

Toxicidad y especificidad de diferentes fitohemaglutininas de frijoles.

(*Phaseolus vulgaris*)¹

WERNER G. JAFFÉ² Y OLLIE BRÜCHER³

RESUMEN

Con el uso de glóbulos rojos de diferentes animales se logra distinguir 4 tipos de actividad hemaglutinante en los extractos de diferentes variedades de frijoles: aquellos que aglutinan eritrocitos de conejos y eritrocitos tripsinizados de vaca llamados tipo A, los que aglutinan solo glóbulos de conejos, llamados tipo B, los que aglutinan solo glóbulos tripsinizados de vaca, llamados tipo C y los que no actúan sobre ninguno de los dos glóbulos, llamados tipo D. Los cuatro tipos pueden ser detectados con sangre de hamster tratada con pronasa. Los extractos tipo A y C son tóxicos al ser inyectados en ratones.

Al calentar extractos de frijoles se observa que la actividad hemaglutinante frente a eritrocitos de conejos desaparece más rápido que la observada con glóbulos rojos de vaca activados por tratamiento con tripsina y que esta última actividad como también la acción tóxica puede ser observada después de un calentamiento a 85°C por 2 horas.

Cuatro grupos de ratas se alimentaron con dietas preparadas con cada uno de los cuatro tipos de frijoles crudos y molidos y caseína digerida (Casitona). Los animales que recibieron frijoles de los tipos A y C perdieron peso y se murieron, mientras que aquellos que consumieron las dietas preparadas con frijoles de los tipos B y D, respectivamente, no exhibían signos de intoxicación. En las heces de todas estas ratas se pudo detectar la presencia de hemaglutininas de la cual se concluye que la diferencia en toxicidad no es debida a una diferencia a la resistencia en la digestión.

1. Presentado ante la 2ª Reunión Científica de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición (SLAN), Viña del Mar, Chile, Diciembre 1970.

2. División de Investigaciones, Instituto Nacional de Nutrición, Caracas.

3. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, (fallecida).

Recibido: 20-9-1971.

Se observó que ratas alimentadas con frijoles que se habían molido y cocinado en agua o en bicarbonato de sodio a 85°C por 2 horas no crecen bien y extractos de sus heces poseen actividad hemaglutinante, indicando que las hemaglutininas tóxicas no son destruidas totalmente en estas condiciones.

La existencia de factores tóxicos en frijoles crudos y su posible relación con las hemaglutininas de estas semillas ha sido objeto de numerosas publicaciones (1, 2). Aunque la mayoría de los investigadores sostienen que las hemaglutininas de estas leguminosas tienen una acción tóxica en animales experimentales (3, 4), se han publicado observaciones que permiten una interpretación diferente. Por fraccionamiento por cromatografía (5) se obtienen preparaciones que no llevan relación directa entre el poder hemaglutinante y tóxico, lo que podría significar que ambas actividades se deben a factores diferentes. También se han descrito ensayos comparativos de toxicidad de extractos de semillas de leguminosas en el curso de los cuales se observó que una variedad de frijol mostraba un considerable poder hemaglutinante sin exhibir acción tóxica (6).

En un trabajo recientemente publicado hemos demostrado que existen 4 diferentes tipos de hemaglutininas en frijoles y que las pruebas de laboratorio utilizadas hasta ahora no permitían distinguir entre ellos (7). En el presente trabajo se estudia la existencia de hemaglutininas tóxicas y no tóxicas en frijoles y se desarrollan métodos para distinguirlos. Además, se han efectuado ensayos sobre la destrucción por calor de las hemaglutininas tóxicas.

MATERIAL Y METODOS

Parte de las semillas usadas fueron producidas en un campo experimental del Centro de Biología Experimental de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela en condiciones que permitían conservar su pureza genética. Para la preparación de los extractos y de las dietas experimentales, los diversos lotes adquiridos en el mercado local, fueron molidos en un molino Wiley de laboratorio. Los extractos se prepararon mezclando las semillas molidas con solución de NaCl al 1% en la proporción de 1:5 ó 1:10 durante 2 horas a temperatura ambiente y centrifugación subsiguiente.

Para la determinación del poder hemaglutinante de los extractos se utilizó un equipo "Micro-Titer" (Cole Eng. Comp. Alexander, Virginia, USA). Los eritrocitos de las diferentes especies de animales usados se prepararon de sangre obtenida con citrato como anticoagulante y se sometieron a tres lavados con solución de NaCl al 0.85%. Los glóbulos provenientes de la sangre de vaca se sometieron a la digestión por 30 minutos a 25° con tripsina cristalizada en la proporción de 0.1 mg/10 ml de suspensión de glóbulos al 10%, centrifugación y doble lavado con suero fisiológico. Este tratamiento es necesario para sensibilizar este tipo de eritrocitos a la aglutinación por extracto de frijol (8). Los glóbulos de sangre de hamster se trataron durante 1 hora con una solución de pronasa (Calbiochem) de 0.1 mg/10 ml y subsiguiente doble lavado con suero fisiológico.

Para los ensayos de la toxicidad parenteral se utilizaron ratones machos de 18-22 g de peso a los cuales se aplicó una inyección intraperitoneal del extracto en estudio, calculando la cantidad de manera que por 20 g de peso del animal se inyectó 1 ml de un extracto preparado como se describe anteriormente. Se controló la mortalidad dentro de las próximas 48 horas, porque el número de animales muertos posteriormente era mínimo y no existía la seguridad de que habían sucumbido a causa de la acción del extracto respectivo.

La toxicidad oral se estudió en ratas blancas descendientes de la raza "Sprague Dawley" de 28-30 días de edad, mantenidas en jaulas individuales con fondo de tela metálica. Las dietas usadas en los experimentos de la Tabla 3 tenían la siguiente composición: frijoles molidos 400 g, DL-metionina 3 g, Bacto-Casitone 100 g¹, aceite de maíz 5 g, aceite de hígado de bacalao 1 g, mezcla de vitaminas (9) 1 g, mezcla de sales USP XVI 40 g, almidón cantidad suficiente para 1000 g. En los experimentos de la Tabla 5 la casitona fue reemplazada por almidón. Los frijoles usados para las dietas de la Tabla 5 se prepararon por cocción a fuego directo por 3 horas después de remojarlos en agua durante la noche o con frijoles molidos y cocidos por 2 horas a 85°C en agua o en una solución de bicarbonato de sodio al 0.1% sin remojo previo. Al terminar la cocción se secaron por corriente de aire, se molie-

1. Caseína digerida por tripsina, Difco Lab., Detroit 1. Mich. U. S. A.

ron y se prepararon las dietas correspondientes. Para cada serie se usaron 6 animales, 3 de cada sexo, provenientes de por lo menos, tres diferentes camadas. Comida y agua se ofrecieron ad libitum. Se registró el consumo de dieta y se recolectaron las heces dos veces por semana.

Para medir la absorción intestinal de nitrógeno se calculó la ingesta y la excreción fecal estimados por el análisis de las cantidades ingeridas y excretadas usando el método de microkjeldahl. Además, se preparó un extracto con solución de cloruro de sodio al 0.85% de las heces molidas de cada animal el cual sirvió para efectuar la prueba de hemaglutinación con las tres preparaciones de glóbulos rojos descritos.

Los animales del último experimento (Tabla 5) se sacrificaron para extirpar y pesar los bazos y páncreas.

El fraccionamiento de las hemaglutininas se efectuó a partir del extracto acuoso de un cultivar comercial de frijoles negros "Cubagua" el cual primero se sometió a la precipitación fraccionada con sulfato de amonio. La fracción que precipita entre las concentraciones de 50% y 75% de saturación con esta sal se pesó por una columna de DEAE-celulosa, aplicando un gradiente de pH entre 5 y 8.8 y obteniéndose 5 fracciones.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se presentan los datos comparativos correspondientes a la capacidad de extractos crudos de 22 diferentes cultivares de frijoles para aglutinar glóbulos rojos de conejos y los conejos tripsinizados de vacas y la mortalidad de ratones inyectados con estos extractos por vía intraperitoneal. Las diferentes variedades de semillas se agrupan en 4 tipos según su capacidad hemaglutinante, a saber, los que aglutinan ambos tipos de células sanguíneas (tipo A), los que actúan sobre sangre de conejo mucho más fuertemente que sobre sangre de vaca tratada con tripsina (tipo B), los que aglutinan únicamente sangre de vaca tratada con tripsina (tipo C) y aquellos que no producen aglutinación con ninguna de las dos preparaciones de sangre (tipo D). Solamente aquellos extractos que aglutinan glóbulos de conejos también son activos frente a glóbulos sanguíneos humanos y

de cochinos. Utilizando glóbulos de hamster tratados con pronasa se pudo detectar una fuerte actividad hemaglutinante en los extractos de todos los tipos de frijoles inclusive los de tipo D (Tabla 2).

TABLA 1

COMPARACION DE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE ESPECIFICA Y LA TOXICIDAD INTRAPERITONEAL EN RATONES DE EXTRACTOS DE DIFERENTES VARIETADES Y CULTIVARES DE FRIJOLES

V a r i e d a d	Sangre conejo	sangre vaca tripsinizada	Toxicidad ^{1/} No. de ratones inyec. No. de ratones muertos	Tipo: ^{2/}
Balin de Albenga	+	+	5/4	A
Mérida	+	+	9/9	A
Negro Nicos.	+	+	5/4	A
Saxa	+	+	5/5	A
No. 755	+	+	5/5	A
No. 756	+	+	5/5	A
Peruvita	+	-	5/0	B
Palleros	+	-	6/0	B
Juli	+	-	5/0	B
Cubagua A	+	-	5/0	B
Porillo	-	+	5/5	C
Negra No. 584	-	+	5/3	C
Vainica Saavegra	-	+	10/6	C
Rabuda	-	*	5/5	C
Hallado	-	-	5/0	D
Madrileño	-	-	5/0	D
Alabaster	-	-	5/0	D
Tríguito	-	-	6/0	D
Mountaineer Half Runner	-	-	8/0	D
Great Northern 1044	-	-	5/0	D

¹ Se inyectaron 1 ml/20 g de peso de ratón de un extracto de semillas molidas 1:5.

² Clasificación de las variedades de frijoles según la especificidad hemaglutinante, véase texto.

TABLA 2
ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE DIFERENTES TIPOS DE
FRIJOL SOBRE ERITROCITOS DE DIVERSO ORIGEN

Tipo de sangre	Variedad de frijol			
	Saxa (A)	Cubagua (B)	Porillo (C)	Mountaineer Half Runner (C)
Conejo	8	9	0	0
Vaca (tripsinizada)	12	2	12	1
Humano AB	6	6	0	0
Cochino	11	9	0	0
Hamster (tratado con pronasa)	12	11	12	10

Se indica en cada caso la mayor dilución de un extracto de una parte de semillas molidas con 10 partes de solución de cloruro de sodio que produce todavía aglutinación visible en 1 hora.

En los extractos de las variedades que aglutinan los eritrocitos tripsinizados de vaca (tipo A y C), se notó un efecto tóxico sobre los ratones. De un total de 59 animales inyectados con estos extractos, fallecieron 51, mientras que de 55 ratones inyectados con extractos de frijoles de los tipos B o D no hubo ninguna muerte en las condiciones experimentales usadas (Tabla 1).

En la Gráfica 1 se presentan los resultados obtenidos con una fracción proteica del extracto de un cultivar comercial de frijoles negros variedad "Cubagua". El extracto crudo de las semillas se sometió primero a un fraccionamiento con sulfato de amonio. El material que precipita entre 0.5 y 0.7 saturación fue sometido a diálisis y luego a cromatografía en una columna de DEAE-celulosa. Una de las fracciones que fue eluída a pH 7.9 tenía la actividad correspondiente al tipo A y era tóxica y otra fracción eluída a pH 5.65 actuó solamente sobre eritrocitos de conejos (B-actividad) y no era tóxica. Al investigar 100 semillas individuales de la variedad comercial utilizada en este experimento, se encontró que 24 semillas eran del tipo A y 76 del tipo B, tratándose, por lo tanto de una muestra mixta de los dos tipos.

El segundo experimento tenía por finalidad explorar la destrucción por el calor de la acción parenteral de extractos crudos de frijoles. Las semillas molidas se extrajeron como en los casos anteriores con solución de cloruro de sodio al 0.85% y sin filtrar se calentaron en baño de maría a 85°C por 2 horas, luego se centrifugaron y se utilizó el sobrenadante para la determinación del poder hemaglutinante y de la toxicidad. Se nota de los datos de la Tabla 3, que la actividad hemaglutinante frente a glóbulos de conejos se pierde más fácilmente que la actividad sobre glóbulos tripsinizados de vaca y que la toxicidad de los extractos resiste este calentamiento de manera notable.

El efecto de la ingesta oral de los cuatro tipos de frijoles se estudió en ratas en un experimento cuyo resultado se presenta en la Tabla 4. Se pueden notar los efectos de toxicidad en las dietas preparadas con frijoles de los tipos A y C los que también resultaron más tóxicos si los extractos correspondientes fueron aplicados por la vía intraperitoneal (Tabla 1). Las otras dietas preparadas con semillas molidas de frijoles de los grupos B y D causaron un crecimiento que se puede considerar normal en las condiciones experimentales. Se ensayó el poder hemaglutinante de las heces de cada una de las ratas de este experimento. Mientras que no se encontró ninguna actividad en las heces de los animales que habían sido alimentados con dietas preparadas con frijoles autoclaveados se detectó dicha actividad en la excreción fecal de todos los animales que comieron frijoles crudos. Para el ensayo de heces de aquellas ratas que recibieron frijoles del tipo D se usaron glóbulos rojos de hamster tratados con pronasa.

En la Tabla 5 se informa de los resultados del experimento sobre la detoxificación de frijoles por cocción de las semillas enteras o por calentamiento de semillas previamente molidas. Mientras que en el primer caso se observa un crecimiento normal de las ratas alimentadas con frijoles cocidos y peso de páncreas y bazo normal, los animales que consumieron la dieta preparada con frijoles crudos perdieron peso, el peso del páncreas era elevado y el bazo era anormalmente bajo.

Cuando la dieta se había preparado con frijoles molidos y posteriormente cocinados a 85°C con o sin bicarbonato de sodio, los resultados eran intermedios, porque los animales alimentados con las dietas respectivas crecieron mucho menos

que los controles que consumieron la dieta de frijoles cocidos en la manera tradicional. Los otros parámetros estudiados eran similares a los valores normales de los controles. El peso del páncreas de estos animales era más alto que en los controles pero la diferencia no era estadísticamente significativa. Se pudo detectar actividad hemaglutinante en extractos de los frijoles crudos y cocidos a 85°C con y sin bicarbonato como también en extractos de heces de las ratas que habían consumido las dietas preparadas con este material.

La adición de bicarbonato de sodio al agua usada para la cocción de frijoles es una costumbre popular, porque presumiblemente reduce el tiempo de cocción. En el presente trabajo, sin embargo, no se encontró influencia sobre la destrucción de la actividad hemaglutinante y tóxica.

DISCUSION

Ya en ocasiones anteriores hemos señalado que existen fitohemaglutininas muy tóxicas y otras de poca o ninguna toxicidad y que no es lícito relacionar ambas actividades sin un estudio detallado en cada caso (10). Los resultados del presente trabajo confirman la existencia de dos tipos de fitohemaglutininas en frijoles que no se detectan con los métodos tradicionales, es decir la prueba hemaglutinante con sangre de conejo o sangre humana, sino que se deben investigar utilizando glóbulos de vaca tripsinizados o de hamster tratados con pronasa y que hemos descrito recientemente (7). Según los datos presentados en las Tablas 1 y 4 es evidente que los tipos de fitohemaglutininas que hemos llamado A y C y que se distinguen por su fuerte acción aglutinante sobre glóbulos tripsinizados de vaca, están relacionados con la toxicidad de los frijoles. Esta conclusión queda apoyada con el resultado del ensayo presentando en la Fig. 1 que también demuestra que solamente la fracción hemaglutinante con acción sobre glóbulos tripsinizados de vaca exhibe un efecto tóxico bajo las condiciones experimentales usadas. Estos resultados demuestran que es indispensable utilizar glóbulos sanguíneos de vaca activados con tripsina para la investigación de las hemaglutininas tóxicas de frijoles.

En algunos de los ensayos sobre la toxicidad oral hemos usado, como en ocasiones anteriores (11), dietas preparadas

con frijoles crudos, molidos y caseína predigerida (Casitone) con el fin de eliminar, en lo posible, los efectos de inhibidores tripticos que pueden existir en los frijoles crudos y cuya actividad podría oscurecer el efecto de las hemaglutininas. Su acción queda neutralizada por el suministro de una fuente de proteínas que no requiere la acción proteolítica para su utilización fisiológica. El efecto de hemaglutininas tóxicas ingeridas oralmente consiste en un trastorno de la absorción intestinal (4) y puede confundirse con el de inhibidores de enzimas digestivas si no se usa un diseño experimental como el presente. Por lo tanto, los resultados presentados en la Tabla 4 no comprueban que los cultivares de frijoles "Peruvita" y "Mountaineer Half Runner", los cuales en estas condiciones producen un crecimiento satisfactorio en las ratas, estén completamente libres de factores antinutricionales (inhibidores enzimáticos).

Los síntomas de toxicidad observados consistieron en pérdida de peso o crecimiento reducido, absorción intestinal de nitrógeno baja, peso bajo del bazo y peso alto del páncreas. Estos mismos síntomas ya se habían observado en un trabajo anterior (11).

La observación de que los extractos de heces de ratas alimentadas con frijoles crudos tienen actividad hemaglutinante comprueba que los cuatro tipos de aglutininas resisten la acción digestiva del tracto gastro-intestinal y debe interpretarse en el sentido de que la diferencia en la toxicidad no puede ser explicada por diferencias de estabilidad frente a la digestión. Más bien se debe probablemente a diferencias en sus capacidades de reaccionar con grupos receptores de las células epiteliales intestinales (4).

Los resultados de las Tablas 3 y 5 sobre la termoresistencia de las hemaglutininas y del efecto tóxico tienen importancia práctica porque se ha propuesto la aplicación de mezclas de frijoles y cereales molidos para programas de alimentación materno-infantil (12). Es probable que la cocción casera de frijoles previamente molidos en recipientes de barro y sobre fuego abierto no logre mantener una temperatura suficientemente elevada para garantizar la destrucción completa de las hemaglutininas tóxicas, tanto más cuanto que es mucho más difícil apreciar si la cocción fue completa en una mezcla de semillas molidas, que en frijoles enteros. Esta posibilidad se

TABLA 3

ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE Y TOXICA DE EXTRACTOS DE FRIJOLES
CRUDOS Y CALENTADOS

Variedad de frijol	T i p o	Extracto crudo			Extracto calentado		
		Hemaglutinación		Mortalidad	Hemaglutinación		Mortalidad
		sangre conejo	sangre vaca tripsinizada	ratones muertos/ ratones inyec.	sangre conejo	sangre vaca tripsinizada	ratones muertos/ ratones inyec.
761-MM	A	9	10	6/6	0	9	7/8
San Fernando	B	9	3	0/6	0	0	0/5
Porillo	C	0	12	6/6	0	12	5/5
Alabaster	D	0	0	0/6	0	0	-

Los extractos se calentaron por 2 horas a 85°C. Ratones de 20 ± 2 g se inyectaron con 1.5 ml de los extractos respectivos preparados por extracción de 2 g y de semillas molidas en 10 ml de solución salina. Se registró la mortalidad al cabo de 24 y 48 horas.

acentúa, si la cocción se verifica en lugares montañosos donde la reducción del punto de ebullición del agua implica un calentamiento menor. Para imitar estas condiciones se ha planificado el ensayo de la Tabla 5 en el cual frijoles molidos se sometieron a una cocción a temperatura de 85°C por 2 horas, suficiente para hacerlas aceptables desde el punto de vista organoléptico e insuficiente para la destrucción total de la acción tóxica.

TABLA 4

CRECIMIENTO DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS PREPARADAS CON DIFERENTES VARIEDADES DE FRIJOLES CRUDOS

Serie No.	Tipo de frijol	Cambio de peso/día g	Dieta con sumida/día g	Absorción aparente de N %
1	Nicoya (A)	- 0.7	7.5	22.9
2	Peruvita (B)	+ 1.5	8.1	49.5
3	Porillo (C)	- 0.2	6.9	38.8
4	Alabaster (D)	+ 2.3	7.3	50.2

Las dietas se suplementaron con caseína digerida y metionina. Los animales de las series 1 y 3 se murieron a los 10-18 días del experimento.

La consistencia dura y el sabor desagradable de las semillas de frijol insuficientemente cocidas se advierten fácilmente, mientras que los frijoles previamente molidos y sometidos a cocción parcial tienen un sabor agradable y una consistencia parecida a las nueces. En la mezcla con maíz molido resultan así bastante apetitosos.

Aunque es probable que en la cocción de las mezclas de frijoles y cereales molidos, la acción tóxica se destruya parcialmente y no sea muy manifiesta, es de suponer que un remanente puede reducir la adsorción intestinal y así anular el efecto nutricional beneficioso buscado de un alimento destinado a mejorar grupos de población malnutrida.

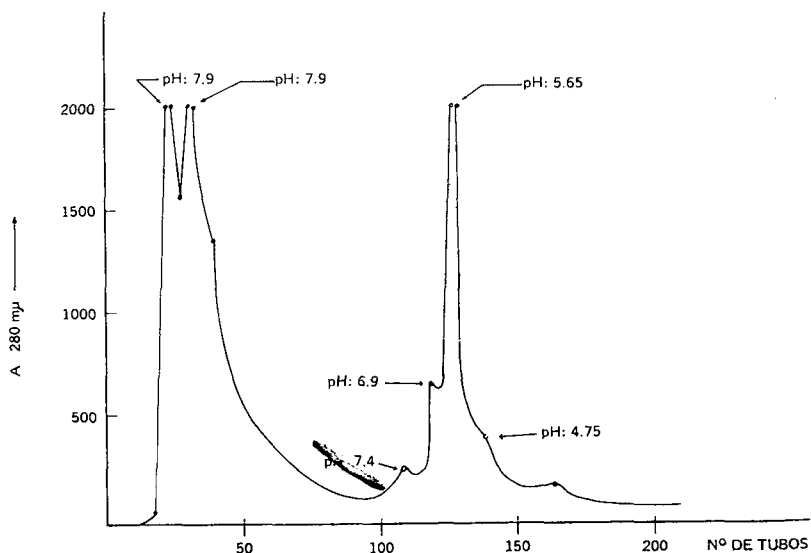
Es interesante la observación de actividad hemaglutinante en las heces de las ratas alimentadas con frijoles crudos o parcialmente cocidos porque una prueba análoga se podría aplicar en las heces de niños que recibieran las mencionadas mezclas de frijoles y cereales molidos.

Sería aconsejable incluir en los trabajos genéticos sobre la obtención de variedades de frijoles con mayor valor alimenticio la prueba de la presencia de hemaglutininas tóxicas. En una publicación anterior hemos informado que el tipo A se hereda como un sólo factor dominante lo que debería facilitar la labor de su eliminación de cepas mejoradas (7).

Al estudiar el efecto mitogénico de los extractos de distintas variedades de frijoles sobre linfocitos humanos cultivados se observó una distribución de esta actividad idéntica a la observada para la toxicidad y presentada en la Tabla 1. Igualmente, el efecto de calor sobre dicha actividad era el mismo que el presentado en la Tabla 3 sobre la toxicidad, i. e. que la actividad de los extractos del tipo A y C resisten el calentamiento a 85°C (13). Es pues, probable que ambas actividades se deban a un mismo factor.

CROMATOGRAFIA DE UN EXTRACTO DE FRIJOLES

Variedad "Cubagua" por columna D. E. A. E. — Celulosa



HEMAGLUTINACION

Sangre de Conejo:	+	-	-	-	+	-
Sangre de vaca tripsinizada:	+	-	-	-	-	-

TOXICIDAD

Ratas inyectadas						
Ratas muertas	%			%		

TABLA 5

CRECIMIENTO DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS PREPARADAS A BASE DE FRIJOLES ROJOS SOMETIDOS A DIFERENTES TRATAMIENTOS TERMICOS Y SUPLEMENTADOS CON METIONINA

Serie No.	Tratamiento	Cambio de peso / día g	Dieta consumida/ día g.	Peso del bazo/ peso corporal x 100	Peso del pancreas peso corporal x 100
1	Cocidos a fuego directo ^{2/}	+ 1.77±0.20	9.55±0.83	0.27±0.022	0.31±0.032
2	Crudos	- 1.62 ±0.5 ^{1/}	3.22±0.30 ^{1/}	0.16±0.014 ^{1/}	0.43±0.028 ^{1/}
3	Cocidos a 85°C ^{3/}	+ 0.55±0.12 ^{1/}	5.87±0.30 ^{1/}	0.30±0.010	0.39±0.022
4	Cocidos a 85°C con bicarbonato ^{3/}	+ 0.71±0.16 ^{1/}	6.30±0.28 ^{1/}	0.31±0.022	0.34±0.020

¹ Diferencia con grupo N° 1 significativo $p < 0.05$.

² Cocidos como semillas enteras después de remojar durante 18 horas.

³ Cocidos en forma molida y sin remoje previo.

SUMMARY

Toxicity and specificity of different phytohemagglutinins of beans (Phaseolus vulgaris)

The hemagglutinating and toxic actions of the extracts of 20 varieties and cultivars of beans have been studied. Four different types of hemagglutinating specificity could be distinguished: bean extracts which agglutinate red blood cells of rabbit and trypsin-activated cow blood cells, called type A; which agglutinate only rabbit cells, called type B; which agglutinate only trypsin-activated cow blood cells, called type C; and those which do not act on any of these blood cells but which agglutinate pronase-treated hamster blood, called type D.

Type A and C-bean extracts would kill mice when injected intraperitoneally, type B and D extracts were not toxic under the conditions used. When bean extracts are heated to 85°C for two hours, the activity toward rabbit blood is lost, but the activity toward trypsin-activated cow blood cells and the toxic action resist.

Four groups of rats were fed diets prepared with ground beans of varieties belonging to the four types described. The diets contained also 10% of trypsin—, digested casin (casitone). The animals receiving the diets containing beans of types A and C lost weight and died within 2 weeks, those fed the diets containing type B and D beans showed no signs of toxicity. In the feces of the rats of all four groups the presence of undestroyed agglutinins could be detected by the agglutination tests. Therefore, the difference in toxicity was not due to a difference in susceptibility to intestinal digestion.

When beans were ground and cooked in water or in sodium bicarbonate solution for two hours at 85°C and fed to rats in a methionine supplemented diet, growth was very poor, but was normal when the whole seeds were cooked at 100°C after soaking in water.

Attention is called to the possibility that in mixtures of ground seeds of beans and cereals used in popular feeding programs the primitive cooking conditions and the reduction of the boiling point of water in mountainous regions may result in only incomplete destruction of toxicity.

It is suggested that in work on genetic improvement of the nutritional value of beans, the elimination of the toxic agglutinins should be included.

Agradecimiento

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas la ayuda financiera que hizo posible la realización de este trabajo y al señor Antonio Callejas su ayuda en la separación cromatográfica de los extractos de frijoles.

BIBLIOGRAFIA

1. Liener, I. E., Toxic factors in edible legumes and their elimination. *Am J. Clin. Nutr.* 11, 281-298, 1962.
2. Jaffé, W. G. in "Toxic Constituents of Plant Foods", editado por I. E. Liener, Academic Press, New York and London, pag. 69-101, 1969.
3. Honavar, P. M., C. V. Shih & I. E. Liener. The inhibition of the growth of rats by purified hemagglutinin fractions isolated from *Phaseolus vulgaris*. *J. Nutr.* 77, 109-115, 1962.
4. Jaffé, W. G. Uber Phytotoxine aus Bohnen, *Arzneimittelforsch.* 10, 1012-1015, 1960.
5. Stead, R. H., H. J. H. de Muelenaere & G. V. Quicke. Trypsin inhibition, hemagglutination and intraperitoneal toxicity of extracts of *Phaseolus vulgaris* and *Glycine max.* *Arch. Biochem. Biophys.* 113, 703-712, 1966.
6. de Muelenaere, H. J. H. Toxicity and hemagglutinating activity of legumes. *Nature* 206, 827-828, 1965.
7. Brücher, O., A. Palozzo & W. G. Jaffé. Detection of four different types of hemagglutinins in beans (*Phaseolus vulgaris*). *Z. Immunitätsforsch.* 142, 439 (1972).
8. Jaffé, W. G., M. Montbrun, A. Callejas & M. Jaffé. Studien mit drei agglutinierenden Eiweissfraktionen aus *Phaseolus vulgaris* un *Vicia faba* in ihrer Wirkung auf die Erythrocyten verschiedener Tierarten. *Z. Immunitätsforsch* 129, 196-207, 1965.
9. Jaffé, W. G. Influencia de distintos suplementos dietéticos sobre la reproducción de ratas alimentadas con dietas bajas en vitamina B₁₂. *Arch. Venez. Nutr.* 3, 59-68, 1952.
10. Jaffé, W. G. Factores tóxicos en leguminosas. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 18, 205-218, 1968.
11. Jaffé, W. G. & C. I. Vega Lette. Rat -labile growth inhibiting factors in beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Nutr.* 94, 203-211, 1968.
12. King, K. W. Fourgere, J. Foucauld, G. Dominique & I. D. Beghin. Response of pre-school children to high intake of Haitian cereal-bean mixture. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 16, 53-64, 1966.
13. Jaffé, W. G., Levy & O. Brücher. Hemagglutinating specificity and mitogenic action of bean phytohemagglutins (PHA). Por publicar.