

## CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL FRIJOL AYOCOTE (*Phaseolus coccineus* L.).

Teniente-Martínez G.<sup>a</sup>, González Cruz L.<sup>a</sup>, Cariño-Cortés R.<sup>b</sup>, Bernardino-Nicanor A.<sup>a</sup>

a) Instituto Tecnológico de Celaya, Departamento de Ingeniería Bioquímica. Av. Tecnológico y A. García Cubas S/N A.P 57. C.P 38010. Celaya, Gto, México.

b) Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias de la Salud, Ex-hacienda la Concepción, Tilcuautla Código Postal: 42160, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo, México. \* [aureabernardino@yahoo.com](mailto:aureabernardino@yahoo.com)

### Resumen

Actualmente, el cáncer es una de las principales causas de mortandad en el mundo, por lo que se ha buscado el uso de componentes nutraceuticos de origen vegetal para su tratamiento, tal es el caso de los péptidos bioactivos obtenidos principalmente de las leguminosas, siendo el género *Phaseolus*, una de las fuentes más importantes, sin embargo existen algunas variedades de éste género que aún no han sido estudiadas y que podrían ser fuente promisoría de compuestos bioactivos, entre las cuales se encuentra el Frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*), por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar la influencia de la colecta sobre la composición química del frijol así como la capacidad citotóxica de los péptidos generados de la hidrólisis enzimática del aislado proteínico. El análisis químico proximal mostró que la colecta de frijol negro (23.8 % b.s) contiene mayor cantidad de proteína que el frijol morado (21.9% b.s), mientras que el contenido de cenizas, grasa y carbohidratos son superiores en el frijol morado que en el negro, el punto isoelectrico de la proteína de ambas colectas se encuentra en un pH de 4.0. Finalmente, los aislados no mostraron toxicidad hasta 5000 mg/kg en ratón CD1<sup>+</sup> por vía oral.

### Abstract

Currently, cancer is a leading cause of death in the world, so we have sought the use of nutraceutical compounds of plant origin for treatment, as in the case of bioactive peptides derived mainly from legumes, being the genus *Phaseolus*, one of the most important sources, but there are some varieties of this genus that have not been studied and could be a promising source of bioactive compounds, including the ayocote bean (*Phaseolus coccineus*) is found, for this reason, the objective of this research was to evaluate the influence of the variant on the chemical composition of the bean and the cytotoxic capacity of the peptides generated from enzymatic hydrolysis of protein isolate. The proximate analysis showed that the black variant (23.8 % db) contains more protein than the purple variant (21.9 % db), while the ash content, fat and carbohydrates are higher in the purple variant than in the black variant, the isoelectric focusing of the protein in both variants was pH 4.0. Finally, the isolates did not have toxicity to 5000 mg/kg in mice orally CD1 +

**Palabras clave:** Péptidos bioactivos, Antimutagénica, *Phaseolus coccineus*.

**Área:** Cereales, Leguminosas y Oleaginosas

## INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus spp*) es un grano de la familia de las leguminosas originaria de América, junto con el maíz es uno de los principales componentes de la dieta de la población mexicana, por lo que 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 es uno de los cultivos de mayor importancia, económica y representa una de las fuentes más importantes de carbohidratos y proteínas (Cuéllar-Ortiz, 2008; Paredes *et al.*, 2006). El género *Phaseolus* es muy diverso, de las 52 especies de las que se tiene registro, alrededor de 40 son originarias de México y no todas están completamente caracterizadas desde el punto de vista nutracéutico, tal es el caso de *Phaseolus coccineus* o frijol ayocote, el cual puede contener hasta 20% de proteína (Aremu *et al.*, 2010) lo que lo convierte en una fuente promisoría de péptidos bioactivos.

Actualmente la importancia del frijol se ha extendido al área médica, ya que se ha demostrado que muchos de sus componentes presentan propiedades nutracéuticas, por lo que se usan en la prevención o tratamiento de enfermedades crónico degenerativas tales como diabetes, hipertensión y cáncer (específicamente de colon, mama, cervicouterino y próstata) (Paredes y Valverde, 2006), siendo ésta última enfermedad la de mayor importancia ya que es la principal causa de mortandad a nivel mundial, se caracteriza por el crecimiento anormal y diseminado de las células que al desarrollarse en forma incontrolada, avanzan entre los tejidos normales y los destruyen, alterando así el funcionamiento del organismo (Escandón *et al.*, 1992), por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar la influencia de la colecta sobre la composición químico proximal del frijol ayocote así como sobre la actividad citotóxica de los péptidos obtenidos por medio de la hidrólisis enzimática *in vitro* del aislado proteínico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se utilizaron dos colectas de frijol ayocote (morado y negro), proveniente del municipio de Zacatlán ubicado en la Sierra Norte del estado de Puebla. Las semillas se limpiaron manualmente retirando materia extraña y granos dañados, y se almacenaron a 4°C hasta su análisis.

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

El análisis de químico proximal del frijol se realizó según los métodos descritos por la AOAC 1990. Contenido de proteínas (Método 955.04, factor N X 6.25), Fibra

cruda (Método 962.09), Humedad (Método 934.01), Extracto etéreo (Método 920.39) y Cenizas: (Método 923.03).

### **Obtención de los aislados proteínicos del frijol ayocote.**

Para la obtención del aislado proteínico, primero se determinó el punto isoelectrico de las proteínas, para lo cual se consideró como base el método de precipitación isoelectrica de Bernardino-Nicanor *et al.*, 2000, el cual consta de dos etapas, en la primera etapa se determina el pH de máxima solubilidad de la proteína partiendo de una disolución de harina desengrasada:agua en una relación 1:20 (p/v), se ajusta el pH con NaOH (0.1N) en el intervalo de 9 a 11, se centrifuga a 4°C durante 30 min a 3000 xg, se determina proteína en el sobrenadante por el método de Bradford y se selecciona el pH donde se obtenga la mayor concentración de proteína. En la segunda etapa se determina el pH de máxima precipitación de la proteína, para lo cual se usa el sobrenadante seleccionado y se ajusta el pH en un intervalo de 3 a 7, el punto isoelectrico es aquel donde se obtiene la menor concentración de proteínas en el sobrenadante.

### **Electroforesis (SDS\_PAGE)**

El análisis electroforético de los aislados se realizó según la metodología descrita por Laemmli, 1970. El PM de las proteínas se determinó graficando la movilidad relativa de estándares de referencia contra PM, extrapolando el valor correspondiente de las fracciones de las proteínas analizadas.

### **Determinación de la DL50**

La determinación de la dosis letal media (DL50) se realizó de acuerdo al método descrito por Lorke 1983. Los animales empleados fueron ratones machos de la cepa CD1+ con un peso aproximado de 20-25g los cuales fueron mantenidos con libre acceso al agua y al alimento. Se administró por vía oral de 10, 100, 1000 mg/kg utilizando 3 ratones por dosis. Se analizaron por 7 días, considerando los pesos, durante los días donde no hubo mortandad, considerando el resultado se procedió a administrar los aislados a otros grupos de ratones con dosis de 1600, 2900 y 5000 mg/kg analizando por 7 días.

## **RESULTADOS**

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

Los resultados del análisis químico proximal muestran que la concentración de proteína del frijol varía de acuerdo a la colecta, siendo el frijol negro (23.80 %) el que mostró mayor concentración en comparación con el frijol morado (21.93 %). Los resultados obtenidos en la colecta de frijol negro fueron similares a los reportados

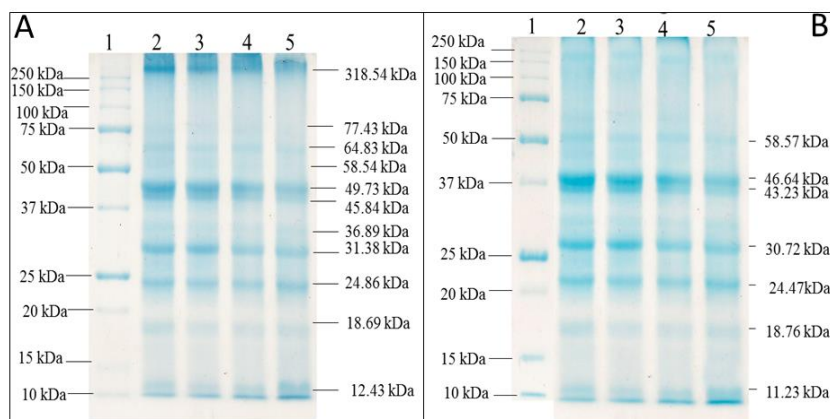
por Álvarez-Salas y Turbay-Ceballos en 2009 para colecta de frijol ayocote petaco (23.46%), mientras que es superior en comparación con el reportado para Ayocote escarlata (20.97%) y Ayocote Blanco-Tlaxcala (20.46%) (Aremu, 2010; INIFAP). Las colectas de frijol morado y negro presentaron el 9.62 y 9.37% de humedad respectivamente, dichos valores son superiores a los reportados por Álvarez-Salas y Turbay-Ceballos en el 2009, lo cual se debe a que como se ha demostrado la humedad varía de acuerdo al lugar de origen de la leguminosa. Por otro lado, el contenido de grasa en las colectas de frijol morado y negro (3.78% y 3.50% respectivamente) es inferior a los reportados por Aremu *et al.*, 2010 y Pérez-Herrera *et al.*, 2002. Finalmente, el contenido de cenizas de ambas colectas (morado 3.77% y negro 3.50%) se encuentra en el intervalo reportado por Aremu *et al.*, 2010 y Álvarez-Salas y Turbay-Ceballo, 2009.

### **Obtención de los aislados proteínicos del frijol.**

Los resultados mostraron que el punto isoeléctrico de la proteína de ambas colectas se encuentra en un pH de 4.0, este valor es similar a obtenido por Bressani, 2012, para el frijol terciopelo (*P. vulgaris*) el cual es 4, otros autores como Córdova-Lizama et al., 2013 y González-Quijada, 1999 reportan 4 y 4.9 respectivamente como punto isoeléctrico. Lo que nos indica que el punto isoeléctrico depende de la variedad y de los reactivos que sean utilizados para el ajuste de pH. Los aislados obtenidos presentan 93.14% de proteína para el frijol morado y 94.53% para el frijol negro, estos resultados son inferiores a los reportados por Boye *et al.*, 2010 (95.70%) en aislado de frijol lima (*P. lunatus*), sin embargo son superiores a los obtenidos por Conde-Martínez y Ortega-Delgado, 1990 y Medina-Godoy et al., 2009; en aislado de frijol azufrado y azufrado regional 87 (91% y 66.73% respectivamente).

### **Comportamiento eletroforético del aislado proteínico**

Para determinar el efecto del método de conservación del aislado sobre las proteínas, se utilizaron dos tipos de secado: a temperatura ambiente ( $\approx 15$  h) y a temperatura a 50 °C (3-4 h), así como dos temperaturas de conservación; congelación a -18 °C y ultracongelación -72 °C, las muestras fueron analizadas con electroforesis de poliacrilamida (Figura 1), encontrando que los métodos utilizados aparentemente no alteran la estructura de la proteína, ya que se presentó el mismo comportamiento electroforético para todas las muestras.



**Figura 1.** Electroforesis de los aislados proteínicos; A) Frijol Negro, B) Frijol Morado, 1- Patrón electroforetico, 2-Aislado en Ultracongelación( -72 °C), 3- Aislado en congelación (-18 °C), 4- Aislado seco a temperatura ambiente, 5- Aislado seco a temperatura de 50 °C.

### Dosis letal media (DL50).

Los resultados mostraron que los ratones no presentaron mortandad ni síntomas o alteraciones en la conducta, con lo que se concluye que probablemente las dosis de; 10, 100, 1000, 1600, 2900 y 5000 mg de aislado/kg de peso del animal en estudio son inocuas, por lo que se considerará en estudios posteriores el uso de las dosis de 430 y 860 mg/kg/día, lo cual es equivalente a la ingestión diaria de frijol en humanos.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Cuéllar-Ortiz SM. 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.
2. Paredes L O; Guevara L F; Bello P L A. 2006. Los Alimentos Mágicos De Las Culturas Indígenas Mesoamericanas. FCE, SEP, CONACYT, CAB.
3. Paredes O y Valverde M E. 2006. Los recursos nutraceuticos y medicinales que Mesoamérica le ha dado al mundo. CINVESTAV. 25(3): 65-73.
4. Escandón RC, Benítez MM G, Navarrete EJ, Vázquez MJL, Martínez MOG 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
5. AOAC. 1990. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis (15th Ed.), 974.24, Arlington, Virginia. pp. 993-994.

6. 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.
7. Bradford M M. 1976. Arapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72: 248-254
8. Laemmli KU. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259), 680–685.
9. Lorke D. 1983. Anew approach to practical acute toxicity testing. *Arch. Toxicol*. 54:275-287.
10. Álvarez-Salas LM, Turbay-Ceballos S. 2009. El Fríjol 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.
11. Aremu MO, Olaofe O, Basu SK, Abdulazeez G, and Acharya SN. 2010. Processed cranberry bean (*Phaseolus coccineus* L.) seed flour for the African diet. *Canadian Journal of Plant Science*. 90(5): 719-728.
12. Pérez-Herrera P, Esquivel-Esquivel G, Rosales-Sena R, Acosta-Gallegos JA. 2002. Caracterización física, culinaria y nutricional de frijol del altiplano subhúmedo de México. *Archivos Latinoamericanos de nutrición*. 52:172-180.
13. Bressani R. 2006. Extracción, caracterización fisicoquímica y propiedades funcionales de la proteína y del almidón de frijol Mucuna (terciopelo) *Mucuna ssp*. Informe final del proyecto Fodecyt No. 044-2012.
14. Cordova-Lizama A, Ruiz-Ruiz J, Segura-Campos M, Betancur-Ancona D, Chel-Guerrero L. 2013. Actividad antitrombotica y anticariogenica de hidrolizados proteinicos de firjol lima (*Phaseolus lunatus*). *Revista de la Facultad de Ingeniería Química*. 52:25-31
15. González-Quijada MR. 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.