

Nuevos estudios sobre un Factor Tóxico de las caraotas crudas (*Phaseolus vulgaris*)

WERNER G. JAFFÉ, ALFREDO PLANCHART, J. I. PÁEZ PUMAR,
RAFAEL TORREALBA Y NELLY FRANCESCHI D.
Instituto Nacional de Nutrición

En una serie de publicaciones, uno de nosotros ha demostrado que las caraotas crudas, incorporadas a dietas para ratas o conejos, interfieren con el crecimiento normal, causan diarrea y, en algunos casos, la muerte de los animales (1 - 3). La literatura sobre la materia ha sido revisada en un trabajo anterior (4). También se ha estudiado un número de leguminosas crudas con respecto a su efecto sobre el crecimiento y se ha demostrado que en semillas se pierde completamente la toxicidad. No se ha podido demostrar una relación directa entre el efecto tóxico por un lado y el contenido en inhibidores tripticos, hemaglutininas y ácido cianhídrico por el otro. Se concluyó que posiblemente existe en las caraotas crudas un factor termolábil que es tóxico al ser administrado por vía oral. En el presente trabajo estudiamos en una primera parte la influencia que tiene la adición de caraotas crudas molidas a dietas experimentales para ratas sobre el crecimiento de los animales y la digestibilidad de las dietas. En una segunda parte se estudió el efecto de dietas con caraotas crudas sobre la capacidad de absorción intestinal de glucosa por las ratas y, por último, se hicieron algunos ensayos preliminares para obtener una fracción activa a base de extractos de caraotas molidas.

MATERIAL Y METODO

1. *Experimentos de crecimiento y digestibilidad.*—Para los experimentos biológicos se usaron ratas machos descendientes de la cepa "Sprague Dawley", criados en este Instituto, que se tenían en jaulas individuales con fondo de tela metálica. Se

determinó el consumo de dieta y se recolectaron las heces para la determinación de la digestibilidad. Dietas y heces secadas se analizaron para determinar humedad, extracto etéreo y nitrógeno; los animales se pesaron dos veces por semana. Cada grupo experimental consistió de seis animales y cada experimento duró 28 días. Las dietas usadas tenían la siguiente composición:

Dieta N^o 1: Ración comercial para ratas "Ratarina", 70%; caraotas molidas, 30%.

Dieta N^o 2: Caseína digerida "Casitona Difco", 15%; caraotas molidas, 20%; aceite con vitaminas A, D y E, 5%; mezcla de vitamina B, 1%; d,1 metionina, 0,2%; almidón, 58,8%.

Dieta N^o 3: Caraotas molidas, 20%; metionina, 0,3%; mezcla de sales, 4%; aceite con vitaminas A, D y E, 5%; mezcla de vitamina B, 1%; almidón, 75%.

Dieta N^o 4: Caraotas molidas, 5%; caseína, 5%; metionina, 0,2%; mezcla de sales, 4%; aceite con vitaminas A, D y E, 5%; vitamina B, 1%; almidón, 70%.

Todas las dietas designadas con la letra "a" fueron preparadas con caraotas cocidas, y las que llevan la letra "b" se prepararon con caraotas crudas.

Con esta técnica se determina la absorción de los nutrientes sin distinguir específicamente entre efectos sobre la digestión y la absorción intestinal.

2. *Experimentos de absorción de glucosa.*—Todas las ratas se mantuvieron durante 24 horas en ayunas al comenzar la experiencia.

Para la absorción de glucosa se usaron ratas adultas machos de la misma cría, que se alimentaron con una dieta comercial para ratas (testigos) o con la misma dieta comercial mezclada en la proporción de 70 partes de dieta con 30 partes de caraotas crudas molidas, durante 10 días antes de la determinación de absorción. La técnica usada era la siguiente:

Fueron anestesiadas con Nembutal Sódico, sol. de 50 mgs. por cc., empleándose 0,1 cc. por cada 100 grs. de peso, o sea 5 mgr. por cada 100 grs. de peso por vía intraperitoneal.

Una vez dormidas, se les practicaba una laparotomía mediana medioumbilical, procediéndose a ligar el intestino delgado a nivel del ángulo duodeno-yeyunal y en la desembocadura del íleo en el ciego (asa de Tyri-Vela). Inmediatamente se inyectaron en el yeyuno-íleo 2 cc. de una solución al 5%

de glucosa, cerrando la pared y dejando al animal en estas condiciones por 45 minutos. Al cabo de este tiempo se reabría el animal, se seccionaba el intestino por encima de la ligadura duodeno-yeyunal y se procedía a desprenderlo y extraerlo cuidadosamente, seccionándolo por debajo de la ligadura del íleo. Luego se lavó por fuera para remover cualquier resto de sangre; y se procedía a extraer el contenido intestinal con sucesivos lavados con agua destilada, recogiénose en un balón aforado, y a eliminar los residuos fecales mediante un embudo con un algodón. Se completó a un volumen de 25 cc. y se procedió a dosificar la glucosa por el método de Somogy Nelson, obteniéndose así la glucosa residual del intestino en mgrs. por ciento. Sabiendo que la cantidad inyectada fué de 100 mgrs. (2 cc. sol. al 5%), por diferencia se obtuvo la glucosa absorbida.

Se hizo un experimento en blanco, comprobándose que no había sustancias reductoras detectables con la técnica usada si se inyectaba agua destilada en vez de solución de glucosa, bajo las mismas condiciones experimentales.

3. *Extracción de fracciones.*—Dos lotes de caraotas crudas molidas de 2 kilogramos cada uno se mezclaron con 8 litros de agua o solución de cloruro de sodio al 1%, respectivamente, y se guardaron en la nevera por 24 horas. Luego se prensó la masa y se filtró, obteniéndose 4,5 litros de extracto. Se agregó alcohol hasta obtener una concentración del 30% y se separó el precipitado por centrifugación (fracciones 1a y 2a). El sobrenadante se llevó con más alcohol hasta una concentración final del 80%, obteniéndose las fracciones 1b y 2b, respectivamente. Estas fracciones se secaron al vacío a temperatura ambiente.

RESULTADOS OBTENIDOS

En la tabla N^o 1 se presentan los datos acerca del crecimiento, la digestibilidad aparente bruta, digestibilidad aparente y real del nitrógeno, digestibilidad aparente de las grasas por día y animal, crecimiento por N ingerido, crecimiento por N absorbido por día y animal, consumo de la dieta por día y animal.

Una comparación de los datos entre los grupos experimentales que recibieron las dietas con caraotas crudas, con los controles alimentados con las dietas correspondientes, pero

con caraotas cocidas, revela una reducción de todos los valores estudiados; la reducción del crecimiento siempre estuvo acompañada por una disminución del consumo de la dieta, como también de la digestibilidad de todos sus componentes estudiados. Esta reducción fué mucho más pronunciada en los experimentos efectuados con las dietas Nos. 2 y 3 que con las dietas 1a y 1b.

Por esta razón se ideó la dieta N° 4 con un contenido bajo en proteína y fibra, la cual revela mejor las diferencias de crecimiento si se usan caraotas crudas o cocidas para su preparación. En la tabla N° 3 se presentan los resultados obtenidos con estas dietas por sí solas o adicionadas con tres distintas fracciones de caraotas crudas. Con esta técnica ya la adición de sólo un 5% de caraotas crudas se manifiesta por una marcada reducción del crecimiento y se logró demostrar que las fracciones 1a y 1b —preparadas con extractos acuosos—, agregadas en la concentración al 1% a la dieta, causan pérdida de peso de los animales, mientras que la fracción 2a —preparada por extracción con solución de Na Cl al 1%— no tenía tal efecto; tampoco se observa el efecto si se usa a la concentración de 3%.

Una prueba con sangre de ratas reveló que las fracciones 1a y 1b tuvieron actividad de hemaglutinina, mientras que la fracción 2a no la tuvo a la concentración del 1% en solución isotónica de cloruro de sodio.

En vista de que la digestibilidad (absorción intestinal bruta) de las proteínas (digestibilidad del N) siempre estaba acompañada de una reducción de la digestibilidad total, como también de la de las grasas, resolvimos estudiar la absorción intestinal directamente, mediante la técnica descrita más arriba. Los resultados de estos ensayos se han resumido en la tabla N° 2. Se observa que realmente la proporción de glucosa absorbida por el asa de Tyri-Vela en 45 minutos en animales que habían consumido una dieta con un 30% de caraotas crudas era de sólo 47,7%, contra un 87,7% en los animales de control. Esta diferencia es altamente significativa.

DISCUSION

Nuestros resultados demuestran que en las caraotas negras crudas existe un factor termolábil cuya presencia en una dieta

adecuada para ratas impide el crecimiento normal de estos animales. Se observa una reducción de la digestibilidad de la dieta, no únicamente respecto a las proteínas, sino también a las grasas. La inclusión de cantidades adecuadas de caseína digerida a la dieta no anula el efecto de las caraotas crudas. Como también hemos demostrado que los intestinos de ratas que han consumido por 10 días una dieta con caraotas crudas absorben glucosa mucho más lentamente que los controles, se puede concluir que la acción se debe, por lo menos en parte, a que el factor de la caraota cruda interfiere con la absorción intestinal normal.

Una revisión de la literatura demuestra que no se han hecho observaciones similares a las nuestras anteriormente, aunque las caraotas han sido el objetivo de numerosas investigaciones respecto a la presencia de factores desconocidos; desde que Landsteiner y Raubitschek (5) observaron que extractos de semillas de esta leguminosa, como las de muchas otras, tienen un poder hemaglutinante fuerte, y desde que Osborne y Mendel (6) observaron que las caraotas, como fuente proteica de una dieta para ratas, no permiten un crecimiento normal. Estos autores, como varios que se han ocupado del problema posteriormente (7), relacionaron el mal crecimiento, bajo las condiciones experimentales mencionadas, a la digestibilidad reducida de las proteínas de las caraotas. Esta tesis encontró apoyo en los estudios de Borchers (8), quien encontró un inhibidor de la acción de la tripsina en los extractos de varias leguminosas, inclusive *Phaseolus*. Sin embargo, como demostramos ya en estudios anteriores (3) y también en el presente trabajo, la adición de caseína digerida a una dieta con caraotas crudas no elimina el efecto de estas últimas, como sería de esperarse si la inhibición del crecimiento se debiera únicamente al inhibidor triptico. Los experimentos presentados demuestran que la absorción de la glucosa es muy reducida en los animales que han consumido la leguminosa en discusión, lo que no se puede explicar por la acción del inhibidor de la tripsina.

En experimentos no incluidos en el presente trabajo se pudo eliminar la posibilidad de que la falla de absorción de glucosa fuera consecuencia de la diarrea que frecuentemente se observa en ratas que se alimentan con una dieta con un 30% de caraotas crudas. En el examen microscópico del intes-

tino no se han encontrado lesiones visibles histológicas en los intestinos de ratas alimentadas durante 28 días con la dieta con 30% de caraotas crudas.

Ultimamente, Rigas, Osgood y Duerst (9) han logrado aislar, en forma pura, una proteína de caraotas crudas que tiene un fuerte poder hemaglutinante y seguramente es idéntica a los factores estudiados ya al principio de este siglo (10, 11). Los autores americanos mencionan que el factor aislado por ellos no es tóxico, aunque no aportan evidencia experimental en su publicación, sino se refieren a la literatura publicada anteriormente.

Liener, en una serie de publicaciones (13-16), ha descrito el aislamiento de una toxina de la soya, que llama "soyina" y que es tóxica tanto por la vía oral como parenteral para ratas y pollos. Este autor cree que el modo de acción de la soyina, aplicada por vía oral, es el de causar una reducción del consumo de alimentos. Como hemos demostrado, el factor estudiado por nosotros también causa una reducción del consumo de dieta, pero su acción de reducir el crecimiento de las ratas no se explica únicamente de esta manera.

Es de interés que la toxicidad de las caraotas crudas o insuficientemente cocidas se ha observado también en humanos (17). Sobre el mecanismo de la intoxicación en humanos no existen datos en la literatura estudiada. Los síntomas clínicos observados son: náuseas, vómitos y diarreas.

RESUMEN

Se presentan resultados de experimentos sobre el crecimiento de ratas alimentadas con diferentes tipos de dietas conteniendo caraotas negras crudas o cocidas. La inclusión de caraotas crudas en las dietas redujo la velocidad del crecimiento a una fracción y simultáneamente tenía por efecto una reducción de la digestibilidad total, proteica y de las grasas.

En otra serie de experimentos se logró demostrar que la absorción de glucosa introducida en un asa intestinal aislada se reducía significativamente en las ratas que habían consumido antes una dieta con caraotas crudas, en comparación con los controles.

Se logró componer una dieta experimental con la cual la adición de sólo un 5% de caraotas crudas produjo una pérdida de peso en las ratas que la consumieron, mientras que la adición de la misma cantidad de caraotas cocidas permitió un aumento de peso.

Mediante esta dieta se estudió el efecto de algunas fracciones de caraotas, obtenidas por la extracción del grano molido y la precipitación del extracto con alcohol. Fracciones de un extracto acuoso, precipitadas con alcohol al 30% ó al 80%, eran activas cuando incorporadas a la dieta en la proporción del 1%. Una fracción obtenida de un extracto con NaCl al 1% no resultó ser activa.

SUMMARY

The authors present results of experiments about the growth of rats fed diets containing cooked and uncooked beans (*Phaseolus vulgaris*). The addition of uncooked beans to the diets, diminished the rate of growth and also reduced the digestibility of proteins and fats.

In other series of experiments the authors could show that the absorption of glucose introduced in an isolated intestinal loop was diminished significantly in those rats which had been fed on a diet with uncooked beans in comparison with the control animals.

It has been possible to prepare an experimental diet in which the addition of only 5% of raw beans produced loss of weight while the addition of the same amount of cooked beans produced an increase.

Some fractions of the beans could be studied with this type of diet. Those obtained by alcohol precipitation of a water extract were active in the growth experiments, when added to the experimental diet in the proportion of 1%.

ZUSAMMENFASSUNG

Es werden Daten mitgeteilt über die Verdaulichkeit von Eiweiss und Fett in Diäten, die entweder rohe oder gekochte schwarze Bohne (*Phaseolus vulgaris*) enthielten und über das Wachstum von Ratten die mit diesen Diäten gefüttert wurden. Rohe Bohnen hemmen stets das Wachstum und bewirken eine Erniedrigung der Verdaulichkeit und der verzehrten Futtermenge.

In andern Versuchen wurde in Ratten, die vorher eine Diät mit oder ohne rohe Bohnen genossen hatten und dann 24 Stunden ohne Futter gelassen wurden, die Absorbtion von Glucose aus dem Darm direkt bestimmt und gefunden, dass sie nach dem Genuss der Bohnendiät nur halb so schnell ist als in den Kontrollen.

Es gelang, eine experimentelle Diät zusammenzustellen, mit der bereits der Zusatz von nur 5% gemahlener roher Bohnen einen sehr deutlichen Wachstumseffekt zeigt. Mit Hilfe dieser Diät wurde die biologische Wirksamkeit einiger Bohnenextraktfraktionen untersucht. Wirksam waren Fraktionen aus wässrigen Extrakten mit Alkohol gefällt.

TABLA No. 1

RESULTADOS DE LOS ENSAYOS CON DIETAS QUE CONTENIAN CARAOTAS COCIDAS O CRUDAS RESP.

	Dieta 1 a	Dieta 1 b	Dieta 2 a	Dieta 2 b	Dieta 3 a	Dieta 3 b
Aumento de peso/ día/animal en gr.	4.8	1.5	6.1	0.9	1.3	-2.4
Consumo de dieta/ día/animal en gr.	13.4	6.8	12.9	10.3	12.0	7.6
Digestibilidad total bruta %	74.4	66.5	91.5	83.0	93.7	82.4
Digestibilidad aparente del N %	68.2	53.9	75.5	57.8	64.4	0
Digestibilidad real del N %	71.2	58.0	82.8	64.9	77.0	0.01
Digestibilidad aparente de grasas %	79.6	57.5	94.7	88.5	95.2	88.9
Crecimiento / N consumido en gr.	8.7	5.3	17.4	3.1	13.8	—
Crecimiento / N retenido en gr.	12.8	10.0	23.0	5.2	19.8	—

Cada grupo experimental consistía de 6 ratas. Duración de
carraotas cocidas; con la letra 'b', carraotas crudas. La composi

los experimentos: 28 días. Las dietas con la letra 'a' contienen
ción de las dietas, vea el texto.

TABLA No. 2

INFLUENCIA DE CARAOTAS Y EXTRACTOS DE CARAOTAS SOBRE EL CRECIMIENTO DE RATAS

Tipo de dieta	No. de animales	No. de días	Variación de peso por animal y por día	Consumo diario por animal
Dieta 4 b con caraotas crudas . .	6	10	— 0.15	11.1
Dieta 4 a con caraotas cocidas . .	6	10	+ 2.1	14.6
Dieta 4 a con 3%. Fracción N° 2-a	6	5	+ 2.0	14.8
Dieta 4 a con 1%. Fracción N° 1-a	6	5	— 1.7	—
Dieta 4 a con 1%. Fracción N° 1-b	6	3	— 1.3	10.2

TABLA No. 3

ABSORCION DE GLUCOSA DE UN ASA INTESTINAL AISLADA
DE RATAS TRATADAS CON O SIN CARAOTAS CRUDAS

	No. de casos	Glucosa absorbida	Desviación standard	Significación $\frac{p1-p2}{\sigma p1-p2}$
Controles . . .	18	87.7%	5,42	$\frac{p1-p2}{\sigma p1-p2} > 3$
Dieta con 30% de caraotas crudas. . . .	12	47.4%	6,53	P = < 0,001

BIBLIOGRAFIA

- (1) W. G. Jaffé.—Acta Científica Venezolana 1, 16 (1950).
- (2) W. G. Jaffé.—Rev. Soc. Venez. Quím. No. 20, 16 (1949).
- (3) W. G. Jaffé.—Experientia 5, 81 (1949).
- (4) W. G. Jaffé.—Acta Científica Venezolana 1, 62 (1950).
- (5) K. Landsteiner y H. Raubitschek.—Centr. Bakt. 45, 660 (1907).
- (6) T. B. Osborne y L. B. Mendel.—Z. Physiol. Chemie 80, 307 (1912).
- (7) C. O. Johns y A. I. Fink.—J. Biol. Chem. 41, 379 (1920).
- (8) R. Borchers y C. Ackerson.—Arch. Biochem. 13, 291 (1947).
- (9) D. A. Rigas, E. E. Osgood y M. Duerst.—J. Biol. Chem. 212, 607 (1955).
- (10) O. Wienhaus.—Biochem Z. 18, 228 (1909).
- (11) F. Assmann.—Arch. ges. Physiol. 137, 499 (1911).
- (12) A. H. Souza.—Bol. Ministerio Agr. Brasil 33, 11 (1944).
- (13) I. E. Liener.—J. Biol. Chem. 193, 183 (1951).
- (14) I. E. Liener y M. J. Pallansch.—J. Biol. Chem. 197, 29 (1952).
- (15) I. E. Liener.—Fed. Proc. 12, 790 (1953).
- (16) I. E. Liener.—J. Nutr. 49, 527 (1953).
- (17) C. Griebel.—Zeitschr. Lebensmittel Untersuchung u. Forschung 90, 191 (1950).