

Contenido de aflatoxinas y proteína en 13 variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)*

Aflatoxin and protein content in 13 bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties

Silvia Denise Peña-Betancourt¹ y Víctor Conde-Martínez²

¹Laboratorio de Toxicología. Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, México. C. P. 04210. ²Laboratorio de bioquímica. Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco, km 36.5. Montecillo, Estado de México. C. P. 56230. (vconde@colpos.mx). ³Autora para correspondencia: spena@correo.xoc.uam.mx.

Resumen

En México el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es una semilla leguminosa de elevado consumo (11 kg per cápita anualmente), por lo que su cultivo es amplio en diferentes regiones. En este estudio se determinó la presencia de aflatoxinas en ocho variedades de frijol común y cinco variedades de frijol mejorado; además del contenido de proteína y humedad. En todas las variedades evaluadas el contenido de humedad mostró grandes variaciones (6 a 16%), encontrándose 16% de las variedades estudiadas fuera de la normatividad (<12%). El mayor contenido de proteína se detectó en las variedades de frijol mejoradas (26.1%) y el más bajo en las variedades comerciales (19.8%, ± 3.09) y silvestres (20.78% ± 1.93). Todas las variedades presentaron aflatoxinas en un promedio de 7.46 ng g⁻¹ y un intervalo de 5 a 13 ng g⁻¹. El nivel más alto de contaminación se observó en las variedades de frijol mejoradas (9.2 ± 2.9 ng g⁻¹), seguidas de las variedades comerciales 7.25 ± 0.95 ng g⁻¹ y las variedades silvestres 6 ± 1 ng g⁻¹. Se detectaron taninos en las variedades de frijol silvestre en un nivel de 0.44% ± 0.13 . Los resultados obtenidos confirman la presencia de compuestos tóxicos y antinutricionales en las diferentes variedades de frijol común y silvestre, en niveles permitidos por la legislación nacional; sin embargo, pueden constituir un riesgo a la salud del consumidor, debido a su alto consumo.

Abstract

In Mexico, the bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a highly consumed legume seed (11 kg per capita annually), so that its cultivation it's quite extensive in different regions. In this study we investigated the presence of aflatoxins in eight common bean varieties and five improved bean varieties, in addition to protein and moisture. In all the varieties tested, the moisture content showed large variations (from 6 to 16%), being 16% of the varieties studied outside the normal (<12%). The highest content of protein was detected in the improved bean varieties (26.1%) and, the lowest in commercial (19.8% ± 3.09) and wild varieties (20.78% ± 1.93). All of them showed aflatoxins on average of 7.46 ng g⁻¹ and a range from 5 to 13 ng g⁻¹. The highest level of contamination was observed in the improved bean varieties (9.2 ± 2.9 ng g⁻¹), followed by the commercial ones ± 0.95 7.25 ng g⁻¹ and wild varieties 6 ± 1 ng g⁻¹. Tannins were detected in wild bean varieties at a level of 0.44% ± 0.13 . The results obtained confirm the presence of toxic and anti-nutritional compounds in the different varieties of common and wild beans at levels permitted by national law, but may pose a risk to the consumer's health due to its high consumption.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L., *Phaseolus coccineus* L., toxic and anti-nutritional substances.

* Recibido: agosto de 2011
Aceptado: diciembre de 2011

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris* L., *Phaseolus coccineus* L., sustancias tóxicas y antinutricionales.

Introducción

En México el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo ampliamente difundido, debido que se utilizan 2.3 millones de hectáreas y se producen 1.12 millones de toneladas al año, por lo que se considera el segundo cultivo en importancia comercial después del maíz (Barrios *et al.*, 2010). Las distintas variedades de frijol común difieren en tamaño, color y contenido de proteína (Castillo *et al.*, 2006). Las variedades de frijol comerciales son principalmente, Garbancillo, frijol Negro, Peruano, Flor de Mayo y Flor de Junio (Singh, 2006). Las variedades mejoradas conocidas son: Ayocote Morado, Ayocote Café, Tzama; entre las variedades silvestres, frijol Oaxaca Chico, Durango Típico, Durango Atípico, Tlaxcala Típico y Tlaxcala Atípico.

En las variedades de frijol, existe poca información sobre la presencia de compuestos tóxicos como son las aflatoxinas, sustancias químicas producto del metabolismo secundario de hongos patógenos termotolerantes y microtermofílicos como *Aspergillus tamari*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus nomis*, hongos patógenos que disminuyen la calidad física y contenido energético de la semilla y ocasionan problemas de salud en el consumidor, por sintetizar aflatoxinas del tipo B y G, sustancias químicas que afectan el sistema inmune, además de su poder hepatotóxico y carcinogénico.

La presencia de sustancias antinutricionales como son los compuestos polifenólicos o taninos, han sido extensamente estudiados debido a su capacidad de interferir en la biodisponibilidad de la proteína (Iniestra *et al.*, 2005), ya que los taninos se unen a las proteínas formando compuestos insolubles e indigestibles para el consumidor. Los taninos han sido reportados en niveles desde 0.8% hasta 12%. La calidad e inocuidad es un principio básico en la agricultura moderna, así como la selección de la semilla en los programas de fitomejoramiento. Por lo que el objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de aflatoxinas relacionando su presencia con la humedad, proteína y genotipo de frijol.

Introduction

In Mexico, the bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is grown widely, 2.3 million hectares, producing 1.12 million tons per year, which is considered the second most important crop just after maize (Barrios *et al.*, 2010). The common bean varieties differ in: size, color and protein content (Castillo *et al.*, 2006). Known commercial bean varieties are Garbancillo, Frijol Negro, Peruano, Flor de Mayo and Flor de Junio (Singh, 2006). Known improved varieties are: Ayocote Morado, Ayocote Café, Tzama; among the wild beans, Frijol Oaxaca Chico, Durango Típico, Durango Atípico, Tlaxcala Típico and Tlaxcala Atípico.

Regarding the varieties of beans, there is little information on the presence of toxic compounds such as aflatoxins, chemicals products of secondary metabolism by fungal pathogens such as *Aspergillus tamari*, *Aspergillus flavus*, and *Aspergillus nomis*, pathogenic fungi that reduce the physical quality and energy content of the seed and cause health problems in the consumer, when synthesizing aflatoxin B and G type, chemicals that affect the immune system in addition to its hepatotoxic and carcinogenic power.

The presence of anti-nutritional substances such as tannins or polyphenolic compounds has been extensively studied because of its ability to interfere with the bioavailability of the protein (Iniestra *et al.*, 2005), and that Tannins bind to the proteins forming insoluble compounds, indigestible for the consumer. Tannins have been reported at levels from 0.8% to 12%. The quality and safety is a basic principle in modern agriculture and, the seed selection in breeding programs. The objective of this study was to determine the presence of aflatoxins relating their presence with moisture, protein and bean genotype.

Materials and methods

We used thirteen varieties of beans, four of them, commercial bean (Garbancillo, Peru, Flor de Mayo Flor and Flor de June), four improved varieties (Ayocote, Ayocote Café, Ayocote Morado and Tzama) and five wild varieties (Tlaxcala Típico, Tlaxcala Atípico, Oaxaca Chico, Durango Típico

Materiales y métodos

Se usaron trece variedades de frijol, cuatro de ellas, de frijol comercial (Garbancillo, Peruano, Flor de Mayo y Flor de Junio), cuatro de variedades mejoradas (Ayocote, Ayocote café, Ayocote morado y Tzama y cinco de variedades silvestres (Tlaxcala Típico, Tlaxcala Atípico, Oaxaca Chico, Durango Típico, Durango Atípico) procedentes de la cosecha 2005 y 2006; colectadas en el invernadero de botánica del Colegio de Posgraduados, en aproximadamente 2 kg de semilla en estado seco.

El invernadero presenta una temperatura máxima promedio de 31 °C y cuenta con riego a disposición. Se determinó el contenido de humedad (OMA, 1990), la presencia de taninos mediante la técnica colorimétrica de la gnetina y cloruro de sodio, y el nivel de taninos mediante la técnica espectrofotométrica de luz ultravioleta a una longitud de onda a 765 nm, de acuerdo con el manual de Peña (2000), en cinco variedades de frijol silvestre, los resultados se reportan como miligramos equivalentes de ácido tánico por gramo de muestra seca. El análisis de proteína se realizó con el método del Kjeldahl (AACC, 2000), por duplicado. Para el contenido de aflatoxinas se utilizó la técnica inmunoenzimática comercial que detecta la presencia de aflatoxinas y su concentración mediante una reacción sustrato-anticuerpo-enzima.

Los resultados de humedad, proteína y aflatoxinas fueron procesados utilizando el análisis de varianza de una vía y comparación de medias por el método de Tukey, usando el paquete estadístico PASW Statistics versión 18.

Resultados y discusión

En las variedades de frijol silvestre el contenido de humedad se encontró en el promedio más bajo (6%), siendo el frijol Oaxaca Chico el menor, contrariamente a lo observado con el frijol Tlaxcala Atípico. Las variedades de frijol comercial presentaron niveles de humedad promedio 7.9%, el frijol Garbancillo con el contenido más alto (10%) y las variedades mejoradas los más altos contenidos de humedad (13.24%). El contenido de proteína en las variedades de frijol silvestre se encontraron en promedio en 21.18%, el frijol Tlaxcala con el menor contenido (18.8%), mientras que las variedades de frijol comerciales y mejorados con 19.75% y 25.74% respectivamente (Cuadro 1).

and Durango Atípico) from the 2005 vintage and 2006, collected in the Botanical Conservatory Graduate School, about 2 kg of seed in dry state.

The greenhouse has an average maximum temperature of 31 °C and irrigation available. The moisture content was determined (OMA, 1990), the presence of tannin by colorimetric technique of the gelatin and sodium chloride, and the level of tannins by spectrophotometric technique of ultraviolet light at a wavelength of 765 nm, according to the manual of Peña (2000), five varieties of wild beans, the results are reported as mg tannic acid equivalents per gram of dry sample. Protein analysis was performed using the Kjeldahl method (AACC, 2000), in duplicate. For the aflatoxin content, a commercial immunoenzymatic technique was used that detects the presence of aflatoxins and their concentration by reacting-antibody-enzyme substrate.

The results of moisture, protein and aflatoxin were processed using analysis of variance and the comparison of means via Tukey method, using the statistical package SPSS version 18.

Results and discussion

In the wild bean varieties, moisture content was found in its lowest average (6%), with the lowest bean Chico Oaxaca, contrary to that observed with bean Tlaxcala Típico. Commercial bean varieties had levels of 7.9% average humidity; Garbancillo presented the highest content (10%) and the improved varieties the highest moisture content (13.24%). The protein content in wild bean varieties were found on average 21.18%, Tlaxcala bean had the lowest content (18.8%), while the commercial and improved bean varieties, 19.75% and 25.74% respectively (Table 1).

Wild beans varieties had the lowest levels of aflatoxin (6 ng g⁻¹), followed by commercial varieties (7.25 ng g⁻¹) and the improved varieties with 9.2 ng g⁻¹ (Table 2).

Tannins from the pyrogallol group were detected qualitatively and quantitatively within the wild bean varieties, with an average content of 4.4 mg g⁻¹ ± 1.39 (Table 3). As for the bean genotype and protein content, it showed no significant differences at all (p > 0.05). However, there was a significant difference between moisture content and aflatoxin (p ≤ 0.05) among the wild bean and improved, (6 ± 1.46, 12.8 ± 3.27, 6 ± 1 and 9 ± 2.92 ng g⁻¹) and commercial genotypes (7.25 ± 0.95 ng g⁻¹).

Cuadro 1. Contenido promedio de humedad y proteína en doce variedades de frijol.
Table 1. Average moisture content and protein in twelve varieties of beans.

Tipo	Variedad	Humedad (%)	Proteína cruda (%)
Silvestres (a)	Durango Atípico	6.7	23.29
	Durango Típico	5.1	22.31
	Oaxaca Chico	4.2	20.2
	Tlaxcala Atípico	8	18.82
	Tlaxcala Típico	6	19.3
Mejorados (a)	Ayocote	16.2	24.72
	Ayocote Café	10	19.01
	Ayocote Morado	10	35.19
Comerciales (a)	Flor de Mayo	15	25.51
	Peruano	6.2	18
	Garbancillo	10	18
	Flor de Junio	7.5	19

Las variedades de frijol silvestre presentaron el menor contenido de aflatoxinas (6 ng g⁻¹), seguidas por las variedades comerciales (7.25 ng g⁻¹) y las variedades mejoradas con 9.2 ng g⁻¹ (Cuadro 2).

En las variedades de frijol silvestre se detectaron cualitativamente y cuantitativamente taninos del grupo pirogalol, con un contenido promedio de 4.4 µg g⁻¹ ± 1.39 (Cuadro 3). En cuanto al genotipo de frijol y el contenido de proteína no se observaron diferencias significativas (*p* > 0.05). Sin embargo, hubo diferencia significativa entre el contenido de humedad y el contenido de aflatoxinas (*p* ≤ 0.05) entre los genotipos de frijol silvestre y mejorado, (6 ± 1.46, 12.8 ± 3.27, 6 ± 1 y 9 ± 2.92 ng g⁻¹) y comercial (7.25 ± 0.95 ng g⁻¹).

El menor contenido de humedad de las variedades de frijol silvestre, se debió al incremento en la temperatura y a la falta de riegos en el lugar de producción, además por un prolongado almacén de acuerdo con lo mencionado por Rojas (2009). La presencia de aflatoxinas en todas las variedades de frijol, en niveles por debajo de 20 ng g⁻¹, se encuentran dentro de los niveles permitidos por la normatividad mexicana para el maíz; sin embargo, no existe recomendación para el frijol a pesar de la vulnerabilidad de la planta a la infestación por hongos bajo condiciones de alta temperatura, en el campo y en el almacén como lo menciona Wang *et al.* (2006).

Cuadro 2. Contenido de aflatoxinas en nueve variedades de frijol.
Table 2. Aflatoxin in nine bean varieties.

Tipo de frijol	Variedad	Aflatoxinas totales (ng g ⁻¹)
Comercial (a, b)	Flor de Junio	8
	Garbancillo	7
	Peruano	6
	Flor de Mayo	8
	Negro	8
Mejorado (a)	Tzama	5
	Ayocote	9
	Ayocote Café	10
	Ayocote Morado	13
Silvestre (b)	Tlaxcala Típico	5
	Tlaxcala Atípico	7
	Oaxaca Chico	6

Los valores en la línea con literales diferentes son estadísticamente significativas (*p* ≤ 0.05).

The lowest moisture content of the wild beans varieties was due to increases in temperature and lack of irrigation in the production site, as well for an extended store as mentioned by Rojas (2009). The presence of aflatoxins in all varieties, at levels below 20 ng g⁻¹ are within the levels permitted by Mexican regulations for maize, but there is no recommendation for beans, despite the vulnerability of the plant to fungal infestation under high temperature conditions in the field and in storage, as mentioned by Wang *et al.* (2006).

Cuadro 3. Análisis cualitativo y cuantitativo de taninos en cinco variedades de frijol silvestre.

Table 3. Qualitative and quantitative analysis of tannins in five wild bean varieties.

Variedad	Prueba cualitativa (colorimétrica)	Prueba cuantitativa ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Contenido de taninos (% Eat)**
Tlaxcala Típico	T. Pirogalol*	4400 $\pm$	0.44
Tlaxcala Atípico	T. Pirogalol	6000 $\pm$	0.6
Oaxaca Chico	T. Pirogalol	4200 $\pm$	0.42
Durango atípico	T. Pirogalol	5300 $\pm$	0.53
Durango típico	T. Pirogalol	2360 $\pm$	0.23

*= taninos hidrolizables; **= expresados en equivalentes de ácido tánico.

Además la presencia de hongos fitopatógenos en el frijol Flor de Mayo y Durango, han sido reportadas por Groenewold *et al.* (2003). Las variedades de frijol silvestre presentaron un contenido promedio de 4.8 mg g⁻¹ de taninos, coincidiendo con los hallazgos de Ojeda *et al.* (2010) en las variedades comerciales; sin embargo, estos niveles no son similares a lo descrito por (Bressani *et al.*, 1991; Helbig *et al.*, 2003; Salinas *et al.*, 2005) en leguminosas forrajeras, diferencias que pueden ser debidas a aspectos metodológicos en el análisis químico (George *et al.*, 2005).

Se deberá continuar investigando la presencia y contenido de sustancias químicas naturales como los taninos por su efecto protector sobre la planta en campo, comparando los diferentes genotipos de frijol, la región ecológica de procedencia y la contaminación por aflatoxinas (Bressani *et al.*, 1991; Helbig *et al.*, 2003; Salinas *et al.*, 2005). Además se deberá considerar el alto consumo de frijol por la población mexicana, ya que se ha mencionado que el exceso de taninos está relacionado con un incremento de la actividad proteolítica hepática y con la alteración en la respuesta inmune de acuerdo con Hassan *et al.* (2003); Martínez *et al.* (2000), respuestas que pudieran potencializarse por la presencia de aflatoxinas.

Conclusiones

Las variedades de frijol silvestre presentaron el menor contenido de humedad y de aflatoxinas, mientras que las variedades de frijol comercial el menor contenido de proteína y un alto contenido de aflatoxinas. Las variedades de frijol mejoradas mostraron el mayor contenido de humedad, proteína y aflatoxinas. Las variedades de frijol silvestre poseen taninos de tipo hidrolizables. Todas las variedades de frijol mostraron la presencia de aflatoxinas en niveles permitidos para el maíz.

Furthermore, the presence of pathogenic fungi in Flor de Mayo and Durango has been reported by Groenewold *et al.* (2003). Wild beans varieties showed an average content of 4.8 mg g⁻¹ tannins, coinciding with the findings of Ojeda *et al.* (2010) for commercial varieties, but these levels are not similar to that described by (Bressani *et al.*, 1991; Helbig *et al.*, 2003; Salinas *et al.*, 2005) in forage legumes, differences that can be due to methodological issues during the chemical analysis (George *et al.*, 2005).

The presence and content of natural chemicals such as tannins should further be investigate for its protective effect on the plant in field, comparing the different genotypes of beans, green region of origin and aflatoxin contamination (Bressani *et al.*, 1991; Helbig *et al.*, 2003; Salinas *et al.*, 2005). The high consumption of Mexican bean by the population should also be taken into account, as mentioned that Tannins excess is associated with an increase in proteolytic activity and hepatic disturbance in the immune response according to Hassan *et al.* (2003), Martínez *et al.* (2000), responses that might potentiated by the presence of aflatoxins.

Conclusions

Wild beans varieties presented the lowest moisture and aflatoxin content, while the commercial bean varieties had lowest protein content and, high levels of aflatoxins. Improved bean varieties showed the highest moisture, protein and aflatoxin content. Wild bean varieties have hydrolyzable tannins. All the varieties showed the presence of aflatoxin, at levels allowed for maize.

End of the English version



Literatura citada

- American Association of Cereal Chemist (AACC). 2000. Approved methods of the AACC. 10th edition. St Paul, MN. USA.
- Official Methods of Analysis (OMA). 1990. 15th edition. Association of Official Analytical Chemist. Washington, D. C.
- Bressani, R.; Mora, D. R.; Flores, R. y Gómez, B. R. 1991. Evaluación de dos métodos para establecer el contenido de polifenoles en frijol crudo, cocido y efecto que éstos provocan en la digestibilidad de la proteína. Arch. Latinoam. Nutr. 41(4):569-83.
- Barrios-Gómez, E. J.; López-Castañeda, C.; Kohashi-Shibata, J.; Acosta-Gallegos, J. A.; Miranda-Colín, S. y Mayek-Pérez, N. 2010. Rendimiento de semilla y sus componentes en Flor de Mayo en el centro de México. Agrociencia. 44(4):481-489.
- Castillo-Mendoza, M.; Ramírez-Vallejo, P.; Castillo-González, F. y Miranda, C. S. 2006. Diversidad morfológica de poblaciones nativas de frijol común y frijol Ayocote del oriente del estado de México. Rev. Fitotec. Mex. 29(2):111-119.
- George, S. P.; Brat, P.; Alter, M. and Amiot, J. 2005. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant derived products. J. Agric. Food Chem. 53:1370-1373.
- Groenewold, L. B.; Mayek, P. N. y Padilla, J. R. 2003. Hongos asociados a la semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Aguascalientes, México. Rev. Mex. Fitopatol. 21(3):375-378.
- Hassan, A.; Elzubeir, E. and El Tinnay, A. 2003. Growth and apparent absorption of minerals in broiler chicks fed diets with low or high tannin contents. Trop. Anim. Health Prod. 35:189-196.
- Helbig, E.; Oliverira, A. C.; Queiroz, K. and Reis, S. M. 2003. Effect of soaking prior to cooking on the levels of phytate and tannin of the common bean. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 49:81-86.
- Iniestra, G. J. 2005. Factores antinutritivos y actividad antioxidante en variedades mejoradas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Rev. Agro. 39:603-610.
- Martínez, V. I.; Periago, M. y Ros, G. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Arch. Latinoam. Nutr. 50:5-18.
- Norma Oficial Mexicana (NOM-FF-038-2002). 2002. Productos alimenticios no industrializados para consumo humano. Fabaceas. Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Especificaciones y métodos de prueba.
- Ojeda, A.; Frias, A. y González, R. 2010. Contenido de taninos, fósforo fítico y actividad de fitasas en el grano de 12 híbridos de sorgo granífero. Arch. Latinoam. Nutr. 60(1):93-98.
- Peña, B. S. D. 2000. Manual de técnicas en el laboratorio de toxicología. Serie manuales. Editorial de CBS. UAM-Xochimilco.
- Rojas, A. M. 2009. Determinación del momento de riego mediante la temperatura de la cobertura foliar en el cultivo de jitomate, bajo condiciones de invernadero. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Texcoco, Estado de México. Tesis doctoral. 117 p.
- Salinas, M. Y.; Rojas, H.; Sosa, M. and Pérez, H. 2005. Anthocyanin composition in black bean varieties grown in Mexico. Agrociencia. 39:385-394.
- Singh, P. S. 2006. Drought resistance in the Race Durango dry bean landraces and cultivars. Crop Sci. 46:2211-2120.
- Wang, J.; Gan, Y. T.; Clarke, F. and McDonald, C. L. 2006. Response of chickpea yield to high temperature stress during reproductive development. Crop Sci. 46:2171-2178.