



**INSTITUTO TECNOLÓGICO  
DE CELAYA**

**SEP**  
SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA



**DEPARTAMENTO DE INGENIERIA BIOQUIMICA**

**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO GENOTÓXICO DE  
EXTRACTOS PROTEÍNICOS DE FRIJOL AYOCOTE NEGRO Y MORADO  
(*Phaseolus coccineus* L.) EN RATÓN CD1<sup>+</sup>**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

**PRESENTA**

**IBQ. GERARDO TENIENTE MARTÍNEZ**

**DIRECTORA DE TESIS**

**DRA. AUREA BERNARDINO NICANOR**

**CO-DIRECTORA DE TESIS**

**DRA. RAQUEL CARIÑO CORTÉS**



**Celaya, Guanajuato, México. Octubre 2014**





"2014, Año de Octavio Paz"

Celaya, Gto., 17/06/2014

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

No. de Oficio PIBQ-07-01-2014


ING. TERESA SÁNCHEZ PÉREZ  
JEFA DEL DEPTO. DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA  
PRESENTE.

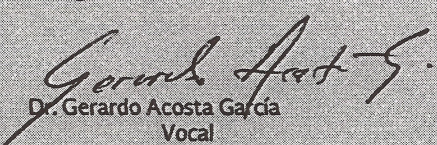
De acuerdo con la convocatoria hecha por la jefatura a su digno cargo, con el fin de determinar la aprobación de impresión del proyecto de maestría titulado:

**"Aislamiento, caracterización y estudio genotóxico de extractos proteínicos de frijol ayocote negro y morado (*Phaseolus coccineus* L)" en ratón CD1**

Presentado por el (la) pasante: **C. IBQ. Gerardo Teniente Martínez**, comunicamos a Usted que esta Comisión Revisora ha tenido a bien aprobar la impresión de este trabajo.


  
Dra. Aurea Bernardino Nicanor  
Presidente


  
Dr. Leopoldo González Cruz  
Secretario

  
Dr. Gerardo Acosta García  
Vocal

  
Dra. Raquel Carriño Cortes  
Asesor Externo

Vo. Bo.

  
M.C. SANDRA HERRERA PÉREZ  
COORDINADOR DEL POSGRADO  
INGENIERIA BIOQUIMICA

  
SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA  
INSTITUTO TECNOLÓGICO  
DE CELAYA  
POSGRADO ING. BIOQUÍMICA





## **DEDICATORIA**

A Dios quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desesperar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la fe en mí mismo, ni desfallecer en el intento.

A mis padres Teresa y J. Piedad, por su apoyo, consejos, comprensión, amor y por ayudarme en los momentos difíciles ya que con sabiduría y paciencia han sabido guiarme en toda mi carrera, además de haberme dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia y sin lugar a dudas, sin su apoyo hubiera sido imposible lograr este objetivo tan importante en mi vida.

A mis hermanos Alejandro, Gabriela y Cristian, quienes me han mostrado su cariño y apoyo, en todo este trayecto para lograr cumplir todas mis metas.

Muchas gracias.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi asesora y directora de tesis la Dra. Aurea Bernardino Nicanor, por la orientación, apoyo, amistad y confianza, que me brindo a lo largo del proyecto y de carrera profesional, ya que esto me permitió aprender mucho más de lo estudiado en este trabajo, que será fundamental para mi formación como investigador.

Agradezco a mi asesora externa la Dra. Raquel Cariño Cortés, por haberme dado un cálido recibimiento en mi estancia en ICSa (UAEH), por su apoyo, paciencia y sobre todo por el conocimiento que me brindo y compartió para la realización de este trabajo además de sus consejos y su visión crítica que me ayudaron a concluir el proyecto.

Agradezco a mi Comité de tesis por sus observaciones y sugerencias en la elaboración y mejora del trabajo, espero que las vean reflejadas en el producto final; empiezo por el Dr. Leopoldo González Cruz por su guía y apoyo, brindados con calidez y confianza en todo momento a lo largo del proyecto además de su sencillez y actitud solidaria para compartir sus conocimientos y experiencias de investigación. Al Dr. Gerardo Acosta García por compartir su tiempo, entusiasmo y conocimientos. A mis compañeros y amigos del laboratorio de alimentos del Tecnológico de Celaya y del laboratorio de Toxicología de la UAEH, IBQ. Ivette Galván, IBQ. Jocelyn Hernández, al estudiante Moisés Pantoja, LN. Ely Mireya e LQ. Isacc, por brindarme su apoyo, consejos, confianza y sobre todo su amistad.

A todos Ustedes

Muchas gracias



## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS .....	iv
ÍNDICE DE CUADROS .....	v
RESUMEN .....	vi
ABSTRACT.....	vii
INTRODUCCIÓN .....	8
CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES.....	9
1.1 Generalidades .....	9
1.2 Origen del frijol.....	10
1.3 Características Botánicas .....	11
1.3.1 Taxonomía del frijol .....	11
1.3.2 Morfología .....	11
1.3.2.1 Raíz .....	12
1.3.2.2 Tallo .....	13
1.3.2.3 Ramas y complejos axilares .....	15
1.3.2.4 Hojas .....	16
1.3.2.5 Inflorescencia.....	17
1.3.2.6. Flor .....	17
1.3.2.7 Fruto.....	18
1.3.2.8 Semilla .....	19
1.4 Variedades .....	20
1.5 Variedades de mayor consumo en México.....	21
1.6 Frijol ayocote ( <i>Phaseolus coccineus</i> ).....	22
1.7 Frijol como fuente de compuestos nutracéuticos .....	24
1.8. Genotoxicidad .....	25
1.9. Citotoxicidad .....	26
1.10. Carcinogénesis y Mutagénesis .....	26
1.10.1. Pruebas de mutagénesis <i>in vivo</i> .....	28
1.10.1.1. Modelo experimental de micronúcleos .....	28
JUSTIFICACIÓN.....	30
HIPÓTESIS .....	31



<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
<b>CAPÍTULO 2 . MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
<b>2.1. Material vegetal</b> .....	<b>33</b>
<b>2.2. Acondicionamiento de la materia prima</b> .....	<b>33</b>
<b>2.3. Análisis proximal de la harina de frijol ayocote</b> .....	<b>34</b>
<b>2.4. Separación de las proteínas de almacenamiento del frijol ayocote</b> .....	<b>34</b>
<b>2.5. SDS-PAGE de las fracciones proteínicas del frijol ayocote</b> .....	<b>35</b>
<b>2.6. Determinación del punto isoeléctrico y obtención de los extractos proteínicos del frijol ayocote</b> .....	<b>35</b>
<b>2.7. Secado del extracto proteínico</b> .....	<b>36</b>
<b>2.8. Determinación de la DL<sub>50</sub></b> .....	<b>36</b>
<b>2.9. Ensayo de Genotoxicidad y Citotoxicidad</b> .....	<b>36</b>
<b>2.9.1. Prueba de micronúcleos</b> .....	<b>37</b>
<b>2.10. Hidrólisis de los extractos proteínicos.</b> .....	<b>40</b>
<b>2.11. Determinación del grado de hidrólisis</b> .....	<b>40</b>
<b>2.12. Separación de las fracciones peptídicas mediante ultrafiltración</b> .....	<b>41</b>
<b>2.13. Esquema Experimental</b> .....	<b>42</b>
<b>CAPÍTULO 3 . RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>43</b>
<b>3.1. Material vegetal.</b> .....	<b>43</b>
<b>3.2. Análisis Químico Proximal de la harina de frijol</b> .....	<b>43</b>
<b>3.4. Separación de las proteínas de almacenamiento del frijol ayocote</b> .....	<b>45</b>
<b>3.5. Caracterización electroforética (SDS-PAGE) de las fracciones proteínicas del frijol ayocote</b> .....	<b>46</b>
<b>3.6. Determinación del punto isoeléctrico y obtención de los extractos proteínicos del frijol ayocote</b> .....	<b>48</b>
<b>3.7. Secado del Extracto Proteínico</b> .....	<b>51</b>
<b>3.8. DL<sub>50</sub> de los Extractos Proteínicos</b> .....	<b>54</b>
<b>3.9. Evaluación Citotóxica de los Extractos Proteínicos (Negro y Morado)</b> .....	<b>54</b>
<b>3.10. Evaluación Genotóxica de los Extractos Proteínicos (Negro y Morado)</b> .....	<b>58</b>
<b>3.11. Hidrólisis enzimática y Porcentaje de Hidrolisis (%H)</b> .....	<b>61</b>
<b>3.12. Separación de péptidos mediante ultrafiltración</b> .....	<b>62</b>



<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>77</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Posibles centros de origen del frijol.....	10
Figura 1.2. Sistema radicular inicial del frijol.....	12
Figura 1.3. Nodulos presentes en la raíz del frijol .....	13
Figura 1.4. Estructura de una plántula de frijol .....	14
Figura 1.5. Esquema de los cuatro tipos de hábito de crecimiento del frijol.	15
Figura 1.6. Tipos de desarrollo de yemas .....	16
Figura 1.7. Tipos de hojas de la planta de frijol.....	16
Figura 1.8. Inflorescencia terminal de frijol Ayocote.....	17
Figura 1.9. Flor de Frijol Ayocote.....	18
Figura 1.10. Colores de las vainas del frijol .....	18
Figura 1.11. Secciones externas e internas de la semilla de frijol .....	19
Figura 1.12. Diferenciación del frijol con base en el color de la testa. ....	20
Figura 1.13. Planta y variedades de semilla de Frijol Ayocote ( <i>P. coccineus</i> ): .....	23
Figura 1.14. Formación de micronúcleo durante el proceso de eritropoyesis y su observación microscópica en sangre periférica. ....	29
Figura 2.1. Mapa del estado de Puebla.....	33
Figura 2.2. Tipos de Eritrocitos cuantificables .....	38
Figura 2.3. Pruebas in vivo .....	39
Figura 2.4. Realización de Frotis.....	39
Figura 3.1. Frijol ayocote .....	43
Figura 3.2. SDS-PAGE de las fracciones de frijol ayocote .....	47
Figura 3.3. Solubilidad de las proteínas a diferentes pH's. ....	48
Figura 3.4. Segundo barrido de la solubilidad de las proteínas a diferentes pH's.....	49
Figura 3.5. Punto isoeléctrico del frijol ayocote.....	50
Figura 3.6. SDS-PAGE del extracto proteínico a diferentes secados .....	52
Figura 3.7. SDS-PAGE de las proteínas del frijol negro y morado.....	53
Figura 3.8. SDS-PAGE 2D del extracto de frijol ayocote.....	54
Figura 3.9. Índice de citotoxicidad del extracto de frijol negro .....	56
Figura 3.10. Índice de citotoxicidad del extracto de frijol morado .....	58
Figura 3.11. Índice de genotóxica del extracto de frijol negro .....	59
Figura 3.12. Índice de genotóxica del extracto de frijol morado .....	60
Figura 3.13. SDS-PAGE de los péptidos de frijol ayocote. ....	63

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 3.1 Composición químico proximal de las variedades de frijol Ayocote .....	44
Cuadro 3.2. Composición químico proximal de diferentes variedades de frijol ayocote ( $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de muestra seca).....	45
Cuadro 3.3. Proteínas de reserva del frijol ayocote obtenidas por el método de Osborne .....	46
Cuadro 3.4. Contenido proteínico del extracto de frijol ayocote y otras especies. ....	51
Cuadro 3.5. Comparación del Grado de hidrólisis del frijol ayocote con respecto a otras leguminosas.....	61
Cuadro 3.6. Porcentaje de proteína de las fracciones peptídicas de los hidrolizados de frijol Ayocote. ....	62



## RESUMEN

En la actualidad, existe una gran variedad de enfermedades crónico degenerativas que son la principal causa de muerte a nivel mundial, por lo que se ha buscado el uso de principios activos provenientes de fuentes naturales que permitan eliminar o disminuir las alteraciones que dichas enfermedades causan al organismo, sin embargo para poder considerar un compuesto como agente terapéutico es necesario realizar pruebas de citotoxicidad y genotoxicidad, que permitan establecer su inocuidad para su posible utilización como agente nutracéutico, por lo que en el presente trabajo se utilizaron dos variedades de Frijol Ayocote caracterizadas por medio de un análisis químico proximal, se obtuvieron los extractos proteínicos por el método de precipitación isoeléctrica y se analizó su actividad citotóxica y genotóxica en ratones CD1+. Los resultados mostraron que ambas variedades presentan una composición química proximal semejante con alto contenido proteínico, un punto isoeléctrico de 4.0 para las proteínas de ambas variedades, el extracto es inocuo en dosis de hasta  $5000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , sin mostrar efecto genotóxico, con una citotoxicidad moderada por lo que podría ser utilizado como agente terapéutico contra enfermedades crónico degenerativas.

## **ABSTRACT**

Actually the chronic degenerative diseases, are the principal cause of dead in the world, for this reason the research has been focused to search the nutraceutical compounds from vegetal source, in order to eliminated or diminish the disorder in the organism, however is necessary evaluate the possible cytotoxic and genotoxic effect of the compounds to considered a as therapeutic agent, so that in this work two varieties of *Phaseolus coccineus* L. (runner bean) were chemically characterized, a proteinic extract was obtained by isoelectric focusing and was determinated the cytotoxic and genotoxic activity on CD1+ mice. The results showed that chemical composition, the isoelectric focusing (pH 4.0), safety doses from the proteinic extract (up to 5000 mg\*kg<sup>-1</sup>), without genotoxic effect and moderate cytotoxic activity were similar in both varieties of runner beans, so that the extract proteinic could be used as possible therapeutic agent versus chronic degenerative diseases.



## INTRODUCCIÓN

El frijol en América Latina representa una tradición productiva y de consumo que a lo largo de la historia se ha convertido inclusive en un alimento de identificación cultural, además de que es uno de los cultivos de mayor importancia económica, representa una de las fuentes más importantes de carbohidratos y proteínas (Cuéllar-Ortiz, 2008; Paredes *et al.*, 2006). En México, la producción de frijol se destina al consumo humano siendo nuestro país uno de los cinco principales productores de esta leguminosa a nivel mundial (Secretaría de Economía, 2012).

Es por esta razón que recientemente se ha prestado atención al frijol, por sus características nutricionales y nutracéuticas, ya que contiene compuestos bioactivos que se ha demostrado previenen o reducen enfermedades tales como, enfermedades cardiovasculares y cáncer de colon, de mama, cervicouterino y de próstata (Paredes y Valverde, 2006). Cuando existe la presencia de un agente xenobiótico, este induce un efecto citotóxico sobre las células nucleadas precursoras de la médula ósea, causando muerte celular o reducción de la división celular (Alvis-Davila, 2010). Otro efecto que se podría tener es un efecto genotóxico el cual causa daño sobre el material genético en cuanto a la fijación y transmisión del cambio inducido en el ADN, dando como consecuencia una mutación génica o cambios cromosómicos ya sean estructurales o numéricos y por ello es asociado a la aparición de procesos cancerígenos (Kramer, 1998; Erickson, 2003). En investigaciones recientes en animales alimentados con frijol, han encontrado que tiene propiedades quimiopreventivas contra agentes xenobióticos que generan algunos efecto citotóxico y genotóxicos que provocan mutaciones y algunos cánceres. Algunas de estas variedades son frijol Pinto Zapata, Ayocote Morado, Ayocote Negro y Negro 8025, las cuales sobresalieron por contrarrestar principalmente el cáncer de colon. Estas propiedades se han atribuido a su contenido de proteína, fibra, almidón resistente y a los fitoquímicos (fenólicos, y antocianinas) (Herrera-Hernández y Guzmán-Maldonado, 2010). Por lo que en el presente trabajo se muestran los efectos citotóxico y genotóxico de las proteínas de dos variedades de frijol ayocote.

## **CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES.**

### **1.1 Generalidades**

El frijol es la leguminosa alimenticia más importante para cerca de 300 millones de habitantes de países en desarrollo (Camacho-Espinoza *et al.*, 2010), ya que junto con el maíz constituye una de las fuentes importantes de carbohidratos y proteínas (Cuéllar-Ortiz, 2008).

En América Latina el cultivo del frijol, al igual que el de maíz, representan una tradición productiva y de consumo, que a lo largo de la historia se ha convertido no sólo en un alimento tradicional, sino también en una identificación cultural y económica ya que representa para los productores una fuente importante de ingresos, que a su vez es una garantía de seguridad alimentaria. En México, gran parte de la producción de frijol se destina al consumo humano siendo así que a nivel mundial ocupa el quinto lugar en producción y el tercero en consumo (Secretaría de Economía, 2012).

Recientemente se ha prestado atención al frijol, por sus características nutricionales y nutracéuticas, ya que previene o reduce enfermedades cardiovasculares y cáncer desarrollado en diferentes órganos. Asimismo es fuente de calcio, fósforo, hierro, magnesio y zinc; los cuales pueden contribuir en la prevención de osteoporosis, cáncer de colon e hipertensión, disminuyen el riesgo de contraer problemas relacionados con el sistema vascular y disfunciones del cerebro (Paredes y Valverde, 2006). En comparación con otros vegetales, el frijol presenta mayor número de compuestos nutracéuticos. Por ejemplo, una porción de 100g de frijol cocido puede aportar el 60% del requerimiento diario de fibra soluble, 40% de hierro y 66% de ácido fólico (Figuerola *et al.*, 2010), así como polifenoles, que incluyen fenoles solubles, taninos, antocianinas, flavonoides y ácido fólico (Paredes y Valverde, 2006; Figuerola *et al.*, 2010).

Por otro lado, los oligosacáridos y la fibra del frijol tienen funciones benéficas para la salud humana, ya que se ha demostrado que el consumo de 40 g de frijol cocido al día puede prevenir la formación de tumores en el colon; además ayudan a reducir el colesterol y la presión sanguínea (Reynoso-Camacho *et al.*, 2007).



## 1.2 Origen del frijol

Varios autores han postulado la hipótesis que establece tres centros de origen y domesticación del frijol los cuales son, el Sur de los Andes (que abarca desde el sur de Perú hasta San Luis Argentina), el Norte de los Andes (desde el occidente de Venezuela hasta el norte de Perú) y Mesoamérica (región limitada por los valles de los ríos Pánuco y Santiago México, hasta el norte de Costa Rica), en esta última región se ha encontrado la mayor especiación es decir, el proceso mediante el cual una población de una determinada especie da lugar a otra u otras variedades) de frijol (**Figura 1.1**)(Paredes *et al.*, 2006).



**Figura 1.1.** Posibles centros de origen del frijol (Paredes *et al.*, 2006).

Sin embargo, se ha reconocido a México como el centro de origen más probable o al menos el centro primario de diversificación, debido a los hallazgos arqueológicos que indican que éste cultivo existía desde hace algunos 5000 años a.C. (Ulloa *et al.*, 2011), aunado al hecho de que en nuestro país se han

identificado 47 de las 60 especies del género *Phaseolus*, además se han encontrado los antepasados silvestres de cinco especies cultivadas del *P. vulgaris* o frijol común, *P. acutifolius* o frijol tépari, *P. lunatus* o frijol lima, *P. coccineus* o frijol escarlata y *P. polyanthus* o frijol anual (Paredes *et al.*, 2006).

En la actualidad diferentes variedades del género *Phaseolus* se siembra en los cinco continentes y la semilla seca es después de la soya, la leguminosa de mayor comercialización en el mundo (Cuéllar-Ortiz, 2008).

### **1.3 Características Botánicas**

#### **1.3.1 Taxonomía del frijol**

El frijol pertenece al orden *Rosales*, familia *Leguminosae*, sub familia *Papilionoideae*, tribu *Phaseolae*, sub tribu *Phaseolinae*, genero *Phaseolus*, este género estaba considerado como un grupo heterogéneo con más de 250 especies distribuidas en el mundo (Debouck *et al.*, 1984; Payró de la Cruz, 2005), sin embargo, recientes investigaciones permitieron redefinirlo con aproximadamente 50 especies, todas americanas, 45 de ellas de origen mesoamericano, cinco especies domesticadas a partir de diferente ancestros silvestres (*Phaseolus vulgaris* L., *Phaseolus lunatus* L., *Phaseolus coccineus* L., *Phaseolus polyanthus* Greenman y *Phaseolus acutifolius* A. Gray); con el cual forma su propia poza de genes primaria donde existe total o casi total compatibilidad genética (Payró de la Cruz, 2005).

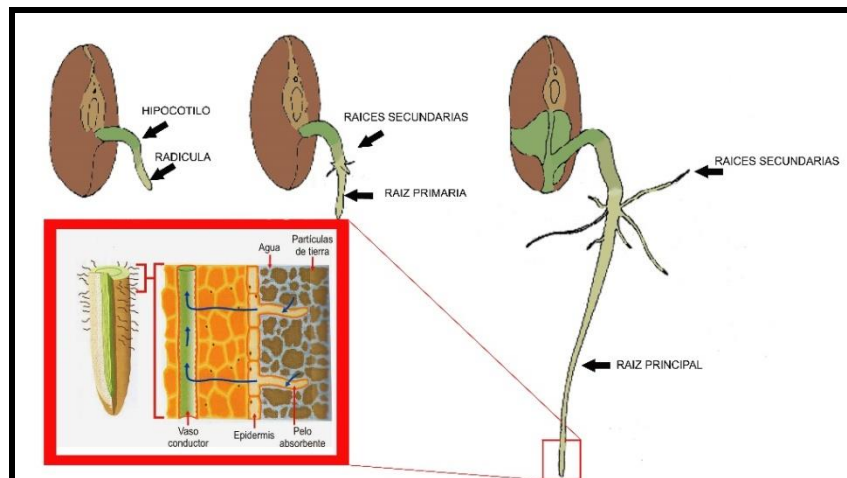
#### **1.3.2 Morfología**

Los caracteres morfológicos del frijol se agrupan en caracteres constantes y caracteres variables; los constantes son aquellos que caracterizan el taxón, es decir la especie o la variedad (generalmente son caracteres altamente hereditarios). Los caracteres variables reciben la influencia de las condiciones

ambientales, que podrían ser considerados como el resultado de la acción del medio ambiente. La descripción de la morfología de frijol, se hace normalmente tomando algunos caracteres como la raíz, el tallo, las ramas, las hojas, tipo de inflorescencia, flor, fruto y semilla (Debouck *et al.*, 1984 y Vargas *et al.*, 1998) de ahí la importancia de caracterizarlos como a continuación se describe.

### 1.3.2.1 Raíz

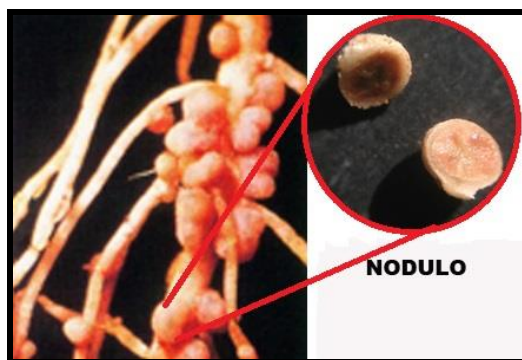
La raíz es uno de los órganos más importantes de la planta, su crecimiento y ramificación son cruciales para la absorción de agua y nutrimentos (Ontiveros-Cortés *et al.*, 2005). En la primera etapa, el sistema radical está formado por la raíz primaria o principal que se desarrolla a partir de la radícula del embrión (Debouck *et al.*, 1984), a los pocos días de la emergencia de la radícula es posible ver las raíces secundarias, pudiendo encontrar entre 3 y 7 de ellas en disposición de corona con un diámetro menor que la raíz principal; posteriormente aparecen las raíces terciarias y otras subdivisiones como los pelos absorbentes, los cuales se encuentran en todos los puntos de crecimiento de la raíz (**Figura 1.2**) (Debouck *et al.*, 1984; Vargas *et al.*, 1998).



**Figura 1.2.** Sistema radicular inicial del frijol, (Adaptada de Avilán-Rovira y Louis-Neptune, 1976)



El sistema radical es superficial ya que su mayor volumen se encuentra en los primeros 20 cm de profundidad del suelo, tiende a ser fasciculado, fibroso en algunos casos, pero con amplia variación, incluso dentro de una misma variedad (Debouck *et al.*, 1984; Vargas *et al.*, 1998 y Ontiveros-Cortés *et al.*, 2005), presenta nódulos distribuidos en las raíces laterales de la parte superior y media del sistema radical, estos nódulos tienen forma poliédrica (**Figura 1.3**), un diámetro entre 2 y 5 mm, conviven de forma simbiótica con bacterias *Rhizobium*, las cuales fijan el nitrógeno atmosférico contribuyendo a satisfacer los requerimientos de nitrógeno de la planta (Ontiveros-Cortés *et al.*, 2005).

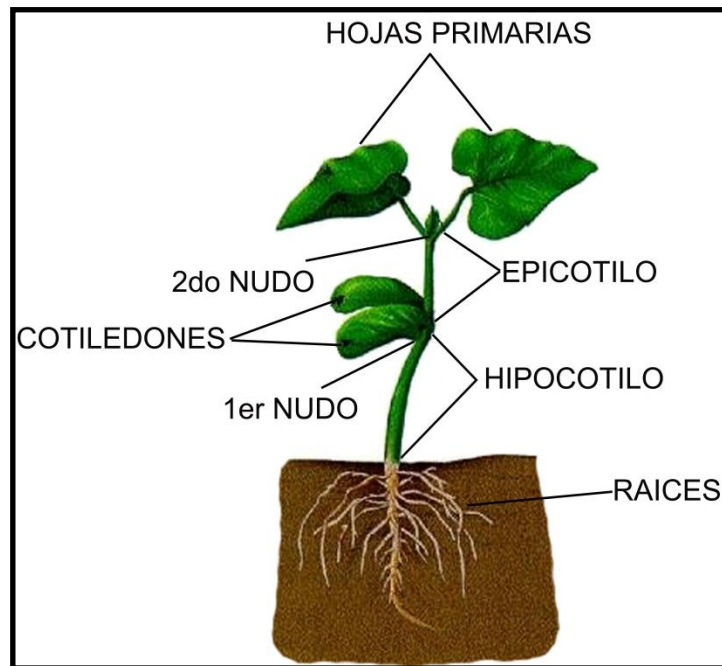


**Figura 1.3.** Nódulos presentes en la raíz del frijol (adaptado de Baca *et al.*, 2000)

### 1.3.2.2 Tallo

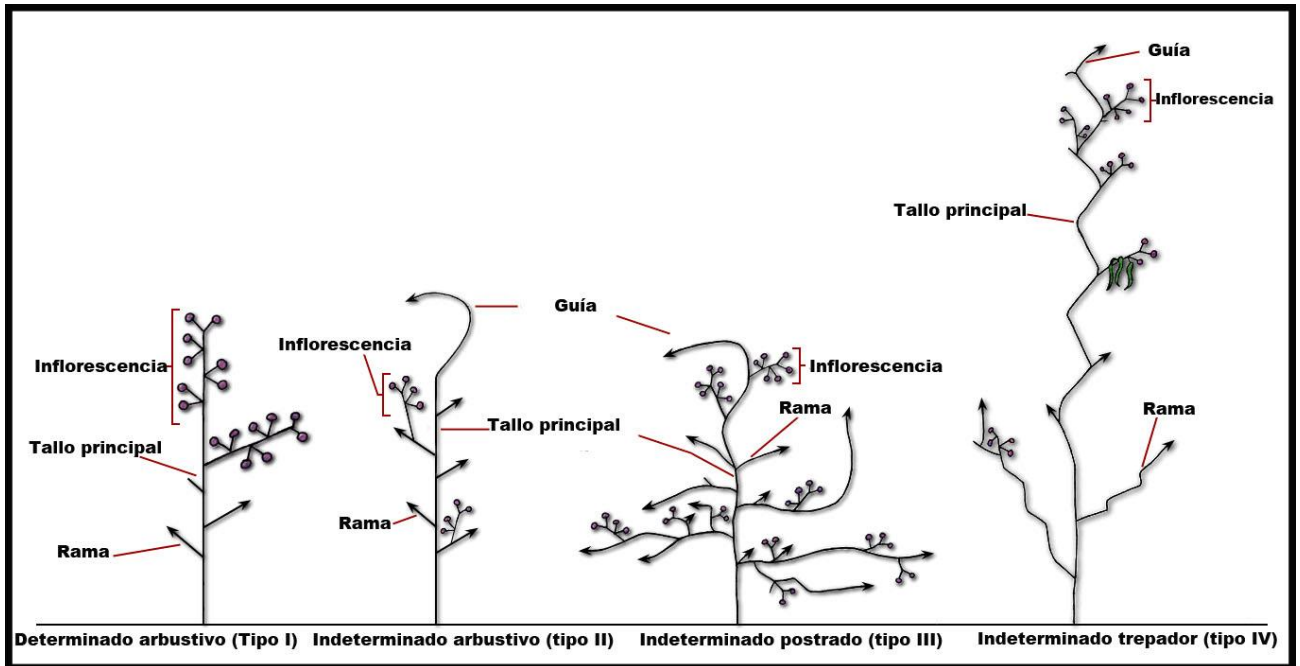
El tallo es el eje central de la planta el cual está formado por una sucesión de nudos y entrenudos, se origina a partir del meristemo apical del embrión de la semilla, se caracteriza por ser herbáceo (mantienen su estructura primaria, además de ser blando y de color verde durante el desarrollo de la planta), además de ser generalmente cilíndrico o ligeramente angular, debido a pequeñas corrugaciones de la epidermis. La primera parte del tallo que comprende desde la inserción con las raíces y el primer nudo se llama hipocotilo, cuya longitud es aproximadamente de  $9.60 \pm 0.30$  cm (cuando la plántula tiene una altura de 24.63 cm) (Celis-Velázquez *et al.*, 2008; Peña-Valdivia *et al.*, 2008). El siguiente nudo es el de las hojas primarias (las cuales son opuestas); entre el nudo de los cotiledones y el de las hojas primarias se encuentra un entrenudo llamado

epicotilo (**Figura 1.4**). Los dos primeros nudos, el de los cotiledones y el de las hojas primarias son formados durante la embriogénesis.



**Figura 1.4.** Estructura de una plántula de frijol (Adaptada de Rost *et al.*, 1979).

Según el hábito de crecimiento el tallo puede ser recto, semipostrado, o postrado, además puede presentar dos tipos de desarrollo en su parte terminal; en el primer tipo de desarrollo la planta termina en inflorescencia, por lo tanto cesa su crecimiento longitudinal por lo que se dice que la planta es de crecimiento determinado y en el segundo tipo de desarrollo la planta posee en su extremo final un meristemo vegetativo, el cual le permite continuar su crecimiento y seguir formando nudos y entrenudos (Debouck *et al.*, 1984). Por lo anteriormente mencionado, se clasifican en: hábito tipo I (arbustivas de crecimiento determinado), hábito Tipo II (arbustivas de crecimiento indeterminado), hábito Tipo III (postradas de crecimiento indeterminado) y hábito Tipo IV (trepadoras de crecimiento indeterminado) (**Figura 1.5**) (Debouck *et al.*, 1984; Vargas *et al.*, 1998 y Cuéllar-Ortiz, 2008). Esta clasificación trata no solamente del hábito de crecimiento, el cual involucra el desarrollo de los meristemas apicales, sino que también incluye la arquitectura de la planta (Vargas *et al.*, 1998).

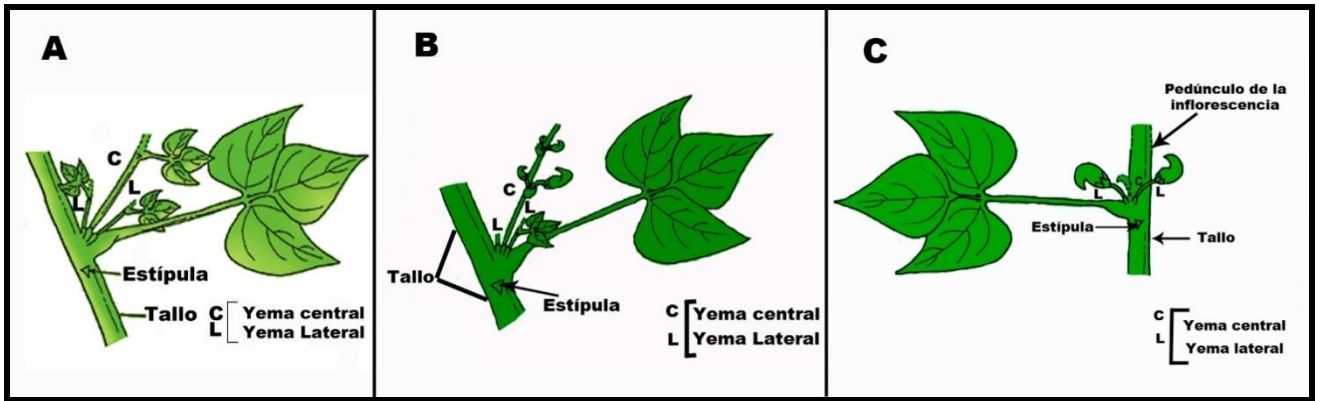


**Figura 1.5.** Esquema de los cuatro tipos de hábito de crecimiento del frijol (Adaptado de Debouck *et al.*, 1984).

### 1.3.2.3 Ramas y complejos axilares

Las ramas se desarrollan a partir de un complejo de yemas localizadas siempre en las axilas formadas por el pulvínulo de una hoja y el tallo o rama; también en la inserción de los cotiledones denominado complejo axilar, que generalmente está formado por tres yemas visibles desde el inicio de su desarrollo, las cuales forman un complejo axilar llamado tríada, pudiendo ser de tres tipos (**Figura 1.6**): desarrollo completamente vegetativo; desarrollo floral y vegetativo; y desarrollo completamente floral (Debouck *et al.*, 1984).

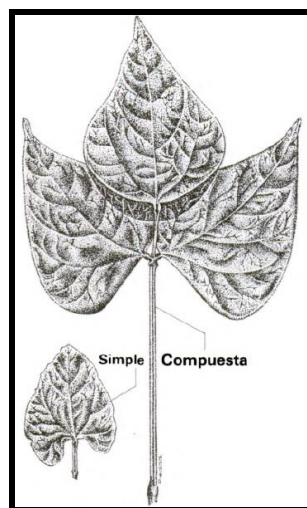




**Figura 1.6.** Tipos de desarrollo de yemas: A) completamente vegetativo, B) floral y vegetativo y C) completamente Floral (Adaptado de Debouck *et al.*, 1984).

### 1.3.2.4 Hojas

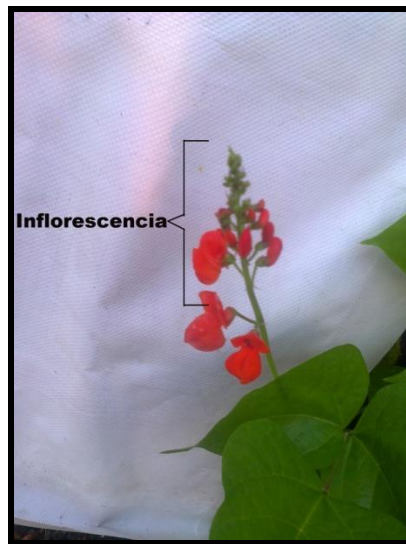
Las hojas del frijol son de dos tipos: simples y compuestas (**Figura 1.7**). Las hojas primarias son simples; aparecen en el segundo nudo del tallo y se forman en la semilla durante la embriogénesis, son opuestas al tallo, cordiformes, unifoliadas, auriculadas, simples y acuminadas, generalmente caen antes de que la planta esté completamente desarrollada (Debouck *et al.*, 1984). Las hojas compuestas son trifoliadas, van de moderadamente lobulares, a lobuladas; el tamaño de los folios laterales y el central es muy variable sobre todo en las silvestres (Vargas *et al.*, 1998).



**Figura 1.7.** Tipos de hojas de la planta de frijol (Debouck *et al.*, 1984).

### 1.3.2.5 Inflorescencia

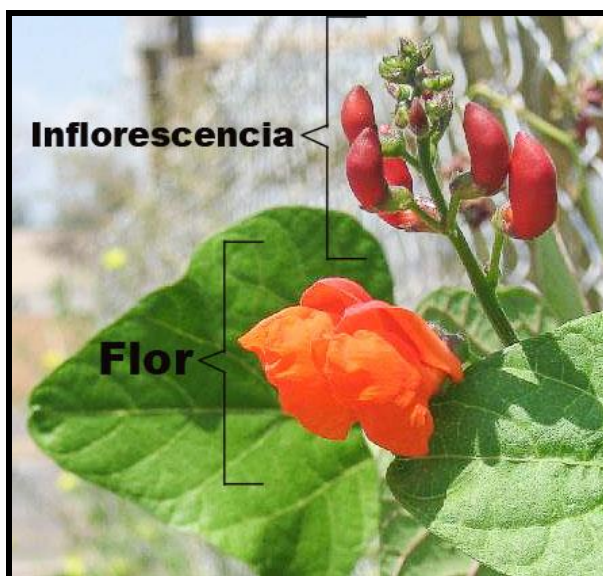
Desde el punto de vista botánico, las inflorescencias (**Figura 1.8**) pueden ser axilares o terminales, se consideran como racimos de racimos: es decir, un racimo principal compuesto de racimos secundarios, los cuales se originan de un complejo de tres yemas que se encuentra en las axilas formadas por las brácteas primarias y el raquis (Debouck *et al.*, 1984).



**Figura 1.8.** Inflorescencia terminal de frijol Ayocote (autor personal)

### 1.3.2.6. Flor

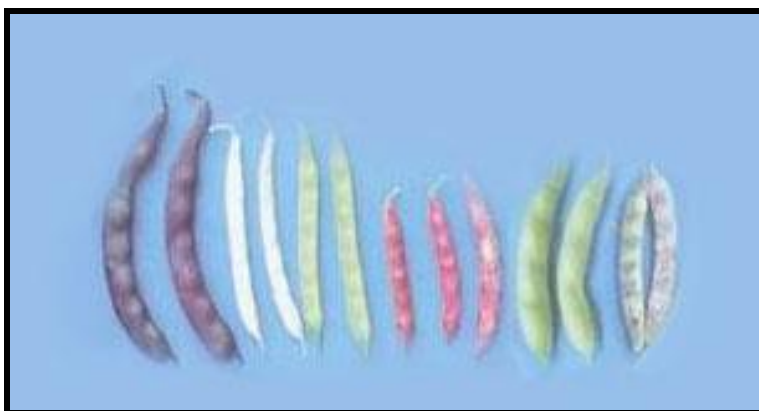
La flor es papilionácea, en su proceso de desarrollo se pueden distinguir dos estados, botón floral y flor completamente abierta, el primero se origina en las inserciones de un racimo o en el desarrollo completamente floral de las yemas de una axila, en su estado inicial está envuelto por las bractéolas que tienen forma ovalada o redonda, en el estado final la corola que aún está cerrada sobresale y las bractéolas cubren solo el cáliz. La flor (**Figura 1.9**) se abre después de la antesis (periodo de florescencia), este mecanismo favorece la autopolinización del frijol (Debouck *et al.*, 1984).



**Figura 1.9.** Flor de Frijol Ayocote (autor personal)

### 1.3.2.7 Fruto

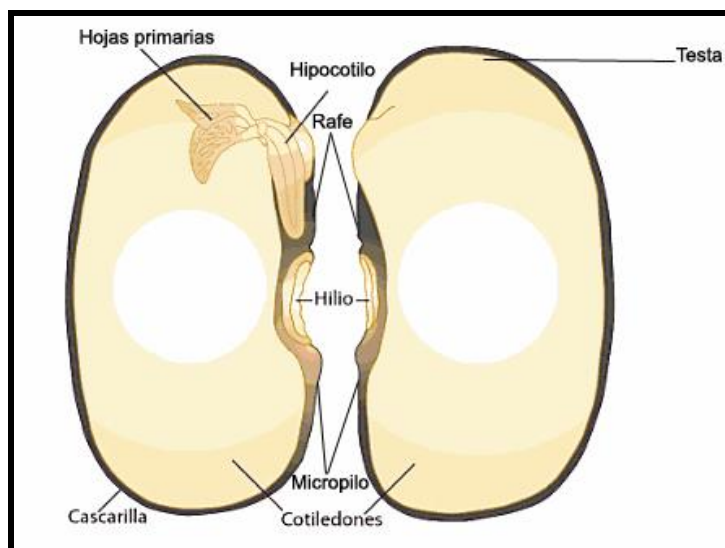
El fruto es una vaina (**Figura 1.10**) con dos valvas, las cuales provienen del ovario comprimido, las vainas son delgadas angostas y ovaes, pueden ser monocromáticas (morado oscuro, negro, rojo carmín, verde brillante, gris plateado, dorado, amarillo fuerte, café, amarillo pálido o blanco) o dicromáticas (moradas, rojo carmín, rojo pálido, rosa oscuro, sobre verde; verdes sobre ante o café). La longitud y ancho promedio de las vainas inmaduras varía de 1.5 a 7 cm y 0.2 a 0.8 cm respectivamente en las variedades silvestres (Vargas *et al.*, 1998).



**Figura 1.10.** Colores de las vainas del frijol (Bascur y Tay, 2005)

### 1.3.2.8 Semilla

Las semillas son ex-albuminosas (no poseen albumen, por lo tanto las reservas nutritivas se concentran en los cotiledones), se origina de un óvulo campilótopo (óvulo curvo) y puede tener varias formas: cilíndrica, riñón, esférica u otras. Las secciones externas más importantes de la semilla son: 1) testa o cubierta, que corresponde a la capa secundaria del óvulo; 2) hilio, cicatriz dejada por el funículo, el cual conecta la semilla con la placenta; 3) micrópilo que es una abertura en la cubierta o corteza de la semilla cerca del hilio, a través de esta abertura se realiza la absorción de agua y 4) rafe, proveniente de la soldadura del funículo con los tegumentos externos del óvulo campilótopo. Internamente la semilla está constituida solamente por el embrión, el cual está formado por la plúmula, las dos hojas primarias, el hipocotilo, los dos cotiledones y la radícula (**Figura 1.11**) (Debouck *et al.*, 1984).



**Figura 1.11.** Secciones externas e internas de la semilla de frijol (adaptada de Paredes *et al.*, 2006)

El color de la testa de la semilla se clasifica del más oscuro al más claro en diferentes categorías específicas que van desde el negro, hacia los diferentes tonos de colores como: café pálido a café oscuro, marrón, gris con café o verde, amarillo o verde con amarillo, blanco, blanco con matiz morado, verde clorofila, de



verde a olivo, rojo, rosa y hasta morado (**Figura 1.12**). En cuanto al moteado la clasificación abarca diferentes categorías que van desde la ausencia del moteado a las otras categorías como: moteado constante, veteado, con manchas romboides, salpicada de puntos, con manchas circulares, con un patrón de color en algún margen, con una mancha larga grande, bicolor, bicolor con manchas, con color alrededor del hilio. El brillo de la testa de la semilla también permite una diferenciación fenotípica de la misma en tres categorías: mate, media o brillante (Vargas *et al.*, 1998).



**Figura 1.12.** Diferenciación del frijol con base en el color de la testa. A) Negro, B) Amarillo oscuro y C) Café claro (autor personal).

#### 1.4 Variedades

Las variedades del frijol se clasifican de acuerdo a diferentes criterios:

- ❖ Por la forma de consumo, se considera que hay variedades para consumo como grano seco, como grano semi-maduro, como vaina verde (habichuelas, ejotes o vainitas) y como grano tostado (ñuña o poroto).
- ❖ Desde el punto de vista agronómico; generalmente se utilizan características como la duración del período vegetativo y se tienen variedades precoces o tardías
- ❖ Considerando el fotoperiodo se tienen variedades sensibles, insensibles o neutras.
- ❖ Considerando la sensibilidad a factores limitantes de la producción se tienen dos categorías: resistentes y susceptibles.

- ❖ Según el hábito de crecimiento se cuenta con variedades de hábito determinado (Tipo I) o indeterminado (Tipos II, III y IV).
- ❖ Por tamaño, forma y colores del grano.

Esta última resulta subjetiva y difícil, por lo que se utiliza la clasificación de la Unidad de Recursos Genéticos (URG) del CIAT. El tamaño es determinado por el peso de los granos, donde son clasificados como pequeños (hasta  $25\text{g} \cdot 100 \text{ semillas}^{-1}$ ), medianos (entre  $25$  y  $40\text{g} \cdot 100 \text{ semillas}^{-1}$ ) y grandes (desde  $40\text{g} \cdot 100 \text{ semillas}^{-1}$ ); o bien para medir el tamaño se puede usar el calibre del grano (número de semillas en 100g), llamado gramaje. Referente a la forma se utilizan como redondos, elípticos y ovoides. La URG admite en su catálogo descriptivo del germoplasma de frijol común ocho grupos de colores que corresponden a siete familias de colores, y dentro de cada familia incluye una graduación de tonalidades. Esta clasificación toma en cuenta solo el color primario, indicados como: 1 (blanco), 2 (crema), 3 (amarillo), 4 (pardo o marrón), 5 (rosado), 6 (rojo), 7 (morado) y 8 (negro) (Voysesst, 2000).

### **1.5 Variedades de mayor consumo en México.**

El consumo de frijol en nuestro país depende de la ubicación geográfica y de la variedad de frijol, de tal manera que; en la zona norte se consumen las variedades claras y azufradas, que se cultivan principalmente en los estados de Sinaloa y Durango; mientras que una gran parte de frijol negro y rojo (principalmente ayocotes y sangre de toro) se cultivan en Nayarit, Estado de México, Guanajuato, San Luis Potosí y Zacatecas y son consumidos principalmente en la zona centro y sur del país (Rodríguez-Licea, 2008).

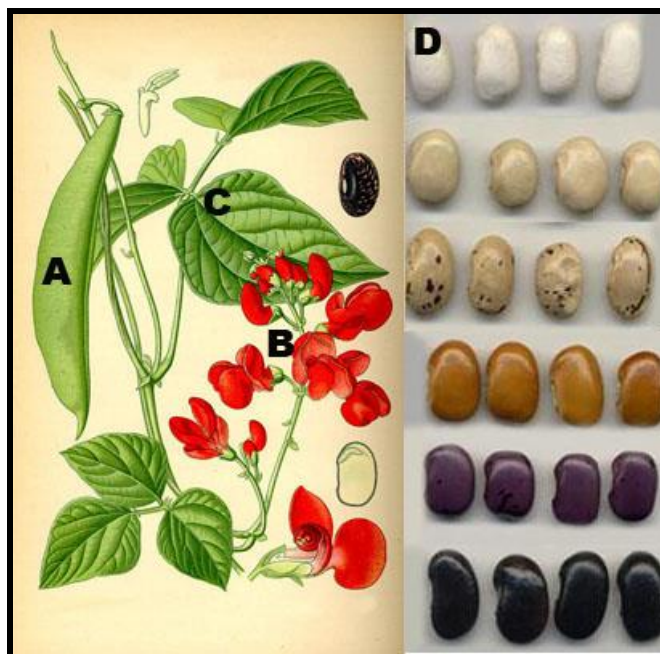
Los consumidores identifican al frijol por su nombre comercial o por el color, pero desconocen la variedad que están adquiriendo, ya que en el mercado existen muchas variedades que se comercializan con el mismo nombre pero que son diferentes en tiempo de cocción, color y contenido de proteína. Por ejemplo, se conoce como frijol pinto nacional al café claro, mientras que al café oscuro se le

conoce como frijol delicias, otro ejemplo es el frijol bayo que es confundido con el canario. A pesar del desconocimiento que existe por parte de los consumidores, existe una importante diferencia en las preferencias por tipo de frijol: 77.2% de la población prefiere frijol grano (limpio, seleccionado, cribado, pulido y empacado, siendo el 45.2% de primera clase, 21.6% de segunda y 10.4% extraclase) y el 22.8% el industrializado (17.9% opta por el enlatado, 2.9% por el empaque al vacío, 1.5 % por el empaque tetra-Pack y 0.5% por el deshidratado) (Rodríguez-Licea *et al.*, 2010).

Por la aceptación del consumidor, el frijol se ha clasificado en, muy preferente donde se encuentran variedades como azufrado, mayocoba, negro jamapa, peruano, flor de mayo, flor de junio, pinto saltillo y bayo; preferente, donde se encuentran variedades como garbancillo, manzano, negro San Luis, negro Querétaro y pinto y no preferente representado por el bayo blanco, alubia blanca, negro Zacatecas, ojo de cabra y bayo berrendo (Secretaría de Economía, 2012).

### **1.6 Frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*)**

El frijol ayocote (*P. coccineus*) es una planta perenne cultivada como anual, trepadora, con un gran vigor vegetativo; los tallos alcanzan varios metros de longitud, aunque hay algunos cultivares que son de mata, con hojas compuestas, vaina de 8 a 10 cm de largo y semillas grandes, de color variable, con una inflorescencia de 20 cm, con flores de color rojo escarlata (**Figura 1.13**) (Benavides *et al.*, 2010).



**Figura 1.13.** Planta y variedades de semilla de Frijol Ayocote (*P. coccineus*): A) Vaina, B) Inflorescencia y flor, C) hoja compuesta y D) Colores de la semilla. (Adaptada de Ruíz-Salazar, 2009)

El frijol ayocote es nativo de Mesoamérica, se encuentra generalmente en las zonas altas tropicales y húmedas de México, en tiempos precolombinos, se cultivó extensivamente en el altiplano mexicano (Vargas *et al.*, 1998 y Benavides *et al.*, 2010), siendo tan antiguo como el frijol lima, actualmente esta especie no se cultiva en forma tan amplia como el frijol común, tiene cuatro subespecies, dos de las cuales presentan formas cultivadas: *P. coccineus* subsp. *coccineus* distribuida especialmente en la zona de México y Guatemala, y *P. coccineus* subsp. *polyanthus* que se encuentra tanto en México y Guatemala como en Colombia, Ecuador y Venezuela y las otras dos subespecies no cultivadas son; *P. coccineus* subsp. *formosus* y *P. coccineus* subsp. *obvallatus* (Vargas *et al.*, 1998).

Actualmente las especies cultivadas se producen a baja escala en algunos estados de México, donde además se aprovechan sus variedades silvestres (Benavides *et al.*, 2010). Se siembra en monocultivo de temporal e intercalado con el maíz, éstas últimas pueden ser de guías cortas, o plantas trepadoras que maduran mucho después que el maíz. En los municipios de Libres y Serdán, Puebla, el frijol ayocote se siembra en monocultivo, mientras que en regiones de los estados de

Hidalgo, México y Tlaxcala se siembran, junto al maíz o al frijol común (*P. vulgaris*). También se cultiva y consume el frijol ayocote en otras regiones del país, como las partes altas del estado de Chiapas, donde por lo general se asocia con el maíz, y en los estados de Chihuahua, Durango y Zacatecas, donde se cultiva junto al frijol común (*P. vulgaris* L.) de temporal. A nivel mundial, se cultiva en países de Centro y Sudamérica, además de Inglaterra y Estados Unidos. (Vargas-Vázquez *et al.*, 2011).

El aporte nutricional del frijol ayocote es comparable al de *P. vulgaris* L., por lo que las vainas verdes se aprovechan como verdura y la semilla madura como una leguminosa; además la planta se usa también como ornamental, de cobertura (se usa como techo principalmente de habito indeterminado trepador) y como forraje (Benavides *et al.*, 2010).

Aunque México es el centro de origen del frijol ayocote, la atención que se le ha dado ha sido insuficiente para impulsarlo como alternativa de producción y mucho menos como fuente de compuestos nutraceuticos.

### **1.7 Frijol como fuente de compuestos nutraceuticos**

En la actualidad existen diferentes enfermedades crónico degenerativas que han cobrado muchas vidas en el país y el mundo, por lo que se ha buscado alternativas alimenticias que por su contenido de compuestos nutraceuticos permitan disminuir o controlar la incidencia de estos padecimientos, tal es el caso del frijol. En investigaciones recientes se ha incluido al frijol en la dieta de conejos diabéticos y ratas con cáncer de colon (inducidas químicamente por agentes xenobiótico) para evaluar el efecto que tiene su consumo sobre el control de estas enfermedades. Las variedades Pinto Zapata y Negro fueron las más sobresalientes para contrarrestar el cáncer de colon y disminuir los niveles de glucosa en sangre estas propiedades se han atribuido a su contenido proteína, fibra, almidón resistente, compuestos fenólicos, y antocianinas (Herrera-Hernández y Guzmán-Maldonado, 2010), efectos similares se han observado con frijol negro y blanco cocido cuyos resultados mostraron una disminución en la incidencia total de tumores (Hangen y Bennink, 2002), mientras que en el año 2006 se demostró el efecto protector del frijol cocido contra el cáncer (García,



2006). De forma específica se ha observado que animales alimentados con frijol Ayocote Morado, Ayocote Negro, Negro 8025 y Pinto Zapata presentaron menor incidencia de tumores (Herrera-Hernández y Guzmán-Maldonado, 2010).

Los compuestos nutraceuticos extraídos del frijol podrían ser una buena opción para usarse como ingredientes para la elaboración de alimentos funcionales o pueden incluirse en matrices no alimentarias y ejercer efectos benéficos para la salud (Escudero *et al.*, 2012). Aunque existe el hecho de que debe probarse los posibles efectos adversos que podrían ejercer. Para ello existen algunos requerimientos de seguridad que incluyen la ausencia de toxicidad, citotoxicidad y genotoxicidad (Hartmann *et al.*, 2007).

### **1.8. Genotoxicidad**

La genotoxicidad es un término amplio que se refiere a cualquier tipo de daño causado sobre el material genético en cuanto a la fijación y transmisión del cambio inducido en el ADN, dando como consecuencia una mutación génica o cambios cromosómicos ya sean estructurales o numéricos y por ello es asociado a la aparición de procesos cancerígenos (Kramer, 1998; Erickson, 2003). Los ensayos de genotoxicidad se definen como ensayos *in vitro* e *in vivo* diseñados para detectar agentes que inducen daño genético de forma directa o indirecta, mediante diversos mecanismos. Si bien estos fueron desarrollados para la detección de agentes capaces de producir defectos hereditarios, mediante la inducción de mutaciones en células germinales, sin embargo en la actualidad los ensayos de genotoxicidad constituyen una herramienta esencial en la determinación de riesgo cancerígeno, evaluando sus efectos en células somáticas. Existen evidencias contundentes de que las mutaciones que causan alteraciones en oncogenes y genes supresores de tumores en las células somáticas están implicadas en la inducción del cáncer (Alvis-Davila, 2010).

En cuanto a los ensayos utilizados habitualmente corresponden a ensayos bien establecidos y ampliamente aceptados. Estos ensayos se realizan siguiendo protocolos rigurosos que optimizan la capacidad de detectar un posible potencial genotóxico, con el fin de asegurar que un resultado negativo puede ser aceptado

con un grado suficiente de confianza, también existen directrices en elaboración como es por ejemplo el caso del ensayo de micronúcleos *in vitro* e *in vivo* (Kramer, 1998; Zeiger, 1998).

### **1.9. Citotoxicidad**

La citotoxicidad se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado (Repetto, 2002).

Normalmente las células de la sangre tienen una vida corta y se renuevan constantemente por la proliferación mitótica de las células madre localizadas en los órganos hemopoyéticos (Alvis-Davila, 2010). Las células madre son células que se dividen continuamente y sus células hijas siguen dos destinos: unas permanecen como células madre, manteniendo esta población, y otras se diferencian en otros tipos celulares con características específicas (Junqueira y Carneiro, 1996).

Dependiendo de su grado de madurez, las células eritrocíticas se denominan EPC (Eritrocitos policromáticos) “eritrocito joven” y ENC (Eritrocitos normocromáticos) “eritrocitos maduros” (Junqueira y Carneiro, 1996). Cuando existe la presencia de un agente xenobiótico, este induce un efecto citotóxico sobre las células nucleadas precursoras de la médula ósea, causando muerte celular o reducción de la división celular, causara un descenso en la formación de EPC quedando reflejado en la relación entre EPC/ ENC (Alvis-Davila, 2010).

### **1.10. Carcinogénesis y Mutagénesis**

La información genética es transmitida de una célula a su sucesora por la precisa duplicación de las cadenas de ADN, en un proceso que es común a todos los seres vivos, desde simples bacterias hasta complejos animales o plantas. Alteraciones en la información genética ocurren como resultado de pequeñas alteraciones en la estructura de la molécula de ADN, por lo cual, la secuencia de

bases transmitida a la otra generación celular es distinta. Estas alteraciones son mutaciones, las que pueden ser compatibles con una vida normal y sana, dando lugar a las pequeñas diferencias entre miembros de una especie y constituyendo la fuerza motriz de la evolución (Trossero *et al.*, 2006).

Estas mutaciones pueden provocar el crecimiento de las células cancerosas ya que se dividen continuamente y en forma autónoma, invadiendo e interfiriendo la función de los tejidos normales. La transformación de una célula normal en cancerosa sería consecuencia de anomalías en los sistemas de regulación que son fundamentales en la fisiología celular normal. La característica más importante de la célula maligna es que se multiplicará dando siempre origen a células cancerosas y nunca volverá a originar células normales. Así, las anomalías que producen las células cancerosas son heredadas en forma permanente y son estables a nivel celular. Esto nos sugiere la hipótesis que cambios genéticos son responsables de la transformación neoplásica (Sherr, C.J. 1996 y Trossero *et al.*, 2006). Por otra parte se sabe que la mayoría de los estudios concluyen que el cáncer tiene relación con alteraciones del material genético y que existe una correlación de un 90% entre carcinogénesis y mutagénesis (Marques *et al.*, 2002), aunque es conveniente particularizar que la etiología del cáncer es multifactorial, una de las principales causas es la mutación génica y cromosómica. Las mutaciones que provocan cáncer afectan a los genes responsables de la proliferación celular, del desarrollo celular y las que controlan otras actividades celulares fundamentales. Las anomalías pueden presentarse en dos tipos de genes, los protooncogenes, que al mutar y activarse originan la oncogénesis y con ello propician la transformación maligna y los genes supresores que, bloquean el desarrollo del tumor regulando los genes que participan en el crecimiento celular (Deshpande, 2002).

Debido a esto, es justificable y necesario el creciente interés por desarrollar sistemas de prueba que detecten a todos aquellos agentes potencialmente tóxicos para el material genético así como, aquellas sustancias que protejan al DNA de dicha toxicidad. En general, las evaluaciones se realizan en bacterias, en células somáticas y gaméticas (Preston y Hoffmann, 2001), y se pueden realizar tanto en

sistemas *in vitro* como *in vivo*. A continuación se menciona las características generales de la técnica más usada *in vivo*.

### **1.10.1. Pruebas de mutagénesis *in vivo***

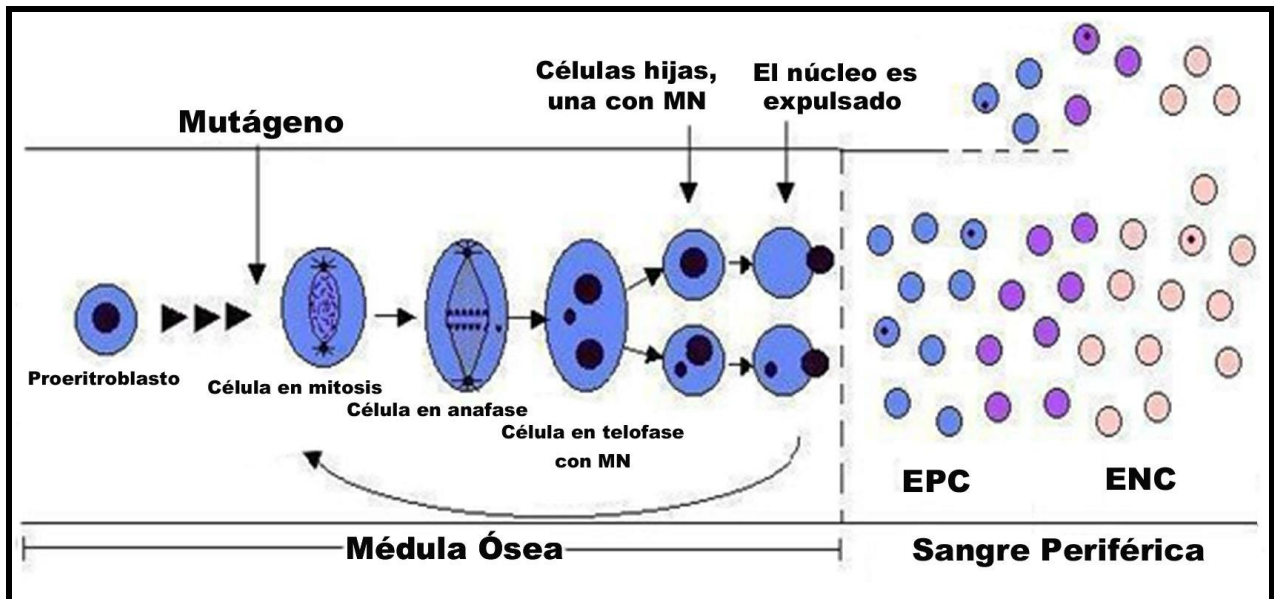
Esta técnica evalúa el efecto de una sustancia en un sistema completo y expuesto a las condiciones metabólicas normales. Entre este grupo se encuentra la de dominantes letales, esta prueba está diseñada para mostrar los efectos tóxicos en células germinales del animal macho intacto, por lo general ratón o rata. Estos efectos se deben en general a daños cromosómicos, que conducen a errores de desarrollo que son mortales para el cigoto, por lo tanto se debe de utilizar la prueba de micronúcleos (Lu, 1992).

#### **1.10.1.1. Modelo experimental de micronúcleos**

En la eritropoyesis (**Fig. 1.14**) se presentan mitosis sucesivas del proeritroblasto en la médula ósea, proceso en el cual éstas células en maduración constante son susceptibles de daño genotóxico, una vez que salen a circulación sistémica se pueden observar dos tipos de células, los eritrocitos policromáticos (EPC) o células inmaduras que aún contienen RNA y al terminar la síntesis de hemoglobina disminuyen de tamaño y terminan su maduración convirtiéndose en eritrocitos normocrómicos (ENC). En etapas previas a la formación de estas células, diversos xenobióticos o compuestos clastogénicos pueden dañar el material genético y evidenciar lesiones cromosómicas que se manifiestan como micronúcleos (MN).

Los micronúcleos son fragmentos citoplasmáticos de cromatina, separados del núcleo principal y se forman a partir de la ruptura de fragmentos acéntricos o bien por rezago anafásico, lo cual se traduce en la aparición de un pequeño núcleo en células anucleadas como los eritrocitos, o bien en el citoplasma de células nucleadas como los linfocitos o espermatogonias. Debido a este daño, en las investigaciones es necesario asegurar que la división celular no ha sido bloqueada

y el tiempo permite que la forma mutagénica activa alcance la población de células blanco, previa a la división celular y próxima al conteo (Madrigal-Santillán, 2000).



**Figura 1.14.** Formación de micronúcleo durante el proceso de eritropoyesis y su observación microscópica en sangre periférica (Adaptado de Madrigal *et al.*, 2002).



## JUSTIFICACIÓN.

Para considerar la posible utilización de un compuesto como agente terapéutico, es necesario evaluar su eficacia nutraceutica y seguridad toxicológica, actualmente los principales compuestos bioactivos son extraídos de fuentes vegetales y de manera específica se ha considerado el género *Phaseolus* como una fuente probable, sin embargo existen especies que aún no han sido estudiadas en nuestro país, tal es el caso del frijol ayocote, una especie silvestre y endémica de la cual no existen estudios del aporte nutraceutico, estudios previos en nuestro laboratorio han mostrado que es una fuente importante de proteína. Además existen evidencias experimentales de péptidos bioactivos de otras especies de *Phaseolus* como agentes antihipertensivos, antioxidantes, anticarcinogénicos en cultivos celulares *in vitro*. En la literatura consultada no se encontraron estudios acerca de la bioactividad de *Phaseolus coccineus* L., por lo tanto es importante la realización de estudios que indiquen la naturaleza de los extractos proteínicos con fines nutricionales así como su posible efecto en la citotoxicidad y genotoxicidad de células hemáticas *in vivo*.

## **HIPÓTESIS**

La implementación de una dieta basada en extractos proteínicos procedentes del frijol ayocote, tendrán un impacto significativo en la toxicidad inducida en los animales de experimentación, disminuyendo la citotoxicidad y la genotoxicidad producida por la daunorrubicina.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto citotóxico y genotóxico de extractos proteínicos derivados de la semilla del frijol ayocote y su acción como protector contra un agente xenobiótico.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- ❖ Determinar la composición químico proximal del frijol ayocote
- ❖ Separar y caracterizar electroforéticamente las proteínas de almacenamiento del frijol ayocote.
- ❖ Determinar el punto isoeléctrico de las proteínas del frijol ayocote
- ❖ Obtener el extracto proteínico de la semilla de frijol ayocote
- ❖ Determinar la citotoxicidad y genotoxicidad del extracto proteínico del frijol ayocote.
- ❖ Evaluar la acción protectora del extracto proteínico contra un agente xenobiótico

## CAPÍTULO 2 . MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Material vegetal

Se utilizaron 2 variedades de frijol ayocote (morada y negra) provenientes del municipio de Zacatlán ubicado en la Sierra Norte del estado de Puebla sus coordenadas geográficas son 19° 56' 5" latitud norte, 98° 12' 36" latitud occidental (**Figura 2.1**). Las semillas se limpiaron manualmente retirando materia extraña y granos dañados, y se almacenaron a 4°C hasta su análisis.



**Figura 2.1.** Mapa del estado de Puebla y la ubicación del municipio de Zacatlán.

### 2.2. Acondicionamiento de la materia prima

Las semillas limpias de ambas variedades se molieron en un molino manual, se tamizaron con malla No. 40, la harina obtenida se secó en estufa de flujo laminar (BINDER, Alemania) a 30 °C por 3 h, la muestra seca se almacenó a temperatura ambiente ( $\approx$  25 y 30) hasta su análisis.

### **2.3. Análisis proximal de la harina de frijol ayocote**

El análisis químico proximal del frijol se realizó según los métodos descritos en el AOAC (1995).

- a) Contenido de proteínas: Método 955.04, factor N X 6.25,
- b) Humedad: Método 934.01
- c) Extracto etéreo: Método 920.39
- d) Cenizas: Método 923.03
- e) Carbohidratos totales (por diferencia)

### **2.4. Separación de las proteínas de almacenamiento del frijol ayocote**

Para el fraccionamiento de las proteína de la harina de frijol ayocote se utilizó el método de Osborne, 1924.

*Albúminas*; se extrajeron con agua destilada en una proporción de 1:10 (p/v) con agitación constante (1 h; 4 °C), se centrifugó a 6000 x g (30 minutos; 4 ° C). El sobrenadante se almacenó a 4 °C hasta su análisis.

*Globulinas*; el pellet obtenido de la extracción de las albúminas fue utilizado, agregando NaCl al 10%, se mantuvo en agitación (1 h; 4 °C) se centrifugó a 6000 x g (30 minutos; 4 °C). El sobrenadante se almacenó a 4 ° C hasta su análisis.

*Prolaminas*; el pellet obtenido de la extracción de globulinas fue utilizado para preparar una disolución con 2-propanol al 70%, se mantuvo en agitación (1 h; 4 °C) se centrifugó a 6000 xg (30 minutos; 4 °C). El sobrenadante se almacenó a 4 ° C hasta su análisis.

*Glutelinas*, el pellet obtenido de la extracción de prolaminas fue mezclado con ácido acético al 10%, se mantuvo en agitación (1 h; 4 °C) se centrifugó a 6000 x g (30 minutos; 4 °C). El sobrenadante se almacenó a 4 ° C hasta su análisis.

## **2.5. SDS-PAGE de las fracciones proteínicas del frijol ayocote**

El análisis electroforético de las fracciones proteínicas del frijol ayocote se realizó según la metodología descrita por Laemmli, 1970. La muestra ( $1\mu\text{g}$  de proteína $\cdot\text{mL}^{-1}$ ) se solubilizó en disolución reguladora (0.1M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS), se agitó y se colocó en baño maría a  $96^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. Se aplicaron  $10\mu\text{L}$  de muestra en cada pozo del gel de poliacrilamida. La separación electroforética se realizó a 120 V durante 1.5 h. El gel se tiñó con disolución de azul de Coomassie R-250. La masa molecular de las proteínas se determinó graficando la movilidad relativa de los estándares de referencia contra masa molecular en papel semilogarítmico y extrapolando el valor correspondiente de las fracciones de las proteínas analizadas.

## **2.6. Determinación del punto isoelectrico y obtención de los extractos proteínicos del frijol ayocote**

Para obtener el extracto proteínico, primero se determinó el punto isoelectrico de las proteínas del frijol ayocote con el método de precipitación isoelectrica reportado por Bernardino-Nicanor *et al.*, 2000, el cual consistió en dos pasos: en el primero se determinó el pH de máxima solubilidad de las proteínas y en el segundo se determinó el pH de máxima precipitación.

Se preparó una disolución con harina de frijol y agua destilada en una relación 1:14 (p/v), se ajustó el pH con NaOH (0.1N) en el intervalo de 9 a 11, se centrifugó a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos a  $3000 \times g$  para encontrar el pH de máxima solubilidad mediante la determinación de proteína en el sobrenadante por el método de Bradford, usando el sobrenadante seleccionado se ajustó el pH en un intervalo de 3 a 7 con HCl (0.1N), el punto isoelectrico de las proteínas fue aquel pH donde se obtuvo la menor concentración de proteínas en el sobrenadante.



## **2.7. Secado del extracto proteínico**

Una vez obtenido el extracto proteínico, se realizaron pruebas de almacenamiento, utilizando dos temperaturas de secado; temperatura ambiente (16 h) o 50 °C (4 h); además dos temperaturas de congelación con la finalidad de conservarlos en fresco -18 °C o -72 °C. Las condiciones adecuadas para la conservación de las muestras fueron seleccionadas considerando los resultados obtenidos en la electroforesis de poliacrilamida al 8 % teñido con azul de coomassie.

## **2.8. Determinación de la DL<sub>50</sub>**

La determinación de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) se realizó de acuerdo al método descrito por Lorke, 1983. Los animales empleados fueron 45 ratones machos de la cepa CD1<sup>+</sup> con un peso aproximado de 20-25g, los cuales fueron mantenidos con libre acceso al agua y al alimento. Se dio una sola administración por dosis, la cual fue por vía intragástrica a 3 ratones por dosis, las cuales fueron de 10, 100, 1000 mg\*kg<sup>-1</sup>. Se observaron 7 días y se anotaron los pesos, durante este periodo no se observó mortandad de los sujetos, por lo que, se procedió a administrar los extractos a otros grupos de ratones con dosis de 1600, 2900 y 5000 mg\*kg<sup>-1</sup> observando nuevamente por 7 días.

## **2.9. Ensayo de Genotoxicidad y Citotoxicidad**

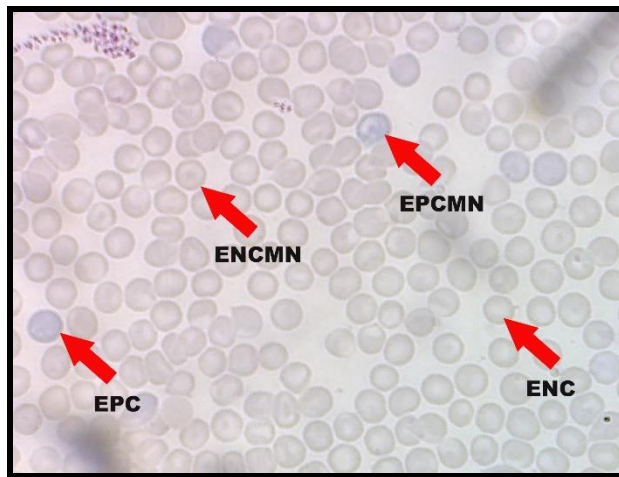
Para esta prueba se utilizaron dos dosis de acuerdo a lo reportado por Reynoso-Camacho *et al.*, 2006 (430 y 860 mg\*kg<sup>-1</sup> de masa corporal/día) así como una dosis combinada con Daunorrubicina (Dau) (860 mg\*kg<sup>-1</sup> + Dau 1 mg\*kg<sup>-1</sup>) y los controles (administración de solución salina isotónica) y control positivo (Dau), este ensayo fue subcrónico y se administraron por vía intragástrica durante 5 días consecutivos, dejando 7 días de recuperación, se tomaron muestras de sangre periférica a diferentes tiempos (0, 48, 96, 144, 264 y 360 h.) para posteriormente fijar, teñir y leer los frotis.

### 2.9.1. Prueba de micronúcleos

Para determinar el efecto genotóxico y citotóxico se utilizaron ocho grupos con cinco ratones por grupo:

1. SS: Testigo negativo (solución salina)
2. Dau: Testigo positivo ( $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).
3. FN 430: Extracto proteínico de frijol negro (430 mg)
4. FN 860: Extracto proteínico de frijol negro (860 mg)
5. FN+Dau: Extracto proteínico de frijol negro (860 mg) mas Daunorrubicina ( $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
6. FM 430: Extracto proteínico de frijol morado (430 mg).
7. FM 860: Extracto proteínico de frijol morado (860 mg).
8. FM+Dau: Extracto proteínico de frijol morado (860 mg) mas daunorrubicina ( $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).

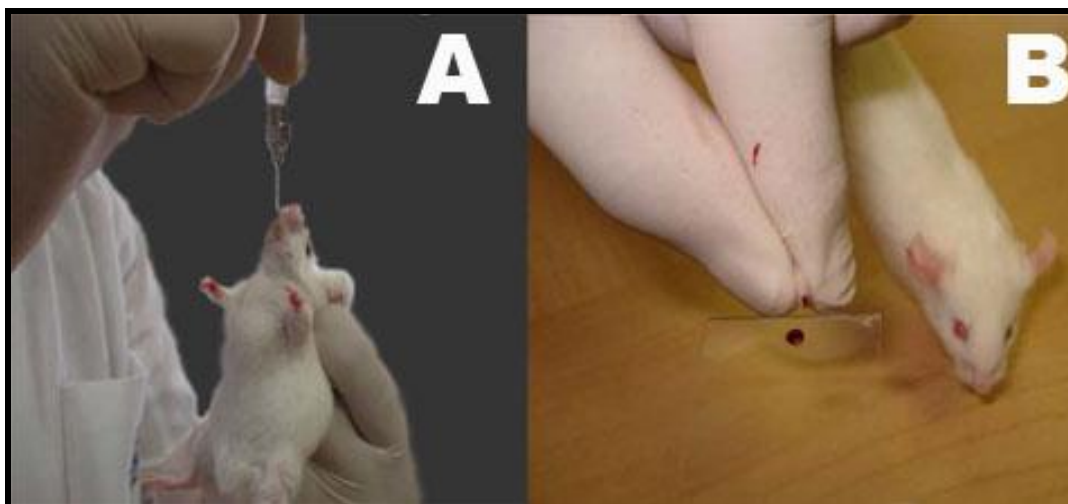
Esta técnica sugiere que los eritrocitos constituyen la manera más eficaz de evaluar la afección de la actividad medular (Chandra y Aruna, 1998). La razón de este estudio es monitorear la presencia de micronúcleos en eritrocitos normocrómicos (ENC) (**Figura 2.2**). Los EPC son células jóvenes (reticulocitos) recientemente liberadas a la circulación sanguínea, además se distinguen de los ENC por que se tiñen de color azul violáceo y son de un tamaño mayor al de los ENC. De tal forma que para evaluar la citotoxicidad se determinó la relación entre el número de EPC y de ENC en 1000 células por cada ratón y para determinar la genotoxicidad se observó el número de eritrocitos normocrómicos micronucleados (ENCMN) en un total de 1000 eritrocitos por cada ratón tratado.



**Figura 2.2.** Tipos de Eritrocitos cuantificables ENCMN (Eritrocitos Normocrómicos Micronucleados son ligeramente rosados con fragmentos de cromatina en el citoplasma), EPCMN (Eritrocitos Policromáticos Micronucleados son azulados con fragmentos de cromatina morada en el citoplasma), EPC (Eritrocitos policromáticos) y ENC (Eritrocitos Normocromicos)

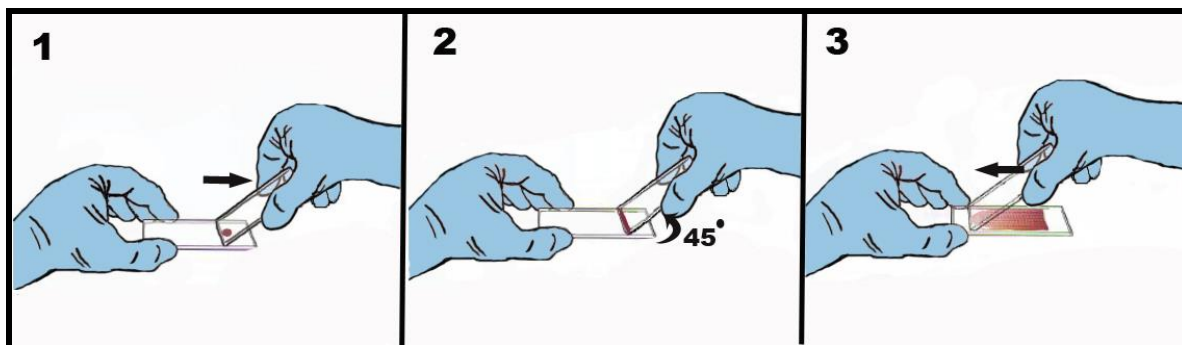
La toma de muestra se realizó en sangre periférica para cada ratón, se tomaron muestras a diferentes tiempos (0, 48, 96, 144, 264, 360, 408 y 504 h) después de cada administración (una administración por un periodo de cinco días) intragástrica (**Figura 2.3. A**) del extracto proteico.

Se inmovilizaron a los animales procurando que la cola pudiera ser manipulada para tomarles muestras sanguíneas de manera individual, la obtención de la muestra sanguínea se realizó, haciendo una limpieza aséptica con etanol al 70 % y cortando aproximadamente 1 mm de la punta de la cola con tijeras de disección previamente desinfectadas. Se tomaron las muestras por duplicado (**Figura 2.3. B**).



**Figura 2.3.** Pruebas in vivo, A) Administración intragástrica y B) Toma de muestra sanguínea (Adaptada de Martínez-Fregozo, 2008)

El frotis sanguíneo se realizó de siguiente manera, la primera gota de sangre se eliminó y la segunda gota fue depositada en una laminilla de vidrio, con otra laminilla se procedió a realizar un frotis (**Figura 2.4**), se dejó secar a temperatura ambiente ( $\approx 25^{\circ}\text{C}$ ) y se fijó con metanol absoluto por 5 minutos.



**Figura 2.4.** Realización de Frotis, 1) Muestra de sangre, 2) Se coloca la punta de otro cristal encima de la gota de sangre  $45^{\circ}$  procurando que se expanda a lo ancho de la punta del mismo y 3) Se desliza el cristal superior para esparcir la muestra de sangre y separa los eritrocitos.

Posteriormente se realizó la tinción de Giemsa en donde se colocaron los frotis en un vaso de Coplin con colorante Giemsa (el cual se preparó con 2.0 mL de colorante Giemsa en 5 mL de amortiguador de fosfatos 0.3 M a un pH de 6.8, y 43 mL de agua destilada; **Anexo 1**). Las laminillas quedaron totalmente cubiertas durante 50 minutos, al terminar se lavaron con agua destilada, se dejaron secar a

temperatura ambiente (Brown, 1993), para realizar el conteo de eritrocitos con un microscopio óptico (OLYMPUS CX21) con el objetivo de inmersión de aceite 100X, se contaron 1000 eritrocitos totales, obteniendo la relación de EPC/ENC como índice de citotoxicidad y, al mismo tiempo, se cuantificaron los eritrocitos normocromicos micronucleados (ENCMN) y los eritrocitos policromaticos micronucleados (EPCMN).

## 2.10. Hidrólisis de los extractos proteínicos.

Los extractos proteínicos se hidrolizaron por medio de un tratamiento secuencial con pepsina, pancreatina y peptidasa, de acuerdo al método establecido por Mora-Escobedo *et al.*, 2009.

El extracto proteínico (2.5 g de extracto\* 50 mL<sup>-1</sup> de agua destilada) se ajustó a pH 2 con HCl 1.0 N y se digirió con 100 mg de pepsina (E/S= 1/25) por 60 minutos a 37°C, Posteriormente se ajustó el pH a 5.3 con NaHCO<sub>3</sub> 0.9 M y se adicionaron 100 mg de pancreatina (E/S= 1/20), ajustando nuevamente el pH a 7.5 con NaOH 1 N se dejó digerir durante 120 minutos a 37°C y después se agregaron 3.25 mg de peptidasa y se continuó con la digestión durante 60 minutos a 37°C. Para detener la digestión la muestra se colocó en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos

## 2.11. Determinación del grado de hidrólisis

Se determinó el grado de hidrólisis (%GH) utilizando el método reportado por Kim *et al.*, 1990, el cual se estimó midiendo la cantidad de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (TCA) al 10% y su proporción con respecto a la cantidad de nitrógeno total en la suspensión del extracto proteínico según la siguiente fórmula:

$$\%GH = \frac{\text{Nitrógeno soluble en TCA al 10\%}}{\text{Nitrógeno Total}} * 100$$

Para evaluar la cantidad de nitrógeno soluble en TCA se tomaron 10 mL del hidrolizado y se mezclaron con 10 mL de TCA al 10%. Esta mezcla se centrifugó a  $12,100 \times g$  por 15 minutos, el nitrógeno presente en el sobrenadante se determinó por el método Kjeldahl (AOAC, 1997).

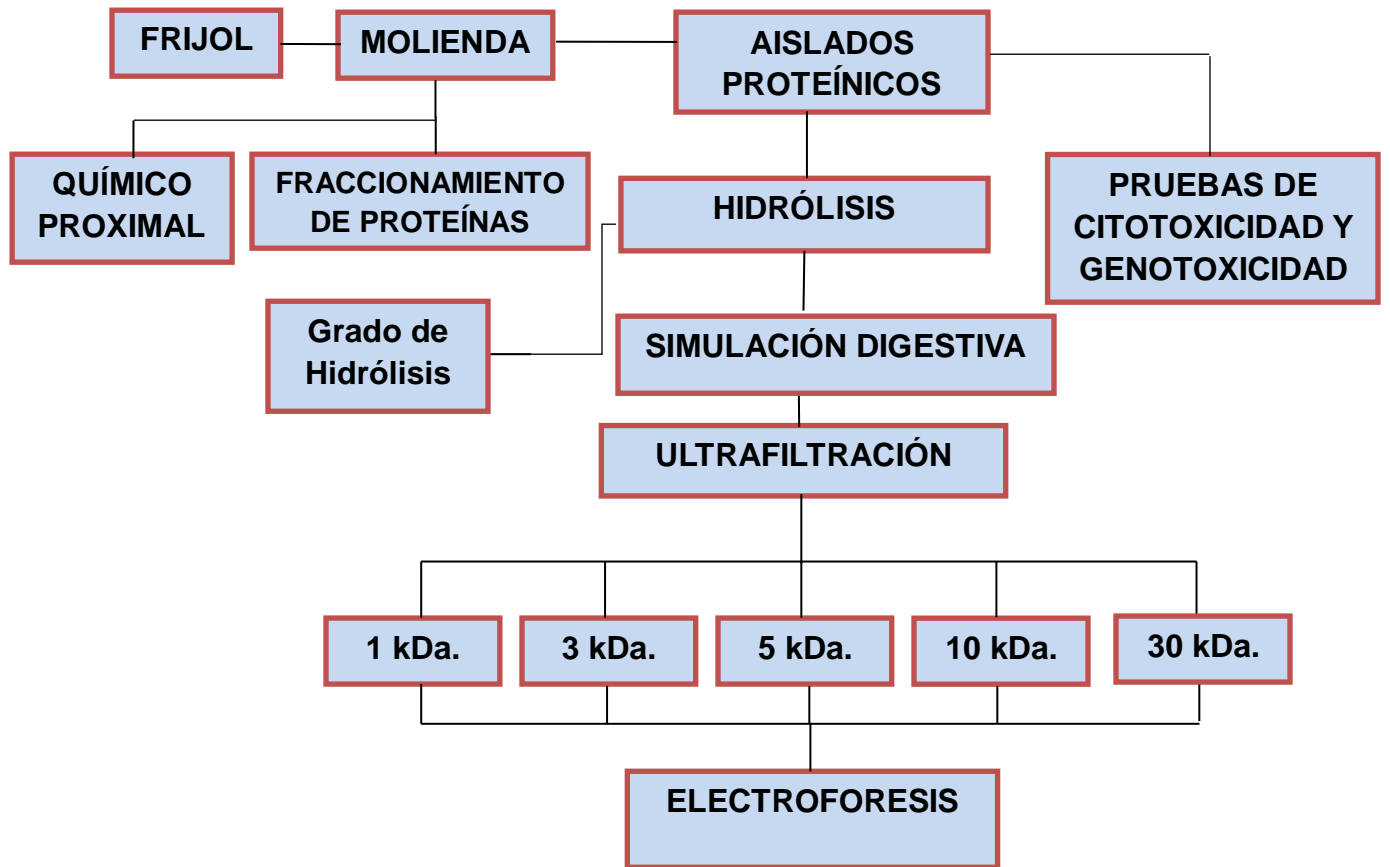
El nitrógeno total se midió tomando 10 mL de una suspensión de proteína preparada de forma similar a la utilizada para desarrollar la hidrólisis enzimática pero sin la presencia de enzima y se le determinó el contenido de nitrógeno por el método Kjeldahl (AOAC, 1997). En ambos casos se utilizó el factor de conversión  $N \times 6.25$ .

## **2.12. Separación de las fracciones peptídicas mediante ultrafiltración**

Los hidrolizados proteínicos se centrifugaron a  $10,000 \times g$  por 20 minutos. El sobrenadante con las fracciones solubles se utilizó para iniciar la separación por ultrafiltración. Se utilizó una unidad de ultrafiltración equipada con un agitador magnético (Amicon, milipore, USA) para evitar el sedimento de la muestra sobre las membranas. Se utilizaron cinco membranas de manera secuencial con diferentes cortes de masa molecular (MWCO): 30000 Da (30kDa), 10000 Da (10 kDa); 5000 Da (5 kDa); 3000 Da (3 kDa) y 1000 Da (1 kDa), para obtener seis fracciones peptídicas marcadas como: A (masa molecular  $> 30$  kDa), B (masa molecular entre 30 y  $>10$  kDa), C (masa molecular entre 10 y  $>5$  kDa), D (masa molecular entre 5 y  $>3$  kDa), E (masa molecular entre 3 y  $>1$  kDa) y F (masa molecular  $1 < 1$  kDa) (Cho *et al.*, . 2004).



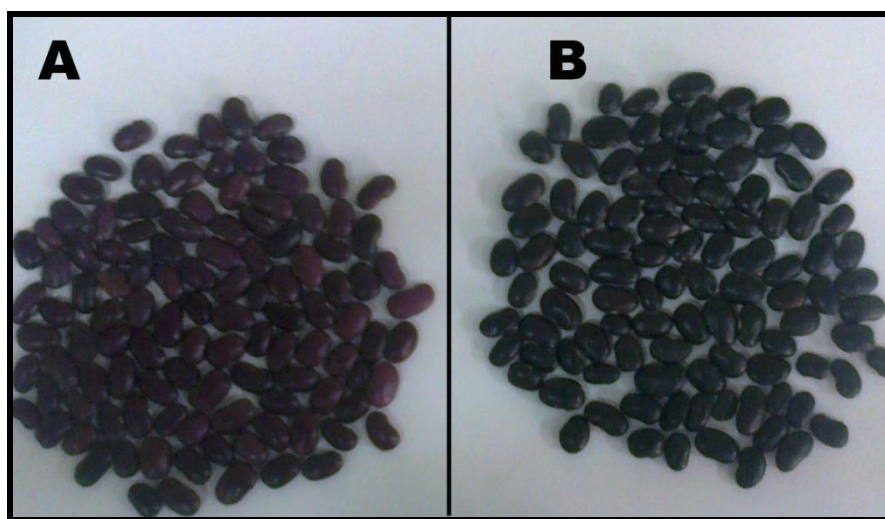
### 2.13. Esquema Experimental



## CAPÍTULO 3 . RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Material vegetal.

Se utilizaron dos variedades de frijol ayocote: morada y negra (**Figura 3.1**) con tamaño de  $1.93 \pm 0.18$  cm de largo,  $1.23 \pm 0.15$  cm de ancho y  $0.81 \pm 0.20$  cm de grosor para el frijol morado y para el frijol negro se obtuvieron tamaños de  $1.71 \pm 0.27$  cm de largo,  $1.18 \pm 0.09$  cm de ancho y  $0.75 \pm 0.18$  cm de grosor.



**Figura 3.1.** Frijol ayocote: A) variedad morada y B) variedad negro

### 3.2. Análisis Químico Proximal de la harina de frijol

La composición química proximal de ambas variedades de frijol ayocote (*P. coccineus*) muestra que existen diferencias estadísticamente significativas. El frijol morado presentó 1.87% menos concentración de proteína en comparación con el frijol negro (**Cuadro 3.1**)

**Cuadro 3.1 Composición químico proximal de las variedades de frijol Ayocote**

Composición	Variedad de Frijol Ayocote	
	Negro	Morado
Humedad	9.37 <sup>b</sup> ±0.208	9.62 <sup>a</sup> ±0.113
Cenizas*	3.50 <sup>b</sup> ±0.876	3.77 <sup>a</sup> ±0.133
Grasa Cruda*	3.50 <sup>b</sup> ±0.021	3.78 <sup>a</sup> ±0.115
Proteína cruda*	23.80 <sup>a</sup> ±0.876	21.93 <sup>b</sup> ±0.683
**Carbohidratos totales*	59.83 <sup>b</sup> ±0.00	60.90 <sup>a</sup> ±0.00

Letras iguales entre filas indican que no hay diferencia estadística.  $P \leq 0.05$

\*Los componentes están en base seca.

\*\* Se determinó por diferencia.

Los resultados obtenidos para la concentración de proteína en las variedades utilizadas en la presente investigación se encuentran dentro del intervalo reportado para otras variedades de frijol ayocote (**Cuadro 3.2**)

Por otra parte, los valores de humedad fueron mayores a los reportados por Álvarez-Salas y Turbay-Ceballos, 2009 en la variedad de frijol petaco donde reportan 7.79%. Mientras que, el contenido de extracto etéreo del frijol negro y morado (**Cuadro 3.1**) se encuentran por debajo de lo reportado por Aremu *et al.*, 2010 y Pérez-Herrera *et al.*, 2002 (**Cuadro 3.2**). Finalmente, el contenido de cenizas de las variedades analizadas en el presente trabajo se encuentran dentro del intervalo reportado por Aremu *et al.*, 2010 y Álvarez-Salas y Turbay-Ceballos, 2009, (**Cuadro 3.2**).

Las diferencias observadas en la composición químico proximal de las variedades analizadas y las referenciadas podría ser debido a que fueron cultivadas en distintos lugares, son variedades diferentes y por ende las propiedades de cultivo y de suelo son distintas.

**Cuadro 3.2. Composición química proximal de diferentes variedades de frijol ayocote (g\*100g<sup>-1</sup> de muestra seca)**

Variedad de Frijol Ayocote	Composición					Referencias
	Humedad	Cenizas*	Grasa Cruda*	Proteína cruda*	Fibra cruda*	
Escarlata	3.7 <sup>d</sup> ±0.050	4.6 <sup>a</sup> ±0.460	13.4 <sup>b</sup> ±0.250	20.2 <sup>d</sup> ±0.150	58.1 <sup>b</sup> ±0.00	Aremu <i>et al.</i> , 2010
Petaco	7.79 <sup>c</sup> ±0.625	2.41 <sup>d</sup> ±0.159	15.18 <sup>a</sup> ±0.863	21.65 <sup>b</sup> ±0.678	52.97 <sup>b</sup> ±0.86	Álvarez-Salas y Turbay-Ceballos, 2009

Letras iguales entre columnas indican que no hay diferencia estadística. P≤0.05

### 3.4. Separación de las proteínas de almacenamiento del frijol ayocote

El fraccionamiento de las proteínas de la semilla de frijol resulta ser muy conveniente ya que se inicia la caracterización de las proteínas de reserva de una variedad de frijol ayocote que aún no ha sido estudiada del todo, por lo que es importante no solo para comparación sino también como paso inicial de una posible purificación (Shewry *et al.*, 1995), en el caso del frijol ayocote se observa que como toda leguminosa las fracciones mayoritarias son las albúminas y globulinas (**Cuadro 3.3**), las cuales representan el 60% y 58.74% para el frijol negro y morado respectivamente, siendo las prolaminas las fracciones presentes en menor proporción en ambas variedades, sin embargo se observa que la concentración de prolaminas en el frijol negro es el doble de la concentración obtenida para el frijol morado.

**Cuadro 3.3.** Proteínas de reserva del frijol ayocote obtenidas por el método de Osborne

Fracción	Recuperación (%)	
	Negro	Morado
Albuminas	41.54	41.74
Globulinas	18.50	17.00
Prolaminas	4.46	2.14
Glutelinas	6.81	4.50
Residuo	28.69	34.62

Los resultados obtenidos para ambas variedades son menores a los reportados por Gallegos-Tintore *et al.*, 2004, donde reporta para albuminas y globulinas, 62.3 % y 34.4% respectivamente para *Phaseolus Lunatus*, sin embargo estos valores se encuentran dentro del intervalo reportados por Gallegos, en el 2000 (36% de albumina y 25.5 % globulinas en *Phaseolus Lunatus*). Las variaciones observadas podrían ser atribuidas a diferentes factores, entre los cuales se encuentran, distinta variedad, proceso de extracción diferente y características de la harina usada en la extracción; ya que se ha demostrado que existen variaciones en los resultados cuando se maneja harina desengrasada o sin desengrasar (Nikokyris y Kandyliis, 1997).

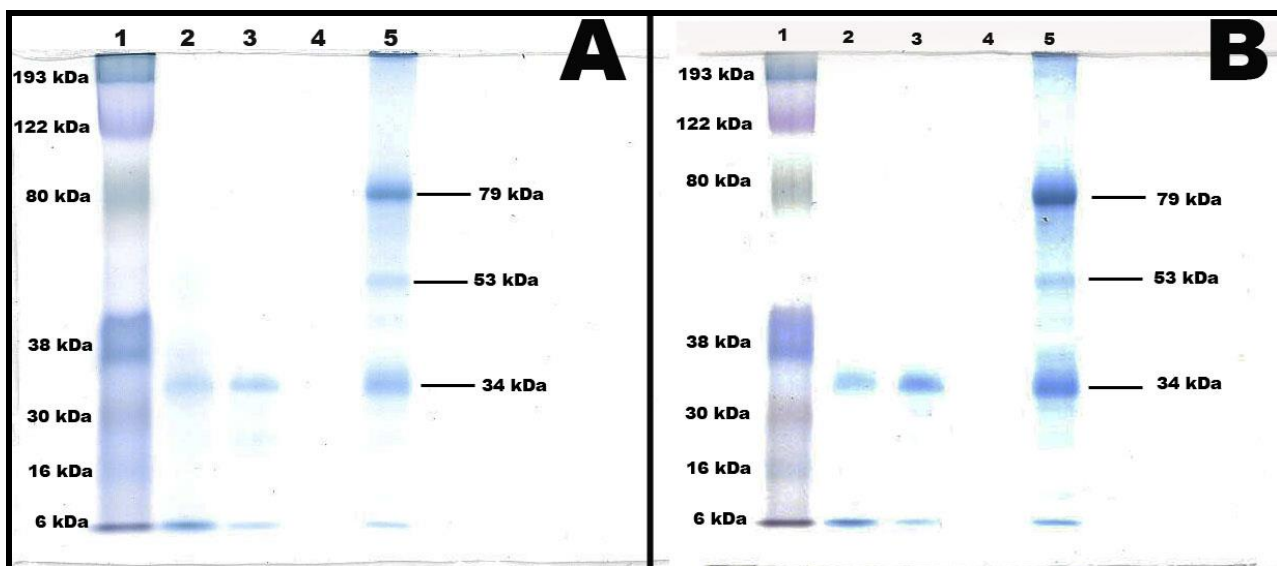
### **3.5. Caracterización electroforética (SDS-PAGE) de las fracciones proteínicas del frijol ayocote.**

El análisis electroforético SDS-PAGE (**Figura 3.2**) mostró que las fracciones de albuminas y globulinas presentaron un banda de 34 kDa en ambas variedades, esto puede ser debido a que ambas fracciones presentan regiones conservadas tanto en la misma como en diferente variedad o bien, se trata del mismo

polipéptido, ya que se ha demostrado que debido a que albuminas y globulinas presentan propiedades semejantes de solubilización, la extracción de ambas fracciones podría contaminarse (Kortt and Caldwell 1990, Du *et al.*, 2012).

En el caso de las prolaminas la concentración presente en las muestras fue muy pequeña, por lo que fue imposible observar los polipéptidos presentes.

Por último, las glutelinas mostraron tres bandas en ambas variedades de 79 kDa, 53 kDa y 34 kDa (**Figura 3.2**), lo cual nuevamente podría ser un indicio de que existen regiones conservadas entre variedades dentro del frijol ayocote.



**Figura 3.2.** SDS-PAGE de las fracciones de frijol ayocote. A) Frijol negro, B) Frijol morado: Carril 1 Patrón electroforético, Carril 2 Albuminas, Carril 3 Globulinas, Carril 4 Prolaminas y Carril 5 Glutelinas.

El polipéptido de 34 kDa obtenido en ambas variedades de frijol ayocote podría ser semejante al reportado por Gallegos-Tintore 2004, para albúminas (33 kDa) de *P. Lunatus* y se encuentra dentro del intervalo reportado para globulinas de *P. Lunatus* y *Lupinus mutabilis sweet* (32 kDa y 33 kDa respectivamente ((Gallegos-Tintore 2004 y Acuña *et al.*, 1996)

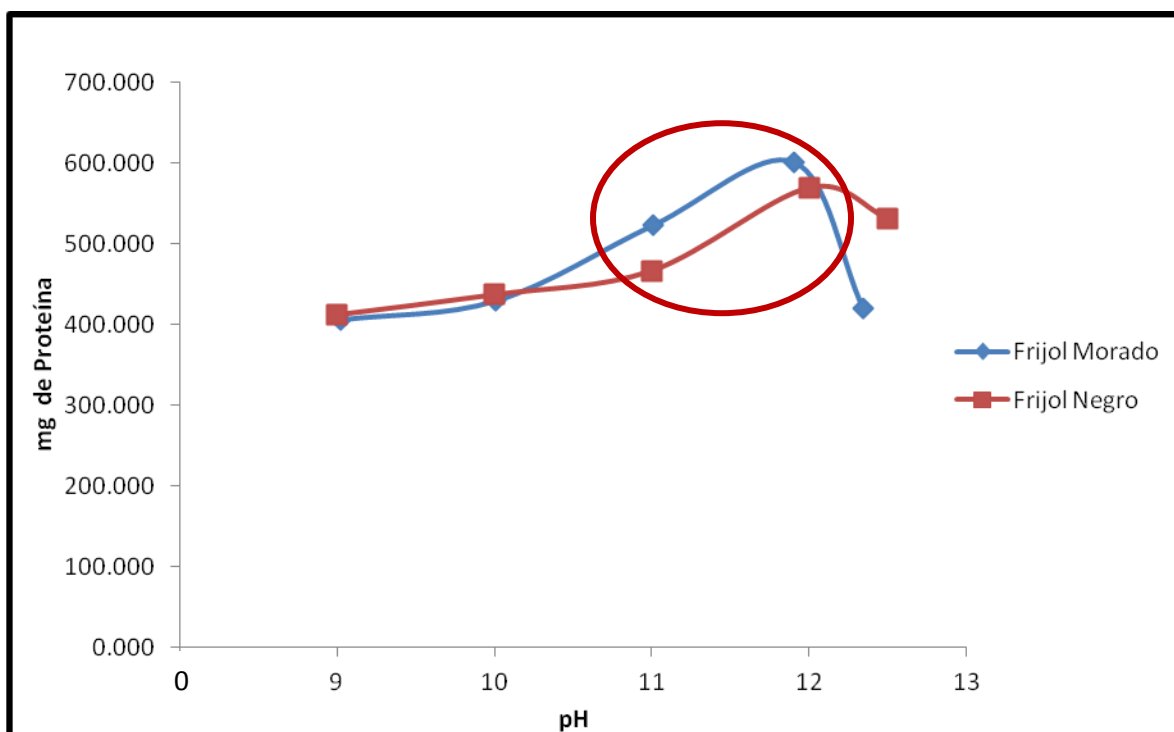
La banda de 34 kDa observada en las glutelinas de las dos variedades de frijol ayocote es semejante a la reportada para el frijol lima (*P. lunatus* L.) (Gallegos-Tintore 2004), así como la presentada para leguminosas como *Jatropha curcas* L. (Peralta-Flores, 2004), sin embargo el resto de las bandas presentes en el frijol



ayocote (79 y 53 kDa) muestran masas moleculares superiores a las de las otras leguminosas (34, 31, 24, 21 y 17 kDa) (Gallegos-Tintore 2004 y Peralta-Flores, 2004).

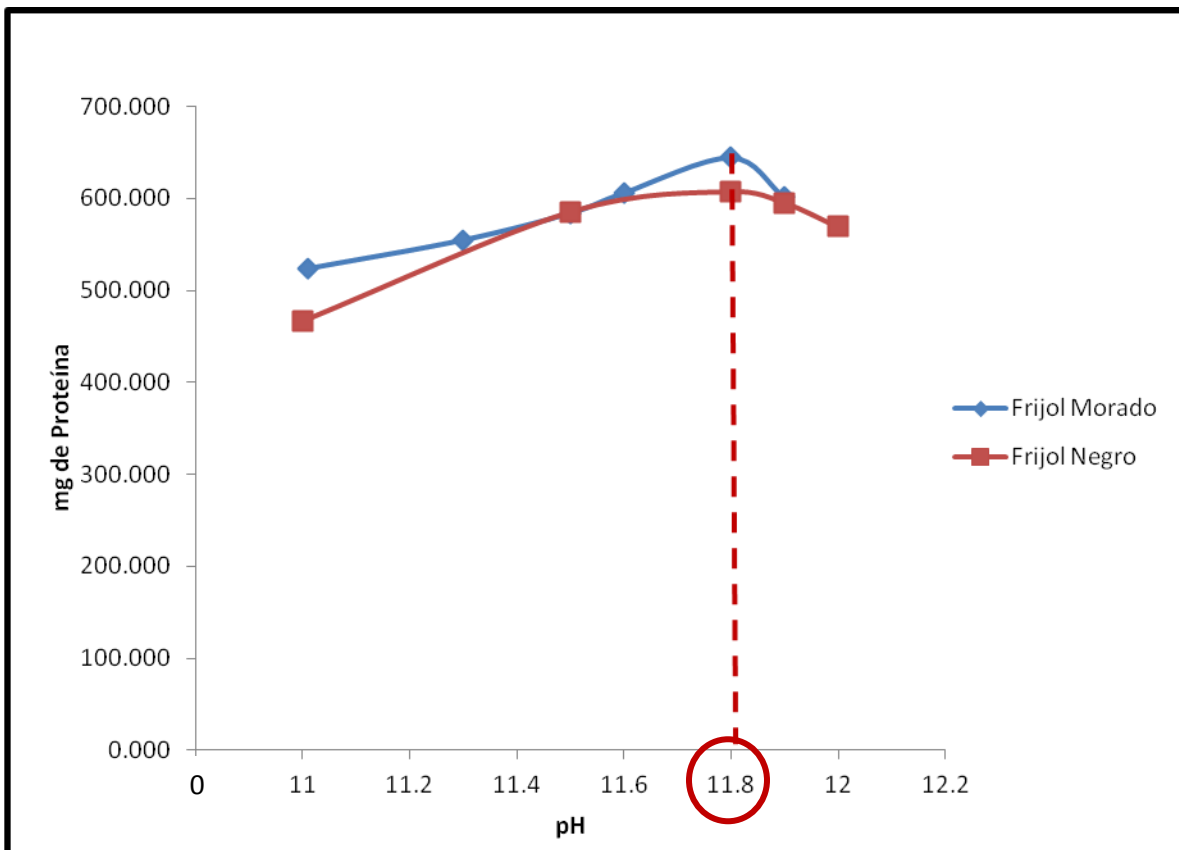
### 3.6. Determinación del punto isoelectrico y obtención de los extractos proteínicos del frijol ayocote

Los extractos proteínicos se obtuvieron mediante precipitación isoelectrica, los resultados mostraron que el pH de máxima solubilidad para ambas variedades se encuentra en un intervalo entre 11 y 12.5 (**Figura 3.3**).



**Figura 3.3.** Solubilidad de las proteínas a diferentes pH's.

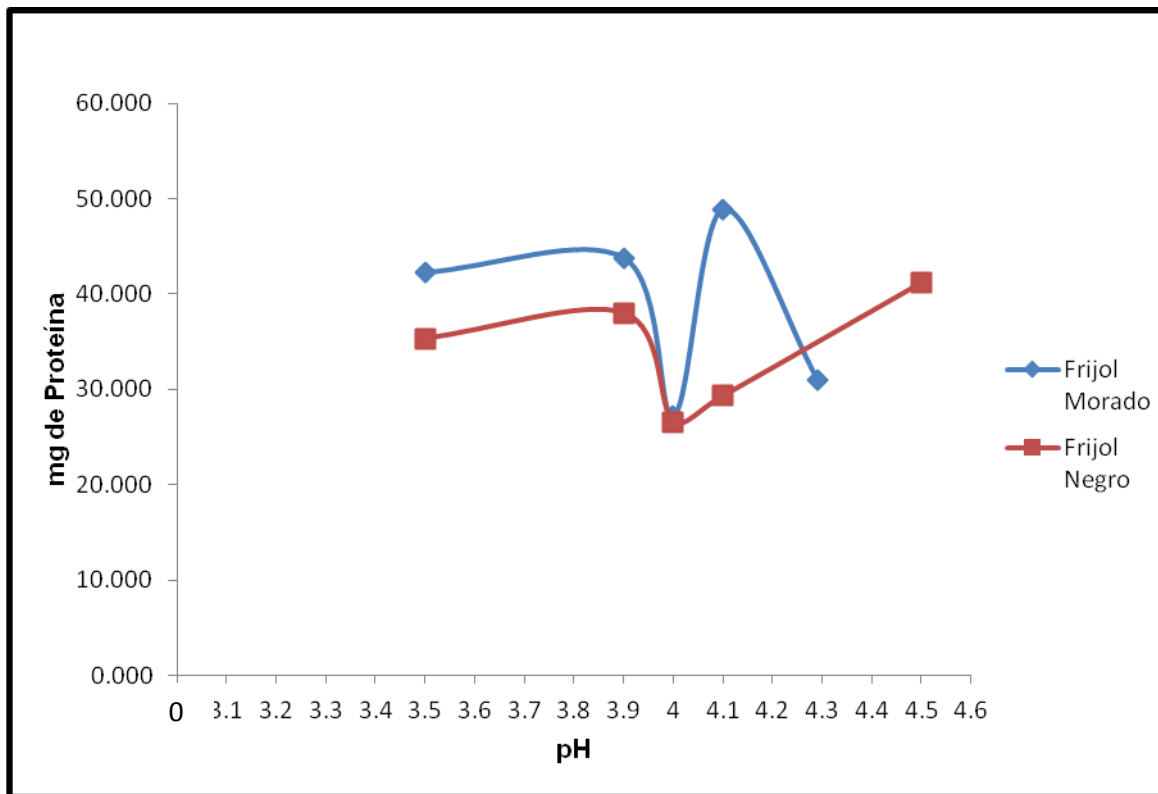
Considerando los pH's de 11, 11.5, 11.8, 11.9, se encontró que el pH de máxima solubilidad se encuentra en 11.8 para ambas variedades (**Figura 3.4**).



**Figura 3.4.** Segundo barrido de la solubilidad de las proteínas a diferentes pH's.

El pH de máxima solubilidad encontrado en este estudio es superior a los reportados por Betancur-Ancona *et al.*, 2004 para el *P. lunatus* y Torruco-Uco, 2009 para frijol lima (*P. lunatus*) y frijol Jamapa (*P. vulgaris*) donde reportan un pH de máxima solubilidad de 11 para estas variedades, esta diferencia pudiera atribuirse a que son distintas variedades de frijol y a las modificaciones que se le hicieron al método.

Tomando como base la proteína solubilizada a pH 11.8, se realizó la búsqueda del punto isoeléctrico, considerando el intervalo de 3 a 5, los resultados mostraron que para ambas variedades es a pH 4.0 (**Figura 3.5**).



**Figura 3.5.** Punto isoelectrico del frijol ayocote.

Considerando los resultados obtenidos, el punto isoelectrico de las proteínas del frijol ayocote analizado en el presente estudio es similar al obtenido por Bressani en el 2012, para el frijol terciopelo (*P. vulgaris*), y se encuentra dentro del intervalo reportado para otras especies del género *Phaseolus* tales como frijol lima (*P. lunatus*) y frijol común (*P. vulgaris*) cuyos puntos isoelectricos se encuentran en 4.0 y 4.9 respectivamente (Córdova-Lizama *et al.*, 2013, González-Quijada, 1999)

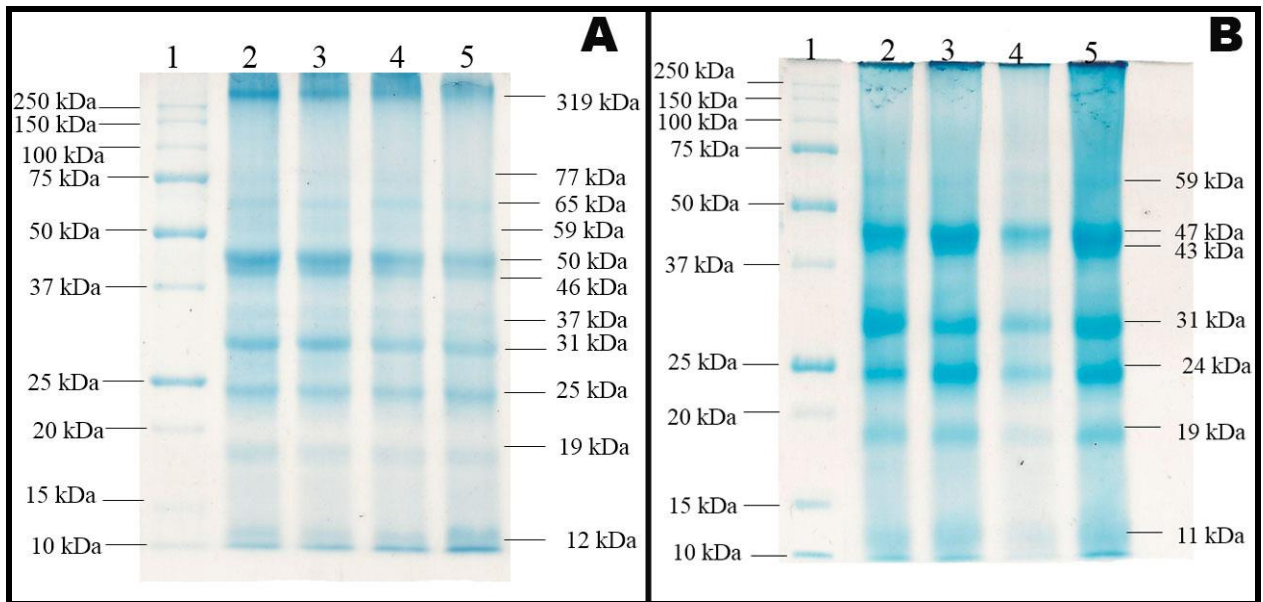
Finalmente, los extractos proteínicos obtenidos mostraron un rendimiento del 53.78% para el frijol negro y 55.35% para el frijol morado, con un contenido proteínico dentro del intervalo reportado por otros autores (**Cuadro 3.4**)

**Cuadro 3.4.** Contenido proteínico del extracto de frijol ayocote y otras especies.

<b>Variedad</b>	<b>Variedades de Frijol</b>	<b>% de proteína</b>	<b>Referencia</b>
<i>Phaseolus coccineus</i>	Morado	83.7	Experimental
	Negro	90.8	Experimental
<i>Phaseolus lunatus</i>	Lima	95.7	Boye <i>et al.</i> , 2010.
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Azufrado	91.0	Conde-Martínez y Ortega-Delgado, 1990.
	Azufrado Regional 87	66.7	Medina-Godoy <i>et al.</i> , 2010.

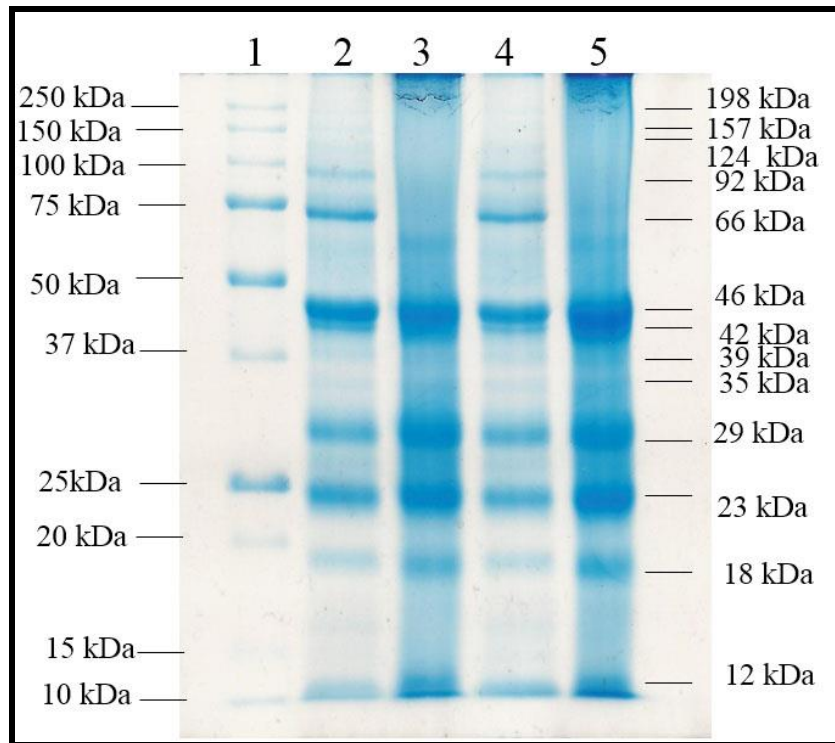
### **3.7. Secado del Extracto Proteínico**

Para seleccionar el método de almacenamiento de los extractos proteínicos se consideró el comportamiento electroforético de cada muestra después de ser sometido a secado o congelación (**Figura 3.6**), encontrando que el perfil electroforético de todas las muestras es similar, por lo que se seleccionó el secado a 50 °C por 4 h el cual permite optimizar el tiempo de obtención del Extracto.



**Figura 3.6.** SDS-PAGE del Extracto proteínico a diferentes secados. A) Frijol negro. 1) Patrón electroforético, 2) Extracto conservado a  $-72^{\circ}\text{C}$ , 3) Extracto conservado a  $-18^{\circ}\text{C}$ , 4) Extracto seco a temperatura ambiente, 5) Extracto seco a  $50^{\circ}\text{C}$ . B) Frijol morado. 1) Patrón electroforético, 2) Extracto seco a  $50^{\circ}\text{C}$ , 3) Extracto seco a temperatura ambiente, 4) Extracto conservado a  $-18^{\circ}\text{C}$ , 5). Extracto conservado a  $-72^{\circ}\text{C}$ .

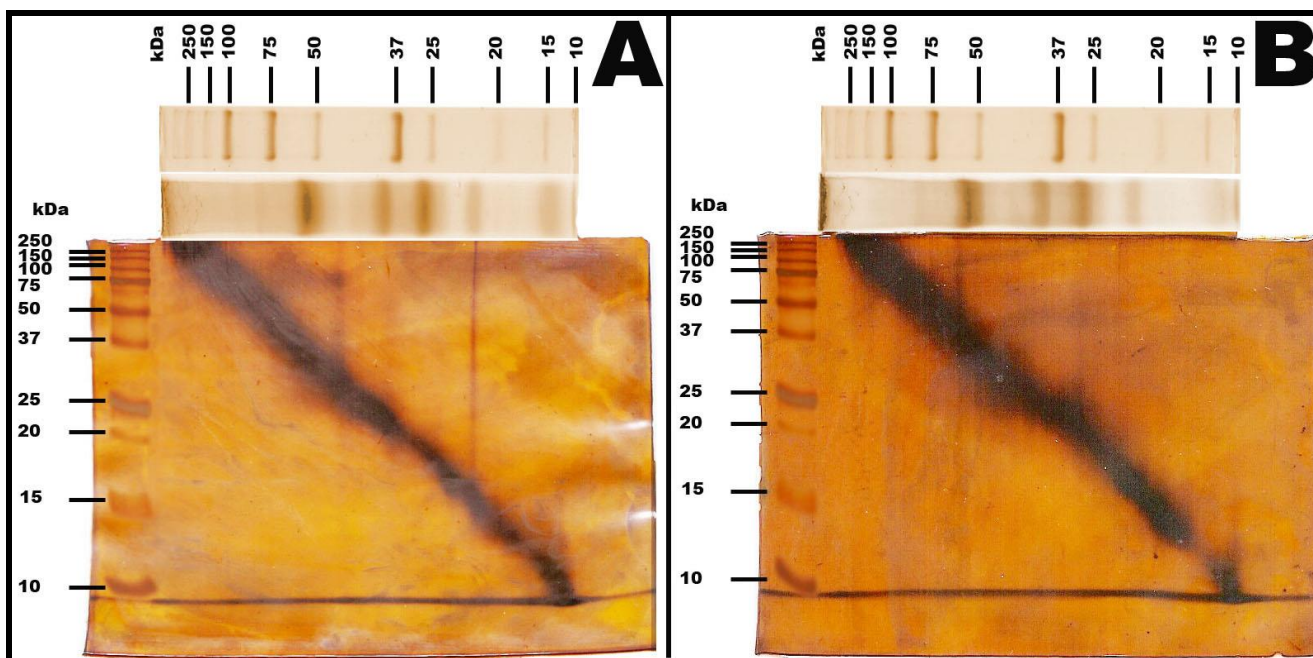
La comparación entre el perfil electroforético de la harina desengrasada del frijol ayocote contra su respectivo extracto proteínico mostró en ambos casos la desaparición de dos bandas (94.4 kDa y 65.5 kDa) (**Figura 3.7**), lo cual podría ser atribuido a que durante el proceso de obtención del extracto proteínico la proteína se hidrolizó.



**Figura 3.7.** SDS-PAGE de las proteínas del frijol negro y morado. 1) Patrón electroforético, 2) Harina de frijol negro, 3) Extracto de frijol negro seco a 50 °C, 4) Harina de frijol morado, 5). Extracto de frijol morado a 50 °C.

Con la finalidad de determinar la presencia de puentes disulfuro dentro de la proteína, se realizó la electroforesis bidimensional de los extractos proteínicos de frijol ayocote (**Figura 3.8**), donde se observó claramente que ambos extractos no cuentan con puentes disulfuro dentro de su conformación, estos resultados son semejante a lo reportado por Camacho-Espinoza *et al.*, 2010 quienes reportan que no existen puentes disulfuro, en tres variedades de frijol común ya que no presentaron bandas por debajo de la línea de 45°. Indicando que no hay uniones internas de la proteína con dichos puentes.





**Figura 3.8.** SDS-PAGE 2D del extracto de frijol ayocote. A) Frijol negro, B) Frijol morado

### 3.8. DL<sub>50</sub> de los Extractos Proteínicos

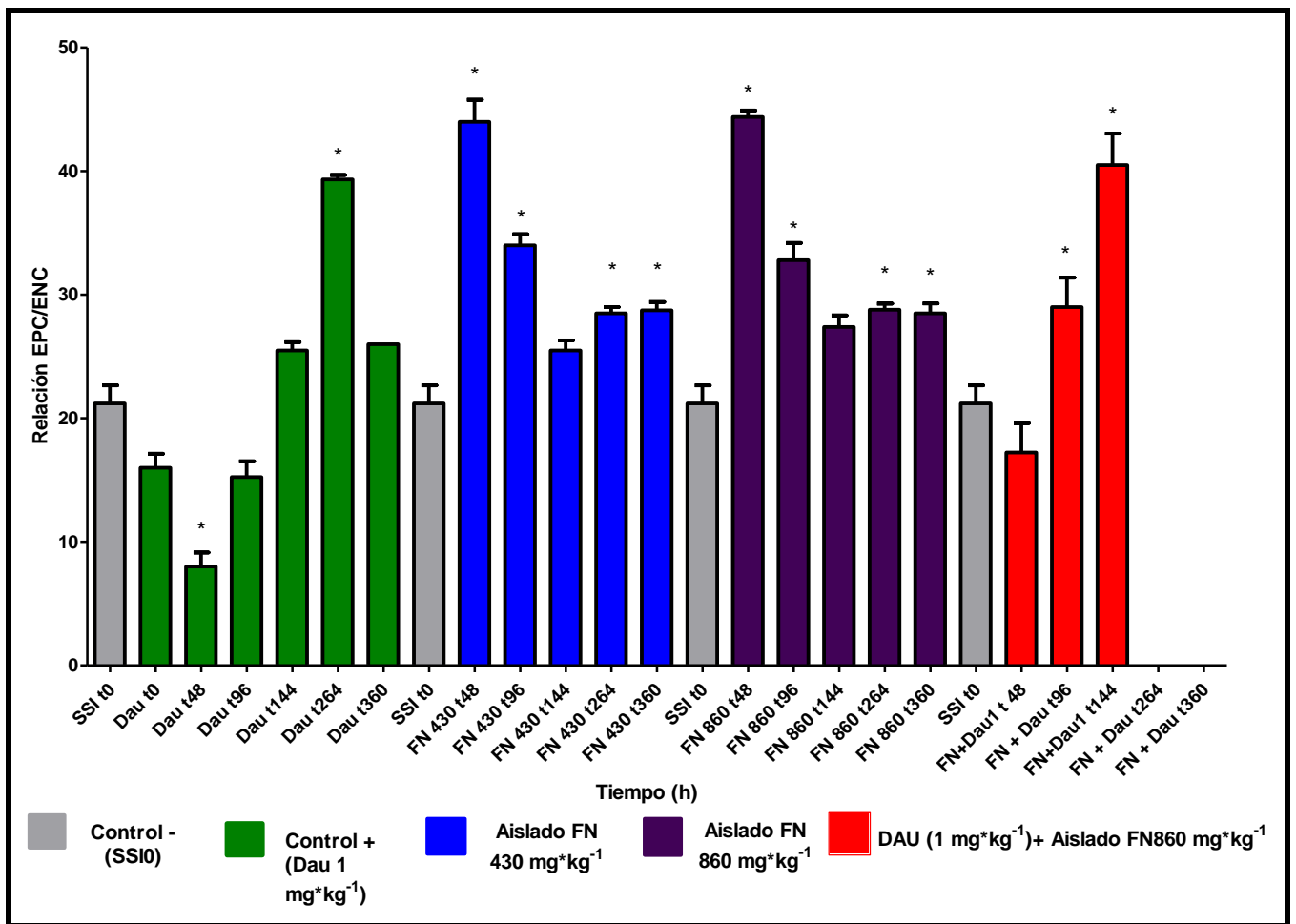
Los resultados mostraron que la DL<sub>50</sub> de los extractos proteínicos es superior a 5000 mg\*kg<sup>-1</sup> de extracto, ya que la administración de dicha dosis no provocó muerte ni alteraciones en los sujetos de estudio, por lo que se puede considerar que a dicha concentración los extractos son inocuos según lo indicado en las normas de las Comunidad Europea donde se establece que un xenobiótico se considera no tóxico cuando supera la dosis de 2000 mg\*kg<sup>-1</sup> sin tener alteraciones o daño sobre el organismo analizado (Gorriti *et al.*, 2010).

### 3.9. Evaluación Citotóxica de los Extractos Proteínicos (Negro y Morado)

Los resultados obtenidos (**Figura 3.9**) muestran el efecto citotóxico del extracto proteínico de la variedad negro, el cual fue evaluado cuantificando el número de EPC por cada 1000 eritrocitos totales, encontrando que para las dosis de 430 y

860 mg\*kg<sup>-1</sup> administrada a los animales a las 48 h hay un incremento significativo con respecto al control negativo, lo cual indica que el xenobiótico utilizado (extracto proteínico) tiene efecto citotóxico significativo ( $p < 0.05$ ) y posiblemente atribuido a la presencia de lectinas (tienden a unirse a algunos azúcares de membrana de eritrocitos provocando inestabilidad homeostática) en el extracto ya que se ha comprobado que estas tienen efecto citotóxico en ratones CD1<sup>+</sup> (Reynoso-Camacho *et al.*, 2003), en otros estudios se ha encontrado que algunas lectinas además de tener la propiedad de aglutinar eritrocitos pueden presentar efecto mitogénico *in vitro* (Bernaldo, 1998), debido a esto puede deberse el aumento de la eritropoyesis representado en el conteo elevado de EPC.

Mientras que a las 96 h se observó un decremento de los EPC del 22.7% y 26.1% respectivamente, es decir, depresión de médula ósea, lo cual también es un índice de citotoxicidad.



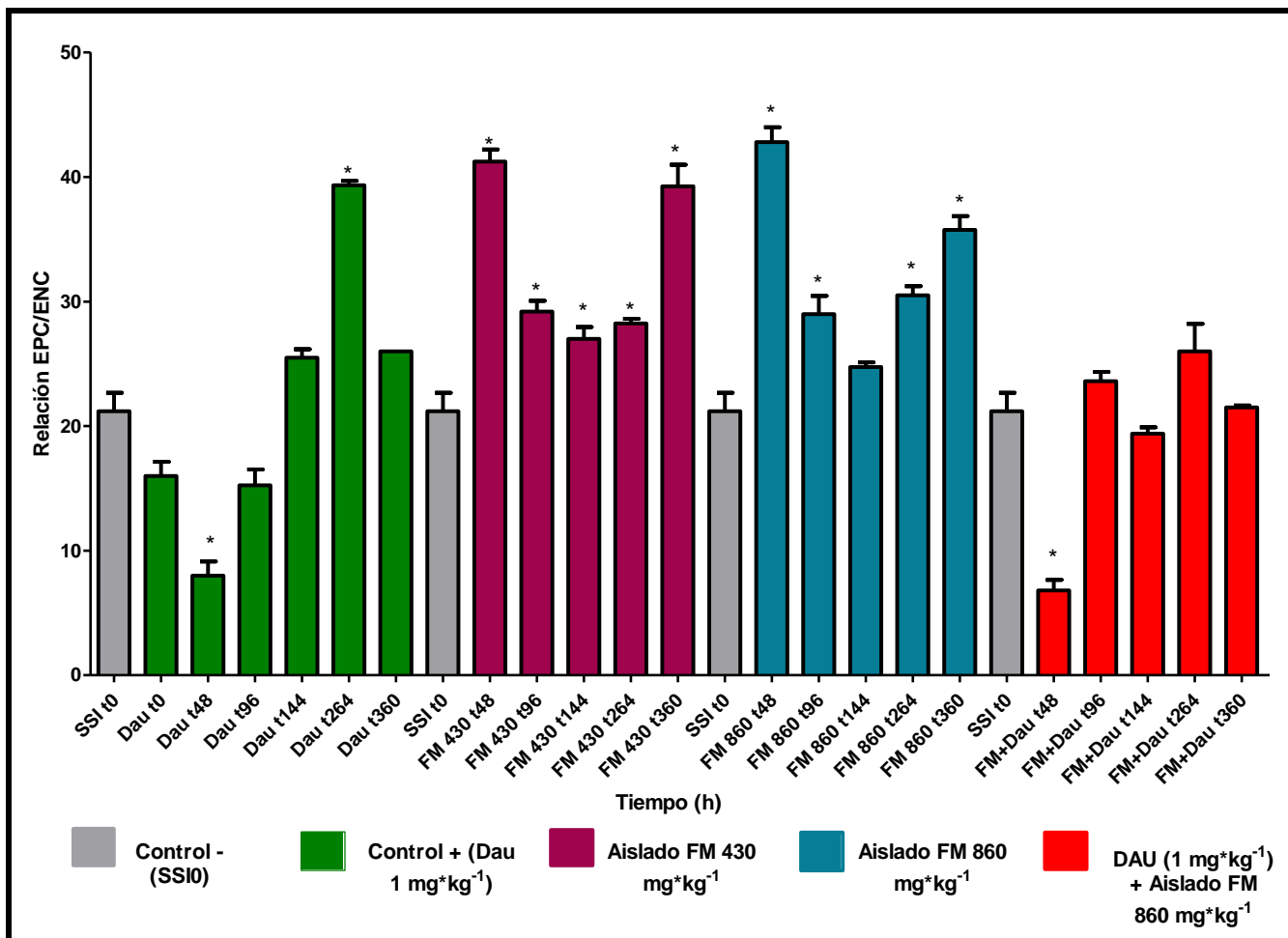
**Figura 3.9.** Índice de citotoxicidad del extracto de frijol negro, en sangre periférica de ratones CD1+. \*Diferencia estadística significativa con respecto al control negativo (SSI to)  $P < 0.05$ .

Por otro lado, en los ratones de control positivo se observó que a las 48 h disminuyeron los EPC indicando que hubo depleción de la eritropoyesis, sin embargo a las 96 h hubo una recuperación de EPC, llegando a una sobre producción a las 144 h indicando que tanto la depleción como el aumento de EPC son signos de citotoxicidad de la Dau. En cambio los animales administrados con Dau ( $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) y extracto FN  $860 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  fueron aumentando la cantidad de EPC significativamente con respecto al control negativo, indicando una sobre producción de EPC con respecto a los ENC, lo que indica daño citotóxico generado por la combinación de Dau:extracto ( $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ :  $860 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) que pudiera actuar en sinergia y provocar un daño severo en el animal originando

decesos, a partir de las 144 h.; además se observó que estos animales presentaron signos clínicos, como piloerección, caída de pelo, estreñimiento, pérdida de la visión y pérdida del apetito, estos signos también se observaron en los animales de control positivo, aunque fue más lenta su aparición y los decesos comenzaron después de las 264 h.

En cuanto a la evaluación citotóxica del extracto de frijol morado, los resultados (**Figura 3.10**) muestran que la cantidad de EPC en las dosis de extracto de FM 430 y FM 860  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  a las 48 h aumenta significativamente con respecto al control negativo (SSI t0) indicando que hay elevada producción de EPC ocasionada por el efecto citotóxico del extracto de frijol morado, que al igual que en el extracto de frijol negro, se podría atribuir a la presencia de lectinas. En las horas siguientes (96, 144, 264 h.) los EPC se estabilizaron en un promedio de 28.11 por cada 1000 ENC teniendo diferencia estadísticamente significativa respecto al control negativo (SSI t0), sin embargo a las 360 h hay un incremento en número de EPC de un 39.6%.

En el lote tratado con extracto FM860  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  y Dau (1  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), se observó que a las 48 h hubo depleción de la eritropoyesis provocando disminución de EPC con respecto al número de ENC, mostrando signos de recuperación de la eritropoyesis a las 96, 144, 264 y 360 h, sin embargo a partir de las 144 h comenzaron los decesos de los animales, lo que indica un sinergismo entre el extracto de frijol morado y Dau.



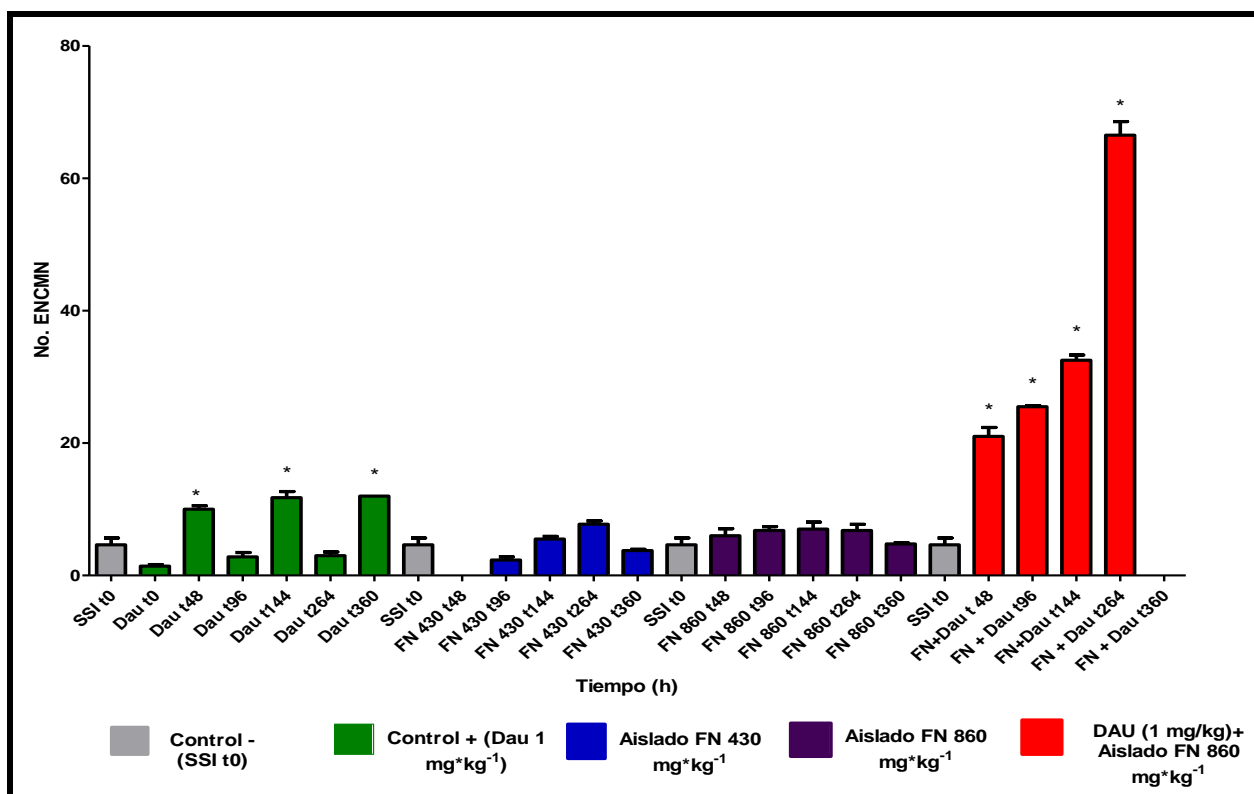
**Figura 3.10.** Índice de citotoxicidad del extracto de frijol morado, en sangre periférica de ratones CD1<sup>+</sup>. \*Diferencia estadística significativa con respecto al control negativo (SSI t0) P<0.05.

### 3.10. Evaluación Genotóxica de los Extractos Proteínicos (Negro y Morado)

En la **figura 3.11** se muestran los valores promedios de ENCMN en 1000 eritrocitos totales tratados con extracto de frijol negro donde se muestra que el número de ENCMN aumento de manera estadísticamente significativa a las 48, 144 y 360 h en el lotes administrado con Dau (1 mg\*kg<sup>-1</sup>) respecto al control negativo (SSI t0), datos que son similares a los reportados por Álvarez-González *et al.*, 2004, que indican que la Dau es un agente inductor de la producción de EPCMN en sangre periférica de ratón. En cuanto a las dosis de extracto FN 430 mg\*kg<sup>-1</sup> y FN 860 mg\*kg<sup>-1</sup> se observó que a partir de las 48 h se incrementó el

número de ENCMN cesando a las 360 h e inició el decremento de los ENCMN hasta el 19% y 2.6 % respectivamente en comparación al control negativo (SSI t0), sin embargo estos resultados no presentaron diferencia estadística significativa por lo que considera que no tuvieron efecto genotóxico considerable, estos resultados son similares a los obtenidos por Azevedo, 2003 donde no se reporto efecto genotóxico del frijol negro (*P. vulgaris* L).

En la combinación de Dau (1 mg\*kg<sup>-1</sup>) y extracto FN 860 mg\*kg<sup>-1</sup> aumento el número de ENMN de forma estadísticamente significativa con respecto al control negativo (SSI t0) lo que indica que hay daño genotóxico provocado por la sinergia entre el extracto y Dau, a partir de las 144 h comenzaron los decesos de animales.

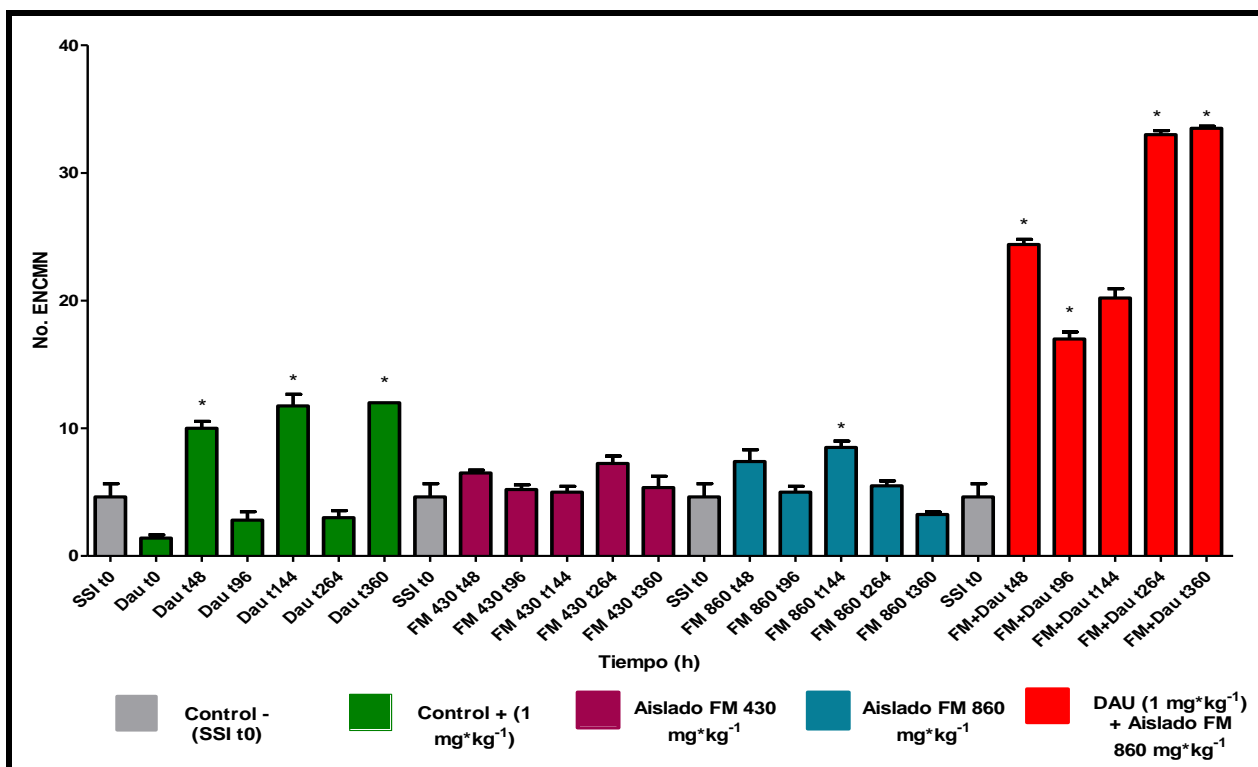


**Figura 3.11.** Índice de genotóxica del extracto de frijol negro, en sangre periférica de ratones CD1<sup>+</sup>. \*Diferencia estadística significativa con respecto al control negativo (SSI t0) P<0.05.

La evaluación genotóxica del extracto de frijol morado (**Figura 3.12**) mostro que dosis de 430 mg\*kg<sup>-1</sup> y 860 mg\*kg<sup>-1</sup>, mantiene estable la cantidad promedio de

ENCMN (5.89) y no presentaron diferencia estadística significativa con respecto al control negativo (SSI t0).

Por otra parte, el tratamiento con la combinación Dau:extracto (1 mg\*kg<sup>-1</sup>:860 mg\*kg<sup>-1</sup>) no mostró un comportamiento definido en número de ENCMN durante las primeras 144h, estabilizándose a partir de las 264 h en un promedio de 33 ENCMN siendo diferente estadísticamente con respecto al control negativo. Estos resultados son similares a los obtenidos para el frijol negro, por lo que se observa que hubo daño genotóxico provocado por el Dau y este no fue detenido por los extractos sino que probablemente actuaron en sinergia.



**Figura 3.12.** Índice de genotóxica del extracto de frijol morado, en sangre periférica de ratones CD1<sup>+</sup>. \*Diferencia estadística significativa con respecto al control negativo (SSI t0) P<0.05.

Con lo que se puede mencionar que el extracto de frijol negro y morado no solo presentan características estructurales muy similares entre ellas, sino que también presentaron resultados similares de citotoxicidad y genotoxicidad.



### 3.11. Hidrólisis enzimática y Porcentaje de Hidrolisis (%H).

Los extractos proteínicos de ambas variedades de frijol ayocote se hidrolizaron por un tratamiento secuencial con pepsina, pancreatina y peptidasa. Esto debido a que estas enzimas están involucradas en la digestión gastrointestinal humana, los resultados obtenidos podrán proporcionar información sobre la generación de péptidos bioactivos durante la digestión fisiológica de estos extractos.

La hidrólisis (%H) de los extractos obtenido con este tratamiento (**Cuadro 3.5**) fue superior en un 42.46% y 10.95% con respecto a lo reportado por Lo *et al.*, 2005 y Pedroche *et al.*, 2002 para extracto de soya hidrolizado, 69.86% y 83.5% con relación al frijol mungo (Hong *et al.*, 2005), 2.80%, 2.71%, con relación en extracto de soya sin germinar y germinada (Dikshit y Ghadle, 2003). Estos resultados son semejantes a los obtenidos en el presente estudio ya se obtuvo un 73.00 y 72.90 para la variedad de frijol morado y negro respectivamente.

**Cuadro 3.5. Comparación del Grado de hidrólisis del frijol ayocote con respecto a otras leguminosas**

Material utilizado	Enzimas usadas para la hidrólisis	% de Hidrolisis	Autor
Extracto proteínico de frijol morado ( <i>P. coccineus</i> , L)	Pepsina, Pancreatina y Peptidasa	73	Experimental
Extracto proteínico de frijol negro ( <i>P. coccineus</i> , L)	Pepsina, Pancreatina y Peptidasa	72.9	Experimental
Extracto de soya	Pepsina y Pancreatina	42	Lo <i>et al.</i> , 2005
Extracto de soya	Alcalasa® y Flavourzima®	65	Pedroche <i>et al.</i> , 2002

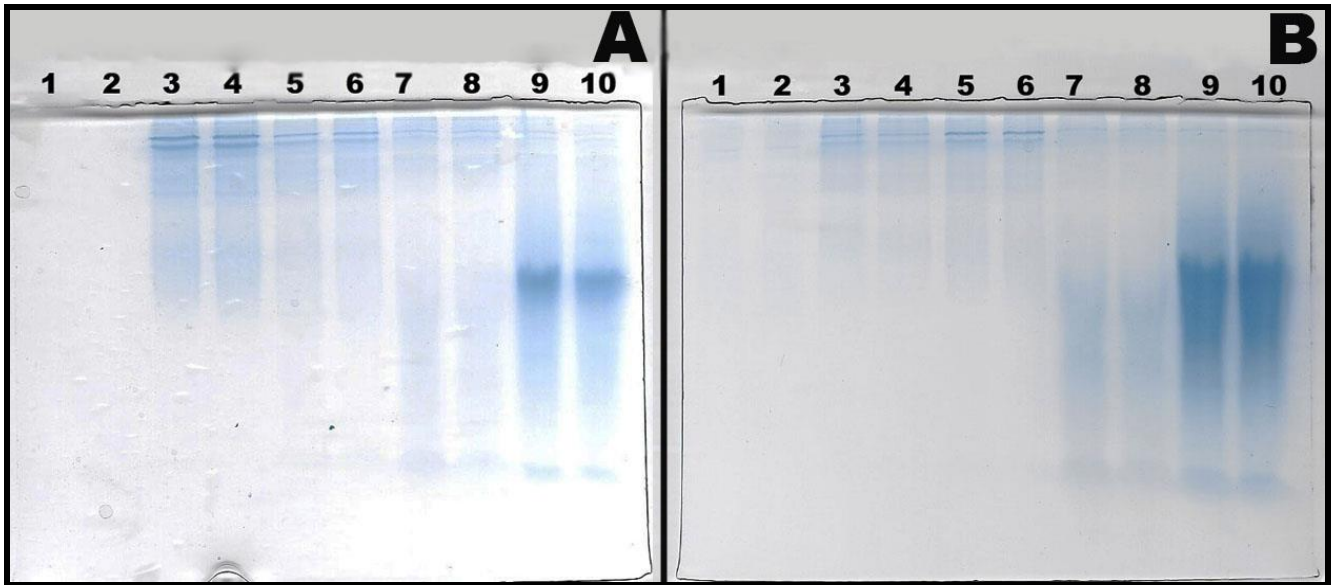
Extracto proteínico de frijol mungo ( <i>P. radiatus</i> L.)	Alcalasa® y Neutrasa®	22 y 12	Hong <i>et al.</i> , 2005
Harina de soya sin germinar y germinada	Pepsina y Tripsina	70.95, 71.02 y 73.53	Dikshit y Ghadle, 2003

### 3.12. Separación de péptidos mediante ultrafiltración

Se separaron por ultrafiltración las fracciones peptídicas de los hidrolizados a través de las membranas de corte de 1, 3, 5, 10 y 30 kDa. A cada fracción se le determinó el porcentaje de proteína (**Cuadro 3.6**) de ambas variedades de frijol ayocote, además de que se caracterizó electroforéticamente (**Figura 3.13**).

**Cuadro 3.6.** Porcentaje de proteína de las fracciones peptídicas de los hidrolizados de frijol Ayocote.

Frijol	Tamaño de péptido	Nitrógeno recuperado (g)
<b>Negro</b>	< 30	1.549
	30	0.007
	10	0.023
	5	0.019
	3	0.004
	1	0.149
<b>Morado</b>	< 30	1.488
	30	0.045
	10	0.026
	5	0.023
	3	0.039
	1	0.130



**Figura 3.13.** SDS-PAGE de los péptidos de frijol ayocote A) Frijol negro, B) Frijol morado: carril 1-2: Péptidos de 1 kDa, carril 3-4: Péptidos de 3 kDa, carril 5-6: Péptidos de 5 kDa, carril 7-8: Péptidos de 10 kDa y carril 9-10: Péptidos de 30 kDa.

## VII. CONCLUSIONES

- Estadísticamente, la composición química proximal de ambas variedades de frijol ayocote es distinta.
- La variedad negra presenta mayor concentración de proteína respecto al frijol morado.
- No existe diferencia en el patrón electroforético de las proteínas de reserva de ambas variedades de frijol ayocote, sin embargo la concentración de prolaminas es superior en el frijol negro.
- El punto isoeléctrico de las proteínas de ambas variedades de frijol ayocote se encuentra a pH 4.0.
- La extracción de proteína a partir de ambas variedades de frijol ayocote es superior al 50% con un contenido proteínico por encima del 80%.
- No existe efecto en el perfil electroforético de las proteínas del extracto por efecto de las condiciones de almacenamiento.
- La  $DL_{50}$  de los extractos proteínicos es superior a  $5000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  de extracto
- Los extractos proteínicos de frijol ayocote de ambas variedades mostraron citotoxicidad en concentraciones de 430 y  $860 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  a partir de las 48h, a estas dosis no se mostraron signos de genotoxicidad.
- Se observó sinergia de ambos extractos cuando son combinados con un agente xenobiótico generado incremento en el efecto citotóxico y genotóxico del Dau.
- Los extractos proteínicos obtenidos en el presente trabajo presentan una concentración de proteína superior al 80%, por lo que se consideran aislados.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Acuña O., Castillo P., Orbea M., Cherrez, M. y Guerrero, M., 1996.** Fraccionamiento de proteína de lupino por solubilidad y determinación de pesos moleculares (*Lupinus mutabilis sweet*). Simposio Iberoamericano sobre proteínas para alimentos (CYTED). Buenos Aires, Argentina;. 239 - 49.
2. **Álvarez-Salas L M, Turbay-Ceballos S., 2009.** El Frijol Petaco (*Phaseolus Coccineus*) y la Maravilla (*Phaedranassa Sp.*): Aspectos Etnobotánicos de dos plantas alimenticias de origen Americano en el Oriente Antioqueño, Colombia. *Agroalimentaria*. 29(15): 101-113.
3. **Álvarez-González, I., Madrigal-Bujaidar, E., Martino-Roaro, L., Espinosa-Aguirre, J. J., 2004.** Antigenotoxic and antioxidant effect of grapefruit juice in mice treated with daunorubicin. *Toxicol lett*, **25**: 152:203-11.
4. **Alvis-Davila, R., 2010.** Detección del efecto antimutagénico del extracto acuoso del fruto de *Myrciaria dubia* H. B. K. Mc Vaugh "camu camu", utilizando la prueba in vivo de micronúcleos. Tesis. Universidad Nacional Mayor De San Marcos Facultad De Ciencias Biológicas
5. **AOAC, 1997.** Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis (15th Ed.), 974.24, Arlington, Virginia. pp. 993-994.
6. **Avilán-Rovira, L. y Louis-Neptune, A. M., 1976.** Morfología Inicial Del Sistema Radicular Del *Phaseolus vulgaris* L. 'Carioca' En Condiciones Controladas. *Agronomía Tropical* 26(2): 109-116.
7. **Aremu M O, Olaofe O, Basu S K, Abdulazeez G, and Acharya S N., 2010.** Processed cranberry bean (*Phaseolus coccineus* L.) seed flour for the African diet. *Canadian Journal of Plant Science*. 90(5): 719-728.
8. **Azevedo, L., Gomes, J. C., Stringheta, P. C., Gontijo, A. M, Padovani C. R., Ribeiro L. R., Salvadori, D. M., 2003.** Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. *Food Chem Toxicol.*, **41**:1671-6.
9. **Bascur, B. G. y J Tay, U., J., 2005.** Colecta, Caracterización y Utilización de la Variabilidad Genética en Germoplasma Chileno de Poroto (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agricultura Técnica*. 65(2):135-146
10. **Benavides, M. A., Hernández, V. R. E. M., Ramírez, R. H. y Sandoval, R. A. 2010.** Tratado De Botánica Económica Moderna. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

11. **Bernardino-Nicanor A, Ortíz-Moreno A, Martínez-Ayala A L and Dávila-Ortíz G., 2000.** Guava Seed Protein Isolate: Functional and Nutritional Characterization. *Journal of Food Biochemistry*. 25 :( 2001) 77-90.
  
12. **Bernaldo, S.N., 1998.** Sustancias Tóxicas en Productos Vegetales. Acribia. Zaragoza.
  
13. **Betancur-Ancona, D.; Gallegos-Tintoré, S., y Chel-Guerrero, L., 2004.** Wetfractionation of *Phaseolus lunatus* seeds: partial characterization of starch and protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(10): 1193-1201.
  
14. **Bonafine, O., Cañizares, A. y Laverde, D. 2006.** Importancia de los fitoquímicos en la alimentación. INIA Divulga7. Nutrición humana.
  
15. **Boye, J., Zare, F., Pletch, A., 2010.** Pulses proteins: processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43. 414-431..
  
16. **Bradford M. M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
  
17. **Bressani R., 2012.** Extracción, caracterización fisicoquímica y propiedades funcionales de la proteína y del almidón de frijol *Mucuna* (terciopelo) *Mucuna ssp.* Informe final del proyecto Fodecyt No. 044-2006.
  
18. **Camacho-Espinoza, M. K., Peinado-Guevara, L. I., López –Valenzuela J. A., Valdez-Ortiz, A., Salinas-Pérez, R. A., Moreno-Herrera, C. G., Medina-Godoy, S. 2010.** Caracterización Proteómica De Granos De Frijol Azufrado (*Phaseolus Vulgaris*) Cultivados En El Estado De Sinaloa. *Ra Ximhai*. 6(1): 23-36.
  
19. **Celis-Velázquez, R., Peña-Valdivia, C. B., Trejo-López, C., Aguirre-Rivera, J. R., Cordova-Téllez, L. y Carballo-Carballo, A. 2008.** Consumo De Reservas De La Semilla De Frijol Para La Emergencia Y Desarrollo Inicial En Diferentes Profundidades De Siembra. *Agronomía Mesoamericana*. 19(2): 167-177.
  
20. **Chandra, J. G. and Aruna, R. 1998.** Effect of various concentrations of leaf nitrate on the induction of micronuclei in mouse bone marrow. *Mutation Reseach*. 415, 131-137

21. **Chaparro-Acuña, S. P., Aristizábal-Torres, I. D. y Gil-González, J. H., 2009.** Composición y Factores Antinutricionales de las Semillas del Género *Mucuna*. Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín. 62(1).
22. **Chasquibol, S. N., Lengua, C. L., Delmás, I., Rivera, C. D., Bazán, D. Aguirre, M. R., Bravo, A. M. 2003.** Alimentos Funcionales o Fitoquímicos, Clasificación e Importancia. Rev. Per. Quím. Ing. Quím. 5(2): 9-20.
23. **Choi J. K., Murillo G., Pezzuto J. M., Kinghorn A. D. and Mehta R. G. 2006.** Ixocarpalactone A isolated from the Mexican tomatillo shows potent antiproliferative and apoptotic activity in colon cancer cell. The Federation of European Biochemical Societies Journal. 273(24): 5714-23.
24. **Cho, J. M.; Unklesbay, N.; Hsieh, F-H., y Clarke, D. A. 2004.** Hydrophobicity of bitter peptides from soy protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 5895-5901.
25. **Cordova-Lizama A, Ruiz-Ruiz J, Segura-Campos M, Betancur-Ancona D, Chel-Guerrero L., 2013.** Actividad antitrombotica y anticariogenica de hidrolizados proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*).Revista de la Facultad de Ingeniería Química. 52:25-31
26. **Conde-Martínez, V. y Ortega-Delgado, M. L., 1990.** Obtención de aislados proteínicos y determinación de almidón en frijol (*Phaseolus vulgaris*L.) Endurecido por el almacenamiento. Agrociencia serie fitociencia. 1. 175-187.
27. **Cuéllar-Ortiz, S., M. 2008.** Mecanismos de resistencia a sequía presentes en la variedad de frijol común pinto villa. Participación de la Movilidad de carbohidratos en la resistencia a sequía de esta variedad. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad Autónoma de México.
28. **Debouck, D. G., Hidalgo, R., Ospina, O. H. F. y Flor, M. C. A. 1984.** Morfología de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). 2ª edición. Centro Internacional de Agricultura Tropical.
29. **Deshpande, S. 2002.** Carcinogenesis, mutagenesis, and teratogenesis. En: *Handbook of Food Toxicology*, New York, Ed. Marcel Dekker incorporated. pp 64-68.

30. **Dikshit, M., Ghadle, M., 2003.** Effect of sprouting on nutrients, antinutrients and in vitro digestibility of de MACS-13 soybean variety. *Plant Foods for Hum. Nutr.* 58:1-11
31. **Drago, S. M. E., López, L. M. y Sainz, E. T. R. 2006.** Componentes Bioactivos De Alimentos Funcionales De Origen Vegetal. *Rev Mex de Ciencias Farmacéuticas.* 37(4): 58-68
32. **Escandón, R. C., Benítez, M. M. G., Navarrete, E. J., Vázquez, M. J. L., Martínez, M. O. G. y Escobedo de la Peña, J. 1992.** Epidemiología del Cáncer cervicouterino En El Instituto Mexicano Del Seguro Social. *Salud Pública de México, Instituto Nacional de Salud Pública.* 34(6): 607-614
33. **Escudero, E., Aristoya, M.C., Nishimurab, H., Ariharab, K. and Toldrá, F., 2012.** Antihypertensive effect and antioxidant activity of peptide fraction extracted from Spanish dry-cured ham. *Meat Science,* 91(3):306-311
34. **Erickson, R. P., 2003.** Somatic gene mutation and human disease other than cancer. *Mutat. Res.:* 543, 125-136.
35. **Eugenia-Baca, B., Soto-Urzuu, L. y Pardo-Ruiz, Ma. P. A., 2000.** Fijación biológica de nitrógeno. *Elementos.* 38 (7): 43.
36. **Figueroa, G. J. J., Guzmán, M. S. H., Herrera, H. M. G., Rumayor, R. A. F., Alvarado, N. M. D. y Sánchez, T. B. I. 2010.** Botana a base de frijol con alto valor nutricional y nutracéutico. Folleto Técnico. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC-INIFAP. (28): 27
37. **Figueroa-Hernández, J., L.; Sandoval-González, G.; Ascencio, V., J.; Figueroa-Espitia, J., L. and Fernández-Saavedra, G. 2005.** Plant product with anticancer properties employed in the treatment of bowel cancer: literature review 1985 and 2004. *Proceedings of the Western Pharmacology Society.* (48):77-83.
38. **Fuentes-Pananá, E.; Camorlinga-Ponce, M. y Maldonado-Bernal, C. 2009.** Infección, inflamación y cáncer gástrico. *Salud pública de México, Instituto Nacional de Salud Pública.* 51(5): 427-433
39. **Gallegos, T.S., 2000.** Perfil electroforético de las fracciones proteínicas de *Canavalia ensiformis* y *Phaseolus lunatus*. Tesis de licenciatura. Mérida, Yucatán, México; Universidad Autónoma de Yucatán.



40. **Gallegos-Tintoré, S., Pacheco-Aguirre, J., Betancur-Ancona, D. y Che-Guerrero, L., 2004.** Extracción y caracterización de las fracciones proteínicas solubles del grano de *Phaseolus lunatus* L. Archivos Latinoamericanos De Nutrición. 54(1).
41. **García, G. 2006.** Efecto hipoglucemiante de diferentes variedades de harinas de frijol cocido (*Phaseolus vulgaris*) y su posible mecanismo de acción en ratas diabéticas inducidas con esptreptozotocina. Tesis de Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.
42. **González-Quijada, M. R., 1999.** Características fisicoquímicas y valoración nutricional y funcional de un aislado proteica obtenido de la semilla de ébano (*Pithecellobium flexicaule - benth*). Tesis Doctoral de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
43. **Gorriti A., Arroyo J., Quispe F., Cisneros B., Condorhuamán M., Almora Y., Chumpitaz V., 2010.** Toxicidad Oral A 60 Días Del Aceite De Sacha Inchi (*Plukenetia Volubilis* L.) y Linaza (*Linum Usitatissimum* L.) y Determinación De La Dosis Letal 50 En Roedores. Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública. 27(3): 352-60.
44. **Gospodarowicz, M., K.; Cazap, E. and Jadad, A., R. 2009.** Cancer in the world-a call for international collaboration. Salud pública de México, Instituto Nacional de Salud Pública. 51(2) 305-308.
45. **Hangen, L, and Bennink, M. 2002.** "Consumption of Black Beans and Navy Beans (*Phaseolus vulgaris*) Reduced Azoxymethane-Induced Colon Cancer in Rats". Nutr. Cancer. 44:60-65.
46. **Hartmann, R., Wal, J.M., Bernard, H., and Pentzien, A.K., 2007.** Cytotoxic and allergenic potential of bioactive proteins and peptides. Current Pharmaceutical Design, 13:897-920
47. **Henningson, A., M., Nyman, E., M. and Bjorck, I., M. 2001.** Content of short-chain fatty acids in the hindgut of rats fed processed bean (*Phaseolus vulgaris*) flours varying in distribution and content of indigestible carbohydrates. Br. J. Nutr. 86:379-89.
48. **Hernández-Díaz P.; Martín-González O.; Rodríguez de Pablos V. Y Ganem-Báez F. 1999.** Aplicaciones de las lectinas. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia. 15(2):91-95.

49. **Herrera-Hernández, M., G. y Guzmán-Maldonado, S., H. 2010.** Variedades de frijol contra el cáncer y diabetes. Jornada de transferencia de tecnología del cultivo del frijol. Fundación Produce Sinaloa, A.C. 27-37
50. **Hong, L. G.; Wei, L. G.; Liu, H., y Hui, S. Y. 2005.** Mung-bean protein hydrolysates obtained with alcalase exhibit angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Food Science and Technology International*, 11(4): 281-287.
51. **Jarpa, P. 2003.** Potencial mutagénico del tabaco de mascar venezolano. *Revista De La Facultad De Farmacia*. 45(2)
52. **Jordinson, M.; El-Harury, I.; Calnan, D.; Calam, J. y Pignatelli, M. 1999.** Vicia faba agglutinin, the lectin present in broad beans, stimulates differentiation of undifferentiated colon cancer cells. *Gut* 44:709-714
53. **Junqueira y Carneiro, 1996.** *Histología Básica: Texto y atlas*. 4<sup>ta</sup> Edición. Masson S. A. 346-348.
54. **Kim (Lee), Y. S., Park, W. S. P., and Rhee, C. K. 1990.** Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3): 651-656.
55. **Kortt, A.A., Caldwell, J.B. 1990.** Low molecular weight albumins from sunflower seed: identification of a methionine-rich albumin. *Phytochemistry*. 29(9): 2805-2810.
56. **Kramer P. J, 1998.** Genetic toxicology. *J. Pharm. Pharmacol.* 50, 395-405.
57. **Laemmli, K.U., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259), 680–685.
58. **Lee, S., H.; Choi, W., C. and Yoon, S., W. 2009.** Impact of standardized *Rhus verniciflua* stokes extract as complementary therapy on metastatic colorectal cancer: a Korean single-center experience. *Integrative Cancer Therapies*. 8(2):148-152.
59. **Lo, W., E. Li-Chan, 2005.** Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from in vitro pepsin-pancreatin digestion of soy protein. *J. Agric. Food Chem.* 53(9): 3369- 3376.
60. **López, P., Y.; Angulo, E., M.; Martínez, R., C.; Soto, B., J.; Chaidez, Q., C. 2007.** Efecto Antimicrobiano De Extractos Crudos De Neem (*Azadirachta Indica* A. Juss) Y Venadillo (*Swietenia Humilis* Zucc) Contra *E. Coli*, *S.*

*Aureus* y el Bacteriófago P22. Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, A.C. 32(004): 117-125

61. **Lorke, D., 1983** A new approach to practical acute toxicity testing. Arch. Toxicol. 54:275-287.
62. **Lu, F, C. 1992.** Mutagenia. En: *Toxicología Básica*. Ed, Harla. Miami, EUA. 139-141.
63. **Madrigal-Santillán, E. 2000.** Efecto Inhibitorio del manano contra el daño genotóxico producido por la aflatoxina B1 *in vivo*. Tesis Doctoral Instituto Politécnico Nacional. Mexico. 9-12, 88-95.
64. **Martínez-Augustin, O. y Martínez de Victoria, M., E. 2006.** Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutrición Hospitalaria*. 21(2)
65. **Martínez-Fregozo, F., 2008.** Efecto de Inhibición Mutagénica del Nitrito de Sodio por Acción Quimiopreventiva de la Capsaicina en Ratón. Tesis de licenciatura en Nutrición. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias de la Salud.
66. **Marques, S., Olivera, N., Chaveca, T. and Rueff, J. 2002.** Micronuclei and sister chromatid exchanges induced by capsaicin in human lymphocytes *Mutation Research*. 517:39-46
67. **Medina-Godoy, S., Camacho-Espinoza, M.K., Peinado-Guevara L.I., López –Valenzuela J.A., Valdez-Ortiz A., Salinas-Pérez R.A. y Moreno-Herrera C.G. 2010.** Caracterización Proteómica de Granos de Frijol Azufrado (*Phaseolus vulgaris*) Cultivados en el Estado de Sinaloa. *Ra Ximhai*. Vol. 6(1):23-36. ISSN-1665-0441
68. **Megías, C.; M. Yust; J. Pedroche; H. Lquari; J. Girón; M. Alaiz; F. Millán and J. Vioque. 2004.** Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus L.*) protein isolates. *J. Agr. Food Chem*. 52:1928-1932.
69. **Mora-Escobedo, R., Robles-Ramírez, M. C., Ramón-Gallegos, E., y Reza-Alemán, R. 2009.** Effect of Protein Hydrolysates from Germinated Soybean on Cancerous Cell of the Human Cervix: An *In Vitro* Study. *Plant Foods Hum Nutr*. 64:271–278

70. **Nikokyris, P. N. and Kandyliis, K., 1997.** Feed protein fractions in various solvents of ruminant feedstuffs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2(75): 198–204.
71. **Novelo, M.; Cruz, J., C; Hernández, L.; Pereda-Miranda, R.; Chai, H.; Mar, W. and Pezzuto, J., M. 1993.** Cytotoxic constituents from *Hyptis verticillata*. *Journal Natural Products*. 56(10):1728-1736.
72. **Osborne, T. B. 1924.** The vegetable proteins (2nd ed). New York: Longmans, Green
73. **Ontiveros-Cortés, A.; Kohashi-Shibata, J.; Yáñez-Jiménez, P.; Acosta-Gallegos, J., A.; Martínez-Villegas, E. y García-Esteva, A. 2005.** Crecimiento de la raíz del frijol con diferentes velocidades de secado del suelo. *Terra Latinoamericana*. 23(3): 311-320
74. **Paredes, L., O.; Guevara, L., F.; Bello, P., L., A. 2006.** Los Alimentos Mágicos De Las Culturas Indígenas Mesoamericanas. FCE, SEP, CONACYT, CAB.
75. **Paredes, O. y Valverde, M., E. 2006.** Los recursos nutraceuticos y medicinales que Mesoamérica le ha dado al mundo. *CINVESTAV*. 25(3): 65-73.
76. **Payró de la Cruz, E. 2005.** Diversidad Y Relaciones Genéticas De Poblaciones Silvestres, Arvenses Y Domesticadas De Frijol (*Phaseolus Vulgaris* L.), En El Área Mesoamericana De Domesticación. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad de Colima.
77. **Pedroche, J.; Yust, M. M.; Girón-Calle, J.; Alaiz, M. Millán, F., y Vioque, J. 2002.** Utilisation of chickpea protein isolates for production of peptides with angiotensin I converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 960-965.
78. **Peña-Valdivia, C., B.; Celis-Velázquez, R.; Luna-Cavazos M.; Aguirre-Rivera, J., R.; Carballo-Carballo, A.; Trejo-López, C. 2008.** Variabilidad Morfológica Seminal Y Del Vigor Inicial De Germoplasma Mejorado De Frijol. *Agronomía Mesoamericana*. 19(2):179-193.
79. **Peralta-Flores, M.E.L., 2004.** Caracterización bioquímica de las proteínas de la semilla de *Jatropha Curcas* L. Tesis de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos.

80. **Peralta-Flores, L., Gallegos-Tintore, S., Solorza-Feria, J., Davila-Ortiz, G., Chel-Guerrero, L. and Martinez-Ayala, A., 2012.** Biochemical evaluation of protein fractions from physic nut (*Jatropha curcas* L.). *Grasas y Aceites*. 63 (3):253-259
81. **Pérez A. T., Arun B., Tripathy D., Tagliaferri M. A., Shaw, H., S.; Kimmick, G., G.; Cohen, I.; Shtivelman, E.; Caygill, K., A.; Grady. D.; Schactman, M. and Shapiro, C., L. 2010.** A phase 1B dose escalation trial of *Scutellaria barbata* (BZL101) for patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 120(1):111-118.
82. **Pérez-Herrera, P., Esquivel-Esquivel, G., Rosales-Sena, R., Acosta-Gallegos, J.A., 2002.** Caracterización física, culinaria y nutricional de frijol del altiplano subhúmedo de México. *Archivos Latinoamericanos de nutrición*. 52:172-180.
83. **Preston, J. y Hoffmann. R. G. 2001.** Genetic Toxicology. En: *Casarett and Doulls Toxicology the basic science of poisons*. Klaassen D. C.(ed). Mc Graw Hill pp. 331-340.
84. **Ramos, H., O., J. 2009.** Detección De Péptidos De Lupino Similares A Lunasina De Soya. Tesis. Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional. Centro De Desarrollo De Productos Bióticos.
85. **Repetto, M., 2002** Toxicología Fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad in vitro. Sevilla, España: Ediciones Díaz de Santos, Enpses-Mercie Group .Tercera edición. 303-305.
86. **Reynoso-Camacho, R., Ramos-Gómez, M. and Loarca-Pina, G. 2006.** Bioactive components in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Adv Agr Food Biotech*. 217- 236.
87. **Reynoso-Camacho R., Ríos-Ugalde, M. del C., Torres-Pacheco, I., Acosta-Gallegos, J. A., Palomino-Salinas, A. C., Ramos-Gómez, M., González-Jasso, E. y Guzmán-Maldonado, S.H., 2007.** El Consumo De Frijol Común (*Phaseolus Vulgaris* L.) Y Su Efecto Sobre El Cáncer De Colon En Ratas Sprague-Dawley. *Agricultura Técnica en México*. 1(33): 43-52
88. **Rodríguez-Licea, G. 2008.** Preferencias del consumidor de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en México. Tesis doctoral. Postgrado en socioeconomía, estadística e informática economía. Colegio de

Postgraduados. Instituto de Enseñanza de Investigación en Ciencias Agrícolas.

89. **Rodríguez-Licea, G.; García-Salazar, J., A.; Rebollar-Rebollar S. y Cruz-Contreras, A., C. 2010.** Preferencias del consumidor de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en México: factores y características que influyen en la decisión de compra diferenciada por tipo y variedad. Paradigma económico. 2(1): 121-145
90. **Rosales-Reyes, T.; De la Garza, M.; Arias-Castro, C.; Rodríguez-Mendiola, M.; Fattel-Fazenda, S.; Arce-Popoca, E.; Hernández-García, S. and Villa-Treviño, S. 2008.** Aqueous crude extract of *Rhoeo discolor*, a Mexican medicinal plant, decreases the formation of liver preneoplastic foci in rats. *J Ethnoph.* 115(3):381-386.
91. **Rost T.L., Barbour M.G., Thornton R.M., Weier T.E., Stockingy C.R. 1979.** Botany. A Brief Introduction To Plant Biology. John Wiley & Sons. New York.
92. **Roy, A. and Saraf S. 2006.** Limonoids: Overview of Significant Bioactive Triterpenes Distributed in Plants Kingdom *Biol. Pharm. Bull.* 29(2): 191-201
93. **Ruíz-Salazar, R. 2009.** Análisis de la Diversidad Genética de *Phaseolus coccineus* L. de la Subprovincia Carso Huasteco de México. Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica. Instituto Politécnico Nacional.
94. **Ruiz-Marcial C., Reyes-Chilpa P., Estrada E., Reyes-Esparza J., Fariña G. G., Rodríguez-Fragoso L. 2007.** Antiproliferative, cytotoxic and antitumor activity of
95. coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense*. *Journal of Pharm Pharmacol.* 59(5):719-725.
96. **Secretaría de Economía, 2012.** Análisis de la Cadena de Valor del Frijol. Dirección General de Industrias Básicas.1-8
97. **Serrano, J., y Goni, I. 2004.** Papel del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de la población guatemalteca. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.* 54(1):36-44
98. **Schlaepfer, L.; Mendoza-Espinoza, J., A. 2010.** Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* 41(4):18-27

99. **Sherr, C.J. 1996.** Cancer cell cycles. *Science*. 274: 1672-7.
100. **Silveira, R., M., B.; Monero, M., S. y Molina, B., B. 2003.** Alimentos Funcionales y Nutrición Óptima. ¿Cerca O Lejos? *Rev. Esp. Salud Pública*. 77(3)
101. **Shewry, P.R., Napler, J.A. and Tatham, A.S. 1995.** Seed storage proteins: structure and biosynthesis. *Plant Cell* 7. 945-954
102. **Torruco-Uco, J., G.; Domínguez-Magaña, M., A.; Dávila-Ortíz, G.; Martínez-Ayala, A.; Chel-Guerrero, L., A.; Betancur-Ancona, D., A. 2008.** Péptidos Antihipertensivos, Una Alternativa De Tratamiento De Origen Natural: Una Revisión. *Ciencia y Tecnología Alimentaria, Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos*. 6(2):158-168.
103. **Trossero, C., Caffarena, G., Hure, E. y Rizzotto, M. 2006.** Detección de Mutagenicidad en Compuestos N-Nitroso con el Test de Ames. *Acta Farm. Bonaerense*. 25 (1): 139-44
104. **Ulloa, J., A.; Ulloa, P., R.; Ramírez, R., J., C.; Ulloa, R., B., E. 2011.** El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Revista Fuente*. 3(8).
105. **Vadivel, V. and Janardhanan, K. 2005.** Nutritional and antinutritional characteristics of seven south Indian wild legumes. *Plant Foods for human Nutrition* 60(2): 69-75.
106. **Valencia, G., F., E. y Román, M., M., O. 2004.** La fibra Dietaría Como Alimento Funcional. *VITAE, Revista de la facultad de Química Farmacéutica*. 1(2): 12-17
107. **Vargas, V., P.; Alvarado, M., S.; Muruaga, M., J., S.; Guillén, A., H.; Ortega, A., J.; Montero, T., V.; Acosta, G., J. y Azpíroz, R., H., S. 1998.** Evaluación de la resistencia a la roya (*Uromyces appendiculatus*) en poblaciones silvestres y cultivadas de frijol, mediante el empleo de marcadores genéticos moleculares. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Centro. Informe final SNIBCONABIO proyecto No. G027.
108. **Vargas-Vázquez, P.; Muruaga-Martínez, J., S.; Martínez-Villarreal, S., E.; Ruiz-Salazar, R.; Hernández-Delgado, S. y Mayek-Pérez, N. 2011.** Diversidad morfológica del frijol ayocote del Carso Huasteco de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82: 767-775.

109. **Voysest, V., O. 2000.** Mejoramiento del frijol (*Phaseolus Vulgaris* L.). Legado de variedades de América Latina 1930-1999. Publicación CIAT No. 321:1-80
110. **Zeiger E., 1998** Identification of rodent carcinogens and noncarcinogens using genetic toxicity tests: premises, promises, and performance. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 28, 85-95.



## ANEXOS

### ANEXO I. Tinción de GIEMSA.

En este método se reemplazan los colorantes policromáticos empíricos por distintos compuestos de azur (tionina y sus derivados metilados) con eosina y azul de metileno. Los frotis deben fijarse durante tres minutos en alcohol metílico. Luego se secan y se sumergen en colorante de Giemsa diluido (un volumen de colorante para nueve a 15 volúmenes de agua destilada o de amortiguador de pH 6.8) en frasco de Copling, durante quince minutos a una hora. Luego se lava en agua destilada y se seca al aire, sin montar (Lunch, 1977).

El procedimiento de tinción que se realizó fue el de Giemsa May-Grünwald, con las siguientes modificaciones:

1. Los frotis secados al aire se fijan durante cinco minutos de alcohol metílico.
2. Se pasan a colorante de May-Grünwald diluido recientemente con un volumen de agua destilada 43 mL, una solución reguladora de fosfatos 0.3 M (pH 6.8) y 2 mL de colorante de Giemsa, se deja actuar durante 45-50 minutos.
3. Aclarar con agua destilada y dejarlos secar al aire y evaluar (Brown, 1993).

Preparación del buffer de fosfatos 0.3 M

1.- Solución A ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )..... Masa molecular = 136.09g

Pesar 40.827g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y disolver en 1000 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada

2.- Solución B ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )..... masa molecular = 141.96g

Pesar 42.588g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y disolver en 1000 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada

Mezclar ambas soluciones (A y B) y ajustar a un pH de 6.8.