

ESTUDIO DE AGLUTININAS EN VARIEDADES COLOMBIANAS DE "PHASEOLUS VULGARIS"

Resumen del trabajo de tesis presentado por NOHRA
CELY DE MORA, para optar al título de Químico-
Farmacéutico.

Presidente de tesis: doctor ALFONSO RUIZ M.

INTRODUCCION

Se ha comprobado la presencia de aglutininas de origen vegetal, las cuales producen aglutinación de los eritrocitos en diversas especies animales, incluso en sangre humana. Con mayor frecuencia, se han encontrado en los extractos de leguminosas y entre éstas en los de Phaseolus vulgaris (fríjol).

Las variedades de Phaseolus vulgaris constituyen un importante recurso de proteínas vegetales, y son de consumo popular en muchas partes de Colombia. Se han reportado casos de intoxicación humana por el consumo de fríjoles clasificados botánicamente como Phaseolus vulgaris insuficientemente cocidos, o cocidos en condiciones inadecuadas. [Faschinbauer y col. (?), y Griebel, 1950 (11)].

En algunas especies de Phaseolus se han encontrado potentes aglutininas, con actividad tóxica para animales de experimentación; estas actividades se han eliminado parcialmente por solo calentamiento, en condiciones adecuadas. Liener, 1962 (24), cita aglutininas e inhibidores de tripsina, presentes en Phaseolus vulgaris, entre los factores tóxicos presentes en legumbres, los cuales contribuyen a la disminución del valor nutritivo de sus proteínas. Por esto debe buscarse la presencia de actividad hemoaglutinante y tóxica, entre

legumbres colombianas de consumo humano o animal, como el frijol.

Las variedades de Phaseolus vulgaris, cultivadas en Colombia, pueden tener aglutininas con poder aglutinante de glóbulos rojos o estar exentas de éstas, ya que dentro de una misma especie hay variedades que poseen tal propiedad o no. Estas diferencias persisten aun cuando las variedades se cultiven en ambientes idénticos. (Boyd, 1963) (2).

La diferencia en la actividad hemoaglutinante, se encontró en diversas variedades de Phaseolus vulgaris, siendo específica para grupos sanguíneos humanos, en algunas variedades, y no específica en otras. (Toms y Turner, 1965) (31).

La aglutinina con actividad hemoaglutinante aislada de Phaseolus vulgaris, ha encontrado uso comercial en la preparación de suspensiones de leucocitos; este método está prácticamente estandarizado usando semillas de frijol rojo, para aglutinar los eritrocitos y así facilitar la separación de los leucocitos a partir de la sangre total. (Toms y Turner, 1965) (31)

En el presente trabajo se seleccionaron las variedades de consumo humano que presentaron mayor actividad hemoaglutinante en sangre humana y animal. La sustancia activa se purificó y se determinaron algunas de sus propiedades.

Se realizaron experimentos de toxicidad oral e intraperitoneal en ratas, con las variedades de Phaseolus vulgaris: Diacol Calima (frijol rojo) y Frijol Negro, línea número 20561-M (3) 7 m. y se estudiaron los cambios patológicos.

Es de vital importancia saber si las variedades de Phaseolus vulgaris cultivadas en Colombia contienen aglutininas con las propiedades anotadas y si éstas producen efectos tóxicos similares a los ya conocidos en la literatura. A la vez es necesario saber si el cocimiento usual del frijol anula la toxicidad, ya que el consumo de esta legumbre es elevado en algunas regiones colombianas.

MATERIALES Y METODOS

I. ELECCION DEL MATERIAL BOTANICO

Phaseolus vulgaris, conocido como frijol alimenticio, es una planta anual, originaria de América Tropical, y generalmente

enana y trepadora. Su longitud total oscila aproximadamente entre 45 y 60 cms.

Las plantas y semillas fueron proporcionadas por la Granja Experimental de Palmira y pertenecen a las variedades siguientes: Diacol Calima, Ica Tuí y Fríjol Negro, línea 20561-M (3) 7 m. Ica Cuna (frijol rojo) y Diacol Catio (frijol rojo).

Diacol Calima, se cultiva en el Valle del Cauca y otras regiones de clima cálido moderado. Se usa para la alimentación humana.

Ica Tuí, se cultiva actualmente en el Valle del Cauca para exportación. Es una variedad de grano negro (tipo caraota). Su consumo en Colombia es muy limitado, ya que entre nosotros poco se usan los fríjoles negros para consumo humano.

Fríjol Negro, línea 20561-M (3) 7 m., se consume poco en Colombia, aunque en otros países como Venezuela, Costa Rica y Honduras, los fríjoles negros tienen gran demanda para consumo humano.

La variedad Ica Cuna se produce en regiones de clima cálido y se usa para alimentación humana en el Departamento de Antioquia, Colombia.

La variedad Diacol Catio se cultiva en Medellín, Colombia, para consumo humano. (ICA, 1972).

II. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE

a) *Determinación cualitativa.*

Preparación del extracto de frijól:

Se suspendieron 10.0 g. de frijól molido en 100 ml. de solución de cloruro de sodio al 0.85%. Después de dos horas de agitación se filtró por gasa. Luego se esterilizó por filtro Seitz EK SI, recibiendo el filtrado en recipiente estéril.

Preparación de la suspensión de eritrocitos (6) :

Se tomaron tubos estériles (75 mm. x 10 mm.) y se les adicionó 0.1 ml. de EDTA al 10%. Se extrajo sangre de cobayo, conejo o rata y cuidadosamente se agregó sobre el anticoagulante, mezclando suavemente.

A la sangre completa se le añadieron 5 ml. de suero fisiológico y en seguida se centrifugó durante 10 minutos para separar el plasma (3.000 rpm.). Se retiró el líquido sobrenadante y se lavaron nuevamente los eritrocitos con solución salina fisiológica.

Se adicionó 1 ml. de hematíes a un tubo que contenía 3 ml. de suero fisiológico y se mezcló suavemente. Esto constituye una suspensión de eritrocitos al 25%.

Prueba en porta-objetos (6) :

Se coloca sobre un porta-objetos una gota de extracto de frijol y una gota de suspensión de eritrocitos. Se mezcla con un palillo y luego se agita suavemente el porta-objetos. Se observa durante un minuto para ver si hay aglutinación.

b) *Determinación cuantitativa de la hemoaglutinación.*

Se usa la misma suspensión de eritrocitos de cobayo al 25% en solución **salina**.

Para determinar la actividad de una suspensión de anticuerpos se hacen pruebas en una serie de diluciones; la serie debe hacerse suficientemente larga y los intervalos no deben ser muy grandes (8).

Se preparó una serie de diluciones partiendo del extracto al 10%, o sea 1:10. (Ver tabla I).

TABLA I

Tubo	Dilución	Se adicionan ml.	Del tubo N°	Completar con solución salina hasta	Dilución final
1	1:10	—	—	—	1:10
2	1:16	2.5 ml. de	1	4.0 ml.	1:16
3	1:33	5.0 ml. de	2	10.0 ml.	1:32
4	1:40	4.0 ml. de	3	5.0 ml.	1:40
5	1:80	2.5 ml. de	4	5.0 ml.	1:80
6	1:160	2.5 ml. de	5	5.0 ml.	1:160
7	1:320	2.5 ml. de	6	5.0 ml.	1:320
8	1:800	2.0 ml. de	7	5.0 ml.	1:800
9	1:2.000	2.0 ml. de	8	5.0 ml.	1:2.000
10	1:2.666	3.0 ml. de	9	4.0 ml.	1:2.666
11	1:4.000	2.0 ml. de	10	3.0 ml.	1:4.000
12	1:8.000	1.0 ml. de	8	10.0 ml.	1:8.000
13	1:13.333	3.0 ml. de	12	5.0 ml.	1:13.333
14	1:16.000	2.0 ml. de	12	4.0 ml.	1:16.000
15	1:80.000	1.0 ml. de	14	5.0 ml.	1:80.000

Luego se mezclan iguales cantidades de extracto diluido y suspensión de eritrocitos.

Se hace la prueba como se describe en la parte cualitativa, haciendo dos ensayos para cada dilución.

c) *Investigación de la especificidad para grupo sanguíneo humano.*

Se usa el extracto preparado anteriormente. Se preparan suspensiones de eritrocitos de cada grupo (predeterminado), al 25% en suero salino fisiológico, como se describió anteriormente. Se hace la prueba en porta-objetos (ya descrita), y se prueba si hay diferencia respecto al título.

III. PURIFICACION Y PROPIEDADES DE LA AGLUTININA
DE *PHASEOLUS VULGARIS*

a) *Purificación de la proteína.*

Se realizó según el método descrito por Rigas y Osgood (28).

b) *Ensayos cualitativos para proteínas.*

Se preparó una solución acuosa (1 mg./ml.), de cada una de las aglutininas obtenidas en la purificación del frijol Diacol Calima y del Frijol Negro, y se practicaron las siguientes reacciones cualitativas para proteínas: [Calderón G. E. (3)]. Reacción de coagulación, reacción xantoproteica, reacción de Biuret, reacción de Millon y contenido de nitrógeno (4).

c) *Espectro de absorción a la luz ultravioleta.*

Se preparó una solución acuosa del producto de la liofilización y se midió su absorción a diferentes longitudes de onda, con un espectrofotómetro Beckman DU., usando celdas con espesor de 1 cm. En frijol Calima se tomaron lecturas a dos concentraciones: 0.5 mg./ml. y 0.05 mg./ml. En frijol negro se midió la absorción a una solución acuosa que contenía 0.05 mg./ml.

d) *Análisis cromatográfico sobre DEAE celulosa.*

Se caracterizó la proteína purificada por cromatografía de intercambio iónico, con gradiente de elución. El intercambiador DEAE celulosa, con capacidad de intercambio de 0.5 meq./g., se preparó por una serie de lavados con solución de soda 0.1 N, agua destilada, ácido fosfórico 0.1 N y finalmente se llevó a la forma de hidróxido con la solución de soda 0.1 N. Se prepararon 9 mezclas tampones. El intercambiador DEAE celulosa se ajustó a pH 9,3 con la mezcla reguladora I, 0.005M de ácido fosfórico y 0.0125M de cloruro de sodio. Se completó el equilibrio lavando con dos litros de la misma mezcla.

Se empacó en la columna (10 mm. de diámetro), por el método de sedimentación (Morris, 25), hasta una altura de 15 cms.

El gradiente de elución se llevó a cabo adicionando cada una de las nueve mezclas reguladoras, por intermedio de un mezclador, que cambiaba gradualmente la composición del líquido que alimentaba la columna.

La proteína se dializó con el tampón I, y la solución acuosa, 100 mg./3 ml., se aplicó a la columna.

Se recogieron fracciones de 5 ml. En general se siguió el método usado por Prager y Speer (27), usando las siguientes mezclas reguladoras:

I.	0.005 M de ácido fosfórico y 0.0125 M de NaCl. pH-9.3.
II.	0.01 M de ácido fosfórico y 0.0125 M de NaCl. pH-8.5.
III.	0.02 M de ácido fosfórico y 0.0125 M de NaCl. pH-8.0.
IV.	0.04 M de ácido fosfórico y 0.0125 M de NaCl. pH-7.5.
V.	0.08 M de ácido fosfórico y 0.0125 M de NaCl. pH-7.0.
VI.	0.16 M de ácido fosfórico y 0.0125 M de NaCl. pH-6.0.
VII.	0.20 M de ácido fosfórico y 0.0125 M de NaCl. pH-5.0.
VIII.	0.50 M de ácido fosfórico y 0.0125 M de NaCl. pH-5.0.
IX.	1.00 M de ácido fosfórico y 0.0125 M de NaCl. pH-4.5.

El pH de cada mezcla reguladora se midió con un potenciómetro Coleman J.

Evaluación del cromatograma.

Cada fracción se probó con una suspensión de eritrocitos de cobayo al 25%. Su densidad óptica se midió en espectrofotómetro Beckman DU., a 280 milimicras.

IV. ESTUDIO DE LA ACCION TOXICA Y SU ANULACION POR EL CALOR

a) *Determinación de la toxicidad oral en ratas.*

Se estudió la toxicidad de dos variedades de frijól: Diacol Calima, Frijol Negro, línea 20561-M (3) 7 m.; se utilizaron para el estudio de cada uno de los frijoles, 10 ratas alimentadas con dietas que contenían frijól, suplementadas con metionina, ya que

se ha encontrado que este aminoácido está contenido en cantidad insuficiente en todas las variedades de *Phaseolus vulgaris*, (Honarvar y col. 1962) (12).

Las ratas utilizadas se dividieron en grupos de cinco. Los grupos se establecieron con animales de igual sexo, igual edad (30, 31 días), y el peso inicial se buscó lo más próximo posible (60 gm. a 65 gm.). Todas las ratas de los diferentes grupos eran de la misma raza, albina, y procedentes de la misma colonia.

Dos grupos de cinco animales tenían la misma dieta.

Grupo 1 y 2, 10 ratas con la dieta siguiente:

Frijol Calima crudo 50.00 g.

Metionina 0.3 g.

Concentrado para ratas (peletizado) 49.7 g.

Grupo 2 y 3, 10 ratas con la dieta:

Frijol Calima cocido * 50.00 g.

Metionina 0.3 g.

Concentrado para ratas (peletizado) 49.7 g.

Grupo 3 y 4, 10 ratas con la dieta:

Frijol Negro crudo 50.00 g.

Metionina 0.3 g.

Concentrado para ratas (peletizado) 49.7 g.

Grupo 4 y 5, 10 ratas con la dieta:

Frijol Negro cocido * 50.00 g.

Metionina 0.3 g.

Concentrado para ratas (peletizado) 49.7 g.

En las dietas anteriores, el porcentaje representado por el frijol (50%), proporciona entre 10.0 y 10.7% de proteína.

En la dieta control, se cambió el frijol por caseína, que proporcionará la misma cantidad de proteína suministrada por el frijol; dado que la caseína contiene 87% de proteína, se suministraron 11.5% g. de caseína, cuya composición quedó así:

Caseína 11.5% g.

Metionina 0.3% g.

* Calentado al autoclave, 110°C. 30 minutos. Previo remojo en agua 24 horas.

Concentrado para ratas (peletizado) csp. 100 g.

Las diferentes dietas se prepararon mezclando los ingredientes pulverizados, en las proporciones indicadas. El alimento se les suministró diariamente, en tal forma que no carecieran de él; igualmente se mantuvo el suministro de agua potable, en cantidad suficiente. El alimento suministrado se pesó, igualmente el residuo, y por diferencia se encontró el alimento tomado diariamente. El cambio de peso por día, en cada animal, se determinó pesando cada animal dos veces en 24 horas.

Diariamente se anotó el número de animales muertos en cada grupo. En cada animal, al morir, se determinó: peso corporal, peso del bazo, peso del páncreas y peso del hígado.

b) *Estudio de la toxicidad intraperitoneal.*

Se estudió la actividad tóxica intraperitoneal de la hemoaglutinina purificada de cada una de las variedades de frijol. Diacol Calima (Fríjol rojo), y frijol negro. Se prepararon soluciones de la proteína liofilizada, en solución de cloruro de sodio al 0.9%, estéril, a concentraciones de: proteína aislada de Fríjol Calima: 10 mg./ml., 20 mg./ml., 30 mg./ml., 40 mg./ml.

Proteína aislada de Fríjol Negro: 10 mg./ml., 20 mg./ml., 30 mg./ml., 40 mg./ml.

Cada solución se inyectó a 10 ratas hembras, de raza albina, de 30 días de edad. A cada animal se le inyectó I. P. 1 ml. de cada solución. Se anotó el número de animales muertos en cada grupo y el tiempo entre la inyección y la muerte.

c) *Estudio de los cambios patológicos.*

A cada animal muerto, en cada uno de los grupos de actividad tóxica oral, o actividad tóxica intraperitoneal, se le practicó la autopsia, y se hizo examen histopatológico de cada uno de sus órganos*.

RESULTADOS Y DISCUSION

ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE

Las semillas de frijol de las variedades: Diacol Calima, Diacol Catio, Ica Tuí y Fríjol Negro, presentaron actividad hemoaglutinante.

* Necropsias realizadas en el Programa de Patología. ICA.

nante, al ser probados sus extractos con eritrocitos de cobayo, rata y conejo. Tabla II.

Se comprobó gran variación en la actividad hemoaglutinante entre las diferentes variedades de frijol, como puede observarse por la determinación cuantitativa, tabla III. Las variedades Diacol Catio, e Ica Cuna, no presentaron una potente acción hemoaglutinante, ya que sus títulos * son muy bajos comparados con los encontrados en las otras variedades estudiadas.

La mayor potencia hemoaglutinante se encontró en el frijol rojo, Diacol Calima, cuyo título 1:16000, es mayor que el encontrado por Jaffe y Vega (20), y por Honavar y col. (12), quienes estudiaron las propiedades hemoaglutinantes del frijol "Red Kidney bean" de Minnesota. El Frijol Negro presentó un título de 8000, superior a la variedad Ica Tuí (tipo caraota negra). Estos resultados pueden compararse con los obtenidos en los estudios realizados en el Frijol Negro, Orlandilla, venezolano, cuyo título de 800, es 10 veces menor (Jaffe 14). Sin embargo son muy semejantes a los resultados reportados por Honavar y col. (12), para el frijol "Black Parramos bean" de Guatemala.

Se seleccionaron las variedades: Diacol Calima y Frijol Negro, para el estudio biotóxico, debido a su mayor potencia hemoaglutinante. Estas variedades de frijol, contienen una potente hemoaglutinina para los grupos sanguíneos humanos (A, B, AB, O) y sus correspondientes grupos Rh (positivo y negativo), que aglutinó eritrocitos de todos los grupos mencionados, tabla IV. En medio salino los extractos de ambas variedades dieron idéntico título, sin tener en cuenta el tipo de eritrocitos humanos, o el Rh positivo o negativo.

Igualmente las variedades de *Phaseolus vulgaris*, estudiadas por Toms y Turner (31), no presentaron selectividad para grupo sanguíneo humano en medio salino, o especificidad para Rh positivo o negativo.

Las aglutininas anteriormente estudiadas en diferentes variedades de *Phaseolus vulgaris*, por Rigas y Osgood (28), Prager y Speer (27), y Boyd (2), han sido clasificadas como no específicas para sangre humana.

* El título de un extracto se expresa como el recíproco de la más alta dilución que presentó aglutinación positiva de la suspensión de eritrocitos al 25%.

Sin embargo, Toms y Turner (31), informaron que el extracto de *Phaseolus vulgaris*, "Navy Pea", contiene una aglutinina no específica, simultáneamente con una aglutinina específica anti-(A₁ + B). La selectividad de grupo humano no se presentó en medio salino, pero cuando este medio se cambió por suero humano AB, sí encontraron especificidad para los antígenos humanos mencionados. Por esto, no debe excluirse la posibilidad de que las aglutininas estudiadas en este trabajo, puedan exhibir especificidad para algún grupo o sub-grupo sanguíneo humano, en otras condiciones experimentales.

La potencia hemoaglutinante de las variedades colombianas de frijol estudiadas, resultó mayor a la encontrada anteriormente en otras variedades. El frijol Diacol Calima y el Frijol Negro presentaron un título hemoaglutinante de 800 para sangre humana, notablemente superior al determinado por Toms y Turner (31), en la variedad "Red Kidney bean", cuyo título fue de 64, en idénticas condiciones experimentales.

Se encontró gran diferencia cuantitativa entre las aglutinaciones con sangre humana y animal, de las dos variedades de frijol (Tablas III y IV), como puede observarse por los títulos con sangre de cobayo (16.000 y 8.000), y con sangre humana (800). Esta diferencia ya había sido notada por Bird (1) y por Boyd (2), en la variedad de *Phaseolus vulgaris*, "Red Kidney bean". Estos autores sugirieron el uso de las aglutininas de *Phaseolus vulgaris*, para diferenciar sangre humana y animal. Además establecieron una clasificación de los eritrocitos de diversas especies animales, en cinco grupos, según la diferencia cuantitativa en la reacción de hemoaglutinación con extracto de *Phaseolus vulgaris*, "Red Kidney bean".

TABLA II

Determinación cualitativa de la actividad hemoaglutinante de *Phaseolus vulgaris* *.

Extracto salino de las variedades de frijol	SUSPENSION DE ERITROCITOS AL 25% DE:		
	Cobayo	Rata	Conejo
Diacol Calima	+	+	+
Frijol Negro	+	+	+
Ica Tuí	+	+	+
Ica Cuna	+	+	+
Diacol Catio	+	+	+

* El signo positivo (+) indica actividad hemoaglutinante, el signo negativo (-) indica ausencia de ésta.

TABLA III

Determinación cuantitativa de la actividad hemoaglutinante de Phaseolus vulgaris en sangre de cobayo.*

Tubo N°	Dilución del extracto	Diacol Calima	Frijol Negro	Ica Tuí	Ica Cuna	Diacol Catio
1	1:10	+	+	+	+	+
2	1:16	+	+	+	+	—
3	1:32	+	+	+	+	—
4	1:40	+	+	+	—	—
5	1:80	+	+	+	—	—
6	1:160	+	+	+	—	—
7	1:320	+	+	+	—	—
8	1:800	+	+	+	—	—
9	1:2.000	+	+	—	—	—
10	1:2.666	+	+	—	—	—
11	1:4.000	+	+	—	—	—
12	1:8.000	+	+	—	—	—
13	1:13.333	+	—	—	—	—
14	1:16.000	+	—	—	—	—
15	1:80.000	—	—	—	—	—

* El signo positivo (+) indica actividad hemoaglutinante, el signo negativo (—) indica ausencia de ésta.

TABLA IV

*Actividad hemoaglutinante de Phaseolus vulgaris en sangre humana**

Dilución	FRIJOL NEGRO				FRIJOL CALIMA			
	GRUPO O Rh + Rh —	GRUPO B Rh + Rh —	GRUPO AB Rh — Rh +	GRUPO A Rh + Rh —	GRUPO B Rh + Rh —	GRUPO O Rh — Rh +	GRUPO A Rh + Rh —	GRUPO AB Rh — Rh +
1:10	+	+	+	+	+	+	+	+
1:16	+	+	+	+	+	+	+	+
1:32	+	+	+	+	+	+	+	+
1:40	+	+	+	+	+	+	+	+
1:80	+	+	+	+	+	+	+	+
1:160	+	+	+	+	+	+	+	+
1:320	+	+	+	+	+	+	+	+
1:800	+	+	+	+	+	+	+	+
1:2.000	—	—	—	—	—	—	—	—
1:2.666	—	—	—	—	—	—	—	—

* El signo positivo (+) indica actividad hemoaglutinante, el signo negativo (—) indica ausencia de ésta.

PURIFICACION Y PROPIEDADES DE LA AGLUTININA
DE *PHASEOLUS VULGARIS*

La aglutinina obtenida por precipitación fraccionada con sulfato de amonio, diálisis y liofilización, presentó características similares en las variedades Diacol Calima y Fríjol Negro.

El producto obtenido de cada una de estas variedades, es un polvo blanco, amorfo, soluble en agua, en soluciones de cloruro de sodio (0.85%, 0.9%, 1%) y en soluciones diluidas de ácido clorhídrico y soda, lo cual muestra su carácter anfotérico.

Es precipitado por la adición de sales como acetato de plomo y sulfato de amonio y por el alcohol al 30%. Según el diagrama de solubilidad establecido por Cheronis y Entrinkin (5), las aglutininas de las dos variedades de frijol, clasifican en el grupo S₂. Entre los compuestos orgánicos clasificados en este grupo, se encuentran los aminoácidos.

Rigas y Osgood (28) describen la proteína hemoaglutinante del frijol "Red Kidney bean", como un polvo blanco insoluble en agua, diferente a la solubilidad de las aglutininas obtenidas de Diacol Calima o Fríjol Negro; éstas presentaron una solubilidad muy semejante a la reportada por Jaffe y Gaede (18), de las aglutininas (A y B), obtenidas del frijol "Black Kidney bean".

Los ensayos anteriores y los datos encontrados en la literatura, indican una posible naturaleza proteica de las hemoaglutininas obtenidas en la purificación.

ENSAYOS CUALITATIVOS PARA PROTEINAS

Las aglutininas obtenidas del frijol Diacol Calima y del Fríjol Negro reaccionaron positivamente y en forma similar en los siguientes ensayos cualitativos:

Reacción de coagulación: la solución de cada una de las aglutininas por acción del calor dio un precipitado en forma de copos blancos.

Reacción xantoproteica: cuando se adicionó ácido nítrico concentrado a la solución de las aglutininas, se produjo una coloración amarilla, la cual pasó a anaranjado al ser alcalinizada con solución de hidróxido de sodio al 40%.

Reacción del biuret: al adicionar una gota de solución de sulfato de cobre (1%), a la solución alcalina de cada una de las aglutininas, apareció una coloración violeta oscura.

Reacción de Millon: el reactivo de Millon, al ser adicionado a la solución de cada una de las aglutininas, en frío, formó un precipitado blanco. Por acción del calor, este precipitado se tornó rojizo.

Los ensayos de solubilidad y precipitación, así como las reacciones anteriores, confirman una posible naturaleza proteica en las aglutininas aisladas de las variedades de frijól Diacol Calima y Frijol Negro. Las reacciones positivas, xantoproteica y de Millon, sugieren la presencia de tirosina en estas proteínas.

Osborne, T. (26), quien realizó los primeros estudios de las aglutininas de *Phaseolus vulgaris*, demostró que éstas son de naturaleza proteica; posteriormente varios autores han confirmado este concepto. Rigas y Osgood (28), sugirieron que la proteína aislada de la variedad "Kidney bean", contiene tirosina; Takahashi y col. (30), encontraron tirosina en la proteína obtenida de la variedad Sure Crop Stringless Was. Los resultados informados por estos autores están de acuerdo con los ensayos realizados en el presente trabajo.

PRODUCTO OBTENIDO EN LA PURIFICACION DE *PHASEOLUS VULGARIS*

Variedades: Diacol Calima 4.0% g. de aglutinina/Kg. de frijól.
Frijol Negro 1.3% g. de aglutinina/Kg. de frijól.

Contenido de nitrógeno: determinado por el método Kjeldhal
(4) aglutininas aisladas de:

Frijol Diacol Calima 14,48 g. de N % 90,50% de proteína *.
Frijol Negro 14,15 g. de N % 88,44% de proteína *.

Semillas: frijól Diacol Calima 3,24 g. de N % 20, 25% de proteína *. Frijol Negro 3,44 g. de N % 21,50% de proteína *.

La cantidad de aglutinina purificada por el mismo método, en la variedad Red Kidney bean, por Rigas y Osgood (28), es la mitad de la obtenida en el frijól Diacol Calima, y el doble de la obtenida en el Frijol Negro; ellos purificaron 2.0 gm. de aglutinina por kilo de frijól. El contenido de nitrógeno de la proteína aislada por estos autores (14,6% g. N), es muy semejante al encontrado en la aglutinina del frijól Diacol Calima.

* Contenido de proteína (%) = (% N × 6,25).

Hanovar y col. (12), encontraron un contenido de 21,1% g. de proteína en el frijol "Red Kidney bean" de Minnesota y 21,9% g. de proteína en el frijol "Black Parramos" de Guatemala; estos resultados son semejantes a los encontrados en las dos variedades colombianas.

Las proteínas obtenidas en condiciones ácidas, conservaron las propiedades hemoaglutinantes del extracto de frijol del cual fueron aisladas. Estos resultados son similares a los reportados por Rigas y Osgood (28), quienes separaron del frijol "Red Kidney bean" una proteína activa y un residuo (polisacárido) inactivo.

Las propiedades hemoaglutinantes del producto liofilizado, obtenido de Diacol Calima y del Fríjol Negro, se conservaron después de almacenamiento durante un año, a temperatura de 4°C., pero fueron destruidas por calentamiento a 100°C. durante una hora.

ESPECTRO DE ABSORCION A LA LUZ ULTRAVIOLETA

El espectro de absorción ultravioleta de las aglutininas obtenidas en la purificación de las variedades Diacol Calima y Fríjol Negro, presentó para cada una de estas sustancias en solución acuosa un máximo de absorbancia a 280 milimicras de longitud de onda y un mínimo entre 250 y 255 milimicras. Estos espectros de absorción muestran la típica naturaleza proteica de las aglutininas.

La curva espectral de cada aglutinina se obtuvo graficando en las ordenadas los datos de la densidad óptica de su solución acuosa y en las abscisas la correspondiente longitud de onda a la cual se tomó cada lectura.

Las medidas de absorbancia se determinaron en las siguientes condiciones:

Espectrofotómetro: Beckman DU.

Espesor de la celda: 1.0 cm.

Lámpara de hidrógeno: longitud de onda, entre 220 y 400 milimicras.

Rendija: 1.0.

Sensibilidad: 2.0.

Los espectros de absorción son semejantes al obtenido por Huprikar y col. (13), para la aglutinina de *Pisum Sativum*, purificada por un método similar. Estos autores encontraron un máximo de absorbancia a 280 milimicras y un mínimo de 252 milimicras.

CROMATOGRAFIA SOBRE DEAE CELULOSA Y EVALUACION
DEL CROMATOGRAMA

La caracterización de la aglutinina aislada del frijol Diacol Calima, por cromatografía DEAE celulosa con elución de gradiente entre pH 9.3 y 4.5 dio como resultado la separación de la proteína en seis grupos de fracciones cromatográficas.

El fraccionamiento de la proteína se hizo evidente por los seis picos de densidad óptica encontrados en la evaluación del cromatograma por espectrofotometría.

La densidad óptica se determinó en las siguientes condiciones:

Espectrofotómetro: Beckman DU.

Longitud de onda: 280 milimicras.

Lámpara de hidrógeno:

Sensibilidad: 2.0.

Rendija: 1.0.

Cada fracción cromatográfica efluente: 5 ml.

Rata de flujo: 15 ml./hora.

El cromatograma de la aglutinina se obtuvo graficando en las abscisas las fracciones cromatográficas efluentes, numeradas según el orden en que se colectaron, contra su respectiva densidad óptica.

Se encontró actividad hemoaglutinante positiva en cinco grupos de fracciones cromatográficas, correspondientes a los números: (2-7), (12-19), (37-40), (71-80), (96-98). Otras fracciones (55-59), presentaron hemoaglutinación solamente después de 24 horas.

Las fracciones cromatográficas que mostraron mayor densidad óptica también presentaron una reacción de aglutinación más potente, y aquellas fracciones de menor absorbancia, se encontraron exentas de actividad hemoaglutinante. La mayor potencia hemoaglutinante se encontró en la fracción (2-7).

Los anteriores resultados sugieren la presencia de cinco componentes hemoaglutinantes diferentes en el producto obtenido de la purificación del frijol Diacol Calima.

Varios investigadores han observado que más de una fracción hemoaglutinante puede estar presente en una misma variedad de *Phaseolus vulgaris*. Prager y Spper, 1959 (27), separaron el extracto de *Phaseolus vulgaris*, "McCaslan Pole bean", en varias fracciones proteicas por cromatografía sobre DEAE celulosa, en similares condiciones experimentales. El cromatograma desarrollado por estos autores, presentó cinco picos de absorbancia, pero

encontraron actividad hemoaglutinante positiva, sólo en tres grupos de fracciones cromatográficas.

Stead y Muelenaere, 1966 (29), separaron las proteínas obtenidas por purificación de *Phaseolus vulgaris*, "Natal Round Yellow bean", por cromatografía sobre DEAE celulosa, en siete grupos de fracciones. Tres grupos de fracciones presentaron actividad hemoaglutinante significativa y uno de éstos mostró mayor potencia hemoaglutinante.

Posteriormente, Takahashi y col., 1967 (30), fraccionaron el extracto de *Phaseolus vulgaris*, "Sure Crop Stringless Was", en dos proteínas diferentes, por cromatografía sobre DEAE celulosa. La fracción más activa se separó en dos componentes hemoaglutinantes por posterior cromatografía.

Otros autores, usando el mismo método de purificación, por electroforesis, han demostrado la presencia de diversos componentes hemoaglutinantes: Jaffe y Gaede, 1959 (18), demostraron dos fracciones hemoaglutinantes en la variedad "Black Kidney bean", y las denominaron Phaseolotoxina A y B. La fracción B se separó en tres componentes hemoaglutinantes. Posteriormente, Jaffe, 1960 (15), separó esta fracción en cinco proteínas activas.

Usando el mismo método, Jaffe, 1962 (16), separó el extracto de la variedad "Black bean" en cuatro fracciones hemoaglutinantes: A, B, C, E. La fracción B, por cromatografía sobre CM-celulosa se separó en tres componentes hemoaglutinantes. Jaffe y Hanning, 1965 (19), encontraron dos aglutininas diferentes en la caraota negra, cultivada en Venezuela. Una de estas aglutininas presentó mayor estabilidad y potencia hemoaglutinante.

Cada uno de los autores anteriormente citados informa resultados diferentes. Igualmente todos estos resultados difieren de los encontrados en la presente investigación, probablemente por tratarse de variedades distintas de *Phaseolus vulgaris*.

ACTIVIDAD TOXICA DE *PHASEOLUS VULGARIS* Y SU ANULACION POR EL CALOR

a) *Toxicidad oral en ratas.*

El frijol crudo de cada una de las variedades Diacol Calima y Frijol Negro, al ser incorporado en la dieta suministrada como alimento para ratas, causó efectos tóxicos, ya que produjo pérdida de peso y muerte de todos los animales experimentales (tabla V).

Se observó que los grupos de ratas alimentadas con dietas de Frijol Negro crudo (grupos 4 y 5), presentaron mayor pérdida de peso corporal, menor tiempo de supervivencia, y menor consumo de alimento, comparativamente con los grupos alimentados con dietas de frijol Diacol Calima crudo (grupos 1 y 2), cuya pérdida de peso, tiempo de supervivencia, y consumo de alimento, presentaron la diferencia anotada.

Los animales alimentados con dietas de frijol crudo de las dos variedades, presentaron notable diferencia de tamaño, respecto a los alimentados con la dieta control (grupos 6 y 7).

La mortalidad fue nula cuando los frijoles se sometieron a cocimiento (110°C., 30 minutos), previo remojo en agua (24 horas). En estos experimentos, las ratas alimentadas con frijol

TABLA V

Relación de la dieta de frijol con peso corporal, páncreas, bazo y mortalidad en ratas.

Frijol de cada dieta (50%)	Número de ratas	Cambio de peso/día (1*)	Consumo de dieta/día (1*)	Mortalidad Tiempo de supervivencia (2*)	Ratas muertas por total ratas	Peso del páncreas/peso corporal (3*)	Peso del bazo/peso corporal (3*)
		g./día	g./día	Días		g./g.	g./g.
<i>Grupos 1 y 2.</i>							
Frijol Diacol Calima crudo . . .	10	- 2,10	6,67	14,0	10/10	0,450	0,189
<i>Grupos 2 y 3.</i>							
Frijol Diacol Calima cocido . . .	10	+ 2,11	13,08	30	0/10	0,330	0,306
<i>Grupos 3 y 4.</i>							
Frijol Negro crudo	10	- 2,23	6,18	12,0	10/10	0,481	0,168
<i>Grupos 5 y 6.</i>							
Frijol Negro cocido	10	+ 1,87	11,50	30	0/10	0,378	0,283
<i>Grupos 6 y 7.</i>							
Dieta control, sin frijol, con caseína	10	+ 3,92	20,20	30	0/10	0,260	0,456

1 * Promedio de 10 ratas de dos grupos, cada grupo formado por cinco animales, todos con la misma dieta.

2 * El experimento se realizó durante 30 días, con los animales que sobrevivieron. Al final de este tiempo, todos se sacrificaron y se les practicó la autopsia.

3 * Se relaciona el peso del páncreas o el peso del bazo, al peso del cuerpo de cada animal al morir, se multiplica por 100. El promedio de los datos obtenidos de 10 ratas con el mismo alimento, figura en la tabla.

Diacol Calima cocido (grupos 2 y 3), presentaron mayor aumento de peso corporal (+ 2,11 g./día), y mayor consumo de alimento (13,08 g./día), que las ratas alimentadas con dietas de Fríjol Negro cocido (grupos 5 y 6), las que sólo presentaron un aumento de peso corporal (+ 1,87 g./día), y un consumo de alimento (11,5 g./día). Sin embargo, se observó que el aumento de peso corporal en estos grupos fue inferior al encontrado en las ratas alimentadas con la dieta control (+ 3,91 g./día). Similarmente, el consumo de alimento en los grupos con las dietas de frijol crudo o cocido, de las dos variedades, fue notablemente inferior, comparativamente con el observado en el grupo control (20,2 g./día).

Los resultados de los grupos de ratas alimentadas con dietas de Frijol Negro, crudo o cocido, comparativamente con los observados en los grupos con dietas de frijol Diacol Calima, crudo o cocido, sugieren una mayor toxicidad oral del Frijol Negro.

Varios investigadores han informado que las dietas de diversas variedades de *Phaseolus vulgaris*, crudo o insuficientemente cocido, producen pérdida de peso y muerte en animales experimentales.

Los resultados encontrados en los grupos de ratas alimentadas con dietas de las dos variedades colombianas de *Phaseolus vulgaris*, están de acuerdo con los reportados por: Jaffe (14), en la variedad Orlandilla, cultivada en Venezuela, Jaffe y Camejo (17), en las caraoatas negras venezolanas, Kakade y Evans (21, 22, 23), en la variedad "Sanilac", Honavar y col. (12), en las variedades "Black Parramos bean" (Guatemala) y "Red Kidney bean" (Minnesota), y Jaffe y Vega (20), en las variedades "Black Kidney bean" y "Red Kidney bean".

Kakade y Evans (21), han sugerido que el contenido de metionina en *Phaseolus vulgaris*, o la poca utilización de este aminoácido, por los animales alimentados con estas legumbres crudas (22), puede causar parcialmente la toxicidad oral del frijol. En el presente trabajo todas las dietas de frijol, en las dos variedades, Diacol Calima y Frijol Negro, contenían metionina (0,3% gm.). Sin embargo, el suplemento de este aminoácido no redujo la mortalidad en las ratas con dietas de frijol crudo, ni mejoró el aumento de peso corporal de los animales con dietas de frijol cocido. Estos resultados son similares a los informados por Jaffe y Vega (20) en ratas alimentadas con frijol crudo o cocido, de las variedades "Black Kidney bean" y "Red Kidney bean".

La relación del peso del páncreas al peso corporal, en las ratas alimentadas con dietas de frijól crudo, en las variedades Diacol Calima o Frijol Negro (tabla V, grupos 1 y 2, 3 y 4), se presentó superior a la observada en los grupos con dietas de frijól cocido (grupos 2 y 3, 5 y 6), y a su vez esta relación se observó superior a la encontrada en las ratas alimentadas con dieta control (grupos 6 y 7). Similarmente, la relación del peso del bazo al peso corporal, en las grupos con dietas de frijól crudo o cocido, de las dos variedades, se presentó inferior comparativamente con la observada en el grupo control.

Jaffe y Vega (20) informaron que las ratas alimentadas con frijól crudo de las variedades "Black Kidney bean" y "Red Kidney bean" presentaron hipertrofia pancreática y disminución del peso del bazo, comparativamente con las ratas alimentadas con dieta control. Estos resultados están de acuerdo con los encontrados en el presente trabajo.

Wagh y col. (32), Hintz y Hogue (9), encontraron hipertrofia pancreática en pollos alimentados con frijól crudo, "Red Kidney bean". Informaron que este efecto solamente se eliminó por cocimiento del frijól (121°C. 30 minutos). Estos autores opinan que en el frijól crudo existe un factor termolábil, denominado inhibidor de tripsina, el cual inhibe la actividad proteolítica de la enzima tripsina y produce como respuesta compensatoria un páncreas hiperactivo, que provoca pérdida de aminoácidos esenciales y, en general, una reducción de la utilización de las proteínas del frijól, causando así los efectos tóxicos mencionados (24).

Jaffe (14) y Honavar y col. (12) observaron que para suprimir la toxicidad oral en diferentes variedades de *Phaseolus vulgaris*, fue necesario remojarlos en agua durante 24 horas y someterlos a cocimiento durante 30 minutos. Estos resultados están de acuerdo con los encontrados en las variedades colombianas, ya que este tratamiento evitó la pérdida de peso corporal de las ratas y la mortalidad de las mismas.

Kakade y Evans (22) y Hintz y col. (10) informaron que el cocimiento de los frijoles (121°C., 10 a 30 minutos, respectivamente), sin previo remojo en agua, fue suficiente para anular la toxicidad oral en las variedades "Sanilac" y "Red Kidney bean".

La divergencia de estos resultados entre variedades de una misma especie muestra la importancia de conocer las condiciones adecuadas de cocimiento de los frijoles, que asegure la anulación

de la actividad tóxica oral, ya que se han reportado casos de intoxicación humana por el consumo de los mismos, insuficientemente cocidos, o cocidos en condiciones inadecuadas (7, 11).

El efecto del calor respecto a la anulación de la toxicidad oral en las variedades Diacol Calima y Frijol Negro sugiere la presencia de uno o más factores tóxicos termolábiles en estas legumbres.

b) *Toxicidad intraperitoneal de las aglutininas de Phaseolus vulgaris.*

Los resultados encontrados en el ensayo de toxicidad intraperitoneal de las aglutininas aisladas de las variedades Diacol Calima y Frijol Negro, se anotan en la tabla VI.

TABLA VI

Toxicidad intraperitoneal de la aglutinina de Phaseolus vulgaris.

Aglutinina de:	Nº de ratas	Dosis mg./rata *	Dosis mg./rata	Nº ratas muertas Nº total ratas
Frijol Diacol Calima	10	10	200	0/10
	10	20	400	4/10
	10	30	600	8/10
	10	40	800	10/10
Frijol Negro	10	10	200	0/10
	10	20	400	6/10
	10	30	600	10/10
	10	40	800	10/10

* Peso de cada rata: 50.0 g.

La aglutinina del Frijol Negro provocó la muerte de todos los animales experimentales cuando se inyectó intraperitonealmente en una concentración de 600 mg./kg. de rata, con intervalo de 20 horas entre la inoculación y la muerte. La aglutinina aislada del frijol Diacol Calima, produjo esta misma mortalidad (100%) cuando se inyectó intraperitonealmente en ratas en dosis de 800 mg./kg. de rata, después de 23 horas de la inoculación.

Según estos resultados, la aglutinina purificada del Frijol Negro presentó mayor toxicidad intraperitoneal en ratas que la aglutinina purificada del frijol Diacol Calima.

Varios investigadores han informado resultados similares en las aglutininas aisladas de diversas variedades de *Phaseolus vulgaris*.

Jaffe y Gaede (18), encontraron en las aglutininas purificadas de la variedad "Black Kidney bean" actividad tóxica intraperitoneal en ratas. Jaffe (16) confirmó los resultados de estos autores. Posteriormente Jaffe (15) demostró que las aglutininas del frijol "Black bean", purificadas por el método de Rigas y Osgood (28), son tóxicas por la vía intraperitoneal en ratas y ratones. Estos resultados están de acuerdo con los observados en las aglutininas de las dos variedades de frijol colombianas, purificadas por el mismo método.

Los resultados de la actividad intraperitoneal de las aglutininas están de acuerdo con la mayor toxicidad oral observada en el Frijol Negro, y sugieren que las aglutininas presentes en el frijol son en gran parte responsables de la toxicidad oral de estas legumbres. Por otra parte, la toxicidad oral del frijol se anuló por calentamiento, el cual a la vez anuló la actividad hemoaglutinante de las proteínas aisladas de las dos variedades de *Phaseolus vulgaris* cultivadas en Colombia.

c) Cambios patológicos.

Las ratas alimentadas con dietas de Frijol Negro crudo, y frijol Diacol Calima crudo, presentaron lesiones patológicas similares. En estos animales se observaron los siguientes cambios patológicos *:

Cianosis generalizada del tejido subcutáneo y de la mucosa ocular y bucal; edema subcutáneo generalizado; riñones congestionados en su zona cortical y medular; región sub-capsular y porción de la pelvis renal ligeramente edematosa. Histológicamente se observó infiltración linfocitaria en la porción superficial de la corteza y en la zona medular. En la parte externa del estómago y en el intestino se encontraron algunos focos hemorrágicos y ligero edema de la pared. Dilatación intestinal por el contenido gaseoso, especialmente en el colon. Páncreas congestionado, hipertrófico y edematoso. En algunos casos se observaron hemorragias focales petequiales.

Histológicamente se encontró: congestión y hemorragia focal; edema interlobular e intercinar; ligera atrofia de algunos islotes de Langerhans. El bazo se observó disminuido respecto a su tamaño normal. Histológicamente se encontró depleción de los centros

* Necropsias y exámenes histopatológicos realizados por el Programa de Patología. ICA.

germinales. Hígado congestionado e hipertrófico. La porción central del parénquima hepático ligeramente congestionada. Se presentó una coloración bastante oscura, por congestión de los sinusoides y de las venas centrales de los lobulillos hepáticos. Pulmón congestionado y edematoso. Histológicamente se observó congestión pulmonar y ligero edema interalveolar. Se observó ligera congestión en el miocardio. El epicardio, ligeramente hemorrágico; igualmente el endocardio.

En el cerebro y cerebelo se observó ligera congestión, siendo más notoria en las folias cerebelares.

Las ratas inoculadas intraperitonealmente con la solución de las aglutininas aisladas de cada una de las variedades Diacol Calima y Fríjol Negro, presentaron lesiones patológicas similares. En estos animales se observó el hígado congestionado e hipertrófico. Ascitis, hidrotórax y congestión generalizada. Marcada congestión meníngea.

Los cambios patológicos observados en las ratas muertas por ingestión de los frijoles crudos indican una vasodilatación y un aumento de la permeabilidad capilar, lo cual produce el edema generalizado observado en todos los animales, y explica los focos hemorrágicos encontrados en los diversos órganos.

El aumento de peso del páncreas (tabla V), se explica por el edema interacinar e interlobular, comprobado histológicamente, y no por un páncreas hipertrófico e hiperactivo.

Aparentemente hay una contracción esplénica que produce una depleción sanguínea de los sinusoides espléncicos, causando, a su vez, congestión de algunos órganos.

El aumento de la permeabilidad capilar y la vasodilatación producen disminución de la motilidad gastrointestinal, lo cual disminuye la absorción de los alimentos y explica el poco aumento de peso de estos animales.

Las aglutininas, en inyección intraperitoneal, produjeron cambios patológicos similares a los observados en las ratas intoxicadas oralmente, ya que la congestión y el edema generalizado son comunes en los dos casos. En estos casos, la vasodilatación periférica produjo el shock y la muerte de los animales.

Varios investigadores han reportado diversas opiniones respecto a la toxicidad encontrada en algunas variedades de *Phaseolus vulgaris*, y no se ha establecido si la actividad hemoaglutinante y tóxica se debe a uno o varios factores presentes en el frijol.

Honavar y col. (12) y Jaffe (15), demostraron que las aglutininas de *Phaseolus vulgaris*, en gran parte son responsables de la toxicidad oral de estas legumbres. Las proteínas hemoaglutinantes purificadas por estos autores presentaron toxicidad al ser incorporadas en una dieta adecuada para ratas. Las dos actividades, hemoaglutinante y tóxica, fueron anuladas por el calor, por lo cual los autores concluyeron que son producidas por una misma sustancia.

Jaffe (15) demostró que las aglutininas reducen la absorción intestinal de los alimentos, y explicó que las actividades, la hemoaglutinante y la tóxica, se deben a la reacción de las aglutininas con las membranas celulares. Jaffe y Camejo (17) comprobaron que en la caraota cruda existe un factor termolábil, identificado con la aglutinina, cuya presencia en una dieta adecuada para ratas disminuye la absorción intestinal de glucosa y produce reducción de la absorción de las proteínas. Jaffe (15, 16, 17) sugirió que la toxicidad oral causada por la ingestión de las aglutininas del frijol que las contiene puede explicarse porque estas sustancias pueden combinarse con las células de la pared intestinal e interferir con la absorción intestinal de todos los nutrientes.

Wagh y col. (32) sugieren que la toxicidad oral del frijol "Red Kidney bean" en pollos, puede explicarse por la presencia de factores hemoaglutinantes e inhibidores de tripsina, y no excluyen la posibilidad de otros factores tóxicos termoestables.

Kakade y Evans (21, 22) explicaron la toxicidad oral del frijol crudo de la variedad "Sanilac" por el bajo consumo de alimento y por la reducción en la absorción de aminoácidos esenciales, y sugieren que estos efectos pueden ser causados por factores tóxicos producidos por las aglutininas y por los inhibidores de tripsina.

Hintz y col. (10), encontraron que los efectos tóxicos en ratas alimentadas con frijol crudo "Red Kidney bean" se deben en gran parte a la reducción en la absorción intestinal de glucosa, ya que todos los animales tenían hipoglicemia. Según estos autores, la hipoglicemia puede ser causada por la disminución del consumo de alimento y la poca utilización de éste, debido a la baja digestibilidad de las proteínas del frijol crudo. Atribuyen estos efectos a la interferencia de las aglutininas con la absorción intestinal.

CONCLUSIONES

El estudio comparativo de la actividad hemoaglutinante de las variedades colombianas de *Phaseolus vulgaris* Diacol Calima, Ica

Tuí, Diacol Catio, Ica Cuna y Fríjol Negro, línea 20561-M (3)-7 m., indicó:

1. Todas las variedades de fríjol analizadas contienen aglutininas, ya que sus extractos salinos aglutinaron eritrocitos de cobayos, conejos y ratas.

2. Se comprobó menor potencia hemoaglutinante en las variedades Diacol Catio e Ica Cuna, lo cual demostró que entre diferentes variedades de una misma especie de *Phaseolus vulgaris* existe gran variación en sus propiedades hemoaglutinantes.

3. Los títulos hemoaglutinantes en sangre de cobayo demostraron la presencia de dos potentes aglutininas en las variedades Diacol Calima y Fríjol Negro, por lo cual fueron seleccionadas para el presente estudio. Estas variedades presentaron actividad hemoaglutinante para los grupos sanguíneos humanos (A, B, AB, O), y sus correspondientes grupos Rh (positivos y negativos). En medio salino los extractos de estos frijoles no mostraron especificidad para los antígenos humanos mencionados. Las aglutininas aisladas de estas variedades de fríjol podrían usarse para la preparación de suspensiones de leucocitos humanos.

4. Las aglutininas obtenidas de cada una de las variedades Diacol Calima y Fríjol Negro, por precipitación fraccionada con sulfato de amonio y diálisis, presentaron las siguientes características similares:

a) Su solubilidad en ácidos y bases demostró un carácter anfotérico propio de las proteínas.

b) Reaccionaron positivamente en los siguientes ensayos cualitativos para proteínas: Reacción de coagulación, reacción xantoproteica, reacción de Millon y reacción de Biuret.

c) La aglutinina aislada de la variedad Diacol Calima (4,0 g./Kg. de frijol), presentó un contenido de nitrógeno de 14,48 por ciento g. y la aglutinina del Fríjol Negro presentó un contenido de 14,15 por ciento g. de nitrógeno.

d) Estas aglutininas permanecieron estables durante un año a temperatura de 4°C., pero su actividad aglutinante se destruyó por ebullición durante una hora.

e) El espectro de absorción ultravioleta de la aglutinina purificada de las variedades Diacol Calima y Fríjol Negro presentó para cada una de estas sustancias en solución acuosa un máximo de

absorbancia a 280 milimicras y un mínimo entre 150 y 155 milimicras, lo cual es un espectro característico para proteínas.

5. La caracterización de la aglutinina aislada del frijol Diacol Calima por cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE celulosa, y la evaluación del cromatograma por espectrofotometría y hemoaglutinación demostró la separación de ésta en seis fracciones, cinco de ellas con actividad hemoaglutinante.

6. a) Se comprobó que la ingestión de dietas con frijol crudo de las variedades Diacol Calima o Frijol Negro, causó efectos tóxicos en ratas, que se manifestaron por pérdida de peso y muerte de todos los animales experimentales entre 10 y 14 días. Aun cuando la toxicidad se anuló por cocimiento de los frijoles (110°C. 30 minutos), con previo remojo en agua (24 horas), las ratas, alimentadas con dietas de frijol cocido de las dos variedades, presentaron menor aumento de peso corporal que las ratas alimentadas con dieta control.

b) Las aglutininas aisladas de estas variedades de frijol también mostraron toxicidad, ya que causaron la muerte de todos los animales experimentales, al ser inyectadas intraperitonealmente (600-800 mg.).

c) Los cambios patológicos observados en los animales intoxicados oralmente por la ingestión de frijol crudo y los observados en los animales muertos por inoculación intraperitoneal de las aglutininas son similares, ya que la vasodilatación, el aumento de la permeabilidad capilar y el edema generalizado son comunes en los dos casos. En ambos casos la vasodilatación periférica produjo el shock y la muerte de los animales. Por otra parte, la mayor actividad tóxica intraperitoneal de la aglutinina del Frijol Negro está de acuerdo con la mayor toxicidad oral de ésta, y la acción del calor sobre las aglutininas del frijol o sobre éstos, sugiere que estas sustancias son responsables, por lo menos en gran parte, de la toxicidad oral de estas legumbres.

RESUMEN

La elección del material botánico según su actividad hemoaglutinante se realizó entre las siguientes variedades de *Phaseolus vulgaris*: Diacol Catio, Ica Cuna, Ica Tuí, Diacol Calima y Frijol Negro, línea 20561-M (3) 7 m. Entre éstas, las variedades Diacol

Calima y Frijol Negro fueron seleccionadas para el presente estudio por su mayor actividad hemoaglutinante en sangre de cobayo; con los extractos de estas variedades de frijón se investigó la actividad hemoaglutinante en sangre humana. En medio salino, las dos variedades de frijón presentaron potente actividad hemoaglutinante para los grupos sanguíneos humanos (A, B, AB, O) y sus respectivos grupos Rh (positivos y negativos). No se encontró selectividad para los antígenos humanos mencionados.

Se purificaron las aglutininas de las variedades de frijón Diacol Calima y Frijol Negro, por precipitación fraccionada con sulfato de amonio, diálisis y liofilización. A estas aglutininas se les practicaron los siguientes ensayos:

- a) Clasificación por solubilidad.
- b) Ensayo de precipitación.
- c) Ensayos cualitativos para proteínas.
- d) Contenido de nitrógeno por el método de Kjeldahl.
- e) Espectro de absorción ultravioleta.

f) La aglutinina aislada del frijón Diacol Calima se caracterizó por cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE celulosa, con gradiente de elución entre pH 9,3 y 4,5; la evaluación del cromatograma se efectuó por espectrofotometría y hemoaglutinación.

Se practicaron ensayos de toxicidad oral con las variedades Diacol Calima y Frijol Negro, incorporadas en la dieta suministrada como alimento para ratas. Estos frijoles en estado crudo causaron la muerte de todos los animales experimentales en pocos días. La toxicidad se anuló por cocimiento de los frijoles (110°C., 30 minutos, previo remojo en agua por 24 horas).

Se practicaron ensayos de toxicidad intraperitoneal de las aglutininas aisladas de estos frijoles, por inoculación en ratas. Estas aglutininas fueron tóxicas intraperitonealmente.

Se estudiaron los cambios patológicos en todos los animales experimentales. Se concluyó que las aglutininas presentes en el frijón son responsables de su toxicidad. Sin embargo, no se excluye la posibilidad de otros factores tóxicos.

SUMMARY

Among the varieties of red beans, *Phaseolus vulgaris*, namedas Diacol Catio, Ica Cuna, Ica Tuí, Diacol Calima and Frijol Negro

(black beans) line 20561-M (3) 7 m., the Diacol Calima and Frijol Negro varieties were selected for their greater hemoagglutinant activity in guinea pig blood. The hemoagglutinant activity in human blood was determined. The two varieties showed a great hemoagglutinant activity in saline medium for blood types A, B, AB, O (negative and positive Rh factor). The extracts did not show selectivity for the human antigens above mentioned. The agglutinins were purified by fractionated precipitation with ammonium sulphate, dialysis and freeze-drying. The agglutinins were analyzed for solubility, precipitation, proteins, nitrogen content and U. V. absorption. The agglutinin from Diacol Calima was characterized by ion exchange chromatography with DEAE-cellulose, with elution gradient from pH 9,3 to pH 4,5. The chromatogram was evaluated by spectrophotometry and hemoagglutination.

The crude red beans were incorporated in the normal diet of rats. The beans killed all the animals in a few days. The toxic effect was eliminated by cooking at 110°C x 30 min. after previous soaking in water during 24 hr. The isolated agglutinins were administered intraperitoneally to rats. They showed clear toxic effects. The pathological changes in the animals were studied. Based on the results we can say that the agglutinins are responsible for the toxicity of the beans, although other possible toxic agents can not be disregarded.

RÉSUMÉ

Une étude préliminaire de l'activité hémagglutinante des espèces Diacol Catio, Ica Cuna, Ica Tuí, Diacol Calima et Haricot Noir, lignée 20561-M (3) 7 m., vis à vis du sang de cobaye, nous ayant montré que Diacol Calima et Haricot Noir sont les plus actives, nous avons utilisé ces deux espèces pour déterminer leur action sur le sang humain.

En milieu salin, on a observé une forte activité vis à vis des groupes A, B, AB et O ainsi que des groupes Rh positifs et négatifs respectifs. Par contre, ces antigènes humains ne montrent pas de sélectivité.

Les agglutinines furent purifiées par précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium, dialyse et liophylisation et leur étude complétée par une classification selon la solubilité, les essais de précipitation, les caractéristiques qualitatives des protéines, l'N

total par Kjeldahl et les spectres d'absorption UV et finalement caractérisées par chromatographie d'échange ionique entre pH 9,3 et 4,5. Le chromatogramme a été évalué par spectrophotométrie UV et hémagglutination.

Les essais de toxicité orale sur rats, par incorporation des haricots crues dans la diète a provoqué la mort de tous les animaux au bout de quelques jour. Cette toxicité peut être éliminée par trempage des haricots durant 24 h. dans l'eau suivi d'une coction a 110°C, pendant 30 minutes.

De même, les extraits sont toxiques par inoculation intrapéritonéale. Les modifications pathologiques observées sur tous les animaux soumis a l'expérience ont permis de conclure que la toxicité est due aux agglutinines présentes, sans pour cela exclure l'existence d'autres facteurs toxiques.

BIBLIOGRAFIA

1. BIRD, G. W. G. Brit. Med. Bull. 15, p. 165-168. (1959).
2. BOYD, W. C. Vox Sanguinis. 8, p. 1-32. (1963).
3. CALDERÓN GÓMEZ, E. Curso de Química Orgánica. Primera Parte, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. E., p. 434-435. (1959).
4. CALDERÓN GÓMEZ, E. y GAVIRIA, E. E. Conferencias de Análisis Químico Aplicado., Fac. de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. E. (1958).
5. CHERONIS, N. D., and ENTRINKIN, J. B. Semimicro Qualitative Organic Analysis, 2nd Edition. Interscience. Publ. Co. (1957).
6. DAVIDSOHN, I y WELLS, B. Diagnóstico Clínico, por el Laboratorio. Tood-Sanford. Cuarta Edición española. Traducción de la Edición Decimotercera Americana, por el Dr. Jorge Mota Revetllat. Editorial Marín, S. A., Barcelona. p. 264-323.
7. FASCHINGBSUER, H., and KOFLER, L. Wien. Klin. Wochchr. 42, p. 1069-1072. (1929).
8. FROBISHER, M., Sc. D. Microbiología Médica. 3ª Edición. Salvat Editores, S. A., Barcelona, p. 338-353. (1964).
9. HINTZ, H. and HOGUE, D. E. Jour. Nutr. 84, p. 283-186. (1964).
10. HINTZ, H., HOGUE, D. E. and KROOK, L. Jour. Nutr. 93, p. 77-86 (1967).
11. HOGUE, D. E., PROCTOR, J. F., and WARNER, F. Jour. of Animal Science. 21, p. 25-29. (1962).
12. HONAVAR, P. M., SHIH, C., and LIENER, I. Jour. Nutricional. 77, p. 109-113. (1962).
13. HUPRIKAR, S. V., and SOHONIE, K. Enzymología. 28, p. 333-345. (1965).
14. JAFFE, W. G. Experientia. 5, p. 81. (1949).
15. JAFFE, W. G. Arzneimittel Forsch. 10, p. 1012-1016. (1960).
16. JAFFE, W. G. Experientia. 18, p. 76-77. (1962).
17. JAFFE, W. G. y CAMEJO, G. Acta Científica Venezolana. 12, p. 59. (1961).

18. JAFFE, W. G., and GAEDE, K. *Nature*. *183*, p. 1329-1330. (1959).
19. JAFFE, W. G., and HANNIG, K. *Arch. Biochem. Biophys.* *109*, p. 80-90. (1965).
20. JAFFE, W. G., and VEGA LETTE, C. *The Journal of Nutritional.* *94*, p. 203-210. (1968).
21. KAKADE, M. L., and EVANS, R. J. *Brit. Jour. Nutr.* *19*, p. 269. (1965 b).
22. KAKADE, M. L., and EVANS, R. J. *Jour Nutrition.* *90*, p. 191. (1966).
23. LANDSTEINER, K., and RAUBISTECK, H. *Zbl. Bakt.* *45*, p. 660-667. (1908). Citado a partir de *Jour. Pharmaco. Suppl.* *17*, p. 118-125. (1965).
24. LIENER, I. E. *American Journal of Clinical Nutrition.* *11*, p. 281-290. (1962).
25. MORRIS, C. J. O. R. and MORRIS, P. *Separation Methodes in Biochemistry.* Sir Isaac Pitman & Sons, L. T. D. London. (1964).
26. OSBORNE, T. *Jour. Am. Chem. Soc.* *16*, p. 633 y 757. (1894). Citado a partir de *Arch. Biochem. Biophys.* *109*, p. 80-90. (1965).
27. PRAGER, M., and SPEER, R. J. *Proc. Soc. Explitl. Biol. Med.* *100*, p. 68-70. (1959).
28. RIGAS, A. and OSGOOD, C. *Jour. Biol. Chem.* *212*, p. 607-610. (1955).
29. STEAD, R. H., DE MUELENAERE, H. J., and QUICKE, G. V. *Arch. Biochem. Biophys.* *113*, p. 703-707. (1966).
30. TAKAHASHI, T., RAMACHANDRAMURTHY, P., and LIENER, I. *Biochimica et Biophysica Acta.* *133*, p. 123-1331. (1967).
31. TOMS, G. and TURNER, T. D. *Jour. Pharm. Pharmacol. Suppl.* *17*, p. 118-125. (1965).
32. WAGH, P., KLAUSTERMEIER, D., WAIBEL, P., and LIENER, I. *Jour. Nutrition.* *80*, p. 191-195. (1963).