



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA (PROPAC)

“ELABORACIÓN Y EVALUACIÓN NUTRIMENTAL, NUTRACÉUTICA Y SENSORIAL DE UN YOGURT Y UNA BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA CON LA ADICIÓN DE POLISACÁRIDOS DE FRIJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.)”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS

Presenta

IQ. ALDRIN CRUZ PORRAS

Dirigida por:

DRA. MA. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA

SINODALES

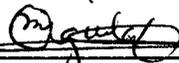
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Presidente

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Secretario

Dra. Clara Escamilla Santana  
Vocal

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz  
Suplente

Dr. Eduardo Castaño Tostado  
Suplente

  
Q.B. Magali Aguilar Ortiz  
Director de la Facultad

  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Dr. Luis G. Hernández Sandoval  
Director de Investigación y  
Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Octubre, 2009  
México

## RESUMEN

Actualmente los productos lácteos fermentados cuentan con una gran aceptación por la población, ya que son considerados además de alimentos con un contenido básico de nutrientes, con algunos efectos benéficos a la salud. El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es considerado un alimento nutracéutico por su contenido de compuestos fenólicos (taninos condensados y flavonoides) y polisacáridos (fibra soluble e insoluble, almidón resistente y oligosacáridos) implicados con la prevención de enfermedades crónico degenerativas. El objetivo de este trabajo fue elaborar y evaluar el potencial nutrimental, nutracéutico y sensorial de un yogurt y una bebida láctea fermentada con adición de polisacáridos de frijol común cocido. Se obtuvieron dos EP con diferente tamaño de partícula (EP1 y EP2) y se les determinó el contenido de taninos condensados, flavonoides totales, fibra total y capacidad antioxidante. El EP1 (tamaño de partícula  $\leq 149 \mu\text{m}$ ) de la variedad Negro 8025 fue elegida por presentar el mayor contenido de taninos condensados ( $10.03 \pm 0.70$  mg equivalentes de (+)-catequina/g muestra) y flavonoides totales ( $0.30 \pm 0.01$  mg equivalentes de rutina/g muestra). La adición del EP1 al yogurt y a la bebida, incrementó de manera dosis-dependiente el contenido de taninos condensados ( $4.4 - 13.0 \mu\text{g}$  equivalentes de (+)-catequina/g muestra para la bebida y  $13 - 52 \mu\text{g}$  equivalentes de (+)-catequina/g muestra para el yogurt), contenido de fibra total ( $0.08 - 0.75\%$  para la bebida y  $0.34 - 3.24\%$  para el yogurt), así como la capacidad antioxidante *in vitro* (ABTS y DPPH) con respecto al yogurt y bebida control (sin EP1). El yogurt adicionado con 1.7% del EP1 en los sabores fresa y café y la bebida sabor manzana adicionadas con el EP1 a las concentraciones de 0.6% y 1.2% presentaron el mayor nivel de agrado y preferencia por los consumidores. Los resultados sugieren que la adición del EP1 permitirá proponer la elaboración de productos enriquecidos con fibra y con cantidades de taninos condensados aceptables, ya que una ración de 300 g de yogurt o bebida aportaría entre el 5 - 30% de fibra total y 0.3 - 1.5% de compuestos fenólicos totales de la ingesta diaria recomendada.

**(Palabras clave:** Extracto de polisacáridos (EP1), fibra dietética, capacidad antioxidante, frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), yogurt, bebida).

## SUMMARY

Nowadays fermented milk products are highly accepted by population, since they are considered beside having basic food nutrient content, with some beneficial effects on health. The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is considered a nutraceutical food for their content of phenolic compounds (condensed tannins and flavonoids) and polysaccharides (soluble and insoluble fiber, resistant starch and oligosaccharides) involved with the prevention of chronic degenerative diseases. The aim of this study was to develop and assess the potential nutritional, nutraceutical and sensory quality of a yogurt and a fermented milk drink containing polysaccharides of cooked common beans. Two EP were obtained with different particule size (EP1 and EP2) and the content of condensed tannins, total flavonoids, total fiber and antioxidant capacity was determined. The EP1 (particle size  $\leq 149 \mu\text{m}$ ) of the Negro 8025 cultivar was chosen for presenting the highest content of condensed tannins ( $10.03 \pm 0.70$  mg equivalent of (+)-catechin / g sample) and total flavonoids ( $0.30 \pm 0.01$  mg equivalent routine / g sample). The addition of the EP1 to yogurt and drink, increased in a dose-dependent the content of condensed tannins (4.4 - 13.0 mg equivalent of (+)-catechin / g sample for the drink and 13 to 52 mg equivalent of (+)-catechin / g sample for the yogurt), the total fiber (0.08 - 0.75% for the drink and 0.34 - 3.24% for the yogurt) and the antioxidant capacity *in vitro* (ABTS and DPPH) with respect to the control yogurt and the drink (without EP1). The yogurt added with 1.7% of EP1 in strawberry and coffee flavors and drink apple flavor added with the EP1 to concentrations of 0.6% and 1.2% had the highest level of satisfaction and preference of consumers. Results suggest that the addition of the EP1 allow to propose the development of products fortified with fiber and acceptable quantities of condensed tannins, as a ration of 300 g of yogurt or drink would provide between 5 - 30% of total fiber and 0.3 - 1.5 % of total phenolic compounds of the recommended daily intake.

**(Keywords:** polysaccharide extract (EP1), dietary fiber, antioxidant capacity, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), yogurt, drink).

## DEDICATORIAS

A mis padres

Rufina Porras Gómez y Félix Cruz Hernández

Este logro se los debo a ustedes que siempre me enseñaron con su ejemplo, que para lograr lo que se desea en este mundo se requiere de decisión, empeño, fuerza, coraje y fe, por estar siempre conmigo, que sin esperar nada a cambio depositaron en mí su confianza, amor y apoyo incondicional de siempre.

Muchas gracias...

A mis hermanos

Daniel y Aaron

Porque siempre han estado conmigo compartiendo tantas experiencias, situaciones difíciles y momentos llenos de alegría.

A Érica Talavera

Por permitirme ser parte de tu vida, por escucharme, comprenderme y apoyarme siempre, gracias porque juntos hemos pasado tantos momentos llenos de amor y felicidad.

A mis amigos del Propac:

Que nos apoyamos mutuamente: Magda, Susy, Melina, Miguel Eduardo, Fanny, Jacqueline, Elisa, Sarys, por su confianza, apoyo recibido y tantos momentos compartidos. Siempre los recordare.

A mis compañeros y amigos del laboratorio:

Gely, Raquel, Hayde, Rocío, Marcelo, Anita, Nataly, Violeta, por su amistad, por su gran apoyo brindado e instantes vividos.

A mis amigos de la licenciatura:

Caro y Porfirio quienes me han brindado su amistad siempre en todo momento.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la universidad Autónoma de Querétaro por ofrecerme y brindarme la oportunidad de estudios de maestría y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada y por el financiamiento otorgado al proyecto.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Estación Bajío (INIFAP, Celaya) por la donación de las variedades de frijol común utilizadas en este proyecto.

Al CINVESTAV unidad Juriquilla, Querétaro, Dr. Juan de Dios Figueroa, Juan Vélez y Marce por su ayuda en la realización del análisis proximal.

A la Dra. Flavia Loarca por su tiempo, apoyo y confianza brindada, así como por sus sabios consejos y orientación otorgada para la realización del presente trabajo de investigación.

A las Dras. Silvia Amaya y Sandra Mendoza por proporcionarme su ayuda, despejar mis dudas y por su gran aporte a este trabajo.

A la Dra. Clara Escamilla por sus consejos y apoyo brindado durante la etapa de evaluación sensorial.

Al Dr. Eduardo Castaño por todos sus comentarios y valiosas observaciones para mejorar la presente investigación.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE CUADROS	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1. FRIJOL COMÚN	2
2.1.1. Generalidades	2
2.1.2. Composición química	3
2.2. COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL FRIJOL	5
2.2.1. Compuestos fenólicos	6
2.2.2. Fibra dietética	12
2.3. PRODUCTOS LÁCTEOS FERMENTADOS	22
2.3.1. Productos lácteos fermentados enriquecidos con fibra	24
2.5. EVALUACIÓN SENSORIAL	25
III. JUSTIFICACIÓN	27
IV. HIPÓTESIS	27
V. OBJETIVOS	28
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	29
6.1. MATERIALES	30
6.1.1. Materia prima	30
6.1.2. Reactivos	30
6.2. METODOS	31
6.2.1. Extracción de polisacáridos de frijol común cocido	31
6.2.1. Molienda y tamizado del EP	32
6.2.2. Proceso de elaboración de yogurt batido y bebida láctea fermentada con adición del EP	32

6.2.2. Cuantificación de compuestos fenólicos en EP, yogurt y bebida	34
6.2.3. Determinación de capacidad antioxidante en EP, yogurt y bebida	36
6.2.4. Análisis proximal en EP, yogurt y bebida láctea fermentada	37
6.2.5. Cuantificación de sólidos totales en yogurt y bebida	43
6.2.6. Cuantificación de acidez en yogurt y bebida	43
6.2.7. Determinación de pH en yogurt y bebida	44
6.2.8. Medición de viscosidad en yogurt y bebida	44
6.2.9. Determinación de sinéresis en yogurt y bebida	44
6.2.10. Determinación de sedimentación en yogurt y bebida	45
6.2.11. Evaluación sensorial	46
6.2.12. Análisis estadístico	48
<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	<b>49</b>
VII.1. Rendimiento de polisacáridos de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cocido	49
VII.2. Contenido de taninos condensados y flavonoides totales en el extracto de polisacáridos (EP)	50
VII.3. Fibra soluble, insoluble y total en la fracción EP1 y EP2	53
VII.4. Contenido de grasa, cenizas, humedad y proteína en EP1	55
VII.5. Capacidad antioxidante en EP1	56
VII.6. Yogurt batido y bebida láctea fermentada con adición del EP1	57
VII.6.1. Formulación del yogurt batido y bebida láctea fermentada	58
VII.6.2. Tiempos y temperaturas de Pasteurización	59
VII.6.3. Sólidos totales, pH y acidez	63
VII.6.4. Contenido de taninos condensados	65
VII.6.5. Contenido de fibra	66
VII.6.6. Capacidad antioxidante en yogurt y bebida con adición del EP1	68
VII.7. Evaluación sensorial	69
VII.7.1. Primera etapa. Prueba de ordenamiento de 4 sabores utilizados en yogurt y bebida con adición del EP	69

VII.7.2. Segunda etapa. Nivel de agrado y prueba de ordenamiento de yogurt y bebida con adición del EP1	70
VII.8. Contenido de grasa, proteína, cenizas, humedad del yogurt y bebida con adición del EP1 y sabor	72
VIII. CONCLUSIONES	75
IX. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	76
X. ANEXOS	85

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Estructura química de compuestos fenólicos y flavonoides	7
2.	Celobiosa, unidad repetitiva de la celulosa (Badui, 1993).	14
3.	Estructura química (a) y gelificación de la pectina (b)	15
4.	Estructura química de la goma guar	15
5.	Estructura química de los galactosacáridos	16
6.	(a), enrollamiento helicoidal de la amilosa; (b), estructura química de la amilopectina	17
7.	Fermentación bacteriana de la fibra	20
8.	Estrategia experimental.	29
9.	Proceso de elaboración de yogurt y bebida	33
10.	1. Curva de calibración de taninos condensados expresados como mg equivalentes de (+)-catequina.	85
11.	2. Curva de calibración de flavonoides totales expresados como $\mu\text{g}$ equivalentes de rutina.	85
12.	3. Curva de calibración de capacidad antioxidante <i>in vitro</i> por el método ABTS.	86
13.	4. Curva de calibración de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> por el método DPPH.	86

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Características químicas y nutrimentales del frijol común.	4
2.	Clasificación de la fibra de acuerdo a su solubilidad en agua y su fermentación en colon.	18
3.	Contenido de polisacáridos de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cocido.	49
4.	Rendimiento de tamizaje del extracto de polisacáridos de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cocido con tamaño de partícula $\leq$ 149 micras.	50
5.	Contenido de compuestos fenólicos (taninos condensados y flavonoides totales) en el EP de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cocido.	51
6.	Contenido de fibra insoluble, soluble y total en extracto de polisacáridos de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cocido con tamaño de partícula $\leq$ 149 $\mu$ m (EP1).	53
7.	Contenido de fibra insoluble, soluble y total en extracto de polisacáridos de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cocido con tamaño de partícula $>$ 149 $\mu$ m (EP2).	54
8.	Contenido de grasa, cenizas, humedad, proteína y carbohidratos en EP1.	55
9.	Capacidad antioxidante en EP1 por método DPPH y ABTS	56
10.	Formulación del yogurt batido con adición del EP1.	58
11.	Formulación de la bebida láctea fermentada con Adición del EP1.	59
12.	Valores de viscosidad, sinéresis y sedimentación del yogurt y bebida láctea fermentada con adición del EP1 utilizando 2 condiciones de pasteurización.	60
13.	Sólidos totales (ST), pH y acidez en bebida láctea fermentada con adición del EP1 de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cocido de la variedad Negro 8025.	63
14.	Cuadro Sólidos totales, pH y acidez en yogurt batido con adición del EP1 de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cocido de la variedad Negro 8025.	63
15.	Cuadro Contenido de taninos condensados en bebida láctea fermentada y yogurt con adición del extracto de polisacáridos (EP1) de frijol cocido de la variedad Negro 8025.	65
16.	Cuadro Contenido de fibra insoluble, soluble y total en yogurt batido con adición de extracto de polisacáridos (EP1) de frijol cocido de la variedad Negro 8025.	66

17.	Contenido de fibra insoluble, soluble y total en bebida láctea fermentada con adición de extracto de polisacáridos (EP1) de frijol cocido de la variedad Negro 8025.	67
18.	Capacidad antioxidante en yogurt y bebida con adición del EP1 de la variedad de frijol Negro 8025.	68
19.	Orden de preferencia de 4 sabores utilizados en el yogurt y bebida láctea fermentada con adición del EP1 frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cocido de la variedad Negro 8025.	69
20.	Nivel de agrado en yogurt y bebida láctea fermentada y con adición de sabor y del EP de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cocido de la variedad Negro 8025.	70
21.	Orden de preferencia en yogurt y bebida láctea fermentada y con adición de sabor y del EP de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cocido de la variedad Negro 8025.	71
22.	Contenido de grasa, proteína y cenizas en yogurt y bebida con adición del EP1.	73

## I. INTRODUCCIÓN

Hoy en día se recomienda consumir alimentos que además de proveer los nutrimentos básicos de la dieta, proporcionen ciertos compuestos que no necesariamente son indispensables para el organismo, pero su consumo se puede relacionar con la prevención de enfermedades crónico-degenerativas como: obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares y cáncer.

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un componente importante de la dieta en México, y de países en vías de desarrollo, y junto con el maíz proveen los nutrientes necesarios para una dieta balanceada.

En la actualidad, el consumo de esta leguminosa ha sido implicado en la prevención de enfermedades crónico-degenerativas, debido a que contiene compuestos con actividad biológica demostrada, dentro de los que destacan los compuestos fenólicos y la fibra. A los primeros se les ha relacionado con propiedades antioxidantes, antimutagénicas y anticarcinogénicas, así como la inhibición de la proliferación de células transformadas. Mientras que la fibra ayuda al tránsito del bolo intestinal y prevención del estreñimiento. La fermentación de la fibra en el colon por la flora microbiana produce entre otros compuestos, ácidos grasos de cadena corta (AGCC), que ayudan a prevenir el desarrollo de cáncer de colon, mantener los colonocitos y la flora bacteriana actuando como prebiótico.

Tomando en consideración que el consumo *per cápita* de frijol ha disminuido de 22 kg en 1996 a 11 kg en la actualidad y que el frijol es una leguminosa que contiene compuestos bioactivos que ayudan a la prevención de enfermedades crónico-degenerativas, es necesario tener alternativas de consumo de dichos agentes del frijol en la dieta.

Por lo que el objetivo de este trabajo es desarrollar un yogurt y bebida láctea fermentada con adición de polisacáridos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido, y evaluar su composición nutrimental, contenido de taninos condensados, flavonoides totales, capacidad antioxidante y características sensoriales.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. FRIJOL COMÚN

#### 2.1.1. Generalidades

El frijol común, *Phaseolus vulgaris* L., es una planta que pertenece a la familia Leguminosae, por esto recibe el nombre de leguminosa y la forma en que mayormente se consume es como semilla seca (Bender, 1994).

Actualmente México se encuentra entre los 5 países productores de frijol en conjunto con la India, Brasil, China y los Estados Unidos de América, que en total aportan el 63% de la producción mundial. Así México contribuye con el 7% en promedio de las cosechas mundiales. El frijol es uno de los componentes más importantes en la dieta de países en vía de desarrollo, debido a que son una fuente rica y económica de proteínas y calorías (Paredes *et al.*, 2006).

Se acepta que el centro de origen del género *Phaseolus* fue Mesoamérica, específicamente México, y de ahí se difundieron algunas especies hacia el sur del continente (Paredes *et al.*, 2006).

El grano de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los alimentos más importantes en México, aunque siendo deficiente en aminoácidos azufrados y triptófano, deficiencia que se complementa con el consumo de maíz, el frijol es considerado una buena fuente de aminoácidos esenciales en la dieta (Serrano y Goñi, 2004; Paredes *et al.*, 2006).

Existen seis principales clases comerciales de frijol de alta demanda en México: Negro, Azufrado, Bayo, Pinto, Flor de Mayo y Flor de Junio. La preferencia de las variedades depende de la zona geográfica; así en la zona del norte se prefieren las variedades Bayo, Pinto y Azufrados. En la zona centro se consumen todas las clases comerciales principalmente las variedades Flor de Mayo y Flor de Junio, y en la zona sur se prefieren los frijoles negros (Castellanos *et al.*, 1997).

Recientemente se ha informado que el consumo *per cápita* anual de frijol se encuentra en decadencia. Ya que en 1996, cada mexicano comía en promedio 22 kg de frijoles al año (Castellanos *et al.*, 1997), mientras que ahora cada persona come sólo 12 kg al año (SAGARPA, 2008).

### **2.1.2. Composición química**

Como se muestra en el Cuadro 1, el grano de frijol contiene de 16 a 33% de proteína, dependiendo de la variedad, (Guzmán-Maldonado *et al.*, 2000; Pérez-Herrera *et al.*, 2002; Osorio-Díaz *et al.*, 2003; Paredes *et al.*, 2006; Vargas-Torres *et al.*, 2006) así como de factores ambientales, tales como localización geográfica, tiempo de cosecha (Paredes *et al.*, 2006) y de la severidad del tratamiento térmico (Osorio-Díaz *et al.*, 2003).

El tratamiento térmico tiene un doble efecto sobre las leguminosas. Ya que por una parte, disminuye y elimina la actividad de algunos factores antinutricionales como los inhibidores de tripsina, mientras que por otro lado, aumenta la disponibilidad de la proteína (De Almeida-Costa *et al.*, 2006; Serrano y Goñi, 2004).

Además el frijol contiene de 1.5 a 6.2% de lípidos dependiendo de la variedad (Osorio-Díaz *et al.*, 2003; de Almeida Costa *et al.*, 2004; Paredes *et al.*, 2006; Vargas-Torres *et al.*, 2006) y el contenido total de lípidos en el frijol puede variar dependiendo de la localización de la siembra, clima, condiciones ambientales y el tipo de suelo en el cual se cultivan. Los lípidos de frijol tienen una gran variedad de ácidos grasos y en particular niveles sustanciales de ácidos grasos insaturados como el oléico (7-10%), linoléico (21-28%), y linolénico (37-54%), también contiene ácidos grasos saturados, como el ácido palmítico con rangos de 10 a 15% del total (Paredes *et al.*, 2006).

**Cuadro 1. Características químicas y nutrimentales del frijol común.**

Características	Contenido
Composición química (%)	
Proteína	14 – 33
Lípidos	1.5 – 6.2
Fibra total	14 – 19
Insoluble	10.1 – 13.4
Soluble	3.1 – 7.6
Cenizas	2.9 – 4.5
Carbohidratos	52 – 76
Calidad de proteína	
Digestibilidad (%)	52 – 75
Relación de eficiencia proteínica	0.7 – 1.5
Aminoácidos esenciales (g/100 g proteína)	
Fenilalanina + Tirosina	5.3 – 8.2
Isoleucina	2.8 – 5.8
Leucina	4.9 – 9.9
Lisina	6.4 – 7.6
Metionina + Cisteína	1.2 – 1.5
Treonina	4.4 – 7.0
Triptófano	----
Valina	4.5 – 6.7
Vitaminas (mg/100g)	
Tiamina (B1)	0.86 – 1.14
Riboflavina (B2)	0.14 – 0.27
Niacina (B3)	1.16 – 2.68
Piridoxina (B6)	0.34 – 0.64
Acido fólico	0.17 – 0.58
Minerales (mg/100g)	
Calcio	9 – 200
Cobre	0.7 – 1.2
Fosforo	460
Hierro	3.8 – 7.6
Magnesio	200
Zinc	2.2. – 4.4
Otros componentes	
Taninos (mgeq.cat./g) <sup>a</sup>	9.6 – 131.4
Inhibidores de tripsina (UIT/mg) <sup>b</sup>	13 – 29
Acido fítico (%)	0.6 – 2.7

<sup>a</sup> Miligramos equivalentes de catequina por gramo

<sup>b</sup> Unidades de inhibición de tripsina por miligramo (Paredes *et al.*, 2006).

Los carbohidratos son los componentes mayoritarios del frijol. La mayor parte son carbohidratos complejos, almidón y fibra dietaria, mientras que la fracción de azúcares (mono, di y oligosacáridos) es significativamente menor (Serrano y Goñi, 2004). Los carbohidratos constituyen del 52 al 76% del peso seco de la semilla de frijol común, contribuyendo el almidón con 35 al 60% de dicho peso seco. Otro de los componentes importantes del frijol es la fibra dietaria, constituida por polisacáridos indigeribles como las sustancias pépticas, arabinogalactanos y xiloglucanos (Paredes *et al.*, 2006).

Además, el frijol contiene niveles bajos pero significativos de otros carbohidratos, entre los que se encuentran los oligosacáridos rafinosa (trisacárido), estaquiosa (tetrasacárido) y verbascosa (pentasacárido) que varían del 2 al 6% del peso seco de la semilla (Serrano y Goñi, 2004; Iniestra-González *et al.*, 2005; Paredes *et al.*; 2006).

El frijol también es una buena fuente de calcio, fósforo, hierro y zinc; así como de vitaminas hidrosolubles tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B6 y ácido fólico (Serrano y Goñi, 2004; Paredes *et al.*, 2006).

## **2.2. COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL FRIJOL**

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) ha sido señalado como un alimento nutraceutico, ya que no solo contiene compuestos nutricionales, sino que también contiene componentes bioactivos que juegan un papel importante en la promoción de la salud (Paredes *et al.*, 2006). Puede ser que no ejerzan un papel nutricional, puesto que no se trata de sustancias indispensables para el organismo, pero su consumo supone una protección adicional contra la acción nociva de sustancias provenientes de la dieta y del entorno ambiental y que afectan la salud de la población entre los que destacan los compuestos fenólicos (taninos condensados y flavonoides totales) y la fibra (soluble e insoluble) (Araya y Lutz, 2003).

### 2.2.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se pueden definir como una sustancia química que contiene un anillo aromático en su molécula, al cual puede unirse uno o más sustituyentes hidroxilo, incluyendo sus derivados funcionales (ésteres, metilésteres, glucósidos, etc.). Son considerados como metabolitos secundarios y se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Las funciones que llevan a cabo son de defensa contra herbívoros y patógenos, absorción de luz, atracción de insectos polinizadores, reducción de crecimiento de plantas competitivas y promueven la relación simbiótica con bacterias fijadoras de nitrógeno (Manach *et al.*, 2004).

La pigmentación de la cascarilla de frijol común comprende una amplia gama de colores que depende de la presencia de diferentes cantidades y tipos de compuestos fenólicos; pero al tratarse de una mezcla compleja de estos, no se conoce su composición total. Actualmente los más reportados son los de tipo flavonoide, entre los que se encuentran glucósidos de flavonol, taninos condensados y antocianinas (Aparicio-Fernández *et al.*, 2005b; Espinosa-Alonso *et al.*, 2006). El contenido de compuestos fenólicos en frijol puede variar de acuerdo a la localidad donde sea cultivado, entre distintas variedades (Castellanos *et al.*, 1997; De Mejía *et al.*, 2003; Espinosa-Alonso *et al.*, 2006), y por factores del ambiente donde se cultive (Castellanos *et al.*, 1997).

#### 2.2.1.1. Clasificación de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos pueden ser clasificados en 3 grupos (Ho *et al.*, 1992; Manach *et al.*, 2004):

- *Fenoles simples y ácidos fenólicos.* Los fenoles simples incluyen a mofenoles tales como *p*-cresol, 3-etilfenol y 3,4-dimetilfenol, sesamol (derivado de hidroquinona), vainillina, ácido gálico.
- *Derivados del ácido hidroxicinámico.* Ácido cumárico, caféico y ferúlico. Usualmente se presentan en varias formas conjugadas, más frecuentemente

como ésteres que como glucósidos. El miembro más sobresaliente de este grupo es el ácido clorogénico.

- *Los flavonoides.* Es el grupo más importante de compuestos fenólicos en plantas y consisten principalmente de flavonoles, flavonas, flavononas, isoflavonas, proantocianinas (taninos condensados) y antocianinas.

En la Figura 1 se muestran las estructuras de los compuestos fenólicos (Manach *et al.*, 2004).

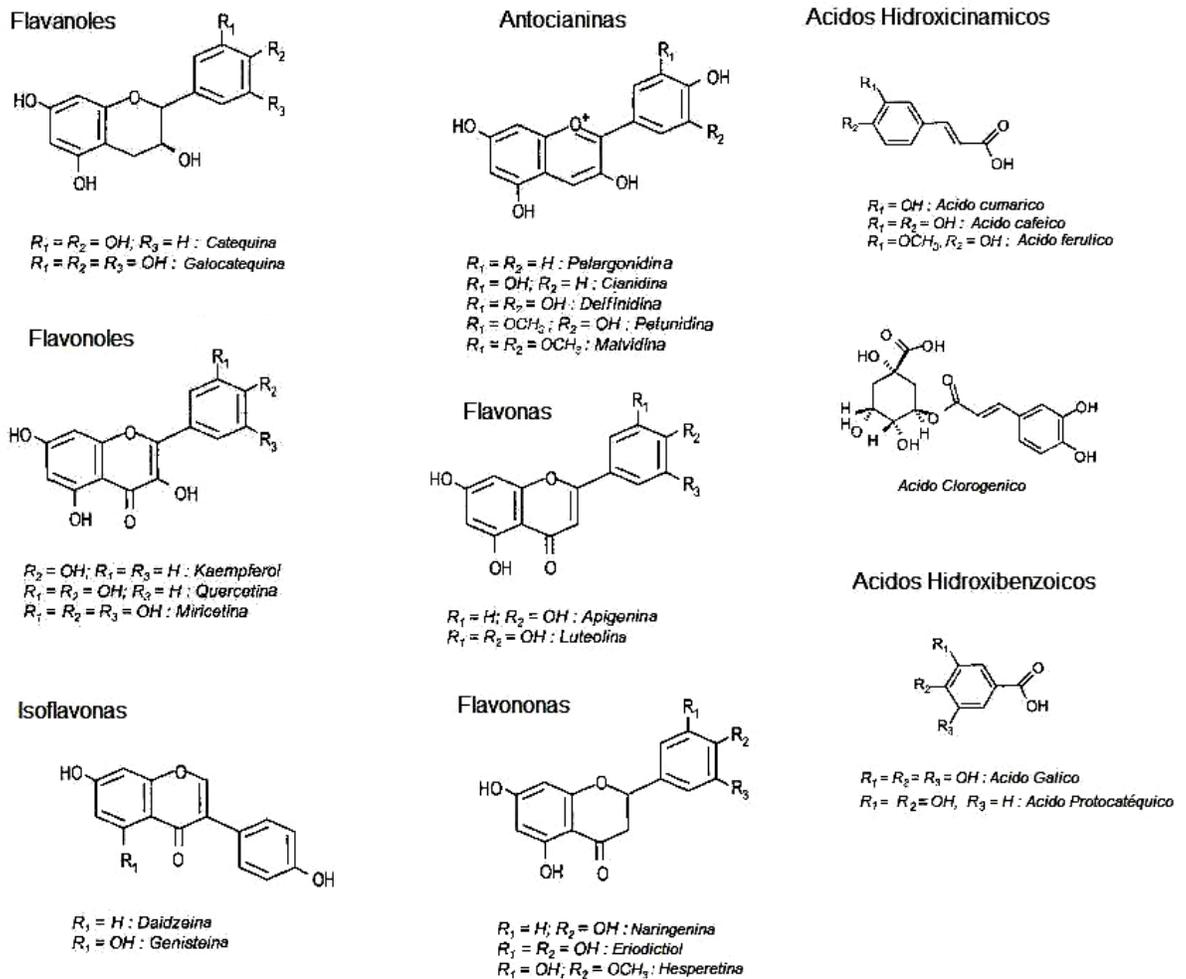


Figura 1. Estructura química de compuestos fenólicos y flavonoides (Manach *et al.*, 2004).

Los flavanoles existen en forma de monómero como la catequina que se encuentra principalmente en las frutas, mientras que la galocatequina se encuentra en semillas de plantas leguminosas (Manach *et al.*, 2004).

Las proantocianidinas o taninos condensados, son dímeros, oligómeros y polímeros de catequinas unidas por enlaces entre los carbonos 4 y 8 y en ocasiones con el carbono 6 (Manach *et al.*, 2004). Consisten de cadenas de unidades de flavan-3-ol y su peso molecular es relativamente alto y son capaces de formar complejos con carbohidratos y proteínas (Ho *et al.*, 1992).

Las antocianinas existen en diferentes estructuras químicas, coloreadas o sin color, dependiendo del pH (Manach *et al.*, 2004) y se caracterizan por su solubilidad en agua. Se encuentran en frijoles de color rojo, rosa y negro, y son los que determinan las diferentes coloraciones del frijol (Salinas-Moreno *et al.*, 2005; Aparicio-Fernández *et al.*, 2005b; Espinosa-Alonso *et al.*, 2006).

Estudios recientes han sugerido que el contenido de antocianinas en el frijol varía de acuerdo a las condiciones de cultivo, así como de la localización de la siembra, sin embargo, el perfil de antocianinas se conserva. Se han encontrado las antocianinas: 3-glucósido de delphinidina, 3-glucósido de petunidina y 3-glucósido de malvidina, y aunque su porcentaje relativo puede variar entre las distintas variedades, el 3-glucósido de delphinidina se encuentra en mayor proporción (Salinas-Moreno *et al.*, 2005; Aparicio-Fernández *et al.*, 2005b; Espinosa-Alonso *et al.*, 2006).

#### **2.2.1.2. Actividad biológica de los compuestos fenólicos**

La actividad biológica de los compuestos fenólicos en frijol común (*P. vulgaris* L.) ha sido ampliamente demostrada en la literatura científica. Por ejemplo, se ha informado que un extracto metanólico de frijol común variedad Flor de Mayo presentó actividad antioxidante y capacidad de atrapar radicales libres e inhibió la mutagenicidad inducida por aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) mediante el ensayo de microsuspensión, utilizando la cepas de prueba de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, sugiriendo que uno de los mecanismos por el cual los compuestos fenólicos presentes en el frijol confieren actividad antimutagénica es por medio de la inhibición de la actividad enzimática del citocromo P450, evitándose de esta manera la

activación del último carcinógeno AFB1-8,9-epóxido causante de la mutación al ADN (Cardador-Martínez *et al.*, 2002a,b, 2006).

En otro estudio se demostró, que después de 2 años de almacenamiento del frijol común (*P. vulgaris* L.) variedad Negro Jamapa, la cantidad de taninos condensados (TC) y antocianinas en la testa disminuyeron aproximadamente 6.3 y 4.0 veces respectivamente, en comparación a la testa de frijol recién cosechado, y que el tratamiento térmico reduce significativamente la cantidad de estos compuestos, reducción que se atribuyó al acomplejamiento de los compuestos fenólicos con macromoléculas propias del frijol como proteínas y carbohidratos, lo que obstaculiza su extracción y cuantificación. En donde se demuestra también, que el extracto metanólico de esta variedad de frijol inhibió la mutagenicidad inducida por AFB<sub>1</sub> en el ensayo de microsuspensión (Aparicio-Fernández *et al.*, 2005a).

A través de una caracterización fraccionada del extracto metanólico de la testa del frijol variedad Negro Jamapa, se encontraron las antocianinas malvidina, delphinidina y petunidina, en su forma de mono y diglucósidos, monoglucósidos de los flavonoles kaempferol, quercetina, y se identificó por primera vez miricetina, así como monómeros y oligómeros heterogéneos de flavanoles (epi-afzelequina, epi-catequina y epi-galocatequina) (Aparicio-Fernández *et al.*, 2005b). Se demostró también, que dicho extracto, tenía capacidad antiradical y era capaz de inhibir la viabilidad de células de adenocarcinoma cervico uterino humano HeLa, mediante la inducción de apoptosis por la vía de la mitocondria junto con la expresión de proteínas proapopticas Bax y Caspasa-3, mientras que el efecto de este mismo extracto fue mucho menor sobre la inhibición de la viabilidad de células no tumorogénicas HaCaT (células de queratinocitos premalignos humanos) (Aparicio-Fernández *et al.*, 2006, 2008).

En un estudio reciente, se aislaron e identificaron 24 compuestos de la testa de frijol negro, entre los que se incluyen 12 triterpenoides, 7 flavonoides, y 5 otros fitoquímicos, y se observó que algunos de estos compuestos mostraron potente actividad inhibitoria en la proliferación de células de cáncer de hígado humano

HepG2, células de cáncer de colon humano Caco-2 y células de cáncer de mama MCF-7. Seis de los flavonoides aislados, mostraron potente capacidad antioxidante (Dong *et al.*, 2007).

### **2.2.1.3. Ingesta diaria y biodisponibilidad de compuestos fenólicos**

Los flavonoides no poseen las características de las vitaminas, no son aminas y conforman otro grupo químico, pero su acción protectora y la imposibilidad del organismo humano de producirlos merecen ser incorporados al grupo de nutrientes esenciales. El valor medio de ingesta de flavonoides se estima como 23 mg/día, siendo predominantes los flavonoles especialmente la quercetina. La ingesta promedio de flavonoles y flavonas se sitúa entre los 20 y 26 mg/día (Martínez-Flores *et al.*, 2002).

Se calculó la ingesta diaria de flavonoides en Estados Unidos que fue de 1.0 g/día que consistía en 16% de flavonoles, flavonas y flavononas, 17% de antocianinas, 20% de catequinas y 45% de biflavonas. Los flavonoles han sido estudiados más extensivamente, el consumo de estos compuestos ha sido estimado en 20 – 25 mg/día en los Estados Unidos. En España el consumo de catequinas y taninos condensados (dímeros y trímeros de proantocianidinas) ha sido estimado en 18 – 31 mg/día (Manach *et al.*, 2004).

La transformación de los flavonoides tiene lugar en dos localizaciones: en primer lugar en el hígado, por medio de reacciones de biotransformación de fase I en las que se introducen o exponen grupos polares; en segundo lugar en el colon mediante reacciones de biotransformación de fase II, en las que los microorganismos degradan los flavonoides no absorbidos. La conjugación con el ácido glucorónico, sulfatos o glicina, tiene lugar tanto para los flavonoides como para sus metabolitos procedentes del colon. Los conjugados que son solubles en agua, pueden excretarse por la orina (Martínez-Flores *et al.*, 2002).

El creciente interés de los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica. Se pueden unir a polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos de transición, tales como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres. Es por este hecho que se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones vírales, úlcera estomacal y duodenal e inflamaciones (Martínez-Flores *et al.*, 2002).

En estudios *in vitro* e *in vivo*, se ha confirmado que el grado de polimerización de las proantocianidinas o taninos condensados impide la absorción de estos compuestos a través del intestino, indicando que estos pueden tener un efecto directo sobre la mucosa intestinal y así generar una protección contra el estrés oxidativo y contra la acción de carcinógenos en este órgano (Manach *et al.*, 2005). Por otro lado en un estudio *in vitro* demostraron que los taninos condensados pueden ser fermentados por la flora colónica después de 48 horas generando ácidos fenólicos como ácido 2-(*p*-hidroxifenil) acético, 2-(*p*-hidroxifenil) propiónico y sus isómeros *m*-hidroxi ácido 2-(*m*-hidroxifenil) acético y ácido 2-(*m*-hidroxifenil) propiónico, ácido 5-(*m*-hidroxifenil) valerico y ácido fenilpropiónico (Déprez *et al.*, 2000). En otro estudio reciente *in vitro* se ha reportado que los compuestos fenólicos presentes en manzana pueden ser fermentados por bacterias del colon generando ácidos grasos de cadena corta entre los que destacan el ácido butírico, propiónico y acético entre otros compuestos como el ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico y tanto el extracto de compuestos fenólicos como el extracto de compuestos fenólicos sometido a la fermentación fueron capaces de inhibir el desarrollo y proliferación de células transformadas de adenoma de colon (LT97) y carcinoma de colon (HT29) (Veeriah *et al.*, 2007).

### 2.2.2. Fibra dietética

De los carbohidratos contenidos en la mayoría de los vegetales, los polisacáridos son los más abundantes y los azúcares libres se encuentran en menor proporción (Paredes *et al.*, 2006).

La fibra dietética parte importante de los carbohidratos, que puede ser definida como la parte comestible de las plantas o hidratos de carbono análogos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado de un individuo monogástrico y que puede ser fermentada parcial o completamente por bacterias propias del colon. La fibra dietética incluye polisacáridos, oligosacáridos, lignina y sustancias asociadas de la planta (Ruperez y Bravo, 2001; García-Peris *et al.*, 2002; Escudero y González, 2006).

Una definición más reciente, añade a la definición previa de fibra dietética el concepto nuevo de *fibra funcional* o *añadida* que incluye otros hidratos de carbono como el almidón resistente, la inulina, diversos oligosacáridos y disacáridos como la lactulosa. Entonces se considera a la fibra total como la suma de fibra dietética más fibra funcional (Escudero y González, 2006).

Al llevar estudios sobre fibras de leguminosas y de algunos subproductos vegetales se observó por primera vez que tanto la fracción insoluble como soluble contenían cierta cantidad de compuestos polifenólicos asociados. Estos compuestos mostraban un comportamiento fisiológico en gran medida similar a la propia fibra ya que no eran digeribles y fermentaban en el colon. Tras el estudio de las propiedades fisiológicas y nutricionales de algunas fibras con compuestos fenólicos asociados, se propuso por primera vez medir la capacidad antioxidante para evaluar los efectos potenciales en la salud de las fibras (Saura-Calixto y Jimenez-Escrig, 2001; Saura-Calixto, 2006).

A partir de estos resultados se ha definido el concepto de “fibra dietética antioxidante” para diferenciar los materiales con un notable poder antioxidante de aquellos que no lo muestran o lo hacen en magnitudes insignificantes. Entonces la fibra antioxidante se puede definir como aquella que contiene cantidades apreciables

de antioxidantes naturales asociados a la matriz de fibra, con las siguientes características (Saura-Calixto y Jimenez-Escrig, 2001; Saura-Calixto, 2006):

- El contenido de fibra debe ser superior al 50% de su materia seca.
- Un gramo de fibra debe tener la capacidad de inhibición de la oxidación lipídica equivalente, al menos, a 200 mg de vitamina E (medida como oxidación de linoléico, método del tiocianato) y una capacidad de secuestro de radicales libres equivalente a un mínimo de 50 mg de vitamina E (método DPPH).
- La capacidad antioxidante debe ser intrínseca, derivada de constituyentes naturales del material vegetal correspondiente y no de antioxidantes adicionados.

#### **2.2.2.1. Clasificación de fibra**

##### *Polisacáridos no almidón*

En este grupo se consideran a todos los polímeros de carbohidratos que contienen al menos veinte residuos de monosacáridos. Entre los que destacan celulosa, hemicelulosas, pectinas y gomas (Escudero y González, 2006).

Estos polisacáridos se encuentran como cadenas lineales, o bien como cadenas ramificadas, que a la vez pueden estar compuestas de un solo tipo de monosacárido (homopolisacárido) como la celulosa, o bien por dos o más tipos de monosacáridos (heteropolisacárido), como la mayoría de las gomas. Su unión se lleva a cabo por interacciones electrostáticas, así como unión de puentes de hidrógeno, interacción hidrófoba y, en ocasiones covalentes (Badui, 1993).

*Celulosa*: Constituyente estructural de la pared celular de frutas, hortalizas y cereales, es un homopolisacárido lineal de unidades de D-glucopiranosas, con uniones  $\beta$  (1,4) y a pesar de que contiene grupos hidroxilos (OH) libres no es soluble en agua debido a que estos grupos no se hidratan por estar actuando entre sí. La

estructura de la celulosa se muestra en la Figura 2 (Badui, 1993; Manrique y Lajolo, 2001).

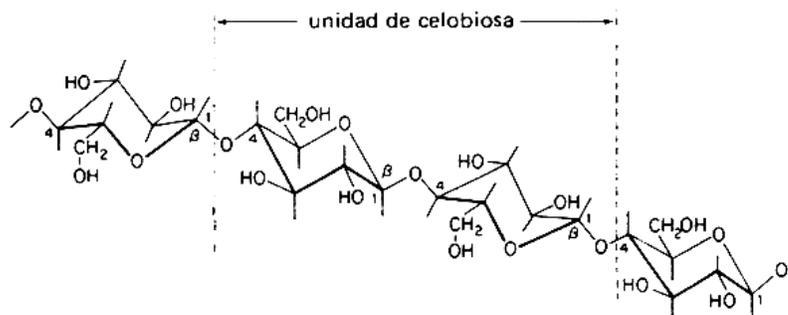


Figura 2. Celobiosa, unidad repetitiva de la celulosa (Badui, 1993).

*Hemicelulosa*: Se encuentra en la pared celular de vegetales, se trata de un heteropolisacárido y su composición química de una de las hemicelulosas más abundante, está basada principalmente por la unión glucosídica mediante enlaces  $\beta$  (1,4) de D-xilanopiranosas y a esta estructura lineal básica se pueden enlazar grupos de L-arabinofuranosas mediante los carbonos 2 ó 3 de la xilosa (Badui, 1993).

*Pectina*: Polisacárido vegetal, con estructura básica de moléculas de ácido D-galacturónico unidas por enlaces glucosídicos  $\alpha$  (1,4), y en la que algunos de los grupos carboxilos pueden estar esterificados con metilos o en forma de sal (Figura 3a). Dos o más moléculas de pectina pueden formar una estructura tridimensional o gel, cuya unión (círculos en la Figura 3b) puede ser mediante interacciones hidrófobas de los grupos metilo, en donde los grupos OH del ácido galacturónico quedan libres para retener agua mediante uniones por puentes de hidrógeno.

*Gomas*: Es un grupo muy amplio de polisacáridos de alto peso molecular, por ejemplo, la goma guar. Su estructura química, se encuentra ramificada y la cadena principal consiste en unidades de  $\beta$ -D-manopiranosas unidas con enlaces  $\beta$  (1,4), a la cual se le añaden ramas de  $\alpha$ -D-galactopiranosas por enlaces  $\alpha$  (1,6). La Figura 4 muestra la estructura química de la goma guar (Badui, 1993).

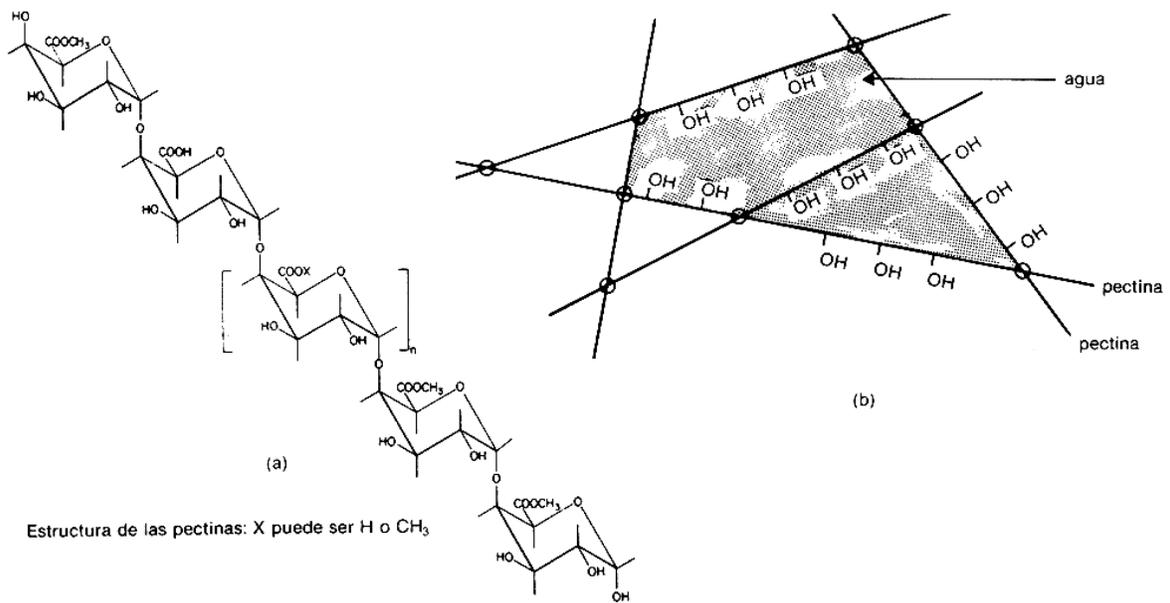


Figura 3. Estructura química (a) y gelificación de la pectina (b) (Badui, 1993).

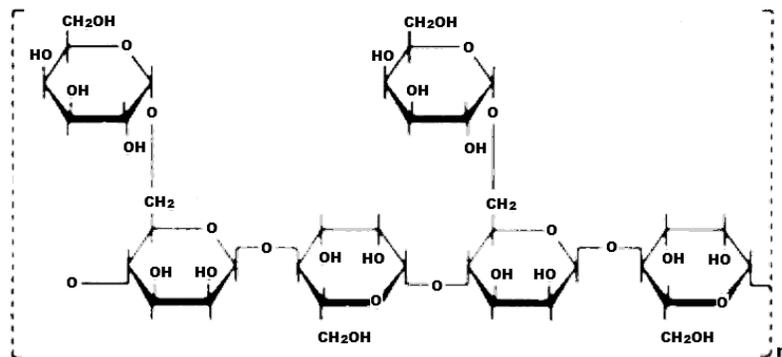
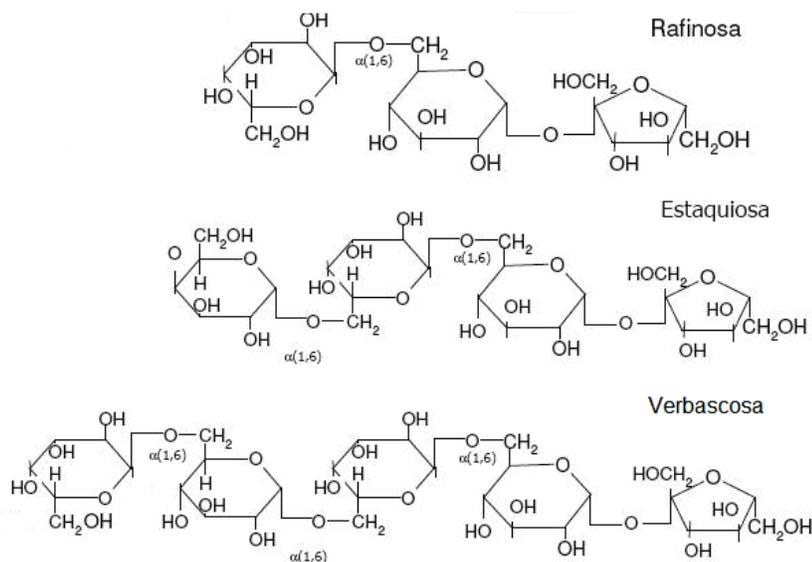


Figura 4. Estructura química de la goma guar (Badui, 1993).

### Oligosacáridos resistentes

Son los hidratos de carbono con un nivel de polimerización bajo, están compuestos de tres a diez moléculas de monosacáridos. Entre los que se encuentran:

Galactooligosacáridos (GOS): como rafinosa (galactosa-glucosa-fructosa), estaquiosa (galactosa-galactosa-glucosa-fructosa), y verbascosa (galactosa-galactosa-galactosa-glucosa-fructosa) con enlaces  $\alpha$  (1,6). En la Figura 5 se muestra la estructura de los galactosacáridos (Muzquiz, 2005; Escudero y González, 2006).



**Figura 5. Estructura química de los galactosacáridos (Muzquiz, 2005).**

Fructooligosacáridos (FOS): Dentro de los cuales destaca la inulina compuesta por una mezcla de polímeros de fructosa cuyo grado de polimerización varía de 2 a 60 unidades con enlaces  $\beta$  (1,2) (Ruperez y Bravo, 2001; Escudero y González, 2006).

### *Lignina*

Se trata de un polímero que resulta de la unión de varios alcoholes fenilpropílicos; confieren rigidez a la pared celular haciéndola resistente a impactos y flexiones. La lignina no se digiere ni se absorbe ni tampoco es atacada por la microflora bacteriana del colon.

## Almidones resistentes (AR)

Al almidón resistente se le conoce como la fracción del almidón que resiste la hidrólisis por enzimas digestivas humanas y pasa a través del intestino grueso donde es fermentado por bacterias propias del colon (Osorio-Díaz *et al.*, 2003; Tovar *et al.*, 2005, 2006; Escudero y González, 2006).

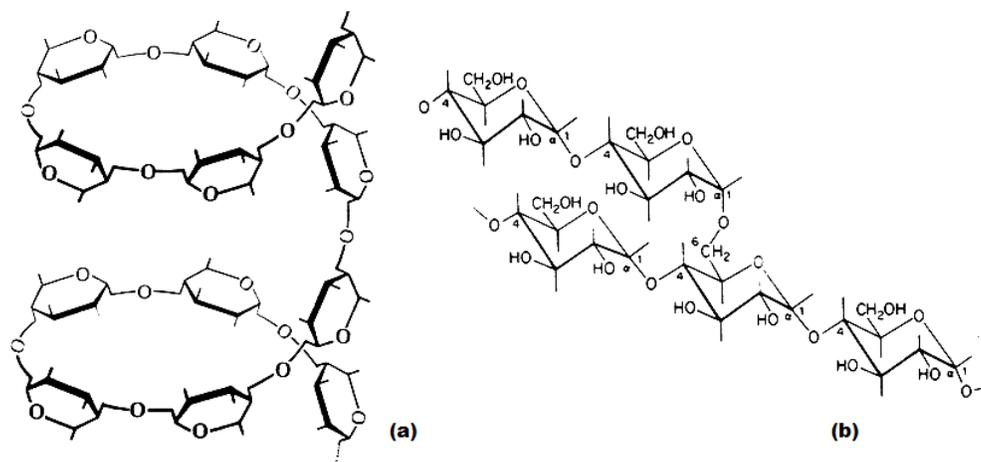


Figura 6. (a), enrollamiento helicoidal de la amilosa; (b), estructura química de la amilopectina (Badui, 1993).

Químicamente es una mezcla de dos polisacáridos con gran similitud, la amilosa y la amilopectina; el primero es la unión de D-glucopiranosas por medio de enlaces glucosídicos  $\alpha$  (1,4) que forma largas cadenas lineales con 200 – 2500 unidades, en donde, su unidad repetitiva es la  $\alpha$ -maltosa (Figura 6a). Mientras que la amilopectina se diferencia de la amilosa porque contiene ramificaciones que le dan una forma molecular similar a un árbol, la unión de las ramificaciones esta dada por enlaces  $\alpha$ -D-(1,6), localizadas cada 15 – 25 unidades lineales de glucosa (Figura 6b) (Badui, 1993; Bello-Pérez *et al.*, 2006).

El almidón resistente se clasifica de la siguiente manera:

- *Tipo 1 o AR1* (atrapado dentro de una matriz celular): se encuentran en los granos de cereales y en las leguminosas.

- *Tipo 2 o AR2* (cristalizado): integrado por gránulos nativos de almidón, no puede ser atacado enzimáticamente si antes no se gelatiniza. Sus fuentes son las patatas crudas, plátano verde y la harina de maíz.
- *Tipo 3 o AR3* (retrogradado): almidón que cambia su conformación ante fenómenos como el calor o el frío. Al calentar el almidón en presencia de agua se produce una distorsión de las cadenas polisacáridos adquiriendo una conformación al azar, este proceso se denomina gelatinización. Al enfriarse comienza un proceso de recristalización, llamado retrogradación. Este fenómeno es responsable por ejemplo del endurecimiento del pan. Se encuentra en pan, copos de cereales, patatas cocidas y enfriadas y alimentos precocinados.
- *Tipo 4 o AR4* (modificado): almidón modificado químicamente de forma industrial. Se encuentra en los alimentos procesados como pasteles y alimentos infantiles (Osorio-Díaz *et al.*, 2003; Escudero y González, 2006).

La fibra dietética también se puede clasificar de acuerdo al grado de solubilidad en agua, como fibra soluble e insoluble, como se muestra en el Cuadro 2 y el grado de solubilidad depende en gran medida del tipo y composición de la fibra (Manrique y Lajolo, 2001; García-Peris *et al.*, 2002; Escudero y González, 2006).

**Cuadro 2. Clasificación de la fibra de acuerdo a su solubilidad en agua y su fermentación en colon.**

Fibra soluble	Fibra insoluble
(Fermentación total en colon)	(Fermentación parcial en colon)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gomas</li> <li>• Pectinas</li> <li>• Rafinosa, Estaquiosa, Verbascosa</li> <li>• Inulina</li> <li>• Almidón resistente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hemicelulosa</li> <li>• Celulosa</li> <li>• Lignina</li> </ul>

(Manrique y Lajolo, 2001; García-Peris *et al.*, 2002; Escudero y González, 2006).

### 2.2.2.2. Fermentación de la fibra dietética

En el cuadro 2, se muestra la clasificación de la fibra de acuerdo a su grado de fermentación y se relaciona en gran parte con su grado de solubilidad, las pectinas, gomas, la inulina, y algunos almidones resistentes, es la fibra soluble con un alto grado de fermentación, mientras que la hemicelulosa, celulosa y lignina, es la fibra insoluble escasamente fermentable por las bacterias propias del colon (García-Peris *et al.*, 2002; Escudero y González, 2006).

Los componentes de la fibra que no se logran digerir por las enzimas gástricas ni son absorbidos a nivel intestino delgado, alcanzan el intestino grueso, donde pueden ser degradados por la microflora bacteriana. El proceso se llama fermentación colónica y consiste en la degradación anaeróbica de sustratos, principalmente carbohidratos, llevada a cabo por la microflora intestinal (Goñi y Martín-Carrón, 2001).

Se estima que la flora intestinal humana comprende más de 400 especies de distintas bacterias. En donde, el 99 % del total esta constituido por las especies dominantes: *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus* y *Clostridia*, la mayor partes de ellas son anaerobios estrictos y se caracterizan por llevar a cabo reacciones reductoras e hidrolíticas (Goñi y Martín-Carrón, 2001).

Los componentes de la fibra, por la acción de las enzimas extracelulares de las bacterias en el colon son hidrolizados a monosacáridos de glucosa entre otros carbohidratos, y estos son metabolizados por medio de la vía metabólica de Embden-Meyerhoff hasta la obtención de piruvato. Luego el piruvato se transforma a ácidos grasos de cadena corta (AGCC): ácido acético, propiónico y butírico, en una proporción molar casi constante 60:25:15; y en menor proporción también se producen otros ácidos orgánicos: ácido valerico, hexanoico, isobutírico e isovalerico, y otros compuestos como CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> (Goñi y Martín-Carrón, 2001; García-Peris *et al.*, 2002; Escudero y González, 2006).

Existen dos vías para la metabolización del piruvato, en una de ellas se genera ácido propiónico, a través del succinato. Por la otra vía, el piruvato se

convierte en acetyl-CoA continuando con una hidrólisis para formar ácido acético o por medio de una reducción para producir ácido butírico (Figura 7) (García-Peris *et al.*, 2002; Escudero y González, 2006).

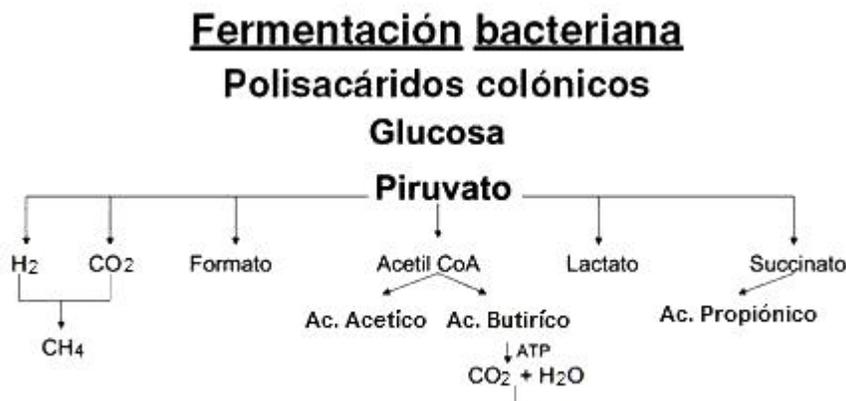


Figura 7. Fermentación bacteriana de la fibra  
(García-Peris *et al.*, 2002; Escudero y González, 2006).

### 2.2.2.3. Efectos benéficos de la fibra

Se ha informado que los diferentes tipos de fibras tienen la capacidad de absorber agua y formar geles que aumentan el volumen fecal y favorecen el tránsito y la evacuación gástrica haciendo más eficiente la absorción y digestión de los alimentos (Escudero y González, 2006; López-Román *et al.*, 2008).

La fermentación de la fibra es importante, ya que gracias a ésta es posible el mantenimiento y desarrollo de la flora bacteriana (efecto prebiótico), así como de células epiteliales, ya que los gases y los AGCC generados durante su fermentación, estimulan el crecimiento de ciertas bacterias que actúan como probióticos (lactobacilos o bifidobacterias ingeridas en leches fermentadas) (Gibson *et al.*, 2004; Escudero y González, 2006; López-Román *et al.*, 2008).

Yin *et al.* (2001) trabajando con células colónicas *in vitro*, reportó que el ácido butírico presenta actividad antiinflamatoria específica en el colon, disminuyendo la producción de algunas citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral

(TNF- $\alpha$ ), modulando la actividad del factor de transcripción NF-kB en células colónicas *in vitro*.

Hughes *et al.* (1997) demostró que la ingesta de frijol pinto es capaz de inhibir el desarrollo de cáncer de colon inducido químicamente con azoximetano (AOM) en ratas de la cepa F344 y sugirió que los compuestos presentes en el frijol como la fibra dietética o fitoquímicos pudieran ser los responsables de sus propiedades anticarcinogénicas.

En otro estudio, se ha demostrado que el consumo de frijol negro y frijol navy, inhibe el desarrollo y multiplicidad del cáncer de colon inducido químicamente con azoximetano en ratas Fischer y se sugiere que el efecto protector del frijol de ambas variedades puede ser atribuido a altas concentraciones de ácido butírico generado en la zona distal del colon por fermentación colónica (Hangen y Bennink, 2002), y/o a la presencia de compuestos fenólicos (flavonoides, taninos y antocianinas) en el frijol (Dong *et al.*, 2007).

En un estudio reciente se reportó que el extracto de polisacáridos (EP) de frijol común de la variedad negro 8025 cocido contiene cantidades considerables de carbohidratos no indigeribles los cuales pueden ser fermentados en el intestino grueso generando ácidos grasos de cadena corta (ácido acético, propiónico y butírico) en donde el ácido butírico fue relacionado principalmente con la inhibición del desarrollo de cáncer de colon inducido químicamente con azoximetano en ratas Sprague-Dawley (Feregrino-Pérez *et al.*, 2008).

#### **2.2.2.4. Recomendación del consumo de fibra**

Las recomendaciones actuales de consumo de fibra en adultos oscilan entre 25 a 30 g/día o bien de 10 a 13 g/1.000 Kcal, debiendo ser la relación insoluble/soluble de 3/1 según la American Dietetic Association 1996. El consumo actual de fibra en Europa se encuentra alrededor de 20 g por persona y día. En concreto en España se estimó una ingesta de 22 g (sin cuantificar los 6 g de almidón

resistente). En los países en vías de desarrollo el consumo de fibra se sitúa entre 60-120 g/día.

La recomendación alimentaria para el consumo adecuado de fibra debe asegurar la ingesta de fuentes variadas de frutas, verduras, legumbres y cereales integrales. Dentro del marco de la dieta equilibrada: consumir diariamente más de tres piezas de fruta, incluyendo siempre un cítrico o fruta tropical (naranja, mandarina, kiwi, mango) y dos o más platos de verdura o ensalada. Consumir cereales, preferiblemente integrales: pan, patata, pasta y arroz. Y al menos 2 a 3 veces por semana legumbres (lentejas, garbanzos, frijol). Asegurar el consumo de 3 a 4 raciones de lácteos (leche, yogur y/o queso) y una de esas raciones sea un probiótico (yogurt) (Martínez-Álvarez *et al.*, 2008).

### **2.3. PRODUCTOS LÁCTEOS FERMENTADOS**

Según la norma Mexicana NMX-F-703-COFOCALEC-2004, un producto lácteo fermentado, es el obtenido por la fermentación de productos lácteos pasteurizados mediante la acción de bacterias ácido lácticas, cuyo resultado sea la reducción del pH con o sin coagulación. En donde, estos cultivos de microorganismos sean viables, activos y en cantidades establecidas (Silva-Hernández y Verdalet-Guzmán, 2003). Se conocen como probióticos ya que contiene microorganismos vivos, bacterias, con efectos que son beneficiosos, en concreto para la flora intestinal, y en general para la salud (Martínez-Álvarez *et al.*, 2008).

La leche, los quesos y las leches fermentadas son ejemplos de alimentos que poseen una reconocida aceptación en casi todo el mundo, por lo que permiten ser un vehículo efectivo para la aplicación de ingredientes funcionales como prebióticos y nutraceuticos. Incluso el suero de queso, es reconocido como una excelente fuente de derivados funcionales (Silva-Hernández y Verdalet-Guzmán, 2003).

En un estudio realizado en nuestro país por Hernández y Gaitán (2007) informaron que los productos lácteos fermentados existentes en el mercado nacional son el yogurt batido, yogurt bebible y bebidas lácteas fermentadas (como Chamyto y Yakult) entre otros. El yogurt es uno de los productos que ha consolidado su consumo debido al beneficio que aporta en facilitar la digestión, atributo que le ha favorecido este crecimiento, además de que su consumo provee los nutrientes básicos a la dieta. El yogurt sabor fresa es el más preferido, aunque también se demandan los sabores durazno, manzana y mango. Las presentaciones que más son consumidas son las presentaciones individuales que van de 125 a 250 g.

Los productos lácteos fermentados son denominados probióticos ya que contienen un número viable de microorganismos principalmente bifidobacterias y lactobacilos (bacterias ácido lácticas) que reconstituyen la microbiota normal del tracto gastrointestinal y pueden ejercer un efecto beneficioso para la salud. En cambio los prebióticos, son ingredientes alimentarios que permiten modificar selectivamente la composición de la flora intestinal, estimulando el crecimiento y la actividad de microorganismos beneficiosos para la salud humana. Existen además productos denominados simbióticos, en los cuales se combinan probióticos y prebióticos, lo que se ha descrito como de gran interés ya que el desarrollo de las bacterias probióticas se ve favorecido por la cercanía del sustrato específico (Martínez-Álvarez *et al.*, 2008).

Los productos lácteos fermentados han sido relacionados con la prevención de enfermedades crónico-degenerativas. Por ejemplo, en comparación con las caseínas, las proteínas de suero ( $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina, albúmina sérica bovina y lactoferrina) que constituyen cerca del 18% de las proteínas de la leche parecen exhibir un efecto más directo sobre la inhibición de carcinogénesis colorrectal (Mattila-Sandholm y Saarela, 2003).

Sternhagen y Allen (2001), demostraron que la  $\alpha$ -lactoalbúmina del suero, inhibe la proliferación y viabilidad de células de cáncer de colon Caco-2 y HT-29.

Tsuda *et al.* (2002), informaron que la lactoferrina presente en el suero, es capaz de inhibir el desarrollo de cáncer de colon inducido químicamente con azoximetano en ratas, y sugiere que uno de los posibles mecanismos de esta inhibición, es por el incremento de la actividad de las enzimas de fase II como la glutatión S-transferasa y por la supresión de la actividad de enzimas de fase I como el citocromo P450, 1A2, evitándose de esta manera la activación del último carcinógeno causante de la mutación al ADN.

Estudios en ratas han demostrado que la ingesta de leche descremada (Sánchez-Negrette *et al.*, 2005) y de proteína de suero inhiben la incidencia y desarrollo de tumores inducidos por 1,2-dimetilhidrazina (DMH) y azoximetano (AOM), dando como resultado una reducción del riesgo del desarrollo de cáncer de colon (Papenburg *et al.*, 1990; Hakkak *et al.*, 2001; Mattila-Sandholm y Saarela, 2003).

### **2.3.1. Productos lácteos fermentados enriquecidos con fibra**

En la actualidad se han desarrollado productos lácteos fermentados enriquecidos con fibra de diversas fuentes ya que estos productos han sido más apreciados por ser más efectivos para la digestión comparados con los normales (Hernández y Gaitán, 2007).

Por ejemplo, Morales de León *et al.* (2000) elaboraron un yogurt con base en una mezcla de leche y garbanzo (*Cicer arietinum*), obteniendo un producto con características físicas y sensoriales similares a la de un yogurt elaborado con 100% leche, un mayor contenido de proteínas y un aporte energético de 140.7 kcal/100 g o 597.6 kJ/100 g.

Granito *et al.* (2004), desarrollaron bebidas lácteas fermentadas con sabor a mango y guayaba, adicionando en un 30% y 10% de extracto de leguminosas *Phaseolus vulgaris* y *Vigna sinensis*, encontrando que estas bebidas son organolépticamente aceptadas. Y sugieren que el uso de las leguminosas *Phaseolus*

*vulgaris* y *Vigna sinensis* en el desarrollo de bebidas lácteas fermentadas, contribuye no solo al mejoramiento nutricional de los productos desarrollados, sino también a la diversificación del uso de las leguminosas en alimentos industrializados.

López-Román (2008), reportó que la administración de un preparado lácteo enriquecido con un suplemento de fibra soluble (inulina y maltodextrina resistente a la digestión) mejora la situación de estreñimiento crónico primario idiopático (comparado con el preparado lácteo control sin fibra), en hombres y mujeres en una edad media de  $47 \pm 15$  años.

## **2.5. EVALUACIÓN SENSORIAL**

La evaluación sensorial se denomina también análisis sensorial y pretende explicar, al menos parcialmente, la relación compleja entre el individuo y el producto que consume, y puede ser definida como el “examen de las propiedades organolépticas de un producto por los órganos de los sentidos”. Se pueden distinguir dos grandes tipos de técnicas: las pruebas objetivas, que describen y diferencian los productos; y las aproximaciones hedónicas que tienen como objetivo evidenciar las preferencias y aversiones de los consumidores hacia los productos (Huguet, 2000; Torricella-Morales *et al.*, 2007).

Dentro de las pruebas objetivas se encuentran:

*Las pruebas discriminativas:* Detectan la presencia o ausencia de diferencias sensoriales entre dos productos; las más conocidas son test triangular, el dúo-trío y el test de clasificación. En general se utilizan cuando las diferencias son pocas o casi inexistentes. Se necesitan individuos entrenados (de 15 a 80 dependiendo si quieren evidenciar una diferencia o verificar una similitud) (Huguet, 2000; Torricella-Morales *et al.*, 2007).

*Análisis descriptivos:* Denominados también perfiles, permiten hacer la caracterización precisa del producto, por medio de descriptores. El ser humano se

convierte en un instrumento de medida precisa y fiel. Se le pide que utilice palabras definidas (descriptores) para describir el producto y medir las intensidades correspondientes. Los individuos (10 a 15) son seleccionados por sus aptitudes sensoriales, por su capacidad de describir y memorizar, así como por su motivación. Al proceso de selección le sigue un entrenamiento en los descriptores y sus intensidades y el uso de escalas para posteriormente evaluar los productos (Huguet, 2000; Torricella-Morales *et al.*, 2007).

En cambio las pruebas hedónicas evalúan el nivel de satisfacción de los consumidores respecto a las calidades intrínsecas del producto y proporcionan una fotografía al instante, de la apreciación de un producto o de una gama de productos, por parte de una población de consumidores (Huguet, 2000).

### III. JUSTIFICACIÓN

El frijol común *Phaseolus vulgaris* L., forma parte de la dieta básica en México y de los países en vías de desarrollo, para los cuales representa una valiosa fuente de compuestos bioactivos, que han sido implicados en la prevención de enfermedades crónico-degenerativas.

Considerando que el consumo *per cápita* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) ha disminuido de 22 kg por año en 1996 a 11 kg por año en la actualidad y al potencial nutracéutico del frijol y/o algunos de sus compuestos bioactivos, se pretende desarrollar un yogurt batido y una bebida láctea fermentada adicionada del extracto de polisacáridos de frijol cocido. Cabe destacar, que en estudios previos se ha demostrado el efecto quimioprotector del extracto de polisacáridos de frijol sobre cáncer de colon así como la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) después de su fermentación *in vitro* y la inhibición de la proliferación de células transformadas por los productos de la fermentación.

Por lo que la propuesta sin duda permitirá proporcionar un valor agregado al uso de agentes bioactivos en alimentos como lo es el yogurt y bebida láctea fermentada ya de conocida aceptación en la población Mexicana.

### IV. HIPÓTESIS

La adición de polisacáridos del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido en el desarrollo de un yogurt y bebida láctea fermentada permite obtener productos con características nutricionales, nutracéuticas y sensoriales adecuadas para el consumidor.

## V. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Elaborar y evaluar el potencial nutrimental, nutracéutico y sensorial de un yogurt batido y una bebida láctea fermentada con adición de polisacáridos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido.

### 5.2. Objetivos específicos

- Cuantificar el contenido de fibra total (soluble e insoluble), taninos condensados, flavonoides totales y determinar capacidad antioxidante, en el extracto de polisacáridos (EP) de 4 variedades de frijol común cocido, Azufrado Higuera, Bayo Madero, Negro 8025 y Pinto Durango.
- Desarrollar y formular el yogurt batido y la bebida láctea fermentada con adición del (EP) de frijol común cocido.
- Evaluar y comparar el contenido de compuestos fenólicos, fibra total y capacidad antioxidante del yogurt y bebida láctea fermentada elaborada con la adición del EP de frijol común cocido.
- Evaluar y comparar las características sensoriales y la composición nutrimental del yogurt y bebida láctea fermentada elaborada con la adición del EP de frijol común cocido.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el cumplimiento de los objetivos planteados con anterioridad se propuso la siguiente estrategia experimental (Figura 8).

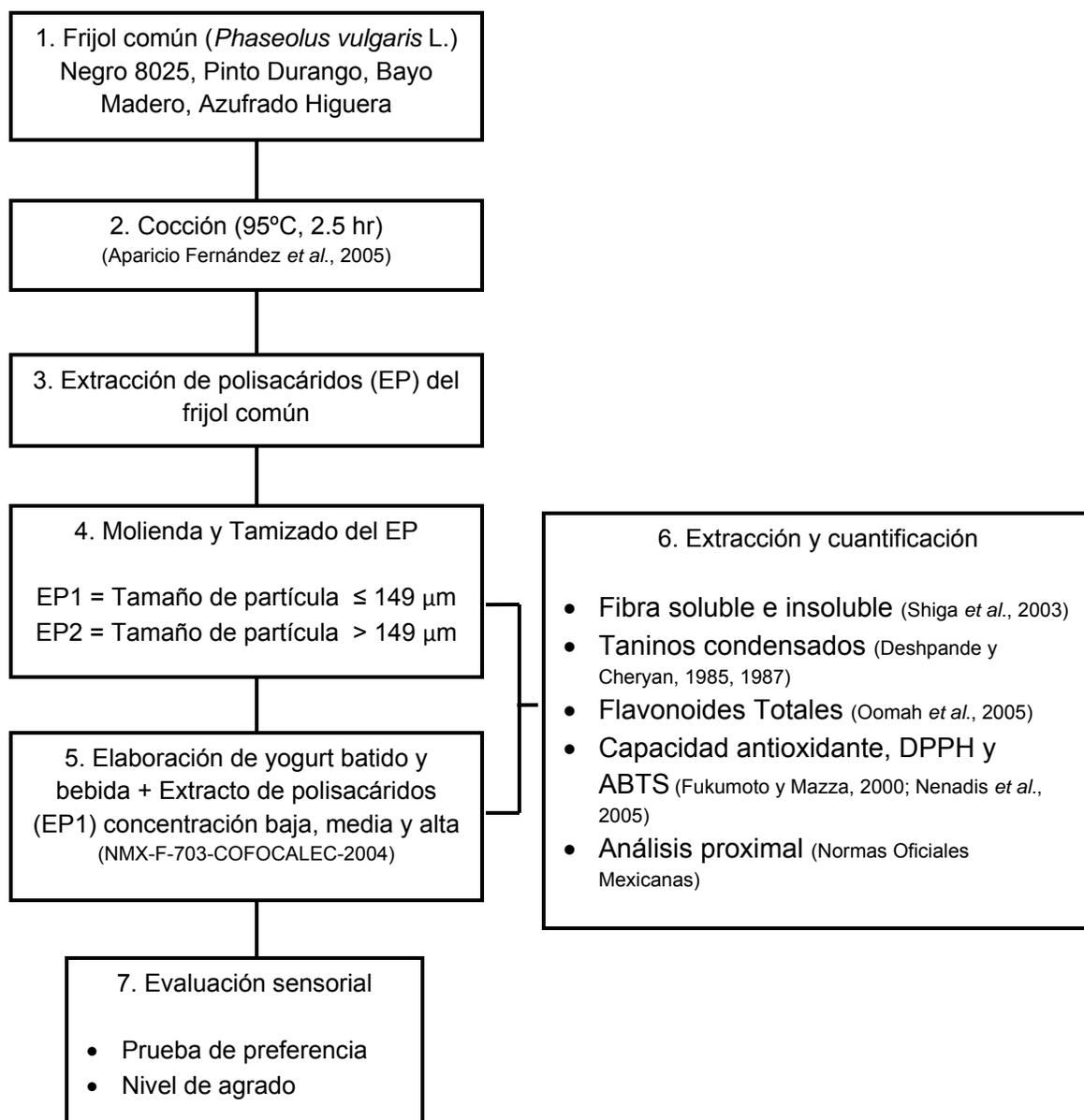


Figura 8. Estrategia experimental.

## 6.1. MATERIALES

### 6.1.1. Materia prima

- Cuatro variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Azufrado Higuera, Bayo Madero, Negro 8025 y Pinto Durango, que fueron donadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) unidad experimental bajío.
- Suero de leche en polvo WPC 34.
- Cultivo láctico Y216LYO (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*) fue adquirido de Danisco Cultures.
- Leche entera en polvo marca Nido, azúcar, fructosa, estabilizante (pectina, grenetina, goma guar) grado comercial, saborizante en polvo (fresa, manzana, mango) marca Tang, café en polvo soluble, marca Nescafe fueron adquiridos en un mercado local.

### 6.1.2. Reactivos

La  $\alpha$ -amilasa, proteasa, amilogucosidasa, ácido tánico, (+)-catequina, rutina, vainillina, 2-aminoetildifenilborato, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)) y Trolox fueron adquiridos de Sigma Chemical Co., (USA). Acetona, etanol, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, NaOH, alcohol isoamílico, éter etílico, ácido bórico, fosfato dibásico de sodio anhidro, fosfato monobásico de sodio monohidratado (solución amortiguadora de fosfatos) y metanol fueron de la marca J.T. Baker.

## 6.2. METODOS

### 6.2.1. Extracción de polisacáridos de frijol común cocido

Primeramente al frijol se le aplicó un tratamiento térmico, siguiendo la metodología propuesta por Aparicio-Fernández *et al.* (2005a), en donde a 50 g de frijol se le adicionaron 250 mL de agua, el cual fue hervido durante 2.5 horas, al termino de la cocción el caldo y las semillas fueron molidos y liofilizados, y se almacenaron en la oscuridad a 4°C hasta su uso.

La extracción de polisacáridos se llevó a cabo de acuerdo a la técnica de Kurtzman y Halbrook (1970), en donde, a 300 g de frijol cocido, liofilizado y molido, se le adicionaron 1500 mL de agua y se agitaron por 1 min. Después se centrifugaron por 1 min a 9000 rpm durante 10 min, y se eliminó el sobrenadante. Enseguida se adicionaron 120 mL solución de ácido tánico al 10%, y se homogenizó la muestra. Después se ajustó el pH a 4.0, y se homogenizó nuevamente la muestra y se volvió a centrifugar a 9000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se desechó, y al precipitado obtenido se le practicaron 3 lavados con acetona y se centrifugó a 9000 rpm durante 10 min después de cada lavado. El precipitado final obtenido, fue el extracto de polisacáridos (EP) del frijol, el cual fue congelado y sometido a un proceso de liofilización. El rendimiento de polisacáridos se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$EP (\%) = \frac{PF - A}{PI} \times 100\%$$

donde:

EP = Contenido del extracto de polisacáridos en frijol en porcentaje (%)

PF = Peso final del extracto polisacáridos (g) después de la liofilización

A = Sumatoria del contenido en porcentaje (%) de grasa, proteína, cenizas y humedad en el EP determinados como se describen en el apartado 6.4

PI = Peso inicial de la muestra de frijol (g) liofilizada

### 6.2.1. Molienda y tamizado del EP

Se pesaron 50 g del extracto de polisacáridos (EP) liofilizado y fue molido mediante un molino de granos de café y especias marca Krups GX4100, tamizado mediante la malla No. 100 con tamaño de poro de 149  $\mu\text{m}$ . Se obtuvo la fracción EP1 con tamaño de partícula  $\leq 149 \mu\text{m}$  y la fracción EP2 con tamaño de partícula  $> 149 \mu\text{m}$  (retención en malla). Los resultados se expresaron de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\text{Fracción EP1 (\%)} = \frac{\text{Peso del EP sin tamizar (g)}}{\text{Peso de la fracción EP1 (g)}} \times 100$$

$$\text{Fracción EP2 (\%)} = 100 - \text{Fracción EP1 (\%)}$$

### 6.2.2. Proceso de elaboración de yogurt batido y bebida láctea fermentada con adición del EP

El yogurt y bebida se elaboraron de acuerdo a la Norma Mexicana NMX-F-703-COFOCALEC-2004 (Figura 9), se partió de la formulación total tanto para yogurt como para bebida la cual se dividió en una fracción A y en una fracción B, la fracción A que contenía la leche entera en polvo y/o suero en polvo (WPC 34), parte del edulcorante y parte del agua, mientras que la fracción B que contenía el extracto de polisacáridos (EP1), el resto de edulcorante, estabilizante y agua. Ambas fracciones tanto de yogurt como de bebida fueron sometidas a un tratamiento térmico utilizando dos condiciones una a 85 °C, 10 min y la otra a 60 °C, 30 min. Enseguida la fracción A de yogurt y bebida fueron sometidas a un proceso de fermentación (8-9 horas, 42 °C, hasta un pH de 4.2 – 4.5) con la adición de un cultivo láctico comercial marca Danisco el cual incluyó una mezcla de las bacterias lácticas: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus dulbrueckii* Subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*. Terminando el tiempo de fermentación la fracción A del yogurt y bebida se almacenaron a temperatura de refrigeración de 4 – 6°C durante 12 horas. La fracción B de yogurt y bebida después del proceso de pasteurización fue aatemperada a una temperatura de 40 °C y se mezcló manualmente con la fracción A

a la temperatura de refrigeración. Las fracciones una vez mezcladas fueron mantenidas en refrigeración para los análisis posteriores.

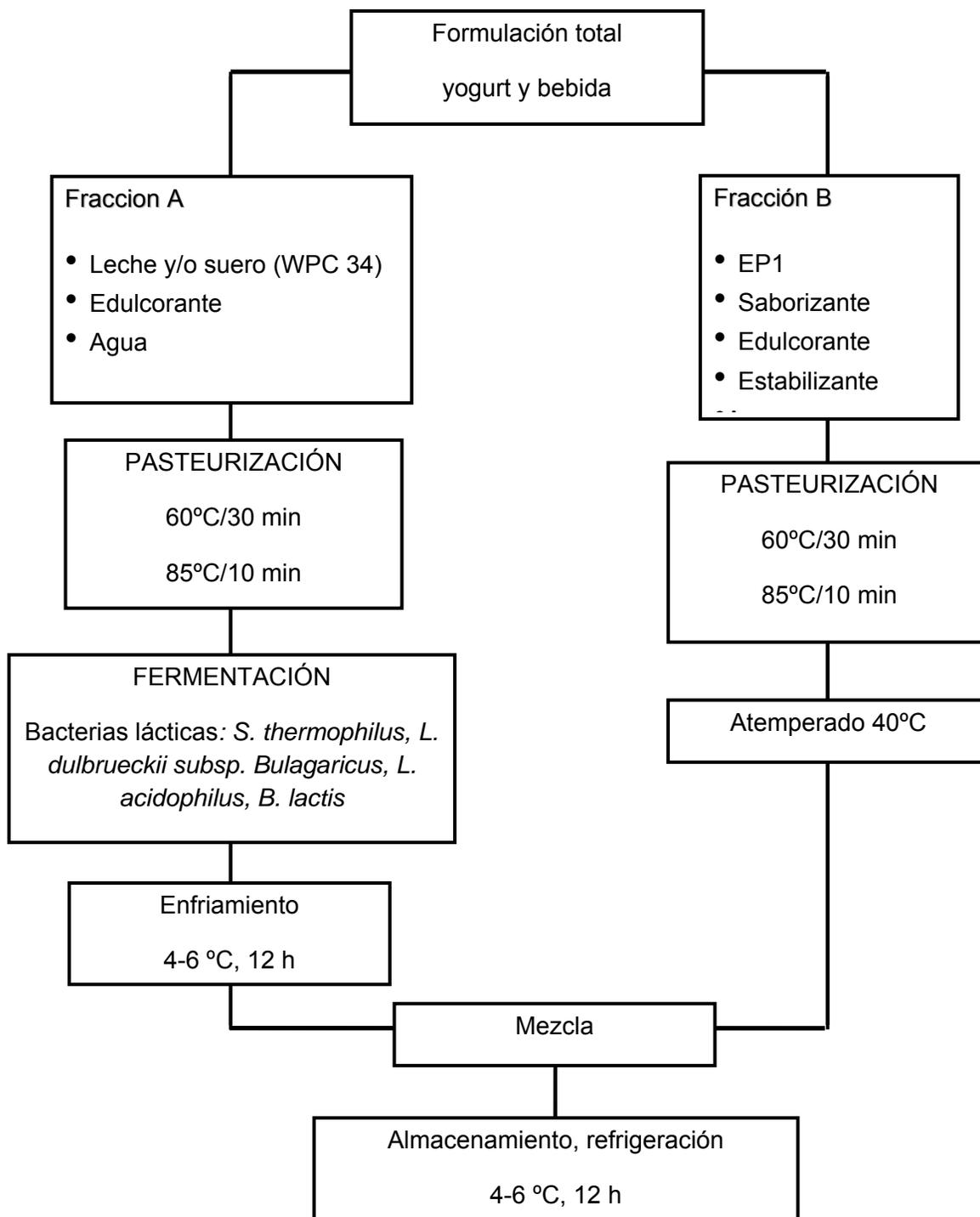


Figura 9. Proceso de elaboración de yogurt y bebida

## **6.2.2. Cuantificación de compuestos fenólicos en EP, yogurt y bebida**

### **6.2.2.1. Extracción metanólica de compuestos fenólicos en EP**

La extracción metanólica de los compuestos fenólicos en extracto de polisacáridos de frijol cocido, se realizó por la técnica descrita por Cardador-Martínez *et al.* (2002a). Brevemente se pesaron 0.2 g de muestra del extracto de polisacáridos, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 50 mL y se le agregaron 10 mL de metanol, la muestra se sometió a agitación durante 24 horas a 25°C. El extracto metanólico obtenido se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min, en donde el sobrenadante obtenido se recuperó y se utilizó para las determinaciones posteriores. Durante la extracción metanólica, la muestra se protegió de la luz para evitar la degradación de los compuestos fenólicos presentes en la misma.

### **6.2.2.1. Extracción metanólica de compuestos fenólicos en yogurt y bebida**

La extracción metanólica de los compuestos fenólicos en yogurt y bebida con adición del EP, se realizó por la técnica descrita por Cardador-Martínez *et al.* (2002a) y Vitarnent *et al.* (2007) con algunas modificaciones. Brevemente para el yogurt con adición del EP1 y control (sin adición del EP1) se pesaron 3 g y para la bebida con adición del EP1 y control (sin adición del EP1) se pesaron 6 g de muestra, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 50 mL y se le agregaron 6 y 5 mL de metanol respectivamente, las muestras se sometieron a agitación durante 24 horas a 25°C. El extracto metanólico obtenido se centrifugó a 9000 rpm durante 10 min, en donde el sobrenadante obtenido se recuperó y se pasó por un filtro con tamaño de poro de 0.45 µm. El sobrenadante se utilizó para las determinaciones posteriores. Durante la extracción metanólica, las muestras se protegieron de la luz para evitar la degradación de los compuestos fenólicos presentes en la misma.

### **6.2.2.2. Cuantificación de taninos condensados en EP, yogurt y bebida**

La cuantificación de taninos condensados se realizó por la técnica de Deshpande y Cheryan (1985, 1987), adaptado para su uso en microplaca. Del sobrenadante de la extracción metanólica, se tomó una alícuota de 50  $\mu$ L como muestra y se colocó en los pozos de la microplaca, se adicionaron 200  $\mu$ L del reactivo de vainillina (vainillina al 1.0 % en metanol y HCl al 8.0 % en metanol en proporción 1:1), para la muestra se preparó un blanco de reactivo con 50  $\mu$ L de metanol mas 200  $\mu$ L de HCl al 4%. Las absorbancias fueron leídas a una longitud de onda de 492 nm en un espectrofotómetro Termo Electron Corporation, Multiskan, Lab-Tech. Instrumentación, S.A. de C.V. La concentración de compuestos fenólicos se calculó en base a una curva de calibración previamente elaborada de (+)-catequina, en donde el coeficiente de correlación  $r^2$  fue cercano a 1.0 (ver anexos) y los resultados se reportaron como mg equivalentes de (+)-catequina por gramo de muestra.

### **6.2.2.3. Cuantificación de flavonoides totales en EP, yogurt y bebida**

La cuantificación de flavonoides totales se realizó por la técnica descrita por Oomah *et al.* (2005), se tomó como muestra una alícuota de 50  $\mu$ L de sobrenadante de la extracción metanólica de polisacáridos y se colocó en los pozos de la microplaca, se adicionaron 180  $\mu$ L de metanol y 20  $\mu$ L de una solución de 2-aminoetil-difenil-borato al 1% en metanol, para la muestra se preparó un blanco con 50  $\mu$ L de muestra mas 200  $\mu$ L de metanol. Las absorbancias fueron leídas a una longitud de onda de 404 nm en un espectrofotómetro Termo Electron Corporation, Multiskan, Lab-Tech. Instrumentación, S.A. de C.V. La concentración de flavonoides totales se calculó en base a una curva de calibración previamente elaborada de rutina en donde el coeficiente de correlación  $r^2$  fue cercano a 1.0 (ver anexos) y los resultados fueron reportados como mg equivalentes de rutina por gramo de muestra.

### 6.2.3. Determinación de capacidad antioxidante en EP, yogurt y bebida

#### 6.2.3.1. Método de DPPH

La determinación de la capacidad antioxidante del EP, yogurt y bebida láctea fermentada por el método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) se realizó de acuerdo a la técnica propuesta por Fukomoto y Mazza (2000). Brevemente, en una placa de 96 pozos se adicionó 20 µL del sobrenadante de la extracción metanólica obtenido de la muestra o trolox (50 – 800 µM) o metanol (control) y 230 µL de solución de DPPH (150 µM). Las muestras se prepararon por triplicado. La placa fue leída a los 0, 4, 10, 30, 90 min a una longitud de onda de 510 nm en un espectrofotómetro Spectra Max 190, Molecular Devices S.A. de C.V. La placa se mantuvo cubierta en la oscuridad y a temperatura ambiente entre lecturas.

Los resultados se expresaron y calcularon de acuerdo a la siguiente fórmula (Burda y Oleszek, 2001):

$$\text{Inhibición \%} = 100 \times (1 - A_{\text{muestra}} / A_{\text{control}})$$

En donde:

$A_{\text{muestra}}$  es la absorbancia de la muestra a 510 nm y  $A_{\text{control}}$  es la absorbancia del control a 510 nm (20 µL mas 230 µL de DPPH).

Se obtuvo una curva de calibración de Trolox y los resultados de capacidad antioxidante se expresaron como µmol de Trolox por g de muestra.

#### 6.2.3.2. Método del ABTS

La determinación de la capacidad antioxidante del EP, yogurt y bebida láctea fermentada por el método de ABTS 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) se realizó de acuerdo a la técnica propuesta por Nenadis *et al.* (2004) y Virtanen *et al.* (2007), adaptado para su uso en microplaca. Brevemente se preparó una solución de ABTS 7 mM en agua destilada y una solución de persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ) 140 mM, se mezclaron 5 mL de la solución de ABTS y 88 µL de la

solución de persulfato de potasio y se dejó reposar durante 12 horas para generar el radical ABTS<sup>•+</sup>, en una placa de 96 pozos se adicionaron 20 µL del sobrenadante obtenido de la extracción metanólica de la muestra o Trolox (50 – 800 µM) o metanol (control) y 230 µL de solución de ABTS<sup>•+</sup> a una absorbancia entre 0.7 – 1.0 (500 µL del radical ABTS<sup>•+</sup> mas 20 mL de etanol). Las muestras se prepararon por triplicado. La placa fue leída al tiempo 0 y 6 min a 734 nm en un espectrofotómetro Spectra Max 190, Molecular Devices S.A. de C.V. La placa se mantuvo cubierta en la oscuridad y a temperatura ambiente.

El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición \%} = 100 \times (1 - A_{\text{muestra}} / A_{\text{control}})$$

En donde:

Porcentaje de inhibición (%) de inhibición es la actividad antioxidante de la muestra,  $A_{\text{muestra}}$  es la absorbancia de la muestra a 734 nm y  $A_{\text{control}}$  es la absorbancia del control a 734 nm.

Se obtuvo una curva de calibración de Trolox y los resultados de capacidad antioxidante se expresaron como µmol de Trolox por g de muestra.

#### **6.2.4. Análisis proximal en EP, yogurt y bebida láctea fermentada**

##### **6.2.4.1. Determinación de proteína por el método de Kjeldahl**

La determinación de proteína se realizó de acuerdo al método propuesto por las Normas Oficiales Mexicanas NMX-F-068-S-1980 y NOM-155-SCFI-2003, la muestra se mezcló y se homogenizó, después se pesaron 0.5 g de muestra y se colocaron en un matraz Kjeldahl. Se le adicionaron 12 g de sulfato de potasio y 1 g de sulfato de cobre pentahidratado junto con 10 mL de ácido sulfúrico y se preparó un blanco con todos los reactivos excepto la muestra.

La digestión de la muestra se realizó por 80 minutos en un digestor hasta una temperatura de 410 – 430 °C aumentando la temperatura gradualmente. Al término

de la digestión la solución fue de color claro y libre de material sin digerir y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Después la muestra se pasó al matraz del destilador Kjeldahl, se adicionaron de 10 a 15 mL de NaOH al 40% y el destilado se recibió a la salida del condensador por medio de un matraz Erlenmeyer de 500 mL con 25 mL de solución de ácido bórico al 4 % con unas gotas de indicador Shiro-Tashiro, asegurándose de que el tubo del condensador se encontrara dentro de la solución de ácido bórico y destilara hasta obtener un volumen por lo menos de 100 mL o hasta que haya pasado todo el amoniaco. Enseguida el destilado se tituló con HCl 0.1 N hasta el vire de color del indicador.

El nitrógeno presente en la muestra se calculó y expresó, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de nitrógeno (\%)} = \frac{V \times N \times 0.014 \times 100}{M}$$

$$\text{Porcentaje de proteína (\%)} = \text{Porcentaje de nitrógeno \%} \times \text{Factor}$$

En donde:

V = es el volumen de ácido clorhídrico empleado en la titulación menos el volumen de ácido clorhídrico empleado en el blanco, mL.

N = es la normalidad del ácido clorhídrico

M = es la masa de la muestra en gramos (g)

0.014 = son los miliequivalentes del nitrógeno

El porcentaje de proteína se obtuvo multiplicando el porcentaje de nitrógeno (%) de nitrógeno obtenido por el factor de 6.38 para yogurt y bebida, 6.25 para el EP.

#### **6.2.4.2. Cuantificación de fibra total (soluble e insoluble)**

La cuantificación de fibra total (soluble e insoluble) se llevó a cabo por el método de Shiga *et al.* (2003).

Para la extracción de *fibra insoluble*, se pesó 1.0 g de muestra y se adicionaron 50 mL de solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.08 M se ajustó el pH a 6.0 con la adición de solución de NaOH 0.275 N ó HCl 0.325 N, después de ajustar el pH, la muestra se incubó con 100 µL de α-amilasa durante 30 min a 95 °C en baño María con agitación cada 5 min, en un frasco cerrado y protegido de la luz.

Después de la incubación, la muestra se atemperó y se ajustó el pH a 7.5 con solución de NaOH 0.275 N, se adicionará 100 µL de proteasa (5 mg/mL) y se incubará la muestra por 30 min a 60 °C con agitación continua.

Enseguida la muestra se atemperó nuevamente y se ajustó el pH a 4.0 – 4.6 con adición de HCl 0.325 N, después se adicionó 300 µL de amiloglucosidasa y la muestra se incubó nuevamente por 30 min a 60 °C con agitación continua.

Al término de la incubación, la muestra se paso por un filtro (Whatman 4 Cat. No. 1004 125) previamente puesto a peso constante, se realizaron dos lavados con agua destilada a 60 °C (10 mL por lavado) volviendo a filtrar después de cada lavado. La *fibra insoluble* obtenida en el filtro se colocó en una estufa para evaporar la humedad y determinar su peso.

Para la extracción de la *fibra soluble*, se colectó lo que no fue retenido en el filtro de la fase de extracción de la fibra insoluble y se recuperó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, se adicionó el mismo volumen de etanol al 80% y se dejó reposar durante 24 horas.

Después del reposo, se paso por un filtro (Whatman 42 Cat. No. 1442 110) previamente puesto a peso constante, el filtrado obtenido fue la fibra soluble y se le realizó un lavado con 10 mL de agua caliente y dos lavados con acetona, volviendo a filtrar después de cada lavado. La fibra soluble obtenida se colocó en una estufa para evaporar el solvente para posteriormente determinar su peso.

El contenido de fibra total se reportó y calculó de acuerdo a la siguiente formula:

$$\% \text{ Fibra total (FT)} = \text{Fibra insoluble (FI)} + \text{Fibra soluble (FS)}$$

En donde:

$$\% \text{ Fibra insoluble (FI)} = \frac{\text{Peso final (g) de fibra insoluble} \times 100 \%}{\text{Peso inicial de muestra (g)}}$$

$$\% \text{ Fibra soluble (FS)} = \frac{\text{Peso final (g) de fibra soluble} \times 100 \%}{\text{Peso inicial de muestra (g)}}$$

### **6.2.4.3. Cuantificación de grasa**

#### **6.2.4.3.1. Cuantificación de grasa en EP. Método Soxhlet**

La cuantificación de grasa para los EP se realizó de acuerdo a la técnica descrita por la Norma Oficial Mexicana NMX-F-089-S-1978 para alimentos. Se pesaron 1.0 g de muestra en el cartucho o dedal y se cubrió con una porción de algodón.

Enseguida el cartucho se colocó dentro del extractor Soxhlet y en la parte inferior se ajustó un matraz (llevado previamente a peso constante por calentamiento a 100 – 110°C). Después se colocó el refrigerante y se agregó éter etílico por el extremo superior del refrigerante en cantidad suficiente para tener 2 ó 3 descargas del extractor (alrededor de 80 ml).

Se hizo circular el agua por el refrigerante y se calentó hasta que se obtuvo una frecuencia de unas 2 gotas por segundo.

Se efectuó la extracción durante 4 a 6 horas, después de terminar la extracción el éter fue recuperado del matraz hasta quedar aproximadamente 1 mL.

Se dejó evaporar el éter restante del matraz y se secó a 100°C hasta peso constante.

El porcentaje de grasa en la muestra se reportó y calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de Extracto Etéreo (\%)} = \frac{P - p}{M} \times 100$$

Donde:

P = Peso en gramos del matraz con grasa.

p = Peso en gramos del matraz sin grasa.

M = Peso en gramos de la muestra.

#### **6.2.4.3.2. Cuantificación de grasa en yogurt y bebida. Método de Gerber**

La determinación de grasa en yogurt y bebida se realizó de acuerdo al método de Gerber siguiendo la metodología propuesta por la Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2003 para productos lácteos. La muestra se mezcló para permitir un reparto homogéneo de la materia grasa. Enseguida en un butirómetro limpio y seco, se introdujo 10 mL de ácido sulfúrico, cuidando de no impregnar el cuello del butirómetro, después se adicionó 11 mL de la muestra deslizándose a lo largo del vidrio, después se adicionó 1.0 mL de alcohol isoamílico, y el butirómetro se agitó por inversión hasta disolución.

A continuación, el butirómetro con la muestra se mantuvo a 65 °C durante 5 min, enseguida se centrifugó durante 5 min a una velocidad de 1000 a 1200 rpm en una centrifuga Gerber.

Una vez concluida la centrifugación, el butirómetro se colocó con la escala hacia arriba en un baño María a 65°C, durante 5 a 10 min.

El contenido de grasa en la muestra se realizó por la diferencia entre la lectura correspondiente al menisco de la parte inferior y superior de la capa de grasa. Los cálculos y la expresión de resultados se realizaron de la siguiente manera:

$$\% \text{ grasa} = B - A$$

En donde:

A es la lectura al inicio (parte inferior) de la columna de grasa en el butirómetro.

B es la lectura de la parte superior de la columna de grasa.

El resultado se expresara directamente en por ciento de la grasa contenida en la leche (% w/v) es decir, g de grasa/100 mL de muestra.

#### **6.2.4.4. Cuantificación de Humedad**

La determinación de humedad se realizó de acuerdo a la técnica descrita por la Norma Oficial Mexicana NMX-F-083-S-1986 para alimentos. Se pesó 1.0 g de muestra en una cápsula de aluminio previamente puesta a peso constante. Enseguida la capsula junto con la muestra se colocó en una estufa a 110 °C durante 6 horas. Después la capsula se transfirió a un desecador se dejó enfriar a la temperatura ambiente y se pesó. Se repitió este mismo procedimiento indicado hasta obtener el peso constante.

Los cálculos y la expresión de resultados se realizaron de la siguiente manera:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(P - p)}{M} \times 100$$

En donde:

P = Peso de la capsula con la muestra húmeda en gramos.

p = Peso de la capsula con la muestra seca en gramos.

M = Peso de la muestra en gramos

#### **6.2.4.5. Cuantificación de cenizas**

La determinación de cenizas se realizó de acuerdo a la técnica descrita por la Norma Oficial Mexicana NMX-F-066-S-1978 para alimentos. En un crisol puesto previamente a peso constante se adicionaron 1.0 g de muestra. Enseguida se colocó el crisol con muestra en una parrilla y se quemó lentamente el material hasta que ya no desprendiera humos, evitando que se proyectara fuera del crisol.

Se llevó el crisol a una mufla y se efectuó la calcinación completa a una temperatura de 550 °C durante 5 horas. Después de la calcinación se dejó enfriar en

la mufla, se transfirió al desecador para su completo enfriamiento y se determinó el contenido de cenizas.

Los cálculos y la expresión de resultados se realizaron de la siguiente manera:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{(P - p)}{M} \times 100$$

M

En donde:

P = Peso del crisol con las cenizas en gramos.

p = Peso de crisol vacío en gramos.

M = Peso de la muestra en gramos

#### **6.2.5. Cuantificación de sólidos totales en yogurt y bebida**

La cuantificación de los sólidos totales se llevó a cabo de acuerdo al método de prueba propuesto por la Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2003. Se cuantificó el contenido de humedad como se describió en el apartado 6.2.4.4 y el contenido de sólidos totales presente en la muestra se calculó y expresó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ sólidos totales} = 100 - \% \text{ humedad}$$

#### **6.2.6. Cuantificación de acidez en yogurt y bebida**

La determinación de acidez se realizó de acuerdo al método de prueba propuesto por la Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2003 y la NMX-F-703-COFOCALEC-2004. Se midieron 20 mL de muestra y se adicionaron 40 mL de agua libre de CO<sub>2</sub>, junto con 2 mL de solución indicadora de fenolftaleína al 1% en alcohol etílico, y se tituló con NaOH 0.1 N hasta la aparición de un color rosado persistente cuando menos 1 min y hasta un pH de 8.3. La determinación de acidez en la muestra se realizó por triplicado.

La acidez presente en la muestra se calculó y expresó, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Acidez titulable (expresada como ácido láctico)} = \frac{V \times N \times \text{Meq} (100)}{M}$$

En donde:

V = Volumen de solución de NaOH 0.1 N, gastados en la titulación en mL

N = Normalidad de la solución de NaOH

Meq = miliequivalente químico del ácido láctico (0.090)

M = Peso de la muestra en gramos

### **6.2.7. Determinación de pH en yogurt y bebida**

Para la medición del pH se realizó de acuerdo al manual de operación del potenciómetro Termo Electron Corporation, basic pH/mV/ORP, Orion 420A+, previamente calibrado.

### **6.2.8. Medición de viscosidad en yogurt y bebida**

La medición de viscosidad se realizó a cada muestra a 20°C mediante un viscosímetro Brookfield DV-II+ con velocidad de torque de 60 RPM y aguja del No. 1 para la bebida y 1.0 RPM y aguja del No. 2 para yogurt. Los valores de viscosidad fueron leídos directamente del equipo y expresados en centipoises (cps).

### **6.2.9. Determinación de sinéresis en yogurt y bebida**

La sinéresis se determinó por el método de Castillo *et al.* (2004). Se pesaron 50 g de muestra y fueron sometidos a una centrifugación a 680 g por 10 min. Se separó el sobrenadante para posteriormente cuantificarlo. El porcentaje (%) de sinéresis se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula.

$$\text{Sinéresis (\%)} = \frac{\text{Peso del suero liberado (sobrenadante) (g)}}{\text{Peso de la muestra (g)}}$$

#### **6.2.10. Determinación de sedimentación en yogurt y bebida**

La sedimentación fue determinada de acuerdo a la técnica propuesta por la Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-173-SCFI-2008 para sólidos no solubles con algunas modificaciones. Se pesaron 50 g de muestra en un tubo Corning, se dejaron reposar a temperatura de refrigeración 4-6°C por 48 horas. Se desechó el sobrenadante por decantación y el sedimento generado fue cuantificado gravimétricamente por la siguiente ecuación:

$$\text{Sedimentación (\%)} = \frac{\text{Peso del sedimento (g)}}{\text{Peso de la muestra (g)}}$$

### **6.2.11. Evaluación sensorial**

La metodología seguida en el estudio sensorial fue la descrita por Escamilla-Santana (1991, 1994) desarrollada en dos etapas con algunas modificaciones.

#### **6.2.11.1. Primera etapa**

El objetivo de la primera etapa fue la de seleccionar el sabor de mayor preferencia. Para ello se prepararon el yogurt y bebida con adición del EP1 en las concentraciones intermedias (1.70% para el yogurt y 0.6% para la bebida) en cuatro sabores comerciales en polvo de la marca Tang al 1.0%, sabor fresa, manzana y mango obtenidos por una encuesta previa como sabores más preferidos por los consumidores a través de una evaluación sensorial preliminar y se incorporo un sabor café marca Nescafe soluble, aprovechando el color oscuro que generó la adición del EP1 al yogurt y bebida además de que permitió ser un sabor nuevo que no existe aun en el mercado.

Se evaluó el orden de preferencia por medio de una prueba de ordenamiento de los cuatro sabores utilizados tanto para el yogurt como para la bebida por medio de la degustación de las muestras proporcionadas por 32 consumidores obtenidos al azar, donde el criterio de selección fue que consumieran yogurt, las muestras fueron ordenadas de acuerdo a una escala del 1 – 4, donde “4” indica mayor preferencia y “1” indica menor preferencia. Cabe destacar que a los consumidores no se les proporcionó ningún tipo de información solo que se trataban de muestras de yogurt y bebida en diferentes sabores (pero sin especificar el sabor utilizado).

#### **6.2.11.2. Segunda etapa**

En la segunda etapa se prepararon el yogurt y bebida con adición del EP1 en las concentraciones intermedias y altas (1.70 y 2.81% para el yogurt y 0.6 y 1.2% para la bebida) en dos sabores de mayor aceptación obtenidos en la evaluación sensorial de la etapa 1 por la prueba de preferencia. Fresa y café para el yogurt, fresa y manzana para la bebida y se compararon con la incorporación por duplicado

de un yogurt y bebida láctea comerciales existentes actualmente en el mercado, sabor fresa (marca Yoplait) para el yogurt y sabor manzana (marca Chamyto) para la bebida láctea fermentada como productos similares.

En esta prueba participaron 103 consumidores obtenidos al azar, donde el criterio de selección fue que consumieran yogurt, se evaluó el nivel de agrado y orden de preferencia de las muestras de yogurt y bebida incluyendo los controles comerciales por medio de una escala hedónica de 7 puntos para el nivel de agrado, donde 7 es “Agrada mucho” y 1 es “Desagrada mucho” y por medio de una escala del 1 – 6 para el orden de preferencia, donde “6” indica mayor preferencia y “1” indica menor preferencia.

Escala hedónica:

- |                            |                           |
|----------------------------|---------------------------|
| 1 – Agrada mucho           | 5 – Desagrada ligeramente |
| 2 – Agrada                 | 6 – Desagrada             |
| 3 – Agrada ligeramente     | 7 – Desagrada mucho       |
| 4 – No agrada ni desagrada |                           |

### **6.2.12. Análisis estadístico**

Tanto para el yogurt como para bebida se utilizó un diseño estadístico de un solo factor completamente aleatorizado, donde el factor fue la concentración utilizada del EP1 en 3 niveles (baja, media y alta), utilizando tres replicas.

El análisis de los resultados se realizó por medio del paquete estadístico JMP 5.0.1, mediante la aplicación de un ANOVA y comparación de medias por prueba de Tukey-Kramer y los resultados son expresados como la media de las determinaciones  $\pm$  error estándar.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### VII.1. Rendimiento de polisacáridos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido

En el Cuadro 3 se muestra el rendimiento de polisacáridos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) de las variedades en estudio. En donde el mayor contenido de polisacáridos lo presentaron las variedades Negro 8025 y Bayo Madero con  $48.61 \pm 0.35$  % y  $51.48 \pm 0.26$  % respectivamente. Por el contrario, el menor contenido de polisacáridos lo presentó la variedad Azufrado Higuera con  $44.30 \pm 0.12$  %.

**Cuadro 3. Contenido de polisacáridos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido.**

Variedad	Contenido de polisacáridos (%)
Negro 8025	$48.61 \pm 0.35$
Pinto Durango	$42.05 \pm 0.04$
Bayo Madero	$51.48 \pm 0.26$
Azufrado Higuera	$44.30 \pm 0.12$

Cada valor representa la media de 3 experimentos independientes  $\pm$  error estándar y se expresan como el contenido de polisacáridos en porcentaje (%) en muestra de frijol liofilizado.

Estos resultados son diferentes a los encontrados por Feregrino-Pérez *et al.* (2008), quienes reportaron un contenido de  $57.5 \pm 0.05$  % de polisacáridos en la variedad de frijol negro 8025 cocido obtenido por la misma técnica. Otros autores Paredes-López *et al.* (2006), Serrano y Goñi, (2004), reportaron un contenido de alrededor de 52 y 76% de carbohidratos de la semilla de frijol seca, sin embargo, dichos carbohidratos están conformados en su mayor parte por polisacáridos.

Las diferencias encontradas pueden ser atribuidas a la cosecha de frijol utilizada en este trabajo, localización de la siembra, clima, condiciones ambientales y el tipo de suelo en el cual se cultivan.

El rendimiento de polisacáridos de acuerdo al tamaño de partícula  $\leq 149 \mu\text{m}$  se presenta en el Cuadro 4. La fracción EP2 se obtuvo de la diferencia  $100 - \text{EP1}$ .

**Cuadro 4. Rendimiento de tamizaje del extracto de polisacáridos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido con tamaño de partícula  $\leq 149$  micras.**

Variedad	EP1 %	EP2 %
Negro 8025	93.83	6.17
Pinto Durango	89.15	10.8
Bayo Madero	90.27	9.73
Azufrado Higuera	92.88	7.12

EP1 = Extracto de polisacáridos con tamaño de partícula  $\leq 149 \mu\text{m}$ .

EP2 = Extracto de polisacáridos con tamaño de partícula  $> 149 \mu\text{m}$ , obtenido por diferencia ( $100 - \text{EP1}$ ).

## **VII.2. Contenido de taninos condensados y flavonoides totales en el extracto de polisacáridos (EP)**

El contenido de taninos condensados y flavonoides totales en el extracto de EP, EP1 y EP2 de las 4 variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en estudio de la cosecha del año 2007 se muestra en el Cuadro 5.

Se observa que para el EP (sin aplicación de proceso de molienda y tamizado) la variedad Negro 8025 presentó el mayor contenido de taninos condensados ( $12.80 \pm 0.26$  mg equivalentes de (+)-catequina/g muestra). Mientras que las variedades Pinto Durango, Bayo Madero y Azufrado Higuera presentaron el menor contenido de taninos condensados ( $4.67 \pm 0.84$ ,  $3.01 \pm 0.25$ ,  $3.27 \pm 0.40$  mg equivalentes de (+)-catequina/g muestra respectivamente).

**Cuadro 5. Contenido de compuestos fenólicos (taninos condensados y flavonoides totales) en el EP de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido.**

Variedad	*Taninos condensados		
	EP	EP1	EP2
Negro 8025	12.80 ± 0.26	10.03 ± 0.70	4.66 ± 0.15
Pinto Durango	4.67 ± 0.84	6.71 ± 0.46	2.66 ± 0.46
Bayo Madero	3.50 ± 0.13	3.06 ± 0.65	0.43 ± 0.04
Azufrado Higuera	3.27 ± 0.40	3.16 ± 0.30	3.56 ± 0.15
Variedad	**Flavonoides totales		
	EP	EP1	EP2
Negro 8025	0.20 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.246 ± 0.002
Pinto Durango	0.12 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.079 ± 0.002
Bayo Madero	0.15 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.063 ± 0.003
Azufrado Higuera	0.22 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.244 ± 0.005

Cada valor representa la media de 3 experimentos independientes ± error estándar.

EP = Extracto de polisacáridos completo, EP1 = Extracto de polisacáridos con tamaño de partícula ≤ 149 µm, EP2 = Extracto de polisacáridos con tamaño de partícula > 149 µm.

\* Los resultados son expresados en mg equiv. (+)-catequina / g muestra liofilizada.

\*\* Los resultados son expresados en mg equiv. rutina / g muestra liofilizada.

Para el contenido de flavonoides totales se observa que la variedad Azufrado Higuera (0.22 ± 0.01 mg equivalentes rutina/g muestra) y la variedad Negro 8025 (0.20 ± 0.01 mg equivalentes rutina/g muestra) presentaron el mayor contenido de estos compuestos. Por otro lado, el menor contenido de flavonoides totales lo presentaron las variedades Pinto Durango (0.12 ± 0.01 mg equivalentes rutina/g muestra) y Bayo Madero (0.15 ± 0.01 mg equivalentes rutina/g muestra).

Los resultados reflejan que el mayor contenido de taninos condensados en la fracción EP1 comparada con la fracción EP2 lo presentaron las variedades Negro 8025, Pinto Durango y Bayo Madero a excepción de la variedad Azufrado Higuera con contenido de taninos condensados similar en ambas fracciones. Mientras que el mayor contenido de flavonoides totales en la fracción EP1 comparada con la fracción EP2 lo presentaron las variedades Negro 8025 y Azufrado Higuera a excepción de las variedades Pinto Durango y Bayo Madero las cuales presentaron un contenido de

flavonoides totales similar en ambas fracciones. Diferencias que pueden ser atribuidas al proceso de molienda al que fue sometido el EP para generar la fracción EP1 la cual representa aproximadamente el 90% del total del EP y la fracción EP2 que representa cerca del 10% del total del EP (Cuadro 4). En donde en la fracción EP2 (tamaño de partícula > 149  $\mu\text{m}$ ) siendo esta la mayoría de la cascarilla de frijol pudieran existir partículas y/o moléculas acomplejadas que no permitan la extracción y cuantificación de taninos condensados y flavonoides totales, mientras que el proceso de molienda pudo haber liberado dichas moléculas acomplejadas por lo que facilitó la cuantificación de taninos condensados y flavonoides en la fracción EP1.

Los resultados obtenidos son diferentes a los reportados por otros investigadores. Por ejemplo, Feregrino-Pérez *et al.* (2008), reportaron un contenido de taninos condensados de  $9.11 \pm 0.27$  mg equivalentes de (+)-catequina/g y un contenido de flavonoides totales de  $1.6 \pm 0.4$  mg equivalentes de rutina/g, para un extracto de polisacáridos de la variedad de frijol Negro 8025 obtenido de la misma manera. Iniestra-González *et al.* (2005) reportaron un contenido de taninos condensados en la semilla de frijol común crudo para variedades mejoradas Negro Durango  $47.09 \pm 11.52$ , Bayo Madero  $77.3 \pm 0.93$ , Pinto Villa  $94.6 \pm 6.50$ , Azufrado Peruano  $87.87 \pm 1.84$  mg equivalentes de (+)-catequina/g. Aparicio-Fernández *et al.* (2005) reportaron un contenido de taninos condensados de  $13.76 \pm 1.2$  y  $5.20 \pm 0.69$  mg equivalentes de (+)-catequina/g almacenado y recién cosechado respectivamente en la semilla de frijol común crudo variedad Negro Jamapa. Oomah *et al.* (2005) reportaron una concentración de 3.38 mg equivalentes de (+)-catequina/g y 0.86 mg de rutina/g para una variedad de frijol negro.

Las diferencias observadas pueden ser atribuidas a la cosecha evaluada ya que para la presente investigación se determinaron los taninos condensados y flavonoides totales en el EP de las semillas de frijol del año 2007, así como a las condiciones climáticas, tipo de suelo donde fue cultivada, y tratamiento térmico (cocción) (Castellanos *et al.*, 1997; De Mejía *et al.*, 2003; Aparicio-Fernández *et al.*, 2005a; Espinosa-Alonso *et al.*, 2006).

Cabe destacar que Iniestra-González *et al.* (2005) reportaron que existe una relación en cuanto a la concentración de taninos condensados y el color de la testa de las variedades evaluadas, ya que en las testas de color negro presentan un mayor contenido de taninos condensados, seguidas por las de color café, amarillas y blancas, misma relación que se obtuvo en este trabajo (cuadro 5).

Es importante señalar que este es el primer trabajo donde se reportan concentraciones de taninos condensados y flavonoides totales en extracto de polisacáridos (EP) para las variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Pinto Durango, Bayo Madero y Azufrado Higuera.

### VII.3. Fibra soluble, insoluble y total en la fracción EP1 y EP2

El contenido de fibra insoluble, soluble y total (suma soluble e insoluble) en el extracto de polisacáridos de la fracción EP1 con tamaño de partícula menor y/o igual a 149  $\mu\text{m}$  de las 4 variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido en estudio se presenta en el Cuadro 6.

**Cuadro 6. Contenido de fibra insoluble, soluble y total en extracto de polisacáridos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido con tamaño de partícula  $\leq 149 \mu\text{m}$  (EP1).**

Variedad	FI %	FS %	FT %
Negro 8025	29.76 $\pm$ 0.04	1.89 $\pm$ 0.08	31.65 $\pm$ 0.28
Pinto Durango	30.30 $\pm$ 0.20	2.32 $\pm$ 0.18	32.62 $\pm$ 0.20
Bayo Madero	31.43 $\pm$ 0.30	2.07 $\pm$ 0.10	33.50 $\pm$ 0.25
Azufrado Higuera	40.73 $\pm$ 0.30	1.29 $\pm$ 0.08	42.02 $\pm$ 0.30

FI = Fibra Insoluble, FS = Fibra Soluble, FT = Fibra total (FI + FS).

Cada valor representa la media de 3 experimentos independientes  $\pm$  error estándar

Diferentes letras en cada columna indican diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ) por la prueba de Tukey.

Se muestra que la variedad Azufrado Higuera presentó el mayor contenido de fibra insoluble (40.73  $\pm$  0.30 %). La variedad Negro 8025 presentó el menor contenido de fibra insoluble (29.76  $\pm$  0.04 %). Por otro lado, el mayor contenido de fibra soluble lo presentó la variedad Pinto Durango (2.32  $\pm$  0.18 %) y el menor

contenido de fibra soluble lo presentó la variedad Azufrado Higuera ( $1.29 \pm 0.08$  %). Por lo tanto, el mayor contenido de fibra total lo presentó la variedad Azufrado Higuera ( $42.02 \pm 0.30$  %), comparada con las otras tres variedades en estudio y el menor contenido de fibra total lo presenta la variedad Negro 8025 ( $31.65 \pm 0.53$  %).

Por otro lado, los resultados de fibra insoluble, soluble y total en la fracción EP2 con tamaño de partícula mayor y/o igual a  $149 \mu\text{m}$  de las 4 variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido en estudio se presentan en el Cuadro 7.

Se muestra que la variedad Negro 8025 presentó el mayor contenido de fibra insoluble, soluble y total ( $63.54 \pm 0.2$ ,  $3.62 \pm 0.25$  y  $67.16 \pm 0.57$  % respectivamente) comparada con las otras tres variedades, mientras que la variedad Azufrado Higuera presentó el menor contenido de fibra insoluble, soluble y total ( $52.88 \pm 0.30$ ,  $1.18 \pm 0.09$  y  $54.06 \pm 0.40$  % respectivamente).

**Cuadro 7. Contenido de fibra insoluble, soluble y total en extracto de polisacáridos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido con tamaño de partícula  $> 149 \mu\text{m}$  (EP2).**

Variedad	FI %	FS %	FT %
Negro 8025	$63.54 \pm 0.20$	$3.62 \pm 0.25$	$67.16 \pm 0.57$
Pinto Durango	$54.78 \pm 0.40$	$3.16 \pm 0.30$	$57.94 \pm 0.47$
Bayo Madero	$58.00 \pm 0.30$	$3.02 \pm 0.19$	$61.02 \pm 0.50$
Azufrado Higuera	$52.88 \pm 0.30$	$1.18 \pm 0.09$	$54.06 \pm 0.40$

FI = Fibra Insoluble, FS = Fibra Soluble, FT = Fibra total (FI + FS).

Cada valor representa la media de 3 experimentos independientes  $\pm$  error estándar

El proceso de tamizado al que fueron sometidos dichos extractos de las cuatro variedades en estudio una vez obtenidos, incrementó el contenido de fibra insoluble en la fracción EP2 (Cuadro 7) y disminuyó el contenido de fibra insoluble en la fracción EP1 (Cuadro 6), resultados que eran de esperarse ya que partículas mayores a  $149 \mu\text{m}$  en la fracción EP2 corresponde en su mayoría a la testa de frijol (cascarilla).

Cabe destacar que estos resultados obtenidos en esta investigación son los primeros reportados para el contenido de fibra en extracto de polisacáridos de las cuatro variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido evaluadas.

#### VII.4. Contenido de grasa, cenizas, humedad y proteína en EP1

En el Cuadro 8 se presenta el contenido de grasa, cenizas, humedad y proteína para los EP1 de las variedades de frijol evaluadas. Se observa que la variedad Negro 8025 presentó el mayor contenido de grasa  $1.58 \pm 0.22\%$ , cenizas  $1.92 \pm 0.02\%$ , humedad  $10.77 \pm 0.07\%$ , pero un menor contenido de proteína  $18.85 \pm 0.09\%$ .

**Cuadro 8. Contenido de grasa, cenizas, humedad, proteína y carbohidratos en EP1.**

Variedad	% Grasa	% Cenizas	% Humedad
Negro 8025	$1.58 \pm 0.22$	$1.92 \pm 0.02$	$10.77 \pm 0.07$
Pinto Durango	$1.48 \pm 0.10$	$1.47 \pm 0.08$	$10.23 \pm 0.05$
Bayo Madero	$1.32 \pm 0.10$	$1.57 \pm 0.07$	$9.40 \pm 0.14$
Azufrado Higuera	$1.29 \pm 0.06$	$1.29 \pm 0.02$	$6.80 \pm 0.08$
Variedad	% Proteína	% Carbohidratos (polisacáridos)*	
Negro 8025	$18.85 \pm 0.09$	$64.55 \pm 0.42$	
Pinto Durango	$21.57 \pm 0.13$	$62.73 \pm 0.20$	
Bayo Madero	$18.99 \pm 0.29$	$66.69 \pm 0.13$	
Azufrado Higuera	$26.80 \pm 0.52$	$61.64 \pm 0.46$	

EP1 = Extracto de polisacáridos de frijol con tamaño de partícula  $\leq 149 \mu\text{m}$ .

Cada valor representa la media de 3 experimentos independientes  $\pm$  error estándar y son expresados en porcentaje (%) en muestra de EP liofilizado.

\* El contenido de carbohidratos fue obtenido por diferencia.

Los carbohidratos (Cuadro 8) son los componentes mayoritarios en la fracción EP1 y como era de esperarse mucho mayor que en la semilla de frijol cocido (cuadro 3). Se ha informado que los carbohidratos están constituidos por polisacáridos, dentro de los que se incluyen al almidón y fibra dietaria, entre otros,

mientras que la fracción de azúcares (mono, di y oligosacáridos) es significativamente menor (Serrano y Goñi, 2004; Paredes *et al.*, 2006).

En las cenizas se ha reportado que se pudieran encontrar minerales como calcio, fósforo, hierro y zinc; así como de ciertas vitaminas hidrosolubles tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B6 y ácido fólico (Serrano y Goñi, 2004; Paredes *et al.*, 2006). Es importante destacar que estos resultados son los primeros que se reportan para extractos de polisacáridos de las cuatro variedades de frijol común evaluadas.

### VII.5. Capacidad antioxidante en EP1

En el Cuadro 9 se presenta la capacidad antioxidante en el EP1 de las cuatro variedades de frijol evaluadas. Se observa que las variedades, Negro 8025, Pinto Durango y Bayo Madero fueron las que presentaron la mayor capacidad antioxidante y la variedad Azufrado higuera fue la que presentó la menor capacidad antioxidante tanto por el método del ABTS como por el DPPH.

**Cuadro 9. Capacidad antioxidante en EP1 por método DPPH y ABTS**

Variedad	Capacidad antioxidante μmol equiv. Trolox / g muestra	
	ABTS	DPPH
Negro 8025	96.62 ± 0.72	172.9 ± 1.39
Pinto Durango	95.84 ± 0.54	153.0 ± 0.07
Bayo Madero	97.19 ± 0.12	174.3 ± 1.39
Azufrado Higuera	40.14 ± 0.17	71.6 ± 0.22

EP1 = Extracto de polisacáridos de frijol con tamaño de partícula ≤ 149 μm.  
Cada valor representa la media de 3 experimentos independientes ± error estándar y son expresados μmol equiv. de Trolox / g muestra.

Se puede observar que los valores de capacidad antioxidante de las cuatro variedades en estudio en los dos métodos evaluados mantuvieron una tendencia muy similar, con valores mayores para el método DPPH y menores para el método ABTS. Sin embargo estas diferencias pueden ser atribuidas a que estudios demuestran que ambos métodos presentan una excelente estabilidad en ciertas

condiciones, aunque también muestran diferencias, por ejemplo, con el método ABTS se cuantifica la actividad de compuestos tanto de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH solo cuantifica la actividad de compuestos con carácter mas lipofílico (Kuskoski *et al.*, 2005).

Por otro lado, no se observó una correlación lineal entre los valores de la actividad captadora de radicales (DPPH• y ABTS•+) y el contenido de taninos condensados y flavonoides totales en la fracción EP1 de las cuatro variedades de frijol (Cuadro 5) ya que la variedad Negro 8025, Pinto Durango y Bayo Madero obtuvieron valores semejantes de capacidad antioxidante en método ABTS. Esto indica claramente que además de los taninos condensados y flavonoides totales, otros compuestos presentes en la fracción EP1 del frijol, pudieran ejercer un papel importante en la actividad captadora del radical DPPH• y ABTS•+, en donde muchos trabajos relacionan la capacidad antioxidante con el contenido de fenoles totales, antocianinas, indicando que cada componente puede contribuir de forma y proporción diferente (Imeh y Khokhar, 2002; Olguin-Contreras *et al.*, 2004; Álvarez *et al.*, 2008)

## **VII.6. Yogurt batido y bebida láctea fermentada con adición del EP1**

Para la elaboración del yogurt batido y de la bebida láctea fermentada se eligió la fracción EP1 con tamaño de partícula menor y/o igual a 149  $\mu\text{m}$  de la variedad Negro 8025 ya que esta variedad presentó cantidades aceptables de compuestos fenólicos (taninos condensados y flavonoides totales), posee capacidad antioxidante además que en estudios previos del grupo de trabajo el consumo del EP de esta variedad presentó inhibición del desarrollo de cáncer de colon inducido químicamente con azoximetano en ratas Sprague-Dawley.

### VII.6.1. Formulación del yogurt batido y bebida láctea fermentada

En pruebas preliminares se utilizaron distintas formulaciones y ajustándose a las características del producto terminado que especifican las Normas Oficiales Mexicanas NOM-185-SSA1-2002 y NMX-703-COFOCALEC-2004 para productos lácteos fermentados, se obtuvo la formulación para yogurt batido y bebida láctea fermentada que se presenta en los Cuadros 10 y 11 respectivamente, en donde los controles se refiere al yogurt y bebida sin adición del EP1 y las modificadas se refiere al yogurt y bebida con adición del EP1 en tres diferentes concentraciones (concentración baja, media y alta) de la variedad de frijol Negro 8025, las concentraciones medias (0.3% para bebida y 1.7% para yogurt) fueron elegidas tomando en consideración la menor sedimentación del EP1 y características sensoriales adecuadas (sabor, olor, color, apariencia, entre otros) durante el almacenamiento en refrigeración del yogurt y de la bebida láctea fermentada. Las concentraciones bajas y altas fueron calculadas a partir de las concentraciones medias de cada producto.

**Cuadro 10. Formulación del yogurt batido con adición del EP1.**

Ingredientes	Formulación	Formulación modificada		
	Control (%)	EP1-1 (%)	EP1-2 (%)	EP1-3 (%)
Leche	12.17	12.17	12.17	12.17
Azúcar	6.70	6.70	6.70	6.70
Fructosa	2.50	2.50	2.50	2.50
Cultivo	0.002	0.002	0.002	0.002
Pectina	0.15	0.15	0.15	0.15
Grenetina	0.30	0.30	0.30	0.30
EP1	0.00	0.56	1.70	2.81
Agua	78.178	77,618	76,478	75,368
Total	100.0	100.0	100.0	100.0

EP1 = Extracto de polisacáridos de frijol variedad Negro 8025 con tamaño de partícula  $\leq 149 \mu\text{m}$ .

Control = Sin adición del EP1.

**Cuadro 11. Formulación de la bebida láctea fermentada con Adición del EP1.**

Ingredientes	Formulación		Formulación modificada	
	Control (%)	EP1-1 (%)	EP1-2 (%)	EP1-3 (%)
WPC 40	3.70	3.70	3.70	3.70
Leche	1.00	1.00	1.00	1.00
Azúcar	4.00	4.00	4.00	4.00
Fructosa	2.00	2.00	2.00	2.00
Cultivo	0.002	0.002	0.002	0.002
Pectina	0.30	0.30	0.30	0.30
Goma guar	0.05	0.05	0.05	0.05
EP1	0.00	0.30	0.60	1.20
Agua	88.948	88.648	88.348	87.748
<b>Total</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>

EP1 = Extracto de polisacáridos de frijol variedad Negro 8025 con tamaño de partícula  $\leq 149 \mu\text{m}$ .

Control = Sin adición del EP1.

Los ingredientes y cantidades utilizados en estas formulaciones son permitidos por las Normas Oficiales Mexicanas mencionadas anteriormente, en donde el azúcar y la fructosa son utilizados principalmente para impartir dulzor y atenuar la acidez del producto, mientras que la gretina, pectina y goma guar son ampliamente utilizados en la industria ya que su finalidad es funcionar como estabilizantes manteniendo las características deseables del yogurt y bebida como textura, viscosidad, consistencia, aspecto y cuerpo (Tamime y Robinson, 1991; Pauletti *et al.*, 2003; Castillo *et al.*, 2004).

### **VII.6.2. Tiempos y temperaturas de Pasteurización**

Con el fin de evaluar la estabilidad del yogurt y bebida láctea fermentada se utilizaron dos temperaturas y tiempo de pasteurización (85 °C, 10 min y 60 °C, 30 min). En el Cuadro 12 se presentan los valores de viscosidad, porcentaje de sinéresis (%) y porcentaje de sedimentación (%), en donde, la sinéresis es la cantidad de suero que fue liberada cuando la muestra se sometió a una fuerza centrífuga (680 g, 10 min) y el % sedimentación se refiere a las partículas del EP1 y

de proteína láctea presentes en el fondo de la muestra después de permanecer en reposo 24 horas, en donde valores elevados de sinéresis, baja viscosidad, indican poca estabilidad del producto terminado y dependen en gran medida del tipo de producto lácteo fermentado en cuestión (Tamime y Robinson, 1991; Díaz-Jiménez *et al.*, 2004; Rincón *et al.*, 2005).

**Cuadro 12. Valores de viscosidad, sinéresis y sedimentación del yogurt y bebida láctea fermentada con adición del EP1 utilizando 2 condiciones de pasteurización.**

Muestra	Viscosidad (cps)		% Sinéresis	
	*1	*2	*1	*2
Yogurt control	6100 ± 26.4 <sup>D</sup>	3063 ± 8.80 <sup>D</sup>	15.08 ± 1.1 <sup>A</sup>	12.71 ± 0.9 <sup>C</sup>
Yogurt EP1-1	6413 ± 34.8 <sup>C</sup>	3125 ± 25.0 <sup>C</sup>	15.05 ± 1.4 <sup>A</sup>	14.70 ± 1.4 <sup>AB</sup>
Yogurt EP1-2	11755 ± 86.7 <sup>B</sup>	4810 ± 5.77 <sup>B</sup>	13.04 ± 0.2 <sup>A</sup>	14.14 ± 0.9 <sup>C</sup>
Yogurt EP1-3	13020 ± 11.5 <sup>A</sup>	5126 ± 14.5 <sup>A</sup>	17.16 ± 0.8 <sup>A</sup>	18.42 ± 0.8 <sup>C</sup>
Bebida control	65.1 ± 0.10 <sup>a</sup>	31.2 ± 0.02 <sup>a</sup>	70.63 ± 0.9 <sup>a</sup>	85.09 ± 0.3 <sup>a</sup>
Bebida EP1-1	70.7 ± 0.08 <sup>a</sup>	29.2 ± 0.05 <sup>a</sup>	64.16 ± 2.7 <sup>ab</sup>	86.06 ± 0.3 <sup>a</sup>
Bebida EP1-2	86.9 ± 0.10 <sup>a</sup>	30.7 ± 0.14 <sup>a</sup>	62.30 ± 0.8 <sup>b</sup>	84.87 ± 0.3 <sup>a</sup>
Bebida EP1-3	90.3 ± 0.08 <sup>a</sup>	29.8 ± 0.08 <sup>a</sup>	54.10 ± 1.0 <sup>c</sup>	81.08 ± 0.2 <sup>a</sup>

Muestra	% Sedimentación	
	*1	*2
Yogurt control	ND	ND
Yogurt EP1-1	ND	ND
Yogurt EP1-2	ND	ND
Yogurt EP1-3	ND	ND
Bebida control	ND	5.5 ± 0.3 <sup>b</sup>
Bebida EP1-1	ND	6.8 ± 0.2 <sup>b</sup>
Bebida EP1-2	ND	8.7 ± 0.6 <sup>b</sup>
Bebida EP1-3	10.9 ± 0.87	12.6 ± 0.9 <sup>a</sup>

EP1 = Extracto de polisacáridos con tamaño de partícula ≤149 μm.

Bebida con adición del EP1, EP1-1 = 0.3 %, EP1-2 = 0.6 %, EP1-3 = 1.2 %.

Yogurt con adición del EP1, EP1-1 = 0.58 %, EP1-2 = 1.7 %, EP1-3 = 2.81 %. cps = centipoises.

\*1 = Pasteurización 85°C, 10 min, \*2 = Pasteurización 60°C, 30 min, ND = Valor no detectado.

Cada valor representa la media de 3 experimentos independientes ± error estándar.

Diferentes letras en cada columna indican diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ) por la prueba de Tukey.

Es importante destacar que valores de viscosidad, sinéresis o sedimentación no se legislan en la actualidad en las Normas Oficiales Mexicanas, si no que estos valores dependen en gran medida de las características propias de cada producto en cuanto a su formulación y como estos valores pueden influir en la aceptación por los consumidores.

Se observa que la pasteurización a 85°C, 10 min comparado con la pasteurización a 60°C, 30 min, permite obtener un yogurt y una bebida con mayor viscosidad. En el yogurt la sinéresis se mantuvo constante en las dos condiciones de pasteurización evaluadas, mientras que en la bebida se observa que a la pasteurización de 85°C, 10 min existe menor sinéresis con respecto a la pasteurización de 60°C, 30 min. Por otro lado en el yogurt no se observó sedimentación en las dos condiciones de pasteurización probadas, mientras que en la bebida solo se observó sedimentación tanto del EP1 como de proteína láctea en las bebidas pasteurizadas a 60°C, 30 min, así como en la bebida pasteurizada a 85°C, 10 min a la concentración alta del EP1.

La adición del EP1 en la bebida y yogurt EP1-(1-3) incrementó el valor de la viscosidad y fue dependiente de la concentración del EP1 comparados con su control sin adición del EP1, en donde, no se observó un incremento lineal en la viscosidad con la adición del EP1. Ya que dicho incremento va depender del grado de interacción generado por parte de los hidrocoloides (fibra soluble) presentes en el EP1 y las proteínas propias de la leche (caseínas) quienes forman una red tridimensional de gran estabilidad que atrapa en su interior el agua y el resto de los componentes (Castillo *et al.*, 2004).

Los resultados son diferentes a los encontrados por Morales de León *et al* (2000), quienes informaron una viscosidad de 5800 cps para un yogurt con base en una mezcla de leche y extracto de garbanzo (*Cicer arietinum*), Castillo *et al.* (2004) reportaron una viscosidad alrededor de 26000 cps y una sinéresis de aproximadamente de 5% para un yogurt con adición de 0.15% de pectina como estabilizante. Rincón *et al.* (2005) informaron una viscosidad de 1088 cps y 14.02% de sinéresis para un yogurt líquido en base a leche semi-descremada y con adición de goma al 0.20% (polisacárido obtenido de la planta *Enterolobium cyclocarpum*), Londoño-Urbe *et al.* (2008) reportaron una viscosidad de 46.0 cps para una bebida de suero de queso fresco fermentado. Diferencias con los resultados obtenidos en este proyecto que pueden ser atribuidas a la formulación tanto del yogurt como de la

bebida láctea fermentada utilizada en esta investigación, así como al proceso de pasteurización utilizado.

Los resultados a 85°C/10 min concuerdan con lo sugerido a nivel industrial donde se recomienda utilizar temperaturas de pasteurización mayores a 80°C para la elaboración de productos lácteos fermentados, ya que a temperaturas altas se desnaturalizan las proteínas del lactosuero (albúmina sérica,  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina e inmonoglobulinas) que reaccionan con las caseínas formando micelas mas estables y durante la fermentación los agregados de micelas de caseína se van asociando y coagulan parcialmente a medida que el pH se aproxima a su punto isoeléctrico (4.6-4.7), en donde es probable que la interacción de la  $\beta$ -lactoglobulina/ $\alpha$ -lactoalbúmina con la k-caseína a través de grupos SH formen puentes disulfuro que protegen parcialmente a las micelas formadas frente a una ruptura o desestabilización, por lo que la red del gel o matriz queda formada por una estructura regular que atrapa en su interior al resto de los componentes de la mezcla base, incluyendo a la fase acuosa y por lo tanto este hecho permite obtener productos con mayor viscosidad y menor sinéresis (observado sólo en bebida) como los resultados encontrados en esta investigación (Tamime y Robinson, 1991).

Mientras la pasteurización de 85°C, 10 min fue la más recomendada, se comparó con una pasteurización a 60°C, 30 min elegida ya que una temperatura mayor de pasteurización se pensó que se pudieran degradar los taninos condensados presentes en el EP1. Sin embargo por medio de pruebas preliminares se observó que el contenido de taninos condensados, así como el de fibra soluble, insoluble y total en ambas condiciones de pasteurización no presentaron diferencia estadística significativa.

Por lo tanto, debido a que la pasteurización a 85°C. 10 min, permitió obtener yogurts con mayor viscosidad y bebidas lácteas fermentadas con menor sinéresis, así como menor sedimentación, se decidió trabajar con esta temperatura y tiempo tanto para el yogurt como para la bebida por lo que los resultados posteriores que se presentan son referidos a estas condiciones de pasteurización.

### VII.6.3. Sólidos totales, pH y acidez

Una vez elaborados el yogurt batido y la bebida láctea fermentada con la adición del EP1 obtenido del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Negro 8025, se les determinaron los sólidos totales y pH como se muestra en los Cuadros 13 y 14 como parámetros de calidad que deben cumplir de acuerdo a las Normas Oficiales Mexicanas para el consumo de estos productos. En donde, los controles corresponden a la bebida y yogurt sin adición del EP1, la bebida y yogurt EP1-(1-3) corresponden a la adición del EP1 en las tres diferentes concentraciones utilizadas.

**Cuadro 13. Sólidos totales (ST), pH y acidez en bebida láctea fermentada con adición del EP1 de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido de la variedad Negro 8025.**

Bebida	ST (%)	pH	Acidez (%)
Control	7.51 ± 0.06 <sup>d</sup>	3.85 ± 0.050 <sup>a</sup>	0.69 ± 0.01 <sup>c</sup>
EP1-1	8.87 ± 0.09 <sup>c</sup>	3.74 ± 0.024 <sup>a</sup>	0.71 ± 0.01 <sup>bc</sup>
EP1-2	9.42 ± 0.05 <sup>b</sup>	3.73 ± 0.044 <sup>a</sup>	0.72 ± 0.01 <sup>ab</sup>
EP1-3	10.0 ± 0.08 <sup>a</sup>	3.74 ± 0.029 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.01 <sup>a</sup>

EP1 = Extracto de polisacáridos con tamaño de partícula ≤149 µm.

Bebida con adición del EP1, EP1-1 = 0.3 %, EP1-2 = 0.6 %, EP1-3 = 1.2 %.

Cada valor representa la media de 3 experimentos independientes ± error estándar

Diferentes letras en cada columna indican diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ) por la prueba de Tukey.

ST = 5.1% min, pH < 4.5, Acidez = 0.7% min, especificaciones en NMX-F-703-COFOCALEC-2004.

**Cuadro 14. Cuadro Sólidos totales, pH y acidez en yogurt batido con adición del EP1 de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido de la variedad Negro 8025.**

Yogurt	ST (%)	pH	Acidez (%)
Control	16.5 ± 0.20 <sup>b</sup>	4.28 ± 0.020 <sup>b</sup>	0.71 ± 0.01 <sup>b</sup>
EP1-1	17.2 ± 0.20 <sup>b</sup>	4.31 ± 0.011 <sup>ab</sup>	0.74 ± 0.01 <sup>ab</sup>
EP1-2	18.6 ± 0.04 <sup>b</sup>	4.32 ± 0.005 <sup>ab</sup>	0.75 ± 0.01 <sup>ab</sup>
EP1-3	19.4 ± 0.10 <sup>a</sup>	4.35 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.01 <sup>a</sup>

EP1 = Extracto de polisacáridos con tamaño de partícula ≤149 µm.

EP1-1 = 0.58 %, EP1-2 = 1.7 %, EP1-3 = 2.81 %.

Cada valor representa la media de 3 experimentos independientes ± error estándar

Diferentes letras en cada columna indican diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ) por la prueba de Tukey.

ST = 5.1% min, pH < 4.5, Acidez = 0.7% min, especificaciones en NMX-F-703-COFOCALEC-2004.

La adición del EP1 en la bebida y yogurt EP1-(1-3) (Cuadro 13 y 14) incrementó el contenido de sólidos. Mientras que los valores de pH permanecieron entre 3.73 y 3.85 para las bebidas evaluadas (bebida EP1-(1-3)) incluyendo a la bebida control, y valores de pH entre 4.28 y 4.35 para los yogurt evaluados (yogurt EP1-(1-3)) incluyendo al yogurt control, sin adición del EP1. De estos resultados se observa que la incorporación del EP1 no modifica el valor de pH, ni el valor de acidez en gran medida con respecto a sus controles sin adición del EP1, ya que estos se mantienen entre 0.69 – 0.75% ácido láctico para la bebida láctea fermentada y 0.71 - 0.75% ácido láctico para el yogurt batido.

Cabe señalar que los valores de pH y acidez determinados en esta investigación se encontraron dentro de los límites establecidos por las Normas Oficiales Mexicanas “NOM-185-SSA1-2002” y la “NMX-F-703-COFOCALEC-2004” para productos lácteos fermentados.

Los resultados son diferentes a los reportados por otros autores. Por ejemplo, Díaz-Jiménez *et al.* (2004), reportaron valores de pH > 4 para un yogurt con adición de trigo (como fuente de fibra) y bajo en grasa. Morales de León *et al.* (2000) reportaron valores de pH de 4.2, 1.8% acidez y 11.6% de sólidos totales para un yogurt firme con base en una mezcla de leche y extracto de garbanzo (*Cicer arietinum*) 80:20. Miranda-Miranda *et al.* (2007) informaron un contenido de sólidos totales de  $17.21 \pm 0.83\%$  y acidez de  $0.71\% \pm 0.02$ , Londoño-Urbe *et al.* (2008) reportaron un contenido de sólidos totales de 17.0% y acidez de 0.3 % para una bebida de suero fermentado, Blanco *et al.* (2006) al elaborar un yogurt con mezclas de azúcares (aspartame y fructosa) y pulpas de fruta (mango, piña y maracuyá) encontraron un contenido entre 0.82 y 0.86% de acidez.

Estas diferencias pueden ser atribuidas a la temperatura y tiempo de fermentación utilizado, cantidad y composición de bacterias del cultivo láctico adicionado, composición y características de los ingredientes utilizados en la formulación del yogurt y bebida láctea fermentada elaborados en esta investigación.

#### VII.6.4. Contenido de taninos condensados

En el Cuadro 15 se presenta el contenido de taninos condensados en bebida láctea fermentada y yogurt batido. Se observa que el contenido de taninos condensados se incrementó con la adición del EP1 y fue dependiente de la concentración adicionada de dicho extracto de polisacáridos tanto en la bebida como en el yogurt evaluados (EP1-(2-3)) con respecto a la bebida y yogurt control sin adición del EP1. Existe mayor cantidad de taninos condensados en el yogurt comparado con la bebida ya que este incluyó una mayor concentración del EP1 en las tres diferentes concentraciones evaluadas. El contenido de taninos condensados no se relacionó linealmente con el incremento del EP1 ya que dichos compuestos pudieran ser acomplejados con macromoléculas y proteínas de la leche por lo cual pueden dificultar su cuantificación (Otero e Hidalgo, 2004). Tanto el yogurt y bebida control sin adición del EP1 presentaron un contenido de taninos condensados resultados que pueden ser atribuidos a errores propios de la técnica utilizada ya que como se trata de una técnica espectrofotométrica otras sustancias y/o la interacción entre ellas diferentes a los taninos condensados pudieran cuantificarse a la longitud de onda evaluada con esta técnica, entre dichas sustancias se encuentran las vitaminas D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub> (Schüep, 1997) presentes como suplemento en la leche en polvo utilizada en la elaboración de yogurt y bebida.

**Cuadro 15. Cuadro Contenido de taninos condensados en bebida láctea fermentada y yogurt con adición del extracto de polisacáridos (EP1) de frijol cocido de la variedad Negro 8025.**

Bebida	Taninos condensados*	Yogurt	Taninos condensados*
Control	4.0 ± 0.3 <sup>b</sup>	Control	12.0 ± 1.0 <sup>b</sup>
EP1-1	4.4 ± 0.2 <sup>b</sup>	EP1-1	13.0 ± 7.0 <sup>b</sup>
EP1-2	10.9 ± 0.7 <sup>a</sup>	EP1-2	41.0 ± 5.0 <sup>a</sup>
EP1-3	13.0 ± 0.5 <sup>a</sup>	EP1-3	52.0 ± 5.0 <sup>a</sup>

EP1 = Extracto de polisacáridos con tamaño de partícula ≤149 µm.

Bebida EP1-1 = 0.3 %, EP1-2 = 0.6 %, EP1-3 = 1.2%.

Yogurt EP1-1 = 0.58 %, EP1-2 = 1.7 %, EP1-3 = 2.81 %.

Cada valor representa la media de 3 experimentos independientes ± error estándar. Diferentes letras en cada columna indican diferencia significativa (α = 0.05) por la prueba de Tukey.

\* Los resultados son expresados en µg equiv. (+)-catequina / g muestra liofilizada.

La adición del EP1 a una bebida láctea fermentada y a un yogurt batido incrementa el contenido de taninos condensados, lo que dará como resultado la obtención de productos enriquecidos con cantidades de taninos condensados aceptables, ya que diversos estudios han demostrado que estos compuestos están implicados en la prevención de enfermedades crónico-degenerativas. Si se consume una ración de 100 g de yogurt o bebida en las tres concentraciones evaluadas aportarían entre 1.0 – 5.0 mg de taninos condensados que corresponde entre 0.1 – 0.5 % de la ingesta diaria recomendada de compuestos fenólicos (1.0 g/día).

#### VII.6.5. Contenido de fibra

Los Cuadros 16 y 17, muestran el contenido de fibra soluble, insoluble y total para el yogurt y bebida, la adición del EP1 tanto en el yogurt como en la bebida incrementó el valor de fibra total, así como el valor de fibra soluble e insoluble y es dependiente de la concentración del EP1 adicionada con respecto al yogurt y bebida control sin adición del EP1.

**Cuadro 16. Cuadro Contenido de fibra insoluble, soluble y total en yogurt batido con adición de extracto de polisacáridos (EP1) de frijol cocido de la variedad Negro 8025.**

Yogurt	FI (%)	FS (%)	FT (%)
Control	0.088 ± 0.007 <sup>c</sup>	0.252 ± 0.006 <sup>c</sup>	0.340 ± 0.013 <sup>d</sup>
EP1-1	0.175 ± 0.030 <sup>c</sup>	0.397 ± 0.009 <sup>c</sup>	0.572 ± 0.040 <sup>c</sup>
EP1-2	0.661 ± 0.031 <sup>b</sup>	1.182 ± 0.060 <sup>b</sup>	1.843 ± 0.038 <sup>b</sup>
EP1-3	1.501 ± 0.027 <sup>a</sup>	1.746 ± 0.073 <sup>a</sup>	3.247 ± 0.070 <sup>a</sup>

EP1 = Extracto de polisacáridos con tamaño de partícula ≤149 μm.

EP1-1 = 0.58 %, EP1-2 = 1.7 %, EP1-3 = 2.81 %.

FI = Fibra Insoluble, FS = Fibra Soluble, FT = Fibra total (FI + FS).

Cada valor representa la media de 3 experimentos independientes ± error estándar.

Diferentes letras en cada columna indican diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ) por la prueba de Tukey.

**Cuadro 17. Contenido de fibra insoluble, soluble y total en bebida láctea fermentada con adición de extracto de polisacáridos (EP1) de frijol cocido de la variedad Negro 8025.**

Bebida	FI (%)	FS (%)	FT (%)
Control	0.016 ± 0.002 <sup>c</sup>	0.064 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.080 ± 0.013 <sup>c</sup>
EP1-1	0.131 ± 0.004 <sup>b</sup>	0.281 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.412 ± 0.024 <sup>b</sup>
EP1-2	0.152 ± 0.007 <sup>b</sup>	0.240 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.392 ± 0.030 <sup>b</sup>
EP1-3	0.337 ± 0.009 <sup>a</sup>	0.415 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.752 ± 0.016 <sup>a</sup>

EP1 = Extracto de polisacáridos con tamaño de partícula ≤149 μm.

EP1-1 = 0.3 %, EP1-2 = 0.6 %, EP1-3 = 1.2%.

FI = Fibra Insoluble, FS = Fibra Soluble, FT = Fibra total (FI + FS).

Cada valor representa la media de 3 experimentos independientes ± error estándar.

Diferentes letras en cada columna indican diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ) por la prueba de Tukey.

Resultados reportados para fibra en yogurt con extracto de polisacáridos no existen en la literatura, sin embargo, Granito *et al.* (2004) reportaron un contenido de  $5.74 \pm 0.1$  % y  $18.29 \pm 0.2$  % de fibra insoluble y soluble respectivamente para una bebida láctea fermentada sabor a mango en base a una mezcla de leche y extracto de frijol (*Vigna sinensis*) 90:10 y un contenido de  $11.57 \pm 0.5$  % y  $39.02 \pm 0.3$  % de fibra insoluble y soluble respectivamente para una bebida láctea fermentada sabor a mango en base a una mezcla de leche y extracto de frijol (*Phaseolus vulgaris*). En donde las diferencias observadas pueden ser atribuidas a que estos autores utilizaron el extracto de frijol *Vigna sinensis* y *Phaseolus vulgaris* de manera entera y en mayor concentración, atribuyendo también dichas diferencias a la formulación e ingredientes utilizados en el desarrollo de estos productos. Por lo que es importante mencionar la contribución de este proyecto al ser el primero en reportar fibra en yogurt y bebida láctea fermentada con adición del EP1 de la variedad de frijol Negro 8025.

La adición del EP1 permitirá proponer la elaboración de productos enriquecidos con cantidades de fibra aceptables, asumiendo que si se consume aproximadamente 300 g de la bebida láctea fermentada o yogurt batido en las tres diferentes concentraciones evaluadas, proveerá aproximadamente entre el 5 y 30%

de la ingesta diaria recomendada de fibra (IDR 25 – 30 g/día). Lo que podría sugerirse el consumo ya sea de la bebida láctea fermentada ó el yogurt batido como una ración.

#### VII.6.6. Capacidad antioxidante en yogurt y bebida con adición del EP1

En el cuadro 18 se presenta la capacidad antioxidante en yogurt y bebida con adición del EP1 de la variedad negro 8025. Se observa que el control sin adición del EP1 en ambos productos presenta capacidad antioxidante que pudiera ser atribuida a otros componentes como la vitamina A (Márquez *et al.*, 2002), y péptidos bioactivos que pueden ser originados por acción de enzimas de bacterias ácido lácticas durante la fermentación del yogurt y bebida, ya que estudios demuestran que dichos péptidos poseen capacidad antioxidante y son capaces de atrapar radicales libres (Vitarnen *et al.*, 2007).

**Cuadro 18. Capacidad antioxidante en yogurt y bebida con adición del EP1 de la variedad de frijol Negro 8025.**

Muestra	Capacidad antioxidante μmol equiv. Trolox / g muestra	
	ABTS	DPPH
Yogurt control	0.78 ± 0.04 <sup>D</sup>	0.29 ± 0.02 <sup>D</sup>
Yogurt EP1-1	2.12 ± 0.08 <sup>C</sup>	1.86 ± 0.07 <sup>C</sup>
Yogurt EP1-2	3.21 ± 0.09 <sup>B</sup>	3.51 ± 0.15 <sup>B</sup>
Yogurt EP1-3	4.65 ± 0.20 <sup>A</sup>	5.20 ± 0.08 <sup>A</sup>
Bebida control	0.01 ± 0.003 <sup>d</sup>	ND
Bebida EP1-1	0.26 ± 0.024 <sup>c</sup>	0.24 ± 0.02 <sup>c</sup>
Bebida EP1-2	0.45 ± 0.026 <sup>b</sup>	0.62 ± 0.02 <sup>b</sup>
Bebida EP1-3	0.90 ± 0.058 <sup>a</sup>	1.33 ± 0.03 <sup>a</sup>

EP1 = Extracto de polisacáridos con tamaño de partícula ≤149 μm.

Bebida con adición del EP1, EP1-1 = 0.3 %, EP1-2 = 0.6 %, EP1-3 = 1.2 %.

Yogurt con adición del EP1, EP1-1 = 0.58 %, EP1-2 = 1.7 %, EP1-3 = 2.81 %.

ND = Valor no detectado.

Cada valor representa la media de 3 experimentos independientes ± error estándar son expresados μmol equiv. de Trolox / g muestra.

Diferentes letras en cada columna indican diferencia significativa (α = 0.05) por la prueba de Tukey.

La capacidad antioxidante se incrementó cuando se enriquecieron estos productos con la adición del EP1 de manera dosis dependiente en los dos métodos evaluados (ABTS y DPPH). Esto era de esperarse ya que el EP1 de frijol Negro 8025 presentó capacidad antioxidante (Cuadro 9). El yogurt fue el que presentó la mayor capacidad antioxidante comparada con la bebida ya que este contiene mayor contenido del EP1.

## VII.7. Evaluación sensorial

### VII.7.1. Primera etapa. Prueba de ordenamiento de 4 sabores utilizados en yogurt y bebida con adición del EP

Al yogurt y bebida con la adición del EP1 en las concentraciones intermedias (1.70% para el yogurt y 0.6% para la bebida) elaborados en 4 sabores diferentes, se les practicó una prueba de preferencia que consistió en elegir de los cuatro sabores proporcionados tanto para yogurt como para bebida el(los) sabor(es) de mayor preferencia por medio de la degustación de 32 consumidores obtenidos al azar. Los resultados se presentan en el Cuadro 19.

**Cuadro 19. Orden de preferencia de 4 sabores utilizados en el yogurt y bebida láctea fermentada con adición del EP1 frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido de la variedad Negro 8025.**

Yogurt		Bebida	
Sabor	Orden de preferencia*	Sabor	Orden de preferencia*
EP1-2-Fresa	2.87 ± 0.18 <sup>a</sup>	EP1-2-Manzana	3.31 ± 0.15 <sup>a</sup>
EP1-2-Café	2.65 ± 0.21 <sup>ab</sup>	EP1-2-Fresa	3.18 ± 0.15 <sup>a</sup>
EP1-2-Manzana	2.37 ± 0.20 <sup>ab</sup>	EP1-2-Mango	1.84 ± 0.14 <sup>b</sup>
EP1-2-Mango	2.09 ± 0.17 <sup>b</sup>	EP1-2-Café	1.68 ± 0.15 <sup>b</sup>

EP1 = Extracto de polisacáridos con tamaño de partícula ≤149 μm.

Para la bebida la concentración del EP1 utilizado es 0.6% y sabor al 1.0%.

Para el yogurt la concentración del EP1 utilizado es 1.7% y sabor 1.0%.

Cada valor representa la media de 32 consumidores que evaluaron las muestras ± error estándar.

Diferentes letras en cada columna indican diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ) por la prueba de Tukey.

\* Los resultados son expresados como el orden de preferencia en una escala del 1-4, donde valores cercanos a "4" indican mayor preferencia y valores cercanos a "1" indican menor preferencia.

En el yogurt los sabores que presentaron mayor preferencia fueron los sabores fresa y café comparados con los sabores manzana y mango con la adición de 1.7% del EP1 de frijol variedad Negro 8025. En cambio los sabores de mayor preferencia en la bebida fueron los sabores manzana y fresa comparados con los sabores mango y café con la adición de 0.6% del EP1 de frijol variedad Negro 8025. Siendo estos sabores los que lograron generar mayor preferencia en los productos evaluados y siendo el sabor fresa el preferido en ambos productos.

### VII.7.2. Segunda etapa. Nivel de agrado y prueba de ordenamiento de yogurt y bebida con adición del EP1

La siguiente prueba consistió en la degustación por 103 consumidores del yogurt y bebida con la adición del EP1 en la concentración alta e intermedia y con la aplicación de los sabores de mayor preferencia obtenidos en la primera etapa de la evaluación sensorial así también se incorporaron controles comerciales por duplicado de yogurt y bebida como productos similares y se evaluó el nivel de agrado y orden de preferencia que se presentan en el Cuadro 20 y 21.

**Cuadro 20. Nivel de agrado en yogurt y bebida láctea fermentada y con adición de sabor y del EP de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido de la variedad Negro 8025.**

Yogurt		Bebida	
Sabor	Nivel de agrado*	Sabor	Nivel de agrado*
Control-Fresa	6,32 ± 0.10 <sup>a</sup>	EP1-2-Manzana	5,39 ± 0.15 <sup>a</sup>
Control-Fresa	6,25 ± 0.11 <sup>a</sup>	EP1-3-Manzana	5,02 ± 0.15 <sup>a</sup>
EP1-2-Café	4,66 ± 0.15 <sup>b</sup>	EP1-2-Fresa	3,89 ± 0.15 <sup>b</sup>
EP1-2-Fresa	4,07 ± 0.17 <sup>c</sup>	Control-Manzana	3,86 ± 0.17 <sup>b</sup>
EP1-3-Café	3,88 ± 0.17 <sup>c</sup>	Control-Manzana	3,72 ± 0.17 <sup>b</sup>
EP1-3-Fresa	3,60 ± 0.16 <sup>c</sup>	EP1-3-Fresa	3,70 ± 0.15 <sup>b</sup>

EP1 = Extracto de polisacáridos con tamaño de partícula ≤149 µm.

Bebida EP1-2 = 0.6 %, EP1-3 = 1.2%.

Yogurt EP1-2 = 1.7 %, EP1-3 = 2.81 %.

Cada valor representa la media de 103 consumidores que evaluaron las muestras ± error estándar.

Diferentes letras en cada columna indican diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ) por la prueba de Tukey.

\* Los resultados son expresados como nivel de agrado de acuerdo a una escala hedónica de 7 puntos, donde valores cercanos a "7" indican mayor nivel de agrado y valores cercanos a "1" indican menor nivel de agrado.

Para yogurt se observa que el uso de la concentración alta del EP1 (2.81%) genera menor nivel de agrado en comparación con el uso de la concentración intermedia (1.7%) mostrando mayor nivel de agrado y preferencia el sabor café que el sabor fresa en ambas concentraciones utilizadas. En cambio el yogurt sabor fresa utilizado como control comercial (sin adición del EP1) obtuvo el mayor nivel de agrado y nivel de preferencia puesto de que se trata de un producto ya establecido y conocido en el mercado y el consumidor identificó rápidamente su sabor característico dándole el mayor nivel de agrado. Mientras que el producto propuesto en este proyecto se trata de un producto similar con características de sabor diferentes al control comercial por la incorporación del EP1 en donde por comentarios hechos por los consumidores las características de granulosidad, consistencia y sabor fueron las de mayor consideración para otorgar dicho nivel de agrado.

**Cuadro 21. Orden de preferencia en yogurt y bebida láctea fermentada y con adición de sabor y del EP de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido de la variedad Negro 8025.**

Yogurt		Bebida	
Sabor	Orden de preferencia	Sabor	Orden de preferencia
Control-Fresa	5.23 ± 0.08 <sup>a</sup>	EP1-2-Manzana	4.66 ± 0.13 <sup>a</sup>
Control-Fresa	5.12 ± 0.09 <sup>a</sup>	EP1-3-Manzana	4.47 ± 0.13 <sup>a</sup>
EP1-2-Café	3.22 ± 0.13 <sup>b</sup>	EP1-2-Fresa	3.19 ± 0.13 <sup>b</sup>
EP1-2-Fresa	2.66 ± 0.13 <sup>b</sup>	Control-Manzana	3.00 ± 0.16 <sup>c</sup>
EP1-3-Café	2.51 ± 0.13 <sup>b</sup>	Control-Manzana	2.93 ± 0.16 <sup>c</sup>
EP1-3-Fresa	2.28 ± 0.12 <sup>b</sup>	EP1-3-Fresa	2.76 ± 0.15 <sup>c</sup>

EP1 = Extracto de polisacáridos con tamaño de partícula ≤149 µm.

Bebida EP1-2 = 0.6 %, EP1-3 = 1.2%.

Yogurt EP1-2 = 1.7 %, EP1-3 = 2.81 %.

Cada valor representa la media de 103 consumidores que evaluaron las muestras ± error estándar.

Diferentes letras en cada columna indican diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ) por la prueba de Tukey.

\* Los resultados son expresados como el orden de preferencia en una escala del 1-6, donde valores cercanos a "6" indican mayor preferencia y valores cercanos a "1" indican menor preferencia.

Por otro lado, en la bebida (Cuadro 20 y 21) se observa que el uso de la concentración alta ó intermedia del EP1 (0.6 y 1.2 %) no influyó de manera importante en el nivel de agrado y preferencia de las muestras, mientras que el uso

del sabor si influyó de manera importante sobre el nivel de agrado y preferencia por los consumidores ya que el uso del sabor manzana que es el que obtuvo el mayor nivel de agrado y preferencia en las dos concentraciones del EP1 comparado con los controles comerciales sabor manzana (sin adición del EP1) y de los sabores fresa con adición del EP1 en la concentración alta e intermedia.

Es importante mencionar que la bebida láctea fermentada con adición del EP1 en la concentración intermedia y alta (0.6 y 1.2%) obtuvo mayor nivel de agrado y preferencia por los consumidores comparado con el yogurt con la adición del EP1 en la concentración intermedia (1.7%) con sabor café y fresa lo cual puede atribuirse a que en la bebida como es líquida el sabor del EP1 permanece menos tiempo en la boca que el yogurt puesto que éste es más viscoso lo que genera un mayor nivel de agrado y preferencia en dicha bebida (Cuadro 20 y 21).

#### **VII.8. Contenido de grasa, proteína, cenizas, humedad del yogurt y bebida con adición del EP1 y sabor**

En el Cuadro 22 se presenta el contenido de grasa, proteína y cenizas de la bebida y yogurt con adición del EP1 de la variedad del frijol Negro 8025 y con la adición de los saborizantes de mayor preferencia obtenidos en la evaluación sensorial (apartado VII.7.2).

Se observa que el contenido de grasa se mantiene entre  $3.2 \pm 0.01$  y  $3.6 \pm 0.01\%$  y entre  $0.2 \pm 0.01$  y  $0.3 \pm 0.01\%$  para los yogurts y bebidas respectivamente incluyendo a los controles sin adición del EP1. Cuando se adicionó el sabor tanto en el yogurt como en la bebida aumentó de igual forma el contenido de cenizas y como era de esperarse los yogurts evaluados por ser más ricos en sólidos totales y en EP1, presentaron un mayor contenido de cenizas comparados con las bebidas evaluadas.

**Cuadro 22.- Contenido de grasa, proteína y cenizas en yogurt y bebida con adición del EP1.**

Muestra	% Grasa	% Cenizas	% Humedad
Yogurt control	3.4 ± 0.01 <sup>B</sup>	0.65 ± 0.030 <sup>C</sup>	83.50 ± 0.20 <sup>B</sup>
Yogurt EP1-2	3.2 ± 0.01 <sup>C</sup>	0.65 ± 0.013 <sup>C</sup>	81.33 ± 0.04 <sup>B</sup>
Yogurt EP1-2-fresa	3.2 ± 0.01 <sup>C</sup>	0.70 ± 0.053 <sup>BC</sup>	76.17 ± 0.03 <sup>B</sup>
Yogurt EP1-2-café	3.4 ± 0.01 <sup>B</sup>	0.83 ± 0.006 <sup>A</sup>	76.74 ± 0.02 <sup>B</sup>
Yogurt EP1-3	3.6 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.77 ± 0.018 <sup>AB</sup>	80.59 ± 0.10 <sup>B</sup>
Yogurt EP1-3-fresa	3.2 ± 0.01 <sup>C</sup>	0.85 ± 0.014 <sup>A</sup>	76.20 ± 0.04 <sup>B</sup>
Yogurt EP1-3-cafe	3.4 ± 0.01 <sup>B</sup>	0.86 ± 0.015 <sup>A</sup>	76.93 ± 0.01 <sup>B</sup>
Bebida control	0.3 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.021 <sup>a</sup>	92.48 ± 0.06 <sup>a</sup>
Bebida EP1-2	0.2 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.38 ± 0.006 <sup>a</sup>	90.00 ± 0.08 <sup>b</sup>
Bebida EP1-2-manzana	0.3 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.45 ± 0.015 <sup>a</sup>	87.77 ± 0.04 <sup>c</sup>
Bebida EP1-3	0.2 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.46 ± 0.014 <sup>a</sup>	90.37 ± 0.05 <sup>b</sup>
Bebida EP1-3-manzana	0.3 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.44 ± 0.009 <sup>a</sup>	87.42 ± 0.02 <sup>c</sup>
Muestra	% Proteína	% Carbohidratos*	
Yogurt control	3.13 ± 0.10 <sup>B</sup>	9.31 ± 0.11 <sup>D</sup>	
Yogurt EP1-2	3.66 ± 0.02 <sup>A</sup>	11.15 ± 0.06 <sup>C</sup>	
Yogurt EP1-2-fresa	3.75 ± 0.05 <sup>A</sup>	16.15 ± 0.09 <sup>A</sup>	
Yogurt EP1-2-café	3.74 ± 0.03 <sup>A</sup>	15.27 ± 0.04 <sup>B</sup>	
Yogurt EP1-3	3.98 ± 0.06 <sup>A</sup>	11.04 ± 0.17 <sup>C</sup>	
Yogurt EP1-3-fresa	3.81 ± 0.14 <sup>A</sup>	15.92 ± 0.11 <sup>A</sup>	
Yogurt EP1-3-cafe	3.87 ± 0.01 <sup>A</sup>	14.92 ± 0.17 <sup>C</sup>	
Bebida control	1.29 ± 0.04 <sup>a</sup>	5.56 ± 0.01 <sup>c</sup>	
Bebida EP1-2	1.60 ± 0.03 <sup>a</sup>	7.81 ± 0.06 <sup>b</sup>	
Bebida EP1-2-manzana	1.50 ± 0.06 <sup>a</sup>	9.95 ± 0.01 <sup>a</sup>	
Bebida EP1-3	1.57 ± 0.06 <sup>a</sup>	7.37 ± 0.09 <sup>b</sup>	
Bebida EP1-3-manzana	1.51 ± 0.04 <sup>a</sup>	10.32 ± 0.05 <sup>a</sup>	

EP1 = Extracto de polisacáridos con tamaño de partícula ≤149 μm.

Bebida con adición del EP1, EP1-1 = 0.3 %, EP1-2 = 0.6 %, EP1-3 = 1.2 %.

Yogurt con adición del EP1 EP1-1 = 0.58 %, EP1-2 = 1.7 %, EP1-3 = 2.81 %.

Cada valor representa la media de 3 experimentos independientes ± error estándar.

\* El contenido de carbohidratos fue obtenido por diferencia.

Diferentes letras en cada columna indican diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ) por la prueba de Tukey.

En los yogurts el contenido de proteína aumenta al incrementarse el contenido del EP1 comparado con el control sin adición del EP1, como era de esperarse ya que el EP1 contenía proteína (Cuadro 8) y la adición de los sabores no influyó de manera importante sobre el contenido de proteína ya que los yogurts con adición del EP1 y con la adición y sin adición de sabor (fresa y café) no presentaron

diferencia estadística significativa. Por el contrario en las bebidas la adición del EP1 y sabor no influyeron de manera significativa sobre el contenido de proteína ya que tanto las bebidas control como las de adición de EP1 y sabor no presentaron diferencia estadística significativa.

En cambio el contenido de carbohidratos que fue obtenido por diferencia, se observa que tanto en los yogurt como en las bebidas evaluadas se incrementó debido a la adición tanto del sabor (ya que incluía edulcorante) así como del EP1 (que contiene carbohidratos entre la mayor parte polisacáridos y dentro de estos últimos se encuentra la fibra dietética).

## VIII. CONCLUSIONES

- De las cuatro variedades en estudio Negro 8025, Bayo Madero, Azufrado Higuera y Pinto Durango, se eligió la variedad Negro 8025 por su mayor contenido de compuestos fenólicos (taninos condensados y flavonoides totales), además de que presentó capacidad antioxidante *in vitro* y cantidades aceptables de fibra.
- En la formulación del yogurt y bebida láctea se eligió la temperatura de pasteurización de 85°C/10 minutos por presentar mayor viscosidad y menor sinéresis, parámetros relacionados con la calidad.
- El consumo de 300 g de estos productos ya sea como yogurt batido o bebida láctea fermentada enriquecidos con el EP1 en las tres concentraciones evaluadas, provee a la dieta entre 3.0 y 15 mg de taninos condensados que corresponden entre 0.3 – 1.5% de la ingesta diaria recomendada de compuestos fenólicos (1.0 g/día) y entre 15 – 75% de la ingesta diaria recomendada de taninos condensados (18-31 mg/día), así como 5-30% de fibra de la ingesta diaria recomendada de fibra (25-30 g/día).
- En el yogurt, tanto el sabor como la concentración del EP1 utilizados influyeron marcadamente sobre la aceptación por los consumidores, ya que el mayor nivel de agrado y preferencia se presentó a la concentración media del EP1 (1.7%) en los sabores fresa y café.
- En la bebida, tanto en la concentración media como alta del EP1 (0.6 y 1.2%) en el sabor manzana presentaron mayor nivel de agrado y preferencia.

## IX. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

- Álvarez R. E., Jiménez G.O.J., Posada, A.CM., Rojano, B.A., Gil, G.J.H. García, P.C.M. Durango, R.D.L. 2008. Activity and phenolic content of extracts from berries of two species of *Vismia* genus (Guttiferae). *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 15(1): 165-172.
- Aparicio-Fernández, X., García-Gasca, T., Yousef, G.G., Lila, M.A., De Mejía, G.E., Loarca-Piña, G. 2006. Chemopreventive activity of polyphenolics from Black Jamapa bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on HeLa and HaCaT Cells. *J. Agric. Food Chem.* 54:2116-2122.
- Aparicio-Fernández, X., Manzo-Bonilla, L., Loarca-Piña, G.F. 2005a. Comparison of antimutagenic activity of phenolic compounds in newly harvested and stored common beans *Phaseolus vulgaris* against aflatoxin B<sub>1</sub>. *J. of Food Sci.* 70(1):S73-S78.
- Aparicio-Fernández, X., Reynoso-Camacho, R., Castaño-Tostado, E., García-Gasca, T., De Mejía, G.E., Guzman-Maldonado, S.H., Elizondo, G., Yousef, G.G., Lila, M.A., Loarca-Piña, G. 2008. Antiradical Capacity and Induction of Apoptosis on HeLa Cells by a *Phaseolus vulgaris* Extract. *Plant Foods Hum. Nutr.* 63:35-40.
- Aparicio-Fernández, X., Yousef, G.G., Loarca-Piña, G., De Mejía, E., Lila, M.A. 2005b. Characterization of polyphenolics in the seed coat of Black Jamapa bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 53:4615-4622.
- Araya, L.H. and Lutz, R.M. 2003. Functional and healthy foods. *Rev. Chil. Nutr.* 30(1).
- Badui, D. 1993. *Química de los alimentos*. Pearson-Educación. Tercera edición. p.89-112.
- Bello-Pérez, L.A., Mendez-Montealvo, M.G., Agama Acevedo, E. 2006. Almidón: definición, estructura y propiedades. En *Carbohidratos en alimentos regionales Iberoamericanos*. Eds. Lajolo, F.M., Menezes, E.W. Universidad de São Paulo. Cap. 1. p.18-30.
- Bender, A.E. 1994. *Diccionario de nutrición y tecnología de los alimentos*. Editorial ACRIBIA, S.A. ZARAGOZA (España). Sexta edición. p.184.
- Blanco, D.S.C., Pacheco-Delahaye, E., Frágenas, N.N. 2006. Evaluación física y nutricional de un yogurt con frutas tropicales bajo en calorías. *Rev. Fac. Agron. (Maracay)*. 32:131-144.
- Burda, S., Oleszek, W. 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 49:2774-2779.

- Cardador-Martínez, A., Albores A., Bah M., Calderón-Salinas, V., Castaño-Tostado, E., Guevara-González, R., Shimada-Miyasaka, A., Loarca-Pina, G. 2006. Relationship among antimutagenic, antioxidant and enzymatic activities of methanolic extract from common beans (*Phaseolus Vulgaris* L). *Plant Foods for Human Nutrition*. 61:161–168.
- Cardador-Martínez, A., Castaño-Tostado, E., Loarca-Piña, G. 2002a. Antimutagenic activity of natural phenolic compounds in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) against aflatoxin B<sub>1</sub>. *Food Addit. Contam.* 19(1):62–69.
- Cardador-Martínez, A., Loarca-Piña, G., Oomah, B.D. 2002b. Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 50:6975–80.
- Castellanos, J.Z., Guzmán-Maldonado, H., De Mejía, G.E., Acosta-Gallegos, J.A. 1995. Efecto de la localidad de siembra sobre la aceptación sensorial y otras características nutricionales y de calidad del grano de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *ALAN*. 45(1).
- Castellanos, J.Z., Guzmán-Maldonado, H., Jiménez, A., Mejía, C., Muñoz R.J., Acosta-Gallegos, J.A., Hoyos, G., López, S.E., Gonzales, E.D., Salinas, P.R., Gonzáles, A.J., Muñoz, V.J.A., Fernández, H.P., Cáceres, B. 1997. Hábitos preferenciales de los consumidores de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en México. *ALAN*. 47(2).
- Castillo, M., Borregales, C., Sanchez, M.D. 2004. Influencia de la pectina sobre las propiedades reológicas del yogur. *Revista de la facultad de farmacia*. 46(2):33-37.
- De Almeida-Costa, G.E., Queiroz-Monici, K.S., Machado, R.S., Oliveira, A.C. 2004. Chemical composition, dietary fibre and resist starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food Chem.* 94:327-330.
- De Mejía, G.E., Guzmán-Maldonado, H.S, Acosta-Gallegos, J.A., Reynoso-Camacho, R., Ramírez-Rodríguez, E., Pons-Hernández, J.L., González-Chavira, M.M., Castellanos, J.Z., Kelly, J.D. 2003. Effect of cultivar and growing location on the trypsin inhibitors, tannins, and lectins of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in the semiarid highlands of Mexico. *J. Agric. Food Chem.* 51:5962-5966.
- Déprez, S., Brezillon, C., Rabot, S., Philippe, C., Mila, I., Lapierre, C., Scalbert, A. 2000. Polymeric Proanthocyanidins Are Catabolized by Human Colonic Microflora into Low-Molecular-Weight Phenolic Acids. *J. of Nutrition*. 2733-2738.
- Desphande, S.S., Cheryan, M. 1985. Evaluation of vanillin assay for tannin analysis of dry beans. *J of Food Sci.* 50:905-910.

- Desphande, S.S., Cheryan, M. 1987. Determination of phenolic compounds of dry beans using vanillin, redox and precipitation assays. *J. of Food Sci.* 52(2):332-334.
- Díaz-Jiménez, B., Sosa-Morales, M.E., Vélez-Ruiz, J.F. 2004. Efecto de la adición de fibra y disminución de grasa en las propiedades fisicoquímicas del yogur. *Revista Mex.de Ing. Quim.* 3(003):287-305.
- Dong, M., He, X., Hai L.R. 2007. Phytochemicals of black bean seed coats: isolation, structure elucidation, and their antiproliferative and antioxidative activities *J. Agric. Food Chem.* 55:6044-6051.
- Escamilla-Santana C. 1991. Evaluación de la calidad en condimentos para botanas. I. Estandarización sensorial de materia prima. Tesis Estudios de Posgrado. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
- Escamilla-Santana C. 1994. A method to develop sensory quality standards to maximize consumer acceptance. Doctoral thesis. University of Reading, Faculty of Agriculture and Food, Department of Food Science and Technology. Reading, UK.
- Escudero A.E. y González S.P. 2006. Dietary fibre. *Nutr. Hosp.* 21:60-70.
- Espinosa-Alonso, G.L., Lygin, A., Widholm, J.M., Valverde, M.E., Paredes-López, O. 2006. Polyphenols in wild and weedy Mexican common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 54:4436-4444.
- Feregrino-Pérez, A.A., Berumen, L.C., García-Alcocer, G., Guevara-González, R., Ramos-Gómez, M., Reynoso-Camacho, R., Acosta-Gallegos, J.A., Loarca-Piña, G. 2008. Composition and Chemopreventive Effect of Polysaccharides from Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on Azoxymethane-Induced Colon Cancer *J. Agric. Food Chem.* 56: 8737–8744.
- Fukumoto, L.R., Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric Food Chem.* 48:3597-3604.
- García-Peris, P., Bretón L.I., Cuerda, C.C., Camblor, A.M. 2002. Metabolismo colónico de la fibra. *Nutr. Hosp.* XVII (Sup. 2):11-16.
- Gibson, G.R., Probert, H.M., Loo J.V., Rastall R.A., Roberfroid M.B. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutr. Research Reviews.* 17: 259–275.
- Goñi, C.I. y Martin-Carron, Nuria. 2001. Fermentación colónica de fibra dietética y almidón resistente. En fibra dietética en Iberoamérica: Tecnología y salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos. Eds. Lajolo, F.M., Saura-Calixto, F., Witting de Penna, E., Menezes, E.W. CYTED/CNPQ/Varela, São Paulo. Cap. 24. p.311-337.

- Granito, M., Trujillo, L., Guerra, M. 2004. Uso de *Phaseolus vulgaris* y *Vigna sinensis* como extensores de una bebida láctea fermentada. ALAN. 54(2).
- Guzmán-Maldonado, S.H., Acosta-Gallegos, J. and Paredes-López, O. 2000. Protein and mineral content of a novel collection of wild and weedy common bean (*Phaseolus vulgaris* L). J. Sci. Food Agric. 80:1874-1881.
- Hakkak, R., Korourian, S., Ronis, M.J.J., Johnston, J.M., Badger, T.M. 2001. Dietary whey protein protects against azoxymethane-induced colon tumors in male rats. Cancer Epidem., Biomark. & Prevent. 10: 555–558.
- Hangen, L. and Bennik, M.R. 2002. Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus vulgaris*) reduced azoxymethane-induced colon cancer in rats. Nutr. and Cancer. 44(1):60-65.
- Hernández, H., Gaitán, J. 2007. Determinación de cambios en los patrones de consumo de leche bovina y productos lácteos en el mercado nacional. Centro de Agronegocios. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. SAGARPA-CONACYT. <http://ceag.mty.itesm.mx/>.
- Ho, C., Huang, M., Lee, C., 1992. Phenolic compounds in food and their effects on health II. American Chemic. Society. p. 2-4.
- Hughes. S.J., Ganthavorn, C., Wilson-Sanders, Susan. 1997. Dry beans inhibit azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. J. Nutr. 127:2328-2333.
- Huguet, N. 2000. La evaluación sensorial. Objetivos y métodos del análisis sensorial. Asociación Catalana de Enólogos. XI Congreso Anual Perpiñán (Francia). <http://www3.unileon.es/personal/wwdhtjmo/MANDEFEC/Practteco/Documpractteco/introduccionsensorial.pdf>
- Imeh, U., and Khokhar, S. 2002. Distribution of Conjugated and Free Phenols in Fruits: Antioxidant Activity and Cultivar Variations. J. Agric. Food. Chem. 50 (22):6301–6306.
- Iniestra-González, J.J., Ibarra-Pérez, F.J., Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Guzmán, N.E., González-Laredo, R.F. 2005. Antinutritional factors and antioxidant activity in improved varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Agrocienc. 39:603-610.
- Kurtzman, R. H. and Halbrook, W. U. 1970. Polysaccharide from dry navy beans, *Phaseolus vulgaris*: Its Isolation and Stimulation of *Clostridium perfringens*. Applied Microbiol. 20(5):715-719.
- Kuskoski, E.M., Asuero, A.G., Troncoso, A.M., Mancini-Filho, J., Fett, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Cinc. Tecnol. Aliment., Campinas. 25(4): 726-732.

- Londoño-Urbe, M.M., Sepulveda-Valencia, J.U., Monzon-Hernandez, A., Parra-Suescun, J.E. 2008. Fermented fresh cheese milkwhey beverage inoculated with *Lactobacillus casei*. Rev. Fac. Nat. Agr. Medellín 61(1):4409-4421.
- López-Román, J., Martínez-González, A. B., Luque, A., Pons-Miñano, J. A., Vargas-Acosta, A., Iglesias, J. R., Hernández, M., Villegas, J. A. 2008. Efecto de la ingesta de un preparado lácteo con fibra dietética sobre el estreñimiento crónico primario idiopático. Nutr. Hosp. 23(1).
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jimenez, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. Am. J. Clin. Nutr. 79:727– 47.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Rémésy, C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. Am. J. Clin. Nutr. 81(suppl): 230S– 42S. American Society for Clinical Nutrition.
- Manrique, G.D. y Lajolo, F.M. 2001. Maduración, almacenamiento y procesamiento de frutas vegetales: Modificaciones en los componentes de la fibra soluble. En fibra dietética en Iberoamérica: Tecnología y salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos. Eds. Lajolo, F.M., Saura-Calixto, F., Witting de Penna, E., Menezes, E.W. CYTED/CNPQ/Varela, São Paulo. Cap. 22. p.283-294.
- Márquez, M., Yépez, C.E., Sútil-Naranjo, R., Rincón, M. 2002. Determinación de las vitaminas antioxidantes E y A. Invest. Clin. 43(3).
- Martínez-Álvarez, J.R., de Arpe-Muños, C., Urrialde de Andrés, R., Fontecha, J., Murcia-Tomas, M.A., Gómez-Candela, C., Villarino-Marín, A. 2008. Nuevos alimentos para nuevas necesidades. Nutrición y salud. Salud Madrid. www.madrid.org.
- Martínez-Flores, S., González-Gallego, J., Culebras, J.M., Tuñón, M.J. 2002. Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr. Hosp. 6:271-278.
- Mattila-Sandholm, T. and Saarela M. 2003. Functional dairy products. Woodhead Publishing Ltd. p.28.
- Miranda-Miranda, O., Fonseca, P.L., Ponce, I., Cedeño, C., Rivero, L.S., Vázquez, I.M. 2007. Elaboración de una bebida fermentada a partir del suero de queso. Características distintivas y control de calidad. Rev. Cubana Aliment. Nutr. 17(2):103-108.
- Morales de León, J.C., Cassis-Nosthas, M.L. Cortés-Penedo, E. 2000. Elaboración de un yogurt con base en una mezcla de leche y garbanzo (*Cicer arietinum*). ALAN. (50):1.

- Muzquiz, M. 2005. Impacto positivo del consumo de legumbres en la salud humana. GLIP dissemination event–Madrid.  
[http://www.grainlegumes.com/fckeditor/aepfiles/File/GLIP/Madrid%202005/Slide s04-Muzquiz.pdf](http://www.grainlegumes.com/fckeditor/aepfiles/File/GLIP/Madrid%202005/Slide%20s04-Muzquiz.pdf).
- Nenadis, N., Lang-Fen, W., Tsimidou, M., Hong-Yu, Z. 2004. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS<sup>+</sup> assay. J. Agric. Food Chem. 52:4669-4674.
- Norma Oficial Mexicana NMX-F-066-S-1978. Determinación de cenizas en alimentos. Foodstuff determination of ashes. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
- Norma Oficial Mexicana NMX-F-068-S-1980. Alimentos. Determinación de proteínas.
- Norma Oficial Mexicana NMX-F-083-1986. Determinación de humedad en productos alimenticios. Foods. moisture in food products determination. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
- Norma Oficial Mexicana NMX-F-089-S-1978. Determinación de extracto etéreo (Método Soxhlet) en alimentos. Foodstuff-determination of ether extract (soxhlet). Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
- Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2003. Leche, formula láctea y producto lácteo combinado. Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.
- Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2003. PROY-NOM-173-SCFI-2008, Jugos de frutas preenvasados-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.
- Norma Oficial Mexicana NOM-185-SSA1-2002. Productos y servicios. Mantequilla, cremas, producto lácteo condensado azucarado, productos lácteos fermentados y acidificados, dulces a base de leche. Especificaciones sanitarias.
- Norma Oficial Mexicana NMX-F-703-COFOCALEC-2004. Sistema producto leche-alimentos-leche y producto lácteo (o alimento lácteo)-fermentado o acidificado-denominaciones, especificaciones y métodos de prueba.
- Olguín-Contreras, G., Meléndez Mier, G., Zúñiga R.A.\* Pasquetti-Ceccatelli, A. 2004. Antioxidantes y aterosclerosis. Revista de Endocrinología y Nutrición. 12(4): 199-206.
- Oomah, D.B., Cardador-Martínez, A., Loarca-Piña, G. 2005. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). J. Sci. Food Agric. 85:935-942.

- Osorio-Díaz, P., Mendez-Montealvo, G., Agama-Acevedo, E., Islas-Hernández, J.J., Sánchez-Muñoz, J., Bello-Pérez, L.A. 2003. Biodisponibilidad del almidón en dos variedades comerciales de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y en frijoles industrializados. *Agrocienc.* 37:565-573.
- Otero, M.J. and Hidalgo, L.G. 2004. Condensed tannins in temperate forage species: Effects on the productivity of ruminants infected with internal parasites (a review). *Livestock Research for Rural Development.* 16(2).
- Papenburg, R., Bounous, G., Fleischer, D., Gold, P. 1990. Dietary milk proteins inhibit the development of dimethylhydrazine-induced malignancy. *Tumor Biology: The journal of the International Society for Oncodevelopmental, Biology and Medicine.* 11(3):129-136.
- Paredes-López, O., Guevara-Lara, F., Bello-Pérez, A. 2006. Los alimentos mágicos de las culturas indígenas. México: FCE, SEP, CONACYT, CAB. D.R. Fondo de Cultura Económica. Primera Edición. p.59-80.
- Pauletti, M.S., Rozyck, S., Sabbag, N., Costa, S. 2003. Modelización de la consistencia del yogurt batido: Efecto de la adición de varios gelificantes. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 4(2): 90-94.
- Pérez-Herrera, P., Esquivel- Esquivel, G., Rosales- Serna, R., Acosta-Gallegos, J. A. 2002. Caracterización física, culinaria y nutricional de frijol del altiplano subhúmedo de México. *ALAN.* 52(2) supl.2.
- Rincón, F., Oberto, A., León de Pinto, G. 2005. Functionality of *Enterolobium cyclocarpum* gum in the preparation of liquid low fat yogurt. *Revista científica, FCV-LUZ.* 15(1):83-87.
- Ruperez, P. y Bravo, L. 2001. Oligofructanos y gomas. En fibra dietética en Iberoamérica: Tecnología y salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos. Eds. Lajolo, F.M., Saura-Calixto, F., Witting de Penna, E., Menezes, E.W. CYTED/CNPQ/Varela, São Paulo. Cap. 4. p.61-76.
- Salinas-Moreno, Y., Rojas-Herrera, L., Sosa-Montes, E., Pérez-Herrera, P. Composición de antocianinas en variedades de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas en México. 2005. *Agrocienc.* 39: 385-394.
- Sánchez-Negrette, M., Montenegro, M.A., Lértora, W.J., Catuogno, M.S. 2005. Disminución del número de tumores intestinales inducidos por 1,2-dimetilhidrazina en ratas alimentadas con leche descremada. *Rev. Vet.* 16(1): 28 - 31.
- Saura-Calixto, F. y Jimenez-Escrig, A. 2001. Compuestos bioactivos asociados a fibra. En fibra dietética en Iberoamérica: Tecnología y salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos. Eds. Lajolo, F.M.,

- Saura-Calixto, F., Witting de Penna, E., Menezes, E.W. CYTED/CNPQ/Varela, São Paulo. Cap. 7. p.103-128.
- Saura-Calixto, F., Goñi, I., Bravo, L., Mañas, E. 1993. Resistant Starch in foods: Modified method for dietary fiber residues. J. of Food Sci. 58(3).
- Saura-Calixto, J. 2006. Evolución del concepto de fibra. En Carbohidratos en alimentos regionales Iberoamericanos. Eds. Lajolo, F.M., Menezes, E.W. Universidad de São Paulo. Cap.10. p.237-253.
- Schüep, W. 1997. Análisis de vitaminas en alimentos. En Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición. Eds. Morón, C., Zacarías, I., Saturnino de Pablo. Dirección de Alimentación y Nutrición Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Santiago de Chile. Cap. 17. <http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/AH833S00.htm#Contents>.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentos (SAGARPA). 2008. <http://www.sagarpa.gob.mx/>.
- Serrano, J. y Goñi, I. 2004. Papel del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de la población guatemalteca. ALAN. 54(1).
- Shiga, T.M., Lajolo, F.M., Filisetti, T.M.C.C. 2003. Cell wall polysacharides of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas. 23(2):141-148.
- Silva-Hernández E.R. y Verdalet-Guzmán, I. 2003. Rev.: Aliment. e Ingred. Func. Deriv. de la leche. 53(4).
- Sternhagen, L.G. and Allen, J.C. 2001. Growth rates of a human colon adenocarcinoma cell line are regulated by the milk protein alfa-lactoalbumin. Advances in Experimet. Medicin. and Biol. 501:115-120.
- Tamime, A.Y., Robinson, R.K. 1991. YOGUR Ciencia y Tecnología. Editorial Acribia, S.A. Apartado 466. Zaragoza (España).
- Toricella-Morales, R.G., Zamora-Utset, E., Pulido-Alvarez, H. 2007. Evaluacion sensorial, aplicada a la investigación y desarrollo y control de calidad en la industria alimentaria. Ministerio de educación superior. Editorial universitaria. 2ª edición. p.10.
- Tovar, J., Bello-Pérez, L.A., Osorio-Díaz, P., Rendón-Villalobos, R. 2006. Almidón resistente: Caracterización y análisis. En Carbohidratos en alimentos regionales Iberoamericanos. Eds. Lajolo, F.M., Menezes, E.W. Universidad de São Paulo. Cap. 3. p.65-88.

- Tovar, J., Fernández-Piedra, M., Blanco-Metzler, A. 2005. Digestibilidad *in vitro* del almidón en preparaciones cocidas y molidas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). INCI. 30(12).
- Tsuda, H., Sekine, K., Fujita, K., Ligo, M. 2002. Cáncer prevention by bovine lactoferrina and underlying mechanism – a review of experimental and clinical studies. Biochem. Cell Biol. 80:131-136.
- Vargas-Torres, A., Osorio-Díaz, P., Agama-Acevedo, Edith., Morales-Franco, L. y Bello-Pérez, L. A. 2006. Digestibilidad del almidón en diferentes variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). INCI. 31(12).
- Veeriah, S., Hofmann, T., Glej, M., Dietrich, H., Will F., Schreier, P., Knaup, B., Pool-Zobel, B.L. 2007. Apple Polyphenols and Products Formed in the Gut Differently Inhibit Survival of Human Cell Lines Derived from Colon Adenoma (LT97) and Carcinoma (HT29). J. Agric. Food Chem. 55(8).
- Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkaden, S., Korhonen, H. 2007. Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. J. Applied Microbiol. 102:106-115.
- Yin, L., Laevsky, G., Giardina, C. 2001. Butyrate suppression of colonocyte NF- $\kappa$ B activation and cellular proteasome activity. J. of Biological Chem. 276(48):44641-44646.

## X. ANEXOS

Las Figuras 10, 11, 12 y 13 muestran la curva de calibración de taninos condensados, flavonoides totales, ABTS y DPPH, respectivamente.

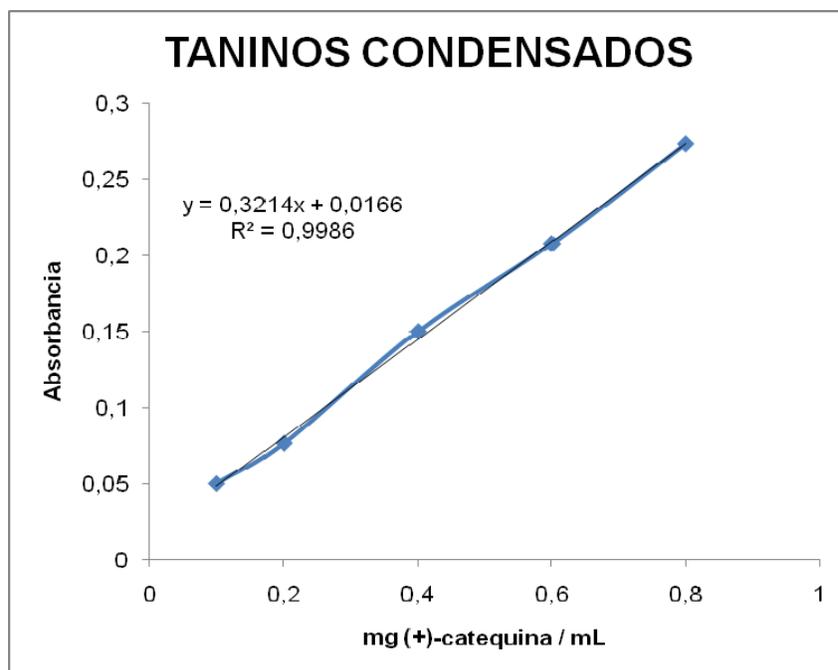


Figura 10. Curva de calibración de taninos condensados expresados como mg equivalentes de (+)-catequina. Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes.

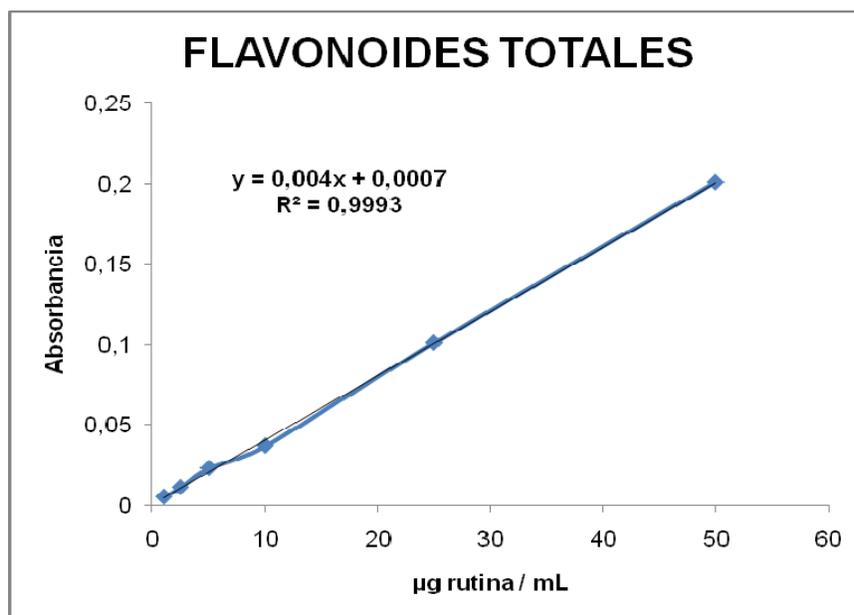


Figura 11. Curva de calibración de flavonoides totales expresados como µg equivalentes de rutina. Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes.

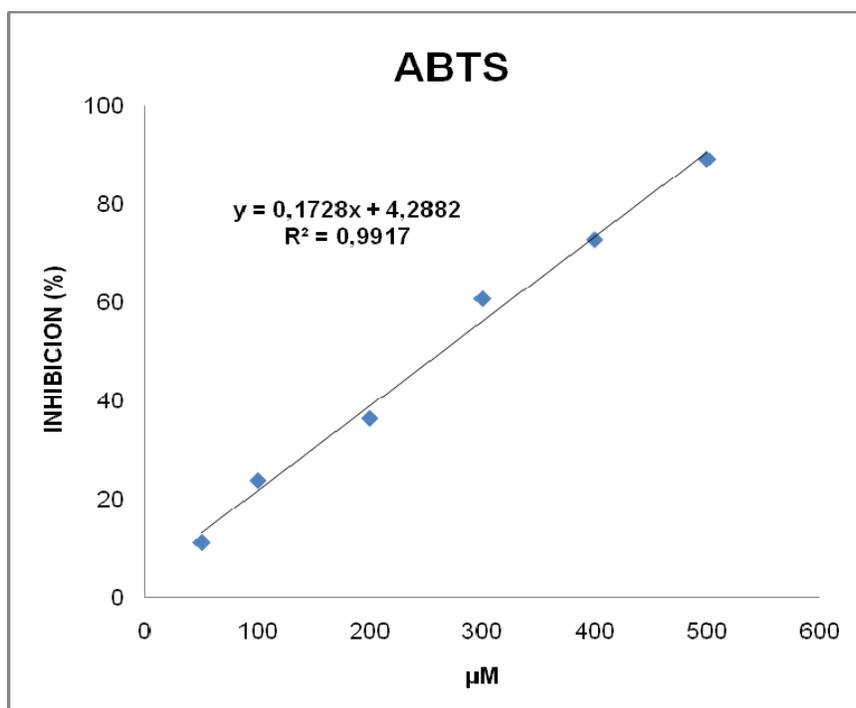


Figura 12. Curva de calibración de capacidad antioxidante *in vitro* por el método ABTS. Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes.

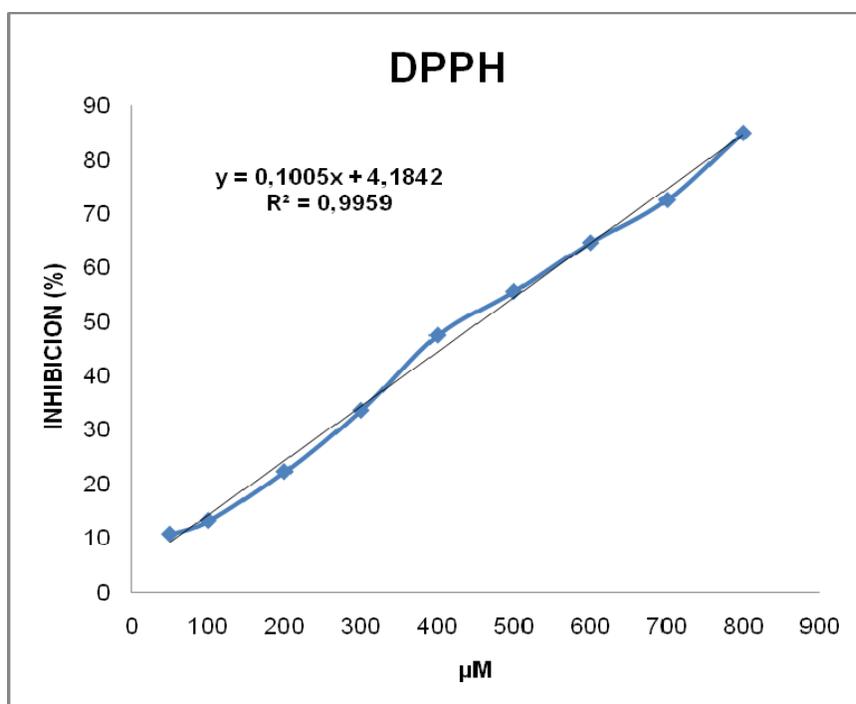


Figura 13. Curva de calibración de la capacidad antioxidante *in vitro* por el método DPPH. Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes.