



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO EN

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

**VARIACIÓN EN EL CONTENIDO DE L-DOPA Y
COMPUESTOS FENÓLICOS DURANTE EL
DESARROLLO DE SEMILLA DE *Vicia faba* L.**

ISABEL GARCÍA SÁNCHEZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PUEBLA, PUEBLA

2011



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

CAMPUE- 43-2-03 ANEXO

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, la que suscribe **Isabel García Sánchez** alumna de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección de la Profesora **Dra. Adriana Delgado Alvarado** por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **VARIACIÓN EN EL CONTENIDO DE L-Dopa Y COMPUESTOS FENÓLICOS DURANTE EL DESARROLLO DE SEMILLA DE *Vicia faba* L.** y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la institución, la consejera de tesis y la que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Puebla, Puebla 31 de agosto de 2011

Firma
Isabel García Sánchez

Vo. Bo. Profesora Consejera
Adriana Delgado Alvarado

La presente tesis titulada: **Variación en el contenido de L-dopa y compuestos fenólicos durante el desarrollo de semilla de *Vicia faba* L.**, realizada por la alumna: **Isabel García Sánchez**, bajo la dirección del **Consejo Particular** indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:



DRA. ADRIANA DELGADO ALVARADO

ASESOR:



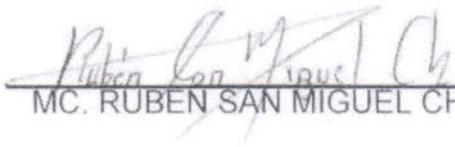
DR. BRAULIO EDGAR HERRERA CABRERA

ASESOR:



DR. RAMON MARCOS SOTO HERNANDEZ

ASESOR:



MC. RUBEN SAN MIGUEL CHAVEZ

Puebla, Puebla, 13 de septiembre de 2011

VARIACIÓN EN EL CONTENIDO DE L-DOPA Y COMPUESTOS FENÓLICOS DURANTE EL DESARROLLO DE SEMILLA DE *VICIA FABA* L.

Isabel García Sánchez, MC
Colegio de Postgraduados, 2011

Estudios recientes han demostrado que el haba además de su alto contenido de proteína, posee otras sustancias benéficas para la salud, como son los compuestos fenólicos que actúan como antioxidantes y la L-dopa, aminoácido que retrasa los síntomas severos del síndrome de Parkinson. Por lo que el presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar la variación de componentes químicos como proteína soluble, compuestos fenólicos, L-dopa y L-tirosina de colectas de *Vicia faba* L. provenientes de la Mesa Central de México y conocer sus contenidos dentro de los tejidos (vainas y semillas) a diferentes etapas fenológicas. Se colectaron vainas a los 25, 30, 40 y 90 días después de la floración (DDF). Los cambios en los componentes químicos se determinaron en las diferentes fechas en las que se colectaron las vainas. Los resultados evidencian la distribución del contenido de proteína soluble, compuestos fenólicos, L-dopa y L-tirosina a través del desarrollo de la vaina y semillas de haba, con cambios diferenciales dependiendo de la colecta y estado de desarrollo de los tejidos. A los 25 DDF algunas colectas como la 161, 238, 269 y 279 destacaron por su contenido de proteína soluble en promedio de la vaina, testa y cotiledón, y en grano seco las colectas 32, 161, 249 y 284. En la etapa de vaina verde (25 DDF) se mostró una gran acumulación de compuestos fenólicos con un valor de hasta más de 60% (colectas 117 y 249), y en la vaina seca (90 DDF) 40% (colecta 86). El contenido mayor de L-dopa se tuvo en estructuras florales, y los botones chicos mostraron los valores mayores de hasta $69 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PF (colectas 181 y 182). En testa y cotiledón los contenidos de L-dopa fueron significativamente menores a los de la vaina a los 90 DDF. En promedio de todos los tejidos de las colectas, la acumulación mayor de L-tirosina fue a los 30 DDF. El cotiledón fue el tejido donde se acumuló principalmente la cantidad mayor de este aminoácido. Aunque dentro de las colectas hubo amplias variaciones en sus contenidos entre tejidos. Lo cual da oportunidad de elegir colectas con propiedades químicas deseables para un uso en particular, dependiendo si se utiliza para consumo en fresco (haba verde) o para grano seco, que además de tener un contenido adecuado de proteína, tenga un contenido alto o bajo de compuestos fenólicos o L-dopa. Las colectas de haba utilizadas presentan una amplia variación en el contenido de proteína soluble total, compuestos fenólicos, L-dopa y L-tirosina, tanto en la vaina, como en la testa y el cotiledón, lo cual es un indicador de la gran diversidad genética que tienen las poblaciones de haba que poseen los agricultores en la Mesa Central de México.

Palabras clave: *Vicia faba* L., días después de floración, L-dopa, proteína, semilla, L-tirosina, vaina.

CHANGES IN THE CONTENT OF L-DOPA AND PHENOLIC COMPOUNDS DURING SEED DEVELOPMENT OF *VICIA FABA* L.

Isabel García Sánchez, MC
Colegio de Postgraduados, 2011

Recent studies have shown that broad bean besides to its high protein content, has other health beneficial substances such as phenolic compounds that act as antioxidants and L-dopa, an amino acid that retards the severe symptoms of Parkinson's syndrome. The aim of this study was to characterize the variation of chemical components such as soluble protein, phenolic compounds, L-dopa and L-tyrosine, in *Vicia faba* L. collections from the Central Plateau of Mexico and to know its contents within tissues (pod and seeds) at different phenological stages. Pods were collected at 25, 30, 40 and 90 days after flowering (DAF). Changes in chemical components were determined at different dates on which the pods were collected. Results show the distribution of soluble protein, phenolic compounds, L-dopa and L-tyrosine through the development of the broad bean pod and seeds, with differential changes depending on the collection and stage of development of tissues. At 25 DAF some collections such as 161, 238, 269 and 279 were noted for their soluble protein content on average from the pod, seed coat and cotyledon; by 90 DAF, the collects 32, 161, 249 and 284 highlighted. In the green pod stage (25 DAF) was shown a large accumulation of phenolic compounds with a value up over 60% (collections 117 and 249), and in the dry pods (90 DAF) 40% (collection 86). The higher content of L-dopa was held in floral structures, and small buttons showed higher values of up to $69 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (collections 181 and 182). In seed coat and cotyledon, L-dopa contents were significantly lower than in the pod at 90 DAF. The average of all tissues of the collects, the greater accumulation of L-tyrosine was at 30 DAF. The cotyledon was the tissue where this amino acid was mostly accumulated. Although within the collections there were wide variations in their contents into tissues. This gives opportunity to choose collections with desirable chemical properties for a particular use, depending on if used for fresh consumption (green bean) or to dry grain, which in addition to adequate protein content, have a high or low composite phenolic or L-dopa. The broad bean collections used have a wide variation in the total soluble protein, phenolic compounds, L-dopa and L-tyrosine, in the pod, seed coat and cotyledon, which is an indicator of the great genetic diversity of populations that have broad bean farmers in the Central Plateau of Mexico.

Key words: *Vicia faba* L., days after flowering, L-dopa, protein, seed, L-tyrosine, pod.

DEDICATORIA

Gracias a Dios, mi fortaleza, mi refugio, por todo lo que he recibido.

A mis padres por su apoyo incondicional, por su paciencia y por estar siempre.

A mi hijo, mi sol, por tu paciencia y comprensión en todas las cosas que hago, ya que indudablemente en ese proceso sacrificamos muchas cosas.

A mis hermanos, Sergio, Fernando por su gran apoyo en cada una de las etapas de mi vida, por ser mi respaldo y ayudarme a sobrellevar mi responsabilidad; a mi hermano Alberto, porque sé que a pesar de la distancia cuento contigo.

A mis amigos Rosy, Jannet, Guille, Flor, Oscar, Rosalinda, Rene, Pepe, su amistad ha enriquecido mi vida e hizo muy grata mi estancia en el periodo de la maestría, a Vero, Tere y Saraí por su gran amistad y por alentarme siempre a crecer.

SR. Juan Zaragoza por su apoyo en lo profesional y personal, por compartir conmigo su experiencia, su amistad, pero sobre todo por abrirme las puertas de su casa.

A todas las personas que me han ayudado a crecer en diferentes aspectos, me han fortalecido e indudablemente han dejado huella en mi vida, a todas y cada una de ellas, gracias.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por haber financiado mis estudios de maestría en el Colegio de Postgraduados-*Campus* Puebla durante el periodo 2005-2007.

AL Colegio de Postgraduados-*Campus* Puebla, por la oportunidad de superación en la vida profesional y de sentar las bases para un futuro mejor.

A la Dra. Adriana Delgado Alvarado, por su disposición, dedicación, paciencia, sencillez y calidez para transmitir su conocimiento y experiencia, por ser una gran mujer, y no olvidar sus distintos perfiles: investigadora, profesionista, esposa y madre.

AL Dr. Edgar Herrera Cabrera por su sencillez, entusiasmo, disposición y por las aportaciones realizadas en este trabajo, así como por haber enriquecido con una nueva perspectiva mi formación.

AL Dr. Marcos Soto Hernández, toda mi gratitud por su valioso apoyo y contribución para la culminación de este trabajo, así como por las facilidades para la realización de la fase experimental.

AL Mtro. Rubén Santamaría Chávez, por su gran apoyo en la realización y revisión de este trabajo.

AL Laboratorio de Bioquímica del Campus Montecillo, por las facilidades para el desarrollo de la parte experimental.

A Juan Zaragoza Zarco, por su amabilidad y gran apoyo en el Laboratorio de Bioquímica, pero sobre todo por su gran amistad y cariño.

A los Sres. Porfirio, José Francisco y Francisco, por su apoyo para la instalación, mantenimiento y muestreo de los lotes experimentales.

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1 ASPECTOS BIOLÓGICOS Y FISIOLÓGICOS DE VICIA FABA	4
2.1.1 Origen del cultivo.....	4
2.1.2. Taxonomía	4
2.2 MORFOLOGÍA.....	6
2.2.1 Estados fenológicos	6
2.2.2 Desarrollo de vaina y semillas.....	8
2.2.3 Acumulación de proteína durante el desarrollo de vainas y semillas	8
2.2.4 Origen y distribución de aminoácidos libres durante el desarrollo de vainas y semillas	10
2.2.5 Composición química del grano	11
2.2.5.1 Proteína.....	12
2.2.5.2 Carbohidratos.....	12
2.2.5.3 Lípidos.....	13
2.2.5.4 Micronutrientes.....	13
2.2.5.5 Compuestos tóxicos o no nutritivos.....	14
2.3 REQUERIMIENTOS EDAFOCLIMÁTICOS.....	15
2.4 IMPORTANCIA DEL CULTIVO.....	16
2.5. TECNOLOGÍA DE PRODUCCIÓN	18
2.5.1 Variedades o cultivares de haba	18
2.5.2 Zonas de producción.....	19
2.5.3 Importancia en la economía del país.....	19
2.6 L-DOPA	20
2.6.1 Historia	20
2.6.2 Estructura química	22
2.6.3 Biosíntesis de L-Dopa	23
2.6.4 Usos terapéuticos.....	24

2.6.5 Distribución de L-Tirosina y L-Dopa en Vicia faba	26
2.7 COMPUESTOS FENÓLICOS EN VICIA FABA.....	27
III. OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVO GENERAL	29
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES	29
IV. HIPÓTESIS.....	29
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
5.1 MATERIAL VEGETAL	30
5.2 DISEÑO DE LOTES EXPERIMENTALES	30
5.2.1 Marcado de flores.....	30
5.3 COLECTA DE VAINAS Y FLORES	31
5.3.1 Técnicas de análisis	33
5.4 PROTEINA SOLUBLE TOTAL	33
5.4.1 Preparación de extractos para cuantificación de proteína.....	34
5.4.2 Determinación de proteína	34
5.4.3 Curva de calibración de proteína	34
5.5 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENOLICOS.....	34
5.5.1 Curva de calibración de compuestos fenólicos	35
5.6 DETERMINACIÓN DE L-DOPA Y L-TIROSINA	35
5.6.1 Extracción de L-dopa y L-tirosina	35
5.6.2 Extracción separación y cuantificación.....	36
5.6.3 Preparación de curva estándar	37
5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	37
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
6.1 CONTENIDO DE PROTEINA, COMPUESTOS FENOLICOS TOTALES, L-DOPA Y L-TIROSINA EN PERICARPIO Y SEMILLA A DIFERNETES DIAS DESPUES DE LA FLORACION EN COLECTAS DE VICIA FABA L.....	39

6.2 CORRELACIONES ENTRE LAS VARIABLES DE RESPUESTA PROTEINA, COMPUESTOS FENOLICOS, L-DOPA Y L-TIROSINA	44
6.3 CONTENIDO DE PROTEINA SOLUBLE TOTAL	45
6.3.1 Proteínas solubles totales a los 25, 30, 40 y 90 días después de la floración en vaina, testa y cotiledón	45
6.3.2 Proteína soluble total en vaina	47
6.3.3 Proteína soluble total en testa	50
6.3.4 Proteína soluble total en cotiledón	51
6.4 CONTENIDO DE COMPUESTOS FENOLICOS.....	51
6.4.1 Compuestos fenólicos en vaina y testa a los 25, 30, 40 y 90 DDF	51
6.4.2 Compuestos fenolicos en vaina	55
6.4.3 Compuestos fenólicos en testa	57
6.5 CONTENIDO DE L-DOPA.....	58
6.5.1 L-Dopa en botones y flores de Vicia faba L.....	58
6.5.2 L-Dopa en vaina, testa y cotiledón a los 25, 30, 40 y 90 DDF.....	59
6.5.3 Contenido de L-Dopa en vaina, testa y cotiledón de tres colectas de Vicia faba L. a 30 DDF	61
6.5.4 Contenido de L-Dopa en vaina, testa y cotiledón de cinco colectas de Vicia faba L. a 90 DDF	63
6.6 CONTENIDO DE L-TIROSINA	64
6.6.1 Contenido de L-Tirosina en vaina, testa y cotiledón de cinco colectas de Vicia faba L. a 30 DDF	65
6.6.2 Contenido de L-Tirosina en vaina, testa y cotiledón de cinco colectas de Vicia faba L. a 90 DDF	68
 VII. CONCLUSIONES	 68
 VIII. LITERATURA CITADA.....	 71
 IX. APENDICE.....	 79

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 2.1	Subdivisión botánica de <i>Vicia faba</i> , cultivares y criollos regionales.	6
Figura 2.2	Plantas de <i>Vicia faba</i> en periodo de A) floración y de B) fructificación.	7
Figura 2.3	Estructura química del Dopa-glucósido y de su aglucón L-Dopa	23
Figura 2.4	Ruta de biosíntesis de L-Dopa.	24
Figura 5.1	Parcela experimental, cubierta por malla antiáfidos, en donde se establecieron las colectas.	31
Figura 5.2	Marcado de flores para control de la edad en vainas de <i>Vicia faba</i> , formación de vainas en <i>Vicia faba</i>	31
Figura 5.3	Material disecado de <i>Vicia faba</i> L, pericarpio y semillas, a 30 días después de la floración.	32
Figura 5.4	Muestras colectadas durante la floración de <i>Vicia faba</i> L.: A) Botón chico, B) Botón grande y C) Flor.	33
Figura 5.5A	Curva de calibración de proteína	80
Figura 5.6A	Curva de calibración de L-dopa	82
Figura 5.7A	Curva de calibración de L-tirosina	83
Figura 6.1	Contenido de proteína soluble total en vaina, testa y cotiledón a los 25 (A) y 30 (B) días después de la floración (DDF) en 14 colectas de haba. Los datos son promedios, n= 10 para cada tejido.	46
Figura 6.2	Contenido de proteína soluble total en vaina, testa y cotiledón a los 40 (A) y 90 (B) días después de la floración (DDF) en 14 colectas de haba. Los datos son promedios, n= 10 para cada tejido.	48
Figura 6.3	Contenido de proteína soluble total en vaina de 12 colectas de haba a 25, 30, 40 y 90 días después de la siembra (DDF). n= 10.	49
Figura 6.4	Contenido de proteína soluble total en testa de 12 colectas de haba a 25, 30, 40 y 90 días después de la siembra (DDF). n=	50

10.

Figura 6.5	Contenido de proteína soluble total en cotiledón de 12 colectas de haba a 25, 30, 40 y 90 días después de la siembra (DDF). Los datos son promedios, n= 10	52
Figura 6.6	Contenido de compuestos fenólicos en vaina y testa a los 25 (A) y 30 (B) días después de la floración (DDF) en 15 colectas de haba. Los datos son promedios, n= 3 para cada tejido. MP = Master Piece	53
Figura 6.7	Contenido de compuestos fenólicos en vaina y testa a los 40 (A) y 90 (B) días después de la floración (DDF) en 15 colectas de haba. Los datos son promedios, n= 3 para cada tejido. MP = Master Piece.	54
Figura 6.8	Contenido de compuestos fenólicos en vaina de diferentes colectas de haba a los 25, 30, 40 y 90 días después de la floración (DDF). n= 3	56
Figura 6.9	Contenido de compuestos fenólicos en testa de diferentes colectas de haba a los 25, 30, 40 y 90 días después de la floración (DDF). n= 3	57
Figura 6.10	Contenido de L-Dopa en botón chico (BCH), botón grande (BGD) y flor de cuatro colectas de <i>Vicia faba</i> L.	59
Figura 6.11	Contenido de L-Dopa en vainas de siete colectas de <i>Vicia faba</i> L. a 25 (A), 30 (B), 40 (C), y 90 (D) días después de la floración (DDF). n =3	61
Figura 6.12	Contenido de L-dopa en vaina, testa y cotiledón de tres colectas de haba a 30 días después de la floración. n = 3.	62
Figura 6.13	Contenido de L-dopa en vaina (A), testa (B) y cotiledón (C) de cinco colectas de haba a 90 días después de la floración. n = 3.	63
Figura 6.14	Contenido de L-tirosina acumulada en vaina, testa y cotiledón de cinco colectas de haba a 30 días después de la floración. n = 3	65
Figura 6.15	Contenido de L-tirosina en vaina (A), testa (B) y cotiledón (C) de cinco colectas de haba a 90 días después de la floración. n = 3.	66

ÍNDICE DE CUADROS

		Página
Cuadro 2.1	Valor nutritivo de algunas legumbres y de otros alimentos	17
Cuadro 2.2	Contenido bromatológico y composición química de <i>Vicia faba</i> L.	18
Cuadro 2.3.	Principales países productores de haba	20
Cuadro 2.4	Perfil histórico de L-dopa	22
Cuadro 2.5	Distribución de L-dopa en la flor y tejidos del fruto de <i>Vicia faba</i>	26
Cuadro 5.1A	Colectas de haba establecidas en San Cayetano, Municipio de Chalchicomula de Sesma. Cd. Serdán, Puebla. 2006.	79
Cuadro 5.2A	Curva estándar de actividad de proteína preparada con albumina de suero bovino BSA (0.25 µg µL ⁻¹).	80
Cuadro 5.3A	Curva estándar de compuestos fenólicos preparada con ácido gálico a una concertación de (0.5 µg.mL ⁻¹)	81
Cuadro 5.4A	Curva estándar de L-dopa	82
Cuadro 5.5A	Curva estándar de L-tirosina	83
Cuadro 6.1	Promedios, coeficientes de variación y cuadrados medios de cuatro variables en 22 colectas de haba de los Valles Altos de México.	39
Cuadro 6.2	Promedios por colecta para cuatro variables químicas de 22 colectas de haba de los Valles Altos de México.	40
Cuadro 6.3	Promedios para cuatro variables en vaina, testa y cotiledón, y a diferentes días después de la floración de 22 colectas de haba de los Valles Altos de México.	42
Cuadro 6.4	Análisis de varianza (ANOVA) del contenido de proteínas solubles totales en vaina, testa y cotiledón a los 25, 30, 40 y 90 días después de la floración en las 22 colectas de haba.	43
Cuadro 6.5	Correlaciones de los valores promedios de las variables químicas evaluadas en vaina, testa y cotiledón a 25, 30, 40 y 90 DDF en 22 colectas de <i>Vicia faba</i> L.	44

I. INTRODUCCION

Vicia faba es un cultivo introducido en México, sin embargo, ha tenido un buen desarrollo y aceptación tanto en nuestro país como en otros países de América, además de que se ubica como una de las leguminosas que tiene importancia como fuente proteínica en diversos países del mundo (ACERCA, 2001).

Los principales estados productores de haba en México (Puebla, Estado de México y Tlaxcala) constituyen el 88% de la superficie sembrada en el país (INEGI, 1997). Puebla se destaca por ser el principal productor nacional de grano de haba y su área de cultivo se ubica principalmente en la región oriente del Estado, comprendiendo desde Tlacotepec hasta Huitzila, incluyendo Ciudad Serdán y Libres.

El haba es un cultivo que se destina principalmente para la producción de semilla para consumo humano, al igual que otras leguminosas (como frijol, garbanzo, y lenteja) es una importante fuente alimenticia, la importancia radica en el valor proteínico que en comparación con otras fuentes como el frijol, es superior, además de ser una buena fuente de carbohidratos (ASERCA, 2001). Aunado a esto, *Vicia faba* es una de las mejores fuentes vegetales naturales de fitoquímicos fenólicos que actúan como antioxidantes (Sheety *et al.*, 2002) y levo-3,4-dihidroxi-fenilalanina (L-dopa), aminoácido que retrasa los síntomas severos del síndrome de Parkinson, y con la particularidad de que este aminoácido se encuentra fundamentalmente en estado libre en los tejidos de las semillas de esta especie. Sin embargo, se sabe también que su contenido es afectado por factores genéticos y ambientales tales como tipo de cultivar, área donde se cultiva, condiciones del suelo, precipitación y temperatura entre otros factores (Cuadrado *et al.*, 1995; Muzquiz *et al.*, 1999).

Las habas pueden emplearse tanto para consumo en fresco, donde se aprovechan vainas y granos conjuntamente, así como únicamente los granos, dependiendo del estado de desarrollo en que se encuentren; o como materia prima para la industria transformadora, tanto para enlatado como para congelado ya que las habas siguen siendo eficaces aun congeladas o en conservación.

En México y especialmente a nivel estatal no se cuenta con información que documente la calidad nutricional, composición química o algunos otros componentes de importancia funcional de la semilla de haba de las variedades criollas o introducidas que se cultivan en México y en el estado de Puebla. A este respecto desde el año 2000, en el área de fitomejoramiento del *Campus* Puebla del Colegio de Postgraduados, se han realizado colectas y selección de semilla de haba de diferentes localidades provenientes de los Estados de México, Hidalgo, Tlaxcala y Puebla, principales estados productores de haba en el país, con el propósito de identificar material genético con buenos rendimientos y sanidad y que además se adapten a diferentes ambientes. De este germoplasma se han elegido un número de colectas más reducido con características morfológicas y fenológicas sobresalientes y en las cuales se plantea realizar estudios específicos sobre la composición química y funcional de las vainas y semillas.

Al ser el Estado de Puebla el principal productor de haba a nivel nacional, y contando con una variabilidad genética que poco ha sido valorada, cuantificada y utilizada agronómicamente requiere que los productos del cultivo sean estudiados en diferentes áreas y disciplinas del conocimiento, ya que la fuente de genes vivos que dan la adaptación a los diferentes ambientes ofrecen numerosos tipos de criollos de

haba, que potencialmente podrían diferir no solo en rendimiento, tamaño y color de la testa, sino en calidad química, nutritiva y funcional de la semilla, que al ser evaluadas permitirían identificar colectas con un valor agregado con características especiales para diferentes usos y usuarios.

II. ANTECEDENTES

2.1 Aspectos botánicos y fisiológicos de *Vicia faba*

2.1.1 Origen del cultivo.

El haba es un cultivo de introducción en nuestro país, su origen es el cercano Este Asiático y ha sido cultivado desde los inicios del periodo Neolítico (Miranda, 2005). La introducción de este cultivo a América Latina se reporta haber sido por los españoles durante la conquista (Smartt, 1984), ya que no existen evidencias de su cultivo por parte de los indígenas americanos en épocas precolombinas, lo que señala que esta leguminosa ha estado presente en nuestro continente por lo menos desde hace 500 años (Olvera *et al.*, 2001).

2.2.2 Taxonomía

La planta del haba pertenece a la división *Spermatophyta*, subdivisión *Angiospermae*, clase *Dicotyledoneae*, subclase *Rosidae*, orden *Fabales*, familia *Fabaceae*, tribu *Vicieae*, género *Vicia* y especie *Vicia faba* L. (Cronquist, 1981).

Para esta especie se han descrito diversas subespecies y variedades. En la clasificación taxonómica realizada por Muratova (1931) se diferencian dos subespecies:

Subsp. *faba* (con las variedades *faba*, *equina* y *minor*) y subsp. *paucijuga*. Hanelt (1972) también reconoce dos subespecies, pero en este caso son: subsp. *faba* (con las variedades *faba* y *equina*) y subsp. *minor* (con la variedad *minor*), sin embargo considera a *paucijuga* como una raza geográfica de la subsp. *minor*. Cubero (1974) distingue sólo la subespecie *faba* con cuatro variedades: *faba*, *equina*, *minor* y

paucijuga. La variedad *faba* se conoce comúnmente como variedad *major*. Actualmente, Duc (1997) propone la subdivisión de cuatro variedades botánicas, en atención a un mayor número de características, como tallo, hoja, semilla, vainas y tipo de reproducción, algunas de las principales características de las variedades de *Vicia faba* L. en esta clasificación son:

- ***Vicia faba paucijuga***, tiene tallos cortos, hojas y semillas pequeñas (peso de 1000 semillas menor de 250g) y reproducción autógama.
- ***Vicia faba major***, produce semillas grandes (peso de 1000 semillas mayor a 1000g), esta variedad se desarrollo en el Mediterráneo Sur y en china, durante la conquista su cultivo se extendió desde México a toda Sudamérica.
- ***Vicia faba minor***, produce semillas pequeñas (peso de 1000 semillas menor a 500g), se cultiva en Etiopia y en el norte de Europa.
- ***Vicia faba equina***, presenta semillas de tamaño medio y se desarrolla principalmente en el medio Este y Egipto.

Las variedades que existen en la mesa Central de México, difieren en tamaño de semilla, lo que hace que los tipos grandes en tamaño de semilla tengan un peso mayor a 2 Kg por cada 1000 granos. Además, las vainas miden de 8 a 13 cm de longitud, con 1-3 óvulos por vaina. El color del grano varía de blanco, amarillo, café rojizo, morado, pinto y moteado (Herrera *et al.*, 2002). Las habas criollas de México se enmarcan en la subdivisión botánica *Vicia faba major* cultivar “asiático” de vaina corta, gruesa y granos grandes y pocos (Herrera *et al.*, 2006) (Figura 2.1).

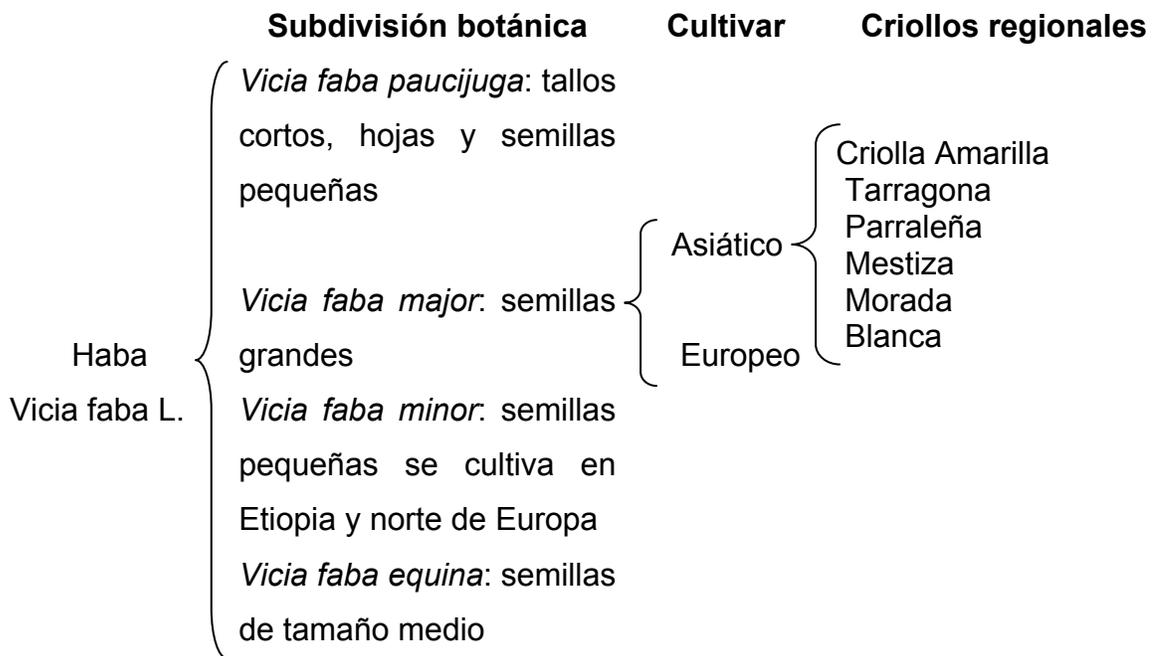


Figura 2.1 Subdivisión botánica de *Vicia faba*, cultivares y criollos regionales (Herrera *et al.*, 2006)

2.2.1 Morfología

Es una planta de ciclo anual que presenta un sistema radicular muy desarrollado, donde se encuentran nódulos que contiene bacterias fijadoras de nitrógeno (MACA, 2005: 7). *Vicia faba* es una planta herbácea, robusta, erecta, de tallo grueso y liso, puede medir hasta 1.8 m de altura, aunque también se pueden encontrar de alturas menores (30 a 45 cm). Las hojas son alternas, abundantes y parapinadas, de uno a tres pares de folíolos, elípticos u ovals que miden de 5 a 10 cm. de longitud. Las flores son grandes, completas, bisexuales, simétricas de 2.5 a 4 cm. de largo, son de color blanco con manchas largas moradas o ligeramente azuladas manchadas de negro, con pedúnculo muy corto, están dispuestas en racimos, de dos a cinco en las

axilas de las hojas (Fig. 2.2A). El fruto en legumbre de 80-200x10-20 mm, es verde-negruzco, carnososo, inflado y pubescente, y contiene unas ocho semillas de 2-3 cm, ovals, oblongas, comprimidas, tersas y de color verde brillante (Fig. 2.2B) (Everard, 1982).

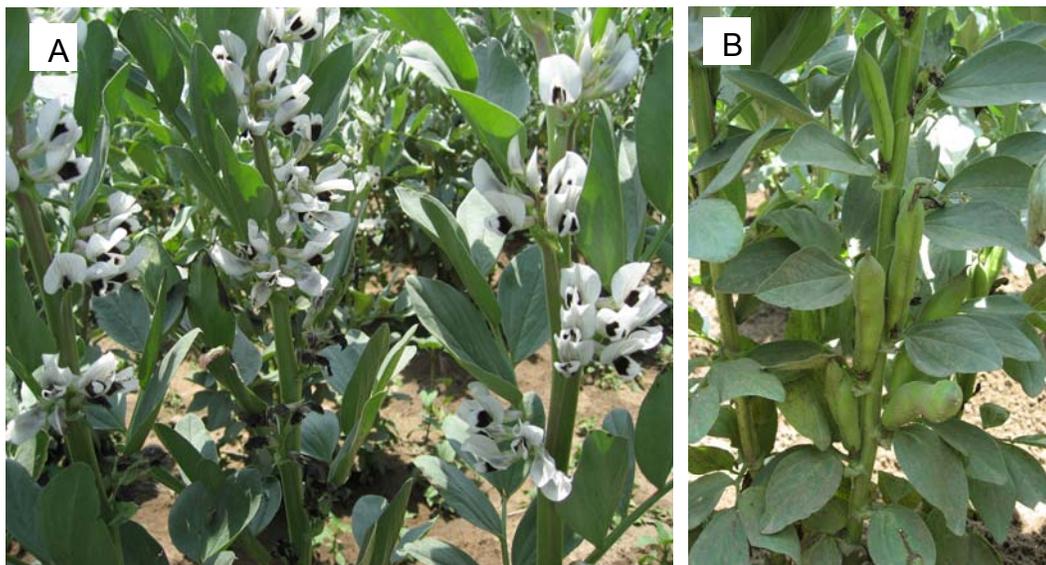


Figura 2.2 Plantas de *Vicia faba* en periodo de A) floración y de B) fructificación

La proporción de cada una de las partes de la semilla de *V. faba* es la siguiente: el par de cotiledones representa el 86% del peso total de la semilla, la testa constituye el 13% y el eje embrionario el 1% (Chavan *et al.*, 1989).

2.2.3 Estados fenológicos

En 1990 se documentaron las claves para describir los estados de desarrollo de *Vicia faba* (Knott, 1990), los cuales están basados en descriptores similares a los que se usaron en *Pisum sativum* (Knott, 1987). La descripción se divide en cinco estados

principales: germinación, y emergencia, vegetativo, reproductivo, senescencia de vainas y senescencia de tallos. Estos a su vez se subdividen en estados secundarios.

2.2.4 Desarrollo de vaina y semillas

El crecimiento de frutos en leguminosas durante las primeras semanas, después de completar la floración, se debe principalmente a la elongación y alargamiento rápido de la pared de la vaina; durante este periodo el desarrollo de la semilla es imperceptible, la semilla incrementa substancialmente su peso después de las cuatro semanas (Wolswinkel y Ammerlaan, 1986). La semilla de haba crece en promedio a una tasa de $27.8 \text{ mg semilla}^{-1} \text{ día}^{-1}$ (con un rango de 20 a 35.5), alcanzando un promedio de $1216 \text{ mg de semilla}^{-1}$ (con un rango de 414 a 2017), la semilla muestra la mayor eficiencia en el crecimiento en la etapa de llenado de grano, 39 días en promedio (con un rango de 21 a 57) (Egli, 1981). Por su parte Wolswinkel y Ammerlaan (1985), reportan una tasa de crecimiento de la semilla de $40 \text{ mg semilla}^{-1} \text{ día}^{-1}$. Por su parte, Offler *et al.* (1989) señalan que en el desarrollo de semillas de *Vicia faba L.*, los fotosintatos son inicialmente distribuidos en el sistema vascular de las cubiertas de la semilla, y posteriormente se mueven en forma radial y lateral.

2.3.2 Acumulación de proteínas durante el desarrollo de vainas y semillas

Actualmente se sabe que la acumulación de reservas en las semillas es el resultado de distintos procesos que ocurren de forma paralela en los principales compartimentos de la semilla, ya sea de origen materno (testa) o zigótica (embrión, endospermo) (Gallardo *et al.*, 2008). Particularmente la disponibilidad de nutrientes y

la fuerza de la demanda son procesos limitantes en la acumulación de las reservas en la semilla.

Las proteínas de reserva pueden localizarse en los cotiledones, en el embrión o en el endospermo de las semillas (Dalling, 1986; Vitalle y Bollini, 1995). Es bien documentado que el contenido de proteína se encuentra arriba del 20% en la mayoría de las semillas de la familia de leguminosas, y estos porcentajes llegan a ser superiores en soya (Mandal y Mandal, 2000). Particularmente en haba los porcentajes varían entre 24 y 32%. Este valor depende del tipo o variedad de la cual se trate, el nivel de maduración así como las condiciones climatológicas y zona de cultivo (Marquardt *et al*, 1989; Chavan *et al*, 1989). En semillas de leguminosas, las globulinas predominan sobre las albúminas. Las globulinas son proteínas de almacenaje o de reserva, mientras que las albúminas son proteínas enzimáticas y no son de reserva. Las principales proteínas del haba son las globulinas, constituidas a su vez por dos fracciones: legumina y vicilina (Dalling, 1986; Müntz, 1998); estas se encuentran en los cuerpos proteicos en 60%. Otras proteínas de reserva son las albúminas (20%), con elevado contenido de aminoácidos azufrados que incluyen la mayoría de los enzimas de la semilla, y en menor proporción las glutelinas (15%) que se encuentran localizan en la testa y las prolaminas que representan un 5%. El haba, como todas las leguminosas, es deficiente en aminoácidos con grupos sulfuro como metionina y cistina, pero es una buena fuente de lisina.

En un estudio pionero realizado durante el desarrollo de vainas y semillas de haba, en relación con la acumulación de las principales proteínas de almacenamiento, mostró que la vicina tendió a acumularse de forma marcada desde valores de 1140 mg·100 g⁻¹

¹ PS en semillas de vainas de 1-2 cm, hasta 2460 mg·100 g⁻¹ PS cuando las vainas tuvieron un tamaño de 5.6 cm, y después el contenido disminuyó a 900 mg·100 g⁻¹ PS en las semillas maduras (Jamalian y Bassiri, 1978)

2.3.5 Origen y distribución de aminoácidos libres durante el desarrollo de vainas y semillas

En un trabajo pionero realizado por Kipps y Boulton (1973) mostraron que la vaina exporta carbono a las semillas como ácido aspártico principalmente, y que el mayor volumen de aminoácidos incorporados en la proteína de la semilla es derivado del carbono exportado por las hojas en la vecindad del fruto. Se encontró también que la tirosina, fenilalanina, glicina, serina y alanina son constituyentes principales de la proteína de la semilla y provienen tanto de la fotosíntesis de las hojas como del metabolismo de sacarosa en las vainas.

La asparagina es un componente en el metabolismo y desarrollo de las semillas de *Vicia faba* L. (Atkins *et al.*, 1975; Wolswinkel y Ruiters, 1985), sin embargo, la alanina es el aminoácido más importante en la composición de exudados en semillas en desarrollo, lo que refleja una diferencia en la actividad metabólica en la testa de la semilla (Wolswinkel y Ruiters, 1985). Por su parte, Hill-Cottingham y Purves (1983) observaron en *Vicia faba* L. que durante el desarrollo de la planta existe diferencias claras tanto en la cantidad como en la composición de aminoácidos libres algunos órganos. Por ejemplo, la concentración de asparagina aumenta de forma marcada durante la formación de vaina, lo que sugiere que ésta es la forma en la cual mucho del nitrógeno se traslada a las semillas para la síntesis de la proteína. Las semillas

jóvenes contienen abundantes cantidades de asparagina, glutamina y alanina libre pero con el tiempo los dos últimos aminoácidos son substituidos por arginina. Estos mismos autores señalan que el aminoácido Dopa, que no es un constituyente de las proteínas, se acumula rápidamente en las vainas y las hojas durante las etapas tempranas de la formación de vainas, pero el contenido total empieza a decrece conforme avanza la senescencia. Las vainas jóvenes contienen más aminoácidos libres que cualquier otro órgano; la concentración llega a alcanzar su pico máximo alrededor de los 78 días después de la floración, y posteriormente su contenido decrece mientras las semillas crecen y maduran (Hill- Cottingham y Purve, 1983).

2.2.5 Composición química del grano

Las leguminosas de grano son un gran interés desde el punto de vista nutricional, debido a la presencia simultánea de proteína y almidón en proporciones adecuadas, así como por la riqueza en vitaminas y microelementos (Goyoaga, 2005). Por lo que se consideran una de las fuentes más importantes de suministro de alimento en términos de aporte de energía y nutrientes. Su composición química varía en función del cultivar, la localización geográfica y las condiciones de desarrollo (Augustin y Klein, 1989; Kadam *et al.*, 1989). La composición química del haba ha sido analizada tanto en la semilla completa, como en cada una de sus partes constituyentes. El par de cotiledones contiene más del 90% de las proteínas, carbohidratos, lípidos y minerales, mientras que la testa tiene la mayoría de la fibra (9%) y de los taninos (Chavan *et al.*, 1989).

2.2.5.1 Proteínas

El contenido proteico de las leguminosas se encuentra en un rango bastante amplio (15-45%), siendo más elevado que el de los cereales. Las proteínas de la semilla, se localizan principalmente en los cotiledones y en el eje embrionario, mientras que sólo una pequeña cantidad está en la testa (Marquardt *et al.*, 1975; Kadam *et al.*, 1989). En general, la proteína de las leguminosas es pobre en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) pero es rica en lisina, de la que es altamente deficitaria la proteína de los cereales, pudiendo de esta forma complementarse cereales y legumbres (Goyoaga, 2005). Las semillas de *V. faba* presentan alrededor de un 30% de proteína, pero dicho contenido está influido por la variedad o cultivar de haba y por el nivel de maduración de la misma, así como por las condiciones climatológicas y zona de cultivo (Marquardt *et al.*, 1975; Chavan *et al.*, 1989).

2.2.5.2 Carbohidratos

Las legumbres se caracterizan por ser una importante fuente de carbohidratos, ya que se encuentran en una proporción del 24-68% (Kadam *et al.*, 1989). Estos compuestos se clasifican en carbohidratos solubles y polisacáridos. En las semillas de *V. faba*, el contenido en carbohidratos es aproximadamente de un 60%, con variaciones dependiendo del cultivar analizado, de las condiciones de cultivo y del grado de maduración de la semilla (Cerning *et al.*, 1975; Chavan *et al.*, 1989). En las semillas de *V. faba* también están presentes almidón y polisacáridos no amiláceos. El almidón, formado por amilosa y amilopectina, es un polisacárido de reserva soluble en agua, que encontramos en los cotiledones. Representa el 80% de los carbohidratos totales

del haba y se encuentra en una proporción del 30-40% frente a los demás compuestos de la semilla.

2.2.5.3 Lípidos

Las leguminosas de grano contienen de 1-7% de lípidos, de los cuales el 32-51% son lípidos simples o neutros. El contenido lipídico del haba varía de 2-3%, concentrándose el 97% en los cotiledones. Los ácidos grasos insaturados más abundantes de las semillas de *V. faba* son el oleico y el linoleico, y en menor proporción se encuentra el linolénico. Los ácidos grasos saturados mayoritarios son el palmítico y el esteárico. Los lípidos simples se presentan en una proporción del 48%, con los triglicéridos como compuesto mayoritario seguidos de los fosfolípidos 36% y los glucolípidos 10% (Salunkhe *et al.*, 1989).

2.2.5.4 Micronutrientes

Las legumbres son una buena fuente de vitaminas hidrosolubles, particularmente de las del grupo B. Tiene especial importancia la tiamina, que se encuentra en cantidades superiores a las de muchos cereales y productos de origen animal (0,3-1,3 mg/100g). Particularmente, las habas son una fuente rica en niacina, riboflavina (B2), vitamina B6, ácido fólico (B9), ácido pantoténico y β -caroteno (Augustin y Klein, 1989). Además, presentan un elevado contenido en fósforo, potasio, calcio, azufre y hierro. Alrededor del 60% del azufre, se encuentra formando parte de los aminoácidos azufrados, pero el 40% restante no influye en el valor biológico de las proteínas. El

40-60% del fósforo localizado en el haba no está disponible, ya que se presenta en forma de inositoles fosfato (Chavan *et al.*, 1989).

2.2.5.5 Compuestos tóxicos o no-nutritivos

El valor nutritivo de las semillas de leguminosas puede llegar a ser limitado por la presencia de una serie de compuestos tradicionalmente denominados “antinutrientes” que obstaculizan en gran medida el aprovechamiento de algunos de sus componentes más interesantes, logrando llegar a ser tóxicos, así como disminuir la disponibilidad de minerales y la digestibilidad proteica, o causar efectos fisiológicos poco deseables (flatulencia). En años recientes se ha visto, que estos compuestos en pequeñas cantidades, pueden ser también muy beneficiosos para la salud en la prevención de enfermedades como cáncer, diabetes, enfermedades coronarias, etc., por lo que actualmente se les denomina compuestos no-nutritivos ya que, si bien carecen de valor nutritivo, no siempre resultan perjudiciales (Muzquiz *et al.*, 2004). Desde un punto de vista bioquímico estos compuestos no-nutritivos son de naturaleza muy variada. Pueden ser proteínas (inhibidores de proteasas, inhibidores de α -amilasas, lectinas), glúcidos (α -galactósidos, vicina, convicina, saponinas), aminoácidos no proteicos (L-dopa, β -ODAP), polifenoles (taninos condensados), alcaloides, etc. (Goyoaba, 2005). Así por ejemplo, las semillas de *Vicia faba* llegan a presentar efectos deletéreos debido a sustancias químicas, entre las que se han reportado se encuentran los glucósidos de pirimidina: vicina y convicina y sus respectivas agliconas, isouramil y divicina (Lin y Ling, 1962), los cuales son poderosos agentes oxidantes implicados en favismo (Mager *et al.*, 1965), enfermedad

caracterizada por una marcada anemia hemolítica, que afecta a algunas personas después de la ingestión de semillas de *Vicia faba*, lo cual se presenta con mas frecuencia en habitantes de países del mediterráneo (Liener, 1982). Estas agliconas, isouramil y divicina, se reconocen como los principales compuestos tóxicos de esta especie (Cheeke y Schull, 1985). Existe considerable variación en la cantidad de vicina y convicina en semillas de *Vicia faba*, entre semillas individuales y de acuerdo al estado de madurez, del cultivar y las condiciones ambientales. Dentro de la semilla estos glucósidos se encuentran primordialmente en los cotiledones mas que en la testa, el contenido es mas abundante en los cotiledones verdes cuando presentan contenidos de humedad de 80%, y declina hasta valores constantes en las semillas maduras (40% de humedad) (Bubano *et al.*, 1995). En las vainas no se encuentra ni vicina ni convicina.

2.3 Requerimientos edafoclimáticos.

El cultivo del haba es de zonas frías y templadas. La temperatura óptima está en torno a los 15°C. Por lo general crece como un cultivo anual de invierno en áreas templadas y subtropicales; algunos cultivares de la región del mediterráneo toleran temperaturas de invierno de -10°C sin daños severos, mientras que la mayoría de los cultivares de Europa pueden tolerar hasta -15°C (Robertson, 1996). Aunque este cultivo tolera casi cualquier tipo de suelo, tiene un mejor desarrollo en suelos con buen drenaje, ricos en arena, limo y arcilla y requiere el suministro moderado de humedad (Duke, 1981). Dentro de las leguminosas el haba es la que resiste menos la sequia. Los requerimientos más altos de humedad en este cultivo se registran entre las 9 y 12 semanas después del establecimiento. La precipitación ideal para esta

especie se considera entre 650-1000 mm por año (Kay, 1979). *Vicia faba* es más tolerante a condiciones de suelos ácidos que la mayoría de las leguminosas. Las estaciones de crecimiento deben tener poco o no excesivo calor, las temperaturas óptimas para la producción varían de 18 a 27°C (Duke, 1981). El periodo de madurez puede ir de 90-220 días dependiendo del cultivar y las condiciones climáticas (Bond *et al.*, 1985).

2.4 Importancia del cultivo

En general las legumbres son de importancia nutritiva y económica por su presencia en los alimentos de millones de personas de todo el mundo. La importancia principal de las legumbres reside en su elevado contenido de proteínas (el doble o triple de la mayoría de los cereales) así como en el hecho de constituir una valiosa fuente de energía. Contienen, además, una buena cantidad de minerales esenciales nutritivos, como calcio y hierro (Cuadro 2.1).

La utilización de las legumbres como alimentos se concentra en los países en desarrollo, que absorben el 90 por ciento del empleo mundial de legumbres destinadas al consumo humano. En los países de muy bajos ingresos, las legumbres contribuyen a alrededor del 10 por ciento de las proteínas diarias y al 5 por ciento del aporte energético de la alimentación de la población. Con estos antecedentes, *Vicia faba* se sitúa como una leguminosa importante desde el punto de vista agronómico y económico, por tener las características nutrimentales de su grupo, como el alto contenido de proteínas, lo que permite su uso como leguminosa de grano en

alimentos, forraje y materia prima para la industria agroindustrial, básicamente, para la elaboración de harinas, enlatados, frituras y como congelado.

Cuadro 2.1. Valor nutritivo de algunas legumbres y de otros alimentos

Alimentos	Calorías (100g)	Proteína (%)	Calcio (mg/100g)	Hierro (mg/100g)
Frijol	341	22.1	137	6.7
Haba	343	23.4	90	3.6
Garbanzo	358	20.1	149	7.2
Caupí	342	23.4	76	5.7
Guandú	343	20.9	129	5.8
Lentejas	346	24.2	56	6.1
Trigo (harina)	370	10.9	16	1.0
Arroz (elaborado)	360	6.7	10	0.9
Maíz (harina)	360	9.3	6	1.8
Yuca	338	1.5	12	1.0
Carne	198	19.0	11	2.3
Huevo	163	12.4	50	2.5
Leche	360	36.0	1235	0.9

Fuente F.A.O 2001

Además tiene la ventaja de poderse utilizar tanto en consumo fresco, aprovechándose vainas y granos conjuntamente, así como solo los granos, dependiendo del estado de desarrollo en que se encuentren. Por ejemplo, en el Cuadro 2.2 se concentra información del contenido bromatológico y de algunos componentes químicos de la semilla del haba, tanto en estado verde como seco (Schmidt-Hebbel *et al.*, 1992), en donde se muestran cambios significativos en los contenidos de los compuestos dependiendo del estado de madurez de la semilla.

Cuadro 2.2 Contenido bromatológico y composición química de *Vicia faba* L.

Componentes	Haba Verde 100 g	Haba Seca 100 g
Proteínas	9.9 g	23.1 g
Grasa	0.3 g	1.8 g
Carbohidratos	18.3 g	49.8 g
Calcio	50.0 mg	90 mg
Fósforo	190 mg	420 mg
Hierro	20.0 mg	4.9 mg
Tiamina	0.29 mg	0.61 mg
Riboflavina	0.15 mg	0.17 mg
Niacina	1.6 mg	2.5 mg
Acido ascórbico	20.0 mg	2.0 mg
Calorías	130 cal	297 a 243 cal

2.5 Tecnología de producción

2.5.1 Variedades o cultivares de haba

Esta documentado que en México existen los granos mas grandes de la subdivisión *Vicia faba major*, lo cual implica que se identifiquen algunos tipos de haba especiales que no se conocen en ninguna otra parte del mundo (Bukasov, 1981). En nuestro país no se cuenta con variedades mejoradas, por lo que la siembra de haba se realiza mediante numerosos tipos de variedades criollas, que pueden diferir en el rendimiento, tamaño y color (Claridades, 2001). Esto conlleva a una falta de control en la calidad nutricional de la semilla que se siembra. En la actualidad, en México no se conocen estudios que describan las características de los cultivares que permitan

obtener un mejor aprovechamiento de las propiedades agronómicas y de la composición química, nutricional y funcional de las semillas de haba.

2.5.2 Zonas de producción

La producción de haba se lleva a cabo en cerca de 17 entidades, principalmente en las partes templadas. Predominantemente en los estados de Puebla, México, Tlaxcala, Veracruz, Michoacán, Oaxaca y Chiapas. Los estados de mayor importancia son Puebla (22,242 ha), Estado de México (10,310 ha), Tlaxcala (7,305 ha), Veracruz (3,666 ha) e Hidalgo (2,979 ha). Donde el 80% de la producción de la semilla a nivel nacional es aportado por Puebla (45%), Estado de México (20%) y Tlaxcala (15%) (INEGI, 1997). Dentro del Estado de Puebla, la mayor producción de haba se ubica en la región Oriente, que comprende desde Tlacotepec hasta Huitzilán pasando por Cd. Serdán y Libres (Claridades, 2001). Las diferencias en ambientes y latitudes se hacen evidentes a través de los diferentes sitios donde se cultiva esta especie, lo que sugiere también variación en los contenidos de los compuestos que los constituyen.

2.5.3 Importancia en la economía del país

México ocupa el noveno lugar a nivel mundial en producción de haba verde con una producción de 53 mil toneladas (Cuadro 2.3). En la República Mexicana el cultivo se ha extendido principalmente en los Valles Altos Centrales, con aproximadamente 53 mil hectáreas (INEGI, 1997), donde destaca el estado de Puebla, que ocupa el primer lugar a nivel nacional en la producción de haba (Claridades, 2001). Además del aspecto nutricional de *V. faba*, es importante resaltar la función ecológica dentro del

agroecosistema ya que este cultivo por su sistema radical con nódulos, implica una entrada importante de nitrógeno al suelo, de esta forma en el haba los campesinos no solo encuentran un alimento sino que además aporta una gran cantidad de biomasa que funciona como abono verde y forraje. El cultivo de haba retroalimenta las estrategias de producción para el autoconsumo a nivel de las unidades domesticas campesinas (Díaz, 2004).

Cuadro 2.3 Principales países productores de haba

Países	Producción haba verde (Ton)
Argelia	125,000
China	115,991
Chipre	110,00
Marruecos	103,820
España	73,100
Italia	66,764
Perú	66,085
Irak	60,000
México	53,000
Siria, República Árabe	53,290

Fuente: F.A.O (2002)

2.6 L-Dopa

2.6.1 Historia

L-Dopa, isómero del aminoácido 3,4-dihidroxifenilalanina, fue aislado en 1913 a partir de semillas de *Vicia faba* por Marcus Guggenheim, dos años antes Casimir Funk (1911) había sintetizado D, L-dopa en el laboratorio. Ambos investigadores

consideraron a este aminoácido como un compuesto predecesor de la adrenalina. Guggenheim, además de aislar la L-dopa, fue también el primero en realizar, con el material aislado, una cierta farmacología simple, en un mismo experimento, Guggenheim injirió 2.5 g de la L-dopa y notó su acción emética que, sin embargo, él interpretó como irritación inespecífica de la mucosa gástrica, ahora se sabe que la acción emética de L-dopa es debido a su conversión a dopamina (DA). En investigaciones realizadas durante 1927, Harai y Gondo Encontraron que D,L- Dopa causa una fuerte hiperglicemia en conejos. En 1930, Hasama demuestra que en conejos D,L-dopa , en contraste con el efecto vasopresor de la adrenalina, provoca un claro efecto en la presión arterial con bajas dosis. Más adelante en el año de 1938, Peter Holtz y colaboradores descubrieron una enzima, llamada dopa descarboxilasa, que en tejido de mamíferos (riñones) convierte a L-dopa a su correspondiente forma biológicamente activa, que es la dopamina (DA), esto representó un momento crucial en la investigación de la catecolamina; que permitió que Blaschko y Holtz postularan el camino válido de la síntesis de la catecolamina en el cuerpo:



A partir de este descubrimiento se realizaron investigaciones en animales y humanos, y fue hasta 1960 cuando se observó que en el cerebro de los enfermos con mal de Parkinson tenían un déficit de DA, un año después L-dopa fue utilizado de manera exitosa como tratamiento terapéutico en pacientes con mal de Parkinson (Hornykiewicz, 2002). Actualmente L-dopa siguen siendo el tratamiento más eficaz para el control sintomático de la enfermedad de Parkinson. El cuadro 2.4 reseña la

historia de la evolución del uso de L-dopa en el tratamiento del Síndrome de Parkinson.

Cuadro 2.4 Descubrimientos que llevan al uso de la L-dopa para tratamiento de Parkinson

AÑO	EVENTO
1911	Funk sintetizó D, L-dopa en el laboratorio.
1913	M. Guggenheim aisló L-dopa de semillas de <i>Vicia faba</i> , isómero biológicamente inactivo
1916	L-Dopa fue propuesto como el compuesto originario de la melanina.
1927	Hirai y Gondo reportan que D, L-dopa causa hiperglucemia en conejos
1930	Hasama demostró que D,L-dopa produce la baja de presión arterial en conejos
1938	Holtz et al descubren la enzima L-dopa descarboxilasa, al transformar L-dopa a DA por homogenizados renales
1939	L-dopa se postuló como un intermediario en la formación de catecolaminas fisiológicamente activas.
1941-42	L-Dopa es descarboxilada a DA en el cuerpo animal y humano.
1957-59	La descarboxilación que produce DA ocurre en el cerebro de animales y humanos, es concentrado en los ganglios basales
1960-62	DA ampliamente reducida en ganglios basales y orina específicamente en pacientes con mal de Parkinson
1961-67	L-Dopa es la droga más eficiente para el tratamiento de mal de Parkinson.

2.6.2 Estructura química

En *V. faba* también están presentes compuestos fenólicos como la L-dopa (3,4-L-dihidroxifenilalanina), que en algunas ocasiones está unido a una molécula de glucosa formando su derivado β -glucosídico (Andrews y Pridham, 1965). El Dopa-glucósido, de fórmula 3-(3'- β -D-glucopiranosido-4'-hidroxifenil) alanina, por hidrólisis del enlace β -glucosídico libera una molécula de L-dopa y otra de glucosa (Figura 2.3).

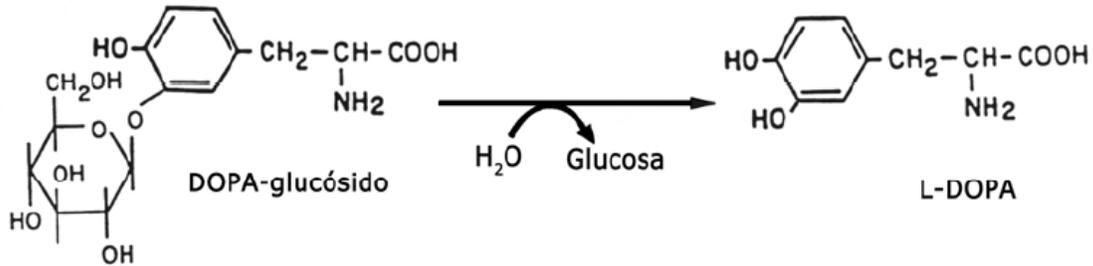


Figura 2.3 Estructura química del Dopa-glucósido y de su aglucón L-dopa

2.6.3 Biosíntesis de L-dopa

La síntesis de L-dopa se inicia por la ruta metabólica de las pentosas fosfato y continúa por la ruta del ácido shikímico, donde es sintetizado su precursor L-tirosina. Este proceso termina con la actuación de la enzima tirosina hidroxilasa, que cataliza la hidroxilación del anillo aromático de L-tirosina para transformarlo en L-dopa (Figura 2.4) (Griffith y Conn, 1973; Shetty *et al.*, 2001; Randhir *et al.*, 2002). El compuesto L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-dopa) se produce a partir del aminoácido tirosina por medio de la acción enzimática mediada por tirosinahidroxilasa. L-dopa es también la molécula precursora de los neurotransmisores dopamina, norepinefrina y epinefrina. Los estudios efectuados con sustancias marcadas con carbono 14 radiactivo, demuestran que la L-dopa se forma en el organismo y en el encéfalo a partir del aminoácido L-tirosina por la acción de la enzima L-tirosinhidroxilasa, nombre químico ácido (-)-L-amino-b-(3,4-dihidroxibenceno) propanoico precursor metabólico de la dopamina (Hornykiewicz, 2002).

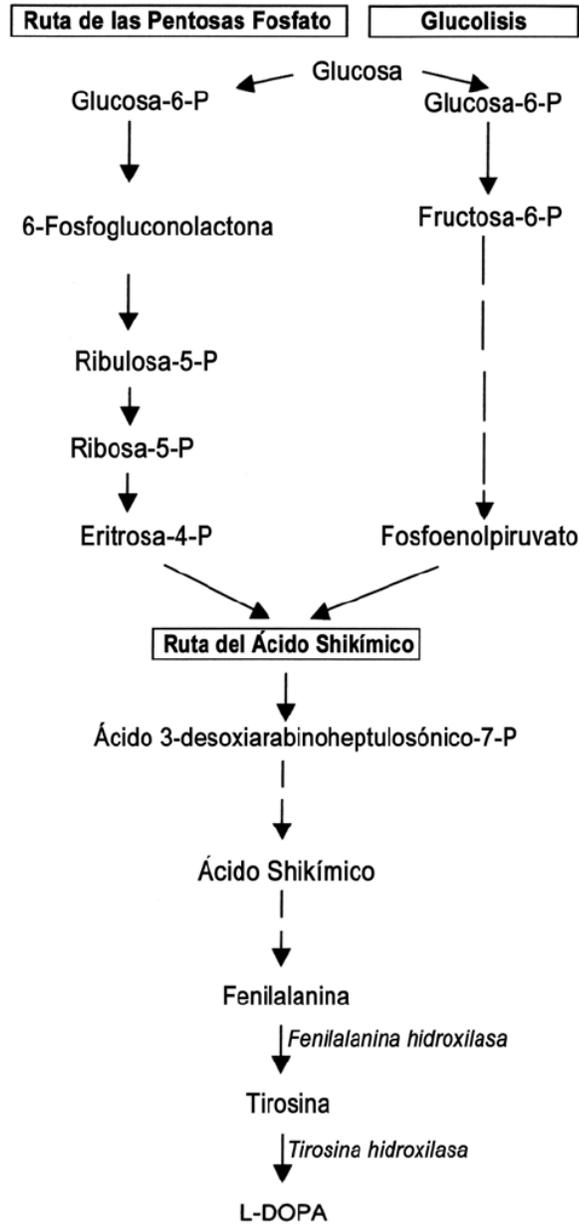


Figura 2.4 Ruta de biosíntesis de L-dopa

2.6.2 Usos terapéuticos

L-dopa se utiliza como fármaco para aumentar niveles de la Dopamina en los enfermos con mal de Parkinson, puesto que puede cruzar la barrera cerebral mientras que la dopamina no puede cruzar esta barrera. Una vez que la L-dopa se ha

incorporado el sistema nervioso central (SNC), es metabolizado a la dopamina por la enzima descarboxilasa del L-aminoácido-aromático-. Sin embargo, la conversión a la dopamina también ocurre en los tejidos finos periféricos, causando efectos nocivos y disminuyendo la dopamina disponible al SNC. Además, con el consumo de *V. faba* se evitan los efectos secundarios producidos por la L-dopa sintética y su interferencia con los alimentos ingeridos (Kempster *et al.*, 1993; Rabey *et al.*, 1993 Shetty *et al.*, 2001; Randhir *et al.*, 2002). A nivel renal, también se produce una descarboxilación enzimática de la L-dopa, que proporciona la dopamina necesaria para tratar hipertensión, alteraciones cardíacas y renales, y cirrosis hepática (Vered *et al.*, 1997). En la actualidad, el suplemento de L-dopa por la ingesta de haba está siendo explorado, debido a que el consumo de habas muestra un incremento en los niveles de L-dopa en la sangre con una marcada mejoría en los pacientes con Enfermedad de Parkinson (Randhir y Sheety, 2004).

2.6.5 Distribución de L-tirosina y L-dopa en *Vicia faba*

La L-dopa se encuentra naturalmente en plantas, vainas y frijoles de *Vicia faba* y en las semillas de *Mucuna pruriens* (Ikram-ul-Haq y Sikander Ali, 2006). Estudios realizados en la planta, flor y fruto de *Vicia faba* (variedad equina), mostraron que existe un aumento gradual de los aminoácidos L-dopa y L-tirosina, a lo largo del desarrollo vegetativo, siendo la floración el periodo de mayor contenido de ambos aminoácidos, la concentración desciende en el periodo de fructificación. En el mismo estudio se reportaron bajas concentraciones de L-dopa en las semillas y los cotiledones pero un alto contenido de L-dopa en las vainas (Cuadro 2.5)

(Cenarruzabeitia *et al.*, 1977). Los resultados descritos en el cuadro 2.5 son similares a los obtenidos por Burbano *et al.* (1995), donde se reporta una concentración de L-dopa en la testa y los cotiledones de 0.06%, y una concentración elevada en vaina verde (6.75%). La concentración en la vaina disminuye durante el secado, reportando un nivel del 0.05% cuando la vaina tiene un 80% de pérdida de agua.

Cuadro 2.5 Distribución de L-dopa en la flor y tejidos del fruto de *Vicia faba*

ORGANO DE LA PLANTA	L-DOPA mg/g tejido	L-TIROSINA mg/g tejido
Semilla completa	0.07±0.01	0.58±0.02
Tegumento de semilla	1.84±0.14	1.27±0.02
Cotiledón de semilla	0.06±0.01	0.36±0.01
Vainas de semilla	10.97±0.05	3.90±0.08
Flor	31.98±0.12	40.38±0.01

Fuente: Cenarruzabeitia *et al.* (1977)

2.7 Compuestos fenólicos en *Vicia faba*

Las plantas alimenticias son una fuente excelente de fitoquímicos fenólicos, especialmente como antioxidantes. Mientras que los antioxidantes de fuentes de la dieta se utilizan tradicionalmente en la preservación de los alimentos, y muchos de ellos tienen aplicaciones terapéuticas y en la prevención de enfermedades (Shetty, 1997, 2001). Por lo que en años recientes reviste gran importancia conocer la función nutricional y terapéutica de los fitoquímicos que se consumen en la dieta, especialmente de los antioxidantes fenólicos, dada la importancia de estos fitoquímicos en la prevención de enfermedades crónicas ligadas a la oxidación (Shetty y Wahlqvist, 2004). En general los fitoquímicos fenólicos se han asociado con acción

antioxidante en los sistemas biológicos, interviniendo como rastreadores de oxígeno singulete y radicales libres (Rice-Evans *et al.*, 1995). Estudios realizados con anterioridad señalan una función para los compuestos fenólicos vegetales en la salud humana, en particular en el cáncer (Hertog *et al.*, 1995; Paganga *et al.*, 1999). Así se sabe que los compuestos fenólicos vegetales son un subgrupo importante de metabolitos secundarios, que tienen diversas aplicaciones funcionales y medicinales (Shetty y Wahlqvist, 2004).

Por ejemplo, las semillas de *Vicia faba* que son un recurso valioso en la alimentación por su alto contenido de proteína, presentan factores anti-nutricionales que limitan su uso. Como lo muestra Bond (1976), quien documenta la presencia de compuestos fenólicos (taninos) en algunos cultivares de haba. Por otra parte, en un trabajo realizado sobre la composición de compuestos fenólicos en dos cultivares de *Vicia faba*, uno rico en taninos condensados (cv. Alfred) y otro libre de taninos (cv. Blandine), mostro que las semillas tuvieron dos diferentes patrones químicos (Bekkara, 1998). Por ejemplo, el patrón de compuestos fenólicos de la testa del cv. Alfred tuvo principalmente derivados de catequinas, taninos condensados y flavonas, mientras que el patrón de fenólicos del cotiledón y la semilla completa fueron muy parecidos y se compusieron principalmente de ácidos fenólicos, catequina y en cantidades menores flavonas. La testa del cv. Blandine presento ácidos fenólicos, flavonas, flavonoles y dihidroflavonoles, en contraste el perfil fenólico de la semilla entera y los cotiledones estuvieron constituidos principalmente de ácidos fenólicos.

Algunos otros datos sobre la presencia de compuestos fenólicos en *V. faba*, argumentan que estos compuestos se producen como una respuesta al medio

ambiente, como resultado del metabolismo secundario. Por ejemplo, el caso de plantas sometidas a estrés biótico y abiótico, muestran la estimulación de compuestos fenólicos incluyendo lignina y suberina, particularmente la exposición de *V. faba* a un tratamiento de microondas, muestra un incremento de compuestos fenólicos (Randhir y Shetty, 2004). Actualmente se están realizando estudios para identificar las relaciones entre compuestos fenólicos y L-dopa.

III. Objetivos

3.1 Objetivo general

Determinar cambios en la composición química de pericarpio y semilla de *Vicia faba* L. en diferentes estados de desarrollo en colectas representativas de la Mesa Central de México

3.2 Objetivos Particulares

- Determinar la variación en el contenido de proteína, compuestos fenólicos, L-dopa y L-tirosina en pericarpio y semillas de diferentes colectas de *Vicia faba* L.
- Conocer la distribución del contenido de proteína, compuestos fenólicos, L-dopa y L-tirosina en vaina, testa y cotiledón de *Vicia faba* L. a diferentes días después de la floración,
- Con base en su composición química, identificar las colectas de haba con características deseables para consumo directo y el aprovechamiento industrial.

IV. Hipótesis

El contenido de proteína, compuestos fenólicos, L-dopa y L-tirosina variara diferencialmente en los tejidos de la vaina de *Vicia faba* en relación con el estado de desarrollo y con el genotipo.

V. MATERIALES Y METODOS

5.1 Material vegetal

Se utilizaron 34 colectas previamente seleccionadas por sus características fenológicas sobresalientes, 19 de las colectas provenientes del Estado de Puebla, 10 del Estado de México y 4 de Tlaxcala, además de 1 colecta extranjera, con la finalidad de ser utilizada como colecta control (Cuadro 5.1A, ver apéndice)

5.2 Diseño de lotes experimentales

La siembra se realizó el día 4 de abril del 2006, en condiciones de temporal, en el predio del Sr. Felipe Jiménez, ubicado en San Cayetano perteneciente al Municipio de Chalchicomula de Sesma, Serdán, Puebla. Se establecieron 3 bloques de 3 m con 12 surcos cada uno, el ancho del surco fue de 70 cm, en cada surco se sembraron 7 matas de cada una de las 33 colectas. Se utilizó 1 surco para cada colecta con una distancia entre matas de 30 cm, el número de granos por mata fue de dos.

5.2.1 Marcado de flores

Con la finalidad de evitar la polinización cruzada, el día 9 de junio de 2006, sobre la parcela experimental se colocó una malla antiáfidos (Figura 5.1); a partir de esta fecha las plantas de las colectas precoces se encontraban en el inicio de la floración y se comenzó el marcaje de las flores abiertas de cada mata, con listones de colores, con el objeto de conocer la edad de las vainas formadas y así poder hacer la colecta de las muestras en el tiempo elegido (Figura 5.2).



Figura 5.1 Parcela experimental, cubierta por malla antiáfidos, en donde se establecieron las colectas.



Figura 5.2 Marcado de flores para control de la edad en vainas de *Vicia faba*, formación de vainas en *Vicia faba*

5.3 Colecta de vainas y flores

La colecta de las vainas se realizo a los 25, 30, 40 y 90 días después de la floración (DDF). De cada colecta se colectaron de 15-20 vainas por cada fecha, estas muestras se almacenaron en bolsas de aluminio y se transportaron en un termo con hielo para mantenerlas frescas para su disección en pericarpio, testa y cotiledón (Fig. 5.3). Posteriormente el 60% del material disecado fue congelado a -40°C para los análisis de contenido de proteína y compuestos fenólicos totales y el resto se liofilizo para realizar posteriormente los análisis de L-dopa y L-tirosina.



Figura 5.3 Material disecado de *Vicia faba* L, pericarpio y semillas, a 30 días después de la floración

Adicionalmente se colectaron muestras (10-15 repeticiones) de estructuras reproductivas: botón chico (4-6 mm) (Figura 5.4A), botón grande (8-12 mm) (Figura 5.4B) y flor abierta (Figura 5.4C) de las colectas: Master Piece Green, C-182, C-160 y C-161, las cuales fueron liofilizadas y mantenidas en refrigeración para realizar posteriormente los análisis del contenido de L-tirosina y L-dopa.

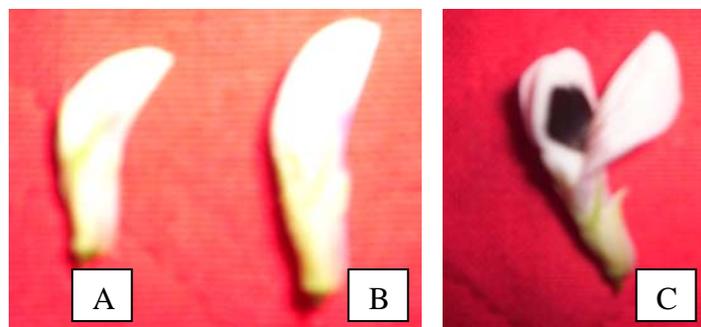


Figura 5.4 Muestras colectadas durante la floración de *Vicia faba* L.: A) Botón chico, B) Botón grande y C) Flor.

5.3.1 Técnicas de análisis

Se realizaron análisis de contenido de proteína soluble, compuestos fenólicos totales, L-tirosina y L-dopa en el material disecado (pericarpio, testa y cotiledón) de las diferentes colectas. En las estructuras reproductivas solo se analizó L-tirosina y L-dopa.

5.4 Proteína soluble total

La presencia de aminoácidos y proteínas en una disolución puede ponerse de manifiesto por un gran número de ensayos generales o específicos (según el grupo funcional con el que reacciona el reactivo) basados en la formación de un compuesto coloreado entre el aminoácido o la proteína y un reactivo específico. El Método de Bradford (1976) se basa en la unión no covalente del azul de Coomassie a las proteínas, utilizando como estándar albúmina de suero bovino, leyendo la absorbancia a 595 nm.

5.4.1 Preparación de extractos para cuantificación de Proteína

50 mg de material vegetal se extrae en 1 mL de buffer de extracción (Tris-HCl 100 mM pH 7.6 conteniendo DTT 5mM), usando un mortero frío y un poco de arena de mar. El extracto se mantiene en hielo y se centrifuga a 14000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Las alícuotas de los extractos se almacenan en congelación a -20 °C.

5.4.2 Determinación de Proteína

El ensayo de proteica consiste en mezclar en un tubo eppendorf 5 µL del sobrenadante de la extracción más 295 µL de agua. Preparar por lo menos un blanco con solo 300 µL de agua. Una vez que se tienen preparados todos los tubos con los estándares y las muestras que se van a medir por triplicado se agregan 50 µL de reactivo de Bradford a cada tubo. Se agitan los tubos y en un lapso no mayor de 15 minutos se toma la lectura en el lector de microplacas a una longitud de onda de 595 nm.

5.4.3 Curva de calibrado de proteína

Se realiza una curva estándar de proteína (12.5 mg de albúmina/50 mL de agua) BSA ($0.25 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) (cuadro 5.2A, ver apéndice) (figura 5.5A, ver apéndice).

5.5 Determinación de compuestos fenólicos

Se utilizó el micro-método de Folin-Ciocalteu propuesto por Singleton y Rossi (1965) y modificado por Singleton *et al.* (1999). Para esta prueba se usaron 50 mg de muestra, que se colocaron en 1.5 mL de etanol al 95%, se mantuvieron a -20°C

durante 48-72 h. Posteriormente la muestra se macero y se centrifugo a 13000 rpm por 10 minutos. 20 μL del sobrenadante (o de estándar ácido gálico) se mezcló con 1.58 mL de agua destilada y 100 μL de Folin al 50% (Sigma, St. Louis, MO). Después de 8 minutos se adicionaron 300 μL de Na_2CO_3 al 5%, se agito con el vortex y se incubo 30 minutos en oscuridad en baño maría a 40°C. Posteriormente se midió la absorbancia a 725 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Evolution 300, Thermo).

5.5.1 Curva de calibrado de compuestos fenólicos

Se hizo una curva patrón con Acido Gálico 25 mg en 5 mL de etanol y se aforo a 50 ml de agua destilada ($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Cuadro 5.3A, ver apéndice).

5.6 Determinación de L-dopa y L-tirosina

Los aminoácidos L-dopa y L-tirosina se cuantificaron en los tejidos liofilizados de haba (vaina, testa, cotiledón, botones florales y flores) de acuerdo con el método propuesto por St-Laurent *et al.* (2000) con algunas adecuaciones.

5.6.1 Extracción

Para proceder a la extracción de la L-dopa y la L-tirosina se tomaron 35 mg de tejido (vaina, testa cotiledón o flor) macerado en mortero y se añadieron 7.5 mL de una solución de agua:acetonitrilo 85:15 a pH 5. La mezcla se homogenizó en un homogenizador Heidolph (mod. DiAx 600) a 9500 rpm, durante 5 min, manteniendo la muestra en hielo. Posteriormente el homogenizado se centrifugó a 712 g durante 15 minutos en una centrífuga marca Eppendorf (modelo 5804). A continuación se colectó

el sobrenadante y se filtró a través de un acrodisco con una membrana de poro 0,45 μm , (Millipore), el filtrado se depositó en viales de 2 mL. Los viales se mantuvieron en baño con hielo hasta el momento de la inyección en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución, o bien se almacenaron en refrigeración a 4°C por 12 h para su posterior análisis. La extracción de estos compuestos se realizó por duplicado para cada muestra.

5.6.2 Separación y cuantificación

La valoración de L-dopa se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en fase reversa, utilizando un cromatógrafo (Hewlett Packard, modelo 1100, Alemania) equipado con bomba cuaternaria, un inyector automático marca. Agilent Technologies mod. 1200 y un detector de arreglo de diodos.

La L-dopa se separó con una columna Chiral-AGP de 100 x 4.0 mm D.I., de 5 μm de tamaño de partícula, utilizando como fase móvil (1 mL min^{-1}) 15:85 de acetonitrilo (ACN): agua, una longitud de onda de 280 nm y una temperatura de análisis de 25° C. Para la separación y cuantificación de L-tirosina se utilizó una columna LiChrospher RP 18, 250 x 4.6 mm D.I., de 5 μ de tamaño de partícula, de Hewlett Packard, también se utilizaron las mismas condiciones del cromatógrafo que se emplearon en el análisis de L-dopa. Una vez finalizados los análisis se lavaron las columnas con un gradiente de agua: ACN en el siguiente orden: t=0 min, 15% ACN, 85% Agua; t=15 min, 30% ACN, 70% Agua; t=30 min, 50% ACN, 50% Agua; t=45 min, 75% ACN, 25% Agua; t=60 min, 100% ACN. Al inicio del análisis, se retiró el ACN haciendo pasar por

la columna la combinación de fase móvil 15:85 ACN: agua hasta que se presentó la señal estable. Cada muestra se analizó por duplicado en condiciones isocráticas.

5.6.3 Preparación de curva estándar.

La identificación y cuantificación de la L-dopa y L- tirosina se hizo comparando los tiempos de retención y espectros obtenidos con los de la curva construida con sus estándares respectivos de L-dopa (3,4-Dihidroxi-L-fenilalanina, sigma, No. Cat. D9628) y L-tirosina (Harleco, No. Cat P-271).

La curva estándar se preparó con diluciones de una solución patrón disolviendo 5 mg de L-dopa en 1 mL de fase móvil, se añadieron 100 μ L de ácido ortofosfórico y 300 μ L de una solución 5N de NaOH, agitándose vigorosamente hasta la disolución de la L-dopa y L-tirosina. A partir de la solución patrón se prepararon diluciones con 18, 36, 72, 142 y 286 μ g/ mL de L-dopa (figura 5.6A) y L-tirosina (figura 5.7A) por separado. Los compuestos presentaron un comportamiento lineal en el intervalo de concentración utilizado, con un coeficiente de correlación (r) de 0,998.

5.7 Análisis estadístico

A cada conjunto de datos se les aplicó la prueba de normalidad (Bondad y ajuste; χ^2). Las variables que no presentaron una distribución normal fueron transformadas a logaritmo base 10 o a logaritmo natural, para la aplicación del análisis de varianza. Las que presentaron igual número de repeticiones en la programación de SAS se analizaron con la terminación PROC ANOVA, por el contrario las variables con diferente número de repeticiones con la terminación PROC GLM. Para las diferencias

estadísticas entre las medias se aplicó la prueba de Tukey. El paquete estadístico que se utilizó fue STATGRAPHICS Plus 4 y SAS 9.1.

El modelo estadístico del diseño experimental completamente al azar fue:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} : variable respuesta

i : tratamiento

j : repetición

μ : media

T_i : efecto del tratamiento

ϵ_{ij} : error experimental

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Contenido de proteína, compuestos fenólicos totales, L-dopa y L-tirosina en pericarpio y semilla a diferentes días después de la floración en colectas de *Vicia faba* L.

A continuación se describen los cambios en composición química de pericarpio y semilla de *Vicia faba* L. en diferentes estados de desarrollo de 22 colectas de la Mesa Central de México, provenientes de los principales estados productores de este cultivo (Puebla, Estado de México, Tlaxcala). La variación entre germoplasma de haba presentó diferencias estadísticas altamente significativas entre colectas, tejido y días después de floración (DDF) en las cuatro variables evaluadas en la vaina y el grano ($p \leq 0.01$) (Cuadro 6.1). El coeficiente de variación para la mayoría de las variables químicas estudiadas presenta una variación entre 13.55 y 16.55%, lo que confiere respaldo estadístico para la interpretación de los resultados obtenidos (cuadro 6.1).

Cuadro 6.1. Promedios, coeficientes de variación y cuadrados medios de cuatro variables en 20 colectas de haba de los Valles Altos de México.

Variable	Media	Coeficiente de Variación	Cuadrados medios			
			Colecta	Tejido	DDF [†]	Error
Proteína (%)	5.952	15.636	22.827***	4771.865**	690.347***	0.866
C. fenólicos (%)	31.389	16.297	1943.982***	22182.421***	39998.374***	26.170
L-Dopa (mg·g ⁻¹ PS)	4.215	13.552	19.009***	6.51.301***	61.783***	0.326
L-Tirosina (mg·g ⁻¹ PS)	0.437	16.55	0.827***	2.312***	0.269***	0.005

[†] Días después de floración. *** P<0.0001

En el cuadro 6.2 se presentan los promedios por colecta de las cuatro variables de las 22 colectas, independientemente de tejidos y DDF.

Cuadro 6.2. Promedios de cuatro variables químicas de las colectas de haba de los Valles Altos de México.

Colecta	Proteína (%)	C. fenólicos (%)	L-Dopa (mg·g ⁻¹ PS)	L-Tirosina (mg·g ⁻¹ PS)
32	6.078 ^{cdefgh}	24.659 ^{gh}	5.246 ^{bc}	0.244 ^{hi}
86	5.926 ^{defghi}	29.652 ^{defg}	4.461 ^{cdef}	0.485 ^{de}
117	5.256 ^{fghij}	30.863 ^{def}	5.003 ^{bcde}	-----
160	6.981 ^{bcd}	43.842 ^b	-----	-----
161	4.439 ^{jk}	73.877 ^a	0.533 ^k	0.172 ⁱ
171	4.900 ^{ij}	37.000 ^c	4.166 ^{defg}	0.167 ⁱ
181	-----	-----	9.263 ^a	0.296 ^{gh}
182	5.489 ^{efghij}	26.416 ^{efg}	2.371 ^j	0.384 ^{fg}
193	5.079 ^{ghij}	26.036 ^{fg}	-----	0.315 ^{gh}
216	3.740 ^k	29.433 ^{defg}	-----	-----
238	5.987 ^{cdefgh}	49.333 ^b	5.510 ^b	0.251 ^{hi}
249	7.038 ^{bc}	31.020 ^{cdef}	2.760 ^{ij}	0.568 ^{cd}
252	6.130 ^{bcdefg}	32.117 ^{cde}	3.236 ^{ghij}	0.518 ^{de}
268	6.032 ^{cdefgh}	---	3.665 ^{fghi}	1.137 ^a
269	6.696 ^{bcd}	27.298 ^{efg}	3.580 ^{fgh}	0.469 ^{ef}
272	5.017 ^{hij}	26.974 ^{efg}	5.120 ^{bcd}	-----
274	8.623 ^a	-----	-----	0.653 ^c
279	5.694 ^{efghi}	31.145 ^{cdef}	2.792 ^{ij}	-----
280	6.286 ^{bcdef}	19.091 ^h	3.061 ^{hij}	0.822 ^b
281	7.191 ^b	29.478 ^{defg}	-----	-----
284	6.636 ^{bcde}	34.682 ^{cd}	4.065 ^{efg}	0.630 ^c
MP	5.202 ^{ghij}	32.212 ^{cde}	3.697 ^{fghi}	0.435 ^{ef}
DMS	1.066	6.053	0.980	0.098

Media armónica para Proteína soluble = 19.72, Compuestos fenólicos = 18.275, L-dopa = 8.436 y L-tirosina = 13.23. MP: Master Piece. Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa Tukey ($P \leq 0.05$)

Las diferencias entre colectas, resultaron altamente significativas para todas las variables, lo que pudiera ser un indicador de la amplia diversidad genética entre las poblaciones de los diferentes agricultores y des base para identificar material sobresaliente dentro de cada variable evaluada (cuadro 6.2). En particular se detecto que la colecta 274 fue estadísticamente superior y diferente a las demás colectas en relación con su contenido de proteína independientemente del tejido y la edad (cuadro 6.2), aunque también se identificaron algunas colectas con contenido bajo como la 161 y la 216. Sin embargo, respecto al contenido de compuestos fenólicos en promedio en todos los tejidos la colecta 161 fue la que supero estadísticamente a todos las demás colectas mostrando los contenidos más altos (cuadro 6.2). En relación con el contenido de L-dopa, en promedio de los tres tejidos (vaina, testa y cotiledón) se detecto un intervalo bastante amplio de $0.53 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS hasta $9.26 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS, destacando la colecta 181 que en promedio tuvo el contenido mayor y fue estadísticamente diferente a las otras colectas (cuadro 6.2). El contenido de L-tirosina en promedio tuvo un intervalo más estrecho de variación de $0.17 - 1.14 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS (cuadro 6.2).

Los valores promedio de las cuatro variables evaluadas por tejido y por días después de la floración (DDF) de las 22 colectas estudiadas se muestran en el cuadro 6.3. Las diferencias entre tejidos y entre DDF, resultaron estadísticamente significativas estadísticamente para todas las variables (cuadro 6.3). En relación al contenido de proteína la mayor acumulación se presento a los 90 DDF en el cotiledón, y el contenido más bajo a los 25 DDF tanto en testa como en vaina (cuadro 6.3). Los compuestos fenólicos tuvieron su mayor acumulación en la testa a los 25 DDF, y

tendieron a disminuir de forma gradual a partir de los 30 DDF, teniendo los valores estadísticamente menores cuando la semilla está madura a los 90 DDF (cuadro 6.3). Respecto al contenido de L-dopa, la vaina fue el tejido que en promedio tuvo el contenido más alto, seguido de la testa y el cotiledón, y fue a los 25 DDF, en el estado de madurez más temprano evaluado, cuando se detectaron los valores mayores (cuadro 6.3). Mientras que la L-tirosina se acumulo principalmente en el cotiledón y en la testa, y fue a los 30 y 90 DDF cuando se mostraron los valores más altos (cuadro 6.3).

Cuadro 6.3. Promedios para cuatro variables en vaina, testa y cotiledón, y a diferentes días después de la floración de 22 colectas de haba de los Valles Altos de México.

Factor	Proteína (%)	C. fenólicos (%)	L-Dopa (mg·g ⁻¹ PS)	L-Tirosina (mg·g ⁻¹ PS)
DDF [§]				
25	3.259 ^c	56.147 ^a	5.712 ^a	0.392 ^c
30	6.122 ^b	34.694 ^b	4.489 ^b	0.475 ^a
40	6.292 ^b	16.667 ^c	4.216 ^b	0.427 ^b
90	8.953 ^a	6.046 ^d	3.176 ^c	0.451 ^{ab}
DMS	0.303	2.013	0.296	0.031
Tejido [¶]				
Vaina	3.008 ^b	23.811 ^b	6.570 ^a	0.261 ^b
Testa	2.952 ^b	38.848 ^a	1.985 ^b	0.519 ^a
Cotiledón	11.898 ^a		1.344 ^c	0.523 ^a
DMS	0.231	1.032	0.246	0.024

Medias con la misma letra en cada variable y por cada factor no son estadísticamente diferentes (Tukey $P \leq 0.05$). DDF: días después de la floración. [§]Medias de todas las colectas y de todos los tejidos (vainas, testa y cotiledón). [¶]Medias de todas las colectas y de los diferentes DDF.

La interacción de días después de la floración (DDF) con los tejidos (vainas, testa y cotiledón) de las 22 diferentes colectas de haba evaluadas tuvo un efecto diferencial en las variables (cuadro 6.4). Por ejemplo, el contenido de proteína en el cotiledón fue mayor y estadísticamente diferente a la testa y la vaina desde los 25 hasta los 90

DDF. El contenido de compuestos fenólicos, la testa fue el tejido que mantuvo el valor más alto y estadísticamente diferente a la vaina aunque tendió a disminuir con el desarrollo de los tejidos (cuadro 6.4).

Cuadro 6.4 Comparación de promedios de cuatro variables químicas en vaina, testa y cotiledón en distintas fechas de floración de las 22 colectas de haba.

Factor	Proteína (%)	Compuestos fenólicos (%)	L-Dopa (mg·g ⁻¹ PS)	L-Tirosina (mg·g ⁻¹ PS)
25 DDF				
Tejido				
Vaina	3.134 ^b	48.619 ^b	7.244 ^a	0.362 ^b
Testa	2.781 ^c	64.093 ^a	2.462 ^b	0.486 ^a
Cotiledón	4.247 ^a		2.067 ^b	0.284 ^c
DMS	0.248	2.542	0.796	0.059
30 DDF				
Tejido				
Vaina	5.487 ^b	20.333 ^b	4.800 ^a	0.253 ^c
Testa	5.760 ^b	49.288 ^a	4.215 ^b	0.400 ^b
Cotiledón	9.401 ^a		3.482 ^c	0.793 ^a
DMS	1.643	2.246	0.571	0.031
40 DDF				
Tejido				
Vaina	1.900 ^b	11.242 ^b	5.107 ^a	0.212 ^c
Testa	1.949 ^b	22.091 ^a	2.035 ^b	0.672 ^a
Cotiledón	15.026 ^a		1.139 ^c	0.398 ^b
DMS	3.399	2.838	0.275	0.028
90 DDF				
Tejido				
Vaina	1.022 ^b	4.024 ^b	10.320 ^a	0.245 ^b
Testa	1.113 ^b	7.778 ^a	0.403 ^b	0.480 ^a
Cotiledón	24.721 ^a		0.246 ^b	0.549 ^a
DMS	3.371	0.615	0.604	0.095

Medias con la misma letra en cada variable y por cada factor no son estadísticamente diferentes (Tukey $P \leq 0.05$). DDF: días después de la floración.

Respecto al contenido de L-dopa, la vaina fue el tejido que tuvo la concentración más alta seguida de la testa y el cotiledón a partir de los 25 DDF. Mientras que la acumulación de L-tirosina, aunque tendió a presentar los contenidos más altos en la

testa a los 25, 40 y 90 DDF, no tuvo un patrón tan definido por tejido como en las otras variables evaluadas (cuadro 6.4).

6.2 Correlaciones entre las variables de respuesta Proteína, Compuestos fenólicos, L-dopa y L-tirosina.

Con el propósito de detectar la relación entre variables se determinaron los coeficientes de correlación entre las variables de respuesta mediante la Prueba de Pearson (Milton y Tsokos, 2001), la cual realiza una cuantificación de la fuerza de la relación lineal entre dos variables cuantitativas, es decir, determina el grado de correlación adaptado a la naturaleza de los datos.

La correlación de proteína con compuestos fenólicos resulto positiva y altamente significativa (cuadro 6.5).

Cuadro 6.5 Correlaciones entre las variables químicas evaluadas en vaina, testa y cotiledón de las colectas de *Vicia faba* L.

Variables	n	r	P
Proteína x Compuestos fenólicos	330	0.3165	<0.0001
Proteína x L-Dopa	162	-0.4045	<0.0001
Proteína x L-Tirosina	213	0.2714	<0.0001
Compuestos fenólicos x L-Dopa	132	0.0216	0.8036
Compuestos fenólicos x L-Tirosina	144	0.1193	0.1543
L-Dopa x L-Tirosina	96	-0.2942	0.0036

Respecto a la relación entre el contenido de proteína y L-dopa se detectó una correlación negativa altamente significativa, lo que indica que las colectas de haba que presentan alto contenido de proteína tienen un contenido bajo de L-dopa, lo cual

podría ser adecuado en los casos que no se desee cultivar colectas con alto contenido de este aminoácido, pero si con un nivel adecuado de proteína. Mientras que en el contenido de proteína y L-tirosina la correlación fue positiva y altamente significativa. Además, se mostró una correlación significativa pero negativa entre el contenido de L-dopa y L-tirosina, lo que se explica por ser la L-tirosina el aminoácido precursor del aminoácido neurotransmisor L-dopa (Bahena-Trujillo *et al.*, 2000), que tiende a disminuir cuando hay una mayor síntesis de L-dopa.

6.3 CONTENIDO DE PROTEINA SOLUBLE TOTAL

6.3.1 Proteínas solubles totales a los 25, 30, 40 y 90 días después de la floración en vaina, testa y cotiledón.

El contenido de proteína que se reporta en la literatura en *Vicia faba* L. en promedio es de aproximadamente 27-28% en el cotiledón, aunque también se han reportado genotipos con 35% o cantidades mayores (Mc Phee y Muehlbahuer, 2002). Sin embargo, no se encontraron reportes en la literatura de los contenidos de proteína en las vainas y testas durante el desarrollo de las semillas de *Vicia faba* L. En este estudio se encontró que a los 25 días después de la siembra las 14 colectas evaluadas presentaron diferencias marcadas en las concentraciones de proteína soluble total en vaina, testa y cotiledón como se observa en la figura 6.1A, donde destacan las colectas 161, 238, 269 y 279 que en promedio de la suma de los tres tejidos presentaron el contenido más alto con valores de 14.09, 12.22, 11.69 y 12.27 % respectivamente (Figura 6.1A)

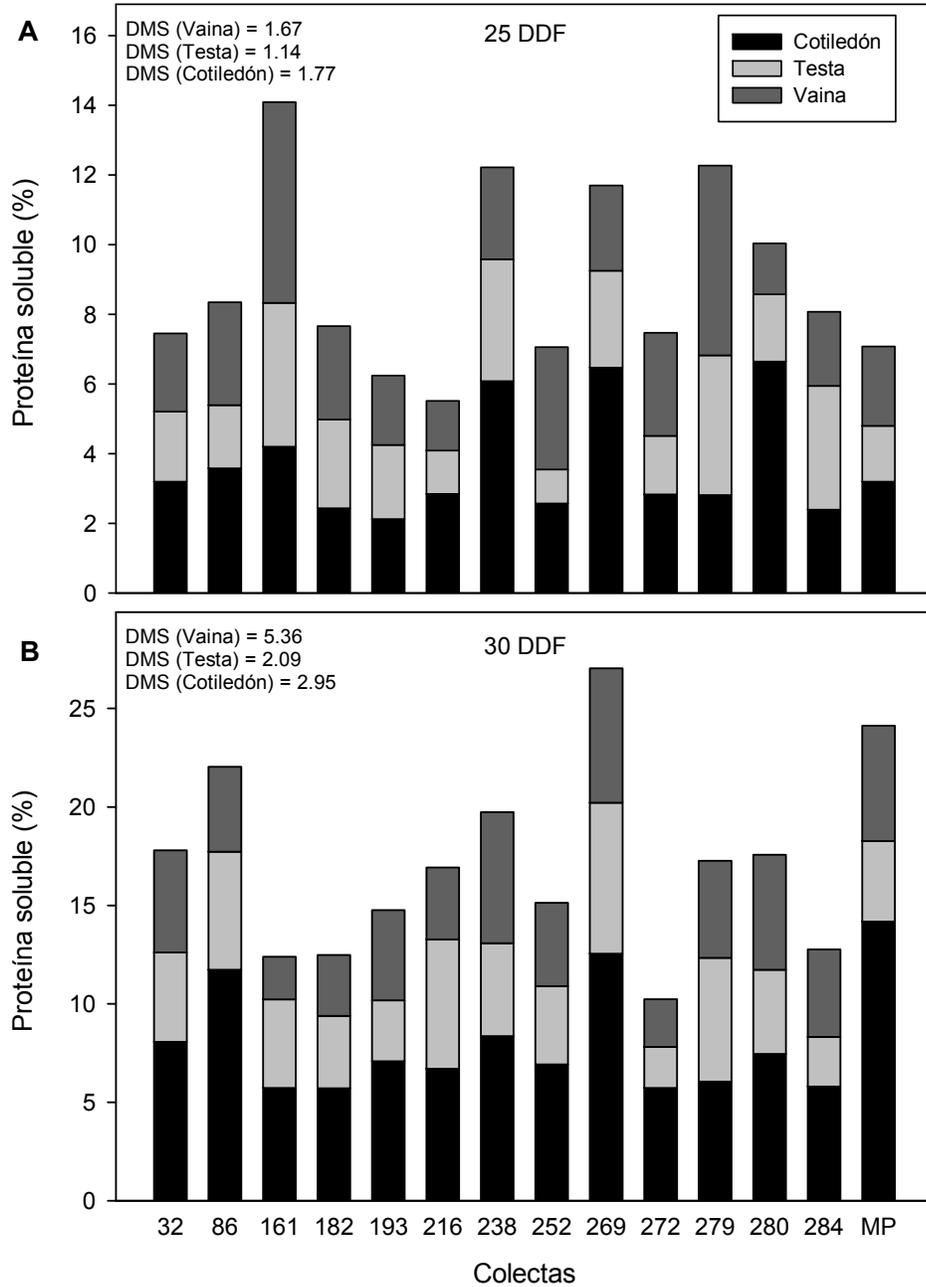


Figura 6.1 Contenido de proteína soluble total en vaina, testa y cotiledón a los 25 (A) y 30 (B) días después de la floración (DDF). Los datos son promedios, n= 10 para cada tejido.

A los 30 DDF, el patrón de acumulación de proteína se incremento y cambio entre las diferentes colectas; por ejemplo, a esta fecha fueron las colectas 86 (22.04%), 269 (27.04%) y MP (24.13%), las que en promedio de la suma de vaina, testa y cotiledón tuvieron los porcentajes mayores (figura 6.1B). Aunque a esta misma fecha (30 DDF), también se detectaron colectas con porcentajes de proteína soluble de casi la mitad de lo que acumularon algunas colectas a los 25 DDF, como la colecta 272 con un contenido de 10.24 % de la suma de los tres tejidos. Algo muy notorio fue que a partir de los 40 DDF, el contenido de proteína en el cotiledón en las diferentes colectas superó considerablemente la acumulación que se dio tanto en testa como en vaina, en donde destaco la colecta 284 con un contenido de 27.18 % en la suma de los tres tejidos (figura 6.2A). Para los 90 DDF, el contenido de proteína soluble se concentro principalmente en el cotiledón donde los porcentajes entre las colectas vario desde 19.71 % (colecta 86) hasta 28.62 % (colecta 84) (figura 6.2B).

6.3.2 Proteína soluble total en vaina

El contenido de proteína soluble total en la vaina tendió a presentar su mayor acumulación a los 30 DDF en la mayoría de las colectas de haba evaluadas, mostrando la colecta 280 el porcentaje más alto (5.85 %), a excepción de las colectas 161, 272 y 279 que presentaron sus contenidos más altos a los 25 DDF (figura 6.3).

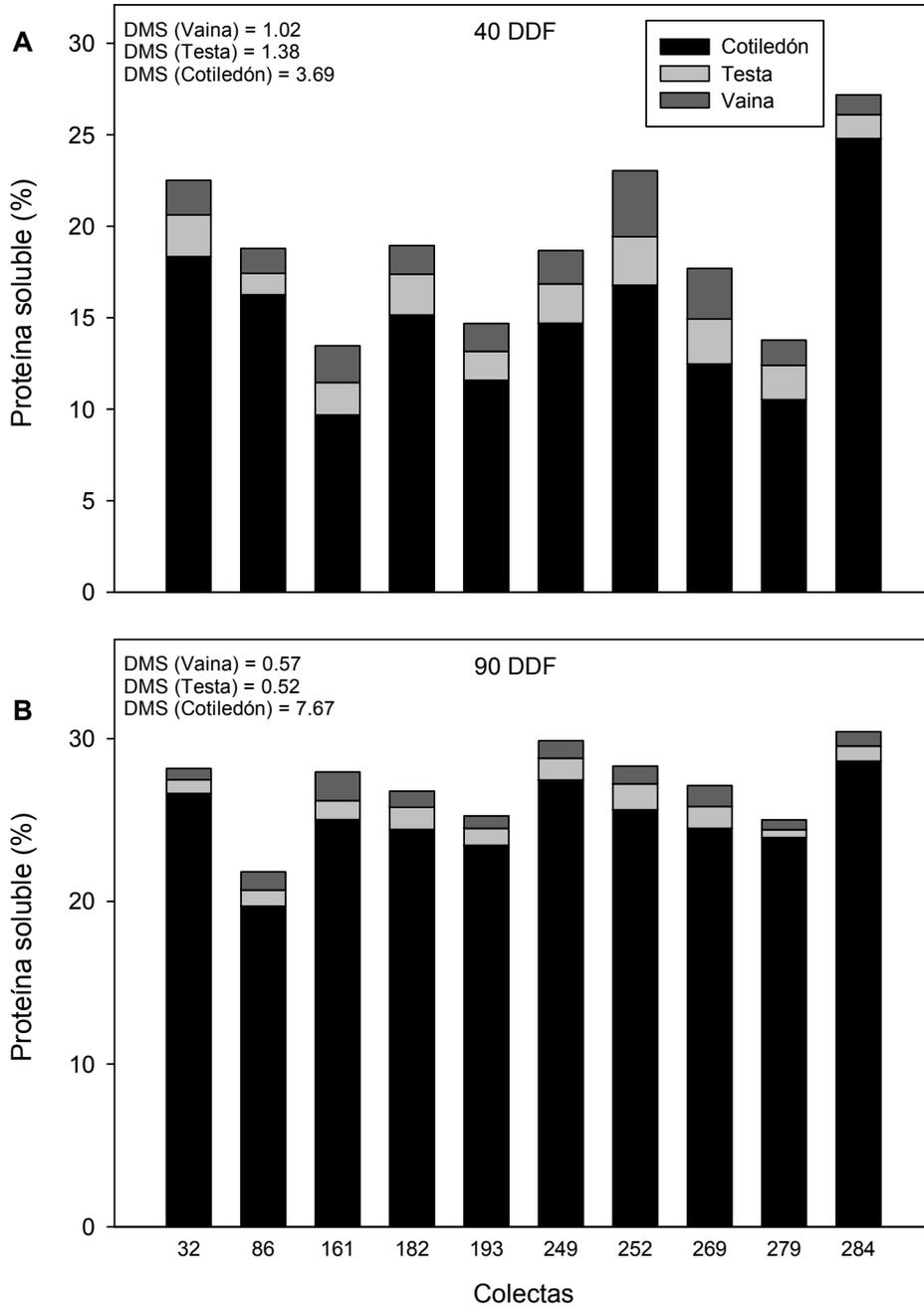


Figura 6.2 Contenido de proteína soluble total en vaina, testa y cotiledón a los 40 (A) y 90 días (B) después de la floración (DDF) en 14 colectas de haba. Los datos son promedios, n= 10 para cada tejido.

El contenido de proteína soluble tendió a disminuir notablemente a partir de los 40 DDF, presentando en esta fecha valores entre 1.07 % (colecta 284) y 2.77 % (colecta 269). A los 90 DDF, cuando la semilla esta en grano seco, la vaina tuvo los contenidos de proteína soluble más bajos que variaron entre 0.68 % (colecta 32) y 1.42 % (colecta 280) (figura 6.3). En general en cuanto al contenido de proteína soluble a través de los diferentes días después de la floración destacan las colectas 252, 269 y 279, las cuales acumularon cantidades apreciables de proteína hasta los 30-40 DDF (figura 6.3). En contraste las colectas 182, 272 y 284 fueron las que acumularon en promedio menor cantidad de proteína soluble a través de los DDF (figura 6.3).

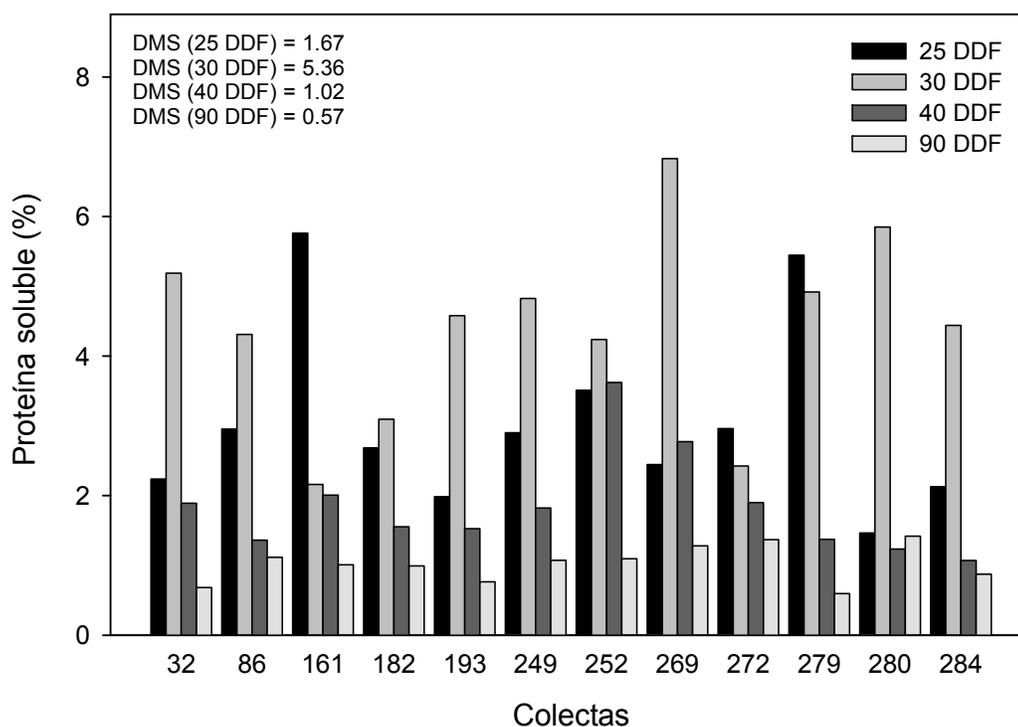


Figura 6.3 Contenido de proteína soluble total en vaina de 12 colectas de haba a 25, 30, 40 y 90 días después de la floración (DDF). Los datos son promedios n= 10.

6.3.3 Proteína soluble total en testa

En la testa el contenido de proteínas solubles tuvo en la mayoría de las colectas la acumulación más alta a los 30 DDF, donde la colecta 269 superó estadísticamente a las demás colectas con un porcentaje de 7.67 (figura 6.4). A partir de esta fecha la acumulación de proteína soluble decreció significativamente, aunque a los 40 DDF se detectaron contenidos de proteína soluble desde 1.17 % (colecta 86) hasta 2.89 % (colecta 280). A los 90 DDF algunas colectas retuvieron aun cantidades apreciables de proteína, como en la colectas 182 (1.36%), 249 (1.33%), 252 (1.60%) y 269 (1.35%) (figura 6.4), las cuales superaron al promedio (1.11%) de las colectas evaluadas en esta fecha (cuadro 6.4).

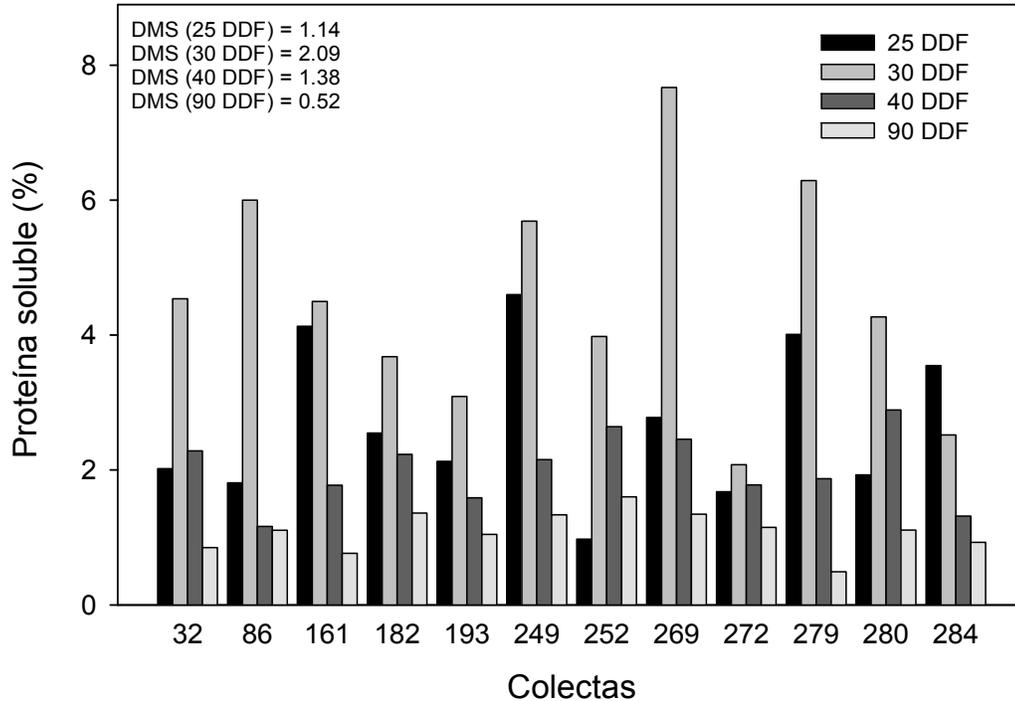


Figura 6.4 Contenido de proteínas solubles totales en testa de 12 colectas a 25, 30, 40 y 90 días después de la siembra (DDF). Los datos son promedios, n= 10.

6.3.3 Proteína soluble total en cotiledón

En el cuadro 6.4 se observa que el cotiledón fue desde los 25 DDF el tejido que presentó el contenido de proteína soluble mayor, siendo estadísticamente diferentes a la testa y la vaina ($P \leq 0.05$). El contenido de proteína soluble en el cotiledón se acumuló paulatinamente desde 25 DDF, que fue la fecha en la que se registraron los contenidos más bajos (2.12-6.47%) (figura 6.5). A los 30 DDF el contenido de proteína se incrementó casi al doble respecto a 25 DDF, se tuvieron porcentajes desde 5.71 % (colecta 18") hasta 12.54 % (colecta 269). A los 40 DDF el contenido de proteína tuvo una acumulación muy similar en la mayoría de las colectas que varió de casi 10 % a 18 %, a excepción de la colecta 284 que tuvo un porcentaje de casi 24.79 % (figura 6.5). A los 90 DDF la mayor parte de las colectas evaluadas mostraron un incremento notable en el contenido de proteína soluble respecto a los 40 DDF, a excepción de la colecta 86 que solo tuvo un incremento de 3 % en esta fecha, ya que solo acumuló 19.71 % de proteína soluble. En contraste las colectas 32, 249, 280 y 284 alcanzaron una acumulación de proteína soluble de entre 26.6 y 28.6 % (figura 6.5). Otro grupo de colectas tuvieron una acumulación entre 23.4 y 25.6 % (figura 6.5), las cuales se encuentran dentro del promedio de todas las colectas evaluadas a esta fecha (24.72%) (cuadro 6.4).

6.4 CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS

6.4.1 Compuestos fenólicos en vaina y testa a los 25, 30, 40 y 90 días después de la floración

El contenido de compuestos fenólicos solo se determinó en vaina y testa, ya que se sabe que en leguminosas estos compuestos se concentran en vaina y dentro de la semilla primordialmente en la testa (Duenas *et al.*, 2006).

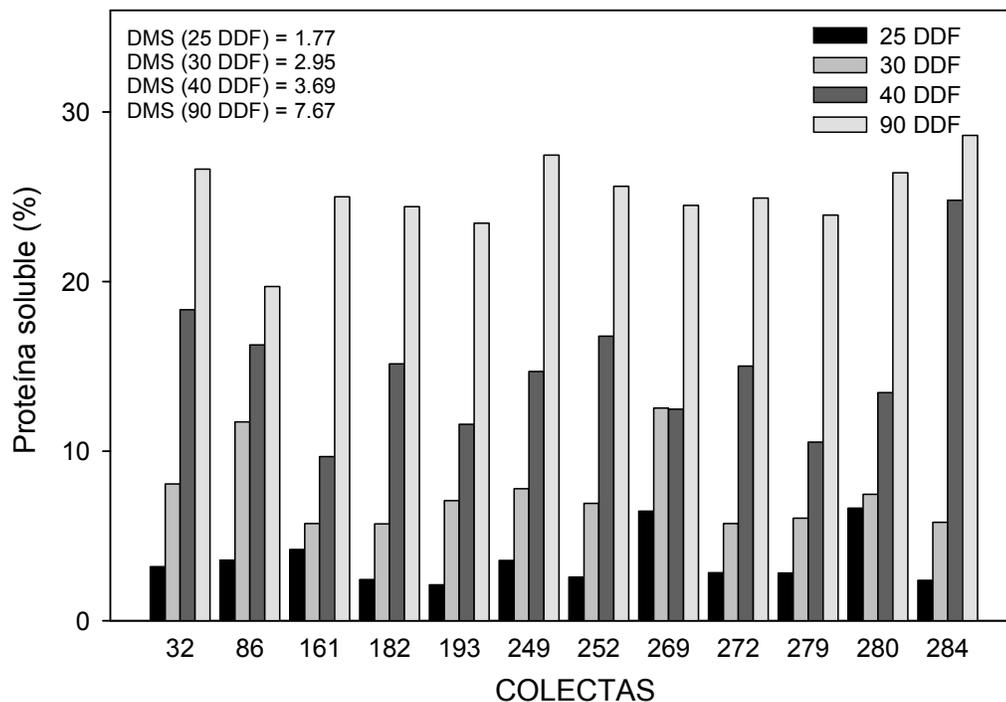


Figura 6.5 Contenido de proteína soluble total en cotiledón de 12 colectas de haba a 25, 30, 40 y 90 días después de la siembra (DDF). Los datos son promedios, n= 10.

En general en promedio de las diferentes colectas evaluadas se evidenció que a los 25 DDF se tuvieron los contenidos mayores de compuestos fenólicos y fue la testa donde se mostraron los porcentajes más altos y significativamente diferentes a la vaina (cuadro 6.3). En esta fecha también se detectó que el contenido de compuestos fenólicos en promedio de la suma del porcentaje de vaina y testa, tuvieron valores altos como la colecta 117 (124.18%), 252 (127.36%) y 279 (142.18%), aunque también se registraron colectas con porcentajes menores al 90%,

en la suma del porcentaje de vaina y testa, como la 272 (80%) y la 280 (74.5%) (figura 6.6A).

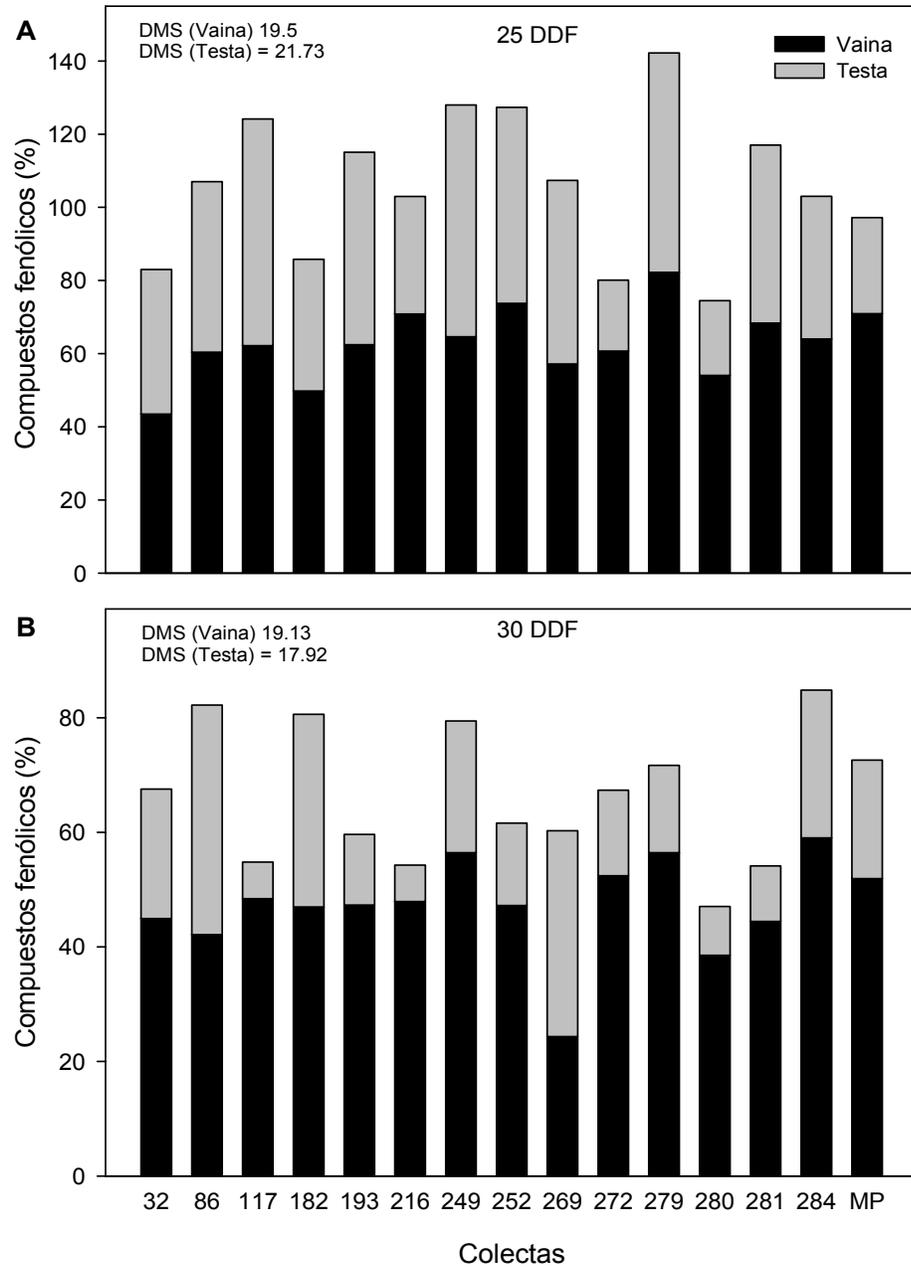


Figura 6.6 Contenido de compuestos fenólicos en vaina y testa a los 25 (A) y 30 (B) días después de la floración (DDF) en 15 colectas de haba. Los datos son promedios, n= 3 para cada tejido. MP = Master Piece

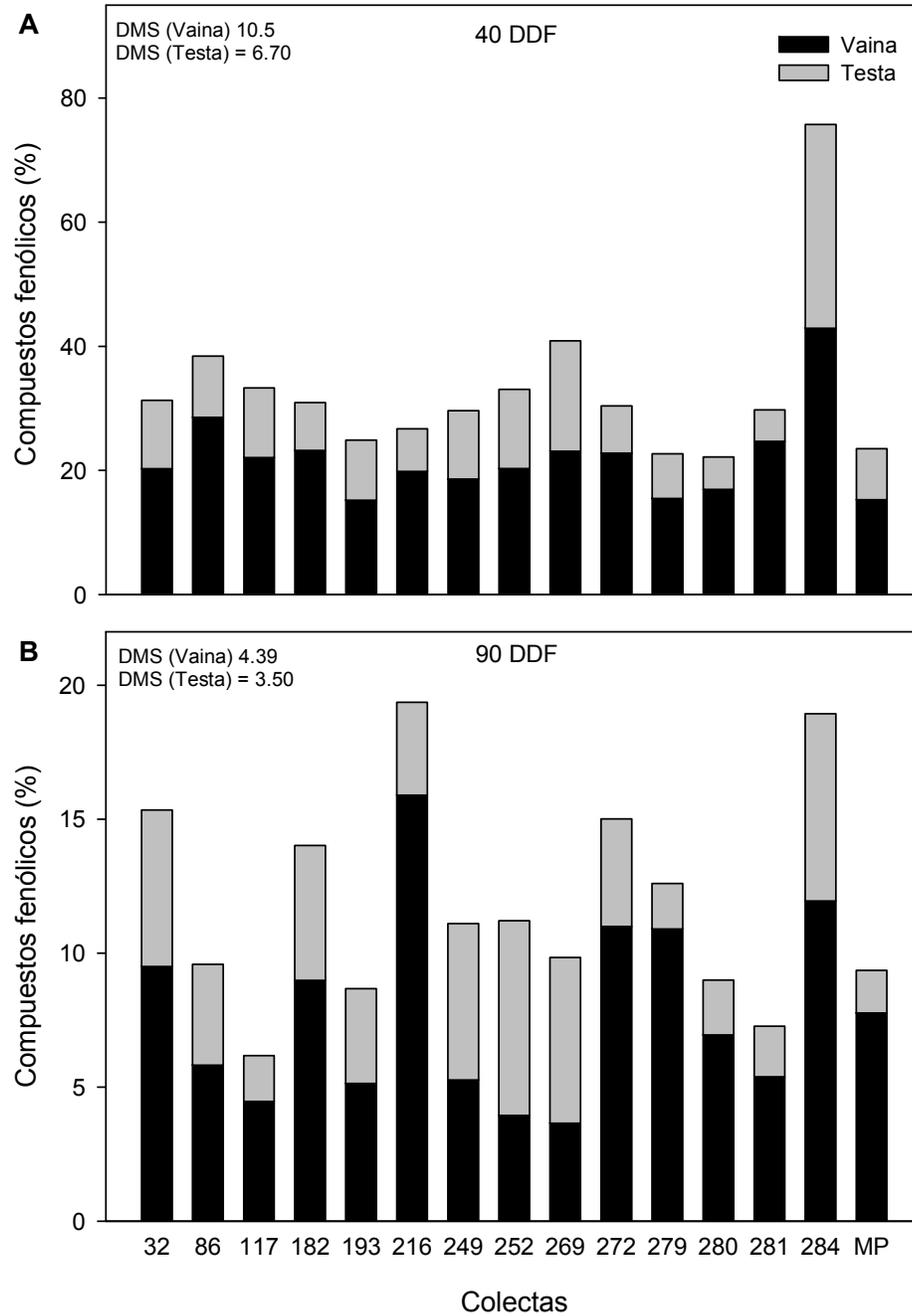


Figura 6.7 Contenido de compuestos fenólicos en vaina y testa a los 40 (A) y 90 (B) días después de la floración (DDF). Los datos son promedios, n= 3 para cada tejido. MP = Master Piece.

A los 30 DDF el contenido de compuestos fenólicos en promedio de la suma de vaina y testa fue desde 47.06 % (colectas 280) hasta 84.23 % (colecta 284) ambas colectas clasificadas como “amarillas” (figura 6.6B). Para los 40 DDF el contenido de compuestos fenólicos en promedio de todas las colectas evaluadas se redujo casi a la mitad de lo que tuvieron a los 30 DDF, tanto en testa como en cotiledón, y la suma del contenido de los dos tejidos varió desde 22.15 % (colecta 280) hasta 40.88 % (colecta 269), con excepción de la colecta 284 que mantuvo porcentajes altos tanto en testa (42.89%) como en cotiledón (32.84%) (figura 6.7A). A los 90 DDF fue notable que la colecta 284, siendo una colecta amarilla, mantuvo un nivel de compuestos fenólicos alto tanto en testa como en vaina al igual que la colecta 216, que fueron las colectas que tuvieron el porcentaje más alto en la suma de los dos tejidos 18.94 % y 19.37 % respectivamente (figura 6.7B). Aunque también en esta fecha varias colectas (86, 117, 193, 269, 280, 281 y MP) tuvieron porcentajes menores al 10 % en la suma de los dos tejidos.

6.4.2 Compuestos fenólicos en vaina

De acuerdo al análisis estadístico se encontraron diferencias estadísticas significativas en el contenido de compuestos fenólicos entre tejidos y entre días después de la floración (cuadro 6.3). Entre colectas en promedio la vaina siempre tuvo valores significativamente menores que la testa (cuadro 6.4). En promedio de todas las colectas evaluadas, en vaina el contenido de compuestos fenólicos a los 25 DDF fue de 48.61 %, que fue más del doble que lo acumulado a los 30 DDF (20.33%) (cuadro 6.4). A los 25 DDF algunas colectas alcanzaron más del 60 % de compuestos

fenólicos como la colecta 117 (61.98%) y la colecta 249 (63.38%) (figura 6.8). A los 30 DDF el nivel de variación fue bastante amplio, así algunas colectas tuvieron un porcentaje bajo, 6.36 % (colecta 117) y en otras retuvieron hasta 40 % (colecta 86). A los 40 DDF en promedio de todas las colectas se detectó una disminución de casi 50 % respecto a los 30 DDF y la variación entre colectas fue más estrecha (5.10% - 17.8%) (figura 6.8).

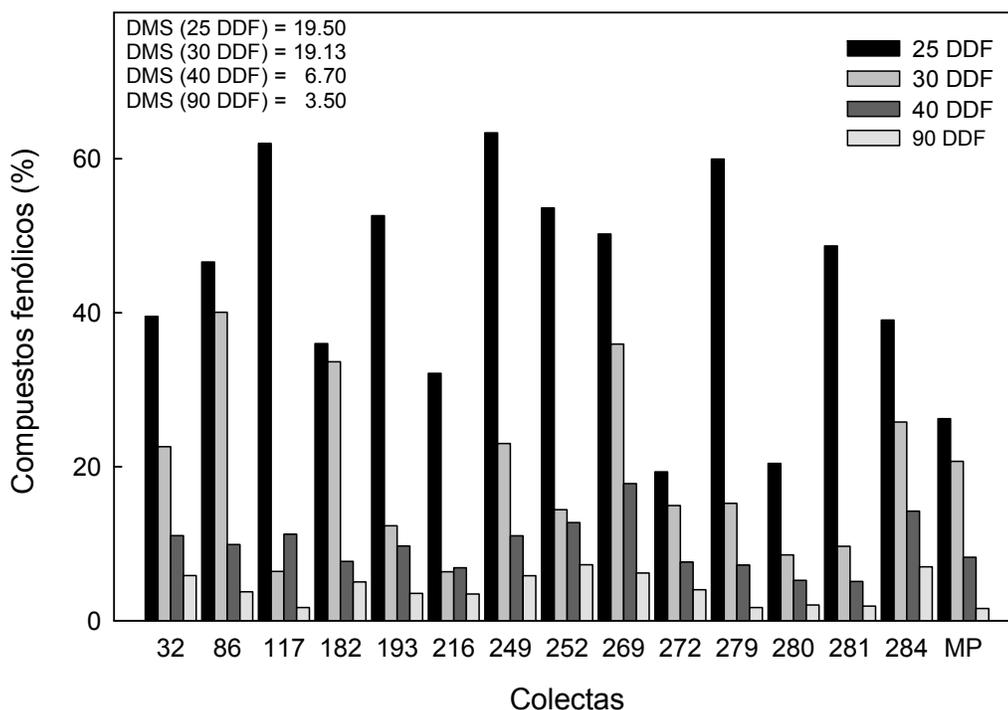


Figura 6.8 Contenido de compuestos fenólicos en vaina de diferentes colectas de haba a los 25, 30, 40 y 90 días después de la floración (DDF). n= 3

A los 90 DDF, el promedio de todas las colectas evaluadas fue de 4.02 % (cuadro 6.4), y el rango de variación fue de 1.59 % (colecta MP) a 7.26 % (colecta 252). Las colectas que acumularon más del 100 % de compuestos fenólicos durante todo el proceso de maduración, calculada como la suma acumulada desde los 25 hasta los

90 DDF fueron las colectas 86 (100.31 %), 249 (103.24%), y la 269 (110.14%) (figura 6.8), las tres colectas corresponden a “amarillas” (cuadro 5.1A, ver apéndice)

6.4.3 Compuestos fenólicos en testa

Como se observa en el cuadro 6.4 desde los 25 DDF en promedio de las diferentes colectas evaluadas el contenido de compuestos fenólicos en la testa fue significativamente superior y diferente al contenido de la vaina, y tendió a disminuir a partir de esta fecha. A los 25 días después de la floración, la colecta 279 (82.22 %) tuvo la mayor concentración de “compuestos fenólicos, pero sin diferencias estadísticas con la mayoría de las colectas, con excepción de la colecta 32 que tuvo significativamente un menor porcentaje (43.15%) de compuestos fenólicos respecto a la colecta 279 (figura 6.9).

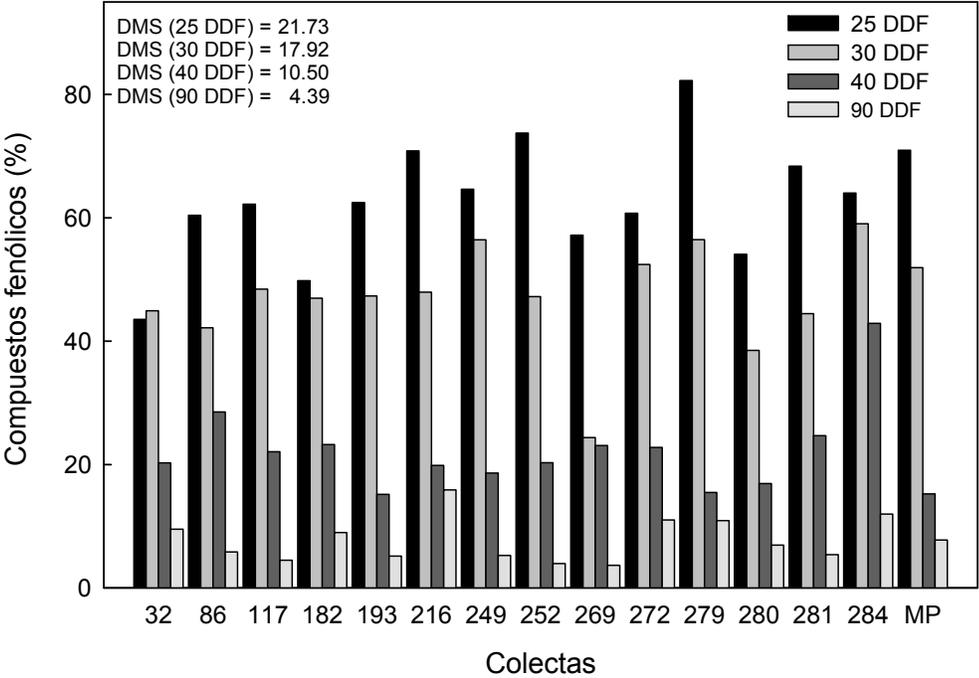


Figura 6.9 Contenido de compuestos fenólicos en testa a los 25, 30, 40 y 90 días después de la floración (DDF). n= 3

A los 30 DDF el promedio de todas las colectas evaluadas fue de 49.28 %, y la mayoría de las colectas se mantuvo cercana a ese porcentaje, aunque la colecta 269 (24.35%) tuvo contenidos significativamente menores (figura 6.9). Conforme maduró la semilla a los 40 DDF, se detectó en promedio de todas las colectas una reducción de aproximadamente 65 %, respecto al contenido de compuestos fenólicos a los 25 DDF en este tejido (cuadro 6.4), con excepción de la colecta 284 que a los 40 DDF tuvo una acumulación de compuestos fenólicos (42.9%) estadísticamente superior a todas las demás colectas, donde la variación fue de 15.25 % a 28.54 % (figura 6.9). En la semilla madura a los 90 DDF, en promedio de todas las colectas evaluadas, la testa acumuló 7.78 % de compuestos fenólicos (cuadro 6.4), y el rango de variación entre colectas fue desde 3.65 % (colecta 269) hasta 11.95 % (colecta 284), siendo esta última colecta la que en promedio acumuló el mayor porcentaje de compuestos fenólicos (177.9%) desde los 25 hasta los 90 DDF (figura 6.9).

6.5 CONTENIDO DE L-DOPA

6.5.1 L-Dopa en botones y flores de *Vicia faba* L.

El interés por conocer el contenido de L-dopa en botones y flores de *Vicia faba*, se apoyó en los estudios realizados por Cenarruzabeitia *et al.* (1977), quienes mencionan que las flores abiertas de esta especie contienen cantidades bastante más abundantes que las detectadas en las semillas y vainas. Por lo que en este trabajo se determinó el contenido de este aminoácido en botones chicos (BCH), botones grandes (BGD) y flores abiertas de cuatro colectas, para conocer en que niveles se encuentra la L-dopa en estas estructuras. Se mostró que las cantidades del

aminoácido variaron dependiendo de la colecta, aunque en promedio de las cuatro colectas se registro que el botón chico tuvo los contenidos más altos ($62 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ PF}$), seguido del botón grande ($58 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ PF}$) y la flor ($54 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ PF}$) (figura 6.10). Dentro de las colectas, la 160 mantuvo los contenidos de L-dopa muy similares desde botón chico hasta flor abierta, mientras que las colectas 181 y 182 tuvieron mayores contenidos en BCH que en flor (figura 6.10). La colecta 161, que presenta flores moradas, tuvo su máxima a acumulación en botón grande, y después disminuyó en la flor abierta (figura 6.10).

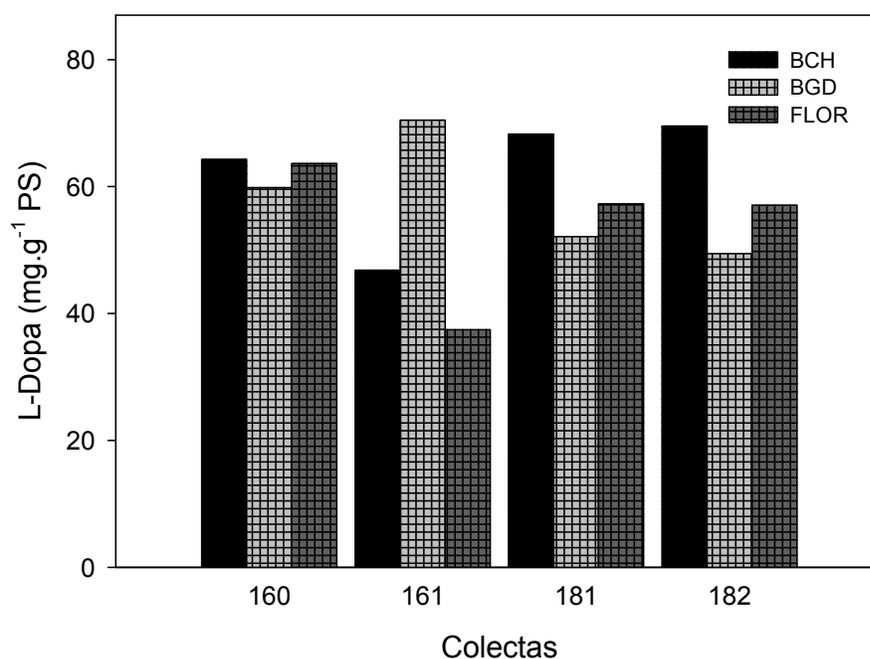


Figura 6.10 Contenido de L-dopa en botón chico (BCH), botón grande (BGD) y flor de cuatro colectas de *Vicia faba* L.

6.5.2 L-Dopa en vaina a los 25, 30, 40 y 90 días después de la floración.

Algunos reportes documentan que L-dopa, se encuentra presente en forma libre en todos los órganos de *Vicia faba* minor, como glucósido especialmente en la testa mientras que su precursor L-tirosina se encuentra en toda la planta, también primordialmente como glucósido (Longo *et al.*, 1974). Como parte de los resultados de este trabajo se evidenció que después de las estructuras florales la vaina fue el tejido en donde se acumulo la mayor cantidad de L-dopa desde los 25 DDF hasta los 90 DDF (Cuadro 6.4), lo cual coincide con lo reportado por Cenarruzabeitia *et al.* (1977), que menciona que en *Vicia faba* las vainas y las flores son las estructuras en donde se concentra la mayor cantidad de este aminoácido. En este trabajo se mostro además que el contenido de L-dopa varía dependiendo de la colecta en los diferentes días después de la floración, por ejemplo a 25 DDF, tres colectas (32, 171 y 182) tuvieron un contenido significativamente mayor ($9.37-9.56 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ PS}$), que el resto de las colectas que se evaluaron cuyo contenido vario desde 4.88 a $6.85 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ PS}$ (figura 6.11A). A los 30 DDF el contenido de L-dopa en la vaina tendió a disminuir, y en esta fecha solo una colecta (86) tuvo valores significativamente mayores ($8.66 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ PS}$) al resto de las colectas (figura 6.11B). Conforme avanzó el desarrollo de la vaina a los 40 DDF, el contenido de L-dopa tuvo un rango de variación amplio desde 3.24 hasta $10.27 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ PS}$, donde la colecta 238 fue la que tuvo el contenido más alto y supero significativamente a las demás colectas evaluadas (figura 6.11C). En la vaina completamente madura y seca, a los 90 DDF, nuevamente algunas colectas llegaron a acumular un nivel de L-dopa hasta de $16.69 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ PS}$, como la colecta 272, aunque, en esta fecha otras colectas mostraron un contenido de L-dopa bajo como la colecta 86 ($7.29 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ PS}$) y la colecta 182 ($5.54 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ PS}$) (figura 6.11 D).

En relación a estos resultados Burbano *et al.* (1995) mencionan que las vainas de *Vicia faba* L, son particularmente ricas en L-dopa, y que no presentan una distribución homogénea en las semillas.

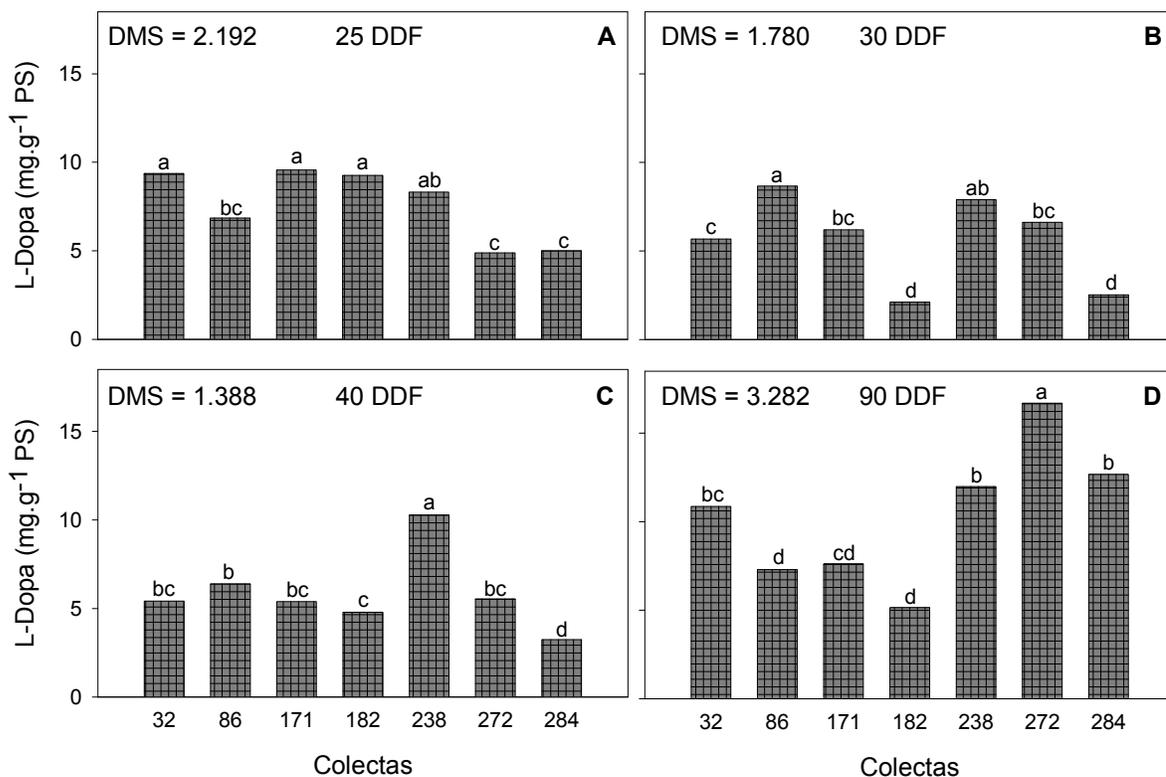


Figura 6.11 Contenido de L-dopa en vainas de siete colectas de *Vicia faba* L. a 25 (A), 30 (B), 40 (C) y 90 (D) días después de la floración (DDF). n =3

6.5.3 Contenido de L-dopa en vaina, testa y cotiledón de tres colectas de haba a 30 DDF.

En este apartado se describe el contenido de L-dopa de tres colectas de haba a los 30 DDF, etapa en la que habitualmente se consume el haba fresca y en donde en promedio de todas las colectas evaluadas, aunque con diferencias significativas tuvieron cantidades y proporciones muy similares en vaina (4.80 mg.g⁻¹ PS, 38%),

testa ($4.22 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS, 34%) y cotiledón ($3.48 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS, 28%) (cuadro 6.4). Las variaciones fueron más notorias y particulares por colecta, por ejemplo, la colecta 32, que fue la que acumulo mayor cantidad de L-dopa en la suma de los tres tejidos ($16 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS), tuvo proporciones similares en los tres tejidos vaina (35%), testa (36%) y cotiledón (29%) y próximos al promedio de las colectas (cuadro 6.3). Mientras que en las colectas 171 y 272 el patrón de distribución fue diferente, en la colecta 171, la vaina acumulo 43 %, la testa 40 % y el cotiledón 17 %, en la colecta 272 la mayor proporción de L-dopa se concentró en la vaina (50%) seguido de la testa (30%) y el cotiledón (20%) (figura 6.12). Lo cual sugiere que la acumulación de este aminoácido en la vaina y semilla de *Vicia faba* no sigue un patrón único, sino que varia ampliamente con el genotipo, como se pudo evidenciar en este trabajo.

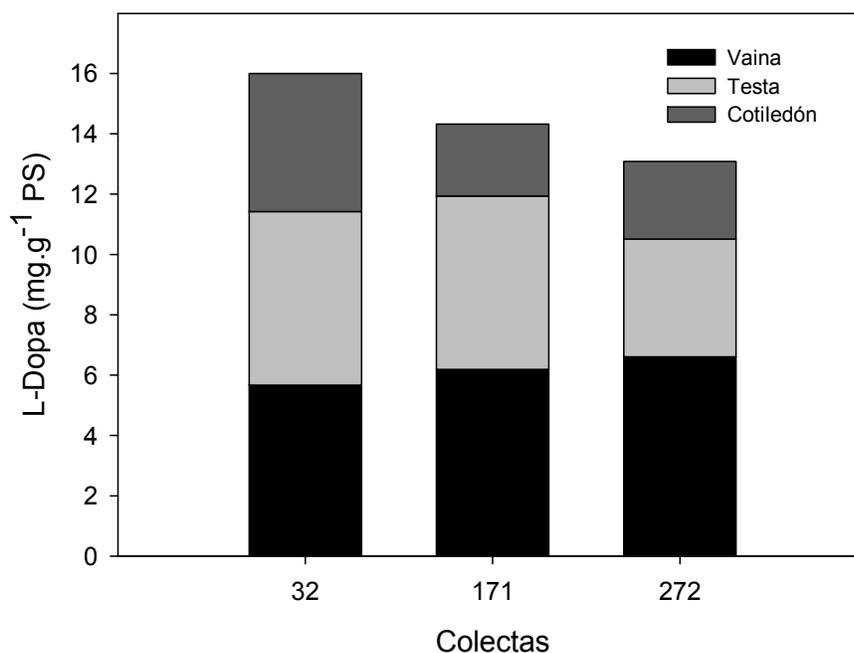


Figura 6.12 Contenido de L-dopa en vaina, testa y cotiledón de tres colectas de haba a 30 días después de la floración. $n = 3$.

6.5.4 Contenido de L-dopa en vaina, testa y cotiledón de cinco colectas de haba a 90 DDF.

A los 90 DDF, es la etapa en la que se consume el haba en grano seco, por lo cual se eligió esta fecha para describir la variación del contenido de L-dopa en las vainas y semillas maduras de diferentes colectas.

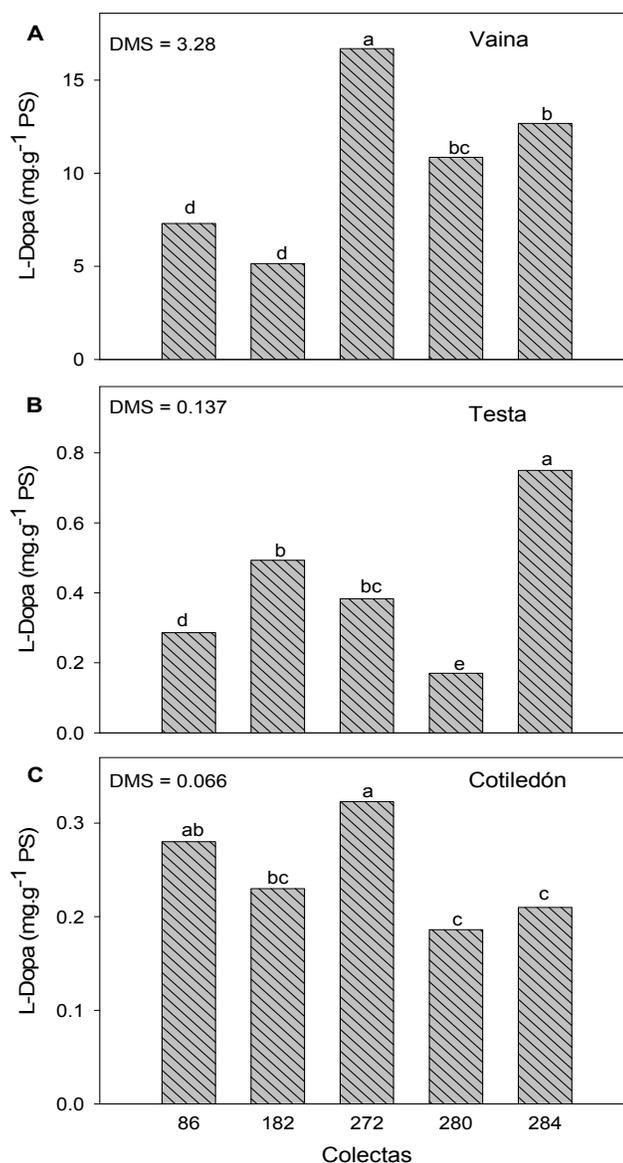


Figura 6.13 Contenido de L-dopa en vaina (A), testa (B) y cotiledón (C) de cinco colectas de haba a 90 días después de la floración. n = 3.

A esta edad, en promedio de 22 colectas evaluadas en los diferentes tejidos (vainas, testa y cotiledón), el contenido de L-dopa tuvo un valor de $3.18 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$ y fue la etapa en la que se registró los valores significativamente más bajos (cuadro 6.3). A este respecto Hill-Conttingham y Purves (1983) señalan que en *Vicia faba* L. hay una acumulación creciente de L-dopa en los frutos y hojas durante las primeras etapas del llenado de vaina, pero la cantidad disminuye conforme avanza la edad de la planta y el contenido de la L-dopa en las semillas maduras llega a ser muy baja. En este trabajo la evaluación de L-dopa entre tejidos a 90 DDF y entre colectas mostró una variación muy marcada dependiendo de la colecta, por ejemplo en esta fecha la colecta 272, tuvo el contenido más alto de este aminoácido y fue significativamente diferente al resto de las colectas tanto en la vaina como en el cotiledón (figuras 6.13A y 6.13C), mientras que en el contenido de L-dopa en la testa, la colecta 284, fue significativamente mayor al resto de las cinco colectas evaluadas (figura 6.13B)

6.6 CONTENIDO DE L-TIROSINA

6.6.1 Contenido de L-tirosina en vaina, testa y cotiledón de cinco colectas de haba a 30 DDF.

La mayor acumulación del contenido de L-tirosina se dio a los 30 DDF en promedio de todas las colectas y tejidos (cuadro 6.3), y fue en el cotiledón (55%), donde se concentró la mayor proporción, seguida de la testa (28%) y de la vaina (17%) (cuadro 6.4). Sin embargo, las variaciones por colecta fueron muy evidentes, como fue en el caso de la colecta 284, la cual a esta fecha la mayor proporción de L-tirosina se concentró en vaina (46%), seguido del cotiledón (31%) y la testa (23%), mientras que

en las colectas 171 y 249 la menor proporción se tuvo en la vaina (10 y 8 %, respectivamente), seguido de la testa y cotiledón (figura 6.14).

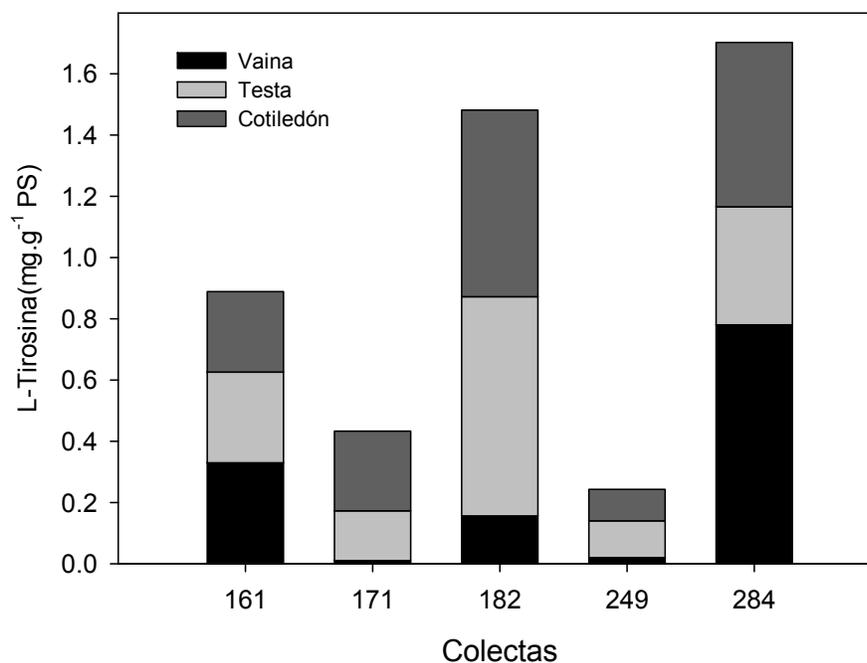


Figura 6.14 Contenido de L-tirosina acumulada en vaina, testa y cotiledón de cinco colectas de haba a 30 días después de la floración. n = 3.

6.6.2 Contenido de L-tirosina en vaina, testa y cotiledón de cinco colectas de haba a 90 DDF.

En la etapa donde la vaina y semillas ya se encuentran maduras y secas, 90 DDF, L-tirosina mostró un nivel comparable al de 30 DDF que fue donde se detectó el contenido más alto (cuadro 6.3), y a esta fecha el cotiledón (43%) y la testa (38%) concentraron la mayor proporción de L-tirosina, y una proporción menor se tuvo en la vaina (19%) (cuadro 6.4). En vaina, a pesar de que tuvieron diferencias numéricas

entre colectas, el contenido de L-tirosina de cinco colectas no tuvo diferencia significativa (figura 6.15A).

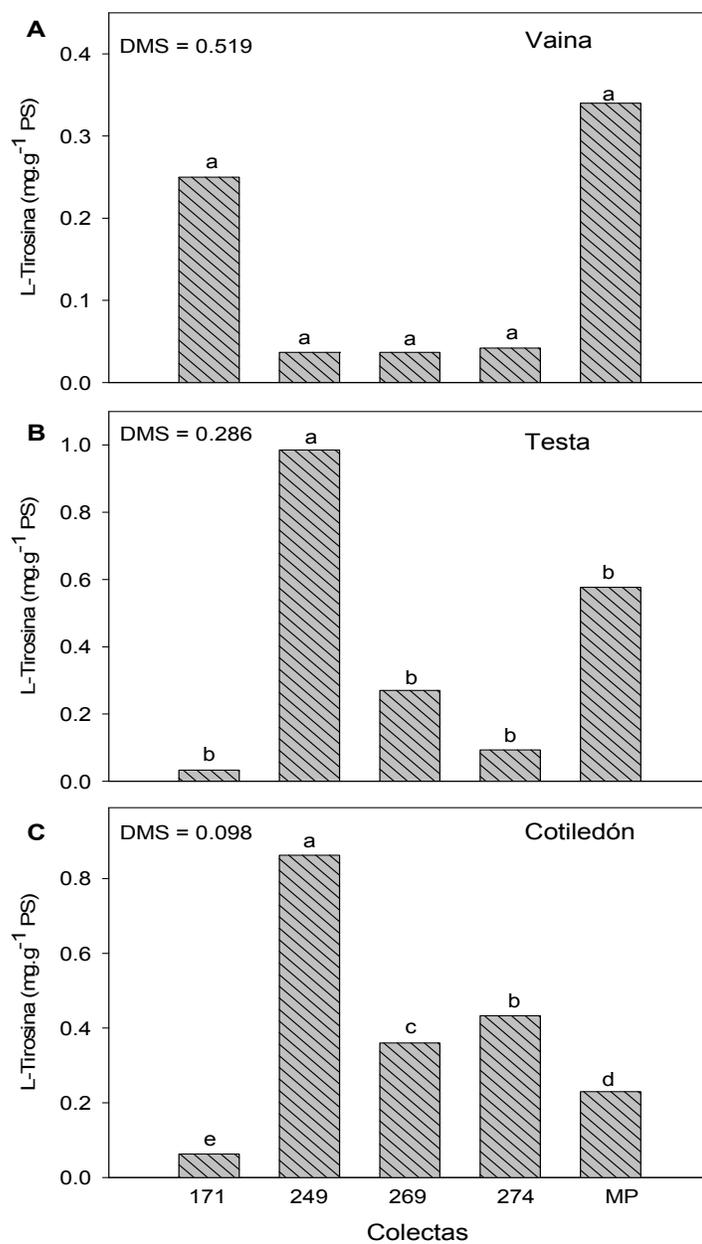


Figura 6.15 Contenido de L-tirosina en vaina (A), testa (B) y cotiledón (C) de cinco colectas de haba a 90 días después de la floración. n = 3.

Mientras que en testa y cotiledón si se detectaron diferencias significativas, particularmente se distingue la colecta 249 que fue significativamente superior en la acumulación de L-tirosina, tanto en testa (figura 6.15B) como en cotiledón (figura 6.15C).

VII. CONCLUSIONES

Las colectas de haba utilizadas en la Mesa Central de México presentan una amplia variación en el contenido de proteína soluble total, compuestos fenólicos, L-dopa y L-tirosina, tanto en la vaina (pericarpio), como en la testa y el cotiledón, Estas características son un indicador de la gran diversidad genética que tienen los agricultores entre las poblaciones de colectas que poseen.

Se evidenció la distribución del contenido de proteína soluble, compuestos fenólicos, L-dopa y L-tirosina a través del desarrollo de la vaina y semillas de haba, con cambios diferenciales dependiendo de la colecta y estado de desarrollo de los tejidos. Lo que permite elegir colectas con propiedades químicas deseables para un uso en particular, dependiendo si se quiere para consumo en fresco (haba verde) o para grano seco.

Se detectaron colectas que destacaron por su contenido de proteína soluble tanto en verde a los 25 DDF, como la 161, 238, 269 y 279, en promedio de los tres tejidos (vainas, testa y cotiledón), como en grano seco como la colecta 32, 161, 249 y 284.

Se mostraron colectas con contenido apreciable de proteína soluble tanto en testa como en cotiledón desde los 25 y 30 DDF. Lo cual sugiere que se puede elegir el tiempo óptimo de corte y las colectas adecuadas para ejote en cuanto al contenido de proteína soluble.

A los 25 DDF, se evidenció la acumulación de compuestos fenólicos con un valor de hasta más de 60% (colectas 117 y 249) en la vaina, y a los 90 DDF de 40% (colecta 86).

En testa la colecta 279 tuvo el nivel más alto (82%) de compuestos fenólicos a los 25 DDF. A los 90 DDF algunas colectas tuvieron hasta 12% como la 284.

El contenido más alto de L-dopa se tuvo particularmente en estructuras florales, y fueron los botones chicos los que registraron los valores mayores de hasta $69 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PF como en la colectas 181 y 182.

En el haba verde (30 DDF), en promedio de las colectas evaluadas se tuvieron proporciones muy similares de L-dopa en vaina (38%), testa (34%) y cotiledón (28%).

El contenido de L-dopa tendió a disminuir con el desarrollo de las semillas, pero en la vaina, que fue la segunda estructura donde se acumulo principalmente este aminoácido, también se detecto un contenido alto, algunas colectas como la 272, particularmente en haba seca (90 DDF), tuvieron valores de hasta $16 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PF.

En testa y cotiledón los contenidos de L-dopa fueron significativamente menores a los de la vaina a los 90 DDF.

En promedio de todas las colectas y tejidos la acumulación mayor de L-tirosina fue a los 30 DDF. El cotiledón fue el tejido donde principalmente se acumuló la mayor cantidad de este aminoácido. Aunque dentro de las colectas hubo amplias variaciones en la distribución de L-tirosina.

En haba verde (30 DDF), la colecta 284 acumulo la mayor proporción de L-tirosina en vaina (46%), pero colectas como la 171 y 249 tuvieron proporciones menores de este aminoácido (10 y 8 %, respectivamente), y la mayor acumulación la tuvieron en testa y cotiledón.

En haba seca (90 DDF), L-tirosina se acumuló principalmente en cotiledón y testa, destacó la colecta 249 que tuvo un nivel significativamente más alto respecto a las demás colectas evaluadas tanto en testa como en cotiledón.

VIII. LITERATURA CITADA

- Andrews RS, Pridham JB (1965) Structure of a dopa glucoside from *Vicia faba*. Nature 205: 1213-1214
- Atkins CA, Pate JS, Sharkey PJ (1975) Asparagine metabolism: key to the nitrogen nutrition of developing legume seeds. Plant Physiology 56: 807–8
- Augustin J, Klein BP (1989) Nutrient composition of raw, cooked, canned, and sprouted legumes En: Legumes: chemistry, technology, and human nutrition. Matthews R.H. (Ed.), 187-217.
- Bahena-Trujillo R, Flores G, Arias-Montaña JA (2000) Dopamina, síntesis, liberación y receptores en el sistema nervioso central. Revista de biomedicina. 11(1):39-60
- Bekkara F, Jay M, Viricel MR, Rome S (1998) Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudations. Plant and Soil. 203: 27–36
- Bond DA (1976) *In vitro* digestibility of the testa in tannin-free field beans (*Vicia faba* L.). The Journal of Agricultural Science 86(3):561.566
- Bond DA, Lawes DA, Hawtin GC, Saxena MC, Stephens JS (1985) Faba Bean (*Vicia faba* L.). p. 199-265. En: R.J. Summerfield and E.H. Roberts (eds.), Grain Legume Crops. William
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254

- Burbano C, Cuadrado C, Muzquiz M, Cubero JI (1995) Variation of favism-inducing factors (vicine, convicine and L-dopa) during pod development in *Vicia faba* L. *Plant Foods for Human Nutrition* 47: 265-274
- Cenarruzabeitia M, Soria A, Larralde J. 1977. Contenido de L-dopa y su precursor L-tirosina en *Vicia faba* cultivada en el norte de Navarra. *Anales de Edafología y Agrobiología*, 677-681.
- Chavan JK, Kute LS, Kadam SS (1989) Broad bean. En: *Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology, and Utilization*. Vol. I. Salunkhe D.K., Kadam S. S., (Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU, 223-245.
- Cheeke, P. R., Shull, L. R. 1985. *Natural toxicants in feeds and poisonous plants*. AVI Publishing Company, Inc., Westport, Conn., USA. 492 pp. Collins Sons Co. Ltd. 8 Grafton Street, London, W1X 3LA, UK
- Cronquist A (1981) *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press, N Y, EEUU, p 1262
- Cuadrado C, Ayet G, Burbano C, Muzquiz M, Camacho L, Cavieres E, Lovon M, Osagie A, Price K (1995) Occurrence of saponins and sapogenols in Andean crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 67: 169–172
- Cubero JI (1974) On the evolution of *Vicia faba* L. *Theor Appl. Genet.*, 45:47-51
- Dalling MJ (1986) *Plant proteolytic enzymes*. Vol II. CRC. Press Inc. Boca Raton, Florida
- Duc G (1997). Faba bean (*Vicia faba* L.). *Field Crops Research* 53: 99-109

- Duenas M, Hernandez T, Estrella I (2006) Assessment of in vitro antioxidant capacity of the seed coat and the cotyledon of legumes in relation to their phenolic contents. *Food Chemistry* 98 (1) 95–103
- Duke JA (1981) *Handbook of legumes of world economic importance*. Plenum Press, New York. p. 199-265
- Everard B (1982) *Guía de campo de las flores de Europa*. Ediciones Omega, S.A., Casanova, 220- Barcelona, España, 545-547.
- Gallardo K, Thompson R, Burstin RJ (2008) Reserve accumulation in legume seeds. *Comptes Rendus Biologies*. 331(10): 755-762
- Griffith T, Conn EE (1973) Biosynthesis of 3,4-dihydroxyphenylalanine in *Vicia faba*. *Phytochemistry* 12(7): 1651-1656
- Hanelt P (1972) Die infraspezifische Variabilität von *Vicia faba* und ihre Gliederung. *Kulturpflanze*, 20: 276-284
- Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, Pekkarinen M, Simic BS, Toshima H, Feskens EJM, Hollman PCH, Kattan MB (1995) Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of Internal Medicine* 155: 381-386.
- Hill-Cottingham DG, Purves JV (1983) Changes during development in the free amino acid constituents of fababean (*Vicia faba* L.) plants. *Plant and Soil* 75(3): 435-442
- Hornykiewicz O (2002) L-dopa: from a biologically inactive amino acid to a successful therapeutic agent. *Amino acids* 23: 65-70

- Ikram-ul-Haq, Sikander Ali (2006) Mutation of *Aspergillus oryzae* for improved production of 3, 4-dihydroxy phenyl-L-alanine (L-dopa) from L-tyrosine
Brazilian Journal of Microbiology 37: 78-86
- Jamalian J, Bassiri A (1978) Variation in vicine concentration during pod development in broad bean (*Vicia faba* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 26(6): 1454–1456
- Kadam SS, Deshpande SS, Jambhale ND (1989) Seed structure and composition. En: Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology, and Utilitation. Vol. I. Salunkhe, D.K., Kadam, S.S. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU, 23-5
- Kay D (1979) Crop and Product Digest No. 3-Food legumes. London: Tropical Products Institute. UK. p.26-47
- Kempster PA, Bogetic Z, Secombei JW, Martin HD, Balazs NDH, Wahlqvist ML (1993) Motor effects of broad beans (*Vicia faba*) in Parkinson's disease: single dose studies. Asian Pacific Journal of Clinical Nutrition 2: 85-89
- Kipps AE, Boulter D (1973) Origins of the amino acids in pods and seeds of *Vicia faba* L. New Phytology. 73: 673-684
- Knott CM 1987 A key for stages of development of the pea (*Pisum sativum*). Annals of Applied Biology 111: 233–245
- Knott CM (1990) A key for stages of development of the faba bean (*Vicia faba*). Annals of Applied Biology. 116(2): 391 – 404
- Liener IE (1982) Toxic constituents in legumes. In Arora SK (ed), Chemistry and biochemistry of legumes. Oxford and IBH, New Delhi, p. 2t7.

- Lin JY, Ling KH (1962) Studies on favism, 2: Studies on the physiological activities of vicine *in vivo*. Journal of the Formosan Medical Association 64: 490-494
- Longo R, Castellani A, Sberze P, Tibolla M (1974) Distribution of L-dopa and related amino acids in Vicia. Phytochemistry. 13(1): 167-171
- Mager J, Gtaber G, Razin A, Izak G, Bein S, Noam M (1965) Metabolic effects of pyrimidines derived from faba bean glycosides on human erythrocytes deficient in glucose-6-phosphate dehydrogenase. Biochemical and Biophysical Research Communication 20: 235-240
- Mandal S, Mandal RK (2000) Seed storage proteins and approaches for improvement of their nutritional quality by genetic engineering. Current Science 79:576-587
- McPhee KE, Muehlbauer FJ (2002) Improving the nutritional value of cool season food legumes. In: Quality improving in field crops (ed) Food Product Press. The Harworth Press. p 101-211
- Muntz K (1998) Deposition of storage proteins. Plant Molecular Biology 38:77-99
- Muratova V (1931) Common bean, *Vicia faba*. Bulletin of Applied Botany Genetics and Plant Breeding. Supplement 50: 285
- Muzquiz M, Burbano C, Ayet G, Pedrosa MM, Cuadrado C (1999) Biotechnology, Agronomy, Society and Environment 4: 210–216
- Muzquiz M, Hill GD, Cuadrado C, Pedrosa MM, Burbano C. 2004. Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Oilseeds. EAAP publication, Wageningen, The Netherlands.

- Offler CE, Nerlich SM, Patrick JW (1989) Pathway of photosynthate transfer in the developing seed of *Vicia faba* L. Transfer in relation to seed anatomy. *Journal of Experimental Botany* 40: 769–780.
- Olvera J, Sánchez RJ, Ochoa R, Rodríguez F, Roque J, Ortega C, Palacios H, Carrillo LA (2001) El haba y su carácter multifuncional en la agricultura. *Claridades Agropecuarias* 93: 7-14.
- Paganga G, Miller N, Rice-Evans CA (1999) The polyphenolic contents of fruits and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute? *Free Radical Research* 30: 153-162
- Rabey JM, Vered Y, Shabtai H, Graff E, Harsat A, Korczyn AD (1993) Broad bean (*Vicia faba*) consumption and Parkinson's disease. *Advances in Neurology* 60: 681-684
- Randhir R, Lin Y-T, Shetty K (2004) Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Asian Pacific Journal of Clinical Nutrition* 13(3): 295-307
- Randhir R, Shetty P, Shetty K (2002) L-dopa and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitors. *Journal of Food Science and Technology* 30(6): 413-416
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB (1995) The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* 22: 375-383.

- Robertson LD, Singh KB, Erskine W, Abd El Moneim Ali M (1996) Useful genetic diversity in germplasm collections of food and forage legumes from West Asia and North Africa. *Germplasm Resources and Crop Evolution* 43:447-460. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Schmidt-Hebbel H, Pennacchiotti I, Masson I, Mella MA (1992) Tabla de composición química de alimentos chilenos. Octava edición. Fac. Ciencias Químicas y Farmacéuticas, U. de Chile, Santiago, Chile, 62p.
- Shetty K (1997) Biotechnology to harness the benefits of dietary phenolics; focus on Lamiaceae. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 6:162-171.
- Shetty K (2001) Biosynthesis of rosmarinic acid and applications in medicine. *J Herbs Spices and Medicinal Plants* 8: 161-181.
- Shetty K, Wahlqvist ML (2004) A model for the role of the proline-linked pentosephosphate pathway in phenolic phytochemical biosynthesis and mechanism of action for human health and environmental applications. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 13 (1):1-24
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16:144-158
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology* 299:152-178
- Smartt J (1984) Evolution of legumes. I. Mediterranean pulses. *Experimental Agriculture* 20: 275-296.

- St-Laurent L, Livesey J, Arnason, JT, Bruneau A (2000) Variation in L-DOPA concentration in accessions of *Mucuna pruriens* (L) DC. and in *Mucuna brachycarpa* Rech,-In: Flores, B.M., Eilitta, M., Myhrman, R., Carew, L.B., Carsky, R.J. (ed.): Food and Feed from *Mucuna*: Current Uses and the Way Forward. Pp. 252–375. CIDICCO, CIEPCA and World Hunger Research Centre, Tegucigalpa 2000
- Vered Y, Grosskopf I, Palevitch D, Harsat A, Charach G, Weintraub MS, Graff E (1997) The influence of *Vicia faba* (broad bean) seedlings on urinary sodium excretion. *Planta Medica* 63: 237-240
- Vitalle A, Bollini R (1995) Legume storage proteins. In: Seed Development and Germination. Kigel J, Galli G (Eds) New York; Dekker. pp 73-95
- Wolswinkel P, Ammerlaan A (1985) Characteristics of sugar, amino acid, and phosphate release from the seed coat of developing seeds of *Vicia faba* and *Pisum sativum*. *Journal of Experimental Botany* 36: 359-68
- Wolswinkel P, Ammerlaan A (1986) Turgor-sensitive transport in developing legumes: the role of the stage of development and the use of excised versus attached seed coats. *Plant, Cell and Environment* 9: 133-40
- Wolswinkel P, Ruitter HD (1985) Amino Acid Release from the Seed Coat of Developing Seeds of *Vicia faba* and *Pisum sativum*. *Annals of Botany* 55(2):283-287

IX. APENDICE

Cuadro 5.1A Colectas de haba establecidas en San Cayetano, Municipio de Chalchicomula de Sesma. Cd. Serdán, Puebla. 2006.

Colecta		Colecta	
C-32	Amarilla	C-249	Amarilla
C-86	Amarilla	C-252	Amarilla
C-117	Cochinera	C-268	Amarilla
C-160	Cochinera	C-269	Amarilla
C-161	Cochinera	C-272	Amarilla
C-171	Amarilla	C-274	Amarilla
C-181	Tarragona	C-279	Amarilla
C-182	Amarilla	C-280	Amarilla
C-193	Amarilla	C-281	Amarilla
C-216	Tarragona	C-284	Amarilla
C-238	Tarragona	Master Piece (MP)	

Cuadro 5.2A. Curva estándar de proteína preparada con albumina de suero bovino BSA ($0.25 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$).

Tubo	Stock (μL)	Agua (μL)	R. Bradford (μL)	μg de Proteína
1	0	300	50	0
2	5	295	50	1.25
3	10	290	50	2.50
4	15	285	50	3.75
5	20	280	50	5.00
6	25	275	50	6.25
7	30	270	50	7.50

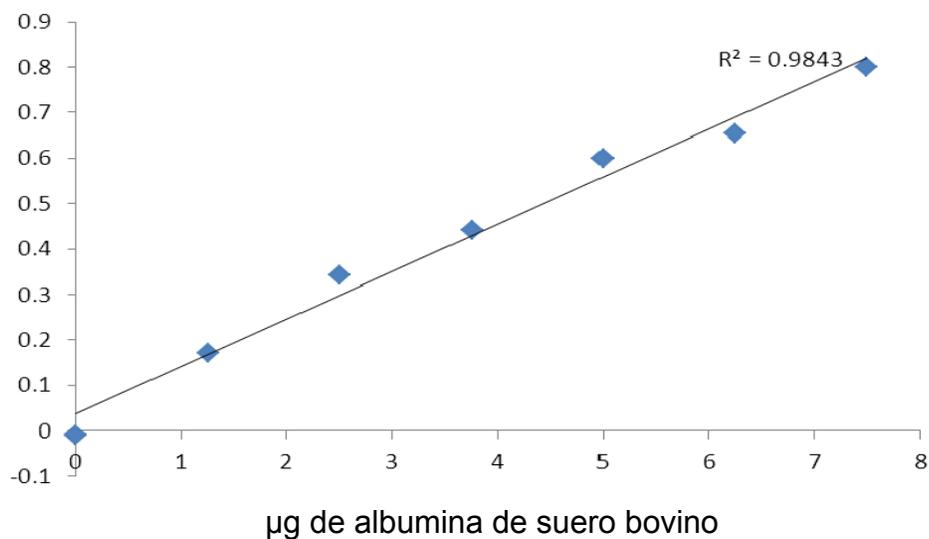


Figura 5.5A. Curva de calibración para proteína con una $R^2 = 0.98$

Cuadro 5.3A. Curva estándar de compuestos fenólicos preparada con ácido gálico a una concentración de $(0.5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1})$

Tubo	Stock (μL)	Agua (μL)	Acido Gálico ($\mu\text{L}/\text{mL}$)
1	0	1000	0
2	100	900	50
3	200	800	100
4	300	700	150
5	400	600	200
6	500	500	250
7	600	400	500

Cuadro 5.4A. Curva estándar de L-dopa. Preparada a partir de un stock de $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 5 mg de L-dopa en 1 mL de fase móvil (15:85 de acetonitrilo:agua), se añadieron 100 μL de ácido ortofosfórico y 300 μL de una solución 5N de NaOH.

Tiempo retención (min)	Nivel	L-dopa (μg)	Área
0.989	1	0.0	0.9
	2	0.38	250.0
	3	0.75	570.0
	4	1.55	1039.0
	5	1.96	1460.0

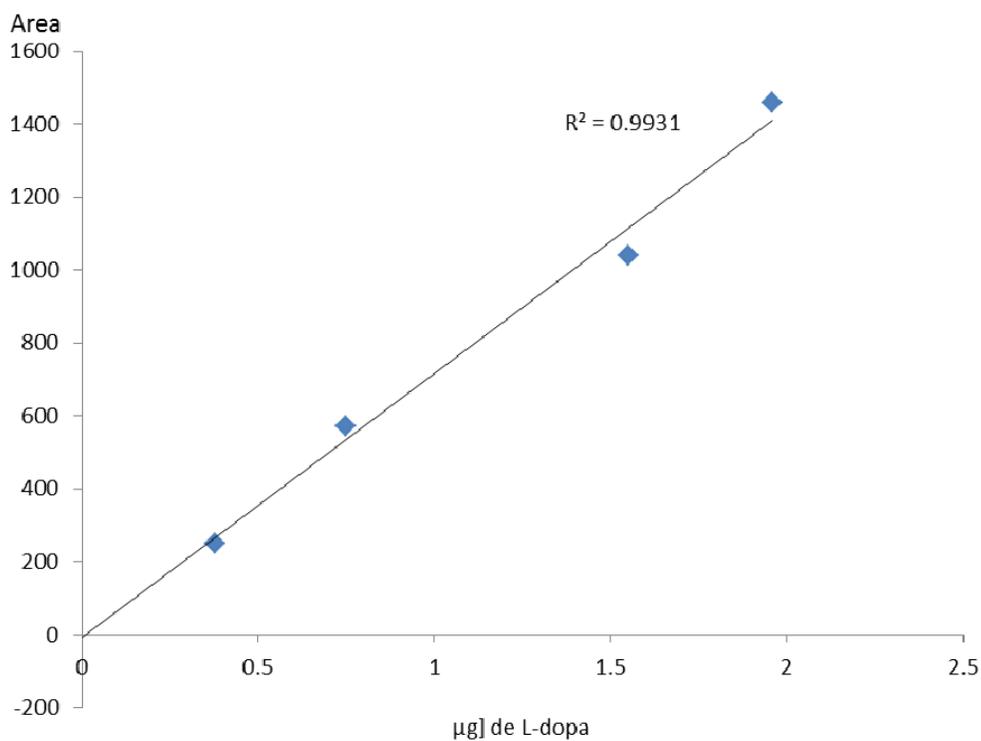


Figura 5.6A. Curva de calibración de L-dopa con una $R^2 = 0.99$

Cuadro 5.5A. Curva estándar de L-tirosina. Preparada a partir de un stock de 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 5 mg de L-tirosina en 1 mL de fase móvil (15:85 de acetonitrilo:agua), se añadieron 100 μL de ácido ortofosfórico y 300 μL de una solución 5N de NaOH.

Tiempo retención (min)	Nivel	L-tirosina (μg)	Área
0.989	1	17.86	895.72302
	2	35.71	1723.34607
	3	53.58	2545.58789
	4	107.16	3806.78296
	5	214.32	1.03E+04

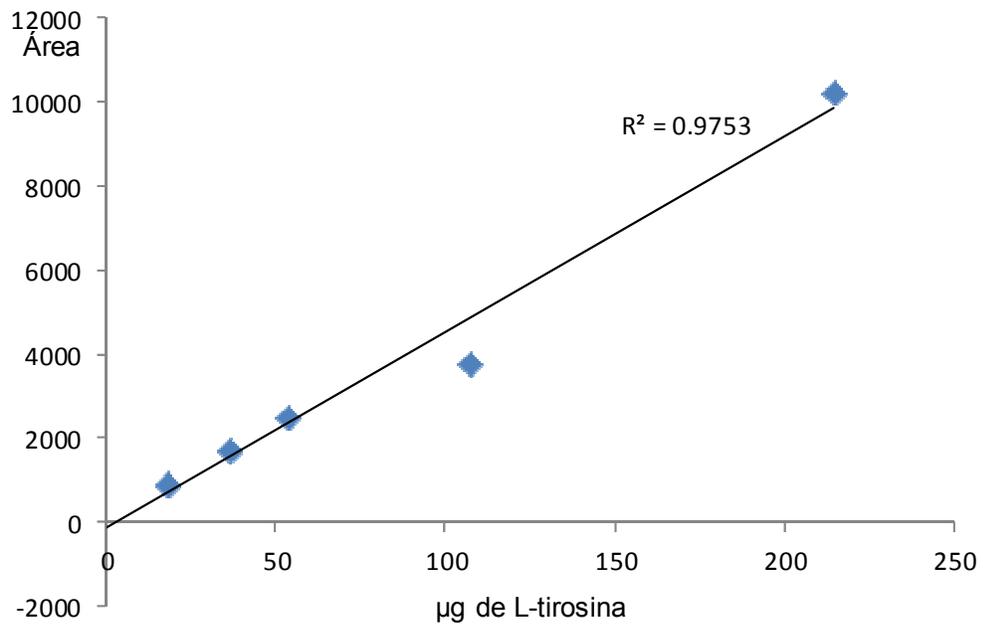


Figura 5.7A. Curva de calibración de L-tirosina con una $R^2 = 0.97$