulgaris). Este contenía un 15% de cistina. lo cual concuerda con los valores encontrados en la soya. En 1985, Apostolatos (43) también encontró altos va

lores de cistina en tres inhibidores de diferentes frijoles secos del Brasil (Phaseolus vulgaris).

III.5 METODOS PARA CUANTIFICACION DE INHIBIDORES DE TRIPSINA

Uno de los primeros procedimientos desarrollados para la medición de inhibidores de tripsina de soya fue el desarrollado por Kunitz en 1947 (33). Dicho método se basa en que al hidrolizar la tripsina por un sustrato (caseína); ~~la~~ ~~para~~ un compuesto, el cual absorbe cierta radiación electromagnética, y la cual puede ser medida en un espectrofotómetro. A mayor cantidad de inhibición, menor será la cantidad de producto de hidrólisis liberado por acción de la tripsina sobre el sustrato. Kakade et al. en 1969 (10) modificaron este método para obtener resultados más exactos y confiables, también en la soya. La modificación involucró el uso de 2% de caseína, en vez de 1% y el cambio por transformación matemática del valor de la absorbancia a $A^{3/2}$, obteniendo así una mejor correlación lineal entre la absorbancia y unidades de tripsina.

En 1961, Erlanger et al. (44) introdujeron el uso de un sustrato sintético Benzoll-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPA), encontrando una reacción cinética de orden cero,

entre la cantidad de p-nitroanilida liberada (amarilla) y la concentración de enzima, lo cual no es observado al utilizar caseína, bajo las condiciones definidas por Kunitz (33). La mayor afinidad de la tripsina por los sustratos sintéticos que por la caseína es debido a efectos de impedimento estérico (10). Kakade y col (10) también encontraron que la utilización de BAPA mostró resultados más confiables que al utilizar la caseína.

En el estudio realizado por Kakade *et al.* en 1969 (10), el uso de este sustrato sintético mostró ser un método más conveniente y confiable. También tomó en cuenta la naturaleza competitiva de la inhibición y este efecto fue compensado por una extrapolación de la actividad inhibitoria a cero mililitros de alícuota, al graficar unidades de tripsina inhibida (UTI) por vrs volumen de alícuotas.

Una unidad de tripsina (UT) es arbitrariamente definida en el método oficial de la AACC (13) como el incremento de la absorbancia en 0.01 unidades por 10 ml de la mezcla de reacción. La actividad inhibitoria de la tripsina es expresada en términos de unidades de tripsina inhibidas (UTI).

Al utilizar BAPA se observa una pequeña desviación de la linealidad alrededor del 55% de inhibición (10). Esta desviación puede ser atribuida a una parcial disociación del complejo inhibidor-tripsina (45).

Kakade et al. (10) extrajeron los inhibidores de soya en la siguiente forma: 1 g de muestra fue desgrasada y molida a 100 mesh, luego fue extraída con 25 ml de agua ajustando el pH a 7.6, se agitó durante una hora y 1 ml fue diluido en 50 ml de buffer de fosfato (pH 7.6).

Kakade et al., en 1974 (9), hicieron modificaciones al método, particularmente para muestras de soya cocidas, las cuales mostraban desviaciones estándar de 48%. Entre las modificaciones efectuadas están: a) extracción de muestras a pH 8.4-10 con NaOH 0.01 N.; b) las suspensiones fueron diluidas hasta concentraciones en donde 1 ml produjo una inhibición entre un 40 a 60%. Para harina cruda encontraron que no existían diferencias en tiempos de extracción (1 y 5 horas), mientras que para harina cocida, la actividad en 5 horas de extracción fue 27% mayor que la correspondiente de 1 hora. Al encontrar estas diferencias se llevaron a cabo extracciones con 1, 3, 5 y 24 horas, encontrando que 3 horas era el tiempo suficiente para obtener los máximos valores de UTI. No se determinaron di-

ferencias significativas entre el uso de extractos centrifugados y no centrifugados. El efecto de pH entre 8.4 y 10 no mostró tampoco ningún efecto significativo. Para los extractos cocidos, la concentración de inhibidores de tripsina se obtuvo promediando los valores de UTI/ml, cuando los graficaban en función de volumen de extracción.

En 1973, Rakis et al. (46), trabajando con muestras de soya, también recomendaron la extracción de NaOH 0.01 y una dilución de los extractos sin límites, utilizando agitación magnética para evitar la formación de espuma. Estos autores obtuvieron una correlación negativa al graficar UTI/ML vrs. ml de extracto, al igual que lo encontrado por Kakade et al. (9). En extractos cocidos, el comportamiento fue constante en algunos casos, mientras que en otros se manifestó un máximo en la gráfica, por lo que se determinó el valor de UTI promediando los valores obtenidos.

Smith et al. (47) no encontraron diferencias significativas al comparar las siguientes modificaciones al método de Kakade et al. de 1969 a) tiempo de extracción de 3 a 24 horas, y 2 minutos de maceración; b) pH de 8.4 y 10; c) extractos filtrados y no filtrados. A bajos niveles de inhibidor, encontraron que el método es pobre y la extra-

polación puede introducir errores. Utilizaron diferentes factores de dilución para muestra cruda, semicocida y cocida, en donde el factor de dilución fue disminuyendo respectivamente. Recomendaron que al analizar muestras con IT bajos, las suspensiones no deben ser diluidas, pudiendo contener 1 g/50 ml, debido a que en estos niveles existen pérdidas de significancia cualitativa y cuantitativa.

El método oficial de la American Association of Cereal Chemists (13), se basa en la investigación realizada por Kakade et al. en 1974 en soya (9) con las siguientes modificaciones: a) moler la muestra preferiblemente a 200 mesh en vez de a 100 mesh, b) la muestra no debe exceder de 1 g de soya.

Tan y Wong (12), trabajando con una variedad de frijol Winged (Psophocarpus tetragonolobus), modificaron la extracción utilizando NaOH 0.05N obteniendo un pH entre 9.5 y 9.8, con lo cual extrajeron la máxima cantidad de inhibidores. En esta misma variedad Lumen y Silamat (28) demostraron que el extractor más efectivo para inhibidores fue el agua. Sin embargo, en este aspecto existen contradicciones, pues en 1985 Kailasapathy et al. (48), en un estudio sobre remojo en el mismo frijol, demostraron que una solución de NaCl al 0.5% fue el mejor extractor, inclu

yendo el agua. Por otro lado en un estudio de legumbres iraquies 49 , se utilizó agua desionizada como agente extractante.

Al cuantificar en una muestra los inhibidores de tripsina, debe primeramente desgrasarse, ya que los ácidos grasos libres presentes, particularmente en productos de soya fermentados, pueden actuar como un potente inhibidor específico de tripsina, interfiriendo así con el ensayo (47).

Haberstrand et al. (11) en 1980 disminuyeron la desviación estándar del método de la AACC, midiendo la cantidad de inhibidor por cálculos de diferencias de lecturas de absorbancia y reportando la inhibición como mg de IT por gramo de muestra. La obtención de resultados decrecientes de UTI/ml vrs ml al incrementar el tamaño de la alicuota puede deberse a diversas causas, características de las reacciones enzimáticas. Es posible que se desarrolle alguna competencia entre el sustrato sintético (BAPA) y algunas proteínas diferentes a los propios inhibidores (50). Por lo tanto, al incrementar el tamaño de la muestra en la mezcla de ensayo, no sólo aumenta el contenido de inhibidores, sino también el contenido de las proteínas competitivas. Otra explicación de las desviaciones con respecto al tamaño de las alicuotas es la disociación del

complejo inhibidor-enzima, de acuerdo a lo propuesto por Green (45) También podría pensarse en que diferentes mecanismos cinéticos podrían intervenir, dependiendo del tamaño de la alicuota utilizada (50).

Algunos autores han intentado resolver los problemas encontrados al analizar inhibidores de tripsina (50). Algunas modificaciones consisten, esencialmente, además de las mencionadas anteriormente, en: a) usar un porcentaje fijo de inhibición como 35% (51) o 50% (52); b) utilizar para el cálculo de la inhibición, una ecuación polinomial de segundo grado a partir de densidad óptica, para métodos semiautomáticos (51) (dichos autores toman como referencia un 35% de inhibición de tripsina en vez de la extrapolación a 0); c) utilización de otros métodos, tales como los fluorimétricos (53), que permiten la detección de cantidades extremadamente pequeñas de inhibidores. En este método se utiliza un novedoso agente llamado florescamine y los ensayos son más precisos y menos complicados.

Una alternativa posible a lo concerniente a manipulación de datos, fue la propuesta por Cuevas y Cheyran (50), en la cual un modelo mecanístico trata de explicar matemáticamente hechos basados en la teoría y en la experimentación. Propusieron una ecuación diferencial que expresa la

ley física que posiblemente gobierna el proceso. Al resolver la ecuación se obtiene una expresión que relaciona todas las variables involucradas en el fenómeno. En el modelo se toman en cuenta los siguientes postulados: a) la reacción de hidrólisis de DL-BAPA por acción de tripsina puede ser descrita por la ecuación de Michaelis-Menten (44), lo que significa que a concentraciones pequeñas de sustrato la reacción es de primer orden y a altas concentraciones de sustrato la reacción es de orden cero; b) la actividad de los inhibidores de tripsina no sigue un comportamiento lineal con respecto a la concentración de inhibidores, y c) la cinética de inhibición corresponde a inhibición competitiva, si los inhibidores presentes son del tipo Bowmann-Birk o si los inhibidores son del tipo Kunitz. Con este método, Cuevas y Cheyran evitaron la incertidumbre y arbitrariedad al extrapolar a cero o al promediar valores de UTI/ml vrs. ml, y su modelo está basado en un modelo mecanístico, explicando los fenómenos cinéticos que ocurren en el análisis; por lo cual la solidez matemática y bioquímica del cálculo está garantizada.

En 1988 se llevó a cabo una investigación (54) sobre efectos nutricionales y antinutricionales en frijol mucuna (Mucuna utilis) y se utilizó el método de Kakade et al.

desarrollando en 1969, sin ninguna variación o comentario referente a la utilización del método en frijol.

Por último, en 1989 Liu y Markakis (55) hicieron las siguientes modificaciones: 1) utilización de agua en vez de hidróxido de sodio diluido para la extracción de inhibidores 2) el extracto acuoso es desestabilizado con Tris buffer y filtrado antes, en vez de filtrarlo después, 3) tripsina de porcino fue utilizada en vez de tripsina de bovino, 4) la enzima es adicionada al final de la mezcla de reacción y no el sustrato (BAPA) y 5) el volumen de reacción fue reducido de 10 a 4 ml. El método tiene una base teórica y fue más preciso. El método fue ensayado para la soya, sin embargo, también se utilizaron pruebas en diferentes semillas de frijoles, encontrándose resultados más altos como TIA y reduciendo la desviación estandard, al ser comparado con el método standard basado en el método de Kakade *et al* (10).

IV. JUSTIFICACION

Las leguminosas han sido y son ampliamente consumidas en América Latina por su alto valor nutritivo, buen sabor y relativo bajo costo.

El frijol negro es una fuente importante de proteína en Guatemala y Centro América. Sin embargo, contiene una amplia variedad de factores antinutricionales, tales como los inhibidores de tripsina, que limitan su utilización, por lo que han sido motivo de estudio e investigación. Por otro lado, se deben considerar los suministros de frijol como parte de la ayuda alimentaria entregada a los países de Centro América por el Programa Mundial de Alimentos, que actualmente incluye varios proyectos de ayuda alimentaria, tales como: materno-infantil, alimentación escolar y comedores populares para grupos vulnerables con algún grado de desnutrición. Por lo tanto, es necesario desarrollar métodos que sirvan de control de calidad, que permitan determinar con certeza la cantidad de inhibidores de tripsina, que afectarán el porcentaje de proteína digerida. Aunque exista una disminución en la cantidad de inhibidores de tripsina durante la cocción de los frijoles, aún persiste cierta cantidad residual que la metodología actual no permite medir con precisión.

En base a lo anterior, es evidente que es importante realizar modificaciones a la técnica y los métodos de cálculo, para obtener una metodología precisa, para uso rutinario en la industria de alimentos, en laboratorios de control de alimentos y en centros de investigación.

V. OBJETIVOS

V.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una metodología precisa, exacta y confiable para la determinación cuantitativa de inhibidores de tripsina en el frijol negro, destinada al uso rutinario de control de calidad.

V.2 OBJETIVO ESPECIFICO

Estudiar el efecto de las variables que influyen sobre la extracción y cuantificación de inhibidores de tripsina en frijol negro.

VI H I P O T E S I S

El método oficial de la AACCC (13) para la detemrination de inhibidores de tripsina en la soya, requiere adaptaciones para obtener una metodología precisa y exacta en la cuantificación de inhibidores de tripsina en el frijol negro crudo y cocido.

VII. MATERIALES Y METODOS

VII.1 UNIVERSO DEL TRABAJO

Recursos Humanos: Esta investigación fué realizada - por un estudiante con pensum de - estudios cerrado y examen privado aprobado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Recursos Materiales: Laboratorios de la División de - Ciencias Agrícolas y de Alimentos del Instituto de Nutrición - de Centro América y Panamá, INCAP.

Material de Estudio: granos de frijol negro (Phaseolus vulgaris) recién cosechados, de las variedades Tamazulapa, originario de Atescatempa y Jutiapa, Departamento de Jutiapa, Guatemala.

- Equipo:**
- Colorímetro Baush & Lomb, Spectronic 20, con juego de filtros y detector de amplio rango (340-960 nm).
 - Molino de martillo Tecator, modelo Cyclotec 1093.
 - Tamices Tyler con mesh números 30 y 60.
 - Centrífuga de alta capacidad, International Modelo V.
 - Baño de Temperatura constante Precisión - Scientific, con capacidad hasta 100°C.
 - Balanza Analítica O'Haus Modelo Galaxy.
 - Agitador Vortex para tubos de ensayo.
 - Agitador magnético Corning PC-351.
 - Aparato Soxhlett.
 - Pipetas automáticas Marca Gilson de 1-5 ml.
 - Cristalería de uso general de laboratorio - de análisis de alimentos.

Reactivos: (grado analítico)

HCl concentrado

Tris-buffer (CaCl_2 , hidroximetilmetano), 0.05M

pH 8.2 NaOH 0.01N

Tripsina cristalizada

BAPA (benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida hidrocloreuro).

Dimetil Sulfoxido

Acido Acético.

Buffer de Fosfato pH 7.6

VII.2 PROCEDIMIENTO

1. Método para la cuantificación de inhibidores de tripsina. Se utilizó como base el método propuesto por Kakade y colaboradores en 1974 (9), método oficial adoptado por la AACCC (13). A este método se le efectuaron varias modificaciones, las cuales son enumeradas a continuación: (variables independientes)

- Granulometría de la harina de frijol: 30 y 60 - mesh.
- Extracción con NaOH 0.01 y con buffer de fosfato pH 7.6.
- Tiempo de extracción 1 y 3 horas.
- Volumen de extracción 25 y 50 ml/g.

2. Preparación de Reactivos.

2.1 Tris Buffer (0.05M, pH 8.2)

Pesar 6.05 g tris y 2.95 g de CaCl₂ · 2H₂O, éstos se disuelven en 900 ml de agua y el pH es ajustado a 8.2, llevándose a un volumen de 1 litro.

2.2 Solución Sustrato

40 mg de BAPA se disuelven en 1 ml de dimetilsulfóxido y se diluye a 100 ml con tris-buffer precalentado a 37°C. La solución de BAPA se prepara en el día y es llevada a 37°C en el momento de usarse.

2.3 Solución de Tripsina

En 200 ml de una solución 0.001N de HCl son disueltos 4 mg de tripsina. Esta solución puede ser guardada en el refrigerador por 2 ó 3 semanas sin apreciable pérdida de actividad.

2.4 Preparación de Muestras

Muestras de 3-4 g de frijol crudo o cocido fueron molidos a 30 ó 60 mesh, desgrasados previamente con 10 volúmenes de éter de petróleo en Soxhlet durante 4 horas. Esta harina desgrasada fue extraída con 25 ó 50 ml del agente extractor (NaOH 0.01 N y buffer de fosfato pH 7.6) durante 1 ó 3 horas. En el caso de utilizar NaOH, el pH de la suspensión fué usualmente de 9.8 a 10.0. En el frijol crudo la suspensión fué diluída 1 en 10 para 50ml/g y 1 en 20 para 25ml/g. La suspensión fué centrifugada a 30 X 1000 RPM/5 min. El por-

fue calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{UTm - UTb}{UTm} \times 100$$

en donde UTm y UTb son preparadas en la misma manera que cualquier alícuota, es decir, de la siguiente forma:

UTm =	2 ml de agua destilada +	UTb =	1 ml de muestra +
	2 ml de tripsina +		1 ml de agua destilada +
	5 ml de BAPA +		2 ml de tripsina
	1 ml de HAc		5 ml de BAPA +
			1 ml de HAc

UTm es la muestra patrón (0% de inhibición).

UTb es la mezcla de reacción con 1ml de muestra.

2.5 Actividad Antitriptica

Una Alícuota de 0 (blanco coloreado), 0.2, 0.4 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 ml de suspensión para frijol crudo, mientras que para frijol cocido se llevaron a cabo alícuotas hasta 2.8 ml. Cada alícuota fue pipeteada dentro de cada set por triplicado y ajustado a 2 ml con agua destilada. Luego de agregar 2 ml de la solución de tripsina a cada tubo, y se colocaron en un baño de agua a 37°C.

Después de 10 min. la reacción fue terminada por la adición rápida de 1 ml de HAc al 30%. Se agitó violentamente. Los contenidos fueron filtrados en papel Whatmann No.3 y su transmitancia fué medida a 410 nm.

2.6 Blanco

El blanco fue preparado por la adición de 2ml de agua, luego la adición de 2 ml de tripsina y 1 ml de ácido acético, finalmente se adicionó 5 ml de BAPA (no coloreado).

2.7 Diagrama de Flujo de la Metodología AACC (13)

Preparación de la muestra cruda o cocida
 ┆
 Moler al mesh respectivo
 ┆
 Pesar 3-4 g
 ┆
Desgrasar en Sohlet empleando 200 ml de éter durante 4-5 h
 ┆
 Pesar 1 g de muestra
 ┆
Suspender en un agitador magnético y agitar el tiempo
 respectivo
 ┆
 Centrifugar 30*1000 RPM/5 min.
 ┆
 Filtrar
 ┆
Diluir la muestra si asi se requiere, en agua destilada
 en donde 1 ml produzca inhibición entre 40-60%
 ┆
Tomar alícuotas de 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4
 1.6, 1.8
 ┆
Ajustar el volumen a 2 ml con agua destilada
 ┆

Agregar 2 ml de tripsina

„

Llevar los tubos de ensayo a baño de María a 37°C y
agregar

„

1 ml de HAc al 30% a la hilera de tubos que sirven de
blanco

„

Agregar 5 ml de BAPA

„

Exactamente pasados 10 min. se adicionan 1 ml de HAc al
30%; Agitar

„

Filtrar los tubos y medir a una longitud de onda a 410 nm.

2.8 Cálculo de los Inhibidores de Tripsina

Se utilizó como base la metodología propuesta
por Cuevas y Cheryan (50).

VII.3 MODELO ESTADISTICO

El estudio se llevó a cabo utilizando un diseño com-
pletamente al azar con arreglo factorial 2^5 , con 3 repeti-
ciones; el diseño de tratamientos se detalla a continua-
ción (56):

FACTORES

Proceso

Molienda

Extracción

Volumen de ext.

Tiempo de ext.

NIVELES

crudo-cocido

30 mes-60 mesh

Buffer 7.6-NaOH(0.01 N)

25 ml/g - 50 ml/g

1 hora - 3 horas

$$\begin{aligned}
Y &= u + A + B + C + D + E + AB + AC + AD + AE + BC + BD + BE + CD \\
&ijklm \quad i \quad j \quad k \quad l \quad m \quad ij \quad ik \quad il \quad im \quad jk \quad jl \quad jm \quad kl \\
&\quad CE + DE + ABC + ABD + ABE + BCD + BCE + CDE + \\
&\quad km \quad lm \quad ijk \quad ijl \quad ijm \quad jkl \quad jkm \quad klm \\
&ABCD + ABCE + BCDE + ABCDE + \text{Error experimental} \\
&\quad ijkl \quad ijklm \quad jklm \quad ijklm
\end{aligned}$$

en donde:

Y = Variable respuesta

$ijklm$

u = efecto de la media general

A, B, C, \dots, D, E = Efecto de factores individuales

$AB, AC, AD, AE, BC, BD, BE, CD, CE, DE$ = efecto de dobles interacciones.

$ABD, ABD, ABE, BCD, BCE, CDE$ = efecto de triples interacciones.

$ABCD, ABCE, BCDE$ = efecto de interacciones de cuarto orden

$ABCDE$ = efecto de interacciones de quinto orden.

Error experimental asociado a la $ijklm$ = ésima unidad experimental. Se realizó un análisis de varianza con una significancia del 0.05 entre los factores. Una vez determinado que factores y combinaciones tuvieron diferencias significativas, se procedió a realizar pruebas de Tukey y así determinar cuáles factores y combinaciones de niveles tuvieron diferencia significativa. Para éstos análisis se utilizó el programa estadístico para computadora personal SAS (SAS Institute, Inc. SAS Circle, Cary, NC, 27512-8000, USA)

VIII. RESULTADOS

VIII.1. Frijol Crudo. Método de Cálculo de Cuevas y Cheryan (53).

A continuación se muestra el significado estadístico de los efectos de las variables y sus interacciones sobre el valor de inhibidores de tripsina obtenido, donde existió diferencia significativa.

TABLA No. 1

EFECTO DE VARIABLES INDEPENDIENTES Y SUS INTERACCIONES

VARIABLE	P
Tamaño de partícula	0.0339
Solvente	0.0001
Tiempo	0.0187
Solvente-dilución	0.0021
Tamaño-solvente-dilución	0.0094
Solvente-tiempo	0.0004

Puede verse de la Tabla No.1 que el tamaño y tiempo como variables independientes poseen efectos significativos, pero no de la misma magnitud, como los de el solvente y las interacciones de esta variable. Los valores mayores obtenidos de UTI/ml fueron para un tamaño de partícula -

de 60 mesh, 1 hora de tiempo de extracción y buffer de fosfato como solvente.

Respecto a las diferencias obtenidas entre las variables dependientes se realizó análisis de Tukey, para determinar si existía diferencia significativa entre las posibles combinaciones para cada grupo de variables. Las tablas 2, 3, y 4 muestran estos resultados.

TABLA No.2
EFECTOS DE LA COMBINACION SOLVENTE-DILUCION

SOL.	DIL.	UTI/ml	Significado*
Buffer	1g/25ml	34.84	c
Buffer	1g/50ml	40.95	d
NaOH	1g/25ml	27.70	b
NaOH	1g/50ml	20.39	a

Se aprecia en la Tabla No.2 que existen diferencias significativas entre todas las combinaciones. El solvente buffer obtuvo los mayores valores de UTI/ml, siendo el factor de dilución 1g/50ml, más alto.

* Letras diferentes indican diferencias significativas - (P<0.05), en esta tabla y las subsiguientes).

TABLA No. 3

EFFECTOS DE COMBINACION DE TAMANO-SOLVENTE-DILUCION

TAMANO	SOLVENTE	DILUCION	UTI/ml	SIGNIFICADO
60	BUFFER	1g/25ml	42.04	c
60	BUFFER	1g/50ml	40.13	c
30	BUFFER	1g/25ml	29.07	b
30	BUFFER	1g/50ml	41.49	c
60	NaOH	1g/25ml	28.58	b
60	NaOH	1g/50ml	24.52	b
30	NaOH	1g/25ml	26.82	b
30	NaOH	1g/50ml	17.64	a

Los primeros valores (c) fueron muy similares, no existiendo diferencia significativa entre ellos, pero si con respecto al NaOH, lo cual indica nuevamente que el extractor buffer es superior al NaOH. Por otro lado, respecto al tamaño y dilución no se puede determinar cuál nivel es mejor. Sin embargo podríamos afirmar en términos generales que a 60 mesh, 1g/25ml y buffer son las mejores condiciones para esta combinación, ya que poseen los valores mayores de UTI/ml.

TABLA No.4 EFECTO DE LA COMBINACION DE SOLVENTE-TIEMPO

SOLVENTE	TIEMPO	UTI/ml	SIGNIFICADO
BUFFER	1 hora	35.90	c
BUFFER	3 horas	39.99	c
NaOH	1 hora	29.16	b
NaOH	3 horas	18.64	a

Para el caso de extracción con buffer no se encontraron diferencias significativas respecto al tiempo ($P \ll 0.05$), pero si con respecto al NaOH. Esto confirma también que el buffer es el mejor extractor y que un tiempo de una hora podría ser adecuado para extraer a los inhibidores de tripsina en frijol crudo.

VIII.2 FRIJOL CRUDO. METODO DE CALCULO DE KAKADE *et al.* (9)

En la tabla No. 5 se muestran los efectos de las diferentes variables, y su significado estadístico, sobre los inhibidores de tripsina, utilizando el método de cálculo de Kakade *et al.* (9).

TABLA No. 5. EFECTO DE VARIABLES INDEPENDIENTES Y SUS INTERACCIONES

VARIABLE	F
SOLVENTE	0.0001
TIEMPO	0.0009
SOLVENTE-DILUCION	0.0002
SOLVENTE-TIEMPO	0.0001
TAMAÑO-SOLVENTE-DILUCION-TIEMPO	0.0085

Por el método de calculo de Kakade *et al.* (9) para los efectos del solvente y del tiempo, al igual que por el método de Cuevas existió diferencia significativa. Los valores mayores de UTI obtenidos para el solvente y tiempo fueron para el solvente buffer y 60 mesh respectivamente.

A continuación se muestran los análisis de Tukey para las combinaciones que poseen diferencia significativa

TABLA No.6 EFECTO DE LAS COMBINACIONES SOLVENTE-DILUCION

SOLVENTE	DIL.	UTI/ml	SIGNIFICADO
BUFFER	1g/25ml	24.95	c
BUFFER	1g/50ml	28.76	d
NaOH	1g/25ml	19.47	b
NaOH	1g/50ml	15.16	a

Al realizar análisis de Tukey, se encontraron diferencias significativas entre todos los tratamientos. El solvente buffer obtuvo los mayores valores de UTI/ml. siendo el más alto el factor de dilución 1g/50ml.

TABLA No.7 EFECTO DE LA COMBINACION SOLVENTE-TIEMPO

SOLVENTE	TIEMPO	UTI/ml	SIGNIFICADO
BUFFER	1 hora	26.09	c
BUFFER	3 horas	27.62	c
NaOH	1 hora	21.60	b
NaOH	3 horas	13.02	a

La Tabla 7 muestra que existe diferencia significativa, únicamente entre los valores con solvente buffer con respecto al solvente NaOH. Los dos primeros valores no poseen diferencia significativa entre sí. En este caso es indiferente el tiempo de agitación, aunque para NaOH es mejor agitar 1 hora.

**TABLA No.8 EFECTO DE LAS COMBINACIONES DE TAMAÑO-SOLVENTE
-DILUCION**

TAMAÑO	SOLVENTE	DILUCION	UTI/ml	SIGNIFICADO
30 mesh	BUFFER	1g/50ml	30.81	b
30 mesh	BUFFER	1g/25ml	20.78	a
60 mesh	BUFFER	1g/50ml	26.71	b
60 mesh	BUFFER	1g/25ml	29.12	b
30 mesh	NaOH	1g/50ml	13.00	a
30 mesh	NaOH	1g/25ml	20.42	a
60 mesh	NaOH	1g/50ml	17.32	a
60 mesh	NaOH	1g/25ml	18.53	a

Los valores indicados con b en la Tabla 8 poseen diferencia significativa respecto a los demás valores. Esto indica que el solvente buffer fue el mejor extractor, y dos de estos tres valores fue dilución 1g/50ml. Respecto al tamaño de partícula no existe diferencia significativa en ambos solventes.

TABLA No. 9 EFECTO DE LA COMBINACION TAMANO-SOLVENTE

DILUCION-TIEMPO

TAMANO	SOLVENTE	DILUCION	TIEMPO	UTI/ml	SIGNIFICADO
30 mesh	BUFFER	1g/50ml	1 hora	31.72	c
50 mesh	BUFFER	1g/50ml	1 hora	24.20	a
30 mesh	BUFFER	1g/25ml	1 hora	20.64	a
60 mesh	BUFFER	1g/25ml	1 hora	27.78	b
30 mesh	BUFFER	1g/50ml	3 horas	29.89	c
60 mesh	BUFFER	1g/50ml	3 horas	29.22	c
30 mesh	BUFFER	1g/25ml	3 horas	20.92	a
60 mesh	BUFFER	1g/25ml	3 horas	30.46	c
30 mesh	NaOH	1g/50ml	1 hora	17.67	a
60 mesh	NaOH	1g/50ml	1 hora	22.40	a
30 mesh	NaOH	1g/25ml	1 hora	28.16	b
60 mesh	NaOH	1g/25ml	1 hora	18.17	a
30 mesh	NaOH	1g/50ml	3 horas	8.33	a
60 mesh	NaOH	1g/50ml	3 horas	12.23	a
30 mesh	NaOH	1g/25ml	3 horas	12.68	a
60 mesh	NaOH	1g/25ml	3 horas	18.87	a

Los cuatro valores mayores (c) correspondientes al buffer no tuvieron diferencia significativa entre si. Los siguientes seis valores mayores (b) fueron significativamente diferentes con el resto de valores. Se observa un predominio del solvente Buffer como agente extractor; mien

tras que para el factor de dilución se observó un leve predominio de tres horas de extracción en los primeros valores.

VIII.3 RESULTADOS FRIJOL COCIDO

Los resultados fueron analizados por el método de cálculo de Kakade *et al.* (9), por ser el método mayormente utilizado, y haber sido la base para el método de la AACC. A continuación se muestran los efectos de las variables.

TABLA No.10 EFECTOS DE LAS VARIABLES INDEPENDIENTES Y SUS INTERACCIONES

VARIABLE	P
SOLVENTE	0.0001
DILUCION	0.0001
SOLVENTE-TIEMPO	0.0055
TAMAÑO-DILUCION-TIEMPO	0.0005
TAMAÑO-SOLVENTE-DILUCION-TIEMPO	0.0109

Como variables independientes observamos que el efecto del solvente y de la dilución poseen la menor significancia (P).

A continuación se muestran los análisis por el test de Tukey, para las combinaciones de variables que poseen diferencia significativa.

TABLA No.11 EFECTO DE LA COMBINACION SOLVENTE-TIEMPO

SOLVENTE	TIEMPO	UTI/ml	SIGNIFICADO
NaOH	1 hora	4.19	b
NaOH	3 horas	3.91	b
BUFFER	1 hora	2.24	a
BUFFER	3 horas	3.52	b

La Tabla No.11 muestra que no existe diferencia significativa entre los solventes. Sin embargo se observan valores mayores para el solvente NaOH, y mejor resultado para 3 horas que para 1 hora con solvente buffer.

TABLA No.12 EFECTO DE LA COMBINACION DE TAMANO-DILUCION-TIEMPO.

DILUCION	TAMANO	TIEMPO	UTI/ml	SIGNIFICADO
1g/50ml	60 mesh	3 horas	5.66	b
1g/50ml	60 mesh	1 hora	3.83	a
1g/50ml	30 mesh	3 horas	4.10	a
1g/50ml	30 mesh	1 hora	5.03	b
1g/25ml	60 mesh	3 horas	2.33	a
1g/25ml	60 mesh	1 hora	2.04	a
1g/25ml	30 mesh	3 horas	2.78	a
1g/25ml	30 mesh	1 hora	1.95	a

Los valores marcados con (b) no poseen diferencia significativa entre sí. Se observa que existe un predominio del factor de dilución de 1g/50ml; mientras que el tamaño y el tiempo no muestran predominio como variables.

**TABLA No.13 EFECTO DE LAS COMBINACIONES SOLVENTE-DILUCION
-TIEMPO.**

SOLVENTE	DILUCION	TIEMPO	UTI/ml	SIGNIFICADO
NaOH	1g/50ml	1 hora	5.96	c
NaOH	1g/50ml	3 horas	4.61	b
NaOH	1g/25ml	1 hora	2.41	a
NaOH	1g/25ml	3 horas	3.22	a
BUFFER	1g/50ml	1 hora	2.90	a
BUFFER	1g/50ml	3 horas	5.15	c
BUFFER	1g/25ml	1 hora	1.57	a
BUFFER	1g/25ml	3 horas	1.89	a

Se observa en la Tabla No.13 que el factor de dilución 1g/50ml obtuvo los valores más altos, junto al tiempo de tres horas y solvente de NaOH.

TABLA No.14 EFECTO DE LA COMBINACION TAMANO-SOLVENTE-TIEMPO-DILUCION.

TAMANO	SOLVENTE	DILUCION	TIEMPO	UTI/ml	SIGNIFICADO
30 mesh	NaOH	1g/50ml	1 hora	6.55	d
30 mesh	NaOH	1g/50ml	3 horas	3.48	a
30 mesh	NaOH	1g/25ml	1 hora	2.28	a
30 mesh	NaOH	1g/25ml	3 horas	4.43	b
30 mesh	BUFFER	1g/50ml	1 hora	3.51	a
30 mesh	BUFFER	1g/50ml	3 horas	4.72	b
30 mesh	BUFFER	1g/25ml	1 hora	1.61	a
30 mesh	BUFFER	1g/25ml	3 horas	1.13	a
60 mesh	NaOH	1g/50ml	1 hora	5.37	c
60 mesh	NaOH	1g/50ml	3 horas	5.74	c
60 mesh	NaOH	1g/25ml	1 hora	2.55	a
60 mesh	NaOH	1g/25ml	3 horas	2.01	a
60 mesh	BUFFER	1g/50ml	1 hora	2.29	a
60 mesh	BUFFER	1g/50ml	3 horas	5.58	c
60 mesh	BUFFER	1g/25ml	1 hora	1.52	a
60 mesh	BUFFER	1g/25ml	3 horas	2.66	a

El valor 6.55 (d) correspondiente a 30 mesh, NaOH, 1g/50 y 1 hora, el cual posee diferencia significativa respecto a todos los demás valores. Por otro lado los valores 5.74, 5.58 y 5.37 (c) no poseen diferencia significativa entre sexto valor 4.43 (b), junto a los primeros cinco valores

son diferentes del resto de los valores.

Se observa primeramente que el factor de dilución 1g/50ml es mejor extractor. Por otro lado, en lo referente a solvente, el NaOH muestra los mejores valores, junto a un tiempo de tres horas.

Al realizar un análisis de correlación entre todos los resultados obtenidos en cada tratamiento diferente para el frijol crudo por el método de cálculo de Cuevas y Kakade se obtuvo un valor de $r^2 = 0.94$.

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

IX.1 FRIJOL CRUDO

IX.1.1 METODO DE CALCULO

Los cálculos para la determinación de los inhibidores de tripsina realizados se llevaron a cabo por dos métodos: primeramente se usó el método de Cuevas y Cheryan (50), el cual posee una base matemática sólida, con fundamento en una ecuación diferencial; mientras que el otro método de cálculo, el de Kakade et al. (9), está basado en observaciones empíricas, las cuales se fundamentan únicamente en que el valor "verdadero" de inhibidores de tripsina en la soya cruda, se encuentra extrapolando los valores a 0 ml al graficar UTI/ml vrs. ml. Kakade et al. (9) argumentaron que existe una competencia por el sustrato entre el BAPA y otros inhibidores, lo cual interfiere en la medición, obteniéndose valores menores a mayor concentración de extracto. Esto da como resultado una ecuación de línea recta con pendiente negativa, y al extrapolar a 0 ml Kakade et al. encontraron que este error era disminuído; mientras que para la soya cocida y tostada se realiza un promedio (9). El método de Cuevas y Cheryan se basa en procesos cinéticos con una base bioquímica para obtener resultados más confiables (50).

A pesar de lo empírico del método de Kakade, se decidió analizar los resultados por ambos métodos y llevar a cabo una comparación estadística. Se encontró una correlación de 0.94 entre ambos métodos para el frijol crudo, lo cual indicó que se pueden usar ambos métodos de cálculo. Esta comparación se hizo necesaria debido a que los resultados en frijol cocido, no se pudieron calcular por el método de Cuevas y Cheyran, probablemente porque los datos no siguen el comportamiento de la ecuación diferencial, debido a que la mayoría de los resultados obtuvieron valores $R^2=0$. Por esta razón los resultados del frijol cocido se calcularon únicamente por el método de Kakade et al. (9).

En el frijol crudo, el comportamiento de los inhibidores de tripsina fue similar al de la soya, pues el método de cálculo de Cuevas y Cheyran, y el método de Kakade et al. (9) están basados en la soya. Únicamente 7 análisis de los 48 no pudieron ser calculados por el método matemático, probablemente por no regirse el mecanismo de inhibición a la ecuación diferencial en un 100%.

Los análisis de cálculo realizados por el método de Cuevas y Cheyran mostraron correlaciones de

0.95 a 0.99, lo cual era de esperarse si nos basamos en la similitud en estructura química de los inhibidores de tripsina de la soya y *Phaseolus vulgaris* (27, 41, 42 43). Además, el hecho de que los 7 análisis que no pudieron calcularse por el método, pudo haberse debido a errores propios del método analítico o a error experimental.

Al utilizarse el método de cálculo de Kakade *et al.* (9), no se observó un comportamiento de una línea recta con pendiente negativa al graficar UTI/ml vrs ml. El comportamiento fue variable y por lo tanto se decidió realizar los cálculos promediando los valores; lo cual aconseja el método Kakade *et al.* en la soya cocida o semicocida (9). El comportamiento del frijol por lo tanto, difirió al de la soya cruda, pudiéndose deber a que, la cantidad de inhibidores de tripsina en el frijol es menor que en la soya.

A continuación se enumeran y discuten los efectos de las variables, tanto individualmente como en conjunto.

IX.1.2 EFECTO DEL TAMAÑO DE PARTICULA

Se sabe que a mayor área superficial, existe

una mayor interacción de moléculas, por lo tanto en la extracción de una soluto por un determinado solvente, se espera una mejor extracción a un tamaño de partícula menor, o sea un tamiz con número mayor de mesh. Al analizar los resultados de inhibidores de tripsina por el método de Cuevas y Cheyran, existe diferencia significativa, encontrándose valores mayores para 60 mesh. Sin embargo el valor de P (0.0339). muestra que el efecto es menor si lo comparamos con el del solvente, lo que nos indica que la extracción entre 30 y 60 mesh no arroja mayor diferencia. Con un tamaño equivalente al mesh de 200 podríamos esperar que aumentara la extracción, pues la diferencia entre un mesh de 30 ó 60 a 200 es alta, con lo cual el efecto de área superficial se incrementaría, obteniendo quizás una mejor extracción (Tabla 1). Sin embargo, a tamaños muy pequeños se originan problemas de aglomeración y tensión superficial que habría que evaluar.

Al usar el método de cálculo de Kakade et al. (9). no existe diferencia significativa respecto al tamaño de partícula.

IX.1.3 EFECTO DEL SOLVENTE

Los valores con menor significancia P por ambos métodos de cálculo (0.0001 ambas, Tablas 1 y 5), es la referente al solvente. Encontramos que el buffer 7.6 obtuvo mayores valores en porcentaje de inhibición y UTI. Estos resultados se encuentran en contraposición con lo reportado por Kakade et al. (9) en la soya, quienes en un principio utilizaron Buffer de fosfato pH 7.6 (10). El buffer en el frijol puede tener un efecto de cosolubilidad con respecto a los inhibidores de tripsina, pues en aguas de lavado de diferentes tipos de soya cruda, el pH se encuentra entre 6.3 y 6.8 según lo reportado por Rackis et al. (46). El pH del solvente NaOH, fue siempre ajustado a 10, lo cual es lejano al pH de 6.8. Este pH (10.0) es el recomendado por Kakade et al. (9), quienes recomiendan que con una solución de 0.01 N de NaOH, el pH debe encontrarse entre 8.4 y 10. Sin embargo este margen es muy amplio, por lo cual se decidió escoger un límite. El pH 8.4 se encontraba cercano al Buffer de fosfato de 7.6, por lo cual se escogió pH 10. Kakade et al. (9) encontraron valores similares entre pH 7.6 y 8.4. Esto nos hace suponer que un pH de 9.0 o 9.5 podría tener un efecto diferente en la extracción de IT. Kakade et al. no hacen mención respecto a este punto. Liu y Markakis (55) en

la soya no encontraron diferencias entre agua, solución de NaOH 0.01N pH 10 y Buffer pH 8.2. Aunque en ese estudio mencionan la aplicación del método en otras leguminosas, no se estudiaron el efecto de estos solventes en frijol negro (Phaseolus vulgaris) ; lo cual nos podría indicar que un pH tan alto disminuiría la extracción de IT, por efectos de cosolubilidad, pues las aguas de lavado de varias leguminosas oscila entre pH de 6.3 y 6.8 (46).

IX.1.4 EFECTO DEL TIEMPO DE EXTRACCION

El tiempo fue otra variable en la cual se determinaron diferencias estadísticamente significativas (Tablas 1 y 5) por ambos métodos de cálculo, encontrándose valores a una hora de agitación. Los valores menores para 3 horas de agitación pudieron deberse a una incipiente desnaturalización, oxidación o factores físicos, tales como una velocidad de extracción, con tendencia a valores asintóticos después de una hora de extracción. Kakade *et al.* (9) sin embargo encontraron máximos valores para 3 horas de agitación en muestras de soya. Por otro lado, en el presente estudio para 20 horas de agitación los valores disminuyeron, prueba que se realizó para demostrar que la extracción de IT tiende a valores asintóticos. Liu y Markakis (56) no encontraron que tiempos mayores de 30 minutos aumentaron la cantidad de IT en la soya cuando se utilizó agua como agente extractor.

IX.1.5 EFECTO DE VOLUMEN DE EXTRACCION Y DILUCION

Al observar los resultados, tanto por el método de cálculo de Cuevas y Cheyran, como el de Kakade et al. (9), se observa que no existe diferencia significativa por efecto de volumen de extracción. Esto indica que un mayor volumen de extracción en la muestra cruda no repercute necesariamente en una mayor extracción de inhibidores. Es importante sin embargo, lograr un porcentaje de inhibición de un 40-60% de inhibición para 1 ml de muestra (9), por lo cual las muestras extraídas con 50 ml/g tuvieron un factor de dilución de 1 ml en 10 ml, mientras que para las muestras extraídas con 25 ml/g el factor fue de 1 ml en 20 ml, para mantener las concentraciones de muestra en ambas extracciones. Kakade y et al. (9) en 1974 extrajeron 1g en 50 ml, mientras que en 1969 habían extraído 1g en 20 ml. En ninguno de los artículos se menciona algún efecto, esto puede haberse debido a que, independientemente del volumen de extracción, diluyen la muestra hasta obtener un 40-60% de inhibición. Liu y Markakis (56) extrajeron 0.5g/50ml; luego diluyeron muestras con diferentes porcentajes de inhibición, encontrando que entre un 40 y 60% de inhibición la desviación estandar es $\pm 3\%$. Esto nos muestra la razón por la cual valores obtenidos sin esta condición se encuentran muy desviados o perdidos. Es por esto que estos autores únicamente toman una alícuota

para determinar IT que se encuentre dentro de este porcentaje de inhibición.

Es importante mencionar que el factor de dilución para la soya es de 1 ml en 50 y en algunos casos 60 ml (9.10), para lograr el porcentaje de inhibición entre el 40-60%. Esto nos demuestra que existe una menor cantidad de IT en el frijol que en la soya, pues a un mismo volumen de extracción, en el frijol crudo se necesitó una dilución de 1 ml en 20 ml.

IX.1.6 EFECTO POR INTERACCIONES ENTRE VARIABLES

Hasta ahora se ha discutido el efecto de variables por separado, sin tomar en cuenta que ciertas variables, en conjunto pueden llegar a tener diferencias significativas (ver Tablas 2,3,4,6,7,8,9).

Existen efectos significativos de interacciones para las variables solvente-dilución por ambos métodos de cálculo, y al realizar el análisis de diferencias de medidas de Tukey, para encontrar si existe diferencia significativa entre las combinaciones, se encontró que todas fueron significativamente diferentes, y que por lo tanto el valor con una mayor cantidad de IT es el mejor (mayor extracción de IT). El Buffer 7.6 con dilución de 50ml/g

arrojó el valor más alto de IT, y por lo tanto se observa que si existe un efecto de mayor extracción de IT utilizando una mayor cantidad de solvente respecto a la cantidad de frijol.

Al analizar el efecto solvente-tiempo de extracción (tabla Pt5) se encontró que es una combinación con un valor pequeño de significancia P, y al llevar a cabo la prueba de Tukey, (Tabla Pt7), se encontró que en las primeras dos combinaciones no existieron diferencias significativas. Esto ocurrió para ambos métodos de cálculo y los valores mayores fueron para Buffer 7.6 con 3 horas y 1 hora, lo que nos muestra que utilizando Buffer, el tiempo de extracción no tiene efecto.

En el método de cálculo de Kakade *et al.* (9), observamos diferencias significativas en lo referente a tamaño de partícula-tiempo; sin embargo, no existieron diferencias significativas entre los primeros 3 valores, de las 6 posibles combinaciones, por lo tanto significa que no es muy representativo, y aún más si comparamos que con el método de cálculo Cuevas y Cheyran no existió diferencia significativa.

Respecto al efecto de tres variables, la com-

binación tamaño-solvente-dilución, fue la única con diferencias significativas por ambos métodos de cálculo; no existieron diferencias significativas entre los primeros 3 valores de las 28 combinaciones posibles al realizar la prueba de Tukey. Estos fueron: 60 mesh, Buffer, 25ml/g-60 mesh, Buffer, 50ml/g-30 mesh, Buffer, 50ml/g. Observamos que el solvente Buffer se encuentra en los tres tratamientos, y por lo tanto es significativo. Aunque en ambos métodos de cálculo los mismos tratamientos tuvieron diferencias significativas, observamos que los resultados obtenidos por el método de cálculo de Cuevas y Cheyran fueron mayores, lo cual nos indica que probablemente en este caso los cálculos son más confiables por tener una base matemática.

Al analizar el efecto de todas las variables (Tabla No.9) sobre los IT se observa que hay diferencia significativa cuando se calculan por el método de Kakade *et al.* (9), no así por el método de Cuevas y Cheyran. Esto muestra, que aunque exista una correlación de 0.94 entre ambos métodos, en el método de Cuevas y Cheyran algunas variables en conjunto, tienden a anular diferencias significativas, como por ejemplo la observada con las tres variables anteriormente mencionadas, en la cual si existieron diferencias significativas. Por el método de cálculo

de Kakade et al. (9), por estar basado en consideraciones empíricas. podemos afirmar que las restricciones son menores que en el de Cuevas y Cheyran, y por lo tanto si existieron diferencias significativas. Al realizar la prueba de Tukey se observa que no hay diferencia significativa entre los primeros 4 valores de los 16 correspondientes. Dos tenían tamaño de partícula correspondiente a 30 mesh y 2 a 60 mesh; todos con solvente Buffer, 3 con dilución 1g/50ml; 1 con dilución 1g/25ml; 3 con tres horas de agitación y con un tiempo de agitación de 1 hora. Analizando estos resultados se observa que el tamaño de partícula no tiene efecto significativo y que utilizando Buffer con una dilución preferentemente de 50ml/g con 1 o 3 horas de agitación, se encuentra un valor real de IT en el frijol negro crudo. Esto significa que se obtienen los valores mayores de IT bajo estas condiciones.

Al tomar los valores obtenidos por el método de cálculo de Kakade et al. (9), y ser comparados en esa misma investigación en 1974, observamos que los valores aquí reportados son más altos, pues el frijol crudo obtuvo 15 UTI/mg aproximadamente, mientras que la soya cruda fue de 110 UTI/mg. Era de esperarse estos resultados, pues al calcular el porcentaje de inhibición, este se fue de 1 en 10 para el frijol, mientras que para la soya cruda el factor de dilución es 1 en 50.

Los blancos para cada alícuota (sin coloración). llevados a cabo para anular algún efecto de transmitancia no tuvieron efecto, por lo que se puede prescindir de ellos, no así en el frijol cocido.

IX.2 FRIJOL COCIDO

En el frijol cocido, por ser menores las concentraciones de IT por desnaturalización proteínica debido al efecto del proceso térmico, se observaron resultados negativos, cero o muy pequeños, en todas las alícuotas. Esto se debe entre otras cosas que a pequeñas concentraciones el método no es confiable, pues existe una competencia por el sustrato con otras proteínas o péptidos (47).

El método de cálculo de Cuevas y Cheyran no pudo utilizarse debido a que, únicamente 6 análisis de los 48 obtuvieron resultados. Existen dos posibles explicaciones: a) el método de Cuevas y Cheyran fue ensayado y propuesto para soya cruda y cocida, y no específicamente para frijol cocido; sin embargo recordemos por otro lado que si fue funcional para frijol crudo, debió serlo también en frijo cocido; y/o b) que el método de extracción y medición de IT no es efectivo a bajas concentraciones. Esta última, es más probable si tomamos en cuenta los factores inherentes al método, como sistemas

complejos no conocidos, con equilibrios desconocidos entre el sustrato y otros inhibidores o péptidos libres que se afecten a concentraciones de IT (46).

Por otro lado, los 6 análisis en que se obtuvo resultados, no fueron de una misma muestra repetición, por lo cual no se puede esperar que estos resultados fueran específicamente de un tratamiento.

Kakade et al. (9,10) condicionan el método, a que al tomar la muestra de 50 ml del agente extractor por gramo, ésta debe diluirse en un factor D, en donde 1 ml produzca entre un 40-60% de inhibición, para disminuir errores. Esta condición no fue posible de alcanzar, aún tomando las alícuotas directamente (D=1), ni cuando se utilizó 25ml de agente extractor por 1 gramo, ni cuando las alícuotas fueron de hasta 2.6 ml al medir en el espectrofotómetro (alícuotas desde 0.2 hasta 2.8 en frijol cocido). Por lo tanto, observamos que en el frijol cocido existen cantidades insignificantes de IT, siendo no detectadas por el método de Kakade et al. (9); y que los IT del frijol son lábiles al calor. Los resultados de cada muestra no muestran proporcionalidad directa al aumento del tamaño de alícuota, al ser medidas en el espectrofotómetro con respecto al aumento de IT. Únicamente en algunos casos se observó proporcionalidad, pero siempre existieron valores ilógicos.

Los valores negativos y cero fueron mucho más frecuentes en el frijol cocido, lo cual era de esperarse tomando lo siguiente: si en el frijol crudo, en donde la concentración de IT es mucho mayor, se observó este fenómeno en las alícuotas pequeñas (0.2 0.4 ml), mientras que en las alícuotas con mayor concentración (2.0-2.2-2.4-2.6-2.8 ml) no fueron observadas estas desviaciones; en el frijo cocido, las concentraciones de IT en las alícuotas mayores (1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 ml) son muy bajas y por lo tanto eran de esperar estas desviaciones. Existe el efecto del blanco (coloreado), en el cual la desviación estándar fue de 2 unidades de transmitancia; además, las alícuotas variaban en algunos casos desde el blanco coloreado hasta la alícuota mayor (2.8 ml) en 2 unidades de transmitancia. La obtención de resultados negativos o cero puede ser debida al error experimental propio del método. Sin embargo, esto hace pensar que si son eliminadas las alícuotas pequeñas y se toman en cuenta únicamente alícuotas desde 1.8 ml hasta 2.8 ml, la obtención de valores ilógicos puede ser disminuída. Sin embargo, en la alícuota mayor de 2.8 ml no se obtuvo ni del 40% de inhibición, lo cual significa que los resultados no son muy confiables pues la desviación estándar es muy grandde, como lo indica Liu y Markakis (55).

Las muestras de 1 g diluídas con 25 ml del agente extrac

tor NaOH 0.1 N, tuvieron mucha turbidez, lo cual fue un elemento que interfirió, aún teniendo blancos incoloros para disminuir este error. Se sabe el efecto de estos compuestos coloidales sobre los IT, pudiendo existir una adsorción de los mismos, aún después de haber sido filtrados los tubos antes de medir en el espectrofotómetro. Rackis *et al.* (46), tuvieron estos mismos problemas de turbidez, tratando de eliminarlos con ácido tricloroacético, pero la mezcla tuvo una disminución en absorbancia.

A pesar de estos inconvenientes, se decidió realizar el cálculo por el método de Kakade y Col, con la aclaración de que el método de Kakade tiene una base empírica y tomando en cuenta que existe una correlación en el método de Cuevas y Cheyran, pudiendo así llegar a ciertas conclusiones.

IX.2.1 EFECTO DEL SOLVENTE DE EXTRACCION

El solvente ejerce un efecto significativo, pero en este caso el NaOH tuvo valores mayores de IT y por ende mejor extracción. Esto pudo deberse a que al utilizar el buffer de fosfato con D=1 existió una precipitación probablemente de proteínas, por lo cual pudo existir una adsorción de IT. Al agregar el ácido acético para detener la reacción, el precipitado fue disuelto (ver Tabla No.10)

IX.2.2 EFECTO DE VOLUMEN DE EXTRACCION

El factor de condición de extracción tuvo efectos significativos, encontrándose que con valores de 50 ml/g de agente extractor, las concentraciones de IT son mayores, lo cual nos demuestra que un mayor volumen de extracción, permite mejor extracción. Incluso tomando en cuenta que al tomar una muestra con 25 ml/g y el factor de dilución $D=1$ (igual que 50 ml/g), esperaríamos mejores resultados por existir una mayor concentración de IT. Sin embargo no fue así, pudiéndose deber a que en el caso de NaOH existieron problemas de turbidez que interfirieron en la absorbancia (46) (Ver Tabla No.10).

El término cocido puede crear confusión, por lo cual se escogió el método cocción de Mattson (57), con el cual 98 minutos de cocimiento fue el indicado. Sin embargo, aunque este frijol se deshacía con los dedos, al probarlo varias personas del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá con experiencia en cocción de frijol, todas indicaron en que este frijol puede considerarse como semicocido.

Este punto es muy importante, pues significa que al analizar un frijol cocido al paladar, se esperarían mayores problemas en la cuantificación de IT por encontrar

se éstos en menor concentración.

Los valores aproximados para nuestro frijo- cocido fueron de 0.33 y 0.27 UTI/mg; estos valores fueron los más altos encontrados en esta investigación. Esto significa que se tomaron los valores que obtuvieron mayores UTI/ml, asumiéndose que son los valores "verdaderos", por ser tomadas las condiciones en las cuales existió una mejor extracción de IT. Al comparar estos valores con los de Kakade et al (9), observamos valores para la harina de soya de tostada 1.9 hasta 6.9 UTI/mg, lo cual nos indica una menor concentración de IT en el frijol. Esto nos hace suponer que los IT del frijol negro son mas lábiles al calor que los IT de la soya, a pesar de su aparente similitud en estructura química (27,41,42,43).

Un cocimiento de 4 horas para frijol, es suficiente para sentirlo cocido al paladar, por lo cual es de esperar una menor concentración de IT, y por lo tanto las condiciones de porcentaje de inhibición son más difíciles de obtener. por lo que el método de Kakade et al.(9) no sería capaz de detectarlos por ser valores cercanos a 0 UTI/mg.

IX.2.3 EFECTOS DE MULTIPLES VARIABLES

Como indicamos anteriormente, el solvente junto al factor de dilución tuvieron efectos significativos como variables independientes, con valores mayores para el solvente NaOH y 50ml/g. Por efecto de múltiples variables la combinación solvente-tiempo también obtuvo diferencia significativa (Tabla No.11), sin embargo al realizar la prueba de Tukey no existió diferencia significativa entre los primeros tres valores de los cuatro obtenidos. Esto quiere decir que aunque esta combinación ejerce efecto significativo respecto a las demás combinaciones de dos variables, su efecto es pobre.

Por otro lado, si analizamos el efecto múltiple de tres variables (solvente-dilución-tiempo) (Tabla No 13), en donde existieron diferencias significativas, los mejores valores fueron para tres horas, lo cual concuerda por lo reportado por Kakade *et al.* (9), que para soya cocida el tiempo de 3 horas era preferible para una mayor extracción de IT. La dilución de 1g/50ml fue la mejor, así como el solvente NaOH.

Otro efecto múltiple de tres variables fue tamaño-dilución-tiempo (Tabla No.12) con diferencia significativa. Los efectos de tamaño de partícula y tiempo fue

ron erráticos, pues existieron igual número de valores para 30 y 60 mesh, como para 1 y 3 horas, encontrando únicamente una diferencia clara en lo que respecta a la extracción, en donde los valores con mayor cantidad de IT fueron para 50 ml/g. Esto nos viene a confirmar que el efecto de extraer con 50ml/g respecto a 25ml/g es mejor.

Al analizar el efecto de las cuatro variables (Tabla No.14), el cual fue significativo, observamos que los mejores valores fueron primeramente con NaOH 0.1 N, con dilución de 50 ml/g y leve efecto de 3 horas. Aunque estos resultados no son muy confiables, por el hecho de que no se cumple la condición de Kakade et al, de que 1 ml produzca un porcentaje de inhibición de 40-60% como lo mencionamos anteriormente, se observa una mejor inclinación a la extracción con 50 ml/g. Esto puede ser debido en parte a efecto de turbidez, cuando extraemos con NaOH, y en el caso de Buffer por efectos de precipitación, mayormente dados para 25 ml/g. El tiempo de 3 horas tuvo valores de IT levemente mayores, lo cual nos indica una tendencia a valores asintóticos cercanos a tres horas, mientras que para el tamaño de partícula no se muestra mayor diferencia y por lo tanto esto quiere decir que la diferencia entre 30 y 60 mesh no es muy significativa.

Como se mencionó anteriormente, el efecto del blanco (coloreado sin muestra), que es la base para realizar los cálculos, tanto de IT, como porcentaje entre un mismo tratamiento (triplicado), variando así los resultados. Esto pudo ser debido a que, siendo el análisis basado en una reacción enzimática, la interacción del BAPA con la tripsina, respecto al momento de agregar el ácido acético, puede tener efecto sobre el blanco o error propio del método. Se llevó a cabo una medición de los blancos para observar este efecto, encontrando que existieron variaciones de hasta dos unidades de transmitancia. Este efecto es menor importante para el frijol crudo, sin embargo, tiene efectos en las alícuotas pequeñas (0.2-0.4-06); En el frijol cocido puede llegar a tener influencias muy grandes, pues incluso se encontraban valores de alícuotas con valor cero o valores negativos, lo cual no es correcto. En otros casos esta diferencia de transmitancia puede llegar a ser la cantidad "real" encontrada, lo cual es erróneo.

En el estudio de Fernández (8), se encontraron valores de 4.05 UTI/ml, equivalente a 3.85 UTI/mg por el método de Kakade *et al.* de 1969 (10). Estos valores son muy altos en comparación a los encontrados en esta investigación. Fernández no cumplió la condición requerida para el método, pues la muestra de un gramo fue diluida en

19 ml, para luego tomar 1 ml y nuevamente diluirla en 50 ml, lo cual debe hacerse siempre y cuando 1 ml produzca el porcentaje de inhibición adecuado. En esta investigación, una vez tomada la muestra de un gramo y diluida en 25 ml o 50 ml, se procedió a tomar las alícuotas directamente, y aún así no se logró la condición de porcentaje de inhibición.

Respecto a la tripsina utilizada de bovino, Liu y Markakis (55) encontraron que ésta se ve afectada su inhibición a un pH alcalino, disminuyendo su inhibición respecto a la tripsina de porcino. Esto pudo haber afectado los resultados, obteniendo valores un poco menores, especialmente cuando utilizamos NaOH como agente extractor

En las tablas 15,16,17,18,19,20 (Anexos) observamos los resultados originales de UTI/ml en forma resumida por triplicado tanto para el frijol crudo por el método de Kakade et al, y Cuevas y Cheyran, y para el frijol cocido por el método de Kakade únicamente. Estos resultados fueron promediados para llevar el análisis estadístico por el método de Kakade. En lo que respecta a los resultados de Cuevas y Cheyran, los espacios en blanco, son aquellos valores, los cuales no pudieron ser calculados por la ecuación diferencial. Encontramos las varia-

ciones obtenidas en cada muestra por triplicado y por lo tanto se puede observar como el método no es muy preciso ni exacto.

Por último es importante mencionar que el cálculo utilizado en esta investigación debe ser revisado, pues existiría menor error experimental al utilizar una sola alícuota con un porcentaje de inhibición dado entre un 40-60 (55).

X. C O N C L U S I O N E S

1. Los resultados obtenidos de UTI por los métodos de cálculo de Kakade y col; y Cuevas y Cheyran son similares en frijol cocido (Phaseolus vulgaris) para todos los diferentes niveles realizados en esta investigación obteniéndose una correlación de $r^2=0.94$.
2. El solvente Buffer de fosfato de pH 7.6 es más adecuado para la extracción de IT en el frijol crudo, y NaOH 0.1 N es mejor para el frijol cocido.
3. El tamaño de partícula entre 30 y 60 mesh no tiene mayor efecto en los resultados, tanto en el frijol crudo como en el cocido.
4. En el frijol crudo 1 hora de extracción es adecuada, mientras que para frijol cocido 3 horas es preferible.
5. La mejor extracción se obtiene con relación solvente-sólido de 50 ml/g, independientemente del solvente extractor que se utilice, para frijol crudo y cocido.
6. La condición de Kakade et al (9) de porcentaje de inhibición, se puede cumplir únicamente para el frijol -

crudo y no para el cocido.

7. Si existen valores diferentes en el blanco (coloreado), éstos deben promediarse y eliminar las alícuotas pequeñas que puedan interferir o dar valores ilógicos.
8. El método de cuantificación de IT no es confiable para concentraciones bajas de IT.
9. Para frijol cocido deben tomarse alícuotas desde 1.8 - hasta 2.8 para disminuir errores en la medición de transmitancia.
10. El valor de IT en frijol cocido es cercano a 0.0 por lo cual, se deduce que los inhibidores de tripsina del frijol común parecen ser bastante lábiles al calor.

XI. RECOMENDACIONES

1. En el caso de encontrar valores perdidos, se debe promediar los blancos coloreados o utilizar el menor valor de los mismos para disminuir errores.
2. Se deben eliminar las alícuotas pequeñas en la medición de transmitancia.
3. Se deben realizar los cálculos con una sola alícuota que cumpla la condición de porcentaje de inhibición.
4. Se debe explorar la utilización de otro método, como el fluorimétrico (53) que posee mayor sensibilidad que el método de Kakade *et al.* (9).
5. Se deben obtener extractos concentrados para realizar los análisis y cumplir la condición de Kakade *et al.* (9) de porcentajes de inhibición, especialmente en frijol cocido.
6. Se debe llevar a cabo mayor investigación en variables (centrifugación o no centrifugación del extracto, diferentes pH de extracción, otros solventes para la extracción como agua y HCl 0.001 N, utilización de trip-

sina de porcino en vez de bovino, reducción el volumen de mezcla de reacción y el orden de adición de la mezcla de reacción) y evaluación de su efecto sobre el método utilizado.

7. Se recomienda determinar los inhibidores de tripsina - en frijol negro (Phaseolus vulgaris) de la siguiente - forma:

FRIJOL CRUDO

Preparar muestra
Moler a 30 o 60 mesh
Pesar 3-4 g
Diluir 1 g en 50 ml buffer de fosfato pH 7.6
Agitar por 1 hora en agitador magnético
Centrifugar 30000 RPM/5min
Filtrar papel No.2
Diluir donde 1 ml produzca 40-60% de inhibición (aprox. 1 ml en 10 ml)
Tomar alícuotas de 1.0, 1.2, 1.4, 1.8
Ajustar el vol a 2 ml con agua destilada
Adicionar 2 ml de tripsina
Calentar a 37 C los tubos
Adicionar 5 ml de BAPA
10 min después adicionar 1 ml Hac
Agitar, filtrar y medir a 410nm

FRIJOL COCIDO

Preparar muestra
Moler a 30 o 60 mesh
Pesar 3-4 g
Diluir 1 g en 50 ml NaOH 0.01 (pH aprox 10)
Agitar por 3 horas en agitador magnético
Centrifugar 30000 RPM/5min
Filtrar papel No.2
Tomar directamente de la muestra sin diluir
Tomar alícuotas de 2.0, 2.2, 2.4, 2.8
Ajustar el vol a 3 ml con agua destilada
Adicionar 2 ml de tripsina
Calentar a 37 C, y adicionar 1 ml Hac a los blancos sin colorear
Adicionar 5 ml de BAPA
10 min después adicionar 1 ml Hac
Agitar, filtrar y mediar a 410nm

A continuación se recomienda tomar en cuenta las siguientes observaciones al método:

- 1.- Si los blancos coloreados varían entre sí, realizar un promedio del duplicado o triplicado.
- 2.- En el frijol crudo no es necesario realizar blancos sin colorear.
- 3.- Si existe turbidez en los tubos de frijol cocido, guardar en el refrigerador por 24 horas, filtrar y medir.
- 4.- Si en el frijol cocido no se observa un aumento de absorbancia al aumentar el tamaño de alícuota, deberá tomarse la muestra con mayor porcentaje de inhibición y realizar los cálculos únicamente con esa muestra.
- 5.- La obtención de valores erróneos (menores de cero), indica UTI/mg.

XII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Flores M, Flores A, Lara M, Food Intake of Guatemalan indian children ages 1 to 5. J. Amer. Dietet. Assoc. 1966;58:480-487.
- 2.- Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. Oficina de Investigaciones Internacionales de los Institutos Nacionales de E.E.U.U. y Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Evaluación nutricional de la población de C.A. y Panamá. Guatemala: INCAP, 1969, 136p.
- 3.- Menchú M, Lara M, Guzmán M. Relación entre la Ingesta de Calorías y Nutrientes en Preescolares y la Disponibilidad de Alimentos en la Familia. Arch. Latinoamer. Nutr. 1970;20:41-58.
- 4.- Bressani R, Elías LG. Legume Foods. En: New Protein Foods Technology. New York; A.M. Altschul Academic Press, 1974; Vol. 1, p. 230-294.
- 5.- Milner M. Nutritional Improvement of Food Legumes by Breeding. New York, U.S.A.: John Wiley & Sons Inc. 1975 399 p.

- 6.- Laszlo L. Methods in Enzimology; Proteolytic Enzimes. London: Academic Press Inc. Lawrence Grossman, Kivie Moldave, 1976;65:695-717, 939 p.
- 7.- Fevold HC. The Effect of Soybean Trypsin Inhibitor in the Enzimatic Release of Amino Acids from Autoclaved Soybean Meal. Arch. Biochem. 1949;2:395-407.
- 8.- Fernández GP. Factores Antinutricionales en Semillas de Leguminosas (*Phaseolus vulgaris*) y su Posible Relación con el Contenido de Taninos y Polifenoles Asociados. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1976;90p.
- 9.- Kakade ML, et al. Determination of Trypsin Inhibitor Activity of Soy Products; A collaborative analysis of an improved procedure. Cereal Chem. 1974;51:376-382.
- 10.- Kakade ML, Simons N, Liener IE. An Evaluation of Natural vs. Synthetic Substrates for Measuring the Antitryptic Activity of Soybean Samples. Cereal Chem. 1969;46: 518-526.
- 11.- Hamerstrand G, Black L, Glover JD. Trypsin Inhibitors in Soy Products: Modification of the Standard Analytical Procedure. Cereal Chem. 1980;58:42-45

- 12.- Tan NH, Wong KC. Thermal Stability Inhibitor Activity in Winged Bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) J. Agric. Food Chem. 1982;30:1140-1143.
- 13.- American Association of Cereal Chemistss. Minnesota, USA. Approved Methods of the AACCC. 7th ed. Minnesota, USA 1976, Method 71-10.
- 14.- Bressani R, Elías LG, Navarrete DA. Nutritive Value of Central American Beans, J. Food Sci. 1961;26:525.
- 15.- Rockland LB, Radke TM. Legume Protein Quality. Food Technol. 1981;35:(3):79-82.
- 16.- Behar M, Bressani R. Las Semillas Leguminosas Como Fuente de Proteínas en América Latina. Guatemala: Ed. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. INCAP. 1970; p.228-241.
- 17.- Hulse HG, Rachie KO, Billingsley LW. Nutritional Standards and Methods of Evaluation for Food Legume Breeders Ottawa: Institute for Development and Research Centre, 1977; 100 p.
- 18.- Carpenter KJ. The Nutritional Contribution of Dry Beans in Perspective. Food Technol. 1981;35(3):218-219.

- 19.- Singh S, Singh HP, Sikka KC. Distribution of Nutrients in the Anatomical Parts of Common Indian Pulses. Cereal Chem. 1969;45:13-18.
- 20.- Food and Agriculture Organization of United Nations. Legumes in Human Nutrition. Rome: Report of the FAO Committee, 1964;139 p.
- 21.- Powrie WP, Adams MW, Pflug IJ. Chemical, Anatomical and Histochemical Studies in the Navy Bean Seed. Agron. J. 1960;52:163-167.
- 22.- Sgarbieri V, Whitaker JR. Properties of Common Bean Proteins. Adv. in Food Research. 1982;28:144-152.
- 23.- Hintz HF, Hogue DE, Krook L. Toxicity of Red Kidney Beans in the Rats. J. Nutr. 1967;93:77-86.
- 24.- Cogan JW, Sabry Z. Nutritive Value of Middle Eastern Foodstuffs. J. Sci. Food Agr. 1966;17:82-85.
- 25.- Daniel I, Norris LC, The Riboflavin, Niacin and Thiamine Content of Dried Leguminous Seeds. J. Nutr. 1945;30:31-36
- 26.- Bressani R, Elías LG, Valiente AT. Effect on Cooking and

of Aminoacid Supplementation on the Nutritive Value of Black Beans (*Phaseolus vulgaris*). *Brit. J. Nutr.* 1963; 17:69-70.

27.- Whitaker JR, Sgarbieri VC. Purification and Composition of the Trypsin-Chymotrypsin Inhibitors of *Phaseolus vulgaris* L. Var Rosinha G2. *J. of Food Bioch.* 1982;5:197-213

28.- Lumen BO, Salamat LA. Trypsin Inhibitor Activity in Winged Bean (*Psophocarpus Tetragonolobus*) and the Possible Role of Tannin. *J. Agric. Food Chem.* 1980;28:533-536.

29.- Wagner LP, Riehm VP. Purification and Partial Characterization of a Trypsin Inhibitor from the Navy Bean. *Arch. Biochem. Bioph.* 1967;121:672-677.

30.- Rick W. *Methods of Enzymatic Analysis; trypsin.* New York Hans-Ulrich Bergmeyer, 1965, 807 p.

31.- Bowman DE. Fractions Derived from Soybeans and Navy Beans Which Retard the Tryptic Digestion of Casein. *Proc Soc. Exp. Biol. Med.* 1949;57:139-140.

32.- Ham WE, Sandstedt RM. A Proteolytic Inhibiting Substance in the Extract from Unheated Soybean Meal. *J. Biol.*

Chem. 1944;154:505-508.

- 33.- Kunitz M. Crystalline Soybean Trypsin Inhibitor II; General Properties. J. Gen. Physiol. 1947;30:291-310.
- 34.- Rackis JJ. Soybean Trypsin Inhibitors: Isolation Purification, and Physical Properties. Arch. Biochem. Biophys. 1962;98:471-478.
- 35.- Rackis JJ. et al. Chromatography of Soybean Protein; Fractionation of whey Protein on the Diethylaminoethyl-cellulose. J. Am. Chem. Soc. 1959;81:6265-6270.
- 36.- Birk Y, Gertler A, Khalef S. A Pure Trypsin Inhibitor from Soybeans. Biochem. 1963;87:281-284.
- 37.- Smith AK, Circle SJ. Soybeans: Chemistry and Technology. Connecticut: The AVI Publishing Company, INC., 1972
470 p (p.162-173)
- 38.- Dibella FL, Liener IE. Soybean Trypsin Inhibitor Cleavage and Identification of a Disulfide Bridge not Essential for Activity. J. Biol. Chem. 1969;244:2824-2829.
- 39.- Buera MP, Pilosof AMR, Bartholomai GB. Kinetics of Tryp-

sin Inhibitory Activity Loss in Heated Flour from Bean, (Phaseolus Vulgaris). J. of Food Sci. 1984;49:124-125.

- 40.- Collins JL, Sanders GG. Changes in Trypsin Inhibitory Activity in Some Soybean Varieties During Maturation and Germination. J. of Food Sci. 1976;41:168-172.
- 41.- Wilson KA, Laskowski M. Isolation of 3 Isoinhibitors of Trypsin from Garden Bean (Phaseolus vulgaris) J. of Biol Chem. 1973;248:746-762.
- 42.- Pusetai A. The Isolation of Two Proteins, Glycoprotein I and a Trypsin Inhibitor, from the Seeds of Kidney Bean (Phaseolus vulgaris). Biochem J. 1966;101:379-383.
- 43.- Apostolatos G. Nutritional Significance of Trypsin Inhibitors from edible Dry Beans (Phaseolus vulgaris L.) J. of Food Tech. 1984;19:561-567.
- 44.- Erlanger BF, Kokowsky N, Cohen W. The Preparation and Properties of Two New Chromogenic Substrates of Trypsin Arch. Biochem. Biophys. 1961;95:271-278.
- 45.- Green NM. Competition Among Trypsin Inhibitors. J. Biol Chem. 1953;205:535-551.

- 46.- Rackis JJ, et al. Problems Encountered in Measuring Trypsin Inhibitor Activity of Soy Flour Report of a Collaborative Analysis. Cereal Sci. 1973;13:513-516.
- 47.- Smith C. et al. The Determination of Trypsin Inhibitor Levels in Foodstuffs Sci. Food Agric. 1980;31:341-350.
- 48.- Kailasapathy PA, Pererea PA. Soaking Studies on Winged Bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) to Process Full-fat Flour and Determine its shelf-Life Stability. J. of Food Sci. 1985;50:773-776.
- 49.- Bakir AY, Sachde AG, Naoum IE. Occurrence and Stability of Trypsin Inhibitors in Iraqui Local Legumes. J. Agric. Food Chem. 1982;30:1184-1185.
- 50.- Cuevas R, Cheyran M. Inhibidores de Tripsina en Alimentos a Base de Soya: Revisión Crítica de la Cinética de Destrucción Térmica y los Métodos de Análisis. Arch Lat. Nutr. 1983;33:902-931.
- 51.- Egberg DC, Potter RH, Honold GR. The Semiautomated Determination of Trypsin Inhibitors in Textured Soy Protein. J. Agr. Food Chem. 1975;23:603-605.

- 52.- Johnson LA, et al. Inactivation of Trypsin Inhibitor in Aqueous Soybean Extracts by Direct Steam Infusion. Cereal Chem. 1980;57:376-379.
- 53.- Jung J. Lee CY. A Fluorimetric Assay for Trypsin Inhibitor. J. of the Korean Agric. Chem. Soc. 1982;25(3):182-188.
- 54.- Ravindran V, Ravindran G. Nutritional and Antinutritional Characteristics of Mucuna Bean Seeds (*Mucuna utilis*) J. Sci. Food Agric. 1988;46:71-79.
- 55.- Liu K. Markakis P. An Improved Colorimetric Method for Determining Antitryptic Activity in Soybean Products. Am Ass. of Cereal Chemists. 1989;66(4):415-421.
- 56.- Box EP, Hunter WG, Hunter JS. Statistics for Experimenters. New York: John Wiley & Sons. 1978; 653 p.
- 57.- García A, Bressani R. Métodos para Establecer la Calidad Tecnológica y Nutricional del Frijol. Guatemala: INCAP, 1986;p11.

XIII. A N E X O S

TABLA No.15 CONTENIDO DE INHIBIDORES DE TRIPSINA EN FRIJOL
CRUDO EXPRESADAS COMO UTI/ml

METODO DE CALCULO: KAKADE Y COL (9)

TIEMPO DE EXT.	S O L V E N T E			
	NaOH Factor de dilución		BUFFER Factor de Dilución	
	1g/25ml	1g/50ml	1g/25ml	1g/50ml
1 HORA	29.63	11.29	27.08	29.04
	24.85	22.78	12.56	35.90
	30.27	18.92	22.29	30.22
3 HORAS	16.76	8.48	19.46	31.02
	12.96	5.78	23.76	31.22
	8.32	10.74	19.54	27.44

**TABLA No. 16 CONTENIDO DE INHIBIDORES DE TRIPSINA
EN FRIJOL CRUDO EXPRESADAS COMO UTI/ML**

METODO DE CALCULO: KAKADE Y COL (9)

TAMAÑO DE PARTICULA: 60 MESH

TIEMPO DE EXT.	S O L V E N T E			
	NaOH FACTOR DE DILUCION		BUFFER FACTOR DE DILUCION	
	1g/25ml	1g/50ml	1g/25ml	1g/50ml
1 HORA	16.24	19.90	26.89	23.49
	18.94	24.88	28.72	23.62
	19.32	22.42	27.75	25.49
3 HORAS	16.84	11.31	27.64	27.60
	19.37	11.66	32.99	28.02
	20.45	13.72	30.75	32.04

**TABLA No.17 CONTENIDO DE INHIBIDORES DE TRIPSINA
EN FRIJOL CRUDO EXPRESADAS COMO UTI/ML**

METODO DE CALCULO: CUEVAS Y CHERRYAN (50)

TAMAÑO DE PARTICULA: 30 MESH

TIEMPO DE EXT.	S O L V E N T E			
	NaOH FACTOR DE DILUCION		BUFFER FACTOR DE DILUCION	
	1g/25ml	1g/50ml	1g/25ml	1g/50ml
1 HORA	34.99	15.73	40.08	38.55
	31.46	26.29	14.78	44.79
	45.91	20.86	33.19	37.92
3 HORAS	20.01	17.62		42.65
	16.59	11.94	30.12	43.79
	11.97	13.42	27.20	41.25

**TABLA No.18 CONTENIDO DE INHIBIDORES DE TRIPSINA
EN FRIJOL CRUDO EXPRESADAS COMO UTI/ml**

METODO DE CALCULO: CUEVAS Y CHERYAN (50)

TAMAÑO DE PARTICULA: 60 MESH

TIEMPO DE EXT.	S O L V E N T E			
	NaOH FACTOR DE DILUCION		BUFFER FACTOR DE DILUCION	
	1g/25ml	1g/50ml	1g/25ml	1g/50ml
1 HORA	27.29	28.97		
	32.23	27.76	40.73	33.04
	34.49	23.92	39.99	
3 HORAS	23.78			40.32
	27.45		44.48	40.61
	26.21	17.43	42.96	46.53

TABLA No.19 CONTENIDO DE INHIBIDORES DE TRIPSINA

EN FRIJOL COCIDO EXPRESADAS COMO UTI/ml

METODO DE CALCULO: KAKADE Y COL (9)

TAMAÑO DE PARTICULA: 60 MESH

TIEMPO DE EXT.	S O L V E N T E			
	NaOH FACTOR DE DILUCION		BUFFER FACTOR DE DILUCION	
	1g/25ml	1g/50ml	1g/25ml	1g/50ml
1 HORA	2.60	4.71	0.89	3.51
	2.23	7.69	1.76	2.89
	2.01	7.26	2.19	4.14
3 HORAS	4.96	2.63	1.75	5.63
	2.99	3.36	0.79	4.37
	5.34	4.44	0.85	4.16

TABLA No. 20 CONTENIDO DE INHIBIDORES DE TRIPSINA

EN FRIJOL COCIDO EXPRESADAS COMO UTI/ml

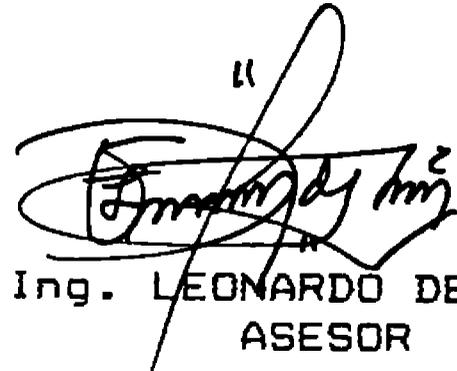
METODO DE CALCULO: KAKADE Y COL (9)

TAMAÑO DE PARTICULA: 60 MESH

TIEMPO DE EXT.	S O L V E N T E			
	NaOH FACTOR DE DILUCION		BUFFER FACTOR DE DILUCION	
	1g/25ml	1g/50ml	1g/25ml	1g/50ml
1 HORA	2.26	5.05	1.36	2.25
	3.10	5.00	1.56	2.05
	2.28	6.06	1.65	2.57
3 HORAS	1.94	7.59	2.65	5.87
	2.08	4.57	2.76	3.71
	2.00	5.06	2.56	7.16



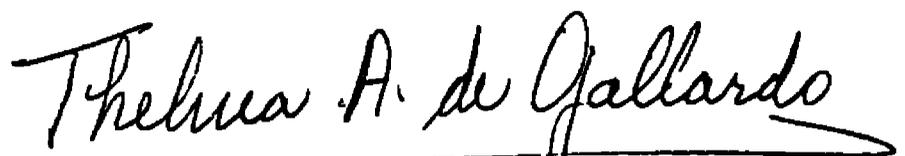
JOSE ROMEO DE LEON ARRIBAS



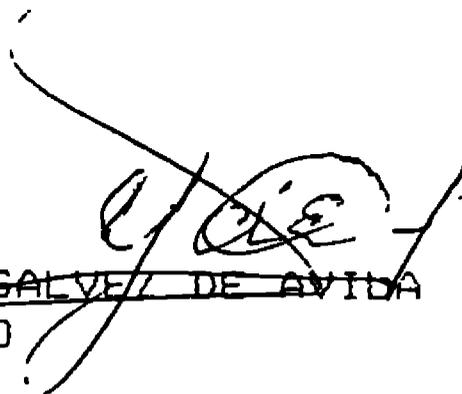
Ing. LEONARDO DE LEON
ASESOR



Dr. ROBERTO CUEVAS
ASESOR



Licda. THELMA ALVARADO DE GALLARDO
DIRECTORA DE ESCUELA



Licda. CLEMENCIA GALVEZ DE AVIDA
DECANO