



**“Estudio del Contenido de Aflatoxinas en Distintas Variedades de Fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.), Considerando las Características de Manejo en la Cadena Agroalimentaria para Determinar Riesgo Alimentario”.**

Jeferson Walter, Castillo Carpio y Carlos Xavier, Zambrano Mejía

Departamento De Ciencias De La Vida Y De La Agricultura

Carrera De Ingeniería Agropecuaria

Trabajo de titulación previo a la Obtención Del Título De Ingeniera Agropecuaria

Phd. Juan Alejandro, Neira Mosquera

Santo Domingo-Ecuador

Agosto del 2020



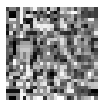
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA SANTO DOMINGO**

### **CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de titulación, **“ESTUDIO DEL CONTENIDO DE AFLATOXINAS EN DISTINTAS VARIEDADES DE FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris* L.), CONSIDERANDO LAS CARACTERÍSTICAS DE MANEJO EN LA CADENA AGROALIMENTARIA PARA DETERMINAR RIESGO ALIMENTARIO”** fue realizado por los señores **CASTILLO CARPIO JEFERSON WALTER, ZAMBRANO MEJIA CARLOS XAVIER** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 24 de Agosto del 2020.

Firma:



firmado electrónicamente por:  
**JUAN ALEJANDRO  
NEIRA MOSQUERA**

**Neira Mosquera Juan Alejandro Ph.D.**

**C.C. 0501644470**



## Urkund Analysis Result

Analysed Document: TESIS AFLATOXINAS CASTILLO-  
ZAMBRANO.docx (D77241641)

Submitted: 2020-07-27 20:54 (-05:00)

Submitted By: janeira1@espe.edu.ec

Significance: 7 %

### Sources included in the report:

[http://www.aecosan.mssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/gestion\\_riesgos/Aflatoxinas\\_ficha\\_JUL15.pdf](http://www.aecosan.mssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/Aflatoxinas_ficha_JUL15.pdf)

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición en relación al efecto sobre la población española de la derogación de la normativa nacional sobre límites máximos permitidos para las aflatoxinas B1, B2, G1, G2.

Bolaños, E. (2011). Evaluación de las características físico químicas en frijol (*Phaseolus vulgaris*) variedad; Pinto Saltillo de dos periodos 2009 y 2010. Buenavista, Saltillo Coahuila, México: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO.

<http://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/1488/1/T-UTEQ-0151.pdf>

<http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/5013/T-ESPE-033049.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

[http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/FUNDAMENTOSYTECNICASDEANALISISDEALIMENTOS\\_12286.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/FUNDAMENTOSYTECNICASDEANALISISDEALIMENTOS_12286.pdf)

Instances where selected sources appear: 15

Firma



firmas electrónicas por:  
JUAN ALEJANDRO  
NEIRA MOSQUERA

Neira Mosquera Juan Alejandro Ph.D.

DIRECTOR



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA SANTO DOMINGO**

**RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA**

Nosotros **CASTILLO CARPIO JEFERSON WALTER, ZAMBRANO MEJIA CARLOS XAVIER**, con cédulas de ciudadanía n° 171972678-6 y 1724853575, declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **"ESTUDIO DEL CONTENIDO DE AFLATOXINAS EN DISTINTAS VARIEDADES DE FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris* L.), CONSIDERANDO LAS CARACTERÍSTICAS DE MANEJO EN LA CADENA AGROALIMENTARIA PARA DETERMINAR RIESGO ALIMENTARIO"** es de nuestra autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 24 de Agosto del 2020.

Firma

**Castillo Carpio Jeferson Walter**

C.C. 171972678-6

**Zambrano Mejia Carlos Xavier**

C.C. 1724853575



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA SANTO DOMINGO**

**AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN**

Nosotros **CASTILLO CARPIO JEFERSON WALTER, ZAMBRANO MEJIA CARLOS XAVIER**, con cédulas de ciudadanía n° 171972678-6 y 1724853575, autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **"ESTUDIO DEL CONTENIDO DE AFLATOXINAS EN DISTINTAS VARIEDADES DE FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris* L.), CONSIDERANDO LAS CARACTERÍSTICAS DE MANEJO EN LA CADENA AGROALIMENTARIA PARA DETERMINAR RIESGO ALIMENTARIO"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 24 de Agosto del 2020.

**Castillo Carpio Jeferson Walter**

C.C. 171972678-6

Firma

**Zambrano Mejia Carlos Xavier**

C.C. 1724853575

## DEDICATORIA

A Dios, por regalarme la vida y guiarme con su luz a lo largo de este proceso de formación.

A mi madre Margarita Carpio, que fue el cimiento principal para terminar este proceso de formación académica y gracias a sus fortalezas, valores y enseñanzas seré un profesional de éxito.

A mi padre Walter Castillo, a pesar de nuestra distancia física, fuiste quien estuvo conmigo en todo momento.

A mis hermanos Darwin y Fernando por ser mis compañeros de vida y apoyo incondicional para cumplir mi objetivo.

A Priscila Parra por su amor sincero y su apoyo incondicional en todo momento dándome consejos constructivos para mi vida.

En general a mis familiares, amigos y docentes por todo el sustento que me brindaron a culminar con esta etapa de mi vida.

Jeferson

A Dios por permitirme culminar una meta más a lo largo de mi vida.

A mis padres Napoleón y Balvina por siempre realizar todo esfuerzo con la finalidad de que mi carrera universitaria culmine con mucho éxito y sumado con sus buenos valores para ser un profesional de calidad.

A mis hermanos María, Jorge, Mariuxi y Karina por siempre acompañarme, apoyarme y compartirme sus conocimientos para poder resolver dificultades en el transcurso de toda la carrera universitaria.

A Katerine Menéndez por ser una persona que admiro mucho por su dedicación, paciencia y apoyo brindado en gran parte de mis estudios.

Finalmente, a todos los docentes que en transcurso de la carrera me aconsejaron y brindaron su amistad y confianza.

Carlos

## AGRADECIMIENTO

A nuestro director de tesis PhD. Juan Neira por su tiempo, paciencia y conocimiento brindados para culminar este proyecto de investigación junto a la PhD. Sungey Sánchez, por su carisma, actitud y enseñanzas brindados en cada etapa de nuestro proyecto de investigación.

A la Ing. Katty Medina por su buena predisposición y paciencia que nos brindó en cada etapa de laboratorio de nuestro trabajo de investigación.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Extensión Santo Domingo por sus enseñanzas y aventuras brindadas para nuestra formación académica,

A la Ing. Lourdes, por sus conocimientos brindados y darnos la oportunidad de realizar análisis de nuestro trabajo investigativo en sus instalaciones de la Universidad Técnica Estatal Quevedo.

A la Economista Mercedes Montero por sus infinitos consejos sobre cuan dura en la vida profesional y las precauciones que se debe tomar para llegar al éxito profesional.

A todas las personas que directa e indirectamente nos apoyaron para poder culminar nuestro trabajo mostramos nuestra gratitud.

Jeferson y Carlos



## ÍNDICE DE CONTENIDO

CARATULA .....	1
CERTIFICACIÓN.....	2
ANALISIS DEL URKUND.....	3
RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA.....	4
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN .....	5
DEDICATORIA .....	6
AGRADECIMIENTO .....	8
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	9
ÍNDICE DE TABLAS.....	12
INDICE DE FIGURAS.....	13
RESUMEN .....	14
SUMMARY .....	15
CAPITULO I .....	16
Introducción.....	16
Objetivos .....	19
Objetivo General.....	19
Objetivos Específicos: .....	19
Hipótesis .....	20
Hipótesis Para el Factor A (Variedades).....	20
Hipótesis Para el Factor B (Presentación de Comercialización).....	20
CAPITULO II .....	21
Revisión de Literatura .....	21
Origen y Generalidades del Fréjol.....	21
Clasificación Taxonómica.....	21
Descripción Botánica.....	22
Características de las Variedades de Fréjol.....	23
Importancia Económica y Nutricional del Fréjol a Nivel Mundial.....	24
Propiedades Alimentarias del Fréjol.....	24
El fréjol y su Importancia en la Seguridad Alimentaria y Nutricional. ....	25
Materia Seca .....	26
Determinación de Humedad.....	26
Determinación de Ceniza.....	26

Determinación de Grasa .....	27
Determinación de Proteína.....	27
Micotoxinas.....	27
Generalidades .....	27
Clasificación.....	27
Aflatoxinas .....	28
Origen.....	28
Biotransformación .....	28
Clasificación.....	29
Efectos Tóxicos.....	30
Características Morfológicas y Bioquímicas.....	31
Método para medir Aflatoxinas .....	32
Kit VERATOX Prueba Cuantitativa para Aflatoxinas.....	32
Fundamentos de la Prueba. ....	32
CAPITULO III .....	33
Materiales y Métodos.....	33
Ubicación del lugar de investigación .....	33
Ubicación Política.....	33
Ubicación Geográfica .....	33
Ubicación Ecológica .....	35
Materiales.....	35
Determinación de Materia Seca .....	35
Determinación de Humedad.....	36
Determinación de Ceniza .....	36
Determinación de Fibra .....	36
Determinación de Proteína.....	37
Extracción de Grasa.....	38
Determinación del Contenido de Aflatoxinas.....	38
Métodos.....	39
Obtención de la materia prima.....	39
Diseño Experimental .....	40
Análisis Estadístico .....	41
Esquema de Análisis de Varianza.....	41

Variables a Medir .....	42
CAPITULO IV .....	50
Resultados.....	50
Análisis de Varianza para las Variables en Estudio. ....	50
Materia Seca .....	50
Humedad.....	51
Ceniza .....	52
Fibra Bruta.....	53
Grasa .....	54
Proteína.....	55
Aflatoxinas totales .....	56
Pruebas de significancia de Tukey $p < 0,05$ para los factores en estudio .....	57
Prueba de significancia de Tukey del Factor A.....	57
Prueba de significancia de Tukey del Factor B.....	60
Prueba de significancia de Tukey de la interacción A*B.....	63
Resultado de Análisis de Conglomerados.....	67
Análisis de componentes principales.....	68
CAPITULO V.....	71
Discusiones.....	71
Con Respecto al Factor A (Variedades).....	71
Con Respecto al Factor B (Presentación de Comercialización).....	72
Con Respecto a la Interacción A*B (Variedades*Presentación).....	73
CAPITULO VI.....	75
Conclusiones y Recomendaciones .....	75
Conclusiones .....	75
Con Respecto al Factor A (Variedades).....	75
Con Respecto al Factor B (Presentación de Comercialización).....	75
Con Respecto a la Interacción A*B (Variedades*Presentación).....	76
Recomendaciones.....	76
CAPITULO VII.....	78
Bibliografía .....	78

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> <i>Características Agronómicas.</i> .....	23
<b>Tabla 2</b> <i>Niveles Reglamentarios para Aflatoxinas Según la FDA.</i> .....	31
<b>Tabla 3</b> <i>Ubicación Política de la Zona donde se Llevó a Cabo el Ensayo.</i> .....	33
<b>Tabla 4</b> <i>Ubicación Geográfica de la Zona donde se Llevó a Cabo el Ensayo</i> .....	33
<b>Tabla 5</b> <i>Ubicación Ecológica de la Zona donde se Llevó a Cabo el Ensayo</i> .....	35
<b>Tabla 6</b> <i>Recursos Necesarios para la Determinación de Materia Seca.</i> .....	35
<b>Tabla 7</b> <i>Recursos Necesarios para la Determinación de Humedad.</i> .....	36
<b>Tabla 8</b> <i>Recursos necesarios para la determinación de ceniza</i> .....	36
<b>Tabla 9</b> <i>Recursos necesarios para la determinación de Fibra.</i> .....	36
<b>Tabla 10</b> <i>Recursos Necesarios para la Determinación de Proteína.</i> .....	37
<b>Tabla 11</b> <i>Recursos Necesarios para la Extracción de Grasa</i> .....	38
<b>Tabla 12</b> <i>Recursos Necesarios para la Determinación del Contenido de Aflatoxinas...</i>	38
<b>Tabla 13</b> <i>Factores y Niveles por Probar en el Estudio Bromatológico de Tres Variedades de Fréjol (Phaseolus vulgaris L.)</i> .....	40
<b>Tabla 14</b> <i>Tratamientos a comparar en el estudio bromatológico de tres variedades de fréjol (Phaseolus vulgaris L.)</i> .....	40
<b>Tabla 15</b> <i>Esquema del Análisis de Varianza para el Estudio Bromatológico de Tres Variedades de Fréjol (Phaseolus vulgaris L.)</i> .....	41
<b>Tabla 16</b> <i>Análisis de varianza para Materia Seca.</i> .....	50
<b>Tabla 17</b> <i>Análisis de Varianza para Humedad.</i> .....	51
<b>Tabla 18</b> <i>Análisis de Varianza para la variable de Ceniza.</i> .....	52
<b>Tabla 19</b> <i>Análisis de Varianza para la Variable Fibra Bruta.</i> .....	53
<b>Tabla 20</b> <i>Análisis de Varianza para la Variable de Grasa.</i> .....	54
<b>Tabla 21</b> <i>Análisis de Varianza para la Variable de Proteína</i> .....	55
<b>Tabla 22</b> <i>Análisis de varianza para la variable de Aflatoxinas totales.</i> .....	56
<b>Tabla 23</b> <i>Prueba de Significancia Tukey del Factor A (Variedades)</i> .....	57
<b>Tabla 24</b> <i>Prueba de Significancia de Tukey del Factor B (Presentación de comercialización).</i> .....	60
<b>Tabla 25</b> <i>Prueba de Significancia de Tukey de la Interacción A*B (Variedades*Presentación).</i> .....	63
<b>Tabla 26</b> <i>Matriz de Correlación de Componentes Principales.</i> .....	68
<b>Tabla 27</b> <i>Matriz de componente.</i> .....	69

**INDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b> <i>Estructura Química de las Aflatoxinas B1, B2, G1 Y G2.....</i>	30
<b>Figura 2</b> <i>Ubicación Geográfica donde se Desarrolló la Investigación. ....</i>	34
<b>Figura 3</b> <i>Cuadro Resumen de las Pruebas de Significancia de Tukey para el Factor A.57</i>	
<b>Figura 4</b> <i>Cuadro Resumen de las Pruebas de Significancia de Tukey para el Factor B.60</i>	
<b>Figura 5</b> <i>Cuadro Resumen de las Pruebas de Significancia de Tukey de la Interacción A*B (Variedades*Presentación). ....</i>	64
<b>Figura 6</b> <i>Dendrograma para los Factores en Estudio. ....</i>	67
<b>Figura 7</b> <i>Gráfico de Sedimentación del Análisis de Componentes Principales. ....</i>	69
<b>Figura 8</b> <i>Gráfico de Componente en Espacio Rotado.....</i>	70

## RESUMEN

El objetivo principal fue, el estudio y determinación de la presencia de aflatoxinas totales en tres variedades de fréjol que son mayor consumidas en el medio, mediante análisis bromatológicos y relacionadas con las propiedades físico químicas de cada variedad, tomando en cuenta los tipos de empaques que se comercializan dichas variedades y así definir si existe riesgo dentro de la cadena agroalimentaria para el consumo humano.

La investigación se realizó dentro del laboratorio de Bromatología de la Universidad de las Fuerzas Armadas -ESPE Sede SD. El experimento fue conducido mediante ANOVA, bifactorial (Variedades: F. Rojo, F. Canario y F. Negro; Presentación de Comercialización: Empaque Plástico, Al granel, Enlatado) bajo un esquema D.B.C.A. dando un total de 9 tratamientos con 3 repeticiones, se aplicó la prueba de Tukey ( $p > 0,05$ ). Se determinó que la variedad de fréjol Rojo\*Al granel y Canario\*E. Plástico obtuvieron los niveles de aflatoxinas más bajos de 0,00 ppb mientras la variedad Negro\*E. Plástico presento el nivel más alto de 4,90 ppb, de igual manera se concluye que todas las muestras analizadas están en niveles aceptados según la FDA para el consumo humano que es de 20 ppb. Por lo tanto, recomendamos consumir el fréjol Rojo en la presentación Enlatadas y empaques plásticos ya que en el estudio demostraron los valores más altos con respecto a proteína y fibra, no obstante tomar mayor control sanitario de parte de las instituciones reguladoras sobre el manejo y almacenamiento de granos de fréjol destinados al consumo humano, ya que no existe límites permitidos sobre cargas fúngicas o estado de comercialización sobre fréjol.

**Palabras clave:** *Aflatoxinas, Fréjol, Variedades, Presentación de comercialización.*

## SUMMARY

The main objective was the study and determination of the presence of total aflatoxins in three bean varieties that are most consumed in the environment, through bromatological analysis and related to the physical-chemical properties of each variety, taking into account the types of packaging that These varieties are marketed and thus define whether there is a risk within the agrifood chain for human consumption.

The research was carried out within the Bromatology laboratory of the University of the Armed Forces -ESPE Sede SD. The experiment was conducted using two-factor ANOVA (Varieties: F. Red, F. Canario and F. Negro; Marketing Presentation: Plastic Packaging, Bulk, Canned) under a D.B.C.A. giving a total of 9 treatments with 3 repetitions, the Tukey test was applied ( $p > 0.05$ ). It was determined that the variety of beans Red \* In bulk and Canary \* E. Plastic obtained the lowest aflatoxin levels of 0.00 ppb while the Black \* E variety. Plastic presented the highest level of 4.90 ppb, likewise it is concluded that all the samples analyzed are at levels accepted by the FDA for human consumption which is 20 ppb. Therefore, we recommend consuming the Red beans in the presentation Canned and plastic packaging since in the study they demonstrated the highest values with respect to protein and fiber, despite taking greater sanitary control from the regulatory institutions on the handling and storage of Bean grains destined for human consumption, since there are no permitted limits on fungal loads or commercialization status on beans.

**Keywords:** *Aflatoxines, Bean, VarietiesMarketing presentation*

## CAPITULO I

### Introducción

Las aflatoxinas son metabolitos tóxicos producidos por varias especies de hongos del género *Aspergillus* que crecen en plantas y alimentos de origen vegetal. Las principales especies productoras de aflatoxinas son *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, aunque también se han descrito otras especies productoras de aflatoxinas en alimentos tales como *A. nonius*, *A. tamarii*, *A. pseudotamarii* o *A. australis*. Estos compuestos fueron descubiertos a finales de los años 50 y principios de los 60 como consecuencia de la investigación acerca de la alta mortandad originada en aves de corral y otros animales productores de alimentos como consecuencia de la ingestión de pienso que contenía cacahuete procedente de Sudamérica. Se trata de compuestos fluorescentes con una estructura cumarínica condensada con un bifurano y una pentanona (aflatoxinas B) o una lactona (aflatoxinas G). Las letras B y G se refieren a la coloración de las aflatoxinas bajo la luz ultravioleta (en inglés, Blue: azul y Green: verde) y los números 1 y 2 se refieren a su posición en un desarrollo cromatográfico (Sáez, 2011).

El cultivo del fréjol común (*Phaseolus vulgaris L.*) tiene gran importancia, ya que es una de las principales fuentes de proteína vegetal de buena calidad y relativamente fácil de obtener en el mercado, constituye la base de la alimentación de grandes cantidades de humanos en el mundo (Pinargote, 2015).

Existen diferentes variedades de fréjol su valor comercial y consumo es influenciado por características como tamaño, color y uniformidad del grano, además del tiempo de cocción, sabor y espesor del caldo. Por otra parte, el valor nutrimental de esta leguminosa está determinado en gran medida por el contenido de proteína y su digestibilidad, este grano es una de las principales fuentes de nutrientes para la población de escasos recursos (Bolaños, 2011).

Las aflatoxinas son sustancias muy tóxicas, sin embargo, no solo los animales se ven afectados, sino los seres humanos, existen evidencias que relacionan la ingestión de alimentos



contaminados con aflatoxinas y el desarrollo de cáncer, por esto es fundamental su estudio para determinar sus causas, efectos, rutas metabólicas y así empezar a normar y estandarizar los límites permisibles para las condiciones ambientales, sociales y geográficas tanto para la producción y el consumo local como la exportación e importación de materias primas (Vallejo, 2012).

Hoy en día, la investigación de las aflatoxinas se la realiza en todo el mundo, sin embargo, el Ecuador no posee ningún registro de los niveles de contaminación presente en los alimentos nacionales o alguna normativa de regulación propia. Por este motivo esta investigación es pionera en determinación de aflatoxinas en leguminosas como fréjol de consumo local, estableciendo una línea base de regulación para la producción y comercialización del mismo. Aportando así al plan de Seguridad Alimentaria e Inocuidad de los alimentos impulsada por el Gobierno Nacional.

El problema más importante presentado en aflatoxinas producidas en el fréjol, son las complicaciones que se reflejan en la salud ya que varios estudios han reportado, que al ingerir estas toxinas se pueden provocar intoxicaciones como también puede llegar a producir enfermedades crónicas como el cáncer de hígado o finalmente la muerte si el consumo se da en un rango mayor al tolerable.

El carcinoma hepatocelular (cáncer de hígado) se encuentra dentro de los tipos de cáncer que más muertes generan al año. Es una neoplasia con una incidencia creciente en todo el mundo, es el tumor primario del hígado más frecuente y constituye el 90% de éstos. Se sabe que el desarrollo del cáncer de hígado puede ser por múltiples etiologías, una de ellas es la exposición crónica a las aflatoxinas (Ornelas & Fimbres, 2015).

Otros de los problemas que se presenta es la variabilidad del contenido nutricional en el fréjol, mismo que dependerá de la variedad y las condiciones de almacenamiento que se le dé al producto a lo largo de la cadena agroalimentaria. Lo que ha ocasionado altas cargas

fúngicas en el producto y pérdidas económicas para el productor, además de las desconfianzas en los consumidores potenciales.

Con el establecimiento de este proyecto de investigación pretendemos, identificar la cantidad de aflatoxinas totales presentes en el fréjol de consumo local en diferentes tipos de almacenamiento y cómo influyen en los componentes nutricionales sus variedades y así contribuir no solo a la comunidad científica, sino, aportar al plan de Seguridad Alimentaria e Inocuidad de los alimentos impulsada por el Gobierno Nacional.

## **Objetivos**

### ***Objetivo General***

Estudio del contenido de aflatoxinas en distintas variedades de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.), considerando las características de manejo en la cadena agroalimentaria para determinar riesgo alimentario.

### ***Objetivos Específicos:***

- Determinar presencia de aflatoxinas y su relación con cada una de las variedades de fréjol.
- Determinar la influencia del manejo en la carga fúngica del fréjol considerando la interacción entre la variedad de fréjol y el tipo de empaque.
- Identificar condiciones de almacenamiento y su influencia en la carga fúngica del fréjol considerando tipo de comercialización en diferentes tipos de empaques.

## **Hipótesis**

### ***Hipótesis Para el Factor A (Variedades)***

- **Ha:** Las variedades de fréjol utilizadas para el consumo humano influyen en la presencia de aflatoxinas y su relación con las características físico-químicas (Humedad, Materia seca, Ceniza, Grasa, fibra, proteína).
- **Ho:** Las variedades de fréjol utilizadas para el consumo humano no influyen en la presencia de aflatoxinas y su relación con las características físico-químicas (Humedad, Materia seca, Ceniza, Grasa, fibra, proteína).

### ***Hipótesis Para el Factor B (Presentación de Comercialización)***

- **Ha:** La presentación de comercialización de fréjol influye en la presencia de aflatoxinas y su relación con las características físico-químicas (Humedad, Materia seca, Ceniza, Grasa, fibra, proteína).
- **Ho:** La presentación de comercialización de fréjol no influye en la presencia de aflatoxinas y su relación con las características físico-químicas (Humedad, Materia seca, Ceniza, Grasa, fibra, proteína).

## CAPITULO II

### Revisión de Literatura

#### Origen y Generalidades del Fréjol

Dentro del grupo de las leguminosas que poseen semillas comestibles, el fréjol común corresponde a una de las más importantes. Actualmente se encuentra distribuido en los cinco continentes y es un componente esencial de la dieta, especialmente en Centroamérica y Sudamérica. México se ha reconocido como el más probable centro de su origen, o al menos, como el centro primario de diversificación. El cultivo del fréjol se considera uno de los más antiguos. Algunos de los hallazgos arqueológicos en México y Sudamérica indican que se conocía hace algunos 5000 años antes de Cristo. Debido al interés del hombre por esta leguminosa, la selección hecha por las culturas precolombinas generó un gran número de diferentes formas y en consecuencia también de diferentes nombres comunes dentro de los que destacan los de fréjol, poroto, alubia, judía, fréjol, nuña, habichuela, vainita y caraota. (Ulloa, 2011).

#### Clasificación Taxonómica

- Nombre científico: *Phaseolus vulgaris* L.
- Nombres comunes: Fréjol, poroto, caraota, judía, alubia, habichuela.
- Reino: Plantae
- División: Magnoliophyta
- Orden: Fabales
- Familia: Fabaceae
- Género: Phaseolus
- Especie: vulgaris

**Nota:** (Henriquez, 2014)

## **Descripción Botánica**

**Raíz:** En las primeras etapas de desarrollo el sistema radicular está formado por la radícula del embrión, la cual se convierte posteriormente en la raíz principal o primaria. Pocos días después se observan las raíces secundarias que se desarrollan en la parte superior o cuello de la raíz principal. Sobre las raíces secundarias se desarrollan las raíces terciarias y otras subdivisiones como los pelos absorbentes, los cuales se encuentran en todos los puntos de crecimiento de la raíz. *Phaseolus vulgaris* presenta nódulos distribuidos en las raíces laterales de la parte superior y media del sistema radical. Estos nódulos tienen forma poliédrica, un diámetro aproximado de 2 a 5 milímetros y son colonizados por la bacteria del género *Rhizobium*, las cuales fijan nitrógeno atmosférico, que contribuye a satisfacer los requerimientos de este elemento en la planta (Henriquez, 2014).

**Tallo:** El tallo es identificado como el eje central de la planta, está formado por una sucesión de nudos y entrenudos, es herbáceo, con sección cilíndrica o levemente angular; puede ser erecto, semipostrado o postrado, según el hábito de crecimiento de la variedad. Dependiendo del hábito de crecimiento, el tallo puede presentar dos tipos de desarrollo en su parte terminal. Uno de estos es que el tallo termine en inflorescencia y por lo tanto cesa su crecimiento longitudinal, y se dice que la planta es de crecimiento determinado (Henriquez, 2014).

**Hojas:** Son de dos tipos: simples y compuestas. Los cotiledones constituyen el primer par de hojas, proveen de sustancias de reserva a la planta durante la germinación y emergencia y elaboran los primeros carbohidratos a través de la fotosíntesis en sus cloroplastos, son de poca duración; el segundo par y primeras hojas verdaderas, se desarrollan en el segundo nudo, son simples, opuestas y cortadas. A partir del tercer nudo se desarrollan las hojas compuestas, las cuales son alternas, de tres folíolos, un peciolo y un raquis.

**Flor:** Las flores de fréjol desarrollan en una inflorescencia de racimo, la cual puede ser terminal como sucede en las variedades de hábito determinado o lateral en las indeterminadas.

La inflorescencia consta de pedúnculo, raquis, brácteas y botones florales. Los botones florales desarrollan en las axilas de las brácteas. Pueden ser blancas, rosada o de color púrpura (Henriquez, 2014).

**Fruto y Semillas:** El fruto es el ovario desarrollado en forma de vaina con dos suturas que unen las dos valvas; Las divergencias laterales están constituidas por los cotiledones y las dos hojas primarias verdaderas. Los cotiledones forman la parte voluminosa de la semilla, son hojas modificadas para el almacén de carbohidratos y proteínas y constituyen la parte aprovechable de la semilla. (Henriquez, 2014).

### **Características de las Variedades de Fréjol.**

**Tabla 1**

*Características Agronómicas.*

	<b>Rojo</b>	<b>Canario</b>	<b>Negro</b>
Altura de planta	49 cm	35 cm	47
Color de la Flor	Blanco	Lila	Lila
Color del grano seco	Rojo vino	Amarillo	Negro
Forma del grano	Arriñonada	Ovalada	Ovalado
Peso de 100 granos	52 g	49 g	18 g
Tamaño del grano	Grande	Grande	Pequeño
Días a la floración	48	51	55
Días a la cosecha en fresco	95	80	80
Días a la cosecha en seco	105	102	120
Adaptación (msnm)	1600-2400	1000 – 2400	1000 - 2200
Rendimiento grano seco	1489 Kg/ha	1481 Kg/ha	1894 Kg/ha

### **Importancia Económica y Nutricional del Fréjol a Nivel Mundial.**

El fréjol común es una de las legumbres más importantes en todo el mundo, especialmente en los países latinoamericanos donde su consumo es un complemento indispensable en la dieta alimenticia de sus habitantes (López, 2010).

El fréjol, según la FAO se produce en 129 países. La producción mundial entre 1961 y 2007 ha estado en promedio en 15 millones de toneladas. En el 2008 se produjeron 20.935.000, con un rendimiento promedio mundial de 730 kilos por hectárea. Entre los países más productores se destacan en orden de importancia, expresados en porcentaje de producción mundial: India 19%, Brasil 17%, Myanmar 12%, Estados Unidos 6% y México 6%. Estos países contribuyeron con el 66% del total producido. Colombia solo representa el 0.8% de la producción mundial. En cuanto a rendimientos el de mayor productividad es Canadá con 2.12, Estados Unidos con 2.0 y Chile con 1.85 toneladas por hectárea. El rendimiento de Colombia está en 1.1 toneladas por hectárea.

En general el mayor consumo per cápita se da en países con bajo ingreso per cápita. Los de mayor consumo son: Nicaragua, Cuba, Brasil, Uganda y El Salvador. En Colombia el consumo es de 3 kilos por persona (López, 2010).

### **Propiedades Alimentarias del Fréjol.**

Los fréjoles juegan un papel importante en la dieta no solo por su contenido energético, sino por la gran cantidad de proteína que suministran, el consumo de fréjol resulta especialmente valioso como complemento de los cereales en aquellas regiones donde la población tienen limitado el acceso a la proteína de productos animales (Serrano, 2004).

Dependiendo del tipo de fréjol, el contenido de proteínas varía del 14 al 33%, siendo rico en aminoácidos como la lisina (6.4 -7.6 g/100 g de proteína) y la Fenilalanina más tirosina (5.3 - 8.2 g/100 g de proteína), pero con deficiencias en los aminoácidos azufrados de metionina y cisteína. Sin embargo, de acuerdo con evaluaciones de tipo biológico, la calidad de



la proteína del fréjol cocido puede llegar a ser de hasta el 70% comparada con una proteína testigo de origen animal a la que se le asigna el 100% (Serrano, 2004).

Con relación a la aportación de carbohidratos, 100 g de fréjol crudo aportan de 52 a 76 g dependiendo de la variedad, cuya fracción más importante la constituye el almidón. El almidón representa la principal fracción de energía en este tipo de alimentos, a pesar de que, durante su cocinado, una parte del mismo no queda disponible dado que se transforma en el denominado almidón resistente a la digestión. Dentro de los macronutrientes del fréjol, la fracción correspondiente a los lípidos es la más pequeña (1.5 - 6.2 g/100 g), constituida por una mezcla de acilglicéridos cuyos ácidos grasos predominantes son los mono y poliinsaturados (Serrano, 2004).

El fréjol también es buena fuente de fibra cuyo valor varía de 14 -19 g/100 g del alimento crudo, del cual hasta la mitad puede ser de la forma soluble. Los principales componentes químicos de la fibra en el fréjol son las pectinas, pentosanos, hemicelulosa, celulosa y lignina. Además, este alimento también es una fuente considerable de calcio, hierro, fósforo, magnesio y zinc y de las vitaminas tiamina, niacina y ácido fólico (Serrano, 2004).

### **El fréjol y su Importancia en la Seguridad Alimentaria y Nutricional.**

El estudio de la seguridad alimentaria (SAN) inició en la década de los años 70 en El Salvador, como una respuesta a la preocupación internacional de producción y comercialización de alimentos. Sin embargo, en los años 90, fue más allá de solo asegurar una producción y una importación nacional de alimentos. En la actualidad, ha pasado a un análisis más aplicado al ámbito de las familias, las personas y de los diversos factores que están afectando su seguridad alimentaria, incluyendo los conceptos de calidad alimentaria, inocuidad, adecuación nutricional, distribución intra hogar y preferencias culturales, y también inicia la consideración de la seguridad alimentaria como un derecho de la humanidad (Maluf, 2009).

Desde la Cumbre Mundial de Alimentación de 1996, la FAO manifiesta que la "Seguridad alimentaria a nivel de individuo, hogar, nación y global se consigue cuando todas

las personas, en todo momento, tienen acceso físico y económico a suficiente alimento, seguro y nutritivo, para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias, con el objeto de llevar una vida activa y sana”. La crisis económica y el incremento internacional de precios tienen profundas implicaciones en la seguridad alimentaria en la población salvadoreña, ya que existe una alta dependencia de alimentos del exterior, incluso de los alimentos básicos como el maíz, el arroz y el fréjol (Maluf, 2009).

### **Materia Seca**

La materia o extracto secos es la parte que resta de un material tras extraer toda el agua posible a través de un calentamiento hecho en condiciones de laboratorio. El porcentaje de materia seca se refiere a la cantidad de alimento menos el agua contenida en dicho alimento, en otras palabras, si una muestra de alimento "X" se somete a un calor moderado (típicamente 65°C por 48 horas) de tal modo que toda el agua se evapore, lo que queda es la porción de materia seca de ese alimento (UNAM, 2008).

### **Determinación de Humedad**

Todos los alimentos, cualquiera que sea el método de industrialización a que hayan sido sometidos, contienen agua en mayor o menor proporción. Las cifras de contenido en agua varían entre un 60 y un 95% en los alimentos naturales. En los tejidos vegetales y animales, puede decirse que existe en dos formas generales: “agua libre” Y “agua ligada”. El agua libre o absorbida, que es la forma predominante, se libera con gran facilidad. El agua ligada se halla combinada o absorbida (UNAM, 2008).

### **Determinación de Ceniza**

Las cenizas de un alimento son un término analítico equivalente al residuo inorgánico que queda después de calcinar la materia orgánica. Las cenizas normalmente no son las mismas sustancias inorgánicas presentes en el alimento original, debido a las pérdidas por volatilización o a las interacciones químicas entre los constituyentes (UNAM, 2008).

### **Determinación de Grasa**

Es una extracción continua por disolvente donde a la muestra se le hace pasar vapor de disolvente y la grasa se cuantifica por pérdida de peso en la muestra o por grasa removida, (UNAM, 2008)

### **Determinación de Proteína**

En el trabajo de rutina se determina mucho más frecuentemente la proteína total que las proteínas o aminoácidos individuales. En general, el procedimiento de referencia Kjeldahl determina la materia nitrogenada total, que incluye tanto las no proteínas como las proteínas verdaderas (UNAM, 2008).

### **Micotoxinas**

#### ***Generalidades***

Las micotoxinas (mikes = hongo y toxina = veneno) se relacionan con la diferenciación y esporulación de los hongos en su fase estacionaria, pueden contaminar los alimentos, piensos y materias primas de consumo humano y animal. Son un grupo muy amplio de metabolitos secundarios de origen fúngico, formados a partir de unos pocos intermediarios del metabolismo primario, bajo condiciones deficientes y estrés la formación de micotoxinas refleja que el moho ha alcanzado algún grado de diferenciación bioquímica, fisiológica y morfológica, por esto poseen diferentes propiedades químicas, biológicas y toxicológicas. Los hongos productores de micotoxinas pertenecen en su mayoría a la división Ascomycota con más de 30.000 especies (Vallejo, 2012).

#### ***Clasificación***

Las micotoxinas son producidas principalmente por los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* y *Claviceps*. Este tipo de metabolitos son usualmente subdivididos en micotoxinas de campo, producidas en cultivos de cereales antes o inmediatamente después de ser cosechados, principalmente por especies de *Fusarium* y las micotoxinas de almacén principalmente producidas por especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* durante el

secado o almacenamiento. Las micotoxinas se clasifican en: Aflatoxinas B1, B2, G1, G2, Ocratoxina A, Fumonisinias B1, B2, B3, Patulina, Zearalenona, Tricotecenos (CIMA, 2016).

## **Aflatoxinas**

### ***Origen***

A comienzos de 1960, más de 100.000 pavos jóvenes en granjas de aves en Inglaterra murieron en el transcurso de unos meses debido a una enfermedad nueva, llamada “la enfermedad X del pavo”. Con el tiempo se determinó que esta enfermedad no estaba asociada únicamente con los pavos, sino que pollos y faisanes jóvenes fueron también afectados con una alta tasa de mortalidad. Esta enfermedad se atribuyó a la presencia de toxinas de *Aspergillus flavus* en harina de maní importada de Sudamérica, tomando así el nombre de aflatoxinas (A: referente al género *Aspergillus* y AFLA: referente a la especie *flavus*), simultáneamente en California se observó una aparición masiva de hepatomas en las truchas arcoíris de varias piscifactorías comerciales que habían consumido pienso con semillas de algodón contaminado por aflatoxinas. En esa misma década existieron números informes de tumores hepáticos en animales de crianza en Europa y América, por esta razón son las micotoxinas más conocidas e intensamente estudiadas en el mundo (Vallejo, 2012).

### ***Biotransformación***

El mecanismo de acción de las aflatoxinas en 1966 se develó e incluía: la inhibición del DNA, RNA, mitosis, producción de alteraciones cromosómicas, lo que evidenció su efecto carcinogénico, teratogénico y mutagénico. La aflatoxina B1 se absorbe en el intestino delgado y es transportada por los glóbulos rojos y proteínas plasmáticas hacia el hígado a través de la vena porta. En las células hepáticas la toxina entra y se metaboliza en el retículo endoplasmático, donde es hidrolizada y transformada en las aflatoxinas P1, M1, Q1. También se produce la toxina B1-8,9-epóxido que puede ser detoxificada por una transferasa inducible formando un conjugado con el glutatió en su forma tiólica (GSH), sin embargo, este epóxido es afín a diversas macromoléculas como ácidos nucleicos y proteínas a las cuales se une de

forma covalente causando interrupciones en la transcripción y traducción, respectivamente. Se forma un aducto de ADN denominado: Aflatoxina B1-guanina, eliminado en la orina y un ducto proteico: Aflatoxina-B1-lisina utilizado como biomarcador en suero (Sáez, 2011).

### **Clasificación**

Existen cuatro aflatoxinas principales, conocidas como aflatoxina B1, aflatoxina B2, aflatoxina G1 y aflatoxina G2. La letra B indica que estas aflatoxinas tienen fluorescencia azul (blue) frente a la luz ultravioleta (365 nm), mientras que la letra G indica la fluorescencia verde amarillenta (green). La aflatoxina B1 y la aflatoxina B2 difieren entre ellas por la presencia de un doble enlace más en la primera. Por su parte, la aflatoxina G1 y la aflatoxina G2 difieren entre sí en el mismo detalle estructural. Las aflatoxinas B difieren de las aflatoxinas G porque el anillo de furano de las primeras se convierte en un anillo de lactona en las segundas. Esta transformación es fácil de realizar en el laboratorio, por tratamiento con ácido, (AECOSAN, 2015).

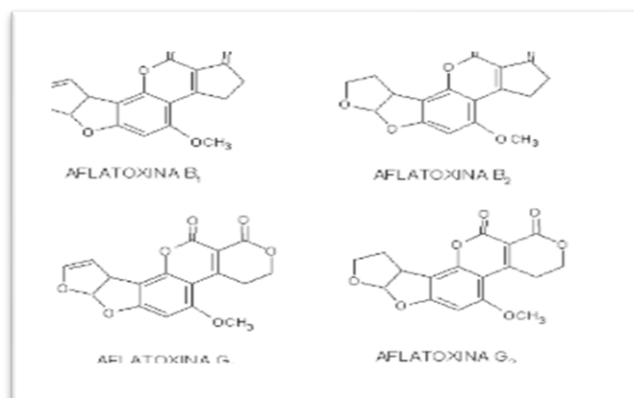
### **Composición Química**

La estructura química de las aflatoxinas B1 y G1, está constituida por la fusión de un núcleo cumarínico y otro bifurano a los que se añaden una pentanona en el caso de la AF B1 y un anillo ciclohexanoico en la AF G1. La AF B2 y AF G2 son dihidroderivados de la AF B1 y AF G1 respectivamente. La mayoría de las restantes aflatoxinas descritas proceden también de la hidroxilación en diferentes puntos de la estructura molecular de las cuatro aflatoxinas principales. Tal es el caso de la AF M1 y de la AF M2, derivados 4-hidroxilados de la AF B1 y AF B2 respectivamente (Ortiz, 2009).

La parte más reactiva de la estructura de las aflatoxinas es el anillo lactónico. Por otro lado, la existencia de un núcleo bifurano confiere a las moléculas de aflatoxina una gran rigidez, lo que favorece la interacción con algunos componentes celulares (Ortiz, 2009).

## Figura 1

*Estructura Química de las Aflatoxinas B1, B2, G1 Y G2.*



## **Efectos Tóxicos**

Las aflatoxinas B y G son micotoxinas genotóxicas y carcinogénicas, habiendo sido clasificadas por la International Agency for Research on Cancer dentro del grupo 1 (sustancias carcinogénicas para humanos). También se ha descrito un potencial efecto inmunosupresor y de interferencia nutricional, así como efectos mutagénicos, teratogénicos y hepatotóxicos. Se considera que la aflatoxina de mayor poder carcinogénico es la aflatoxina B1 que, además, es la que se suele encontrar en mayor concentración en alimentos y piensos contaminados (Sáez, 2011).

Las manifestaciones clínicas de la aflatoxicosis aguda son vómitos, dolor abdominal, edema pulmonar, así como infiltración grasa y necrosis del hígado. No obstante, la aparición de estos cuadros en seres humanos es sumamente escasa y su peligrosidad viene determinada básicamente por su toxicidad crónica. El potencial carcinogénico de las aflatoxinas, fundamentalmente de la aflatoxina B1, ha sido bien establecido en muchas especies animales, incluyendo roedores (que tienen una alta susceptibilidad a estas sustancias), primates y peces. El hígado es de manera constante el principal órgano afectado por la acción tóxica de la aflatoxina B1. No obstante, dependiendo de la especie animal y la raza, la dosis, la vía de exposición y la dieta de los sujetos expuestos, también se han documentado tumores

relacionados con la acción de las aflatoxinas en otros órganos y lugares del cuerpo tales como los riñones o el colon (Sáez, 2011).

### **Niveles Permitidos**

La FDA ha regulado los máximos niveles permisibles de aflatoxinas en alimentos y raciones de forraje para animales. Por lo tanto, es de crucial importancia establecer una determinación precisa de la presencia de aflatoxinas para las autoridades encargadas del control de la calidad de alimentos y forrajes. Las pruebas para aflatoxinas en estos productos requieren que se lleve a cabo muestreos, extracciones químicas, saneamiento o purificación y análisis cuantitativos (Vallejo, 2012).

**Tabla 2**

*Niveles Reglamentarios para Aflatoxinas Según la FDA.*

<b>Para</b>	<b>Nivel</b>	<b>Productos</b>
Hombre	20 ppb	Todas las comidas, excepto la leche
Todas las especies animales	20 ppb	Todos los alimentos (salvo las excepciones siguientes)
Excepciones		
Bovinos y porcinos para reproducción, aves adultas.	100 ppb	Maíz
Cerdos adultos (> 100 libras)	200 ppb	Maíz
Terminación de ganado bovino y porcino.	300 ppb	Maíz
Todas las especies	300 ppb	Harina de semilla de algodón utilizada como forraje.

### ***Características Morfológicas y Bioquímicas***

El color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de aspergilos. Poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las cabezas conidiales presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme, y a simple vista las más grandes suelen parecer diminutos alfileres

sobre el sustrato. En los aspergilos, los conidios constituyen cadenas que se originan en la célula conidiógena o fiálide. En algunos aspergilos hay células adyacentes a las fiálides denominadas métulas o células de soporte. Los *Aspergillus* poseen una o dos series de células sobre la vesícula, o bien presentan simultáneamente cabezas de ambos tipos (Rendon, 2007)

Se han desarrollado métodos inmunológicos rápidos para la identificación de los hongos contaminantes de granos y otros productos vegetales y técnicas moleculares con base en el del ADN nuclear y mitocondrial, el polimorfismo de tramos de fragmentos amplificados (AFLP), el polimorfismo de tramos de fragmentos de restricción (RFLP) y el polimorfismo del ADN amplificado al azar (RAPD) para estudios a nivel intra e interespecífico (Rendon, 2007).

### **Método para medir Aflatoxinas**

#### ***Kit VERATOX Prueba Cuantitativa para Aflatoxinas***

El kit Veratox para aflatoxinas es una prueba unumunoabsorbancia ligada a una enzima ELISA directo competitivo que proporciona un análisis cuantitativo de aflatoxina en productos como maíz, harina de maíz, harina de gluten de maíz, mezcla de maíz/soya, trigo, arroz, arroz blanqueado, milo, soya, semilla entera de algodón, harina de semilla de algodón, maní crudo, mantequilla de maní y piensos mixtos (NEOGEN, 2017).

#### ***Fundamentos de la Prueba.***

El kit VERATOX para aflatoxinas HS, determina cuantitativamente aflatoxinas (B1, B2, G1, G2) a través de la lectura por el método por inmuno absorción ligado a enzimas (ELISA). El inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) es una de las técnicas más aplicadas para la detección de antígenos y anticuerpos. El principio básico es el uso de anticuerpos o antígenos conjugados con una enzima que al reaccionar con el sustrato específico producen una reacción de color que se puede cuantificar con un espectrofotómetro a una longitud de onda apropiada. Este kit cuenta con 38 pocillos, una solución sustrato, una solución de conjugado y una solución "stop" para detener la reacción, además de 4 controles de aflatoxinas 0 ppb, 5 ppb, 15 ppb y 50 ppb (NEOGEN, 2017).



### CAPITULO III

#### Materiales y Métodos

#### Ubicación del lugar de investigación

##### *Ubicación Política*

**Tabla 3**

*Ubicación Política de la Zona donde se Llevó a Cabo el Ensayo*

<b>País</b>	Ecuador
<b>Provincia</b>	Santo Domingo de los Tsáchilas
<b>Cantón</b>	Santo Domingo de los Colorados
<b>Parroquia</b>	Luz de América
<b>Predio</b>	Laboratorios de la Universidad "ESPE"
<b>Dirección</b>	Km 35 Vía Santo Domingo - Quevedo

##### *Ubicación Geográfica*

El presente ensayo de investigación se desarrolló en los laboratorios de la universidad de las Fuerzas Armadas ESPE Extensión Santo Domingo en el km 35 Vía Santo Domingo – Quevedo en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas cantón Santo Domingo.

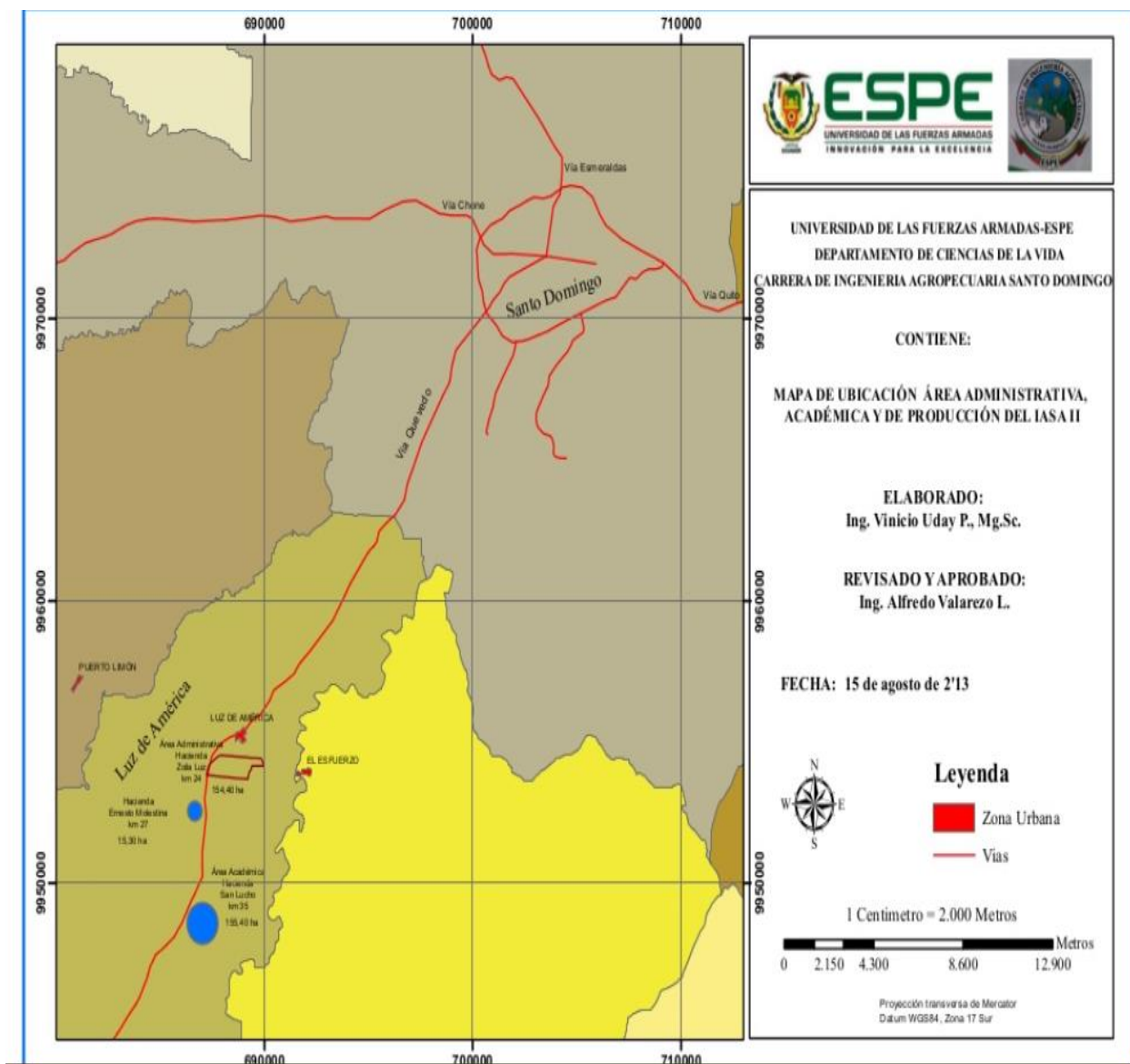
**Tabla 4**

*Ubicación Geográfica de la Zona donde se Llevó a Cabo el Ensayo*

<b>Latitud:</b>	00° 24' 36"
<b>Longitud:</b>	79° 18' 43"
<b>Altitud:</b>	270 msnm

Figura 2

Ubicación Geográfica donde se Desarrolló la Investigación.



### ***Ubicación Ecológica***

**Tabla 5**

*Ubicación Ecológica de la Zona donde se Llevó a Cabo el Ensayo*

<b>Zona de vida:</b>	Bosque húmido. Tropical
<b>Altitud:</b>	224 msnm
<b>Temperatura media:</b>	24.6 ° C
<b>Precipitación:</b>	2860 mm año-1
<b>Humedad relativa:</b>	85%
<b>Heliofanía:</b>	680 horas luz año-1
<b>Suelos:</b>	Francos Arenoso

Nota: Estación Agro meteorológica "Puerto Ila" Vía Quevedo km 34.

### **Materiales**

#### ***Determinación de Materia Seca.***

**Tabla 6**

*Recursos Necesarios para la Determinación de Materia Seca.*

<b>Equipos</b>	<b>Insumos</b>
Estufa	Variedades de Fréjol
Balanza analítica	

**Determinación de Humedad****Tabla 7***Recursos Necesarios para la Determinación de Humedad.*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales</b>	<b>Insumos</b>
Balanza	Cajas Petri	Variedades de
Molino		Fréjol

**Determinación de Ceniza****Tabla 8***Recursos necesarios para la determinación de ceniza*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales</b>	<b>Reactivos</b>
Balanza	Crisol	Ácido sulfúrico
Mufla	Pinzas	Aceite de oliva
Cocineta	Mechero	

**Determinación de Fibra****Tabla 9***Recursos necesarios para la determinación de Fibra.*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales</b>	<b>Reactivos</b>
Equipo Dosi-Fisher	Crisoles	Octanol
Balanza analítica	Lana de vidrio	Ácido sulfúrico
Bomba al vacío		Oxido de sodio
Estufa		Acetona
Mufla		Agua destilada

***Determinación de Proteína***

**Tabla 10**

*Recursos Necesarios para la Determinación de Proteína.*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales</b>	<b>Reactivos</b>
Equipo Kjeldahl	Bureta	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Balanza analítica	Soporte universal	Pastillas catalizadoras
Unidad de destilación	Matraz 250cc	Ácido Bórico al 2%
FISHER	Gotero	Hidróxido de sodio
DESTILLING.		NaCl 35%
Sorbora o colector/extractor de humos (unidad scrubber y bomba de vacío de circulación de agua).		Indicador Kjeldahl.

### ***Extracción de Grasa***

**Tabla 11**

*Recursos Necesarios para la Extracción de Grasa*

<b>Equipos</b>	<b>Material</b>	<b>Reactivos</b>
Extractor Soxhlet 45/50	Papel filtro	Éter de Petróleo 40-60 °C
Matraz redondo de 500 ml	Recipientes metálicos para cocción	Éter Di etílico 80-100 °C
Vasos Beacker para grasa.		
Estufa		
Balanza analítica		
Desecador		
Dedales de Extracción.		

### ***Determinación del Contenido de Aflatoxinas***

**Tabla 12**

*Recursos Necesarios para la Determinación del Contenido de Aflattoxinas.*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Insumos</b>
Balanza	Pipeta graduada	Alcohol	Variedades de fréjol
Kit Veratox	Papel filtro Whatman #1	metílico al 70%	
Lector de			
MicroElisa			

## **Métodos**

### ***Obtención de la materia prima.***

***Presentación al Granel.*** Las muestras se las adquirió en el mercado municipal “Unión y progreso” ubicado en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, cantón Santo domingo de los Colorados, los lugares de donde provienen mayormente estas materias primas son de las provincias de los Ríos y Manabí, comprando 3 kg por cada variedad de fréjol para su respectivo almacenaje y etiquetado en fundas plásticas con cierre hermético según el tratamiento que correspondan.

***Presentación Empaque Plástico.*** Las muestras se adquirieron en un supermercado ubicado en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, cantón Santo domingo de los Colorados, se trabajó con la misma marca de fréjoles, comprando 3 kg por cada variedad de fréjol para su respectivo almacenaje y etiquetado en fundas plásticas con cierre hermético según el tratamiento que correspondan.

***Presentación Enlatada.*** Las muestras se adquirieron en un supermercado ubicado en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, cantón Santo domingo de los Colorados, se trabajó con la misma marca de fréjoles, comprando 3 kg por cada variedad de fréjol, se mantuvo las muestras cerradas en las latas y solo se procedió abrir previamente a cada análisis para evitar contaminación o alteración.

El proyecto consistió en evaluar cada una de las variables propuestas como: Materia seca, Humedad, Ceniza, Fibra, Proteína, Grasa, mediante análisis bromatológico y la determinación del contenido de Aflatoxinas en función a los diferentes tipos de empaques de semillas de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.).

## **Diseño Experimental**

### **Factores a Probar.**

**Tabla 13**

*Factores y Niveles por Probar en el Estudio Bromatológico de Tres Variedades de Fréjol (Phaseolus vulgaris L.).*

<b>Factores</b>	<b>Niveles</b>
Variedades de Fréjol (V)	V1= Fréjol Rojo
	V2= Fréjol Canario
	V3= Fréjol Negro
Presentación de comercialización (P)	P1= Empaques plásticos
	P2= Al granel
	P3= Enlatado

### **Tratamientos a Comparar.**

**Tabla 14**

*Tratamientos a comparar en el estudio bromatológico de tres variedades de fréjol.*

<b>Tratamiento</b>	<b>Factores</b>	<b>Descripción</b>
T1	V1P1	Fréjol Rojo + Empaques plásticos
T2	V1P2	Fréjol Rojo + Al granel
T3	V1P3	Fréjol Rojo + Enlatado
T4	V2P1	Fréjol Canario + Empaques plásticos
T5	V2P2	Fréjol Canario + Al granel
T6	V2P3	Fréjol Canario + Enlatado
T7	V3P1	Fréjol Negro + Empaques plásticos
T8	V3P2	Fréjol Negro + Al granel
T9	V3P3	Fréjol + Enlatado



### **Tipo de Diseño.**

Se empleará un esquema Bifactorial (3X3) conducido en un DBCA con tres repeticiones por tratamiento.

### **Análisis Estadístico**

#### **Esquema de Análisis de Varianza.**

**Tabla 15**

*Esquema del Análisis de Varianza para el Estudio Bromatológico de Tres Variedades de Fréjol (Phaseolus vulgaris L.).*

<b>Fuente de Variación</b>		<b>Grados de Libertad</b>
Bloques	r-1	2
Variedades de fréjol	V-1	2
Presentación de comercialización	P-1	2
Variedad x Presentación de comercialización	(V-1) (S-1)	4
Error Experimental	(t-1) (r-1)	16
Total		26

#### **Coefficiente de Varianza**

$$CV = \frac{\sqrt{Cme}}{x}$$

- Cv = Coeficiente de variación
- Cme = Cuadrado medio del error
- X= Media

**Análisis Funcional.** Se empleará una prueba de Tukey con un nivel de significancia (0,05).

### **Variables a Medir**

Las variables consideradas para esta investigación se realizaron en los laboratorios de la Universidad de las Fuerzas Armadas-“ESPE”:

#### ➤ **Materia Seca**

- Se empleó la siguiente metodología establecida en la NTE INEN 382 (2013):
- Se pesó 100g de la muestra.
- Se dejó en la estufa a 60° C durante 48 horas, obteniendo los datos del peso en seco para proceder hacer los cálculos del porcentaje de materia seca, estas muestras secas sirven para hallar las demás variables.

$$\frac{(\text{Peso seco (g)})}{(\text{Peso fresco (g)})} * 100$$

(Gonzalez & Garduño, 2016).

#### ➤ **Humedad.**

- Se empleó la siguiente metodología establecida en la NTE INEN 1561 (2015):
- Obtenida la materia seca, se restó el peso fresco con el peso seco y se obtuvo la cantidad de humedad de las muestras.

(Gonzalez & Garduño, 2016).

#### ➤ **Ceniza.**

- Se empleó la siguiente metodología establecida en la NTE INEN 520:
- Se pesó dos gramos de muestra en un crisol de porcelana previamente pesado.
- Se quemó la muestra con mechero hasta ver completamente ceniza.
- Enfriamos y observamos que el contenido este seco.
- Agregamos ácido sulfúrico concentrado poco a poco, flameamos el crisol hasta la desaparición de vapores blancos.

- Incineramos el residuo en la mufla a una temperatura de (550°C ± 3/ hora).
- Enfriamos en el desecador por 45 min. y pesamos.
- Se calculó por diferencia de peso la cantidad de cenizas totales mediante la

siguiente formula:

$$\%C = \frac{X}{Y} * 100$$

Donde:

- % C = Porcentaje de cenizas.
- Y = Peso de muestra después de incineración
- X = Peso de muestra antes de incineración
- Y = [peso crisol + muestra (después de incineración)] - peso crisol vacío
- X = [peso crisol + muestra (antes de incineración)] - peso crisol vacío

(Cruz & Melendez, 2004).

➤ **% Fibra.**

- Se empleó la siguiente metodología establecida en la NTE INEN 522:
- Se tomó 2g/crisol de cada tratamiento, y se colocó los crisoles en el extractor de fibra.
- Se colocó 100 ml de ácido sulfúrico y 5 gotas de octanol, por cada crisol.
- Se dejó hervir durante 30 minutos, luego se evacuó el líquido lavando con agua destilada hervida 166 ml en cada uno.
- Posterior a esto se aplicó 100 ml de Hidróxido de potasio y 5 gotas de octanol, se dejó hervir durante 30 minutos.
- Luego se evacuó nuevamente el líquido lavando con agua destilada hervida 333 ml en cada uno.
- Se retiró los crisoles y colocó 10 ml de acetona en cada crisol, dejando 10 minutos en reposo, llevando luego a la bomba de vacío.

- Se colocó los crisoles en la estufa a 100°C durante 24 horas, al enfriarse se tomó el peso. Finalmente se colocó en la mufla a 550°C durante 3 horas, al enfriarse se tomará el peso final.

$$\frac{((\text{Peso crisol} + \text{muestra seca (g)}) - (\text{Peso crisol} + \text{muestra calcinada (g)}))}{(\text{Peso muestra (g)})} * 100$$

(De Garcia, 2015).

### ➤ % Proteína

- Se empleó la siguiente metodología establecida en la NTE INEN 16:

#### **Digestión**

- Se inició pesando una muestra de 0,3 gramos seca o fresca y se colocó en el micro tubo digestor.
- Luego se colocó 5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y una pastilla catalizadora en cada micro-tubo digestor.
- Posteriormente se colocó los tubos de digestión con las muestras en el block-digest con el colector de humos en función.
- Luego se programó a una temperatura de 420°C por 30 min. , finalizado este tiempo se obtuvo una muestra de color verde debido a la pastilla catalizadora.
- Se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente.

#### **Destilación**

- En cada micro-tubo se adicionó 10 ml de agua destilada
- Luego se colocó el micro-tubo y el matraz de recepción con 50 ml de ácido bórico al 2% en el sistema de destilación
- Posteriormente se encendió el sistema y se añadió 30 ml de hidróxido de sodio al 40%, verificando que exista un flujo de agua normal.
- Se recogió 200 ml de destilado, retirando del sistema los accesorios.

### Titulación

- De la destilación obtenida en el matraz se colocó tres gotas de indicador
- Luego se tituló con ácido clorhídrico al 0,1 N utilizando un agitador mecánico.
- Se registró el volumen de ácido consumido, la coloración de titulación fue rosado ligero.

- Para la obtención de proteína bruta se calculó con la siguiente formula:

$$\% \text{ proteína Bruta} = \frac{(V_{HCl} - V_b) * 1,401 * NHCl * F}{g. muestra}$$

Donde:

- 1,401 = Peso atómico del nitrógeno
- NHCl = Normalidad de Acido Clorhidrico 0.1 N
- F = Factor de conversión (6,25)
- VHCl = Volumen del acido clorhidrico consumido en la titulación
- Vb = Volumen del banco (0,3 ml)

(Francisco, 2011).

### ➤ Extracción de grasa

Se empleó la siguiente metodología establecida en la NTE INEN 277:

#### Preparación de la muestra

- Las muestras para el ensayo se acondiciono en recipientes herméticos, limpios secos (vidrio, plástico u otro material inoxidable). Completamente llenos para evitar que se formen espacios de aire.

- La cantidad de la muestra extraída dentro de un lote debe ser representativa y no debe exponerse al aire mucho tiempo.

- Se homogenizo la muestra invirtiendo varias veces el recipiente que lo contiene

## Procedimiento

- Se Secó los vasos beaker en la estufa a 100°C, por una hora, luego se pasó al desecador y luego se pesó con aproximación al 0.1 mg cuando haya alcanzado la temperatura ambiente
- Se pesó aproximadamente 2g de muestra sobre un papel filtro y se colocó en el interior del dedal, se taponó con suficiente algodón, luego se introdujo en el porta dedal.
- Posteriormente se colocó el dedal y su contenido en el vaso beaker, bajo los ganchos metálicos del aparato de golfish.
- Se adiciono en el vaso beaker 50 ml, de solvente, al mismo tiempo se abrió el reflujo de agua.
- Luego se Colocó el anillo en el vaso y se llevó a la hornilla de aparato golfish, se ajustó al tubo refrigerante del extractor y se levantó las hornillas y se graduó la temperatura a 5,5 (55°C)
- El tiempo óptimo para la extracción de grasa fue de 4 horas, mientras tanto se observe que el éter no se evapore caso contrario se colocaría más solvente
- Terminando la extracción, se bajó con cuidado los calentadores, retirando momentáneamente en vaso con el anillo, se sacó el porta dedal con el dedal y se colocó el vaso recuperar del solvente
- Se Levantó los calentadores y se dejó hervir hasta que el solvente este casi todo en el vaso de recuperación, sin quemar la muestra
- Se Bajó los calentadores, se retiró los vasos beaker, con el residuo de la grasa, el solvente se colocó al frasco original.
- El vaso con la grasa se llevó a la estufa a 105°C hasta completamente evaporación del solvente por 30 mim

- Se colocó los vasos beaker que contiene la grasa durante 30 min. en la estufa a una temperatura de 100°C, y luego se enfrió hasta temperatura ambiente en el desecador, se pesó y registro los resultados.

$$G = \frac{W_2 - W_1}{W_0} \times 100$$

Donde:

- G= Porcentaje de grasa
- W0= Peso de la muestra
- W1= Peso del vaso beaker vacío
- W2= Peso del vaso más la grasa

(Heredia, 2017).

➤ **Preparación de muestras y extracción para prueba cuantitativa en aflatoxinas.**

- Las muestras a evaluar se tomaron de acuerdo con las técnicas de resultados aceptados. Las muestras se molieron y mezclaron completamente antes del procedimiento de extracción. Se almaceno las muestras entre 5 y 8 °C hasta ser analizadas.
- Se preparó alcohol metílico al 70% mezclando 7 partes de metanol grados ACS con tres partes de agua destilada para cada muestra que se probó.
- Se obtuvo una muestra representativa. Se molió toda la muestra para que por lo menos el 75% del material molido pase a través de un tamiz #20 para partículas de tamaño de café instantáneo de molido fino.
- Se mezcló 25g de la muestra molida con 125 ml de una solución metanol-agua al 70% en una mezcladora de alta velocidad durante 3 minutos.
- Se filtró el extracto vertiendo al menos 5-15 ml a través de un filtro Whatman #1 (o jeringa de filtrado neogen) y se recolecto el filtrado como muestra.

### Procedimiento de prueba cuantitativa para aflatoxinas.

- Antes de usar, se dejó los reactivos a temperatura ambiente entre 18 y 30 °C.
- Se tomó 1 pozo de mezclado marcando en rojo por cada muestra que se probó, más de 4 pozos marcados en rojo para los controles y se colocó en los porta-pozos.
- Se tomó igual número de pozos cubiertos de anticuerpos.
- Se mezcló cada reactivo antes de usarlo, moviendo los recipientes suavemente y en forma circular.
- Se colocó 100 µl de conjugado del frasco con etiqueta azul en cada pozo de mezcla marcado con rojo.
- Se usó una punta nueva cada vez, se transfirió 100 µl de los controles y las muestras a los pozos de mezclado marcados con rojo como se muestra a continuación.

0	5	15	50	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	Tira 1
M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	Tira 2

- Usando una pipeta de 12 canales, se mezcló los pozos pipeteando el líquido hacia arriba y hacia abajo 3 veces. Se transfirió 100 µl a los pozos de anticuerpo. Se mezcló moviendo el porta micropozo en ambos sentidos sobre una superficie plana durante 20 segundos sin salpicar los reactivos de los pozos. Se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente entre 18 y 30 °C. Se descartó los pozos de mezclado marcados con rojo.
- Con una piseta se llenó cada pozo de anticuerpo con agua destilada y se vació, repitiendo este paso 5 veces. Luego se volvió a los pozos sobre una toalla de papel y se golpeó hasta verter toda el agua restante.
- Se pipeteó el volumen necesario del sustrato (del frasco de etiqueta verde) en la cubeta de reactivos de etiqueta verde y, con puntas nuevas se pipeteó 100 µl de sustrato en los pozos y se hizo la mezcla moviendo en ambos sentidos sobre una superficie plana durante



20 segundos. Se Incubó por 3 minutos, se descartó el sustrato restante y se enjuago la cubeta de reactivo con agua.

- Se pipeteó la solución detenedora roja (del frasco de etiqueta roja, el mismo volumen preparado para el sustrato) en la cubeta de reactivos de etiqueta roja. Usando las mismas puntas de pipeta que se utilizó para dispensar el sustrato, se agregó 100  $\mu$ l de reactivo detenedor rojo a cada pozo y se hizo la mezcla moviendo en ambos sentidos sobre una superficie plana.

- Finalmente se limpió el fondo de los micropozos con un paño seco o toalla y se realizó la lectura en un lector de micro-pozos empleando un filtro de 650 nm. Se eliminaron las burbujas de aire ya que pueden afectar los resultados analíticos.

- Se hizo la lectura dentro de los 20 minutos de haberse completado la prueba.

## CAPITULO IV

### Resultados

#### Análisis de Varianza para las Variables en Estudio.

##### *Materia Seca*

**Tabla 16**

*Análisis de varianza para Materia Seca.*

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Variedades	0,967252	2	0,483626	8,91	0,0025*
B: Presentación	207,966	2	103,983	1916,21	0,0000*
C: Replicas	0,35703	2	0,178515	3,29	0,0636
AB	0,803659	4	0,200915	3,70	0,0256*
Error	0,868237	16	0,0542648		
Total	210,962	26			
Coeficiente de Variación	0,24				

En la tabla 16, se observa diferencia significativa en: El factor A (Variedad), El factor B (Presentación) y en la interacción A\*B (Variedad\*Presentación), aceptando la hipótesis alternativa, a un nivel de 5% de probabilidad.

**Humedad****Tabla 17***Análisis de Varianza para Humedad.*

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Variedades	0,789607	2	0,394804	6,42	0,0090*
B: Presentación	204,048	2	102,024	1659,43	0,0000*
C: Replicas	0,404363	2	0,202181	3,29	0,0636
AB	0,960681	4	0,24017	3,91	0,0213*
Error	0,983704	16	0,0614815		
Total	207,186	26			
Coefficiente de Variación	7,86				

En la tabla 17, se observa diferencia significativa en: El factor A (Variedad), El factor B (Presentación) y en la interacción A\*B (Variedad\*Presentación), aceptando la hipótesis alternativa, a un nivel de 5% de probabilidad.

**Ceniza****Tabla 18***Análisis de Varianza para la variable de Ceniza.*

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Variedades	0,0896	2	0,0448	28,70	0,0000*
B: Presentación	0,258067	2	0,129033	82,65	0,0000*
C: Replicas	0,00202222	2	0,00101111	0,65	0,5364
AB	0,0944	4	0,0236	15,12	0,0000*
Error	0,0249778	16	0,00156111		
Total	0,469067	26			
Coeficiente de Variación	19,87				

En la tabla 18, se observa diferencia significativa en: El factor A (Variedad), El factor B (Presentación) y en la interacción A\*B (Variedad\*Presentación), aceptando la hipótesis alternativa, a un nivel de 5% de probabilidad.

**Fibra Bruta****Tabla 19***Análisis de Varianza para la Variable Fibra Bruta.*

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Variedades	6,68519	2	3,34259	9,38	0,0020*
B: Presentación	40,9074	2	20,4537	57,38	0,0000*
C: Replicas	0,12963	2	0,0648148	0,18	0,8355
AB	38,037	4	9,50926	26,68	0,0000*
Error	5,7037	16	0,356481		
Total	91,463	26			
Coefficiente de Variación	11,85				

En la tabla 19, se observa diferencia significativa en: El factor A (Variedad), El factor B (Presentación) y en la interacción A\*B (Variedad\*Presentación), aceptando la hipótesis alternativa, a un nivel de 5% de probabilidad.

**Grasa****Tabla 20***Análisis de Varianza para la Variable de Grasa.*

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Variedades	1,15574	2	0,57787	9,30	0,0021*
B: Presentación	4,30685	2	2,15343	34,67	0,0000*
C: Replicas	0,0496296	2	0,0248148	0,40	0,6771
AB	2,2337	4	0,558426	8,99	0,0005*
Error	0,993704	16	0,0621065		
Total	8,73963	26			
Coeficiente de Variación	23.82				

En la tabla 20, se observa diferencia significativa en: El factor A (Variedad), El factor B (Presentación) y en la interacción A\*B (Variedad\*Presentación), aceptando la hipótesis alternativa, a un nivel de 5% de probabilidad.

**Proteína****Tabla 21***Análisis de Varianza para la Variable de Proteína.*

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Variedades	11,9657	2	5,98283	5,22	0,0179*
B: Presentación	25,2836	2	12,6418	11,04	0,0010*
C: Replicas	7,19467	2	3,59734	3,14	0,0707
AB	62,0547	4	15,5137	13,55	0,0001*
Error	18,3244	16	1,14527		
Total	124,823	26			
Coeficiente de Variación	5,46				

En la tabla 21, se observa diferencia significativa en: El factor A (Variedad), El factor B (Presentación) y en la interacción A\*B (Variedad\*Presentación), aceptando la hipótesis alternativa, a un nivel de 5% de probabilidad.

**Aflatoxinas totales**

**Tabla 22**

*Análisis de varianza para la variable de Aflatoxinas totales.*

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Variedades	20,8067	2	10,4033	235,55	0,0000*
B: Presentación	3,16667	2	1,58333	35,85	0,0000*
C: Replicas	0,0866667	2	0,0433333	0,98	0,3963
AB	43,66	4	10,915	247,13	0,0000*
Error	0,706667	16	0,0441667		
Total	68,4267	26			
Coeficiente de Variación	12,95				

En la tabla 22, se observa diferencia significativa en: El factor A (Variedad), El factor B (Presentación) y en la interacción A\*B (Variedad\*Presentación), aceptando la hipótesis alternativa, a un nivel de 5% de probabilidad.



**Pruebas de significancia de Tukey  $p < 0,05$  para los factores en estudio**

***Prueba de significancia de Tukey del Factor A.***

**Tabla 23**

*Prueba de Significancia Tukey del Factor A (Variedades)*

<b>Factor A (Variedades)</b>	<b>Materia seca</b>	<b>Humedad</b>	<b>Ceniza</b>	<b>Fibra</b>	<b>Grasa</b>	<b>Proteína</b>	<b>Aflatoxina Totales</b>
V1	96,77 a	2,95 ab	0,17 a	4,83 a	0,90 a	20,75 b	0,48 a
V2	96,59 a	3,16 b	0,14 a	4,56 a	1,34 b	18,97 a	1,78 b
V3	97,05 b	3,37 a	0,27 b	5,72 b	0,90 a	19,32 ab	2,61 c

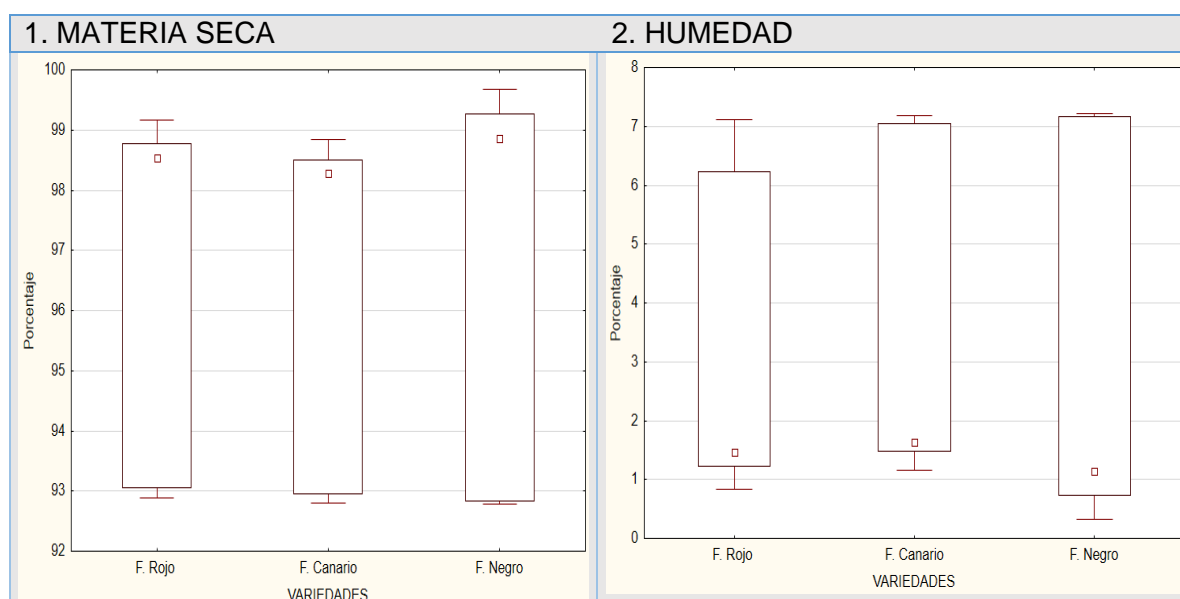
V1= Fréjol Rojo

V2= Fréjol Canario

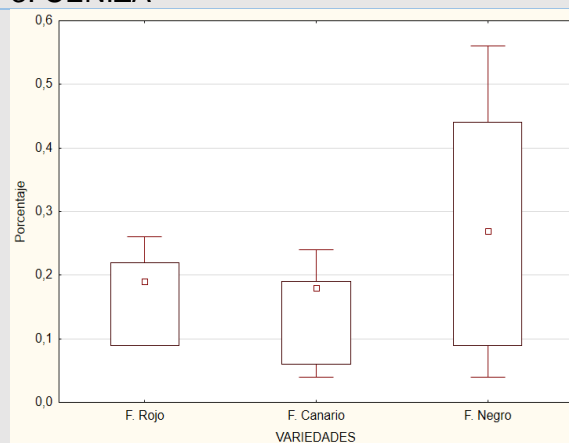
V3= Fréjol Negro

**Figura 3**

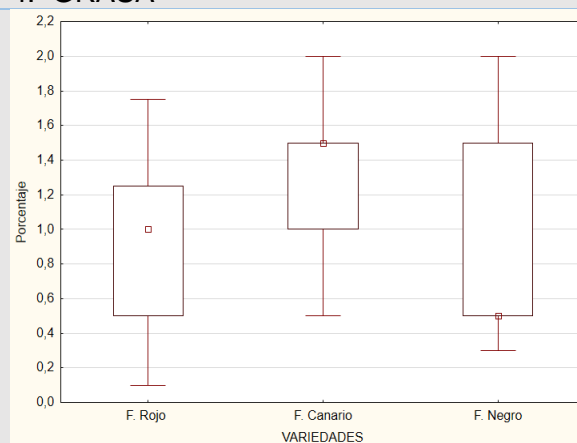
*Cuadro Resumen de las Pruebas de Significancia de Tukey para el Factor A.*



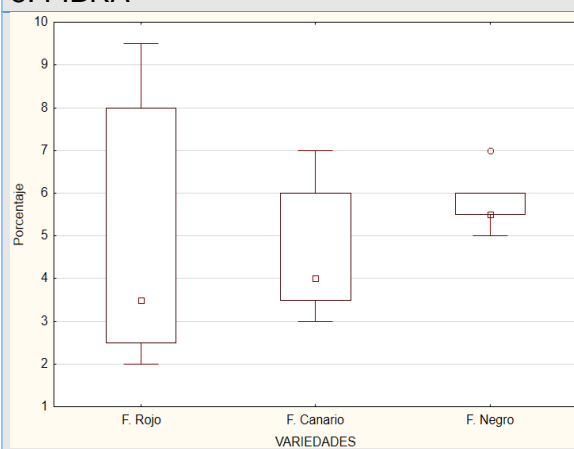
## 3. CENIZA



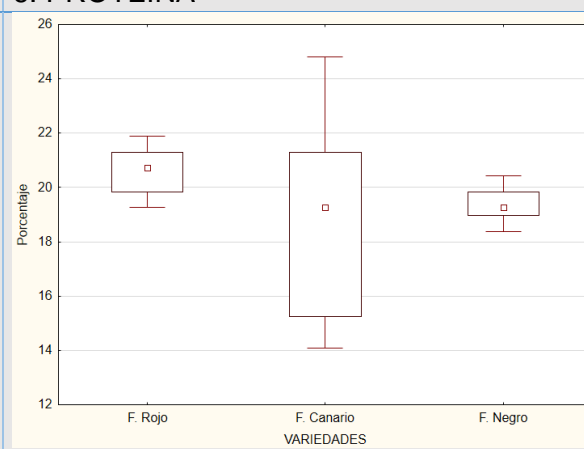
## 4. GRASA



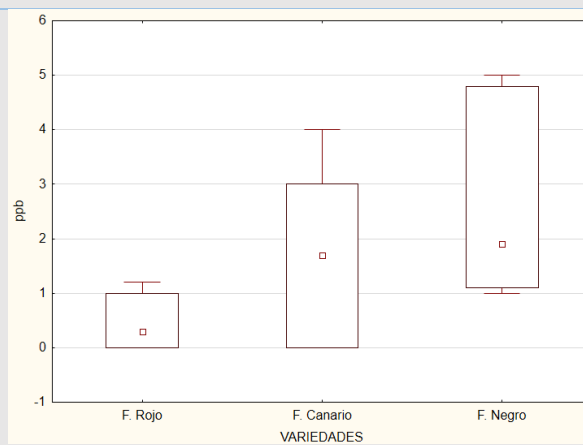
## 5. FIBRA



## 6. PROTEÍNA



## 7. AFLATOXINAS



Como se muestra en la tabla 23 según la variedad de fréjol: Negro (97,05%) demostró tener mayor materia seca con respecto a la variedad Rojo (96,77%) y Canario (96,59%); en humedad la variedad de fréjol: Negro (3,37%) tuvo el porcentaje más alto frente a la variedad Rojo (2,95%) y canario (3,16%); en ceniza y fibra la variable de fréjol: Negro (0,27% - 5,72%) tuvo mayores porcentajes respectivamente frente a la variedad Rojo (0,17% - 4,83%) y Canario (0,14% - 4,56%) con similar porcentajes respectivamente; en grasa la variedad: Canario (1,34%) tuvo mayor porcentaje frente a las variedades: Rojo (0,90%) y Canario (0,90%) cuyos porcentajes son similares; en proteína la variedad: Rojo (20,75%) tuvo el mayor porcentaje frente a la variedad Canario (18,97%) y la variedad Negro (19,32%) demuestra una relación con las dos variedades; con respecto a la concentración de Aflatoxinas totales la variedad Negro (2,61 ppb) presentó la mayor cantidad frente a la variedad Canario (1,78 ppb) y Roja (0,48 ppb).

### Prueba de significancia de Tukey del Factor B

Tabla 24

Prueba de Significancia de Tukey del Factor B (Presentación de comercialización).

Factor B (Presentación de comercialización)	Materia seca	Humedad	Ceniza	Fibra	Grasa	Proteína	Aflatoxina Totales
P1	98,95 c	1,01 a	0,30 c	6,77 b	1,61 b	20,75 b	2,01 c
P2	98,58 b	1,42 b	0,23 b	4,17 a	0,77 a	19,69 ab	1,18 a
P3	92,88 a	7,04 c	0,07 a	4,17 a	0,76 a	18,39 a	1,68 b

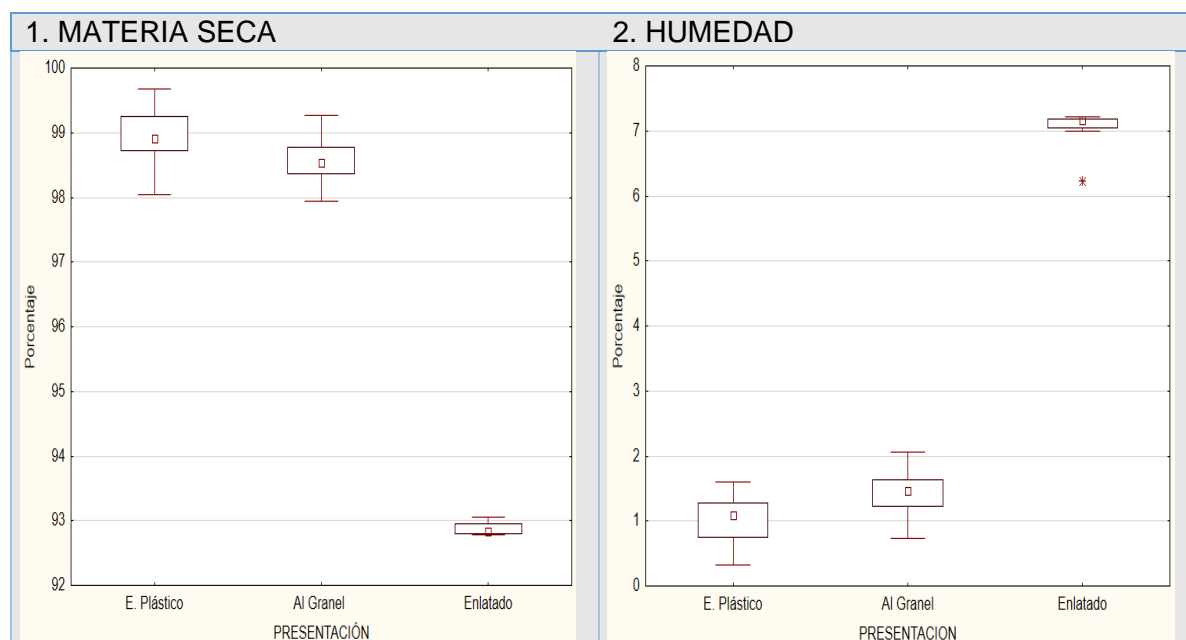
P1= Empaque plástico.

P2= Al granel

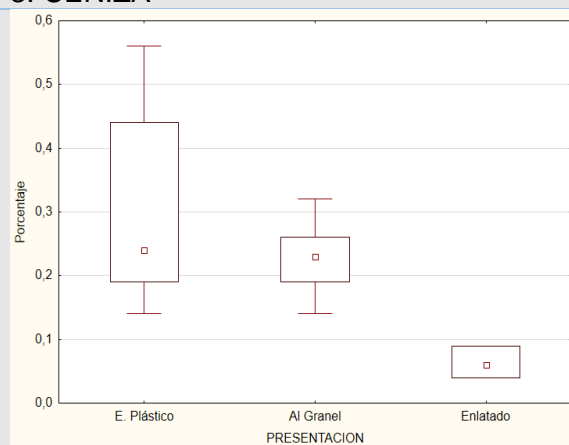
P3= Enlatado

Figura 4

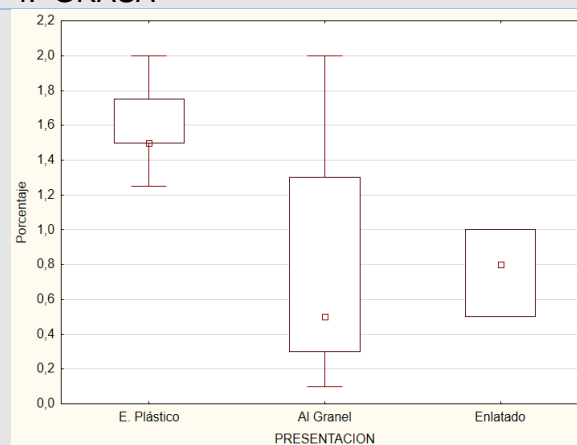
Cuadro Resumen de las Pruebas de Significancia de Tukey para el Factor B.



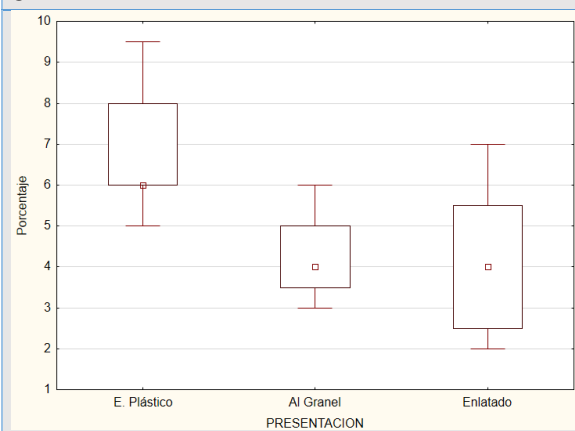
## 3. CENIZA



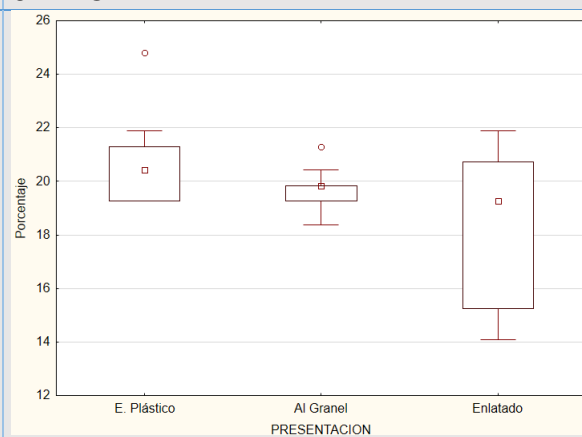
## 4. GRASA



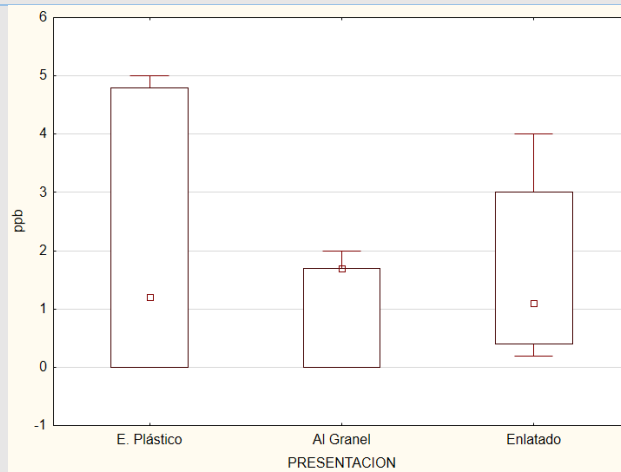
## 5. FIBRA



## 6. PROTEÍNA



## 7. AFLATOXINAS



Como se muestra en la tabla 24 según la presentación de comercialización: en empaque plástico (98,95%) demostró tener mayor materia seca con respecto a la presentación al granel (98,58%) y enlatado (92,88%); en humedad la presentación: Enlatado (7,04%) tuvo el porcentaje más alto frente a la presentación al granel (1,42%) y empaque plástico (1,01%); en ceniza la presentación: empaque plástico (0,30%) tuvo mayor porcentaje frente a la presentación al granel (0,23%) y enlatado (0,07%); en fibra y grasa la presentación: empaque plástico (6,77% - 1,61%) tuvo los mayores porcentajes respectivamente frente a las presentaciones: al granel (4,17 – 0,77%) y enlatado (4,17% - 0,76%) cuyos porcentajes son similares respectivamente; en proteína la presentación: empaque plástico (20,75%) tuvo el mayor porcentaje frente a la presentación enlatado (18,39%) y la presentación al granel (19,69%) muestra una relación con las dos presentaciones de comercialización; con respecto a la concentración de Aflatoxinas totales la presentación empaque plástico (2,01 ppb) presentó la mayor cantidad frente a la presentación enlatado (1,68 ppb) y al granel (1,18 ppb).

**Prueba de significancia de Tukey de la interacción A\*B**

**Tabla 25**

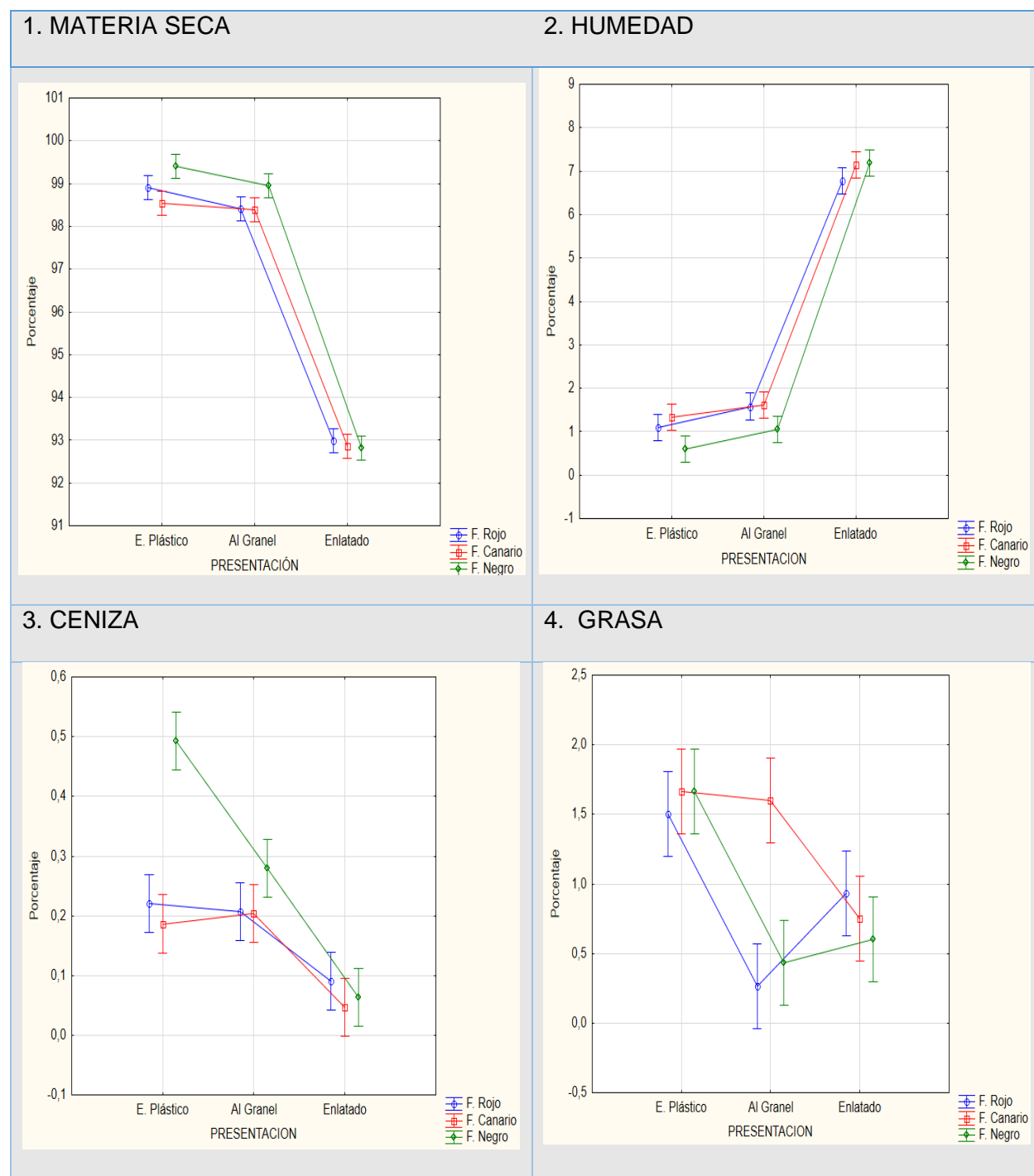
*Prueba de Significancia de Tukey de la Interacción A\*B (Variedades\*Presentación).*

<b>Variedades</b>	<b>Presentación</b>	<b>Materia seca</b>	<b>Humedad</b>	<b>Ceniza</b>	<b>Fibra</b>	<b>Grasa</b>	<b>Proteína</b>	<b>Aflatoxinas totales</b>
Fréjol Rojo	Empaque plástico	98,90 ab	1,10 bc	0,22 b	8,50 a	1,50 ab	20,62 a	1,13 d
Fréjol Rojo	Al granel	98,42 b	1,58 b	0,21 b	3,67 d	0,27 c	19,65 a	0,00 e
Fréjol Rojo	Enlatado	92,98 c	6,78 a	0,09 cd	2,33 d	0,93 bc	21,31 a	0,30 e
Fréjol Canario	Empaque plástico	98,54 b	1,34 b	0,19 bc	6,33 b	1,67 a	21,79 a	0,00 e
Fréjol Canario	Al granel	98,39 b	1,61 b	0,20 bc	3,33 d	1,60 ab	20,33 a	1,67 cd
Fréjol Canario	Enlatado	92,86 c	7,14 a	0,05 d	4,00 cd	0,75 c	14,79 b	3,67 b
Fréjol Negro	Empaque plástico	99,40 a	0,60 c	0,49 a	5,50 bc	1,67 a	19,85 a	4,90 a
Fréjol Negro	Al granel	98,94 ab	1,06 bc	0,28 b	5,50 bc	0,43 c	19,07 a	1,87 c
Fréjol Negro	Enlatado	92,81 c	7,19 a	0,06 d	6,17 b	0,60 c	19,07 a	1,07 d

Figura 5

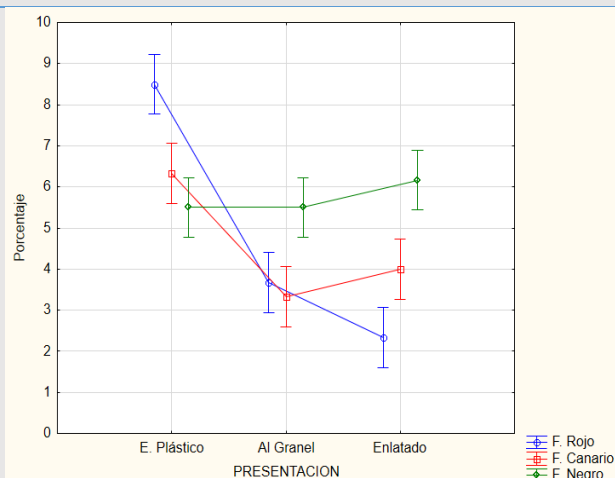
Cuadro Resumen de las Pruebas de Significancia de Tukey de la Interacción A\*B

(Variedades\*Presentación).

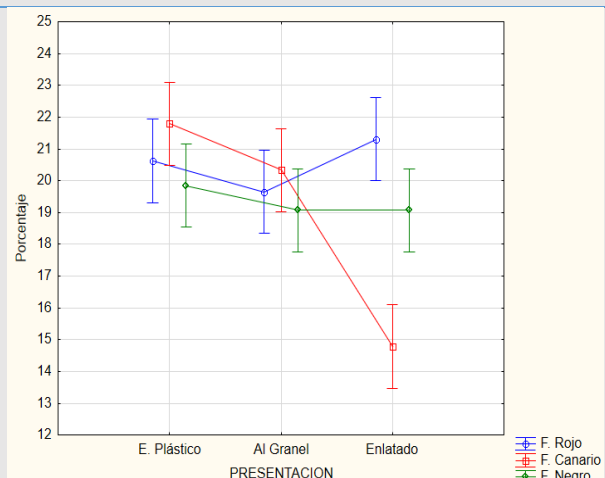




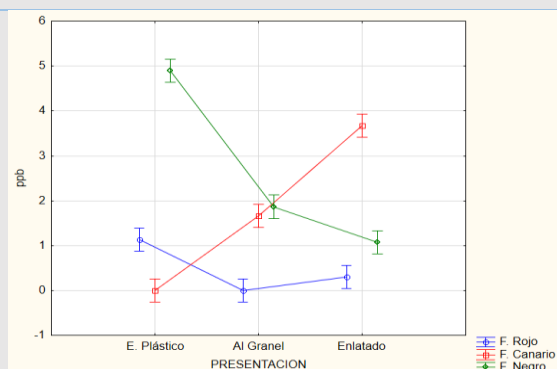
## 5. FIBRA



## 6. PROTEÍNA



## 7. AFLATOXINAS



Como se observa en la figura N° 4, la interacción A\*B, demuestra diferencia significativa para todos las variables estudio, en la variable materia seca donde la variedad de fréjol negro obtuvo los porcentajes más alto en E. plástico y Al granel con valores de 99,4% y 98,94% respectivamente, mientras que para enlatado la variedad rojo obtuvo el mayor porcentaje con 92,98 %, por lo cual se determina que hay una interacción directa entre la variedad rojo y canario con respecto al tipo de presentación al granel.

Para variable humedad la variedad canario presento los porcentajes más altos tanto en E. plástico y al granel con 1,34 % y 1,61% respectivamente, mientras para enlatados la variedad negro obtuvo 7,19 %, también se observa una interacción directa entre la variedad

rojo y canario con respecto al tipo de presentación al granel; para la variable ceniza la variedad negro presento los porcentajes más altos tanto en E. plástico y al granel con 0,49 % y 0,28 % respectivamente, mientras para enlatados la variedad rojo obtuvo 0,09 %, también se observa una interacción directa entre la variedad rojo y canario con respecto al tipo de presentación al granel y enlatado.

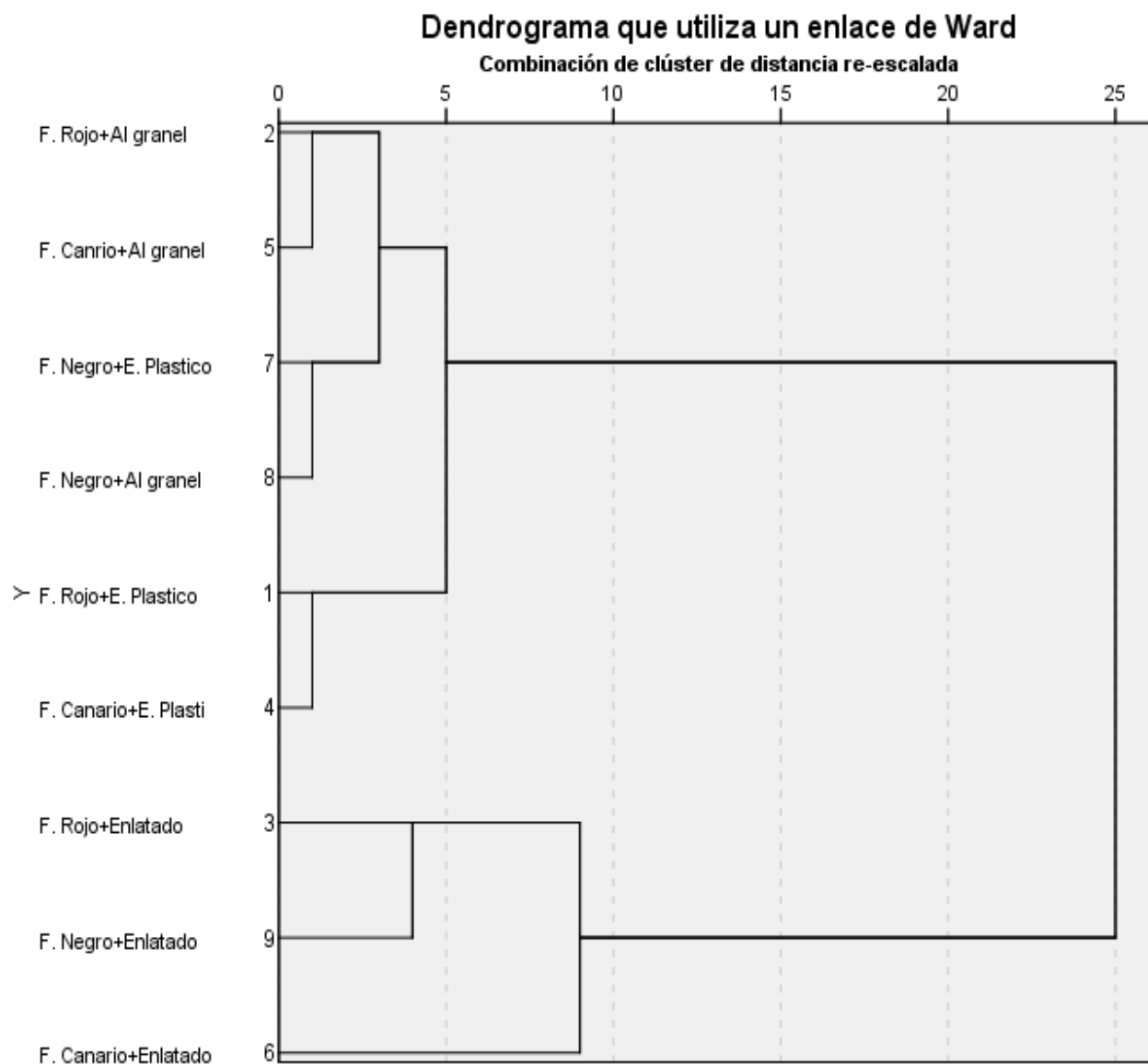
Para la variable grasa la variedad canario presento los porcentajes más altos tanto en E. plástico y al granel con 1,67 % y 1,60 % respectivamente, mientras para enlatados la variedad rojo obtuvo 0,93 %, también se observa una interacción directa entre la variedad canario y negro con respecto al tipo de presentación E. plástico, entre la variedad rojo y negro con respecto al tipo de presentación Al granel y entre la variedad rojo y canario para la presentación enlatados; para la variable fibra la variedad rojo presento el porcentaje más alto en E. plástico 8,50 % mientras en la presentación al granel y enlatados la variedad negro obtuvo 5,50 % y 6,17 % respectivamente, también se observa la interacción directa entre las tres variedades en el tipo de presentación E. plástico y también en la presentación Al granel se interceptan las variedades rojo y canario.

Para la variable proteína los niveles más alto los obtuvo la variedad la variedad canario presento los porcentajes más altos tanto en E. plástico y al granel con 21,79 % y 20,33 % respectivamente, mientras para enlatados la variedad rojo obtuvo 21,31 %, con respecto a las interacciones directa se observa entre las tres variedades y el tipo de presentación Al granel; Finalmente para la variable aflatoxinas totales demuestra que la variedad negro obtuvo los niveles más alto en la presentación E. plástico y Al granel con 4,90 ppb y 1,87 ppb respectivamente, mientras para la presentación enlatados la variedad canario obtuvo 3,67 ppb, con respecto a las interacciones directas se observa entre las variedades rojo y canario en el tipo de presentación E. plástico mientras para la presentación Al granel interceptan directamente las variedades canario y negro.

## Resultado de Análisis de Conglomerados

**Figura 6**

*Dendrograma para los Factores en Estudio.*



Según la figura N°6, se representa el estudio de variables con respecto a la aproximación que existe entre los tratamientos, donde se observa una estrecha semejanza entre el tratamiento F. Canario\*Al granel vs. F. Rojo\*Al granel, notando que el ultimo

tratamiento mencionado se asemeja al tratamiento F. Negro\*E. Plástico, donde dicha relación se da por los análisis físicos-químicos (Materia seca, Humedad, Ceniza, Grasa, Fibra, Proteína) y de aflatoxinas totales.

Los tratamientos con una relación menor que se observaron fueron F. Canario\*E. Plástico vs. F. Canario\*Enlatado, aunque sean la misma variedad de fréjol y debido a la diferencia del tipo de empaque, por lo que la humedad influye en dichos tratamientos para reducir la relación.

### Análisis de componentes principales

**Tabla 26**

*Matriz de Correlación de Componentes Principales.*

	Materia seca	Humedad	Ceniza	Grasa	Fibra	Proteína	Aflatoxinas
Materia seca	1	-1	0,795	0,399	0,373	0,442	0,046
Humedad	-1	1	-0,795	-0,407	-0,366	-0,460	-0,033
Ceniza	0,795	-0,795	1	0,403	0,250	0,291	0,484
Grasa	0,399	-0,407	0,403	1	0,305	0,449	0,228
Fibra	0,373	-0,366	0,250	0,305	1	0,152	0,031
Proteína	0,442	-0,460	0,291	0,449	0,152	1	-0,558
Aflatoxinas	0,046	-0,033	0,484	0,228	0,031	-0,558	1

La tabla N°26 muestra que existe una correlación inversa humedad y materia seca de 1 y -1, con las demás variables se indica que la ceniza esta correlacionada con materia seca y el nivel de aflatoxinas (0,795 y 0,484) respectivamente, de igual manera existe una ligera correlación entre grasa y proteína (0,449).

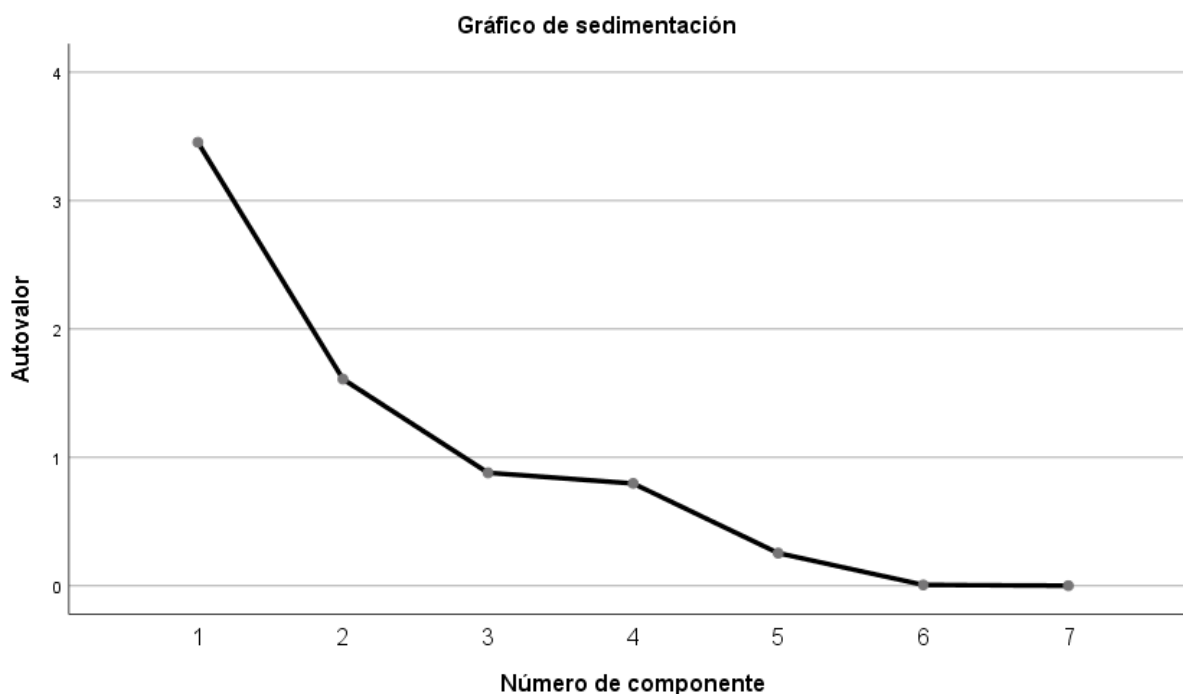
**Tabla 27**

*Matriz de componente.*

<b>Matriz de componente</b>		
	1	2
Humedad	-0,942	0,035
Materia Seca	0,939	-0,019
Ceniza	0,854	0,367
Grasa	0,624	0,028
Fibra	0,484	-0,002
Aflatoxinas	0,136	0,968
Proteína	0,560	-0,732

**Figura 7**

*Gráfico de Sedimentación del Análisis de Componentes Principales.*



La figura N°7 muestra la evolución de las 7 variables con respecto a la varianza total explicada, la humedad obtuvo el mayor porcentaje de varianza, siendo 49,34 %, con respecto al componente 2 (materia seca) el porcentaje fue de 22,99 %, por otro lado, el resto de los componentes obtuvieron valores de varianza menor a 1.

**Figura 8**

*Gráfico de Componente en Espacio Rotado.*



Tal como se muestra en la figura 8 el componente en espacio rotado muestra correlación entre grasa y fibra, al igual que ceniza y materia seca, pero en menor similitud, esto de acuerdo al componente 1, tomando en cuenta que están en el eje positivo, al igual que el componente 2 no existe similitud, de humedad, proteína y aflatoxinas, tomando en consideración que la correlación es inexistente.

## CAPITULO V

### Discusiones

#### Con Respecto al Factor A (Variedades)

Para las variedades estudiadas, se obtuvo el porcentaje de humedad en la variedad de fréjol: Negro 3,37%, tuvo el porcentaje más alto frente a la variedad Rojo 2,95% y canario 3,16%, este porcentaje es menor al que nos indica el NTE INEN 1561(13%), debido a las condiciones iniciales del fréjol, además la (FAO, 1993), nos menciona que mientras menor sea el contenido de humedad, mayor será el tiempo de almacenamiento y conservación de su calidad.

En el contenido de materia seca el fréjol: Negro con un 97,05% demostró tener mayor materia seca con respecto a la variedad Rojo 96,77% y Canario 96,59% datos similares a los expuestos por (Guzman, 2012).

En la determinación de ceniza y fibra la variable de fréjol: Negro obtuvo (0,27% - 5,72%) siendo los mayores porcentajes respectivamente frente a la variedad Rojo (0,17% - 4,83%) y Canario (0,14% - 4,56%) con similares porcentajes respectivamente, según (Henriquez, 2014) los valores correspondientes estan dentro del rango mencionado en ceniza (0,1% - 1%) y fibra (3 – 5%).

En cuanto a la grasa la variedad: Canario obtuvo 1,34% siendo el mayor porcentaje frente a las variedades: Rojo 0,90% y Negro 0,90%, comprobando así lo que nos menciona (Sanchez, 2017) en su estudio en donde se obtuvo un rango de grasa (0.48%- 1,64%).

Los valores obtenidos en proteína la variedad Rojo apporto el 20,75% siendo el mayor porcentaje frente a la variedad Canario con 18,97% y la variedad Negro 19,32%, (Mahajan, 2015) realizó un estudio del contenido de proteína de 51 variedades de fréjol, determinando un promedio de 20,30%; por lo tanto, los resultados obtenidos son cercanos al promedio mencionado.

Con respecto a la concentración de Aflatoxinas en el Ecuador no contamos con ninguna regulación que ayude a controlar estos niveles de contaminación, en nuestro ensayo la variedad Negro obtuvo 2,61 ppb presentó la mayor cantidad frente a la variedad Canario 1,78 ppb y Roja 0,48 ppb, la FDA (Food and Drug Administration) establece que el nivel máximo permitido para aflatoxinas totales es de 20 ppb, por lo tanto, nuestros resultados están dentro del rango permitido.

### **Con Respecto al Factor B (Presentación de Comercialización).**

En cuanto a la humedad la presentación Enlatado obtuvo 7,04% con el porcentaje más alto frente a la presentación al granel 1,42% y empaque plástico 1,01%; (Pescador, 2010) reporta un intervalo de 8,87% a 9,19% en fréjol enlatado, por lo que nuestro resultado se acerca a los datos mencionados.

Para la variable materia seca el mayor porcentaje fue el empaque plástico 98,95% seguido la presentación al granel 98,58% y enlatado 92,88%, no se encuentra información sobre materia seca requerido para el envasado de fréjol.

Con respecto a la ceniza la presentación: empaque plástico 0,30% tuvo mayor porcentaje frente a la presentación al granel 0,23% y enlatado 0,07%, según (Carmona, 2007) menciona que el contenido de cenizas puede variar dependiendo de las características del suelo del cultivo así como de la genética del cultivar.

En fibra y grasa la presentación: empaque plástico 6,77% - 1,61% tuvo los mayores porcentajes respectivamente frente a las presentaciones: al granel 4,17% – 0,77% y enlatado 4,17% - 0,76% cuyos porcentajes son similares respectivamente, Pescador (2010) en su estudio obtuvo un intervalo en grasa de (0.92% a 1.71%) asemejándose a los resultados de nuestro ensayo.

Para la variable proteína la presentación: empaque plástico 20,75% tuvo el mayor porcentaje frente a la presentación enlatado 18,39% y la presentación al granel 19,69%, Carmona (2007) reporta valores de 18.9% y 24.2%, datos que coinciden con nuestro estudio.



Con respecto a la concentración de Aflatoxinas totales la presentación empaque plástico con 2,01 ppb presentó la mayor cantidad frente a la presentación enlatado 1,68 ppb y al granel 1,18 ppb, como nos mencionan (Bogantes & Ledezma, 2004) que la presencia de aflatoxinas esta ligada directamente a las condiciones de almacenamiento inadecuadas.

#### **Con Respecto a la Interacción A\*B (Variedades\*Presentación).**

En cuanto a la humedad, el mejor resultado se obtuvo la interacción Fréjol Negro-Enlatado con 7,19 %, mientras que la interacción Fréjol Negro-Empaque plástico fue el tratamiento que presentó el contenido más bajo de humedad con 0,60%, las normas INEN 1561 establecen un rango (13%).

Para la variable ceniza la interacción Fréjol Negro–Empaque plástico presentó el porcentaje más alto con 0,49% respectivamente, mientras para la interacción con menor porcentaje fue Fréjol Negro-Enlatado se obtuvo 0,06 %, (Garcia, 2019), nos menciona que el fréjol enlatado tiene una disminución de ceniza debido a la perdida de minerales solubles por el proceso de coccion.

Con respecto a la variable materia seca el mejor resultado se obtuvo con la interacción Fréjol Negro-Empaque plástico con 99,4%, mientras que para la interacción Fréjol Negro-Enlatado se obtuvo el menor porcentaje con 92,98 %.

Para la variable grasa la interacción Fréjol Canario-Empaque plástico y la interacción Fréjol Negro – Empaque plástico presento los porcentajes más altos con 1,67 % respectivamente, para la interacción Fréjol Rojo- Granel se obtuvo 0,27 %, coincidiendo lo que nos menciona (Shagardsky, 2013) que el contenido de grasa en fréjol es de 0.9%.

Con respecto a la variable fibra el mejor resultado se obtuvo en la interacción Fréjol rojo-Empaque plástico con 8,50 %, seguido de la interacción Fréjol Negro-Enlatado con 6.17 % y el valor más bajo se obtuvo del Fréjol Negro-Al granel con 5,50%.

En proteína los niveles más alto los obtuvo la interacción Fréjol Canario-Empaque plástico con 21,79 %, mientas que el menor porcentaje se registró en la interacción Fréjol

Canario-Enlatado con 14,79 %. Garcia (2019), nos menciona que el contenido de proteína en fréjol esta en un rango de (22,42 – 23%).

En cuanto a Aflatoxinas totales, el mejor resultado se obtuvo en la interacción Fréjol Rojo-Enlatado (0,30 ppb), mientras el nivel más alto se registró en la interacción Fréjol Negro – Empaque Plástico (4,90 ppb), de acuerdo a los datos, todas las muestras de fréjol en presentación enlatados presentaron los niveles más bajo de aflatoxinas totales, debido al proceso del mismo que agrupa parámetros de calidad sobre la materia prima, las cuales definen granos enteros excepto de cualquier patógeno o impurezas y más de esos las pruebas para que un lote sea aceptado para el consumo según las normas INEN 2336.

## CAPITULO VI

### Conclusiones y Recomendaciones

#### Conclusiones

##### ***Con Respecto al Factor A (Variedades).***

- La humedad en las variedades no supera el 4%, por lo que ayuda al almacenamiento prolongado y conservación de su calidad, con un porcentaje que supere el 17% existe más posibilidades de crecimiento de hongos y bacterias.
- En cuanto la composición química se observa que las variedades estudiadas reflejan variación en cada resultado obteniendo así; que la variedad Negro tiene mayor contenido de ceniza y fibra ((0,27% - 5,72%); la variedad Canario presenta mayor contenido de grasa (1,34%); y la variedad Rojo demuestra mayor contenido de proteína (20,75%).
- La variedad Negro presentó la mayor cantidad de aflatoxinas con un total de 2,61 ppb y con un porcentaje alto de humedad de 3,37%, por lo que es más idóneo al ataque de hongos del género *Aspergillus*.

##### ***Con Respecto al Factor B (Presentación de Comercialización).***

- La humedad con respecto al tipo de presentación es mayor en el de enlatado con (7,04%), debido al manejo de conservación de los fréjoles precocinados ya que una de las normas de su envasado debe tener un 90% de contenido acuoso, sin que afecte al contenido nutricional o presencia de aflatoxinas totales.
- Se determino que los granos de fréjol comercializados en la presentación al granel tuvieron un nivel menor sobre aflatoxinas totales (1,18 ppb), mientras que el nivel más alto los obtuvo la presentación de empaque plástico (2,01 ppb), consideran un mal manejo al acondicionar la muestra al tipo de empaque.

- La presentación de comercialización en empaque plástico presento una mejor composición química con respecto al análisis bromatológico según el contenido de ceniza, fibra, grasa y proteína (0,30%; 6,67%; 1,61% y 20,75%) respectivamente.

***Con Respecto a la Interacción A\*B (Variedades\*Presentación).***

- En la interacción Fréjol rojo-enlatado presento mayor contenido de humedad con (6,78 %) encontrado en el rango permitido por la norma NTE INEN 1561 para granos de fréjol con el 13%.

- Con respecto a la composición química la interacción fréjol rojo-Empaque plástico presento mayor porcentaje para Fibra y Proteína (8,5% y 20,62%) respectivamente, mientras que la interacción Fréjol negro-Empaque plástico obtuvo en Ceniza y Grasa (0,49% y 1,67) respectivamente.

- Con respecto a los niveles de Aflatoxinas totales la interacción de Fréjol rojo-Empaque plástico fue la que demostró menor nivel de presencia de aflatoxinas con 0,30 ppb, mientras que los niveles más altos con 4,90 ppb los obtuvo la interacción Fréjol Negro-Empaque plástico.

**Recomendaciones**

- Realizar una adecuada recolección y manejo de postcosecha del fréjol, ya que el consumo de fréjol por parte de los ecuatorianos involucra un periodo de cocción, sin tomar importancia de que el grano cosechado este en malas condiciones con color negruzco o presencia de moho, lo que pudiera indicar presencia de aflatoxinas que trascenderá en la salud del consumidor.

- Consumir el fréjol Rojo en la presentación Enlatadas y empaques plásticos ya que en el estudio demostraron los valores más alto con respecto a proteína y fibra.

- con respecto al consumo del fréjol Negro, mantener una mayor precaución al momento del consumo ya que la cubierta del grano es demasiado delgada lo que permite una mayor susceptibilidad frente a los hongos del género *Aspergillus* y así reducir el riesgo alimentario.

- Tomar mayor control sanitario de parte de las instituciones reguladoras sobre el manejo y almacenamiento de granos de fréjol destinados al consumo humano, ya que no existe límites permitidos sobre cargas fúngicas o estado de comercialización sobre fréjol.

## CAPITULO VII

### Bibliografía

- AECOSAN. (29 de Julio de 2015). *Aflatoxinas*. Obtenido de Ministerio de seguridad servicios sociales e igualdad :  
[http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/gestion\\_riesgos/Aflatoxinas\\_ficha\\_JUL15.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/Aflatoxinas_ficha_JUL15.pdf)
- Bogantes, P., & Ledezma, D. (2004). *Scielo*. Obtenido de  
[https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-60022004000400004](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022004000400004)
- Bolaños, E. (2011). *Evaluación de las características físico químicas en frijol (Phaseolus vulgaris) variedad; Pinto Saltillo de dos periodos 2009 y 2010*. Buenavista, Saltillo Coahuila, México: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO.
- Carmona, R. (23 de 02 de 2007). Obtenido de  
<https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2621.2006.01218.x>
- CIMA. (2016). *Centro de informacion de mercados agroalimentarios*. Obtenido de  
[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/185452/revista\\_271.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/185452/revista_271.pdf)
- Cruz, R., & Melendez, C. (2004). *"OBTENCION, REFINACION Y CARACTERIZACION DEL ACEITE DE LA SEMILLA DE Passiflora edulis flavicarpa (MARACUYA)"*. SAN SALVADOR- EL SALVADOR: UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.
- De Garcia, M. (2015). *Guía para el Análisis Bromatológico de Muestras de Forrajes*. Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad de Panamá.
- FAO. (1993). Obtenido de <http://www.fao.org/3/X5027S/x5027S00.htm#Contents>
- Francisco, S. (21 de 06 de 2011). *JP-Selecta*. Obtenido de <http://www.grupo-selecta.com/notasdeaplicaciones/analisis-alimentarios-y-de-aguas-nutritional-and-water-analysis/determinacion-de-proteinas-por-el-metodo-de-kjeldahl-kjeldahl-method-for-protein-determination/>
- Garcia, A. (2019). *Universidad Autónoma de Nuevo León*. Obtenido de  
<http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume4/4/1/11.pdf>
- Gonzalez, D., & Garduño, F. (2016). *"CALIDAD BROMATOLÓGICA DE LÍNEAS AVANZADAS DE TRIGO (Triticum aestivum L.) EVALUADAS EN TRES LOCALIDADES DEL VALLE DE TOLUCA"*. TOLUCA, MÉXICO: "CAMPUS UNIVERSITARIO "EL CERRILLO PIEDRAS BLANCAS".
- Guzman, V. (2012). *Repositorio PUCE*. Obtenido de  
<http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/5078/T-PUCE-5302.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Henriquez. (2014). *Universidad del Salvador*. Obtenido de  
<http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/5611/1/16103422.pdf>

- Henriquez, F. (2014). *Comparacion de calidad culinaria y del analisis bromatológico proximal de la especie Phaseolus vulgaris L. (FRIJOL COMUN) variedad Chaparrastique y la importada de China*. Obtenido de Comparacion de calidad culinaria y del analisis bromatológico proximal de la especie Phaseolus vulgaris L. (FRIJOL COMUN) variedad Chaparrastique y la importada de China. Licenciatura thesis, Universidad de El Salvador.: <http://ri.ues.edu.sv/5611/>
- Heredia, M. (26 de 09 de 2017). *Scribd*. Obtenido de <https://es.scribd.com/document/359901763/Materia-Grasa-y-Acidez>
- López, S. (2010). *Explotación de la nueva variación genética y mejora genética del complejo de Phaseolus vulgaris L.* . Obtenido de [http://agris.fao.org/agris-search/search.do;jsessionid=60B85F693C1659E07651A9E4270DBBF2?request\\_locale=es&recordID=QC2010600023&sourceQuery=&query=&sortField=&sortOrder=&agrovocString=&advQuery=&centerString=&enableField=](http://agris.fao.org/agris-search/search.do;jsessionid=60B85F693C1659E07651A9E4270DBBF2?request_locale=es&recordID=QC2010600023&sourceQuery=&query=&sortField=&sortOrder=&agrovocString=&advQuery=&centerString=&enableField=)
- Mahajan, R. (2015). Evaluation of Iron, Zinc, and Protein Contents of Common Bean (Phaseolus). *Bio Publisher*, 7.
- Maluf, R. (2009). *Seguridad alimentaria y nutricional : un enfoque de derecho y soberanía*. Obtenido de Quito, Ecuador : CAFOLIS: <https://searchworks.stanford.edu/view/8488111>
- NEOGEN. (2017). Obtenido de [http://foodsafety.neogen.com/pdf/procedures/8035\\_pro.pdf](http://foodsafety.neogen.com/pdf/procedures/8035_pro.pdf)
- Ornelas, J., & Fimbres, A. (2015). *AFLATOXINAS Y SU ASOCIACIÓN CON EL DESARROLLO DE CARCINOMA HEPATOCELULAR*. Mexico: CIMEL.
- Ortiz, S. (2009). *DETECCIÓN DE AFLATOXINA M1, EN LECHES FRESCAS COMERCIALIZADAS EN LA ZONA DEL VALLE DEL CAUCA (COLOMBIA) MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA*. Obtenido de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8204/tesis202.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Peralta, E. (2014). *PROGRAMA NACIONAL DE LEGUMINOSAS Y GRANOS ANDINOS (PRONALEG-GA) ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA-INIAP*. Obtenido de <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/4589/1/Cat%C3%A1logo%20de%20variedades%20mejoradas%20de%20fr%C3%A9jol%20arbustivo%20para%20los%20valles%20y%20estribaciones%20de%20la%20sierra%20ecuatoriana.pdf>
- Pescador, F. (28 de 05 de 2010). *IXX Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimento*. Obtenido de [https://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icbi/LI\\_FisicAlim/Carlos\\_Aldapa/4.pdf](https://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icbi/LI_FisicAlim/Carlos_Aldapa/4.pdf)
- Pinargote, G. L. (2015). *UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO*. Obtenido de <http://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/1488/1/T-UTEQ-0151.pdf>
- Rendon, N. (2007). *Determinación de la presencia del gen codificador de la aflatoxina producida por Aspergillus flavus en la astaña Bertholletia excelsa mediante la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)*. Obtenido de <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/3553/T-1727.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Sáez, A. C. (18 de Mayo de 2011). *Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición en relación al efecto sobre la población española de la derogación de la normativa nacional sobre límites máximos permitidos para las aflatoxinas B1, B2, G1, G2.*
- Sanchez, E. (2017). *Scielo*. Obtenido de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-07052017000100133](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-07052017000100133)
- Serrano, J. (2004). *Papel del frijol negro Phaseolus vulgaris en el estado nutricional de la población guatemalteca*. Obtenido de [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222004000100006](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000100006)
- Shagarodsky, T. (2013). *Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical*. Obtenido de [http://www.actaf.co.cu/revistas/revista\\_ao\\_95-2010/Rev%202013-2/04frijolmambi.pdf](http://www.actaf.co.cu/revistas/revista_ao_95-2010/Rev%202013-2/04frijolmambi.pdf)
- Ulloa, A. (8 de Julio de 2011). *El frijol (Phaseolus vulgaris): su importancia nutricional*. Obtenido de <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-08/1.pdf>
- UNAM. (2008). *Fundamentos y técnicas de análisis de alimentos*. Obtenido de LABORATORIO DE ALIMENTOS I: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/FUNDAMENTOSYTECNICASDEANALISISDEALIMENTOS\\_12286.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/FUNDAMENTOSYTECNICASDEANALISISDEALIMENTOS_12286.pdf)
- UNAM. (2008). *Fundamentos y Tecnicas de Analisis de Alimentos*. Obtenido de Departamento de alimentos y biotecnología: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/FUNDAMENTOSYTECNICASDEANALISISDEALIMENTOS\\_12286.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/FUNDAMENTOSYTECNICASDEANALISISDEALIMENTOS_12286.pdf)
- Vallejo. (9 de Enero de 2012). *DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS B1, B2, G1 Y G2 HARINA DE MAÍZ DEL SECTOR TUMBACO MEDIANTE EL USO DE COLUMNAS DE INMUNOAFINIDAD (IAC) Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)*. Obtenido de <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/5013/2/T-ESPE-033049-A.pdf>
- Vallejo, M. (09 de Enero de 2012). *DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS B1, B2, G1 Y G2 HARINA DE MAÍZ DEL SECTOR TUMBACO MEDIANTE EL USO DE COLUMNAS DE INMUNOAFINIDAD (IAC) Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)*. Obtenido de <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/5013/T-ESPE-033049.pdf?sequence=1&isAllowed=y>