

EVALUACION DE DOS METODOS PARA ESTABLECER EL CONTENIDO DE POLIFENOLES EN FRIJOL CRUDO Y COCIDO, Y EFECTO QUE ESTOS PROVOCAN EN LA DIGESTIBILIDAD DE LA PROTEINA¹

*Ricardo Bressani², Deidamia R. de Mora³, Rafael Flores⁴
y Roberto Gómez-Brenes⁵*

**Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá
(INCAP),
Guatemala, Guatemala, C. A.**

RESUMEN

Se cuantificaron los polifenoles de frijol común de color blanco, negro y colorado, crudos, cocidos y secados, con y sin caldo, por el método de Folin-Denis que mide polifenoles totales, y por el procedimiento de precipitación de proteína de Hagerman-Butler, que mide su actividad biológica.

La evaluación consistió en determinar polifenoles en las mismas muestras durante 20 días consecutivos, utilizando tres volúmenes de extracto de una misma muestra.

Los resultados obtenidos con el método de Folin-Denis, analizados estadísticamente, indicaron que la variabilidad fue diferente en los tres volúmenes de extracto de cada uno de los colores de frijol. Sin embargo, una prueba no paramétrica señaló que los promedios en los tres niveles de concentración para todos los frijoles, eran iguales.

Manuscrito modificado recibido: 17-8-90.

- 1 Este trabajo se llevó a cabo con fondos provenientes del Título XII-Bean/Cowpea Collaborative Research Support Program.
- 2 En esa época, Jefe de la División de Ciencias Agrícolas y Coordinador de Investigación del INCAP. En la actualidad, el Dr. Bressani es Coordinador de Investigación en Ciencias Agrícolas y de Alimentos, Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), Apartado Postal 1188, Guatemala, Guatemala, C.A.
- 3 Estudiante del Curso de Postgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos CESNA/INCAP, Guatemala, Guatemala, C.A.
- 4 Jefe de la División de Estadística del INCAP.
- 5 Cuando esta investigación se llevó a cabo, era Científico de la División de Ciencias Agrícolas y de Alimentos del INCAP.

Publicación INCAP E- 1376.

La variabilidad y los promedios en los tres niveles de extracto de frijoles negros y colorados -determinados por el método de Hagerman-Butler- fueron iguales, no siendo así con los frijoles blancos. El coeficiente de variación fue más bajo para el nivel de mayor volumen de extracto.

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

El contenido de polifenoles, medido por los dos métodos varió con el color de la cáscara, y el tratamiento térmico redujo su contenido. En las harinas de los tres colores de frijoles cocidos, que fueron secados con y sin caldo, las pérdidas de polifenoles totales (Folin-Denis) variaron entre 31.4 y 36.6%, y entre 39.8 y 51.1%, respectivamente. También se observó una variación entre 25.4 y 93.5% de pérdidas en los frijoles cocidos y secados con caldo, y entre 33.3 y 95.7% de reducción para los polifenoles biológicamente activos (Hagerman-Butler) en los frijoles cocidos y secados sin caldo. Las mayores pérdidas fueron para los frijoles colorados.

La digestibilidad *in vivo* de la proteína del frijol con caldo y sin caldo fue de 73.2, 69.6 y 64.5%, y de 71.9, 71.9 y 68.8% para los frijoles blancos, colorados y negros, respectivamente.

Se encontró una correlación negativa ($r=-0.39$) y significativa ($P<0.05$) entre el contenido de polifenoles de las dietas y el porcentaje de digestibilidad *in vivo*.

INTRODUCCION

Entre las leguminosas, el frijol común (*Phaseolus vulgaris*) ocupa un lugar predominante como alimento de mayor consumo, tanto en las zonas rurales como en las urbanas de los países latinoamericanos. Sin embargo, la eficiencia de utilización de sus proteínas está limitada por su deficiencia de aminoácidos azufrados, la presencia de factores antinutricionales, y su baja digestibilidad (1-3).

Se han formulado diversas hipótesis para explicar la baja digestibilidad de la proteína de los frijoles. Posiblemente los inhibidores enzimáticos, como los taninos o polifenoles, pueden ser parcialmente responsables de esta baja digestibilidad (4-8), pero estos compuestos, en las leguminosas, no han sido investigados a profundidad y existen pocos estudios en animales que indiquen que ellos afectan directamente la calidad nutricional (7,9). No obstante, hay evidencias que hacen pensar que los polifenoles son los que contribuyen más a la baja digestibilidad de la proteína del frijol (10-12).

La mayor dificultad que existe para estudiar a fondo estos compuestos en las leguminosas, radica en los métodos analíticos disponibles para su determinación, los cuales no son específicos (13) para polifenoles.

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

MATERIAL Y METODOS

Para la realización de este trabajo se utilizaron tres cultivares comerciales de frijol común (*Phaseolus vulgaris*): blanco, negro y colorado. Una alícuota de cada uno de ellos se molió en crudo a través de un molino de martillos. Una segunda alícuota fue puesta en remojo en agua durante 18 horas (1:3). Después de descartar el agua, se le agregó el mismo volumen de agua y se cocinó en autoclave a 15 psi. (121°C) por 45 minutos. Luego el material cocido se secó con su caldo por aire caliente a 60°C, y el material seco se molió con un molino de martillos. Una tercera alícuota de cada una de las tres muestras se procesó como se acaba de describir, con la diferencia que el producto del autoclave fue deshidratado sin el caldo de cocción. Por consiguiente, de cada muestra de frijol se prepararon otras tres muestras: harina cruda, harina cocida y secada con su caldo de cocción, y harina cocida y secada sin caldo de cocción.

A. Análisis Químicos

Las muestras se analizaron para determinar su contenido de nitrógeno por el método de Kjeldhal (14), a fin de establecer su contenido de proteína cruda. El porcentaje de humedad se determinó según los métodos de la AOAC (14).

Para la determinación cuantitativa de polifenoles se utilizaron dos métodos. Estos fueron: el de Folin-Denis descrito por la AOAC (14), y el de precipitación de proteína de Hagerman-Butler (8).

Para aplicar este método (8) a las leguminosas, se hicieron ensayos preliminares hasta encontrar la relación óptima para la extracción de taninos, que fue de 8, 4 y 2 g de muestra por cada 50 ml de metanol para frijoles blancos, negros y colorados, respectivamente. El rendimiento máximo de extracción en cada muestra, se obtuvo efectuando tres extracciones sucesivas, con metanol. Cada muestra se agitó a temperatura ambiente por 25 min con la ayuda de un agitador mecánico. Luego se centrifugó a 2,500 rpm durante seis min, recolectándose el sobrenadante y repitiendo la extracción en el residuo dos veces más. El extracto metanólico obtenido se evaporó a un volumen de 45 ml en un horno de convección, a la temperatura de 50°C. Luego se aforó con metanol a 50 ml. Del extracto concentrado se tomaron alícuotas que variaron entre uno y 10 ml, según el color del frijol, las cuales se evaporaron a sequedad en un horno de convección a 50°C, redisolviéndose en seguida con 1 ml de metanol para proseguir las reacciones indicadas por el método de Hagerman-Butler (8).

La reproducibilidad de ambos métodos fue evaluada mediante el siguiente diseño experimental. Se tomaron tres alícuotas de extracto de una misma muestra para un mismo día, lo que representa tres niveles de concentración de taninos (bajo, intermedio y alto) durante 20 días consecutivos (15). Los resultados obtenidos con ambos métodos se analizaron estadísticamente para seleccionar aquella concentración más reproducible y confiable.

B. Digestibilidad *in vivo* en ratas

Este ensayo biológico se llevó a cabo con ratas de la cepa Wistar de 28 días

de edad, provenientes de la colonia animal del INCAP. Cada grupo incluía ocho ratas (4 machos y 4 hembras), las cuales fueron alojadas en jaulas individuales de tela metálica. Para la distribución de las ratas en cada grupo se utilizó un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 2x3. El agua y el alimento fueron ofrecidos *ad libitum*.

El ensayo de digestibilidad tuvo una duración de 17 días. Al inicio del estudio las ratas tuvieron un período de adaptación de 7 días con una dieta a base de caseína que contenía 10% de proteína suplementada con vitaminas, 4% de minerales, 5% de aceite, 1% de aceite de bacalao y almidón de maíz para ajustar a 100%. Al final de este período se les proporcionó las dietas experimentales. El período de adaptación a la nueva dieta duró 42 horas, siguiéndole un período experimental de ocho días para recolección de heces. Las heces recolectadas se secaron en un horno con aire a 60°C, se pesaron y se molieron en mortero. Los datos sobre el cambio de peso y de la ingesta de alimento fueron recolectados al inicio y al final de este último período.

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

Las dietas experimentales contenían harina de frijoles cocidos deshidratados, con y sin caldo para proveer 10% de proteína, y se suplementaron con 4% de mezcla mineral (16) 5% de aceite de algodón, 1% de aceite de bacalao, almidón de maíz para ajustar a 100%, y 5 ml de mezcla vitamínica completa (17). Se utilizaron como controles caseína y leche descremada al 10% de proteína. A una parte de la dieta de frijol colorado y negro se le agregó 60 mg% de carmín para que sirviera como marcador de las heces; en cambio, se usó únicamente 30 mg de carmín por cada 100 g de dieta para aquellas preparadas con harina de frijol blanco, caseína y leche descremada.

C. *Análisis Estadístico*

Los análisis estadísticos aplicados a los resultados obtenidos en este trabajo fueron los siguientes: medidas de variabilidad: varianza, desviación estándar, coeficiente de variación (7,13, 18); prueba de Bartlett (21) y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (13,17,18) análisis de varianza para clasificación simple de uno y dos vías (7,13); y análisis de correlación y regresión (7,13,18).

RESULTADOS Y DISCUSION

A. *Análisis Químico* *Cuantificación de Polifenoles*

Método de Folin-Denis

En la Tabla 1 se presentan los valores promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de cada una de las alícuotas de los extractos de frijol de los tres colores. Según se observa, el rango del coeficiente de variación para los frijoles blancos es de 8 a 27%; para los frijoles negros, de 7 a 15% y para los colorados, de 5 a 12%. El coeficiente de variación más bajo se obtuvo con 10 ml de extracto de 0.5 g de muestra y 250 ml de agua, lo que indica que a este

TABLA 1

**EFECTO DE LA CANTIDAD DE EXTRACTO SOBRE LA
REPRODUCIBILIDAD DEL METODO DE FOLIN-DENIS PARA
CUANTIFICAR POLIFENOLES TOTALES (EXPRESADOS COMO
ACIDO TANICO) EN FRIJOL**

Color del frijol	Ml de extracto ^a	$\bar{x}^b \pm DE^{c,1}$ mcg/ml	CV ^{d,2} %
Blanco	2.5	9.84 ± 2.68	27
	5.0	10.27 ± 1.38	13
	10.0	10.41 ± 0.86	8
Negro	2.5	23.54 ± 3.51	15
	5.0	24.04 ± 2.16	9
	10.0	22.83 ± 1.58	7
Colorado	2.5	28.90 ± 3.35	12
	5.0	28.43 ± 2.24	8
	10.0	27.67 ± 1.38	5

a 0.5 g de muestra a volumen de 250 ml.

b Promedio.

c Desviación estándar.

d Coeficiente de variación.

1 Promedios iguales (Kruskal-Wallis).

2. Variabilidades diferentes (Bartlet).

nivel el método es más reproducible.

La variabilidad que se encontró dentro de las tres alcuotas para cada uno de los frijoles, puede atribuirse a varios factores como son: aminoácidos, proteínas y xantinas, que reaccionan positivamente con el reactivo de Folin-Denis (14,19) y a la constitución genética del grano, que es intrínseco para cada organismo (20). Price, Van Scoyoc y Butler (21) encontraron gran variabilidad en el contenido de polifenoles de los granos de una misma muestra de sorgo. Estos autores señalan que la variabilidad puede también ser atribuida a las pérdidas irregulares de los componentes del grano durante la molienda, y al contenido de taninos entre granos individuales de la misma especie. Es posible que a menor volumen de extracto, con el mismo peso de muestra, la proporción de componentes inherentes en la semilla, capaces de reaccionar con el reactivo de Folin-Denis, sea mayor que los polifenoles, lo que explicaría la variabilidad encontrada. La evaluación estadística de este método sugiere que se deben tomar 10 ml de extracto obtenido de 0.5 g de muestra para obtener la mejor precisión, o sea mejor reproducibilidad de los resultados. Esta cantidad es 20 veces mayor que la cantidad de extracto recomendado por el método original de la AOAC (14).

Los resultados estadísticos obtenidos por la prueba de Bartlet indicaron

que las varianzas de las tres alícuotas de cada color de frijol no son homogéneas. Sin embargo, los resultados obtenidos por la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis mostró que los centros de distribución de cada nivel en los tres colores son iguales.

Método de Precipitación de Proteína (Hagerman-Butler)

Los promedios, la desviación estándar y los coeficientes de variación para las tres alícuotas del frijol de los tres colores, se exponen en la Tabla 2. Los coeficientes de variación encontrados fueron de 17 a 27% para los frijoles blancos, y de 15 a 16 y 7% para los frijoles negros y colorados, respectivamente. Es importante hacer notar que el coeficiente de variación fue menor para el mayor nivel de concentración en los frijoles blancos, mientras que para los frijoles negros y rojos, fue el mismo en las tres alícuotas. No obstante, tanto los blancos como los negros presentan coeficientes bastante altos. La gran variabilidad entre los niveles de ambos frijoles, blancos y negros, puede ser atribuida a que el grado de polimerización de los compuestos fenólicos, así como la presencia de fenoles de bajo peso molecular afectan el método en diferentes maneras, lo que resulta en estas discrepancias (8). Este método es más preciso para los frijoles colorados, aun cuando debe tenerse en cuenta que dentro de la misma especie no todos los frijoles negros se comportan igual.

TABLA 2

EFEECTO DE LA CANTIDAD DE EXTRACTO SOBRE LA REPRODUCIBILIDAD DEL METODO DE HAGERMAN-BUTLER PARA CUANTIFICAR POLIFENOLES (EXPRESADOS COMO ACIDO TANICO) EN FRIJOL

Color del frijol	Ml de extracto	$\bar{x}^a \pm DE^{b,1}$ mcg/ml	CV ^{c,2} %
Blanco	2.5	5.81 ± 1.55	27
	5.0	5.08 ± 0.93	18
	10.0	4.56 ± 0.77	17
Negro	2.5	28.18 ± 4.65	16
	5.0	29.12 ± 4.39	15
	10.0	28.35 ± 4.40	16
Colorado	0.25	574.70 ± 40.44	
	0.50	566.41 ± 37.30	
	1.00	565.41 ± 40.36	

a Promedio.

b Desviación estándar.

c Coeficiente de variación.

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

2. Variabilidades iguales, excepto frijol blanco (Bartlet).

Los resultados estadísticos del método por la prueba de Bartlett revelaron que la variabilidad en las tres alícuotas de frijoles negros y rojos es igual, no siendo así en el caso de los frijoles blancos. A las alícuotas que se usaron en frijol negro y rojo se les hizo un análisis de varianza, el cual señaló que los centros de distribución de cada alícuota son iguales ($F=0.24$ y 0.59 , $P>0.05$ para frijoles negros y colorados, respectivamente), mientras que a los frijoles blancos se les hizo una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. En este último caso se obtuvo diferentes promedios en las tres alícuotas.

Esto puede atribuirse a que el cloruro férrico usado en este método forma un complejo con los compuestos fenólicos biológicamente activos, cuya coloración violeta depende de la naturaleza del fenol contenido en la muestra y del solvente usado (8). Es posible que las cantidades de polifenoles capaces de precipitar la proteína son tan mínimas que no son detectables por este método, o simplemente existe la posibilidad de que la muestra contenga otros tipos de compuestos fenólicos que no reaccionan con el cloruro férrico pero que sí pueden precipitar la proteína. Con base en estos resultados se concluye que al usar este método se debe emplear 10, 8 y 1 ml de extracto de 8, 4 y 2 g de frijol en 50 ml de metanol para frijoles blancos, negros y rojos, respectivamente.

Relación entre Métodos

Con miras a establecer la relación entre los métodos de Folin-Denis y Hagerman-Butler se efectuó una correlación con los valores obtenidos con la alícuota más alta de concentración de polifenoles.

La Tabla 3 expone las ecuaciones de dichas regresiones, y se puede notar que a pesar de que los métodos están basados en principios diferentes, la correlación con todos los valores de los tres frijoles fue significativa ($r=0.72$, $P < 0.05$, $n=60$), pero ésta aumentó al excluir los frijoles blancos ($r=0.84$, $P < 0.05$, $n=40$). Sin embargo, al separar por color de frijol no hubo diferencia significativa, lo que posiblemente se debió al número de muestras.

Los valores para el frijol colorado usado en este estudio fueron mayores por los dos métodos, que los valores obtenidos en otro estudio (1), en el que se analizaron sólo frijoles colorados.

Cambios en el Contenido de Polifenoles por Almacenamiento

Los polifenoles se encuentran en las plantas como metabolitos secundarios, raramente activos (20). Su habilidad de formar compuestos complejos y de precipitar las proteínas hace que sean importantes desde el punto de vista nutricional.

Price, Van Scoyoc y Butler (21), encontraron que en el sorgo almacenado a temperatura ambiente se produce una disminución en el contenido de polifenoles (determinado por el método de vainillina - HCl), de este grano, debido a que ocurre una oxidación de estos compuestos.

Los resultados obtenidos con harina de frijol crudo se aprecian en la Tabla 4. Tal como se observa, el contenido de polifenoles totales determinado por el método de Folin-Denis, es de 0.52, 1.42 y 1.38 g% para frijoles blancos, negros y colorados, respectivamente. El contenido de polifenoles con actividad biológica (Hagerman-Butler), es de 0.003, 0.035 y 1.41 g%, en el mismo orden,

TABLA 3

**ECUACION DE REGRESION ENTRE EL METODO DE FOLIN-DENIS Y
HAGERMAN-BUTLER**

Ecuación de regresión	r	Significancia	n
(X = método de Folin-Denis; Y = método de Hagerman-Butler)			
<i>Frijoles blancos</i> Y = 6.843 + (-0.219) x	-0.24	NS	20
<i>Frijoles negros</i> Y = 45.551 + (-0.754) x	-0.27	NS	20
<i>Frijoles colorados</i> Y = 391.095 + (-11.768) x	-0.40	NS	20
<i>Todos los frijoles</i> Y = -318.341 + (25.496) x	0.72	S	60
<i>Frijoles negros y colorados</i> Y = -1733.759 + (80.427) x	0.84	S	40

NS = No significativo (P > 0.05).

S = Significativo (P > 0.05).

siendo los frijoles blancos los de menor contenido, seguidos por los negros y rojos. En la misma Tabla los datos revelan los valores obtenidos tres meses más tarde, notándose que hubo un incremento en el contenido de polifenoles determinado por el método de Hagerman-Butler. Esta variación puede que se deba a las condiciones de almacenamiento, a la forma física del grano, o bien a otros factores. Esto es un aspecto que debe ser estudiado con más detalle en el futuro. Los granos utilizados en el estudio que se comenta, estuvieron almacenados a 5°C hasta practicar los análisis químicos y el ensayo biológico.

Efecto del Procesamiento

El procesamiento térmico afecta los niveles relativos de polifenoles en el grano de leguminosas. En la Tabla 5 se detallan los resultados obtenidos con los frijoles cocidos y secados, con caldo y sin caldo. Según se aprecia, con la cocción se redujo el contenido de polifenoles en los tres colores, siendo esta reducción de 35.2, 31.4 y 36.6% para los frijoles colorados, negros y blancos, respectivamente. Al eliminar el caldo de cocción estas pérdidas aumentan a 51.1, 39.8 y 49.9%. En esta misma Tabla también puede observarse que la reducción de los polifenoles biológicamente activos, por los tratamientos térmicos, fue mayor en los frijoles colorados (93.5 y 95.7%), siguiéndole los negros (56.8 y 66.2%) y los blancos (25.0 y 33.3%), en las harinas deshidratadas con y sin caldo, respectivamente.

Cabe destacar que en las tres harinas el contenido de polifenoles totales

TABLA 4
CAMBIOS DE POLIFENOLES EN FRIJOL CRUDO DURANTE
EL ALMACENAMIENTO A 5°C, EXPRESADOS COMO
ACIDO TANICO (g %)

<i>Método Folin-Denis</i>		
Frijol	1° marzo $\bar{x} \pm DE^{**}$	2 junio $\bar{x} \pm DE^{**}$
Colorado	1.38 ± 0.07	1.42 ± 0.05
Negro	1.42 ± 0.08	1.26 ± 0.02
Blanco	0.52 ± 0.04	0.53 ± 0.02

<i>Método Hagerman-Butler*</i>		
	3 marzo $\bar{x} \pm DE^{**}$	4 junio $\bar{x} \pm DE^{**}$
Colorado	1.413 ± 0.104	1.771 ± 0.038
Negro	0.035 ± 0.006	0.074 ± 0.003
Blanco	0.003 ± 0.001	0.012 ± 0.001

* Promedio.

** Desviación estándar.

y la actividad biológica de los mismos, varía con la coloración de la cáscara del grano. Elías, Fernández y Bressani (22) encontraron que la coloración de la testa del grano es la principal fuente de compuestos polifenólicos. Los datos de la Tabla 5 indican que parte de los polifenoles se solubilizan en el caldo de cocción, lo cual está documentado (23-26). También es posible que parte de las reducciones observadas pueda deberse a que estos compuestos orgánicos formen compuestos secundarios al reaccionar con proteínas, carbohidratos y otras sustancias (29), dando origen a lo que según, Bressani y Elías (25) se podría considerar como taninos ligados.

Es factible decir que de los métodos evaluados, el de Folin-Denis presentó la mayor reproducibilidad para todos los frijoles, aunque este método tiene la desventaja de que el reactivo de Folin-Denis puede reaccionar con cualquier sustancia que tenga un grupo fenólico. Por otro lado, el método de precipitación de proteína de Hagerman-Butler es un ensayo conveniente y reproducible, que puede suplir información de la actividad biológica de los taninos que contienen los alimentos, información que no puede obtenerse a través de ensayos químicos. Sin embargo, el grado de polimerización de los compuestos polifenólicos y los de bajo peso molecular probablemente afecten el método de diferentes maneras. La determinación de polifenoles en los materiales utilizados en este trabajo con el método de precipitación de la proteína de Hagerman-Butler tuvo una mejor reproducibilidad para los frijoles colorados, no siendo así en el caso de los blancos.

TABLA 5

**CAMBIOS DE COMPUESTOS POLIFENOLICOS EN FRIJOLES CRUDOS
Y COCIDOS Y SECADOS CON CALDO Y SIN CALDO
(Gramos de ácido tánico por 100 g)**

Frijol	Color de frijol		
	Colorado	Negro	Blanco
	(Folin-Denis)*		
Crudo	1.42	1.26	0.53
Cocido con caldo	0.92	0.87	0.33
% de reducción	35.2	31.4	36.6
Cocido sin caldo	0.69	0.76	0.26
% de reducción	51.1	39.8	49.9
	(Hagerman-Butler)*		
Crudo	1.18	0.074	0.012
Cocido con caldo	0.076	0.032	0.009
% de reducción	93.5	56.8	25.0
Cocido sin caldo	0.051	0.025	0.008
% de reducción	95.7	66.2	33.3

* Gramos de ácido tánico por 100 g.

B. Digestibilidad de la Proteína del Frijol

1. Digestibilidad en ratas

El contenido de proteína cruda de las harinas del frijol cocido varió desde 24.21% para el frijol negro cocido y secado con caldo, hasta 27.26% para frijoles blancos cocidos y secados sin caldo.

Los datos de ingesta de proteína y excreción fecal de nitrógeno, así como los porcentajes de digestibilidad aparente de los frijoles cocidos y secados con caldo y sin caldo, se presentan en la Tabla 6. Como lo revelan los datos, en los frijoles cocidos y secados con caldo, la ingesta de nitrógeno fue de 1.53 para los frijoles blancos y de 1.34, tanto para los frijoles negros como para los colorados. En cambio, con los frijoles cocidos y secados sin caldo, la ingesta de nitrógeno fue mayor (1.54) para los frijoles rojos, siguiéndoles los blancos (1.26) y los negros (1.12). En general, la ingesta promedio de nitrógeno fue mayor en el caso de los frijoles con caldo que en los sin caldo, hecho que se reflejó también en la excreción de nitrógeno que fue de 0.44 y 0.38 g/7 días para los frijoles con caldo y sin caldo, respectivamente.

El porcentaje de digestibilidad aparente (D.A.) para los frijoles con caldo fue de 73.2 ± 3.63 , 69.6 ± 4.96 y 64.5 ± 9.05 para los frijoles blancos, colorados y negros, respectivamente. Para los frijoles, la digestibilidad fue de $71.9 \pm$

TABLA 6

**INGESTA Y EXCRECION DE NITROGENO, Y PORCENTAJE
DE DIGESTIBILIDAD APARENTE**

Material	Ingesta de N g/7 días $\bar{x} \pm DE^*$	Excreción de N g/7 días $\bar{x} \pm DE^*$	DA** % $\bar{x} \pm DE^*$
Caseína	2.08 ± 0.32	0.16 ± 0.03	92.4 ± 1.95
Leche descremada	2.00 ± 0.26	0.27 ± 0.05	86.3 ± 1.47
Frijol con caldo:			
blanco	1.53 ± 0.56	0.41 ± 0.15	73.2 ± 3.63
colorado	1.34 ± 0.30	0.41 ± 0.10	69.6 ± 4.96
negro	1.34 ± 0.49	0.49 ± 0.23	64.5 ± 9.05
Frijol sin caldo:			
blanco	1.26 ± 0.56	0.36 ± 0.18	71.9 ± 3.28
colorado	1.54 ± 0.55	0.43 ± 0.16	71.9 ± 2.78
negro	1.12 ± 0.37	0.34 ± 0.10	68.8 ± 4.81

* Promedio ± desviación estándar.

** Digestibilidad aparente.

3.28, 71.9 ± 2.78 y 68.8 ± 4.81, en el mismo orden, siendo los frijoles blancos de mayor digestibilidad que los colorados, y éstos de mejor digestibilidad que los negros. A la caseína le correspondió una digestibilidad de 92.43 ± 1.95 y a la leche descremada, de 86.34 ± 1.47, datos éstos que confirman resultados previos (1,5,22). El análisis de varianza de dos vías señaló que el promedio de digestibilidad de los frijoles blancos con caldo es diferente al de los negros y colorados, y el promedio de los frijoles negros sin caldo es diferente al de los blancos y colorados. Este análisis indicó también que no hay diferencia significativa entre los frijoles con caldo y sin caldo.

Con el fin de establecer el efecto del color del frijol y el efecto del caldo de cocción sobre la digestibilidad de su proteína *in vivo*, se hizo un análisis de varianza de dos vías (7,13). El análisis señaló una interacción estadísticamente significativa ($F = 10.55$, $P < 0.05$) entre tratamiento (con caldo y sin caldo y color de frijol), lo que significa que el efecto del tratamiento depende del color del frijol. Para investigar el tipo de dependencia se hicieron comparaciones de contraste utilizando el método de Scheffé (13). Los resultados de estas comparaciones revelaron que no había diferencias estadísticamente significativas en digestibilidad *in vivo* entre los frijoles con caldo y sin caldo. No obstante, el frijol blanco con caldo acusó una digestibilidad superior ($P < 0.05$) al frijol negro con caldo. Todas las otras comparaciones no fueron estadísticamente significativas ($P > 0.05$). El hallazgo de no haber diferencias en la digestibilidad *in vivo* entre los frijoles con caldo y sin caldo es controversial a lo encontrado en la literatura (2, 4, 5, 22, 25). Este hecho podría explicarse en función del

tamaño de la muestra ($n = 8$ ratas por celda) utilizada en el presente estudio, ya que con este tamaño de muestra y la variabilidad encontrada ($x_2 = 18.92$), el procedimiento de Scheffé sólo podría detectar diferencias de -14.93% al comparar simultáneamente los tres colores, y diferencias de -8.59% comparados con cualesquiera dos colores.

Bressani y Elías (28) han concluido que la digestibilidad de las leguminosas depende por lo menos de cuatro factores: factores antifisiológicos, tratamiento térmico, compuestos inherentes en las semillas, y cambios físico-químicos durante el almacenamiento.

En las leguminosas crudas, la baja digestibilidad de algunas especies es causada por factores antinutricionales como los inhibidores de tripsina de amilosa y las hemaglutininas. Se ha señalado que el tratamiento térmico a que se someten las leguminosas tiene un doble efecto: por una parte disminuye y elimina la actividad de algunos factores antifisiológicos, mientras que por la otra, aumenta la disponibilidad de aminoácidos azufrados presentes en altas concentraciones en los inhibidores de tripsina. No obstante, debe tenerse en cuenta que el tratamiento excesivo puede disminuir la disponibilidad de ciertos aminoácidos, en particular la lisina (6, 25). La destrucción de la estructura terciaria de ciertas proteínas resistentes a la proteólisis enzimática, así como la ruptura de paredes celulares, pueden originar un aumento en la digestibilidad. El minimizar, controlar o destruir el efecto de ciertas sustancias, capaces de formar complejos, particularmente con las proteínas, tendrá como efecto un incremento adicional en la digestibilidad (6, 25).

En la cocción del frijol, parte de los compuestos polifenólicos del grano se solubilizan en el caldo de cocción. Los compuestos polifenólicos en el frijol común han sido considerados como uno de los factores antifisiológicos termorresistentes (28) que disminuyen la digestibilidad de su proteína. En la

TABLA 7

CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES Y PORCENTAJE DE DIGESTIBILIDAD APARENTE EN DIETAS UTILIZADAS EN EL ENSAYO CON RATAS

Frijol	Color	Polifenoles totales	DA**
		(Folin-Denis) g%* $\bar{x} \pm DE$	% $\bar{x} \pm DE$
Con caldo	Negro	0.357 \pm 0.02	64.51 \pm 3.05
	Colorado	0.348 \pm 0.01	69.56 \pm 4.58
	Blanco	0.125 \pm 0.01	73.21 \pm 3.83
Sin caldo	Negro	0.304 \pm 0.01	68.83 \pm 4.81
	Colorado	0.257 \pm 0.01	71.96 \pm 3.78
	Blanco	0.098 \pm 0.01	71.97 \pm 3.26

* Promedio \pm desviación estándar.

** Digestibilidad aparente.

Tabla 7 se dan a conocer el contenido de polifenoles totales, determinados por el método de Folin-Denis, y la digestibilidad aparente de las dietas utilizadas en el ensayo con ratas. Según se observa, tanto en los frijoles con caldo como en los frijoles sin caldo, el porcentaje de D.A. es inversamente proporcional al contenido de los polifenoles totales.

Con el fin de establecer la relación entre el contenido de polifenoles totales (Folin-Denis) y la digestibilidad en ratas, se efectuó una correlación entre este indicador químico y la digestibilidad aparente de las dietas de frijol con caldo y sin caldo, y se encontró una correlación negativa significativa ($r = -0.39$, $P < 0.05$, $n = 48$) ($y = 75.30 + (-21.29x)$), lo que confirma datos de otros investigadores (4, 5, 10, 25, 27-29). La variabilidad de la línea de regresión, sin embargo, es de 15%, lo que indica que a pesar de que hay una correlación significativa, no son los polifenoles los únicos que afectan la digestibilidad, sino que posiblemente existen otros factores que influyen en ella.

SUMMARY

EVALUATION OF TWO METHODS TO DETERMINE POLYPHENOL CONTENT OF RAW AND COOKED BEANS (*PHASEOLUS VULGARIS*) AND EFFECT OF THESE ON PROTEIN DIGESTIBILITY

The polyphenolic compounds present in raw and cooked, and dried, with and without the cooking broth of common white, black and red beans (*Phaseolus vulgaris*) were measured by the Folin-Denis method for total polyphenols, and by the protein precipitation method of Hagerman-Butler, which measures their biological activity.

The polyphenol content was measured during 20 consecutive days on the same sample, using three different extracts of volume from each sample.

Statistical analysis of the results by the Folin-Denis method indicated that variability among the three aliquots was different for each bean color. A non-parametric analysis, however, indicated that the average in the three levels of concentration for beans of all colors, was the same. A similar analysis of the results by the Hagerman-Butler method demonstrated that variability and average values for the three aliquots were equal for black and red beans but not for white beans. The coefficient of variation was lower for the higher aliquot of the extract.

A significant correlation ($r = 0.72$, $P < 0.05$, $n = 60$) was found between the two methods for all beans using the larger aliquot of the extract. The correlation was highly significant ($r = 0.84$, $P < 0.05$) when white bean values were eliminated.

The polyphenolic content varied with seed color and the thermic process reduced their content, as measured by the two methods. The losses in polyphenolics as measured by the Folin-Denis in the cooked beans dried with broth, varied from 31.4 to 36.3%, and from 39.8 to 51.1% for the cooked bean flour dried without broth. The losses by the Hagerman-Butler method were from 25.0 to 93.5% in the cooked bean flours dried with cooking broth, and from 33.3 to 95.7% when dried without the broth. The higher losses were recorded for red beans.

In vivo digestibility for cooked bean flours, dried and without broth, were 73.2, 69.6 and 64.5%, and 71.9, 71.9 and 68.8% for white, red and black beans, respectively.

A negative correlation ($r = -0.39$) and significant ($p < 0.05$) was found between polyphenolic content in the diet and *in vivo* protein digestibility.

BIBLIOGRAFIA

1. Bressani, R., L.G. Elías, A. Wolzak, A.E. Hagerman & L.G. Butler. Tannin in common beans: Methods of analysis and effects on protein quality. *J. Food Sci.*, **48** (3): 1000-1001, 1003, 1983.
2. Jaffe, W.G. Protein digestibility and trypsin inhibitor activity of legume seed. *Proc. Soc. Expert. Biol. Med.*, **75**: 219-220, 1950.
3. Kakade, M.L. Biochemical basis for the differences in plant protein utilization. *J. Agric. Food Chem.*, **22** (4): 550-555, 1974.
4. Aw, T.L. & B.G. Swanson. Influence of tannin on *Phaseolus vulgaris*. Protein digestibility and quality. *J. Food Sci.*, **50** (1): 67-71, 1985.
5. Bressani, R., L.G. Elías & J.E. Braham. Reduction of digestibility of legume proteins by tannins. *J. Plant Food*, **4**: 43-55, 1982.
6. Bressani, R. Research needs to up-grade the nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris*). *Qual. Plant. Plant Foods Hum. Nutr.*, **32**: 101-110, 1983.
7. Dharam, H. **Total Quality Control in the Clinical Laboratory**. St. Louis, Mo., The C.V. Mosby Company, 1977, 23 p.
8. Hagerman, A.E. & L.G. Butler. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *J. Agric. Food Chem.*, **26** (4): 809-812, 1978.
9. Griffiths, D.W. The polyphenolic content and enzyme inhibitory activity of testas from bean (*Vicia faba*) and Pea (*Pisum spp*) varieties. *J. Sci. Food Agric.*, **32**: 797-804, 1981.
10. Singh, V. The inhibition of digestive enzymes by polyphenols of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Mill, sp.) *Nutr. Rep. Internat.*, **24**(3):745-753, 1984.
11. Steel, R.G. & J.H. Torrie. **Principles and Procedures of Statistics**. A Biometric Approach. 2nded. New York, N.Y., McGraw Hill, Inc., 1960, p. 471-472.
12. Wolzak, A., R. Bressani & R. Gómez-Brenes. A comparison of *in vivo* and *in vitro* estimates of protein digestibility of native and thermally processed vegetable protein. *Qual. Plant. Plant Food Hum. Nutr.*, **31**: 31-43, 1981.
13. Ott, L. **An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis**. North Scituate, Massachusetts, Duxbury Press, 1977, 730 p.
14. Association of Official Agricultural Chemists. **Official Methods of Analysis of the AOAC**. 12 th ed. Washington, D.C., The Association, 1975.
15. Barnett, R.N. & W.J. Youden. A revised scheme for the comparison of quantitative methods. *Am. J. Clin. Pathol.*, **54**: 454-462, 1970.
16. Hegsted, D.M., R.C. Mills, C.A. Elvehjem & E.B. Hart. Choline in the nutrition of chicks. *J. Biol. Chem.*, **138**: 459-466, 1941.
17. Manna, L. & S.M. Hauge. A possible relationship of vitamin B₁₃ to orotic acid. *J. Biol. Chem.*, **202**: 91-96, 1953.
18. Downie, N.M. & R.W. Heath. **Métodos Estadísticos Aplicados**. México, Haria, S.A., 1971, p. 293-294.
19. Haslam, E. Polyphenol-protein interactions. *Biochem. J.*, **139**: 285-288, 1974.
20. McLeod, M.M. Plant tannins. Their role in forage quality. *Nutr. Abstr. Revs.*, **44** (11): 804-815, 1974.
21. Price, M.L., S. Van Scoyoc & L.G. Butler. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food. Chem.*, **26** (5):1214-1218, 1978.
22. Elías, L.G., D.G. de Fernández & R. Bressani. Possible effects of seed coat polyphenolics on the nutritional quality of bean protein. *J. Food Sci.*, **44** (2): 524-527, 1979.
23. Undayasekhara Rao, P. & Y.G. Deosthale. Tannin content of pulses: Varietal differ-

- ences and effects of germination and cooking *J. Sci. Food Agric.*, **33**: 1013-1016, 1982.
24. Bressani, R., L.G. Elías & M. Molina. Estudios sobre la digestibilidad de la proteína de varias especies leguminosas. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, **27** (2): 215-231, 1977.
 25. Bressani, R. & L.G. Elías. The nutritional role of polyphenols in beans. In: **Polyphenols in Cereals and Legumes**. Proceedings of a Symposium held during the 36 Annual Meeting of the I.F.T., St. Louis, Mo. June 10-13, 1979. J.H. Hulse. (Ed.) Ottawa, Canada, IDRC, 1980, p. 61-68.
 26. Reddy, N.R., M.D. Pierson, S.K. Sathe & D.K. Salunkhe. Dry bean tannins: A review of nutritional implications *JAACS*, **62** (3): 541-549, 1985.