

Factores tóxicos de leguminosas cultivadas en Chile

III. Hemaglutininas*

SERGIO CONTRERAS y M. A. TAGLE**

Unidad de Nutrición Básica, Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina, Sede Santiago Norte, Universidad de Chile.

RESUMEN

Se investigó la presencia de hemaglutininas en extractos obtenidos a partir de diversas semillas crudas de leguminosas cultivadas en Chile: a) fréjol o poroto (*Phaseolus vulgaris* var *tortola*, var *zeus* y var *coscorrón*); b) haba (*Vicia faba*); c) chícharo (*Lathyrus sativus*); d) arveja (*Pisum sativum*); e) garbanzo (*Cicer arietinum*); f) lenteja (*Lens esculenta*); g) soya (*Glycine max*); h) lupino albo (*Lupinus albus* var *astra*); i) lupino luteo (*Lupinus luteus* var *aurea*) y j) tamarugo (*Prosopis tamarugo*).

Se distinguieron dos tipos de hemaglutininas: aquellas que dieron reacción positiva con glóbulos tripsinados de vaca, y las que solo dieron reacción positiva con glóbulos tripsinados de conejo.

El fréjol presentó las concentraciones más altas de ambos tipos de hemaglutininas, especialmente las variedades *coscorrón* y *tórtola*; el haba, el lupino albo, el tamarugo también presentaron hemaglutininas tóxicas, aunque en concentración menor.

Todas las leguminosas estudiadas presentaron hemaglutininas detectables con sangre de conejo en un rango que oscila de 6 a 12 diluciones, con excepción del lupino luteo que no presentó actividad ninguna.

El fréjol *tórtola* (*Phaseolus vulgaris* var *tortola*) fue sometido a diversos tratamientos para determinar aquellos que resultan más eficaces en la eliminación del tóxico. Nuestros resultados indican que aquellos en que la temperatura sobrepasa los 100°C y el ambiente es húmedo serían los mejores. El remojo como único tratamiento no afecta la actividad hemaglutinante, y como pretratamiento tampoco influye en la eliminación de las hemaglutininas.

* Financiada por OEA, a través del proyecto "Introducción racional de leguminosas en la alimentación infantil".

** Dirección actual: División de Política Alimentaria y Nutrición, FAO, Roma.

Recibido: 15-1-73.

INTRODUCCION

Las leguminosas constituyen una importante fuente de proteína alimentaria, tanto real como potencial (1-3); pero muchas de estas semillas contienen factores tóxicos (1-6). Animales de experimentación alimentados con dietas que contenían leguminosas crudas, presentaron en la mayoría de los casos alteraciones de distinto orden, como inhibición de crecimiento, pérdida de peso y, en algunos casos más graves, hasta la muerte (3-9).

Los tratamientos térmicos mejoran notablemente la calidad nutricional de las leguminosas; se atribuye este efecto principalmente a destrucción de factores tóxicos termolábiles, tales como inhibidor de tripsina, hemaglutininas y otros, muchos de ellos no bien definidos (4-12).

Algunas de las hemaglutininas, conocidas también con el nombre de lectinas o fitohemaglutininas, han sido consideradas tóxicas en animales de experimentación (4, 8, 11); pero algunos trabajos posteriores indican que también existen hemaglutininas que no son perjudiciales al ser administradas por vía oral o intraperitoneal (13-15).

El propósito de este trabajo fue investigar la actividad hemaglutinante presente en semillas de leguminosas cultivadas en Chile, como también estudiar el efecto de diversos procedimientos, tanto de uso industrial como doméstico, sobre su eliminación.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron las mismas leguminosas estudiadas en los trabajos anteriores (16, 17): poroto o fréjol (*Phaseolus vulgaris*) en sus variedades tórtola, coscorrón, arroz y zeus, que son los de mayor consumo en Chile; haba (*Vicia faba*); chícharo (*Lathyrus sativus*); arveja (*Pisum sativum*); garbanzo (*Cicer arietinum*); lenteja (*Lens esculenta*); soya (*Glycine max*); lupino albo (*Lupinus albus* var *astra*); lupino luteo (*Lupinus luteus* var *aurea*); tamarugo (*Prosopis tamarugo*). La mayoría de ellas son de consumo humano, a excepción de: a) tamarugo, que se usa en la alimentación animal en las zonas áridas del Norte de Chile, y b) los lupinos, que aunque

actualmente se usan solo como forraje, se está considerando su posible utilización en la alimentación humana para lo cual se realizan los estudios pertinentes.

Todas las semillas de consumo humano fueron adquiridas en el mercado local; los lupinos fueron proporcionados por el programa de desarrollo de esta leguminosa, que funciona por convenio Universidad de Concepción - CORFO*, y el tamarugo fue obtenido del Departamento de Ganadería de la CORFO.

Se midió la acción del calor sobre las hemaglutininas del fréjol variedad tórtola (*Phaseolus vulgaris* var *tortola*), porque este fue uno de los materiales con valores más altos de actividad hemaglutinante, del mismo modo que había presentado valores relativamente altos de glucósidos cianogénicos e inhibidor de tripsina (16, 17), con lo cual se ha convertido en nuestro material de selección para estudios de tóxicos en leguminosas.

Los tratamientos que para este efecto se realizaron, fueron:

- 1.—Remojo; la semilla de fréjol fue dejada en agua durante 14 horas a temperatura ambiente, en seguida se secó al aire con ventilador; esta forma de secado fue utilizada siempre que la muestra resultaba húmeda. Posteriormente se pulverizó (60 mesh) en un molinillo eléctrico, esta etapa final también fue común para los otros tratamientos.
- 2.—Molido y autoclavado 20' a 121°C.
- 3.—Remojado y autoclavado 20' a 121°C, luego secado y molido.
- 4.—Cocido 1 hr a ebullición en olla común.
- 4.—Remojado y calentado 1 hr a ebullición en olla común.
- 6.—Calentado en olla a presión 10 lb durante 20'.
- 7.—Remojado y calentado en olla a presión 10 lb durante 20'.
- 8.—Calentado entero en estufa a 100°C por una hr.
- 9.—Molido y calentado en estufa a 100°C por una hr.
- 10.—Remojado y calentado entero en estufa a 100°C por una hr.

Para la preparación de los extractos, los materiales molidos se mezclaron con solución de NaCl al 0.85% en la proporción 1:9, agitando 10', para luego dejar reposar en frío (4°C).

* CORFO. Corporación de Fomento de la Producción.

durante 12 hr como mínimo; al cabo de este tiempo se centrifugaban y filtraban en papel Whatman 1, obteniéndose en la mayoría de los casos un extracto límpido.

Eritrocitos preparados a partir de sangre de vaca y de conejo se lavaron tres veces con la misma solución salina y se llevaron a una concentración final de 4%. A continuación, 10 ml de suspensión de eritrocitos se trataron con 1 ml de solución de tripsina (Tripsin 1:250, Difco Laboratories) 1 mg/ml, ya que se ha demostrado que la tripsina es muy efectiva como sensibilizadora de glóbulos (10). Se dejaron reposar por una hr a 37°C, luego se lavaron 3 veces con solución salina, llevando siempre a la misma concentración inicial (4%).

Un volumen de 0.025 ml de extracto inicial se diluyó sucesivamente con la solución salina en un equipo 'Micro-titer' (Cole Eng. Com. Alexander, Virg. U.S.A.), agregando posteriormente sobre cada una de estas diluciones un volumen de 0.025 ml de suspensión de eritrocitos. La lectura se realizó después de una hr de la adición de los glóbulos, considerándose positiva la dilución en que la aglutinación era evidente a simple vista.

RESULTADOS Y COMENTARIOS

La Tabla 1 muestra la actividad hemaglutinante de diversas semillas crudas de leguminosas. Se puede observar que la concentración de hemaglutininas fluctúa en un rango bastante amplio: desde 3 diluciones para haba hasta 19 para porotos tórtola y coscorrón frente a los eritrocitos de vaca, y desde 6 diluciones para el garbanzo hasta 12 para el fréjol tórtola y coscorrón frente a los eritrocitos de conejo.

Jaffé y Brucher (13), demostraron que en los fréjoles las hemaglutininas que dan reacción positiva con glóbulos de vaca serían mucho más tóxicas que las que solo dan con glóbulos de conejo. Considerando lo anterior podríamos postular que los fréjoles crudos serían tóxicos, especialmente en sus variedades tórtola, coscorrón y zeus; el poroto arroz presentó una actividad hemaglutinante bastante menor a las anteriores.

El haba también presentó actividad hemaglutinante, aunque en concentración baja, cuando se midió con eritrocitos

de vaca: dilución 3; en cambio, frente a eritrocitos de conejo la actividad fue mayor, dilución 8. El lupino albo y el tamarugo presentaron hemaglutininas reaccionantes con glóbulos rojos de vaca, 7 y 5 diluciones respectivamente, pero no produjeron hemaglutinación de los eritrocitos de conejo. La muestra de soya solo presentó lectinas que reaccionan con los glóbulos de conejo. Las semillas de las leguminosas restantes, excluyendo el lupino lúteo que no manifestó ninguna actividad hemaglutinante, contienen solo hemaglutininas que reaccionan con eritrocitos de conejo, en diluciones que van de 6 a 11.

TABLA Nº 1

ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE EN DIVERSAS SEMILLAS CRUDAS DE LEGUMINOSAS, DETERMINADA CON ERITROCITOS TRIPSINADOS DE VACA Y DE CONEJO

Nombre común	Nombre científico	Eritrocitos de vaca	Eritrocitos de conejo
Fréjol tórtola	<i>Phaseolus vulgaris</i> var tórtola	19*	12
Fréjol coscorrón	<i>Phaseolus vulgaris</i> var coscorrón	19	12
Fréjol zeus	<i>Phaseolus vulgaris</i> var zeus	17	9
Fréjol arroz	<i>Phaseolus vulgaris</i> var arroz	9	7
Soya	<i>Glycine max</i>	0	9
Haba	<i>Vicia faba</i>	3	8
Arveja	<i>Pisum sativum</i>	0	11
Lenteja	<i>Lens esculenta</i>	0	11
Garbanzo	<i>Cicer arietinum</i>	0	6
Chícharo	<i>Lathyrus sativus</i>	0	10
Lupino albo	<i>Lupinus albus</i> var astra	7	0
Lupino lúteo	<i>Lupinus luteus</i> var aurea	0	0
Tamarugo	<i>Prosopis tamarugo</i>	5	0

* En cada caso se indica la última dilución en que era evidente la aglutinación al cabo de una hora.

En la Tabla 2 se muestran los valores de actividad hemaglutinante que presenta el fréjol tórtola, después de haber sido sometido a diversos tratamientos; también la efectividad de cada uno de los tratamientos en la eliminación de hemaglutininas reaccionantes con glóbulos de vaca, que según Jaffé y Brücher (13) serían las más tóxicas. Los tratamientos que produjeron los mejores resultados fueron aquellos en que la temperatura sobrepasó los 100°C y la presión fue superior a la ambiental: tratamientos 2, 3, 6 y 7, siendo el mejor el tratamiento 7: remojado y calentado en olla a presión 20' a 121°C.

TABLA Nº 2
ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DEL FREJOL TORTOLA SOMETIDO
A DIVERSOS TRTAMIENTOS

Tratamiento Ninguno	Dilución 19*
1.—Remojo	19
2.—Molido y autoclavado 20' a 121°C	19
3.—Remojado y calentado en autoclave 20' a 121°C	2
4.—Cocido 1 hr a ebullición en olla común	6
5.—Remojado y cocido 1 hr a ebullición en olla común	8
6.—Calentado en olla a presión 10 lb 20'	4
7.—Remojado y calentado en olla a presión 10 lb 20'	1
8.—Calentado entero en estufa a 100°C por 1 hr	18
9.—Molido y calentado en estufa a 100°C por 1 hr	15
10.—Remojado y calentado entero en estufa a 100°C por 1 hr	15

* Los valores expuestos corresponden a la última dilución del extracto en que la aglutinación es evidente a simple vista.

Contrariamente a lo encontrado para glucósidos cianogénicos y factor antitriptico (16, 17), los tratamientos en olla común no son los mejores para destruir el poder hemaglutinante del fréjol (tratamientos 4 y 5). Los más ineficaces resultaron aquellos realizados en ambiente seco, en los cuales la disminución de la actividad hemaglutinante ocurre solo en pequeña proporción (tratamientos 8 a 10); de ellos el mejor fue aquel en que se trabajó sobre muestra molida.

El remojo como único tratamiento no disminuyó la cantidad de hemaglutininas presentes (tratamiento 1); también es dudosa la efectividad del remojo como pretratamiento, ya que la diferencia que existe entre una muestra remojada y una no remojada sometida posteriormente a un mismo tratamiento, puede ser positiva o negativa (tratamiento 4 vs 5 y 8 vs 10).

Al observar la Tabla 2 queda en claro que ninguno de los tratamientos eliminó totalmente la actividad hemaglutinante; sin embargo, los resultados obtenidos pueden servir de pauta para forzar las condiciones experimentales en aquellos que resultaron más efectivos, como ser tratamientos 7 y 3.

No hay uniformidad de criterio para expresar la actividad hemaglutinante que existe en determinadas semillas (7, 8, 10, 13), razón por la cual no se pueden comparar los valores dados por diversos investigadores y también nos resulta bastante difícil interpretar los nuestros. Vale la pena señalar que es muy poca la información que existe sobre el mecanismo de acción de las fitohemaglutininas en el organismo; al respecto, Jaffé (19, 20) indica que es posible que el efecto tóxico se deba a que las hemaglutininas se combinan con las células de la pared intestinal y de esta manera interfieren en el proceso de absorción. Parece necesario estudiar más el o los posibles mecanismos de acción de las hemaglutininas, ya que es dable que con los conocimientos actuales se subvalore su presencia en los alimentos.

SUMMARY

Toxic factors in Chilean Legumes. III: Hemagglutinating activity

Hemagglutinines were determined in legume seeds grown in Chile: *Phaseolus vulgaris* var *tortola*, var *arroz*, var *zeus* and var *coscorron*; *Vicia faba*; *Lathyrus sativus*; *Pisum sativum*; *Cicer arietinum*; *Lens escu-*

lenta and *Prosopis tamarugo*. Trypsin-activated rabbit and cow erythrocytes were used for the tests.

Phaseolus vulgaris presented the highest activity on both types of erythrocytes, especially var *tortola* and *coscorrón*. *Vicia faba*, *Lupinus albus* and *Prosopis tamarugo* showed activity on the cow erythrocytes, although at a lower level. All the studied seeds had active hemagglutinins on rabbit erythrocytes, with the exception of *Lupinus luteus* where no hemagglutinating activity was found.

Phaseolus vulgaris var *tortola* was used to study the effect of several heat treatments on the hemagglutinating activity. The best results were obtained with humid heat over 100°C. Soaking alone, or used as a pre-treatment, did not decrease the hemagglutinating activity.

BIBLIOGRAFIA

1. Patwardhan, V. N. Pulses and beans in human nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 11: 12-21, 1962.
2. Aykroyd, W. R. y J. Doughty. Las leguminosas en la nutrición humana. FAO. Roma, Italia, 1964.
3. Jaffé, W. G. Las semillas de leguminosas como fuente de proteínas en América Latina. En "Recursos Proteínicos en América Latina". Edición INCAP, Guatemala, 1971.
4. Kakade, M. L. and R. J. Evans. Nutritive value of navy beans (*Phaseolus vulgaris*). *Brit. J. Nutr.* 19: 269-276, 1965.
5. De Muelenaere, H. J. H. Effect of heat treatment on the hemagglutinating activity of legumes. *Nature* 201: 1029-1030, 1964.
6. Kakade, M. L. and R. J. Evans. Effect of soaking and germinating on the nutritive value of navy beans. *J. Food Sc.* 31: 781-783, 1966.
7. Liener, I. E. and H. G. Hill. The effect of heat treatment on the nutritive value and hemagglutinating activity of soybean oil meal. *J. Nutr.* 49: 609-620, 1953.
8. Jaffé, W. G. and C. L. Vega-Lette. Heat-labile growth-inhibiting factor in beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Nutr.* 94: 203-210, 1968.
9. Borchers, R. and C. W. Ackerson. The nutritive value of legume seeds. Effect of autoclaving and the trypsin inhibitor test for 17 species. *J. Nutr.* 41: 339-345, 1964.
10. Liener, I. E. Photometric determination of the hemagglutinating activity of soyin and crude soybean extract. *Arch. Biochem. Biophys.* 54: 223-231, 1965.
11. Honavar, P. M., P. M. Cheng-Ven Shid and I. E. Liener. Inhibition of the growth of rats by purified fraction isolated from *Phaseolus vulgaris*. *J. Nutr.* 77: 109-114, 1962.
12. Liener, I. E. Toxic factor in edible legumes and their elimination. *Am. J. Clin. Nutr.* 11: 281-298, 1962.
13. Jaffé, W. G. y O. Brücher. Toxicidad y especificidad de diferentes fitohemagglutininas de frijoles (*Phaseolus vulgaris*). *Arch. Latinoamer. Nutr.* 22: 267-281, 1972.

14. Stead, R. H., H. J. H. De Muelenaere and G. V. Quicke. Tripsin inhibition, hemagglutination and intraperitoneal toxicity of extracts of *Phaseolus vulgaris* and *Glycine max*. *Arch. Biochem. Biophys.* 113: 703-712, 1966.
15. Muelenaere, H. J. H. Toxicity and hemagglutinating activity of legumes. *Nature* 206: 827-828, 1965.
16. Contreras, S., H. Araya, N. Pak y M. A. Tagle. Factores tóxicos en leguminosas cultivadas en Chile. II. Inhibidor de tripsina. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 24: 1974.
17. Gallardo, F., H. Araya, N. Pak and M. A. Tagle. Factores tóxicos en leguminosas cultivadas en Chile. II. Inhibidor de tripsina. Por publicarse.
18. Tagle, M. A. Algunos factores tóxicos presentes en los alimentos. En: *nutrición 73*, editado por M. A. Tagle. Impresores Jerba, Santiago, Chile, 1973, pág. 63-65.
19. Jaffé, W. G. Hemagglutinins. En: "Toxic Constituents of Plant Foodstuffs" I. E. Liener (ed). Academic Press, New York and London, 1969.
20. Jaffé, W. G. Uber Phytotoxine aus Bahnen, *Arzneimittelforsch.* 10: 1012-1015, 1960.