



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Enriquecimiento con aislado proteico y hierro biodisponible de una bebida a base de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) extruido variedad Bayo Madero”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

Q.A. Vanessa Sánchez Quezada

DIRIGIDO POR:

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

Santiago de Querétaro a 16 de Noviembre de 2018



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos

“Enriquecimiento con aislado proteico y hierro biodisponible de una bebida a base de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) extruido variedad Bayo Madero”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Presenta:

Q.A. Vanessa Sánchez Quezada

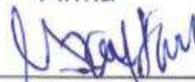
Dirigido por:

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Presidente


Firma

Dra. Marcela Gaytán Martínez
Secretario


Firma

Dra. María de la Luz Reyes Vega
Vocal


Firma

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz
Suplente


Firma

Dra. Rocio Campos Vega
Suplente


Firma


Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Director de la Facultad


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

Este trabajo de investigación va dirigido a Dios, a mis padres y hermano, gracias por enseñarme a imaginar, crear, luchar y lograr mis metas, por el apoyo y amor incondicional, ustedes son mi fortaleza.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Flavia, por el apoyo, la orientación académica y personal, por ser mi mentora y por seguir impulsando mis próximas metas, es una gran científica y sobre todo una increíble persona. Siempre en mi corazón.

A la Dra. Sandra mi tutora, gracias por escucharme y enseñarme que la vida son momentos que se deben luchar día a día, dando la mejor cara y todo el conocimiento. Retribuyendo al mundo un poco de lo que se recibe.

Gracias Dra. Marce, Dra. Luz y Dra. Rocio, que con su ejemplo, dedicación, enseñanzas y trabajo me siguen inspirando a continuar en el mundo del conocimiento.

A mis maestros, gracias por compartir sus conocimientos, enfoques de vida y sabiduría, cada uno fomentó en mí, algo de lo que soy y seré siempre.

A los PROBIOTICOS, por su amistad, por tantos momentos y charlas compartidas, sin ustedes esto tendría otra historia, los quiero siempre. A Mile, Alma, Jonny, Erick, Ivan, Liz, Adri, Lupita y a todas las personas que tuve el placer de conocer y compartir buenos momentos gracias por todo. A Ricardo por todo el cariño.

A Carmelita y personal administrativo, gracias.

Al Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada (CICATA), principalmente al Dr. Morales y Dra. Aurea.

Al Centro de Estudios Académicos sobre Contaminación Ambiental (CEACA), principalmente al Dr. Pedraza y a la Mtra. Areli.

A Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento y apoyos recibidos a mi persona.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por ser mi segunda alma mater.

RESUMEN

Las bebidas veganas son extractos líquidos elaborados a partir de leguminosas, cereales o granos, que se incluyen como nuevos alimentos, disponibles en el mercado con una creciente aceptación entre los consumidores, principalmente para individuos con intolerancia a la lactosa o aquellos con hábitos alimenticios más saludables. Dentro de las leguminosas se encuentra el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), alimento importante en la dieta del mexicano, considerado un alimento funcional por su composición nutrimental, química y nutracéutica. En el grupo de trabajo se desarrolló una bebida a base de frijol común, sin embargo fue deficiente en proteína, por lo que el objetivo de este trabajo fue mejorar la formulación de la bebida elaborada a partir de frijol común extruido variedad Bayo Madero, enriquecida con aislado proteico de frijol y hierro biodisponible, como un producto innovador y de alta calidad que no se encuentra aún en el mercado. De los resultados, se destaca una disminución significativa (de 22 hasta 60 %) en compuestos antinutricios (taninos condensados, ácido fítico, carbonatos totales e inhibidores de tripsina) respecto a harina no extruida. En los aislados proteicos se alcanzó una pureza de 92.84% y una digestibilidad *in vitro* de 89.95%. Al adicionar el aislado proteico a la bebida, el contenido de proteína incrementó hasta 248%. La composición química de la bebida fue: proteína 3.39 ±0.03%, lípidos 0.84 ±0.03%, cenizas 0.37 ±0.01%, carbohidratos 2.11 ±0.9%, humedad 93.19 ±1.05%, hierro (Fe⁺²) 6.36 ±0.06ppm, calcio 14.0 ppm. En las propiedades fisicoquímicas se obtuvo un pH 5.4 ±0.03, acidez titulable de 0.003 ±0.001% respecto al ácido málico, °Brix de 2.50 ±0.07 y densidad de 2.13 ±0.04 °Baumé. Los resultados sugieren que el proceso de extrusión disminuyó el contenido de compuestos antinutricios del frijol. Por otro lado la adición del concentrado proteico y de hierro mejoró nutrimental la bebida, obteniendo parámetros fisicoquímicos, que permitieron tener un nivel de agrado adecuado por los consumidores para un producto innovador que ayude a retomar la alimentación tradicional del mexicano y a su vez ayude a satisfacer las necesidades nutricionales proteicas y de hierro que afectan consideradamente al país.

Palabras claves: Bebida vegana, Frijol común, extruido, nuevas tecnologías, funcional, Bayo Madero

ABSTRACT

Vegetarian beverages are liquid extracts made from legumes, cereals or grains, which are included as new foods, available in the market with a growing acceptance among consumers, mainly for individuals with lactose intolerance or those with healthier eating habits. Within the legumes is the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) being more important in the typical Mexican diet, it is considered a functional food by its nutritional, chemical and nutraceutical composition. In the working group was developed a beverage based on common bean, however, it was a deficient factor in protein, so the objective of this work was to improve the formulation of the drink made from common extruded beans variety Bayo Madero, enriched with protein isolate from beans and iron, as an innovative and high-quality product that is not yet on the market. The results highlight a significant decrease (from 22 to 60%) in antinutritional compounds (condensed tannins, phytic acid, total carbonates and trypsin inhibitors) with respect to non-extruded flour. In protein isolates achieved a purity of 92.84% and an *in vitro* digestibility of 89.95%. When the protein isolate was added to the drink, the protein content increased up to 248%, remaining with the following chemical technology: protein $3.39 \pm 0.03\%$, lipids $0.84 \pm 0.03\%$, ash $0.37 \pm 0.01\%$, carbohydrates $2.11 \pm 0.9\%$, wetness $93.19 \pm 1.05\%$, iron (Fe^{+2}) 6.36 ± 0.06 ppm, calcium 14.0 ppm . In the physicochemical properties a pH of 5.4 ± 0.03 was obtained, a titratable acidity of $0.003 \pm 0.001\%$ with respect to malic acid, ° Brix of 2.50 ± 0.07 and density of $2.13 \pm 0.04^\circ$ Baumé. Regarding the sensory evaluation of the product, the acceptance was "I like little". In conclusion, the extrusion process helped to reduce antinutritional compounds of the bean, and the addition of the protein and iron concentrate of this improved the nutritive beverage, obtaining physicochemical parameters, as well as at the level of pleasure suitable for a new and innovative product that helps to retake traditional Mexican food and in turn help to meet the needs of proteins and iron that affect the country.

Key words: Vegan drink, Common bean, extruded, new technologies, functional, Bayo Madero

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	III
ÍNDICE DE CUADROS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
II.1 Alimentos funcionales y nutraceuticos	2
II.2 Frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	3
II.2.1 Composición química del frijol común.....	6
II.2.1.1 Proteínas.....	8
II.2.1.2 Compuestos anti-nutricios.....	11
II.2.1.3 Carbohidratos	15
II.2.1.4 Compuestos fenólicos	16
II.2.2 Frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L) variedad Bayo Madero (BM)	17
II.3 Bebidas a base de cereales y leguminosas	17
II.3.1 Pre-tratamientos, extracción y producción de una bebida a base de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad BM.....	19
II.3.1.1 Productos en el mercado	20
II.3.1.2 Aditivos y enriquecimiento.....	20
II.3.1.2.1 Enriquecimiento con hierro.....	21
II.3.1.2.2 Enriquecimiento con proteína	24
II.3.1.3 Hidrocoloides	24
II.3.1.4 Extrusión	25
II.4 Enfermedades en México.....	27
II.4.1 Anemia	27

II.4.2 Hierro	28
II.4.3 Causas de anemia ferropénica.....	30
III. OBJETIVOS.....	31
III.1 General.....	31
III.2 Particulares	31
IV. METODOLOGÍA	32
IV.0 Estrategia experimental	32
IV.1 Material biológico	35
IV.1.1 Pre-tratamiento del material biológico	35
IV.1.2 Obtención de los extruidos de frijol	35
IV.1.2.1 Harina extruida para la bebida.....	35
IV.1.2.2 Harina extruida para aislado proteico.....	35
IV.1.3 Obtención del aislado proteico de frijol común.....	36
IV.1.3.1 Cuantificación de proteína en el aislado.....	36
IV.1.3.2 Electroforesis.....	37
IV.1.3.3 Digestibilidad <i>in vitro</i> del aislado proteico	37
IV.1.4 Morfología granular.....	38
IV.1.5 Índice de absorción de agua.....	38
IV.1.6 Índice de absorción de aceite.....	38
IV.2 Elaboración de la bebida a base de frijol común.....	39
IV.2.1 Preparación de la emulsión.....	39
IV.2.2 Enriquecimiento	39
IV.2.3 Enriquecimiento de la bebida a base de frijol	40
IV.2.4 Tratamiento térmico	40

IV.3 Determinación de factores anti-nutricios que afectan la absorción del hierro	40
.....	40
IV.3.1 Cuantificación de inhibidores de tripsina	40
IV.3.2 Cuantificación de carbonatos totales	41
IV.3.3 Cuantificación de ácido fítico.....	42
IV.3.4 Cuantificación de taninos condensados	42
IV.4 Parámetros fisicoquímicos de la bebida a base de frijol común.....	43
IV.4.1 Viscosidad de las formulaciones de la bebida de frijol	43
IV.4.2 Tasa de asentamiento y tasa de solidos totales.	43
IV.4.3 pH y solidos solubles.....	44
IV.4.4 Densidad	44
IV.4.5 Acidez titulable.....	44
IV.5 Composición química de la materia prima y de las formulaciones	44
IV.5.1 Proteína (método AOAC, 954.01).....	44
IV.5.2 Grasa (método AOAC, 920.39).....	45
IV.5.3 Humedad (Método AOAC, 925.09B)	45
IV.5.4 Cenizas (método AOAC, 945.46)	46
IV.5.5 Carbohidratos	46
IV.5.5.1 Fibra dietaria insoluble	46
IV.5.5.2 Fibra dietaria soluble	47
IV.5.5.3 Fibra dietaria Total	47
IV.5.5.4 Almidón resistente.....	47
IV.5.5.4.1 Determinación de glucosa	48
IV.5.5.5 Almidón total.....	48
IV.5.5.6 Almidón disponible	49

IV.5.6 Determinación de hierro férrico (Fe ⁺³).....	49
IV.5.7 Determinación de hierro ferroso (Fe ⁺²).....	50
IV.6 Evaluación sensorial.....	51
IV.7 Análisis estadístico.....	55
V. RESULTADOS Y DISCUSION	56
V.1 Composición química.....	56
V.2 Microscopía electrónica de barrido.....	60
V.3 Aislado proteico de frijol.....	62
V.3.1 Electroforesis.....	66
V.3.2 Microscopía electrónica de barrido.....	67
V.4 Compuestos anti-nutricios.....	68
V.5 Composición nutritiva de la bebida.....	71
V.6 Parámetros fisicoquímicos.....	75
V.7 Evaluación sensorial.....	80
V.7.1 Prueba de nivel de agrado de las formulaciones.....	80
V.7.2 Identificación de aroma.....	81
V.7.3 Identificación de sabor.....	82
V.7.4 Agrado general.....	83
V.7.5 Prueba preliminar de nivel de agrado.....	84
VI. CONCLUSIONES.....	87
VII. APÉNDICE	89
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	94

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del frijol común.....	5
Cuadro 2. Composición nutrimental del frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	7
Cuadro 3. Tipos de péptidos bioactivos y sus efectos benéficos en la salud.	10
Cuadro 4. Factores anti-nutricios del frijol y sus efectos nutracéuticos.....	14
Cuadro 5. Características de compuestos de hierro usados para el enriquecimiento de alimentos	22
Cuadro 6. Criterios para la definición de anemia.....	28
Cuadro 7. Factores nutricionales que afectan la absorción del hierro.....	29
Cuadro 8. Composición química en las harinas del frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad Bayo Madero.....	55
Cuadro 9. Contenido de fibra total, soluble, insoluble y almidón en las harinas de frijol común variedad Bayo Madero.....	57
Cuadro 10. Rendimiento de proteína aislada a partir del frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) utilizando diferentes disolventes.....	60
Cuadro 11. Características de la proteína aislada de harina de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	62
Cuadro 12. Compuestos anti-nutricios en harinas de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad Bayo Madero.....	67
Cuadro 13. Compuestos antinutricios de las diferentes formulaciones de la bebida elaborada a base de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad Bayo Madero.....	68
Cuadro 14. Composición química de bebidas a base de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad Bayo Madero.....	71
Cuadro 15. Contenido de fibra total, soluble, insoluble y almidón en bebidas a base de frijol común.....	73
Cuadro 16. Características fisicoquímicas de las bebidas a base de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	76
Cuadro 17. Parámetros fisicoquímicos de las diferentes formulaciones de la bebida a base de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Datos estadísticos de la de la producción de frijol en México (SIAP, 2016).....	5
Figura 2. Producción de frijol por variedad en México en 2015, a) A nivel nacional, b) Por estado (SIAP-SAGARPA, 2018).....	6
Figura 3. Porcentaje a nivel mundial de personas con intolerancia a la lactosa.....	19
Figura 4. Representación esquemática de un extrusor de tornillo simple	26
Figura 5. Diagrama de experimentación para pre-tratamientos y obtención de harinas de frijol	32
Figura 6. Diagrama de experimentación para elaboración de la bebida.....	33
Figura 7. Diagrama para Análisis a las formulaciones y harinas	34
Figura 8. Formatos para la evaluación sensorial para prueba de nivel de agrado de siete puntos	52
Figura 9. Formato de evaluación sensorial por prueba de ordenamiento	54
Figura 10. Microfotografía electrónica de barrido de las Harina de frijol común variedad Bayo Madero a 2000x.....	59
Figura 11. Electroforesis del aislado proteico de harinas de frijol extruido a diferentes concentraciones de carga siendo.....	64
Figura 12. Microfotografía electrónica de barrido del aislado proteico del frijol variedad Bayo Madero a 500x.....	65
Figura 13. Gráfico de araña de identificación de aroma.....	76
Figura 14. Gráfico de araña de identificación de sabor.....	83
Figura 15. Gráfico de agrado general de las diferentes formulaciones de la bebida de frijol extruido.. ..	84

I. INTRODUCCIÓN

Como parte de una buena alimentación, las leguminosas y los cereales han tenido gran importancia, debido a sus propiedades nutritivas, bajo costo y por los efectos fisiológicos asociados a su ingesta, cualidades que las convierten en un producto básico, especialmente en las poblaciones de bajos recursos de países en vías de desarrollo como lo es México (De león *et al.*, 2015). El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) forma parte de las leguminosas más importantes a nivel mundial, su cultivo está extendido en los cinco continentes, siendo el México el cuarto lugar en producción con 70 variedades nativas y 150 mejoradas, y aunque no está considerado dentro de los cuatro cultivos prioritarios, es uno de los alimentos básicos de los pobladores de regiones de África, América Latina y el Caribe (González *et al.*, 2015). Así mismo el frijol común se destaca por sus propiedades nutritivas que están relacionadas con su alto contenido proteico y en menor medida a su aportación de carbohidratos, vitaminas y minerales (Suárez-Martínez *et al.*, 2016).

Actualmente los cambios en el estilo de vida, reacciones alérgicas y la sustentabilidad en la producción de alimentos hacen que la innovación en los alimentos tenga una orientación agregada con fines a grupos de individuos vulnerables, esto se logra a través de nuevos procesos de elaboración, estrategias más ecológicas, e implementando tecnologías emergentes como lo es altas presiones hidrostáticas, calentamiento ómico, microondas o extrusión (Muthukumarappan y Karunanithy, 2016); este último es un proceso termo-mecánico de corto tiempo, que involucra modificaciones en el tamaño, forma, textura y sabor del alimento, modificaciones fisicoquímicas como: solubilidad y absorción de agua, disminución de absorción de aceites, expansión, aumento en viscosidad y densidad; así como modificaciones moleculares: gelatinización del almidón, desnaturalización de la proteína, disminución de la humedad y/o aumento de fibra dietaria (Muthukumarappan y Swamy, 2018). El grupo de trabajo busca la innovación, producción y tecnología de alimentos funcionales que proporcionen beneficios al consumidor, como es el caso de una bebida a base de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) extruido variedad Bayo Madero, por lo que el objetivo de este trabajo fue mejorar y enriquecer con hierro biodisponible y con aislado proteico de frijol a esta bebida, evaluando sus propiedades nutricionales, fisicoquímicas y sensoriales para asegurar que posea las características deseadas.

II. ANTECEDENTES

II.1 Alimentos funcionales y nutraceuticos

En las últimas décadas el concepto de "alimento nutraceutico" ha crecido dentro de la industria alimentaria y de los consumidores. Los alimentos nutraceuticos o funcionales se pueden considerar como "similares a los alimentos convencionales", son parte de los alimentos basales de la dieta, se consumen regularmente y proporcionan nutrimentos básicos, así como beneficios específicos, como reducir el riesgo de padecer enfermedades crónicas (Heliodoro *et al.*, 2018; Varzakas *et al.*, 2016).

Mientras que un compuesto nutraceutico se puede definir como el o los componentes de los alimentos que aportan un beneficio añadido además del nutricio a favor de la salud del consumidor, inclusive para la prevención y el tratamiento de cierto tipo de enfermedades, es decir en un alimento hay un valor nutraceutico que se refiere a aquellos componentes conocidos a los que se atribuyen funciones de mantenimiento y potenciación de la salud (Reglero, 2011). Estos componentes son llamados compuestos bioactivos que influyen en la actividad celular y en los mecanismos fisiológicos (Martínez *et al.*, 2012) y son principalmente metabolitos secundarios sintetizados por las plantas y constituyen uno de los grupos más abundantes e importantes (Valentine *et al.*, 2013; Beneverente-García, 2014).

Dentro de los alimentos nutraceuticos encontramos a las leguminosas que son ricas en carbohidratos complejos, micronutrientes, aminoácidos y vitaminas (principalmente del grupo B), así como bajas en grasa, además de un alto contenido de fibra, folato, calcio, magnesio, hierro, zinc y potasio, por lo que junto con los cereales forman parte de una dieta saludable (OMS, 2016). El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa más importante para el humano en el mundo ya que se cultiva en los cinco continentes (FAO, 2017). La testa se conforma principalmente de hidratos de carbono y son una buena fuente de nitrógeno y proteínas, contiene gran variedad de minerales como: calcio, magnesio, potasio, fósforo, cobre, hierro, zinc, manganeso y azufre. También es rica en componentes bioactivos como: inhibidores de enzimas, lectinas, fitatos, oligosacáridos y compuestos fenólicos, que exhiben funciones metabólicas en humanos y animales, denominándose así alimento nutraceutico (Guzmán *et al.*, 2015). Dentro de las propiedades nutraceuticas que

se han descrito para *Phaseolus vulgaris* L. se incluyen: actividad de barrido de radicales libres (actividad antioxidante), reducción del índice glucémico, actividad anti-lipasa, anti-mutagénica, prevención contra el cáncer (actividad antiproliferativa), disminución de los niveles de colesterol plasmático y reducción de lipoproteínas de baja densidad, efecto protector contra enfermedades cardiovasculares (Suárez-Martínez *et al.*, 2016; Ramírez-Jiménez *et al.*, 2015).

Los consumidores son cada vez más conscientes de los beneficios del consumo de alimentos con valor agregado o conocido, es por ello que prestan una especial atención los alimentos que contienen compuestos que promueven la salud y con ello la prevención del desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles, lo que motiva a una búsqueda constante de productos naturales y accesibles. Por lo anterior, el grupo de trabajo ha centrado su interés en el estudio del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), así como el desarrollo de nuevos y mejorados productos a base de esta leguminosa, con el fin de promover la salud, así como ayudar a no perder su consumo principalmente en las zonas donde el cultivo es hedémico.

II.2 Frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

Dentro del grupo de las leguminosas, el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) (Cuadro 1) es una de las más importantes a nivel mundial. Es una planta anual, erecta o trepadora, de tallo pubescente o glabrescente en estado adulta, herbácea intensamente cultivada desde las zonas tropicales hasta las templadas. Las estipulas de las hojas tri-pinnadas son de forma lanceolada y de tamaño medio-centimétrico, los folíolos son anchamente ovados u ovado-romboidal, los laterales, implantados oblicuamente, las flores se disponen en racimos usualmente axilares, las bractéolas, con 5 sépalo y con el labio superior bidentado emarginado y el inferior tridentado, la corola, puede ser blanca, amarilla, violácea o roja, las alas obovadas adheridas a la quilla, también centimétrica y con ápice espiralmente retorcido. Esta leguminosa es originaria del continente americano, se le conoce con diferentes nombres tales como: poroto, haricot, caraota, judía, aluvia, habichuela, entre otros (Fernández *et al.*, 2010). El producto comestible más importante de la planta de frijol es el grano seco; la raíz de algunas especies tal como el de frijol ayocote

tienen usos medicinales ya que son hervidos y tomados como desinflamatorio del estómago, mientras que la infusión de hojas, es utilizada para el lavado y limpieza de los ojos (Fernández *et al.*, 2010).

El frijol común es una de las leguminosas de grano más importante a nivel mundial, su cultivo está extendido en los cinco continentes y aunque no está considerado dentro de los cuatro cultivos prioritarios, es uno de los alimentos básicos de los pobladores de regiones de África, América Latina y el Caribe (González *et al.*, 2015). De acuerdo a los Fideicomisos instituidos en relación con la agricultura (FIRA/2016) la producción mundial de frijol registra una tendencia al alza durante la década reciente, donde en el 2015 los siete principales países productores alcanzaron el 63% de la cosecha mundial de la leguminosa: India (24.7%), Brasil (19.2%), Estados Unidos (5.5%), México (5.3%), China (5%) y Tanzania (3.3%). El comercio de frijol en el mercado internacional es reducido en comparación con otros productos agrícolas; en general, los principales países productores destacan también como importantes consumidores, en la actualidad, el consumo mundial de frijol se estima en alrededor de 17 millones de toneladas; en México, el frijol ocupa la cuarta posición en importancia por la superficie que ocupa, después del maíz, pastos y sorgo. Durante el año agrícola 2015 se cosecharon 1.56 millones de hectáreas, de las cuales el 90 por ciento se cultivaron en condiciones de temporal (FIRA, 2016). Cabe resaltar que es considerado un recurso fitogenético importante, el cual se define como el material genético vegetal que tiene un valor real y potencial destinado a la alimentación y a la agricultura, los cuales son usados como recursos de conservación y en desarrollo para los agricultores tradicionales como para el desarrollo de nuevos usos y tecnologías (Ulloa *et al.*, 2011).

De acuerdo al servicio de información agroalimentaria y pesquera (SIAP) en 2016 la forma que es cultivada es la siembra en todos los estados del país, con una mayor superficie en Zacatecas, Durango, Chihuahua, Nayarit, San Luis Potosí, Guanajuato y Chiapas, la cosecha de estos estados representa más del 80% del frijol que se consume en el país. En la figura 1 se observa el comportamiento de la producción de acuerdo al tipo siembra de a nivel nacional de los años 2005 a 2014 (SIAP, 2016).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del frijol común.

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Fabales</i>
Familia	<i>Fabaceae</i>
Género	<i>Phaseolus</i>
Especie	Spp

(Sagarpa, 2015)

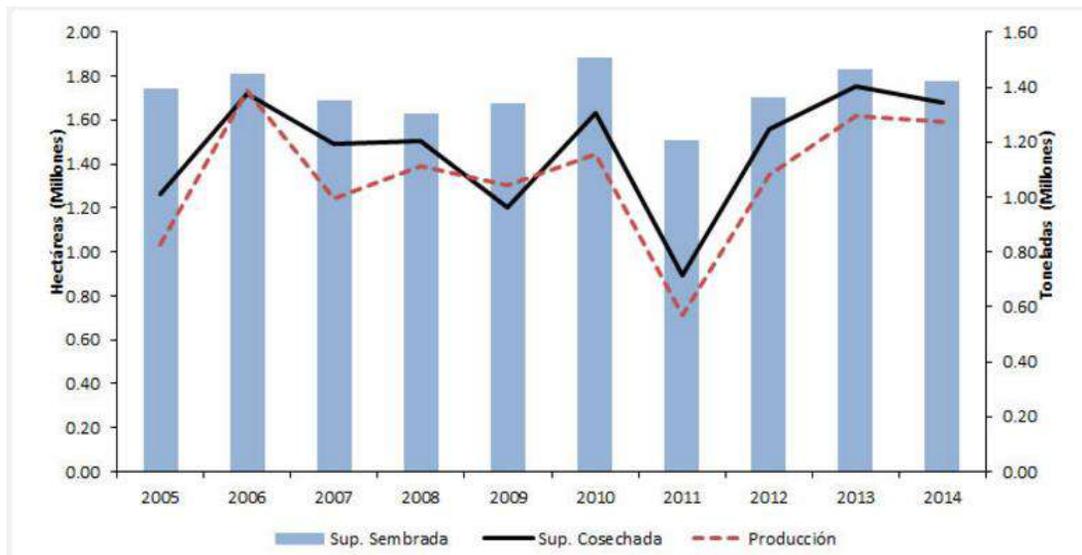


Figura 1. Datos estadísticos de la de la producción de frijol en México (SIAP, 2016).

México es considerado uno de los centros de origen del frijol y es uno de los principales países productores. Se considera que en el país existen cerca de 70 variedades nativas de frijol, los cuales se distribuyen en siete grupos principales (negros, amarillos, blancos, morados, bayos, pintos y moteados); además, se destacan cinco especies

domesticadas: *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común), *Phaseolus coccineus* Asa Gray (frijol ayocote), *P. lunatus* L. (frijol lima), *Phaseolus acutifolius* Asa Gray (frijol tepary) y *Phaseolus dumosus* Macfad (frijol acalate); así mismo, en el país hay más de 150 variedades mejoradas (FIRA, 2016; SAGARPA, 2015). En la figura 2 se muestra la producción de frijol de las principales variedades cosechadas en el 2015 (SIAP-SAGARPA, 2018).

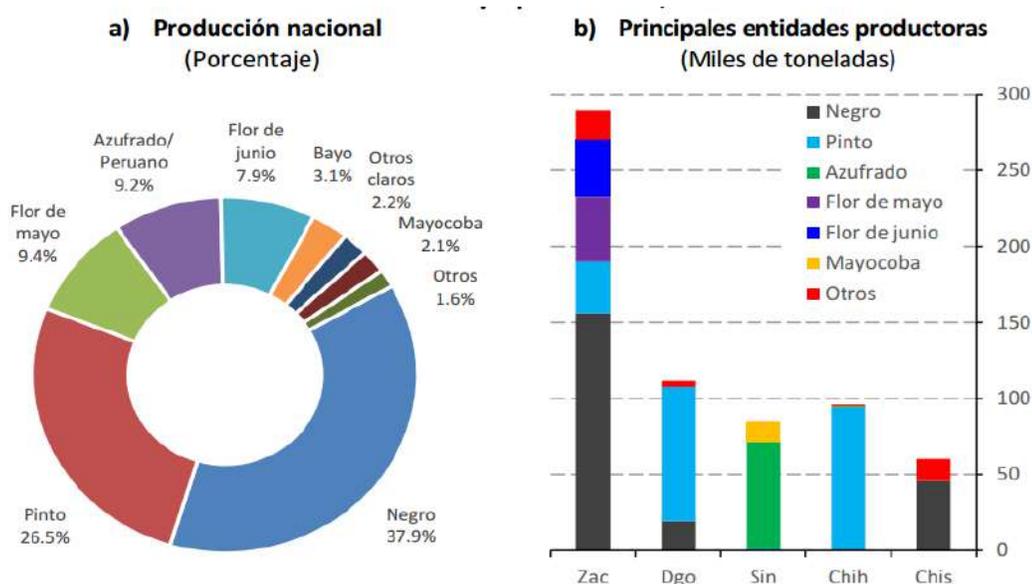


Figura 2. Producción de frijol por variedad en México en 2015, a) A nivel nacional, b) Por estado (SIAP-SAGARPA, 2018).

II.2.1 Composición química del frijol común

El frijol es uno de los alimentos básicos en la dieta del mexicano, entre las propiedades nutritivas se reconoce su alto contenido proteico, carbohidratos y en menor medida a su aportación de vitaminas y minerales (Cuadro 2/Fernández *et al.*, 2010). Además, en las últimas décadas, el frijol común ha sido considerado como un alimento nutracéutico debido a su contenido de compuestos bioactivos como los polifenoles, lectinas, ácido fítico, inhibidores de tripsina, almidón resistente, oligosacáridos, péptidos bioactivos y fibra dietaria (soluble e insoluble) (Luna-Vital *et al.*, 2015), los que a través de mecanismos fisiológicos multifactoriales que incluyen: la actividad antioxidante, la mediación hormonal, la mejora del sistema inmunológico, la facilitación del tránsito de

sustancias a través del tracto digestivo, la producción de ácido butírico en el colon y la absorción y/o dilución de sustancias en el intestino (Nyau, 2014).

Cuadro 2. Composición nutrimental del frijol común (*Phaseolus vulgaris*)

Componente	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Agua (g/100g)	12.10
Calorías (Kcal)	337
Carbohidratos (%)	69.11
Proteína (%)	25.40
Grasas (%)	1.70
Cenizas (%)	3.78
Fibra (%)	17.4
Carbohidratos (%)	4.41
Almidón (%)	37.42
Ácidos grasos saturados (%)	0.193
Ácidos grasos monoinsaturados (%)	0.145
Ácidos grasos poliinsaturados (%)	0.993
Calcio (mg)	167
Cobre (mg)	0.949
Hierro (mg)	6.24
Magnesio (mg)	199
Manganeso (mg)	1.613
Fosforo (mg)	463
Potasio (mg)	1348

Sodio (mg)	5.69
Zinc (mg)	4.15
Vitamina A (IU)	0
Tiamina (mg)	0.882
Riboflavina (mg)	0.186
Niacina (mg)	2.489
Ácido pantoténico (mg)	0.846
Vitamina C (mg)	-
Folatos totales (mg)	0.414
Vitamina B6 (mg)	0.487
Colina (mg)	99.4
Betaína (mg)	0.113
Tocoferol (mg)	2.5

Todos los valores se dan por cada 100 g en base seca de la semilla. Valores de los minerales y vitaminas superiores a 0.1 mg. Los datos marcados como (-) no estaban disponibles (Suárez-Martínez *et al.*, 2016)

II.2.1.1 Proteínas

El frijol común contiene de manera general un rango de proteína de 16 a 33 % dependiente de la variedad, siendo rico en aminoácidos como la lisina (6.4 a 7.6 g/100 g de proteína), fenilalanina y tirosina (5.3 a 8.2 g/100 g de proteína), pero con deficiencias en los aminoácidos azufrados: metionina y cisteína (Landa-Habana *et al.*, 2014; Campos-Vega *et al.*, 2009). En general las proteínas de los granos se clasifican de acuerdo a su: almacenamiento, metabolismo de carbohidratos, defensa, respuesta al estrés, desintoxicación, crecimiento y desarrollo, transporte y metabolismo de nitrógeno; dentro de las proteínas más relevantes de esta leguminosa se encuentra la faseolina y lectina, que son compuestos inhibidores de α -amilasa y del Bowman-Birk (Luna-Vital *et al.*, 2015).

Dentro de los aminoácidos presentes en esta leguminosa, los valores de histidina, isoleucina, lisina, fenilalanina, treonina y valina son ligeramente variables entre las

especies, mientras que la arginina puede presentar variaciones significativas (las especies silvestres muestran mayor nivel de aminoácidos que los cultivos domesticados). La digestibilidad de las proteínas de frijoles es de alrededor del 79% (Suárez-Martínez *et al.*, 2016), sin embargo, de acuerdo a evaluaciones de tipo biológico, la calidad de la proteína del frijol cocido puede llegar a ser de hasta el 70% comparada con una proteína testigo de origen animal a la que se le asigna el 100%, por lo que la recomendación es complementar el consumo del frijol con una dieta combinada con cereales tales como el maíz o el arroz, y así se logra tener todos los aminoácidos esenciales (Ulloa *et al.*, 2011).

La proteína del frijol común se ha clasificado en dos grupos: las globulinas que son solubles en soluciones salinas (45 a 70%) y las albúminas solubles en agua (10 a 30%). Dentro de las albúminas, la más importante es la faseolina que representa 30 a 50 % de la proteína total del frijol común, siendo la proteína de almacenamiento más importante del frijol (Yao *et al.*, 2015), consiste en tres subunidades polipeptídicas α , β y γ de 51-53, 47-48 y 43-47 kDa de peso molecular respectivamente, su valor nutritivo es limitado por baja cantidad de metionina y cisteína y alta resistencia a la proteólisis (Deshpande y Sathe, 2018). La familia de las lectinas (hemaglutininas/fitohemaglutininas) son glicoproteínas tipo globulinas que corresponden a otra fracción importante en el frijol común con 10 a 20 % que incluyen: lectina, fitohemaglutininas (E y L), inhibidores de la α -amilasa y arcelinas, las cuales pueden unirse a azúcares o proteínas causando una absorción interrumpida de estos nutrientes limitan la absorción en la pared intestinal del intestino delgado. La toxicidad de las lectinas también puede llevar a inhibición del crecimiento, aglutinación de glóbulos rojos, diarrea, náuseas, hinchazón y vómitos, Sin embargo, las lectinas están involucradas en la defensa de las plantas ya que mejoran la resistencia contra bacterias, hongos o insectos (Shi *et al.*, 2017; Bhanu *et al.*, 1997) y como alternativas para el tratamiento de heridas de la piel. Inhibidores de proteasa, inhibidores de tripsina Kunitz e inhibidores de Bowman-Birk son proteínas relacionadas con la defensa, comúnmente encontradas en las leguminosas. Tripsina es una proteína globular soluble en agua cuya principal función radica como enzima formadora de péptidos, cortando entre arginina y lisina, por otra parte, los inhibidores de tripsina atacan a la tripsina causando cambios estructurales en la proteína perdiendo su funcionalidad biológica, estos inhibidores tienen características hidrofóbicas y hidrofílicas (Chanphai *et al.*, 2017); sin embargo, las lectinas

y los inhibidores de proteasa son termosensibles, por lo tanto, son inactivados con el proceso de cocción (Luna-Vital *et al.*, 2015).

Los péptidos bioactivos son fragmentos resultantes del rompimiento de los enlaces peptídicos por tratamiento mecánico, químico o bioquímico en las proteínas, estas sustancias son inactivas dentro de la proteína intacta, pero pueden activarse al ser liberadas durante la digestión gastrointestinal del alimento que las contiene, o por su procesamiento. Los péptidos bioactivos pueden actuar en beneficio de la salud del organismo que los consume (Cuadro 3), es por ello que además de las características nutricionales de una proteína también se debe considerar la presencia y actividad de péptidos bioactivos que podrían liberarse de su hidrólisis, ya sea a través de la digestión gastrointestinal o durante su procesamiento.

Cuadro 3. Tipos de péptidos bioactivos y sus efectos benéficos en la salud.

Péptidos	Efecto positivo a la salud
Inhibidores de ECA (antihipertensivos)	Reduce el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares
Antioxidantes	Previenen enfermedades degenerativas y el envejecimiento
Antimicrobianos	Reducen el riesgo de infecciones
Inmunomoduladores	Estimulan la respuesta inmune
Quelantes	Mejoran la absorción de minerales y metales
Anticoagulantes	Reducen los riesgos de padecer coágulos de sangre en las venas
Hipocolesterolémicos	Reduce el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares
Opioides	Regulan el tránsito intestinal, mejoran la digestión y absorción de nutrientes

(Godoy *et al.*, 2011)

La ventaja que presentan los péptidos bioactivos radica en que en una proteína pueden existir distintos tipos de éstos con diferentes propiedades (Godoy *et al.*, 2011). Las

proteasas tales como: alcalasa, flavourzyme, pepsina, pancreatina, quimotripsina, papaína, tripsina y termolisina son los péptidos bioactivos que se producen de las proteínas de frijol, el cual dependerá de la relación de enzima/sustrato, pretratamiento de proteína, tiempo de hidrólisis y la combinación de enzimas y procesamiento posteriores para su generación

II.2.1.2 Compuestos anti-nutricios

Los compuestos anti-nutricios son compuestos que se encuentran comúnmente en las semillas y granos comestibles, y cuando son ingeridos disminuye la biacesibilidad en el cuerpo humano especialmente proteínas, vitaminas y minerales (Nikmaram *et al.*, 2017). En general, las leguminosas se han reconocidos por su bajo contenido nutritivo debido a la presencia de compuestos o factores anti-nutricios que limita la absorción de compuestos nutricionales y bioactivos, los frijoles crudos contienen componentes anti nutricionales que pueden afectar la salud si no son procesados correctamente (Cuadro 3). Los efectos adversos incluyen inhibición del crecimiento, bajo equilibrio de nitrógeno, colitis, mala digestibilidad, flatulencias, disminución de la absorción intestinal de azúcares, minerales, vitaminas y aminoácidos, además de una respuesta inmune alterada. Entre las sustancias anti nutricionales del frijol común se encuentran; enzimas inhibidoras (inhibidores de tripsina, inhibidores de amilasas), compuestos fenólicos (taninos), lectinas, fitato, oligosacáridos no digeribles, saponinas, (Mucuna, 2013; Nikmaram *et al.*, 2017). Sin embargo, paradójicamente, las bajas concentraciones de algunos factores anti nutricionales exhiben efectos nutraceuticos Las propiedades térmicas de las proteínas son un factor de interés debido a que el frijol contiene factores anti-nutricios y para inactivarlos es necesario un tratamiento térmico, por lo que temperaturas de 84 a 91 °C por 15 a 20 minutos, sería suficiente para inactivar los compuestos no deseados y conservar las propiedades proteicas del frijol (Suárez-Martínez *et al.*, 2016; Rui *et al.*, 2011).

La ingesta de calcio es necesaria para tener una buena alimentación y estar saludable, este mineral se encuentra principalmente en sales, sin embargo, interfiere con la utilización de otros minerales principalmente del hierro, cuando se encuentra en mezcla o individualmente como: carbonato de calcio, malato de calcio, hidroxipapita, calcio coloidal, fosfato de calcio y fosfato de potasio, reduce más del 50 % de la absorción del hierro en

individuo adultos, en contraste el calcio glucoronidado que no afecta significativamente la absorción de hierro. Esto puede deberse a la formación de ligandos en el medio ácido del estómago y la primera parte del lumen, esta formación de complejos de alto peso molecular da como resultado la polimerización y la precipitación del hierro provocando decremento en la biaccesibilidad, por lo que la consideración como compuesto anti nutricio está directamente relacionado con el pH y la solubilidad, siendo insoluble en ambiente neutro (McQuaid *et al.*, 2018; Prather y Miller., 1992).

El ácido fitico o mio-inositol hexafosfato se encuentra de forma natural el cereales, semillas oleaginosas, nueces, leguminosas y granos en rangos de 0.4% a 6.4% del peso total, se encuentra principalmente en la aleurona (proteína de reserva), se han reportado propiedades benéficas a la salud desde prevención de enfermedades cardiovasculares diabetes, actividad anticancerígena y anti oxidativa; sin embargo, el ácido fitico contiene seis grupos fostatos reactivos otorgando característica de agente quelante fuerte, en consecuencia forma complejos insolubles con metales reduciendo la absorción de minerales como el hierro, zinc, magnesio y calcio causando deficiencia de iones metálicos en humanos y animales (Nikmaram *et al.*, 2017; Raes *et al.*, 2014).

Los taninos son compuestos fenólicos, sintetizados por la biosíntesis de los flavonoides, formados por unidades de antocianidinas, con peso molecular superior a 500 Da, se encuentran en plantas como berries, cacao, vegetales y en poca proporción en cereales y leguminosas, principalmente en las hojas, semillas, raíces, ramas y brotes. Existen dos tipos de taninos: los hidrolizables y los condensados, cuya diferencia radica en los efectos nutricionales y tóxicos; los taninos hidrolizables se caracterizan por no resistir a la hidrólisis durante el proceso de digestión, por lo que llegan al intestino delgado en compuestos más simples y fácilmente absorbidos, mientras que los condensados resisten a la hidrólisis ácida del estómago, por lo que no pueden ser absorbidos, el efecto antinutricional radica en que los taninos condensados forman enlaces con proteínas y minerales mediante puentes de hidrógenos e interacciones hidrofóbicas, formando así complejos de alto peso molecular que no son digeribles (Nikmaram *et al.*, 2017; Raes *et al.*, 2014).

Los compuestos anti-nutricios son desactivados de manera tradicional por proceso térmico corto de alrededor de 15 a 20 minutos a temperatura de 70-80 °C, algunos de ello

son hidrosolubles, por lo que un remojo antes del tratamiento ayuda a disminuir significativamente su contenido. Actualmente otras tecnologías como altas presiones, microondas y extrusión se han introducido como alternativas para reducir los niveles de compuestos anti-nutricios (Zarei y Kafizadeh, 2013).

Cuadro 4. Factores anti-nutricios del frijol y sus efectos nutraceuticos.

Fotoquímico	Efectos anti-nutricios	Efectos benéficos
Lectinas	Pérdida de peso o reducción del aumento de peso, atrofia de ciertos órganos, hígado graso y otras lesiones histológicas. Son capaces de sobrevivir al paso a través del tracto gastrointestinal	Efecto de disminución del apetito, colecistoquinina y secreción de péptidos similar al glucagón. Regulación celular (aglutinación o agregación celular, apoptosis); Regulación de la actividad de la telomerasa e inhibición de la angiogénesis. La administración oral de dosis bajas tiene efectos beneficiosos sobre: eficiencia de la digestión y absorción intestinal, respuesta inmune.
Inhibidores de α -amilasa y glucosidasa	Interfiere con almidón y descomposición de carbohidratos complejos reduciendo el digestibilidad	Efecto hipoglucémico. Respuesta postprandial al efecto reductor de la insulina. Enfermedades específicas: sobrepeso, obesidad, diabetes.
Inhibidores de proteasas	Inhibición de la actividad proteolítica. Interfiere con la digestión o absorción de proteínas y aminoácidos.	Efecto en las enzimas proteolíticas, proliferación y supervivencia celular, metástasis de invasión. Enfermedades como el cáncer y VIH.
Flavonoides: glicósidos de flavonol, antocianinas y taninos condensados	Formación de complejos proteicos, inhibición de las enzimas digestivas, aumento de la excreción de proteínas endógenas	Inhibición de la oxidación. Supresión de la prostaglandina E2, liberación de óxido nítrico y secreción de TNF- α e IL-6. Inhibición del factor nuclear NF- κ B y proteína activadora (AP) -1 respuesta. Aumento de GSH, SOD, catalasa, GPx y GST.
Fibra (soluble e insoluble), almidón resistente y oligosacáridos	La principal causa de flatulencia en el frijol común es el almidón resistente, la familia de los oligosacáridos y componentes de fibra dietética	Actividad reductora del colesterol, triglicéridos y LDL; Aumento de la excreción de ácidos biliares en las heces. Enfermedades como: hipercolesterolemia, enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes, constipatio.
Fitatos	Interacción con proteínas, Ca, Fe, Mg y Zn; Inhibición de enzimas digestivas.	Inducción de la diferenciación celular. Enfermedades específicas: enfermedades cardiovasculares, cáncer.

(Suárez-Martínez *et al.*, 2016)

Existen otros métodos utilizados para la inhibición de estos compuestos son: degradación por enzimas digestivas, tratamientos con pH, acidosis, dependiendo de la concentración y el compuesto es el grado de aspereza y el tiempo, siendo en la mayoría tiempos muy cortos (segundos) (Mucuna, 2013).

Sin embargo, algunos de los agentes anti-nutricios son termolábiles y a muchos de ellos actualmente se les han atribuido mayor potencial benéfico comparado con el dañino (Badui, 2006). Por otra parte la digestibilidad, y por lo tanto la absorción de micronutrientes tales como el hierro (Fe^{+2}), se mejora mediante procesos de calentamiento, con el consiguiente ablandamiento de la matriz alimentaria, se liberan los elementos unidos a proteínas, carbonatos, y ácidos como el ácido fítico, facilitando así su absorción. Además, el calentamiento de alimentos altera los factores inherentes que inhiben la absorción de minerales, como los fitatos y la fibra dietética (Naozuka y Oliveirab., 2013).

II.2.1.3 Carbohidratos

Los frijoles contienen un bajo contenido de carbohidratos comparado con los cereales, dentro de estos se encuentran como componentes primarios los polisacárido y el almidón (fibra dietética), así mismo los mono-, di-, y oligosacáridos se encuentran con cantidades menores pero significativas (Suárez-Martínez *et al.*, 2016).

La fibra dietética está compuesta por: almidón resistente, fibra soluble e insoluble, dentro de los principales componentes químicos presentes en la leguminosa están: las pectinas, pentosanos, hemicelulosa, celulosa y lignina (Landa-Habana *et al.*, 2014). Además, este alimento también es una fuente considerable de calcio, hierro, fósforo, magnesio y zinc y de las vitaminas tiamina, niacina y ácido fólico (Ulloa *et al.*, 2011).

La fracción no digerible (FND), se define como la parte de los alimentos vegetales que no se digiere o no se absorbe en el intestino delgado y alcanza el colon, donde sirve como sustrato para la microbiota fermentativa. Esta comprende las fracciones soluble e insoluble, almidón resistente, oligosacáridos, ciertos polifenoles, péptidos bioactivos y otros compuestos asociados (Ramírez-Jiménez *et al.*, 2015).

El almidón representa la principal fracción que confiere energía en este tipo de alimentos, cabe mencionar que durante su cocinado, una parte del mismo queda indisponible, dado que se transforma en almidón resistente, sin embargo los carbohidratos no digeridos que llegan al colon junto con la fibra dietética soluble e insoluble y los oligosacáridos no digeribles; los cuales pueden fermentarse en el intestino grueso (Reynoso-Camacho *et al.*, 2003; Suárez-Martínez *et al.*, 2016). Cabe destacar que las leguminosas contienen cantidades importantes de almidón resistente en comparación a los cereales, tubérculos y frutas no maduras. Campos-Vega *et al.* (2010) reportaron un aumento de la fracción no digerible (de 30.5 a 40.7%) y fibra insoluble (de 31 a 41%) a partir de 1 g de frijol en base seca al aplicar un tratamiento térmico (cocción tradicional), por lo que un aumento en la temperatura provoca que se incremente el contenido de polisacáridos no amiláceos y/o modifica la formación de almidón, resistiendo la acción enzimática e incrementa la fibra dietaria total y sus fracciones (De León *et al.*, 2013). El almidón del frijol común es alto en almidón de lenta y de rápida digestión con alrededor de 30 a 40 % de amilosa, este tipo de almidón se asocia con la reducción del índice glucémico y por lo tanto con la disminución de los niveles de glucosa posprandial en comparación con el almidón de rápida digestión (Hutchins *et al.*, 2012). Se ha reportado que el oligosacárido mayoritario del frijol (dependiente de la variedad) es estaquiosa seguido de rafinosa y verbascosa en semillas crudas y cocidas, sin embargo estaquiosa muestra un aumento después del tratamiento térmico, lo que se sugiere que puedes degradar la verbascosa liberando la galactosa, por medio de hidrólisis no enzimática liberando oligosacáridos que se encuentran unidos a macromoléculas (De León *et al.*, 2013).

II.2.1.4 Compuestos fenólicos

El frijol común contiene compuestos polifenólicos. Chen *et al.* (2017) reportaron diferentes compuestos fenólicos en un extracto metanólico de una muestra seca de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) tales como: catequina, glucósido catequina, epicatequina, ácido p-cumárico, delphinidina, quercetina, ácido fítico, ácido ferúlico y triptófano; entre los menores destacaron: el ácido gálico, ácido cafeico, ácido vainílico, naringenina, ácido clorogénico, ácido hidroxibenzoico, ácido 2,5-dihidroxibenzoico (ácido gentísico), ácido 3,4-dihidroxibenzoico (ácido procatecuico), procianidina C1, procianidina B1y B2 y

ácido sinápico. Así mismo, se ha reportado la presencia en la fracción no digerible de taninos no condensados, los cuales pueden fermentarse en el colon y producir ácidos grasos de cadena corta (De león *et al.*, 2013; Nyau, 2014).

II.2.2 Frijol común (*Phaseolus vulgaris L*) variedad Bayo Madero (BM)

Dentro de la composición química general de la variedad BM se ha reportado un contenido de proteína de 14.2%, lípidos 0.8%, humedad 11%, cenizas 3.7%, polisacáridos 25.6% de los cuales corresponde a un 25.3% fibra insoluble y 0.6%, fibra soluble, en 100g de muestra seca (Campos-Vega *et al.*, 2009). Además, Vergara-Catañeda *et al.* (2010) reportaron que BM tuvo un mayor rendimiento de polisacáridos y almidón resistente comparado con las variedades Azufrado, Negro y Pinto las cuales son de consumo común en México. De igual manera, se reportó un contenido de azúcares totales, almidón resistente, taninos condensados, rafinosa y estaquiosa: 9.75, 37.0, 0.81, 9.65, 0.1 mg/g de polisacárido liofilizado respectivamente (Campos-Vega *et al.*, 2010). Por otra parte en estudios *in vitro* donde se evaluó la generación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) de la fracción no digerible del frijol BM, produciendo ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico a diferentes tiempos (6, 12 y 25 h) obteniendo a las 24 h: 48, 12, 15 mM eq AGCC, respectivamente (Campos-Vega *et al.*, 2009).

Velasco-González *et al.* (2013) reportaron un contenido porcentual de cenizas de 4.25, siendo el hierro en mayor proporción con 1.2743% seguido del magnesio con 0.1557% y calcio de 0.0202%. Esta variedad es una de las más blandas con un valor de dureza de 8.787 N, una transición vítrea de 74.12 °C, punto de fusión 167.09°C, viscosidades a 90 y 50°C en centipoise (cP) de 1508 a 1818, respectivamente.

II.3 Bebidas a base de cereales y leguminosas

Las expectativas de los consumidores en cuanto alimentos y/o bebidas es la conveniencia de presentación, transporte y/o distribución, la variedad, el contenido calórico, así como mayor vida de anaquel, lo cual ha provocado la necesidad de modificar y adoptar nuevas técnicas de procesamiento de alimentos, esto con el fin de obtener un

mejoramiento en la calidad sensorial, nutritiva, vida media y sobre todo en la aceptación (Moreno, 2016). Actualmente las tendencias de nuevas bebidas se han incrementado debido al crecimiento de algunos padecimientos como: la intolerancia a la lactosa, alergias, cambios de hábitos y estilos de vida más armoniosos con el medio ambiente. El procesamiento, la distribución, comercialización y la preparación de los alimentos juega un papel crucial, ya que de ellos dependerá la inocuidad y el valor nutritivo previniendo el desarrollo de enfermedades y la mala nutrición (Nyau, 2014). Es por ello que en la actualidad en los supermercados las leches vegetales están cada vez más presentes y se están posicionando como una sólida alternativa a la leche (Andreu, 2016).

Las bebidas vegetales son extractos líquidos de legumbres, frutos secos o cereales. Donde el proceso de elaboración consiste en remojar el grano, molerlo y colarlo para obtener un líquido con un valor nutritivo variable en proteínas, grasas, carbohidratos, vitaminas y minerales, en función del sistema de obtención y de la materia prima utilizada. Usualmente se añaden nutrientes tras su elaboración para intentar asemejar su composición a la de la leche de vaca. Es por ello que estas bebidas se denominan en ocasiones “sucedáneos de la leche de vaca” (Nyau, 2014).

En México 1 de cada 5 individuos presentan intolerancia a la lactosa, sin embargo, a nivel mundial se presenta en un 61 a 70 % de la población; en la Figura 3, se muestra el porcentaje y distribución de este padecimiento a nivel mundial. La intolerancia a la lactosa se caracteriza por niveles bajos o inexistentes de enzima lactasa, y el tratamiento principal consiste en cambios en la dieta, especialmente la sustitución de productos lácteos por análogos (Nardi *et al.*, 2017). De la misma forma el estilo de vida está cambiando, la tendencia en adoptar una dieta vegetariana es cada vez más fuerte por muchas razones, tales como la compasión hacia los animales, el deseo de proteger el medio ambiente, para reducir el riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles, o para controlar terapéuticamente esas enfermedades (Vesanto *et al.*, 2016). Por ello en la actualidad existen en el mercado bebidas a base de cereales o leguminosas cuyo objetivo es sustituir el consumo de la leche y así mismo, implementar el consumo de estas nuevas bebidas a este sector de la población y ofrecer una alternativa nutritiva (Haghighatdoost y Azadbakht, 2015). Así mismo, su disponibilidad a través de la elaboración industrial, su agradable sabor y gran aceptabilidad

han motivado el crecimiento de su consumo por la población en general y de aquellos que padecen alguna alteración en su salud.

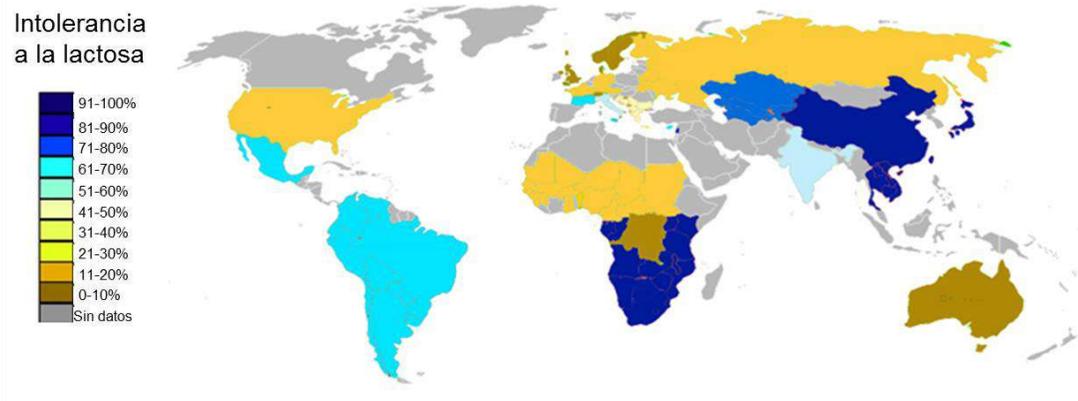


Figura 3. Porcentaje a nivel mundial de personas con intolerancia a la lactosa. (OMS, 2016)

II.3.1 Pre-tratamientos, extracción y producción de una bebida a base de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad BM.

Hay una amplia variedad de bebidas a base de leguminosas, aunque la mayor parte se ha centrado en los productos obtenidos de la soya, sobre la caracterización físico-química, los efectos del procesamiento, la aplicación de nuevas tecnologías tales como: pulsos eléctricos y presiones ultra-altas de homogeneización (Li *et al.*, 2008; Bernat *et al.*, 2015).

La investigación de bebidas vegetales es aún escasa y la mayor parte de ella está relacionada con la calidad nutricional de estos productos. En este sentido, en nuestro grupo de trabajo se ha desarrollado una bebida preliminar a base de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) la cual se tiene como perspectiva tener una función alternativa a la leche en los lacto-intolerantes, mujeres embarazadas y los celíacos, debido a sus altos niveles de proteínas, compuestos fenólicos y minerales (Chico, 2015).

II.3.1.1 Productos en el mercado

Actualmente existen muchas bebidas a base de leguminosas y cereales principalmente a base de soya, almendras, arroz, de coco, garbanzo, kamut, cacahuete, linaza, avellana, cajú, sésamo. De acuerdo a la FAO en el año 2016 el aumento del consumo de estas bebidas en Estados Unidos de América fue del 25% lo que equivale a que pasó de consumir 101 millones a 123 millones de litros anuales, sin embargo, en el mercado no existe ninguna bebida a base de frijol; Chico en 2015, como parte de nuestro grupo de trabajo desarrolló una bebida a partir de frijol común con una aceptación superior comparada con la bebida de almendra, otro de los factores relevantes fue su contenido de proteína de (0.9%) el cual compite con los productos que ya están en el mercado, su cantidad de fibra y los minerales son bajos; sin embargo es un nuevo reto el incrementar el contenido de proteína, conservando la aceptación del producto, así como incorporar el hierro como mineral esencial dándole la orientación a ser un producto para personas con anemia o con bajo consumo de éste.

II.3.1.2 Aditivos y enriquecimiento

De acuerdo al codex alimentario un aditivo alimentario es cualquier sustancia que no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición intencionada al alimento con fines tecnológicos (incluidos los organolépticos) en sus fases de fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte o pueda preverse razonablemente que resulte (directa o indirectamente) por sí o sus subproductos, en un componente del alimento o un elemento que afecte a sus características (Norma General del Codex para los Aditivos Alimentarios, 2017). Dentro de las propiedades reológicas, en disoluciones proteicas que no muestran comportamiento Newtoniano, el coeficiente de viscosidad disminuye cuando aumenta la velocidad de deformación, denominándose pseudoplástico. Este comportamiento es debido a la tendencia de estas moléculas a orientarse con su eje mayor en la dirección del flujo. Disoluciones de proteína fibrosa como la gelatina, permanecen orientadas, por lo que no recuperan rápidamente la viscosidad original, los hidrocoloides en una bebida indicarán el

comportamiento reológico que a su vez interactúa con los diferentes aditivos alimentarios que se encuentren en el producto (Ospina *et al.*, 2012).

Por otra parte la NOM-086-SSAI-1994 define la enriquecimiento como adicionar una o varias vitaminas, minerales o proteínas (aminoácidos) que normalmente no contiene el producto. La enriquecimiento voluntaria es aquella en la cual la industria agrega conscientemente los micronutrientes a los alimentos procesados dirigidos a los niños mayores de cuatro años o más y para los adultos. Los niños deben seguir recibiendo leche materna con alimentos complementarios hasta por 2 años o más. Al final del período de alimentación complementaria, los niños gradualmente pueden habituarse a comer los alimentos de la familia, los cuales pueden ser voluntariamente fortificados (OPS, 2002). Otro concepto importante es el enriquecimiento de los alimentos, el cual se define en aumentar el contenido de algún elemento, los alimentos enriquecidos poseen una incorporación de nutrientes considerados necesarios por la Autoridad Sanitaria a fin de contribuir en la mejora de las carencias de nutrientes que existen en la población, ya sea que presentan estados fisiológicos particulares o que requieren una incorporación de cierto/s nutriente/s en mayor concentración para prevenir enfermedades específicas, siempre y cuando el alimento de forma natural ya posea estos nutrientes (OPS, 2002).

II.3.1.2.1 Enriquecimiento con hierro

Los compuestos de hierro inorgánico se utilizan comúnmente para el enriquecimiento de los alimentos y se clasifican como: solubles en agua, poco solubles en agua/solubles en soluciones ácidas e insolubles en agua/poco solubles en soluciones ácidas. Dentro de la segunda clasificación se encuentra el sulfato ferroso el cual tiene un grado de absorción alto en los adultos y adolescentes, pero los datos recientes indican que se absorbe menos en las personas con una concentración de ácido gástrico inferior, en particular los niños pequeños; la ventaja de este compuesto es que interactúa menos con la matriz alimentaria, y causa menos cambios sensoriales (Davidsson *et al.*, 2011; Martínez-Navarrete *et al.*, 2002). Por estas razones, se usa generalmente en los cereales para niños, las bebidas de chocolate y algunos alimentos para el período de destete a base de cereal disponibles en el mercado (OPS, 2002), puede ser usado como un aditivo nutricional por mucho tiempo.

Además, el sulfato ferroso puede mejorar el nivel de protohemo, y mantenerlo en un nivel normal, es una preparación orgánica de hierro que contiene Fe^{+2} por lo que tiene buena biodisponibilidad a diferencia del sulfato ferroso en la absorción, no destruye vitaminas ni catalizará la reacción de oxidación, mejora la calidad de nutrientes premezclados y mezclados, promover el crecimiento de los animales, y reducir los costos (sunwinchemicals, 2017; La Frano *et al.*, 2015).

Cuadro 5. Características de compuestos de hierro usados para el enriquecimiento de alimentos

Compuesto	Contenido de hierro (%)	Bioaccesibilidad relativa *	Costo relativo (mg de hierro)
Soluble en agua			
Sulfato ferroso heptahidratado	20	100	1.0
Sulfato ferroso seco	33	100	1.0
Gluconato ferroso	12	89	6.7
Lactato ferroso	19	67	7.5
Poca solubilidad en agua, soluble en soluciones ácidas			
Fumarato ferroso	33	100	2.2
Succinato ferroso	33	92	9.7
Hierro electrolítico	97	75	0.8
Formas encapsuladas			
Sulfato ferroso	16	100	10.8
Fumarato ferroso	16	100	17.4

*Evaluado en estudios con individuos adultos (WHO, 2009)

Existen muchas fuentes de hierro en los alimentos (Cuadro 5); sin embargo estudios *in vivo* indican que el sulfato ferroso es el de mayor bioaccesibilidad comparada con fumarato ferroso y hierro electrolítico, entre otros. Adicionalmente este tipo de hierro inorgánico se ha demostrado que no causa sabores metálicos en jugo de naranja en concentraciones de hasta 25 mg de hierro en 1L, mientras en harinas destacan una

concentración de 12 mg de hierro en 1 Kg (Della *et al.*, 2013; WHO., 2009; Erichsen *et al.*, 2005). Las características fisicoquímicas se describen en el Cuadro 6. Lo que sugiere que el sulfato ferroso es buena opción para el enriquecimiento de bebidas.

Existen tres etapas para el enriquecimiento de alimentos con hierro: 1. Selección del compuesto de hierro: identificar el compuesto de hierro que tenga el mayor potencial de absorción y que, al ser agregado al nivel apropiado, no produzca ningún cambio sensorial inadmisibles en el alimento enriquecido o el producto final cocinado. Esto obliga a contar con información sobre la aceptabilidad del color, el sabor y el olor después de la enriquecimiento, al final del período máximo de almacenamiento normal y después de procesar o cocinar el producto final. 2. Optimización de la absorción de hierro para satisfacer las necesidades nutricionales: mediante la adición de promotores de la absorción o la eliminación o disminución de los inhibidores, de ser posible. 3. Medición del cambio en el nivel de hierro en la población destinataria: mediante la determinación de la prevalencia y el cambio de la carencia de hierro y la anemia ferropénica (OPS, 2002).

Cuadro 6. Características fisicoquímicas de hierros usados en el enriquecimiento de alimentos

Características	Solubilidad del compuestos de hierro				
	Agua	Soluciones ácidas	Poca en soluciones ácidas	Compuestos quelados	Compuestos encapsulados
Compuesto de hierro	Sulfato ferroso	Fumarato ferroso	Hierro electrolítico	Bisglicinato ferroso	Sulfato y fumarato ferroso
Reactividad con el alimento	Alta	Intermedio	Muy baja	Baja a Intermedia	Baja
Biodisponibilidad*	100%	100%	20 a 50%	100%	100%
Coso a base del contenido de hierro	Intermedio	Intermedio	Bajo	Alto	Intermedio a Alto
Costo a base a la biodisponibilidad	Bajo	Bajo	Intermedio	Alto	Intermedio

* Con respecto al sulfato ferroso (OPS, 2002).

II.3.1.2.2 Enriquecimiento con proteína

El enriquecimiento de proteínas de diferentes productos sigue siendo una fuerte tendencia para satisfacer las necesidades nutricionales del consumidor. Dado que los consumidores exigen diferentes tipos de productos en diferentes momentos del día, las proteínas que se adiciona deben satisfacer una variedad de necesidades (Bashir *et al.*, 2015). La más utilizada hasta el momento son las proteínas lácteas, sin embargo, el contante incremento de información y las nuevas tecnologías que involucran las proteínas vegetales, las proteínas provenientes de legumbres se pueden utilizar como fuentes de proteínas en diferentes alimentos debido a su calidad de proteína y su atractivo nutricional y tecnológico, esto como ingredientes seguros para la enriquecimiento y enriquecimiento de productos como: leches, bebidas, embutidos, lácteos, galletas y harinas, entre otros (Nogueira y Steel, 2018a; Nogueira *et al.*, 2018b).

La utilización de proteínas vegetales en un número de sistemas de alimentos, favorece a tener una dieta con niveles normales sin otorgar sabor, olor o características fisicoquímicas no favorables en los productos, esto en comparación con las proteínas animales que sí satisface los requerimientos nutricionales humanos pero otorga cambios no deseados en los productos enriquecidos (Gani *et al.*, 2015). Como la calidad nutricional de una proteína depende del contenido de sus aminoácidos esenciales y su digestibilidad, la calidad nutricional de la bebida se puede mejorar mezclando otras proteínas de alto contenido de aminoácidos limitantes en el frijol, esto proveniente de una dieta rica en cereales como el maíz (Morales-de León *et al.*, 2007).

II.3.1.3 Hidrocoloides

La goma Carboximetilcelulosa (CMC) es un hidrocoloide de gran utilidad en la industria de alimentos; por su transparencia, viscosidad y tolerancia a medios ácidos se emplea en muchos productos, dentro de los más destacados se encuentran: productos lácteos congelados, panificación, pasteles y pastas, dulces, bebidas de frutas o sabores, bebidas en polvo, industria química, entre otros; la carga negativa de la CMC favorece el desarrollo de sus características de viscosidad. Particularmente esto se ve influenciado en productos con presencia de proteína (Fennema, 2000).

La goma xantana se utiliza como agente reológico en sistemas, ya que incrementa la viscosidad, ayuda a estabilizar las emulsiones y evita la sedimentación de sólidos en algunas formulaciones, es pseudoplástica y no afecta la temperatura, puede ser usado en sistemas ácido o alcalinos y es incompatible con oxidantes fuerte y sales divalentes como calcio, magnesio o bario (Badui, 2006).

II.3.1.4 Extrusión

La extrusión de alimentos es una tecnología emergente en la industria de alimentos para procesar y comercializar un gran número de productos de diferentes tamaños, forma, textura y sabor. Ésta tecnología ha llevado a la producción de una amplia variedad de productos como: pasta, cereales para el desayuno, migas de pan, galletas dulces y saladas, frituras, pan tostado, alimentos para bebés, bocadillos, artículos de confitería, goma de mascar, proteína vegetal texturizada, sopas secas, mezclas de bebidas, entre otras. Las propiedades funcionales de los alimentos extruidos juegan un papel importante para su aceptabilidad, ya que incluyen, la absorción y solubilidad en agua, índices de absorción de aceite, índice de expansión, densidad aparente y viscosidad de la masa (Mc Hunh, y Gilles, 2017; Alam *et al.*, 2015).

El tratamiento térmico por extrusión, es un proceso que consiste en forzar un material a fluir bajo una variedad de condiciones a través de un orificio conformado (matriz) a una velocidad determinada para conseguir varios productos. El extrusor de alimentos se considera un biorreactor a alta temperatura y tiempo corto, que transforma ingredientes crudos en productos intermedios a terminados con ciertas modificaciones. Durante este procesamiento se aplican energías térmicas y de cizallamiento a materias primas alimentarias que producen transformaciones estructurales, químicas y nutricionales tales como: gelatinización y degradación de almidón, desnaturalización de proteínas, oxidación de lípidos, formación de sabores, aumento de biodisponibilidad mineral, degradación de moléculas como vitaminas, antinutricias y fitoquímicos, así como solubilidad de las fibras (Zhao *et al.*, 2011; Robin *et al.*, 2012). Este método es utilizado en la industria alimenticia ya que no altera las propiedades nutricionales principalmente en las

leguminosas, sin embargo, las evidencias indican que pueden disminuir los compuestos anti-nutricios no alterando el contenido proteínico (Suárez-Martínez *et al.*, 2016).

Durante la extrusión, el producto se cocina y se mezcla con tres fuentes de energía separadas: energía mecánica, energía térmica que proviene del sistema de calefacción y auto calentamiento debido a la viscosidad de fusión en el barril. Como el comportamiento reológico de la masa en el barril afecta en gran medida la calidad del producto terminado, se debe considerar la temperatura y el tiempo óptimo en cada alimento, las variables que afectan al alimento que es sometido al proceso de extrusión son: 1. Composición de la materia prima y formulación (viscosidad, contenido de humedad, composición química); 2. Factores de cocimiento termo mecánicos (humedad, diámetro del tornillo y longitud de la máquina), y las condiciones de las operaciones (tasa de mezcla seca, velocidad del tornillo, perfil de temperatura, contenido de agua, tiempo de residencia); 3. Factores de texturización (diseño del troquel, forma de la boquilla, sección de apertura). Existen cuatro categorías en el proceso de extrusión por: frío, calor, induciendo vapor y co-extrusión, siendo el más utilizado para alimentos aplicando calor directo en la resistencia eléctrica (Mc Hugh y Gilles, 2017).

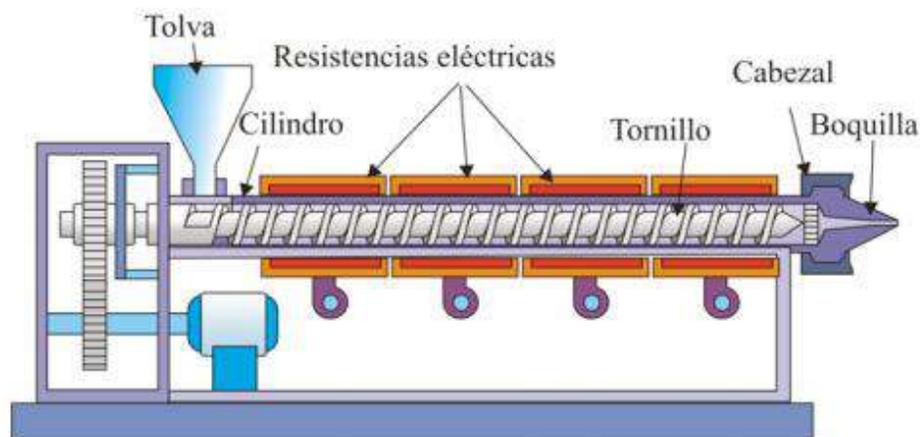


Figura 4. Representación esquemática de un extrusor de tornillo simple
(Alam *et al.*, 2015)

Hay tres tipos principales de extrusores que se utilizan en la industria alimentaria: extrusores de pistones, extrusores de rodillos y extrusores de tornillo, estos últimos son los más comunes utilizados en estos días y se pueden clasificar como extrusores de tornillo

simple (Figura 4) y doble tornillo; extrusor de tornillo simple es un método de cocción atractivo para hacer productos de secos tales como harinas y pastas debido a su bajo costo, y la transformación a tiempos cortos (Alam *et al.*, 2015).

II.4 Enfermedades en México

Aun cuando en la actualidad las enfermedades crónicas no transmisibles están en incremento, la anemia y la desnutrición persisten principalmente en países en vía de desarrollo, siendo la anemia por deficiencia de ingesta de hierro la principal en nuestro país. Esta afecta a cualquier sector de la población principalmente a niños, mujeres embarazadas y personas de la tercera edad, por lo que a pesar de la predisposición genética y el estilo de vida, la buena nutrición es el primer enfoque contra cualquier enfermedad (ENSANUT, 2012).

II.4.1 Anemia

Actualmente más de 1.600 millones de personas, casi una cuarta parte de la población mundial, son anémicas (ENSANUT, 2012). A pesar de los avances económicos y científicos de las últimas décadas, las estimaciones de la Organización mundial de la salud (OMS) en todo el mundo destacan que, el 42% de las mujeres embarazadas, el 30% de las mujeres no embarazadas (de 15 a 50 años), el 47% de los niños en edad preescolar (de 0 a 5 años) y el 12.7% de los hombres mayores de 15 años son anémicos (Pasricha *et al.*, 2013).

La anemia es un trastorno en el cual el número de eritrocitos (y, por consiguiente, la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre) es insuficiente para satisfacer las necesidades del organismo (Cuadro 6). Las necesidades fisiológicas específicas varían en función de la edad, el sexo, la altitud sobre el nivel del mar a la que vive la persona, el tabaquismo y las diferentes etapas del embarazo; la carencia de hierro es la causa más común de anemia, pero pueden causarla las carencias nutricionales entre ellas, la vitamina B12, ácido ascórbico y vitamina A (OMS, 2011).

La anemia es un problema de salud pública que afecta a todos los niveles socioeconómicos, tiene consecuencias importantes sobre el desarrollo cognitivo y físico de los niños y en el desempeño físico y la productividad laboral de los adultos. Se puede

presentar en todas las etapas de la vida, sin embargo es más frecuente en las mujeres embarazadas y en los niños menores de dos años. La causa más frecuente de anemia en México es la dieta deficiente en hierro o la dieta rica en compuestos que impiden su absorción (ENSANUT, 2012).

Cuadro 6. Criterios para la definición de anemia.

Grupo de población	Rango de edad	Punto de corte para diagnóstico de anemia (hemoglobina g/L)
Niños preescolares	12 a 59 meses	<110.0
Niños escolares	5 a 11 años	<115.0
Mujeres (no embarazadas)	12 años y mas	<120.0
Mujeres embarazadas	12 a 49 años	<110.0
Hombres	12 a 14 años	<120.0
	15 y más	<130.0

(ENSANUT, 2012)

II.4.2 Hierro

El hierro es un metal esencial con funciones de gran importancia debido a que participa en procesos metabólicos para el ser humano incluyendo la respiración celular, ya que es un componente funcional para el transporte y almacenamiento de moléculas de oxígeno (hemoglobina y mioglobina), proliferación celular, síntesis de DNA, y los sistemas enzimáticos responsables de la integridad celular (citocromos). Sin embargo, en exceso el hierro puede formar radicales libres, su concentración en los tejidos del cuerpo debe estar bien regulada ya que en cantidades excesivas, puede conducir a daños en los tejidos y provocar apoptosis en las células, a esta regulación se denomina homeostasis del hierro, y es importantes una dieta balanceada ya que existen algunos elementos que influyen como antinutricios en la misma como los que se muestran en el Cuadro 7 (Abbaspour *et al.*, 2014; Tostado *et al.*, 2015). Dentro del organismo el hierro puede encontrarse en dos estados de oxidación estables: Fe^{+2} (ferroso) y Fe^{+3} (férrico), esta propiedad lo hace capaz de participar en reacciones bioquímicas, donde necesita de cofactores para llevar a cabo sus diferentes funciones: metabolismo del oxígeno (oxidasas, peroxidasas, catalasas e

hidroxilasas), transferencia de electrones (citocromos) y transporte de oxígeno a través de la hemoglobina (Pérez *et al.*, 2005).

Cuadro 7. Factores nutricionales que afectan la absorción del hierro

Factores que inhiben la absorción del hierro	Efectos en la absorción	Fuentes de alimentos
Calcio	Interfiere considerablemente en los porcentaje de absorción, tanto del hierro hemínico como del no hemínico, reduciendo la tasa de biodisponibilidad entre 30 y 50%	Forman compuestos insolubles Leche y derivados, citrato de calcio, carbonato de calcio
Fitatos	Los derivados hexa y pentafosfatos del ácido fítico presente forman complejos insolubles a un pH cercano a la neutralidad impidiendo así la dializabilidad del hierro	Semilla de cereales, leguminosas oleaginosas
Polifenoles (taninos)	Debido a sus numerosos radicales hidroxilo se unen fuertemente a metales, propiedad que les confiere la capacidad de ser fuentes inhibidores de la absorción, disminuyéndola hasta en 60%	Té, café, leguminosas, espinacas, cereales
Carbonatos	Existen principalmente en las leguminosas, pero debido a su carácter termolábil se logra reducir su concentración con el proceso de cocción y se disminuye la interferencia con la absorción del hierro	Leguminosas
Oxalatos	Debido a su carácter termolábil se logra reducir su concentración con el proceso de cocción y se disminuye la interferencia con la absorción del hierro	Vegétales de color verde, leguminosas
Fosvitina	Disminuye la biodisponibilidad del catión	Yema de huevo

(Tostado *et al.*, 2015)

El hierro en el organismo se encuentra formando parte de dos compartimientos: uno funcional, que incluye los diversos compuestos celulares que contienen o requieren hierro, y otro de depósito, el cual constituye la reserva corporal del metal (Camaschella, 2015). En los seres humanos la absorción de la cantidad de hierro ingerida es limitada por el tipo de hierro que compone al alimento. Existen dos formas de hierro en los alimentos: el hemínico y el no hemínico, el primero se genera por medio de la degradación de la hemoglobina y de la mioglobina ambas hemoproteínas transportadoras de oxígeno constituidas por cadenas

polipeptídicas; cada una va unida a un grupo prostético llamado hemo. Por lo tanto, cuando el átomo de hierro proviene de estas proteínas se obtiene en forma de grupo hemo compuesto por el átomo en estado ferroso (Fe^{+2}) y un anillo tetrapirrólico (protoporfirina), en este estado el mecanismo de absorción es mucho más sencillo, puede encontrarse en dos formas químicas: como ferritina no hemínica o como sales y quelados de hierro, este tipo de hierro está en estado férrico y se obtiene de alimentos adicionados o naturales como leche, huevo, cereales, leguminosas, vegetales y de suplementos farmacológicos como las sales ferrosas (Theil, 2011; Tostado Madrid *et al.*, 2015).

II.4.3 Causas de anemia ferropénica

La deficiencia de hierro es una de las causas más frecuentes de la anemia (anemia ferropénica); la falta de hierro tiene manifestaciones proteicas, incluyendo fatiga, pérdida del cabello, enfermedad de Willis-Ekbom (síndrome de piernas inquietas), así como un aumento en la susceptibilidad de enfermedades bacterianas y virales. La prueba más eficaz para el diagnóstico de la deficiencia de hierro es la ferritina sérica, análisis que puede hacer por vía oral, o por intravenosa de hierro, de igual manera una de las consecuencias más significativas es la carencia de glóbulos rojos sanos en el torrente sanguíneo de los pacientes con esta patología, es por ello que un análisis completo incluye el diagnóstico de la ferritina, sideremia bajo, transferrina, saturación de la transferrina, hemoglobina, protoporfina libre, bilirrubina (Camaschella, 2015).

Una deficiencia de hierro conlleva a limitaciones fisiológicas y bioquímicas en los organismos ya que éste participa en reacciones de óxido reducción, control de síntesis y de regulación de la actividad enzimática, así como en el control de vías metabólicas, tales como el ciclo del ácido tricarboxílico, el transporte de electrones, la fosforilación oxidativa y la fijación de nitrógeno, entre otras (Yu *et al.*, 2017).

III. OBJETIVOS

III.1 General

Enriquecimiento con aislado proteico y hierro biodisponible de una bebida a base de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) extruido variedad Bayo Madero.

III.2 Particulares

IV.2.1 Obtener un aislado proteico del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Bayo Madero con características deseables, evaluando sus características fisicoquímicas y en la bebida.

IV.2.2 Mejorar y evaluar las propiedades nutritivas, químicas y fisicoquímicas de la bebida a base del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Bayo Madero enriquecida con aislado proteico de frijol común y con hierro biodisponible.

IV.2.3 Medir la aceptabilidad de la bebida de frijol mediante una prueba hedónica con consumidores no entrenados.

IV. METODOLOGÍA

IV.0 Estrategia experimental

Figura 5. Diagrama de experimentación para pre-tratamientos y obtención de harinas de frijol

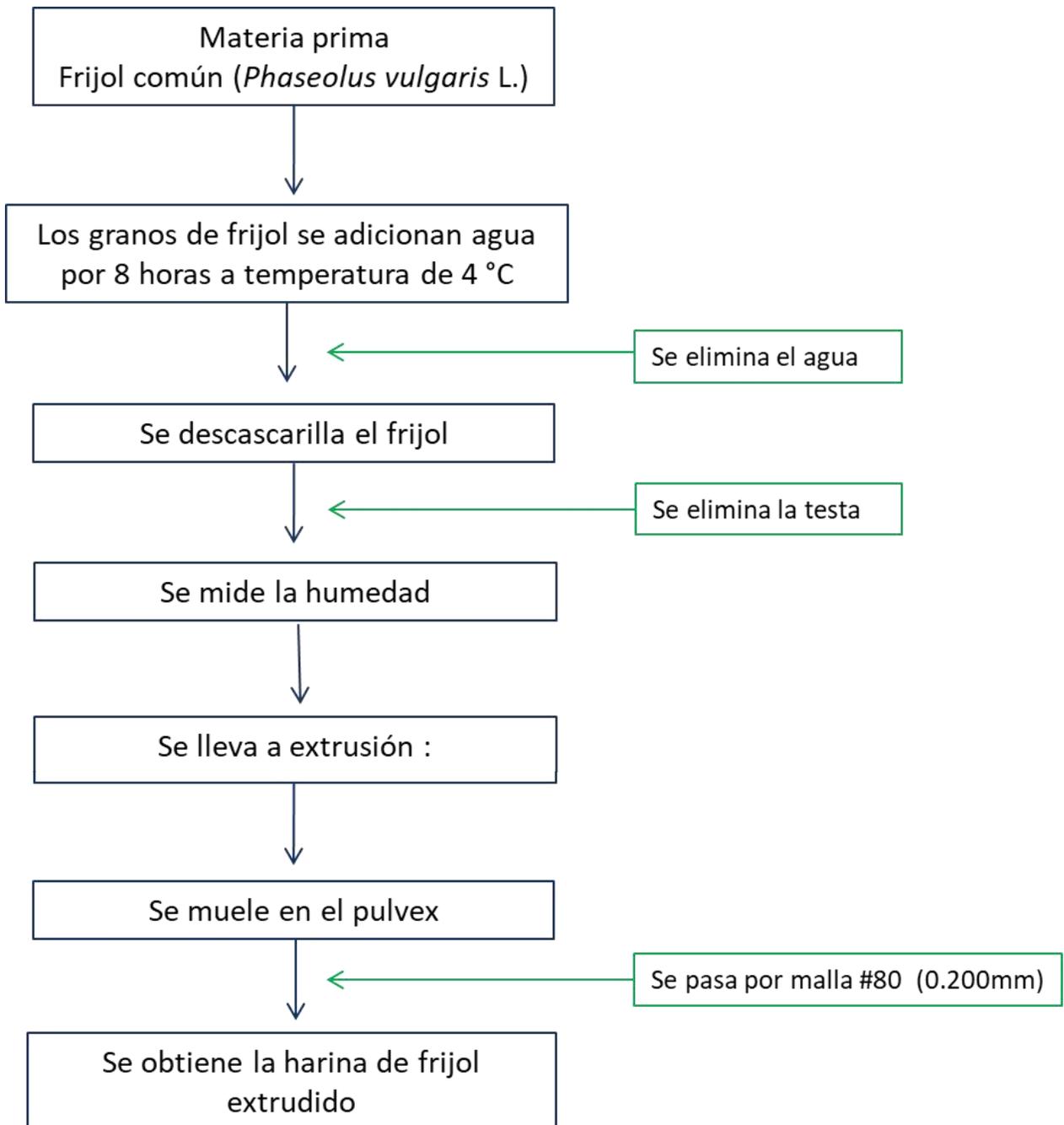


Figura 6. Diagrama de experimentación para elaboración de la bebida

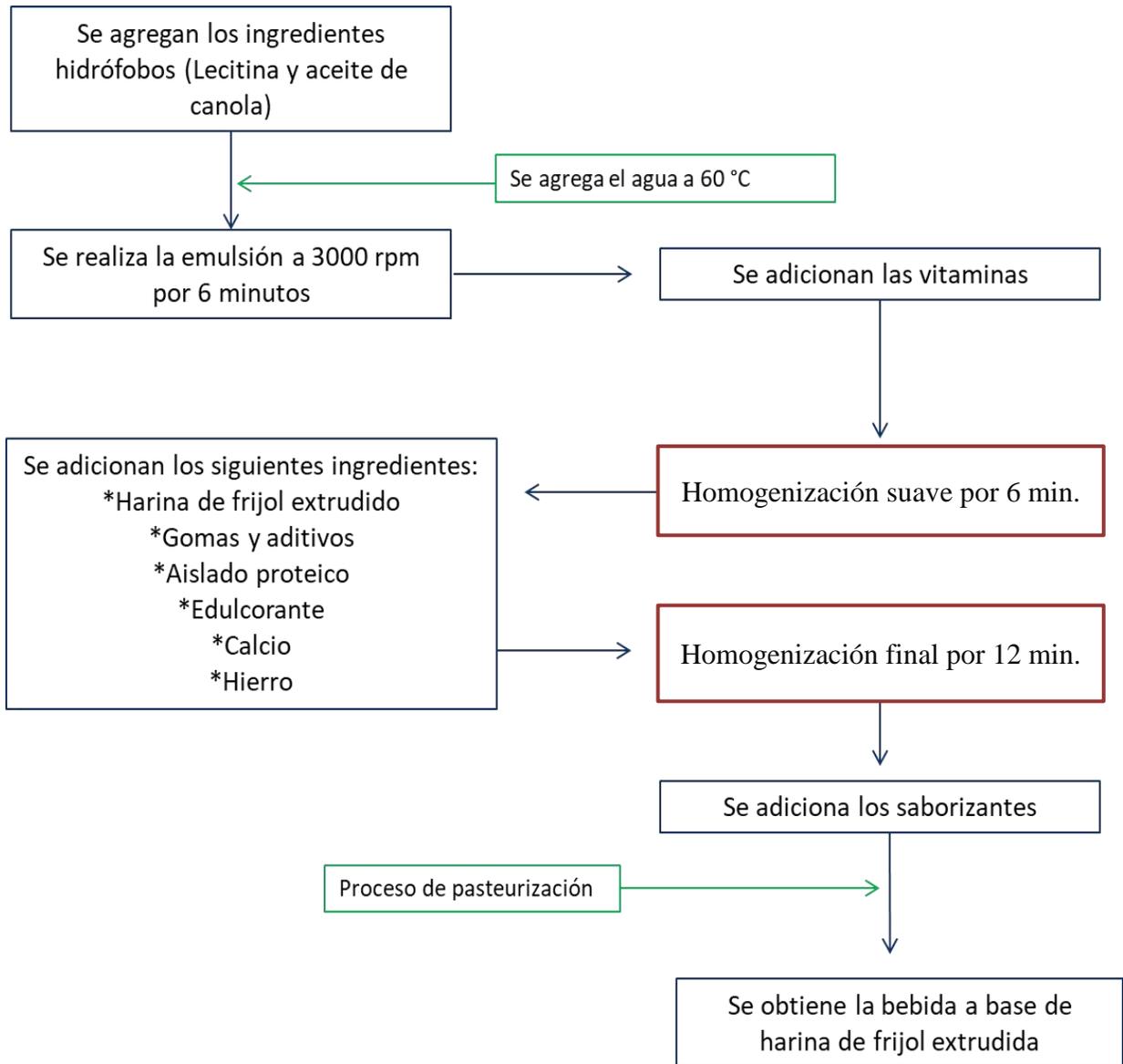
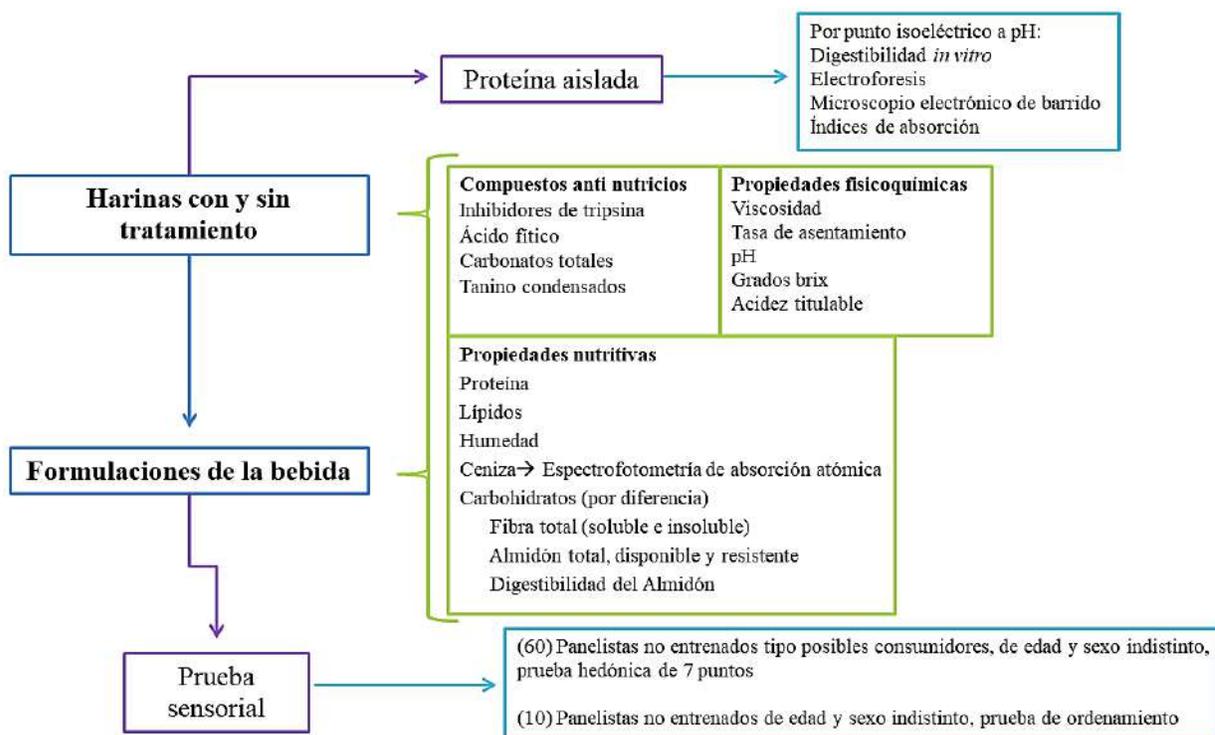


Figura 7. Diagrama para Análisis a las formulaciones y harinas



IV.1 Material biológico

IV.1.1 Pre-tratamiento del material biológico

Se usaron semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Bayo Madero cosecha 2013 donadas por el Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria (INIFAP), campo experimental del Bajío, la cual se sometieron a un proceso de remojo por 8 horas a 1:2 (v/v) con agua destilada, posteriormente se descascarilló el cotiledón a mano, para ser almacenado a 2 °C hasta su utilización.

IV.1.2 Obtención de los extruidos de frijol

A los cotiledones descascarillados se les determinó la humedad relativa la cual fue del $50 \pm 7\%$, una vez valorado la humedad se hicieron pasar por un extrusor de tornillo sencillo con una relación de compresión de 1:1, con diámetro de 1 pulgada acoplado a un dado con orificio de 5 mm, las condiciones cambiaron para obtener harina extruida para la bebida (HB) y harina extruida para aislado proteico (HAP).

IV.1.2.1 Harina extruida para la bebida

Las condiciones utilizadas en el extrusor con características descritas en el apartado IV.1.2, para obtener la harina extruida para la bebida fueron: una velocidad de 12-15 revoluciones por minuto (rpm), temperatura de precalentamiento de 60-80 °C y calentamiento de 130-140 °C, se continuó con un proceso de secado controlado a 41 °C por 2 horas en un deshidratador, finalmente fueron molidos en un molino de café (Krupps GX410011V) y tamizados a tamaño de partícula de 149 μm con ayuda de una malla #100. Se obtuvo la HB.

IV.1.2.2 Harina extruida para aislado proteico.

Para la obtención de la harina extruida para aislar la proteína se utilizó el extrudor con la características descritas en el apartado IV.1.2, utilizando las siguientes condiciones:

una velocidad de 10-12 revoluciones por minuto (rpm), temperatura de precalentamiento de 60-70°C, y temperatura de calentamiento de 100-130°C, se continuó con un proceso de secado controlado a 41 °C por 2 horas en un deshidratador, finalmente fueron molidos en un molino de café (Krupps GX410011V) y tamizados a tamaño de partícula de 180 µm con ayuda de una malla #80. Se obtuvo la HAP.

IV.1.3 Obtención del aislado proteico de frijol común variedad Bayo Madero.

Esta técnica se realizó de acuerdo a Valentas y Levne (1991), con modificaciones. La harina de frijol extrudida para aislado de proteína (HAP) se suspendió en agua destilada (1:6, p/v) y el pH de la suspensión se ajustó a 11 con NaOH (1 N), se agitó en vortex por 2 minutos, se centrifugó durante 35 min a 800 rpm a temperatura de 25 °C, posteriormente se pasó por mallas a tamaño de partícula de 425 µm y 180 µm consecutivamente para eliminar la fibra y el almidón, repitiendo el proceso cinco veces consecutivas, posteriormente se centrifugó 10 min a 800 rpm a temperatura de 25 °C y se separó el sobrenadante. Se ajustó nuevamente el pH del sobrenadante a pH 4.4 con HCl (1 N) y se centrifugó 20 min a 8000 rpm a 25° C para recuperar el precipitado. La proteína precipitada se liofilizó y se almacenó a temperatura ambiente con ausencia de humedad. El porcentaje de pureza de la proteína se expresa en porcentaje mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ pureza} = \frac{\text{Peso de fibra y carbohidatos removidos} - \text{peso de la proteína}}{\text{peso de la muestra inicial}} * 100$$

IV.1.3.1 Cuantificación de proteína en el aislado

La cuantificación de proteínas totales se realizó por la metodología de Bradford, el cual consistió en disolver 10 mg del aislado proteico en 0.9 mL de NaOH (.1 N), la suspensión se sonicó por una hora a 20 °C, de esta disolución se tomó 20 µL y se le agregó 1 mL del reactivo de Bradford (5 mg de azul de Comasie, 2.5 mL de etanol, 5 mL de ácido fosfórico aforado a 50 mL en agua destilada, filtrado y protegido a la luz). Se tomó 200 µL de la reacción anterior y se colocó en una microplaca de 96 pozos transparente, la absorbancia se midió en un espectrofotómetro UV-visible (marca) a 595 nm durante los

primeros 30 minutos de la reacción. El contenido de proteína se determinó por medio de una curva de calibración de albúmina de suero bovino (BSA) y se expresa como mg de proteína por mililitros.

IV.1.3.2 Electroforesis

Se tomó 1 mg de muestra del aislado proteico y se re suspendió en 1 mL de NaOH (0.1 N), se lagitó en vortex por 5 minutos hasta su suspensión, se almacenó a -20 °C hasta su determinación. Se tomó 100 µL de la muestra suspendida y se colocó en tubos eppendorf, posteriormente se agregó 100 µL del buffer de carga (con/sin β-mercaptoetanol), los tubos se colocaron en agua a punto de ebullición por 1 min exactos, una vez pasado el tiempo se tomó una alícuota de 12 y 15 µL y se colocaron en los diferentes pozos del gel (Mini-protean TGX Stain-free, 4-15%), posteriormente el gel se colocó en la cámara de electroforesis (Mini-PROTEAN, BIORAD) y se dejó correr a 90 volts por 95 min, posteriormente se visualizó en el fotodocumentador (Proteinsimple; AlphaImager HP) con ayuda del software (Alphalmager Hp).

IV.1.3.3 Digestibilidad *in vitro* del aislado proteico

Se determinó por lo descrito por Hsü *et al.*, 1977 con algunas modificaciones, se disolvió exactamente 63.8 mg de proteína pura en 10 mL de agua destilada, posteriormente se ajustó el pH a 8 y se incubó hasta alcanzar 37 ° C (15 minutos), una vez alcanzado esa temperatura se adicionaron 1 mL de tripsina, quimiotripsina, proteasa de bovino (1.58 mg de tripsina, 3.65 mg de quimiotripsna y 0.45 de proteasa en 1 mL de agua destilada), se incubó por 10 minutos a 37 °C con agitación continua, posteriormente se adiciono 1 mL de proteasa bacteriana (1.48 mg en 1 mL de agua destilada), para finalizar incubando a 55 °C por 10 minutos y agitación continua, pasado el tiempo se enfrió y se midió el pH; Se realizó un blanco con agua destilada y un control con caseína. La digestibilidad se expresa en porcentaje *in vitro* mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ digestibilidad } in \text{ vitro} = 234.84 - 22.5 (\text{lectura final del pH})$$

IV.1.4 Morfología granular

La fotomicrografía de las harinas obtenidas (HB y HAP) y de la proteína aislada de frijol se observaron por medio de un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) equipado con Phnom Pro. Las muestras se colocaron en el plato de metal y fueron tapadas con cinta adhesiva doble vista, examinándose a 15.0 kV de aceleración y acercamiento de 500 a 3000 x.

IV.1.5 Índice de absorción de agua

Esta determinación se realizó de acuerdo a lo descrito por Anderson *et al.*, 1969, 5 g de HB, HAP y de la proteína aislada de frijol se llevaron a tubos de 50 mL y se le agregó en 30 mL de agua destilada a cada una de las harinas, para su suspensión con ayuda del vortez por un minuto, una vez homogenizada se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en charolas de aluminio previamente llevadas a peso constante, las muestras fueron secadas en una estufa a 105 °C por 10 horas, una vez pasado el tiempo se pesaron y se expresó los sólidos solubles en porcentaje, mediante diferencia de peso. El precipitado obtenido después de la centrifugación se pesó para obtener en porcentaje el índice de absorción de agua, el cual se expresa en % del pellet entre solido secos (g/g).

IV.1.6 Índice de absorción de aceite

Esta determinación se realizó de acuerdo a lo descrito por Yuliana *et al.*, 2014, se pesó 0.5 gramos del aislado proteico en tubos de 25 mL, se agregó 5 mL de aceite puro de maíz y se dejó incubó por 1 hora a 30 °C con agitación constante, posterior al tiempo se centrifugó a 1500 g por 30 minutos, para posteriormente decantar el aceite, el cual se midió con ayuda de una probeta. Los datos se expresan como mL de aceite atrapado por gramo de aislado proteico, mediante la siguiente formula:

$$IAA = \frac{mL \text{ agregados de aceite} - \text{Peso final del pellet de proteína}}{\text{Peso inicial de proteína}}$$

IAA: Índice de absorción de aceite

IV.2 Elaboración de la bebida a base de frijol común

Se utilizó la HPB como ingrediente principal, así mismo todos los instrumentos utilizados fueron previamente esterilizados y desinfectados, se utilizó la formulación descrita por Chico en 2015 (datos sin publicar), con algunas modificaciones.

IV.2.1 Preparación de la emulsión

Se usó la metodología descrita por Chico en 2015, con algunas modificaciones; para emulsificación se colocó 0.3% de lecitina de soya como emulsificante y 0.75% (p/v) de aceite de canola en 1 tercio de agua destilada (del volumen total) la mezcla se calienta a 60 °C con agitación constante y se sometió a una homogenización por 3 minutos a 8000 rpm en un homogenizador (Ultra-Turra IKA T18 basic).

IV.2.2 Enriquecimiento

La enriquecimiento se llevó a cabo de acuerdo a Chico en 2015, la cual consistió en agregar los componentes grasos al 0.15% (p/v de ácido linoleico conjugado). El palmitato de vitamina A (retinol) y la vitamina D3 (calciferol) se agregaron en proporciones de 30, y 35% del IDA definir IDA (150 y 0.75 µg respectivamente para 100 mL). Posteriormente se sometió a una homogenización por 6 minutos a 8000 rpm en un homogenizador (Ultra-Turra IKA T18 basic), la cual se denominó homogenización suave.

Una vez homogenizada la emulsión se le agregó los hidrocoloides (carboximetilcelulosa y goma xantana) en concentraciones de 0.01% de cada uno, 0.015% de sucralosa, 0.1% de azúcar refinada, 3% del aislado proteico de frijol y 3% de harina de frijol extruido (p/v), la optimización se realizó variando las concentraciones en dos niveles unifactorial con variables fijas: concentración de hierro (factor), sabor y dulzor (variables fijas). Posteriormente se sometió a una homogenización por 6 minutos a 12000 rpm en un homogenizador (Ultra-Turra IKA T18 basic), la cual se denominó homogenización final.

IV.2.3 Enriquecimiento de la bebida a base de frijol

Esta enriquecimiento fue realizada de acuerdo a los Ingesta Diaria Recomendada (IDR) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), para un rango de edad de 3 a 45 años de sexo indistinto, en a la normativa mexicana NOM-086-SSA1-1994. Se adicionó sulfato ferroso (FeSO_4) a una concentración de 0.03 % y carbonato de calcio 0.04% (del metal puro) directamente durante el proceso de elaboración de las bebidas dentro de la homogenización final.

IV.2.4 Tratamiento térmico

Posteriormente la mezcla homogenizada y se vertió en el equipo Soyabella (Automatic Soymilk Maker y Coffee Grinder Model SB-130) para su pasteurización donde se la agregó los dos tercios restantes del volumen final deseado, y se sometió a calentamiento de 90 °C durante 20 minutos con agitación cada 5 minutos, posteriormente se agregó el saborizante liquido nuez o vainilla solido a concentración de 10 mL o mg por litro de bebida, con base a la normativa mexicana de aditivos en bebidas no alcohólicas (NOM-218-SSA1-2011), se obtuvo la bebida a base de frijol común (BF), el producto se enfrió y se empaquetó en frascos de vidrio, finalmente se almacenó a 2 °C hasta el día de sus análisis.

IV.3 Determinación de factores anti-nutricios que afectan la absorción del hierro

IV.3.1 Cuantificación de inhibidores de tripsina

Esta técnica se desarrolló usando la metodología de Kakade *et al.*, 1974, se inició con un proceso de extracción tomando 1 g de muestra de las BF, HB y harina de frijol sin tratamiento (HST), se adicionaron 50 mL de NaOH (0.01 N) con agitación continua durante 3 horas, una vez transcurrido el tiempo se ajustó el pH a 8.2 con HCl (0.1N) para posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos. A 5 mL del sobrenadante se agregó 15 mL de agua destilada, una vez realizada la dilución se tomó 500 μL tanto para el tubo muestra como para el blanco, se realizaron diferente diluciones sucesivas tomando 250

μL del tubo de muestra más 250 μL de agua destilada (1:8; 1:16, 1:32, 1:64 v/v). Se realizaron las mismas diluciones para el blanco.

A las diluciones del tubo muestra se le adicionaron 250 μL de tripsina, por 5 minutos, se continuó con la adición de 625 μL de BAPNA (N-benzoil-arginina-p-nitroanilida) y se incubó a 37 °C durante 10 minutos. La reacción se detuvo adicionando 125 μL de ácido acético al 30%; para las diluciones del tubo muestra se agregó adicionalmente 150 μL de tripsina más 125 μL de ácido acético al 30% y 625 μL de BAPNA.

Se preparó un tubo control de máxima absorbancia colocando 250 μL de agua destilada más 250 μL de tripsina, se dejó reposar por 5 minutos y se adicionaron 625 μL de BAPNA para incubarlo a 37 °C por 10 minutos, una vez transcurrido el tiempo de incubación se adicionaron 125 μL de ácido acético al 30%. Para el tubo blanco con cero absorbancias se mezcló 250 μL de agua destilada, 250 μL de tripsina, 125 μL de ácido acético al 30% y 625 μL de BAPNA (en orden).

Se colocaron 250 μL de cada muestra en una microplaca de 96 pozos transparente y se leyó en un lector de microplacas (multimodo Synergy HT) a 410 nm. Los resultados se expresan en unidades inhibitoras de tripsina (UIT) por miligramo de muestra usando la siguiente fórmula:

$$UIT = \frac{[tb\ abs\ máx - (tb\ muestra - tb\ blanco\ muestra)] \times FD}{0.01}$$

FD= Factor de dilución

UIT: Unidad inhibitora de tripsina

Tb: tubos

IV.3.2 Cuantificación de carbonatos totales

Se cuantificó para BF, HB y HST de acuerdo a Bemer y Morse, 1974. Se colocó en un matraz Erlenmeyer de 250 mL 1 g de muestra, posteriormente se adicionó 25 mL de HCl (0.5N), se agitó por 1 minuto, terminando el tiempo se adicionó 25 mL de agua destilada y se calentó lentamente en una parrilla hasta alcanzar 175 °C, se mantuvo esa temperatura por 5 minutos, se dejó enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente, se adicionó

el indicador (100 mL de fenolftaleína 1g/100 mL, 60 mL de rojo de metilo 0.1g/100 mL, 40 mL de verde bromoclesol 0.05 g/80 mL), para finalizar titulando con NaOH (0.5N) hasta cambio de color de rosa a morado, adicionalmente se realizó un blanco con agua destilada, los datos se reportan como mg de CaCO₃ presente en 100 g o mL de muestra o como porcentaje de CaCO₃ de acuerdo a las siguientes formulas:

$$\text{mg de CaCO}_3 \text{ en 100g de muestra} = (A - B) * 50$$

$$\% \text{ CaCO}_3 = (A - B)T * 5$$

T= Normalidad de NaOH

A= mL gastados de NaOH en la muestra

B= mL gastados de NaOH del blanco

1 miliequivalente de CaCO₃ = 50 mg de CaCO₃

IV.3.3 Cuantificación de ácido fítico

El contenido de ácido fítico se determinó por el método de Lolas y Markakis en 1977, el cual consistió en pesar 2 g de la muestra (BF, HB y HST) se le adicionaron 100 mL de HCl al 2%, la muestra se sometieron a agitación por 3 horas, posteriormente se filtró por un papel filtro Whatman No.1. Se tomaron 50 mL del filtrado y se adicionaron 10 mL de agua destilada, 10 mL de tiocianato de amonio (NH₄SCN) al 3 %, posteriormente se tituló con cloruro de hierro III (FeCl₃; 0.00195 g de Fe) hasta el cambio de la coloración a un naranja. La cantidad de ácido fítico se expresa en porcentaje de ácido fítico y se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Ácido fítico (\%)} = \text{Vol. de titulación} \times 1.19 \times 100$$

IV.3.4 Cuantificación de taninos condensados

Se utilizó la técnica descrita por Deshpande y Cheyra en 1987, con modificaciones para microplaca, se comenzó utilizando 1 g de BF, HB y HST, se adicionó 10 mL de metanol puro, se dejó en agitación por 24 horas a temperatura ambiente y protegidos de la luz, posterior de ese tiempo se centrifugó a 5000 rpm por 10 min a temperatura de 21 °C, recolectando el sobrenadante en frascos color ámbar. Se tomó 50 µL de los viales ámbar y se colocaron en los pozos de la microplaca transparente de 90 pozos, posteriormente se

adicionó 200 µL de la solución de vainillina (0.5%: 1% vainillina y 8% de HCl (1:1 metanol)), se corrió un blanco con 50 µL del sobrenadante más 200 µL de HCl (4%), se almacenó la microplaca a 30 °C por 20 minutos en ausencia de luz, la lectura se realizó a 492 nm con ayuda del lector de microplacas (multimodo Synergy HT). Adicionalmente se corrió una curva de calibración de (+) – Catequina, los datos se expresan en mg (+) – catequina equivalentes en gramos de muestra.

IV.4 Parámetros fisicoquímicos de la bebida a base de frijol común

IV.4.1 Viscosidad de las formulaciones de la bebida de frijol

La viscosidad de las bebidas de frijol se determinó por medio de un reómetro Anton Paar MCR 101, el cual se colocó 16 mL de la muestra y se valoró una curva de viscosidad en cp contra tiempo a temperatura controlada de 4, 18, 21 y 25 °C.

IV.4.2 Tasa de asentamiento y tasa de solidos totales.

Por el método de Traynor *et al.*, 2013, donde se colocó 100 mL de las bebidas de frijol en una probeta marcando al inicio y se midió su disminución cada dos días por diez, a temperatura controlada de 4 °C y 25 °C, la tasa de asentamiento se expresa como porcentaje de asentamiento (%TS) se calcula mediante la siguiente formula:

$$\% TS = \frac{Volumen\ inicial}{Volumen\ final} \times 100$$

%TS = Porcentaje de la tasa de asentamiento

Para la taza de solidos totales se utilizó las mismas muestras a las mismas temperaturas midiendo la separación por gravedad de los sólidos visibles dentro de las formulaciones. Se expresa como porcentaje de solidos totales.

IV.4.3 pH y solidos solubles

Se determinó el pH de la bebida por medio de un potenciómetro (Orion 3 Star, THERMO SCIENTIFIC). Los solidos solubles (grados brix) se determinaron con ayuda de un refractómetro.

IV.4.4 Densidad

Se determinó colocando 100 mL de la muestra en una probeta a 20 °C poniendo un densímetro T. Mantay B. de 0 a 10 ° Baumé (20 °C), anotando el valor dado.

IV.4.5 Acidez titulable

Esta determinación se realizó de acuerdo a lo descrito en la normativa mexicana (NMX-F-102-S-1978), el cual consistió en colocar 5 mL de cada una de las formulaciones de la bebida en un matraz de 250 mL, se adicionó 50 mL de agua destilada hirviendo, se continuó calentando por 30 a 60 segundos, se agitó y se dejó enfriar para posteriormente agregar 250 µL de fenoftaleína, para finalizar titulado con NaOH (0.1N), la acidez titulable se expresa en porcentaje y se calcula con la siguiente formula:

$$\% \text{ Acidez: } \frac{\text{Volumen gastado} \times \text{Normalidad NaOH} \times \text{Meq.} \times 100}{\text{Volumen inicial}}$$

Meq. Miliequivalentes referentes de ácido málico: 0.006704

IV.5 Composición química de la materia prima y de las formulaciones

IV.5.1 Proteína (método AOAC, 954.01)

Esta determinación se llevó a cabo mediante el sistema Kjeldhal, en donde se colocó 25 mL de muestra en un matraz de digestión Kjeldhal, se agregó una tableta de catalizadores (sulfato de sodio y sulfato de cobre), se adicionaron 10 mL de ácido sulfúrico concentrado y se colocaron los matraces en la parrilla de digestión a 450 °C hasta el cambio

de coloración verde turquesa, se enfriaron y se adicionaron 100 mL de agua destilada continuando con la digestión, adicionalmente se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 25 mL de ácido bórico, y rojo de metilo que tiene la función de recoger el destilado, una vez llevada la digestión se tituló con ácido clorhídrico 0.1N . Se determinó el nitrógeno total multiplicando por el factor de conversión equivalente al porcentaje de proteína del frijol de 5.85. La cantidad de proteína se expresa en porcentaje.

$$\%N = \frac{(V1 - V2) \times M \times 14.01}{W \times 10}$$

$$\% \text{ Proteína: } \% \text{ Nitrogeno} \times 5.85$$

V1: Volumen de HCl gastados para las muestras

V2: Volumen de HCl gastados para el blanco

M: Molaridad de HCl

W: peso de muestra

IV.5.2 Grasa (método AOAC, 920.39)

En un cartucho de celulosa se colocó 1 g de las diferentes formulaciones de la bebida de frijol previamente liofilizadas y tamizadas a malla 40, se colocó un tapón de algodón en un compartimiento de extracción Soxhlet el cual se colocó junto con un matraz receptor (200 mL de éter de petróleo como refrigerante) se realizó un calentamiento hasta punto de ebullición, donde se ajustó el calentamiento a 10 reflujos por hora hasta un tiempo total de 5 horas, al final se recuperó el solvente, y el matraz se colocó en una estufa a 60 °C para completar la eliminación de los solventes y llevó a peso constante, el contenido de grasa se determinó con la diferencia de pesos del matraz al inicio y al final de la extracción, el contenido de grasa se expresa en porcentaje.

IV.5.3 Humedad (Método AOAC, 925.09B)

Se pesó 1 mL de la muestra en un crisol (peso constante) y se colocó en la estufa (marca) a 130 °C por 3 horas, se enfrió en el desecador a temperatura ambiente, la humedad se expresa por porcentaje de humedad y se determinó por diferencia de peso de los crisoles.

IV.5.4 Cenizas (método AOAC, 945.46)

Se colocó 1 mL de muestra en un crisol de porcelana (peso constante), en una estufa por 3 horas a 110 °C, se continuó con el calcinado en una parrilla de calentamiento dentro de una campana de extracción a 100 °C ±5, para continuar se colocó el crisol dentro de la mufla (modelo) a 550 °C por 3 horas, se enfrió en el desecador de humedad y se pesó. Las cenizas son expresadas en porcentaje, por medio de la diferencia de peso entre el peso de los crisoles multiplicado por cien.

IV.5.5 Carbohidratos

Los carbohidratos se determinaron por diferencia, son expresados en porcentaje.

IV.5.5.1 Fibra dietaria insoluble

Esta metodología se realizó de acuerdo a lo descrito por Shiga *et al.*, 2003 con algunas modificaciones, se pesó un gramo de muestra desgrasada en un matraz erlenmeyer donde se adicionó 50 mL de buffer de fosfatos (0.08M, pH: 6), posteriormente se adiciono 100 µL de la enzima α -amilasa termoestable, se incubó en baño maría a 95 ° C por 30 minutos con agitación cada 5 minutos, se atemperó y se ajustó el pH a 7.5 con NaOH (0.275 N), para continuar adicionando 100 µL de proteasa (5 mg/ mL), se incubó a 60 ° C por 30 minutos con agitación continua a 20 rpm, se atemperó y se ajustó el pH a 4.5 con HCl (0.325 N), posteriormente se adicionó 300 µL de amiloglucosidasa donde se incubó por 60 °C por 30 minutos con agitación continua a 20 rpm, todo el procesamiento anterior se cubrieron los matraces con aluminio y ausencia de luz, para finalizar se filtró en papel whatman No. 4 con peso constante, se realizaron dos lavados con 15 mL agua grado HPLC a 60 °C, el papel se secó en una estufa a 39 °C por 17 horas, posteriormente se pesó, la fibra dietaria se expresa como porcentaje y se obtuvo mediante las siguientes formulas:

$$\% FDI = \frac{\text{Papel con muestra} - \text{Papel inicial}}{\text{Peso de la muestra}} * 100$$

$$\% FDI \text{ real} = \frac{\% FDI * \% \text{ Carbohidratos base seca}}{100}$$

%FDI= Porcentaje de Fibra dietaria insoluble

Nota: Las muestras presentes en el papel filtro se guardaron en el desecador para ser utilizados posteriormente para la determinación de almidón resistente, así como el líquido filtrado, para la determinación de fibra dietaria soluble.

IV.5.5.2 Fibra dietaria soluble

Se utilizó el líquido filtrado de la determinación de fibra dietaria insoluble el cual se adicionó etanol al 80 % (1:1 v/v), se guardó en refrigeración por 72 horas, posteriormente se filtró con papel whatman No. 42 con peso constante, se realizaron dos lavados con 15 mL de acetona, el papel filtro se secó en la estufa a 38 °C por 17 horas, para finalizar se pesó el papel, la fibra dietaria soluble se expresa en porcentaje mediante la siguiente formula:

$$\% FDS = \frac{\text{Peso del papel con muestra} - \text{peso del papel solo}}{\text{peso de la muestra inicial}} * 100$$

%FDS= Porcentaje de Fibra dietaria soluble

IV.5.5.3 Fibra dietaria Total

Es la sumatoria de las dos técnicas anteriores los resultados se expresan como % en base seca / g de muestra

$$\% FDT = \text{Fibra dietaria insoluble (\%FDI)} + \text{fibra dietaria soluble (\%FDS)}$$

% FDS= Porcentaje de Fibra dietaria total

IV.5.5.4 Almidón resistente

Se utilizó la metodología descrita por Saura-Calixto *et al.*, 1993 con algunas modificaciones, de los sólidos obtenidos en la determinación de fibra dietaria insoluble se

pesó 100 mg de la muestra en matraz elenmeyer adicionando 6 mL de KOH (2M), se incubó a 25 °C por 30 minutos con agitación continua, posteriormente se adicionaron 3 mL de buffer de acetato de sodio (0.4 M, pH: 4.75) y 60 µL de amiloglucosidasa, se incubó por 30 minutos a 60 ° C con agitación continua, se enfrió y se centrifugó a 10000 rpm por 15 min recuperando el sobrenadante, se realizaron dos lavados a la pastilla con 10 mL de agua grado HPLC y centrifugando a las mismas condiciones. El sobrenadante recuperado se llevó a un aforo de 50 mL, para posteriormente ser cuantificado por un kit de glucosa oxidasa/peroxidasa.

IV.5.5.4.1 Determinación de glucosa

La concentración de glucosa se realizó de acuerdo a las especificaciones del kit de glucosa oxidasa/peroxidasa con algunas modificaciones para microplaca, en una placa de 96 pozos trasparente se adicionaron 50 µL de la muestra de almidón resistente y 100 µL de la solución del ensayo (0.2 ml de o-dianisidina y 9.8 mL de glucosa oxidasa/ peroxidasa), se incubó por 30 minutos a 37 ° C con agitación continua, la reacción se detuvo adicionando 100 µL de H₂SO₄ (12 N), la placa se leyó a 540 nm en un espectrofotómetro y los resultados fueron interpolados en una curva de calibración de glucosa

El almidón resistente se expresa como porcentaje mediante la siguiente fórmula:

$$\% AR = \frac{[\text{glucosa valorada en la muestra} \left(\frac{\mu g}{mL} \right) * 45 \text{ mL del aforo} * 0.9 * 100}{1000 * \text{mg de la muestra inicial}}$$

%AR: Porcentaje de almidón resistente

IV.5.5.5 Almidón total

Se determinó por medio de lo descrito por Goñi *et al.*, 1997. Cincuenta mg de la harina sin extrudir y las harinas extrudidas tanto para proteína como para la bebida, las cuales estaban desgrasadas, se añadieron 3 mL de agua destilada y 3 mL de hidróxido de potasio (KOH) 4M, se dejó en agitación por 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se añadió 3 mL del buffer de acetato de sodio (0.4 M, pH 4.7) mas 5.5 mL de HCl 2M, se ajustó el pH a 4.75, posteriormente se agregaron 60 µL de aminoglucosidasa

y se incubó por 60 °C por 45 minutos con agitación continua, se deja enfriar a temperatura ambiente para continuar centrifugando a 3000 RPC por 15 minutos a 20 °C, se recupera el sobrenadante en matraces de aforo de 50 mL, se realizan 3 lavados con 15 mL de agua destilada a las mismas condiciones antes mencionadas del centrifugado, por último se aforó a 50 mL y se leyó por medio de un kit de glucosa oxidasa/peroxidas (). El almidón total se expresa en porcentaje, y se calcula mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ Almidon total} = \frac{\left[\text{glucosa en la muestra} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) \right] * \text{volumen del aforo} * 0.9 * 100}{\mu\text{g de muestra inicial}}$$

IV.5.5.6 Almidón disponible

Se determinó de acuerdo a lo descrito por Otemuyiwa *et al.*, 2017, se pesó 500 mg de muestra (HAP, HB y HST), se agregaron 20 mL de agua destilada y se agitó durante 10 minutos en plancha de agitación, posteriormente se agregaron 100 µL de α-amilasa termoestable y se llevó a ebullición en un baño de agua por 20 minutos. Se dejó enfriar y se aforó a 100 mL, donde se tomó 500 µL colocándolo en tubos para posteriormente agregar 1 mL de regulador de acetato de sodio, 25 µL de amilogucosidasa para aforar a 100 mL, se incubó por 30 minutos a 60 °C con agitación constante a 20 rpm, finalmente se centrifugó a 3000 x g durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante con ayuda de una micropipeta para posteriormente ser aforado a 10 mL. Se midió la concentración de glucosa como se indica en el apartado 5.5.4.1, los cálculos fueron los siguientes:

$$\text{Almidón disponible (\%)} = \frac{(\mu\text{g de glucosa/ mL}) * (\text{volumen}) * (\text{dilución}) * 0.9 * 100}{\mu\text{g de muestra}}$$

$$\text{Digestibilidad de carbohidratos (\%)} = \frac{\text{Porcentaje de almidón disponible} * 100}{\text{Porcentaje de almidón total}}$$

IV.5.6 Determinación de hierro férrico (Fe ⁺³)

Esta metodología fue descrita por Siong y Chao (1989), las cenizas fueron tratadas con ácido clorhídrico concentrado 0.1 M y se transfirieron a un matraz aforado de 50 mL, se

continuó el tratamiento colorimétrico, el cual consistió en hacer reaccionar las cenizas tratadas con 1,10-fenantrolina hidrocioruro hasta el cambio de coloración a rojo, el complejo fue leído en un espectrofotómetro de UV-VIS a 510 nm, se extrapolan los resultados en una curva de calibración de una solución de nitrato férrico ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$). Añadió 1 mL de acetato de amonio 1 M, 1 mL de clorhidrato de hidroxilamina al 10%, y 10 mL de solución de fenentrolina al 0.03%, y diluyó exactamente a 50 mL con agua destilada. Se mezcló bien hasta desarrollar el color característico rojo-naranja del complejo de hierro (III) fenantrolina. Se incubó por 45 minutos hasta el cambio de coloración.

IV.5.7 Determinación de hierro ferroso (Fe^{+2})

La cuantificación de hierro se determinó por medio de lo descrito por la AOAC 999.11 con algunas modificaciones, la cual consiste mediante digestión vía seca y lectura por espectrofotometría de absorción atómica con llama con las siguientes condiciones: flama mezcla aire/ acetileno (80:20), longitud de onda de 248.3 nm, temperatura de ignición de 800 °C y atomización de 2300 °C, corrector de background con deuterio, se comenzó con la preparación de las muestras, las cuales se homogenizaron 5 g o 20 mL de acuerdo a la muestra correspondiente, se colocaron en crisoles en una parrilla a 120 °C por 10 minutos, posteriormente se metió a una mufla con termostato programable incrementando a una velocidad de 50 °C/ h hasta que se alcanzó 550 °C por 8 horas, posteriormente se humedecieron las cenizas con 5 mL de HCl (6 M) con cuidado y se evaporó en parrilla a 100 °C por 5 min, se colocaron nuevamente en mufla por 2 horas a 550 °C hasta obtener cenizas blancas, al terminar el tiempo se agregó 5 mL de HCl (6M) asegurándose que las cenizas estuvieran en contacto con el ácido y calentó por 5 minutos en parrilla a 100 °C, por último se disolvieron las cenizas en agua grado HPLC y se aforaron a 50 mL, se leyeron en el espectrometró de absorción atómica, las absorbancias obtenidas se interpolaron en una curva de calibración de estándar de hierro, La curva se realizó tomando 10 mL del estándar de hierro 1000 mg/L (High-purity standards cat. 100026-1) y se aforó en 100 mL de HNO_3 (0.1M), llevando a las siguientes concentraciones de la curva de estándar de acuerdo a lo descrito en el Apéndice 4: 1, 2, 3, 4, 5 mg/mL en matraz de aforo de 10 mL. Las ppm se calcularon con la siguiente formula:

$$\text{Hierro} \frac{mg}{Kg} : \frac{c \times v}{a}$$

c: Concentración en $\mu\text{g/mL}$ obtenidos por la interpolación en la curva de calibración de la muestra.
v: Volumen de la muestra final
a: Masa de la muestra en gramos

IV.6 Evaluación sensorial

Previamente a este estudio se garantizó la inocuidad del producto, al someterse a pruebas microbiológicas (coliformes totales, mesófilos aerobios, además de hongos y levaduras) que se llevaron a cabo en el laboratorio de control y análisis microbiológico de alimentos del Departamento de Investigación y Posgrado de la Facultad de Química. Para el estudio sensorial se dividió en dos fases convocando a 60 panelistas no entrenados tipo consumidores de edad y sexo indistinto (primera fase), se realizó una prueba preliminar con la adición de hierro y proteína en 10 panelistas. La primera fase consistió en una prueba de agrado general donde se les dieron las formulaciones finales con variantes en sabor y nivel de azúcar, se evaluaron por medio de una escalas hedónica de 7 puntos (me disgusta mucho, me disgusta, me disgusta poco, ni me gusta ni me disgusta, me gusta poco, me gusta y me gusta mucho) para las características de olor y de sabor con puntos específicos (dulce, salado, metálico, amargo, entre otra), así como agrado general, en escala de 7 puntos, el formato se describe en la Figura 8. En la segunda fase se seleccionaron las dos formulaciones mejores calificadas de la primera fase, adicionado dos concentraciones de sulfato de hierro (hierro Fe^{+2}), siendo una prueba preliminar las bebidas fueron evaluadas por 10 panelistas no entrenadas de edad y sexo indistinto por medio de una prueba de ordenamiento (Figura 9.), empleando una escala de detección de más o menos. Las personas que presenten reacciones alérgicas al frijol, así como alguno de los ingredientes antes descritos o que presenten alguna enfermedad o condición que límite su apreciación sensorial no podrán ser parte de esta investigación. Esta prueba ha sido revisada y aprobada por el comité de bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Figura 8. Formatos para la evaluación sensorial para prueba de nivel de agrado de siete puntos

Evaluación del nivel de agrado Edad: _____ Sexo: Femenino Masculino

Instrucciones: evalúa cada una de las muestras las cuales están codificadas en números de acuerdo a lo que corresponda

1. Huela una muestra a la vez y marca con una **X** el aroma que se identifique

Aroma	Muestras			
	402	763	108	900
Dulce				
Salado				
Amargo				
Metálico				
Otro: _____				

2. Pruebe una muestra a la vez y marca con una **X** el sabor que se detecte

Sabor	Muestras			
	402	763	108	900
Dulce				
Salado				
Amargo				
Metálico				
Resabio				
¿Cuál?: _____				

Resabio: Se refiere a un sabor que perdura 5 segundos después de ingerir la bebida

3. De acuerdo a la siguiente escala evalué con el número correspondiente de acuerdo a su nivel de agrado general de cada muestra.

Escala:



Muestras	Nivel de agrado
402	
763	
108	
900	

¡Muchas gracias por tu participación!

Figura 9. Formato de evaluación sensorial por prueba de ordenamiento

Prueba de ordenamiento Edad: _____ Sexo: **Masculino** **Femenino**

Instrucciones: Frente a usted se muestran cuatro bebidas codificadas con números, ordene de **MAYOR a MENOR** de acuerdo a lo que corresponda, o en su caso **NO DETECTADO** si no se encontró en una o ninguna muestra.

1. Huela cada una de las muestras (814, 965, 120, 013) y ordénelas de mayor a menor aroma de acuerdo a lo que se le indique o en su caso no detectado.

Aroma Dulce				
				No detectado
				Muestra(s) : _____

Aroma Amargo				
				No detectado
				Muestra(s) : _____

Aroma Metálico				
				No detectado
				Muestra(s) : _____

Otro Aroma:				
				No detectado
				Muestra(s) : _____

+ ← ————— | ————— → |

2. Pruebe cada una de las muestras (814, 965, 120, 013) y ordénelas de mayor a menor el sabor que corresponda o en su caso no detectado.

Sabor Amargo				
				No detectado
				Muestra(s) : _____

Sabor Metálico				
				No detectado
				Muestra(s) : _____

Sabor Salado				
				No detectado
				Muestra(s) : _____

Sabor Dulce				
				No detectado
				Muestra(s) : _____

+ ← ————— | ————— → |

3. Ordene de mayor a menor la muestra que más prefiera en agrado general

--	--	--	--

+ ← ————— | ————— → |

¡Muchas gracias por tu participación!

IV.7 Análisis estadístico

Para las harinas se utilizó un diseño unifactorial 1^3 , las medias se compararon por t-student y Tukey ($\alpha=0.05$). Para la bebida se utilizó un diseño factorial 2^2 con variables fijas, las medias se compararon entre sí por la prueba Tukey ($\alpha=0.05$). El análisis sensorial se determinó por el análisis de correspondencias múltiples. Todas fueron analizadas con ayuda del programa JMP versión 12.2.0.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1 Composición química

Se determinó la composición química del frijol sin tratamiento, la cual se muestra en el Cuadro 8, los datos concuerdan con lo reportado por USDA (2011) quienes reportaron un contenido de proteína del 25.4%, lípidos 1.7%, carbohidratos 69.11%, cenizas 3.78%, humedad 12.1%, hierro 6.24mg, fibra dietaria total 17.4%. A los cotiledones sin testa del frijol se determinó humedad antes del proceso de extrusión donde se identificó una cantidad de 52.09 %, posterior se sometieron al extrusor teniendo un rendimiento del $60 \pm 5\%$, ya que alrededor de un $42.85 \pm 1.65\%$ del peso total se pierde durante el proceso. Se observa que existen diferencias significativas en la harina sin tratamiento contra las harinas que se obtuvo después del proceso de extrusión seco (120-150 °C) en la cantidad de humedad y proteína, esto se debe a que esta tecnología modifica el tamaño, la textura, la forma y el color de los alimentos (Muthukumarappan y Swam, 2018).

De acuerdo a lo reportado por Brennan *et al.*, (2016) la pérdida de humedad es de un 14 a 15 % en leguminosas a una temperatura de 100 °C, los resultados muestran una disminución de un 15 y 17.61 % a temperaturas utilizadas durante el procesamiento, esto se debe a la liberación y evaporación de partículas durante el proceso de extrusión. Cabe destacar que la pérdida de humedad está influenciada durante el proceso de secado que se somete antes de la molienda; así mismo las proteínas sufrieron un aumento en su cuantificación después del proceso de extrusión, es atribuido por el efecto térmico y mezclado del proceso que provoca una pérdida de la estructura hasta una posible desnaturalización, lo que probablemente esté relacionado con las propiedades de asociación, y por lo siguiente el grupo amino y carboxilo estén más disponible, teniendo una mayor detección del grupo amino (nitrógeno orgánico). Taylor y Arêas, (2013) reportan que el proceso de extrusión forma nuevos enlaces peptídicos, formados por amino libre y grupos carboxílicos de la proteína, por lo que sugieren a las proteínas como responsables de la reticulación que tiene lugar en la extrusión, así como que los enlaces disulfuro y las interacciones electrostática e hidrofóbica se consideran como el mecanismo de texturización en este proceso. La significancia obtenida en la cantidad de lípidos puede deberse a la deshidratación de la misma muestra, que actúa comprimiendo las partículas (Muthukumarappan y Swam, 2018).

Cuadro 8. Composición química en las harinas del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Bayo Madero

Composición	HST	HAP	HB
Proteína	24.22 ± 0.5 ^A	28.42 ± 0.2 ^B	28.59 ± 0.3 ^B
Lípidos	1.66 ± 0.4 ^A	2.12 ± 0.1 ^A	2.44 ± 0.06 ^A
Humedad	8.12 ± 0.1 ^A	6.83 ± 0.1 ^B	6.69 ± 0.1 ^B
Cenizas	4.56 ± 0.1 ^A	4.62 ± 0.2 ^A	4.78 ± 0.1 ^A
Carbohidratos ¹	61.44 ± 0.4 ^A	58.01 ± 0.1 ^A	57.50 ± 0.4 ^A
Hierro ²			
Ferroso (Fe⁺²)	22.79 ± 0.5 ^A	22.82 ± 0.5 ^A	22.84 ± 0.4 ^A
Férrico (Fe⁺³)	7.09 ± 0.1 ^B	7.38 ± 0.3 ^{AB}	7.50 ± 0.05 ^A

Los datos se expresan como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes, las letras mayúsculas indican diferencia estadística entre reglones por la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$); HST: harina sin extrusión, HAP: harina extudida para aislado proteico, HB: Harina extrudida para bebida; las muestras fueron molidas y tamizadas a tamaño de 0.250 mm. La composición química está expresada en porcentaje (%). La proteína ajustada (N x 5.85).

¹ Carbohidratos por diferencia

² Hierro en partes por millón (ppm)

El contenido de carbohidratos presentes en las harinas se muestra en el Cuadro 9. Donde los resultados de fibra dietaria soluble e insoluble son mayores en los extudidos que en la harina sin tratamiento; sin embargo, los valores son bajos en comparación a lo reportado por Ramírez-Jiménez *et al.*, (2013), para la misma variedad pero cosecha 2010. Lo que sugiere que la extrusión actúa en una mayor área superficial de las harinas extrudidas expuestas a mayor temperatura, lo que provoca mayor rompimiento de enlaces complejos de proteínas, azúcares y lípidos. De acuerdo a lo reportado por Mateos-Aparicio *et al.*, 2010 el frijol común es rico en fibra dietaria soluble (9.3%), fibra dietaria insoluble (30.8%), cuyos contenidos son dependientes de la variedad y factores ambientales de cosecha. En las muestras de harina destaca un mayor porcentaje de fibra insoluble que varía de 13.4 % a 20.6% en comparación a la fibra soluble que varió de 6.39% a 8.77%, el

contenido menor de fibra en comparación a lo reportado se debe a que durante el proceso de elaboración se elimina la cubierta de la semilla. De acuerdo a Gallegos-Infante *et al.*, (2014), el mayor porcentaje de fibra del frijol se encuentra en la testa. Se ha demostrado el efecto benéfico que tiene la fibra dietética insoluble del frijol que forma parte de la fracción no digerible, desde la prevención de enfermedades como estreñimiento, problemas gastrointestinales entre los que destacan inflamación e inhibición de la proliferación de células HT-29 derivadas de cáncer de colon humano (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2018; Campos-Vega *et al.*, 2009).

El contenido de almidón total con y sin extrusión fueron cercanos a los reportados por Chinedum *et al.*, (2018). La pérdida de contenido de almidón total no fue significativa ($\alpha=0.05$) en las harinas de proteína extrudidas (HAP) y en la harina extrudida para la bebida (HB) esto se debe probablemente a la pérdida de azúcares como oligosacáridos y polisacáridos, esto debido a que en la extrusión se descomponen en componentes de menor peso molecular, como es el caso de la sacarosa que se escinde en glucosa y fructosa, azúcares reductores que son más susceptibles a la reacción de Maillard dando la coloración característica (Morales *et al.*, 2015).

Durante el proceso de extrusión existen transformaciones fisicoquímicas, debido a que es un proceso baro-térmico que produce la gelatinización del almidón (almidón resistente), debido a la ruptura intermolecular de los enlaces, cuyo resultado es la ruptura de los gránulos de almidón (Ver figura 10), produciendo mayor cantidad de almidón fraccionado, lo que incrementa la absorción de agua y con ello la circulación de la partículas, lo que facilitando la penetración de calor y con ello la gelatinización (Muthurkumarappam, 2018; Seth *et al.*, 2015). A pesar de no tener significancia estadística ($\alpha= 0.05$) a nivel biológico se ha informado, en modelos *in vivo*, que un aumento de 8% al 10% (~10 mg/g) de almidón resistente tienen efectos benéficos en el colon (Koh y Rowling, 2017; Otemuyisa *et al.*, 2017; Zhang y Hamake, 2017). Los resultados nos dan un aumento de 10.48 al 10.84 % en las HAP y HB, respectivamente, comparado con la HST.

Cuadro 9. Contenido de fibra total, soluble, insoluble y almidón en las harinas de frijol común variedad Bayo Madero.

Composición	HST	HAP	HB
Fibra Dietaria			
Total ¹	19.8 ± 0.28 ^A	26.28 ± 0.66 ^B	29.39 ± 1.15 ^C
Soluble	6.39 ± 0.08 ^A	8.48 ± 0.51 ^B	8.77 ± 0.97 ^B
Insoluble	13.41 ± 0.56 ^A	17.80 ± 0.81 ^B	20.62 ± 1.34 ^C
Almidón			
Total	52.07 ± 1.78 ^A	53.23 ± 1.98 ^A	48.31 ± 2.91 ^A
Resistente	11.25 ± 1.15 ^A	12.43 ± 0.34 ^A	12.47 ± 1.52 ^A
Disponible	29.50 ± 1.01 ^A	32.61 ± 1.72 ^A	35.17 ± 1.43 ^A
Digestibilidad del almidón	36.83 ± 1.41 ^A	42.74 ± 0.45 ^B	52.59 ± 0.12 ^C
Índice de absorción de agua ²	2.37 ± 0.02 ^A	2.77 ± 0.25 ^B	3.20 ± 0.01 ^C
Sólidos solubles	0.58 ± 0.00 ^A	0.69 ± 0.03 ^B	1.45 ± 0.01 ^C

Los datos se expresan como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes, las letras representan diferencias estadísticas por renglón por la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), HST: harina sin extrusión, HAP: harina extudida para aislado proteico, HB: Harina extrudida para bebida. Los resultados están expresados en porcentaje (%).

¹ Fibra dietaria total se determinó por la sumatoria de fibra soluble e insoluble.

² Expresados en gramos de pellet/ 5g de muestra

La digestión del almidón requiere que el almidón sea capaz de llegar al intestino delgado (Topping *et al.*, 2003), esto depende de la proporción de amilosa/amilopectina, así como de la interacción con otras moléculas como lípidos y proteínas, este dato adicionalmente está relacionado con el almidón disponible libre esto quiere decir que no

forma complejos o que son liberados durante la acción enzimática durante la digestión por lo que son más fáciles de llevar al intestino delgado (Chinedum *et al.*, 2018). El índice de absorción de agua indica la buena solubilidad, se basa en la capacidad que tienen las partículas para absorber agua dentro de ellas, todas las harinas se obtuvo más del 50 % de los sólidos lo que indica que se mezclan perfectamente en el medio hidrofílico, se encontró significancia ($p=0.05$) tanto la HAP, HB y HST, por lo que la harina para la bebida resulto ser más factible para la elaboración de la bebida, el cual se relaciona con un menor contenido de almidón total.

V.2 Microscopía electrónica de barrido

Con la finalidad de saber si la morfología del almidón cambia por los tratamientos de extrusión se realizó una microscopía electrónica de barrido. (Figura 11). En la Figura A muestra un morfología estructural de los gránulos de almidón redonda, elíptica de forma regular, ovalada, con superficie lisa y con nulo espacio de aire, mientras que las Figuras B y C se asemejan a una masa amorfa de estructura cohesiva, con pérdida de apariencia granular, se observan espacios amplios de aire, la intensidad de estas es proporcional al aumento de temperatura. El cambio en apariencia de granular a amorfo se debe a la consecuencia de la gelatinización temperatura donde los gránulos de almidón acoplados forman estructura tipo esponja que conduce a la doble hélice en la región interior del almidón retrogradado. Este cambio en la estructura amorfa conduce a la inhibición en la actividad de la alfa amilasa en el almidón retrogradado (Reddy *et al.*, 2013).

De acuerdo a Ahmad *et al.*, (2018) el efecto sobre la estructura de los extruidos se logra variando la temperatura, el aumento de la temperatura durante la extrusión provoca que en las paredes celulares de los productos extruidos se vuelven más delgadas porque el tamaño de las celdas de aire se hacen más grande. La estructura en las Figura B y C también reveló que la compacidad de los extruidos disminuye con los aumentos de temperatura, esto se debe a la mayor expansión de los aperitivos o botanas extruidas debido al aumento de la temperatura, como resultado, el tamaño de las celdas de aire aumenta y la estructura se vuelve más suave. Por lo tanto, las harinas de frijol extruidas dan un producto con una estructura más blanda.

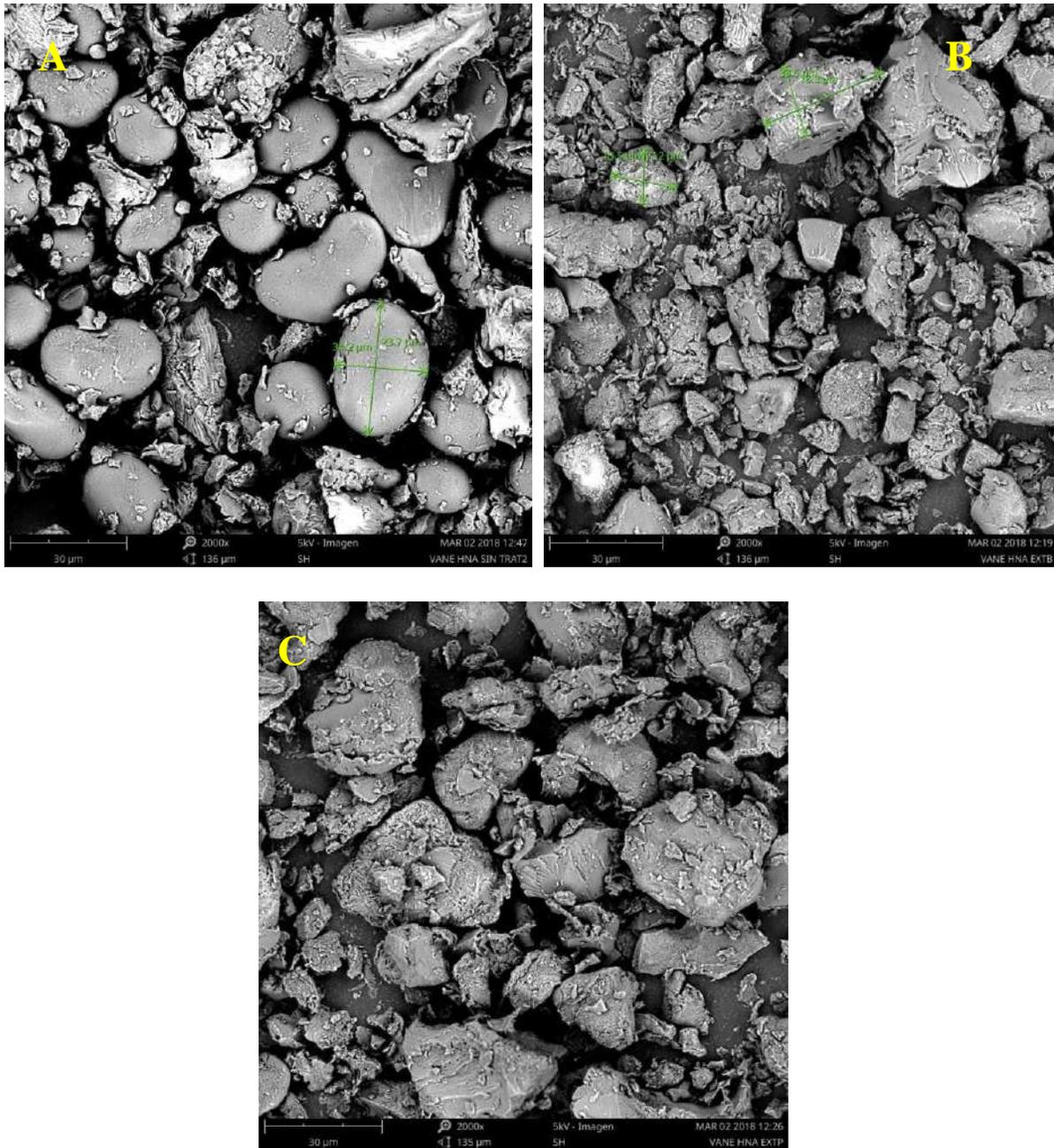


Figura 10. Microfotografía electrónica de barrido de las Harina de frijol común variedad Bayo Madero a 2000x, A) Harina sin tratamiento B) Harina extrudida para aislar la proteína; C) Harina extrudida para elaborar la bebida.

Resultados similares fueron reportados por Lazou y Krokida (2010) en harinas extrudidas de maíz y lentejas para refrigerios, donde la pared celular de los extruidos se volvió más delgada y la estructura se volvió más blanda. Wani y Kumar en 2016, mostraron que la estructura era más compacta en el caso de extruidos de maíz (botanas) en comparación con el control (botanas sin extrusión). Esto indica que los ingredientes con la

presencia de fibra y proteínas, así como la disminución del contenido de almidón en los extruido sean responsables para la estructura compacta de los extruidos. Hallazgos similares fueron observados por Vadukapuram *et al.*, (2014) en un extruido con linaza añadida.

Las imágenes fueron analizados por el programa Imagen J (muestra a continuación), que evalúa los píxeles y nos proporciona diferencia estadística utilizando la prueba de Tucky, los resultados nos arrojaron diferencias estadísticas en las harinas sin tratamiento vs la harinas con tratamiento (siendo ellas iguales), se comprobó que el tratamiento afecta directamente la estructura del alimento.

Harinas	Área total (píxeles)	Porciento del área
A) Sin tratamiento	302151	32.99 ±3.6 ^B
B) Extrudida (120 °C, 12 rpm)	365335	40.06 ±4.5 ^A
C) Extrudida (140 °C, 12 rpm)	417160	45.64 ±2.8 ^A

El análisis se realizó mediante el programa Image J 1.50i, las letras mayúsculas significan diferencia significativa entre filas por medio de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

V.3 Aislado proteico de frijol

Con el objetivo de obtener un extracto rico en proteína se llevaron a cabo dos procedimientos: hidróxido de sodio y urea, los resultados se muestran en el Cuadro 10. El rendimiento de proteína fue mayor con NaOH que con urea un diez porciento más; sin embargo, aun cuando no es estadísticamente significativo se eligió este método obtener el aislado proteico de frijol, ingrediente usado para enriquecer la bebida.

Al cuantificar la proteína extraída de la harina extrudida contra la harina sin extrudir (Cuadro 11), se encontró un mayor rendimiento en la proteína proveniente de la harina extrudida (HAP) con un 92.84% esto significa que se encontró un rendimiento mayor de 11.04% comparado con el aislado proteico proveniente de harina sin extrudir (HST), cabe resaltar que ambas fueron disueltas en NaOH (0.1 N), por otra parte la concentración de proteína aislada de la HST se obtuvo un 141.89 μ g equivalentes a BSA lo que representa 8.82 g en 10 g de muestra, lo que es igual de apropiado para determinar una buena

extracción proteica, siendo estadísticamente diferente a la proteína aislada de la HAP ($\alpha=0.05$), la cual se cuantifico con 242.48 μg equivalentes a BSA lo que equivale a 9.2 g/10 g por lo que a pesar de que ambos tienen una buena la cuantificación y pureza, se recomienda el uso de la proteína con el tratamiento de extrusión, así mismo esta fue la seleccionada para aumentar el contenido proteico en la bebida.

Cuadro 10. Rendimiento de proteína aislada a partir del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizando diferentes disolventes

Disolvente	Rendimiento
Hidróxido de sodio (NaOH; 0.1N)	73.54 \pm 0.19 ^B
Urea (6 N)	61.98 \pm 0.24 ^A

Los datos se expresan como la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes por la prueba de *t-student* ($\alpha=0.05$). Las letras representan diferencias estadísticas entre columnas. Los resultados se expresan como porcentaje (%).

Amaral *et al.*, (2017) reportan que el rendimiento de extracción de proteína en frijol negro fue del 21.7% (p/p) con base a contenido de proteína cuantificando en un porcentaje de 81.6%, por lo que al comparar el contenido del rendimiento obtenido para la variedad Bayo Madero se obtuvo mayor rendimiento con un 73.54 \pm 0.19 %, lo que sugiere que el tratamiento de extrusión favorece a las transformaciones principalmente en fibra dietaria y almidones como se describe en el Cuadro 9, favoreciendo la eliminación con mayor facilidad y cantidad a estos carbohidratos que son considerados como impurezas en los aislados proteicos, y a su vez se obtuvo mayor rendimiento a lo ya reportado para la variedad, en cuanto al contenido en la cuantificación de proteína fue de 92.8% atribuyéndolo a las transformaciones estructurales (desnaturalización de proteína), que favorece a la técnica utilizada de la determinación proteica.

Los resultados de la digestibilidad *in vitro* de la proteína control (caseína) fue de 96.36 % no teniendo significancia estadística con las proteínas obtenidas del frijol extruido (HAP) con un 89.95 %; el contenido aumentó 1.07 veces en comparación al contenido del aislado proteico proveniente del frijol sin estrudir (83.48 %), esto a pesar de que no fueron estadísticamente significativas ($\alpha=0.05$); el aumento de la digestibilidad se debe a que el

proceso de extrusión provoca la desnaturalización de la proteína y la disminución de los compuestos denominados antinutricios de las leguminosas (Cuadro 12) que forman complejos con la proteína, lo que al ser disminuidos y en conjunto con el cambio de estructura proteica aumenta la solubilidad en medio acuoso, y por lo tanto se refleja en el aumento del 7.75% en la proteína aislada con la HAP. Este comportamiento ha sido reportado por Alonso (2000) en aislado proteico de haba común extrudida con un valor del 87.4% (160 °C a 100 rpm) aumentando el 23.5% en comparación al aislado control (sin extrudir). Berk (2008) comprobó la desnaturalización completa de aislado proteico de soya cruda, durante la extrusión a temperatura de 130 °C, por lo que la proteína aislada del frijol también podría estar desnaturalizada. Rathod y Annapure (2016), reportaron una digestibilidad *in vitro* de 80.13% en lenteja roja extrudida a las mismas temperaturas utilizada para obtener la HAP, sugiriendo también que es en el proceso de extrusión donde se lleva a cabo el rompimiento de los enlaces de los complejos formados entre la proteína y compuestos antinutricios (ácido fítico, inhibidores de tripsina, taninos condensados y polifenoles).

En el índice de absorción de agua (IAA) no se encontró significancia estadística ($\alpha=0.05$), sin embargo, el contenido mayor corresponde a la proteína de HAP; el índice de absorción de agua indica una manifestación termodinámica en equilibrio entre enlaces proteína-medio acuoso lo que sugiere una buena solubilidad y por tanto buen ingrediente para elaboración de bebidas y geles, entre otros alimentos. Mientras que los sólidos solubles mostraron datos bajos lo que se relaciona con el índice de absorción de agua, es decir a mayor IAA menor cantidad de sólidos solubles (Cuadro 11). Datos parecidos fueron reportados por Rivera *et al.*, (2016) donde obtuvo un IAA de 2 a 3 mL por gramo de aislado proteico vegetal.

La capacidad del índice de absorción de aceite (IAF) para los aislados proteicos de frijol fue de 0.6 mL por gramo del aislado proteico, la diferencia no fue significativa entre los aislados proteicos de ambas variedades. Ramirez-Jimenez *et al.*, (2015) reportaron IAF ligeramente menores a lo reportado por para frijol cocido de esta misma variedad, lo que sugiere que el proceso de extrusión modifica la proporción de aminoácidos polares en la superficie de la molécula proteica; por lo que este incremento en el IAF pudiese deberse a la presencia de una gran proporción de grupos hidrófobos y aminoácidos no polares en la

superficie de las moléculas de proteína (Sathe *et al.*, 1982). Cabe destacar que la aparición de cadenas laterales no polares de proteínas es importante ya que permite la unión al aceite, y si la proteína se desnaturaliza, pierde su estructura secundaria y en consecuencia la actividad del aceite vinculante. Siendo la extrusión un proceso termo mecánico se produce una reducción en el tamaño de poro en la superficie del alimento, disminuyendo la permeabilidad al aceite (El-Adawy *et al.*, 2003). Recapitulando los resultados presentados de las características de la proteína de frijol indican que el uso de la extrusión ayuda a mejorar el aislado proteico de frijol común variedad Bayo Madero.

Cuadro 11. Características de la proteína aislada de harina de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

Composición	Proteína aislada	
	HST	HAP*
Proteínas totales expresado en:		
mg/mg	1.36 ± 0.04 ^A	2.18 ± 0.06 ^B
µg equivalentes a ASB**	141.9 ± 0.4 ^A	242.5 ± 0.9 ^B
Pureza¹	81.8 ± 1.3 ^A	92.84 ± 0.8 ^B
Digestibilidad <i>in vitro</i>¹	83.48 ± 2.0 ^{Ab}	89.95 ± 0.9 ^{Aa}
Índice de absorción de agua²	3.37 ± 0.01 ^A	3.39 ± 0.01 ^A
Índice de absorción de aceite³	0.60 ± 0.007 ^A	0.61 ± 0.002 ^A
Sólidos solubles¹	80.40 ± 0.02 ^A	85.37 ± 1.01 ^B

Los datos se expresan como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes por la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). HST: harina sin tratamiento, HAP: harina extrudida para aislado proteico. Las letras mayúsculas representan diferencias estadísticas entre filas, las letras minúsculas representan diferencias significativas con el control caseína (96.36 ± 0.63 %) por la prueba de Dunnett ($\alpha=0.05$). * 120 °C a 10 rpm. ** ASB: albúmina de suero bovino.

¹Expresado en porcentaje (%)

²Expresado en mL por gramo de aislado proteico

³Expresado en mL de aceite atrapado por gramos de aislado proteico

V.3.1 Electroforesis

Los geles de electroforesis (Figura 9), muestran el aislado proteico proveniente de HAP, las bandas marcadas con A sin presencia de β -mercaptoetanol, mientras las bandas marcadas como B con β -mercaptoetanol, a condiciones desnaturalizantes. De acuerdo a estudios anteriores la proteína de reserva de frijol (faseolina) es la más importante por abundancia con un peso molecular de entre 40 y 60.4 KDa, sin embargo, esta proteína tiene tres unidades donde α y β -Faseolina con pesos moleculares de entre 50-57 KDa. Mientras que otras proteínas como las lectinas se localizan con un peso de 26 a 31 KDa en monómeros y puede presentarse en forma tetramérica de 126 KDa, y finalmente los inhibidores de tripsina en 15 KDa (Dorantes-Mensoza, 2014; Natarajan *et al.*, 2013; Montoya *et al.*, 2008). Lo que sugiere que el proceso de extrusión provoca la desnaturalización proteica, sin diferencia en cuanto a las condiciones desnaturalizantes del β -mercaptoetanol, siendo la faseolina la banda más marcada, con un peso molecular de 55 KDa, la intensidad de las banda que se puede atribuir a una concentración más elevada comparada con las bandas inferiores que se indentifican como: lectinas (25 KDa) e inhibidores de tripsina (<25KDa).

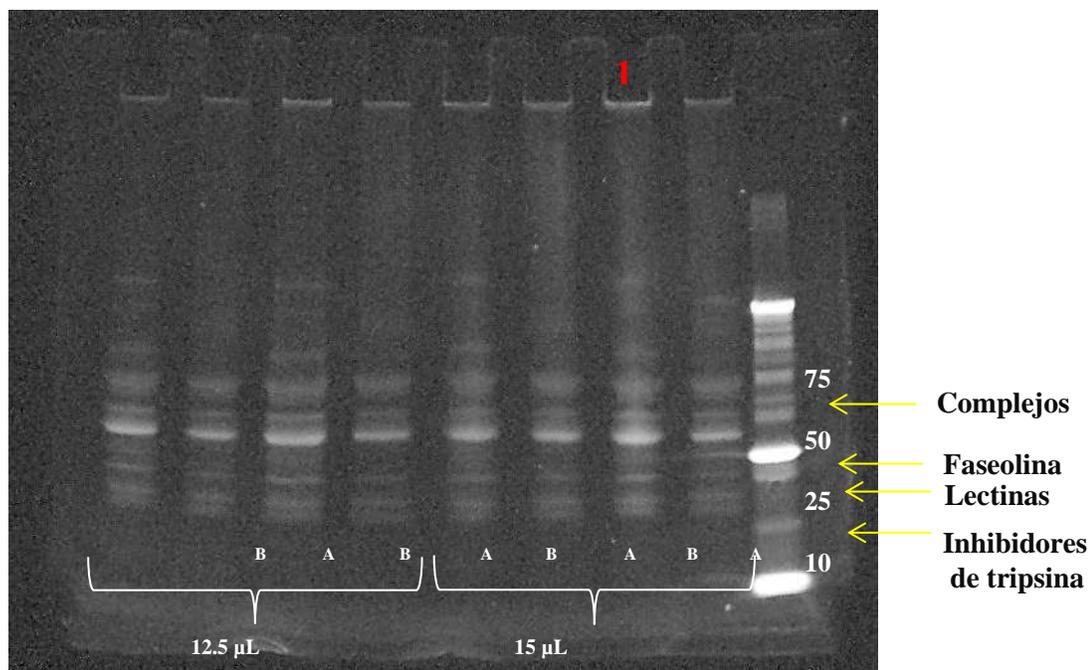


Figura 11. Electroforesis del aislado proteico de harinas de frijol extruido a diferentes concentraciones de carga siendo A) sin β -mercaptoetanol y B) en presencia de β -mercaptoetanol, ambos en condiciones desnaturalizantes. La fila 1 corresponde al marcador molecular.

Las bandas con pesos moleculares superiores sugiere la presencia de complejos como taninos-faseolina, ácido fitico-proteínas y tetrámeros de lectinas, que se encuentran entre 120 a 180 KDa (Espitia *et al.*, 2016). Estos resultados indican que la proteína obtenida del frijol extruido se encuentre desnaturalizada y al ser consumida durante la digestión, el proceso natural de hidrólisis podría formar péptidos de interés biológico que a su vez podrían tener mayor bioccesibilidad, lo cual es una característica deseable en el aislado proteico como ingrediente alimenticio bioactivo.

V.3.2 Microscopía electrónica de barrido

Con la finalidad de observar y caracterizar la superficie del aislado proteico, se llevó a cabo microscopía electrónica de barrido a 500x (Figura 10.) Se puede observar una estructura fraccionada (sin forma específica), lo que sugiere que las proteínas presentes están en una forma desnaturalizada; mientras que formas rugosas y lisas sugiere un rompimiento y degradación por el proceso de extracción. El nulo espacio de aire observado en la proteína presente en el aislado, se puede atribuir a que, durante el proceso de extrusión la proteína presente forma nuevas interacciones principalmente por la exposición de grupos hidrofóbicos que inmediatamente interactúan entre sí formando redes entre las proteínas. Resultados similares han sido reportados por Jiang *et al.*, (2014) quienes obtuvieron proteína desnaturalizada y con formas rugosas de aislados proteicos de frijol negro utilizando ultrasonido. También es fácil de observar escasos gránulos de almidón de forma ovoide de tamaño uniforme y bien definidos, conjugados o no, presentes en el aislado proteico.



Figura 12. Microfotografía electrónica de barrido del aislado proteico del frijol variedad Bayo Madero a 500x

Por otra parte Tang *et al.*, (2009) reportaron que cuanto más pequeños son los agregados en una dispersión y por tanto mayor es su solubilidad en ambientes acuosos, lo que se observa en la Figura 10 son partículas en general de 125 μm por 45 μm coincidiendo con el porcentaje de solubilidad del aislado, que de igual manera se comprobó al obtener valores de índice de absorción de agua superiores a lo ya reportado para aislados proteicos de frijol común sin tratamiento de extrusión.

V.4 Compuestos anti-nutricios

En el Cuadro 12 se presenta el contenido de compuestos anti-nutricios, los valores de cada uno se redujeron a lo requerido por la normatividad después de la extrusión, a excepción del ácido fítico. El contenido de inhibidores de tripsina en harina sin tratamiento fue de un 25.82 ± 0.94 UIT/mg reduciendo en promedio de 59.48% en comparación con las harinas extruidas cumpliendo con los valores máximos permitidos por la normativa mexicana (NOM-184-SSA1-2002), los valores coincidieron con lo reportado por Mejia *et al.*, (2005) para *Phaseolus vulgaris L.* con 26.8 ± 3.1 UIT/mg; Moreles-De *at el.*, (2007) quienes evaluaron la reducción de los inhibidores de tripsina en frijol negro obteniendo valores de un 56.6%, utilizando altas presiones en el frijol. Linsberger-Martín *et al.*, 2013 reportaron que se requieren valores menores de 18.1 UIT/mg de inhibidores de tripsina para formar complejos, lo que sugiere que la cantidad en harinas extrudidas en este trabajo no será suficiente para la formación de complejos con proteínas y almidón.

De acuerdo con lo descrito por Chavez y Sánchez (2017) en harinas crudas de 16 variedades de frijol común mexicano se encontró un rango de 0.10 a 0.42% del ácido fítico, lo que concuerda con los valores encontrados para la variedad Bayo Madero donde el proceso de extrusión redujo un 21.57% sin diferencia estadística; lo que permitió tener valores dentro de lo permitido por la FAO (2013) para legumbres. Mientras Raes *et al.*, (2014) mencionan que en valores superiores a 0.067% en leguminosas provoca interacciones moleculares con minerales y proteínas lo que limita su bioaccesibilidad, dato que sugiere que probablemente éstos estén formando complejos (aun después de la extrusión) siendo esta una característica no deseada para el ingrediente prioritario de la bebida de frijol.

Los taninos condensados aun no se han definido los valores máximos permitidos, sin embargo se redujo significativamente en un 51.2%. Olivas-Aguirre *et al.* (2015) demostraron que los taninos condensados tienen un núcleo glucídico que les confiere mayor susceptibilidad a hidrólisis en condiciones de altas temperaturas permitiendo la liberación gradual de los compuestos primarios. Además se ha informado que valores de 0.85 a 2.27 mg eq. de catequina en 100 g pueden formar complejos con proteínas y metales dependiendo de la matriz alimentaria (Nididi *et al.* 2014 y Hefnawy, 2011). Los valores en las harinas de frijol extrudidas en el estudio son de 0.49 27 mg eq. catequina en 100 g, valor que permitiría mayor bioaccesibilidad en proteína y minerales por la nula o poca formación de complejos. Cabe resaltar que debido a que los taninos se encuentran principalmente en la testa del frijol, la eliminación física de la cascarilla de la semilla durante el proceso previo de la obtención de la materia prima así como la lixiviación, disminuye notablemente el contenido de éstos en el alimento, mejorando la calidad nutricional (Khalid y Elhardallou, 2016). En cuanto a carbonatos totales se tuvo una disminución de 58.82% permitiendo así entrar dentro de los valores máximos permitidos (<20 mg de CaCO₃ en 100 g) por la norma mexicana NOM-184-SSA1-2002.

Cuadro 12. Compuestos anti-nutricios en harinas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Bayo Madero

Composición	HST	HB*
Inhibidores de tripsina ¹	25.82 ± 0.94 ^A	10.46 ± 0.46 ^B
Ácido fítico ²	0.364 ± 0.03 ^A	0.286 ± 0.02 ^A
Taninos condensados ³	1.01 ± 0.002 ^A	0.488 ± 0.003 ^B
Carbonatos totales ⁴	42.5 ± 0.07 ^A	17.5 ± 0.03 ^B

Los datos se expresan como la media ± la desviación estándar de tres experimentos realizados en días independientes, HST: Harina de frijol sin extrusión, HB: harina de frijol extrudida para bebida, las letras mayúsculas significan que son estadísticamente diferentes entre renglones por la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). * 140°C a 12 rpm.

¹ Se expresa en unidades inhibidores de tripsina por miligramos (UIT/mg)

² Se expresa en porcentaje (%),

³ Se expresa en miligramos equivalentes a (+) – catequina por 100 mg

⁴ Se expresa en miligramos de carbonatos por 100 mg

Es de importancia resaltar que la variación de estos compuestos se ha atribuido a las condiciones del cultivo, la variedad y matriz alimentaria (Khalid y Elhardallou, 2016), la normativa aún no está descrita para productos de leguminosas, y los datos reportados son los primeros para frijol extruido variedad Bayo Madero.

Cuadro 13. Compuestos antinutricios de las diferentes formulaciones de la bebida elaborada a base de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Bayo Madero

Bebida de frijol	Inhibidores de tripsina ¹	Ácido fítico ²	Taninos condensados ³	Carbonatos totales ⁴
Natural	8.07 ± 0.27	ND	0.038 ± 0.01 ^A	11.33 ± 0.28 ^{Aa}
Vainilla	8.89 ± 0.13	ND	0.023 ± 0.01 ^B	11.83 ± 0.29 ^{Aa}
Nuez	9.47 ± 1.09	ND	0.023 ± 0.02 ^B	13.33 ± 1.44 ^{Aa}
Nuez (3mg Fe ⁺²)	8.61 ± 0.3	ND	0.022 ± 0.02 ^B	15.17 ± 0.81 ^{Aa}
Nuez (2mg Fe ⁺²)	7.43 ± 1.1	ND	0.022 ± 0.01 ^B	14.67 ± 0.87 ^{Aa}
Vainilla (3mg Fe ⁺²)	7.40 ± 2.88	ND	0.025 ± 0.01 ^B	14.33 ± 2.31 ^{Aa}
Vainilla (2mg Fe ⁺²)	8.09 ± 1.24	ND	0.026 ± 0.01 ^B	13.50 ± 0.58 ^{Aa}
Bebida de soya	ND	ND	0.029 ± 0.01 ^{AB}	21.17 ± 0.5 ^{Bb}

Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar de tres experimentos realizados en días independientes, por la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). Las letras mayúsculas significan que son estadísticamente diferentes entre renglones, mientras que las letras minúsculas entre el grupo control (bebida comercial de soya) por la prueba de Dunnett ($\alpha=0.05$), ND: No detectado.

¹ Se expresa en unidades inhibidores de tripsina por miligramos (UIT/mg)

² Se expresa en porcentaje (%),

³ Se expresa en miligramos equivalentes a (+) – catequina por 100 mL

⁴ Se expresa en miligramos de carbonatos por 100 mL

Los compuestos anti-nutricios en las diferentes formulaciones en bebida se muestran en el Cuadro 13. Los inhibidores de tripsina se encuentran dentro de la normativa NOM-184-SSA1-2002, sin disminución significativa en cuanto a la harina y la formulación, esto podría explicarse a la posibilidad de que éstos compuestos formen parte

de la fracción proteica por lo que al adicionar la harina y el aislado proteico de frijol se tenga una cantidad parecida a la harina extrudida para la bebida (HB).

En cuanto al ácido fitico no fue detectado, lo cual es relevante debido a que sin la presencia de estos compuestos se puede suponer un aumento en la biaccesibilidad y biodisponibilidad de la proteína contenida en las bebidas, el mínimo de detección de la metodología utilizada es de 0.001% (Lolas y Makakis, 1977).

Se encontró un aumento significativo de taninos condensados, proporcional al hierro agregado, esto puede deberse a que la metodología empleada para su cuantificación se basa en la cantidad de grupos hidroxilo presentes en la estructura química de los taninos y sufriendo estas transformaciones químicas principalmente en el grupo metahidroxil libre en el anillo β -catequina, en contacto del metal se forman interacciones no covalentes y de Van de Waals con los grupos hidroxilos del polifenol detectando menor cantidad.

El contenido de carbonatos totales aumentó y está directamente relacionado con la formación de carbonato de hierro, la formación de este compuesto se refleja en el incremento en la concentración de hierro.

V.5 Composición nutritiva de la bebida

El Cuadro 14 muestra la composición nutritiva de las formulaciones más representativas. El contenido de proteína se aumentó 248 %, comparado con la formulación de Chico (2015), teniendo un comportamiento no dependiente del saborizante ni la concentración de hierro. De acuerdo a la literatura, la concentración de proteína en bebidas sucedáneas a la leche de vaca, varía de acuerdo a la materia que se utilice, siendo la de soya la que contiene mayor porcentaje de 3.2 %, seguida de la almendras con 2.58%, coco con 2.29% y avena con 2.4% (Kamisah *et al.*, 2015; Lalic *et al.*, 2014; Alison *et al.*, 2012; Barrett *et al.*, 2006), estos parámetros indican que la bebida de frijol se encuentra dentro del lo esperado en la composición nutritiva, para bebidas sucedáneas de leche en cuanto a los demás macronutrientes se encuentran en los siguientes intervalos: carbohidratos 0.72 a 9.17%, lípidos 0.97 a 23.84%, humedad 67.62 a 95.4% y cenizas de 0.3 a 0.74%

Rebellato *et al.*, (2017), fortificaron con hierro harinas para panes franceses, adicionando cantidades de entre 16.3 a 25.6 ppm para sulfato ferroso, obteniendo una biodisponibilidad de un 59.24 %, el cual dependen de las interacciones electrolíticas del hierro en sus diferentes formas como: reducido, h-reducido, CO-reducido y como ion electrolítico. Interacciones pueden darse en las matrices alimenticias, principalmente en alimentos con tratamientos térmicos previos, como lo es la pasteurización, esto nos da un parámetro de comparativa acerca de la cantidad de hierro presente en la bebida. Adicionalmente la cantidad mínima de calcio contenido en el alimento es esencial para una buena bioaccesibilidad del hierro, debido a las interacciones que realizan en el transporte duodenal, donde actúa bloqueando los transportadores moleculares del hierro y así tener función anti-nutricia, en la formulación propuesta en este trabajo se utilizó el cloruro de calcio como Ca^{+2} , siendo 14 mg en 100 mL, cantidad insuficiente para competir con el hierro.

De acuerdo a Martínez-Navarrete *et al.*, (2012) la dosis encontrada en diferentes alimentos fortificados con sulfato ferroso fueron para yogurt bebible de 10, 20, 40 ppm, leche de 15 ppm, bebidas para infantes de 15 al 18 ppm, donde la concentración dependerá de las características del propio alimento ya que una cantidad elevada de compuestos anti-nutricios o un elevada cantidad de lípidos modificará la calidad de la enriquecimiento y del sabor de los productos. El enriquecimiento con sulfato ferroso como hierro utilizada se basó en el grado de bioaccesibilidad y biodisponibilidad, así como en los parámetros fisicoquímicos y resultados en la evaluación sensorial que posteriormente se describen.

Las diferentes formulaciones utilizadas para la elaboración de la bebida de frijol proporcionan una buena calidad ya que se logró disminuir los compuestos que afectan la absorción del hierro y se elevó a niveles deseados la cantidad de proteína, también de destacar es que no se presentaron diferencias significativas en parámetros de texturas y parámetros fisicoquímicos.

Cuadro 14. Composición química de bebidas a base de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Bayo Madero

Bebida de frijol	Proteína	Lípidos	Humedad	Cenizas	Carbohidratos ¹	Hierro ²		Calcio ³
						Ferroso (Fe ⁺²)	Férrico (Fe ⁺³)	
Natural	3.39 ± 0.03	0.84 ± 0.03	93.19 ± 1.05	0.37 ± 0.01 ^{BC}	2.11 ± 0.90 ^{BC}	6.36 ± 0.06 ^C	3.44 ± 0.03 ^C	14
Nuez	3.33 ± 0.07	0.85 ± 0.02	93.00 ± 1.07	0.39 ± 0.00 ^{BC}	2.35 ± 0.5 ^C	6.08 ± 0.13 ^C	3.50 ± 0.02 ^C	14
Vainilla	3.43 ± 0.04	0.87 ± 0.03	92.79 ± 1.04	0.37 ± 0.02 ^C	2.43 ± 0.61 ^C	6.28 ± 0.02 ^C	3.34 ± 0.04 ^C	14
Nuez (3mg Fe ⁺²)	3.44 ± 0.01	0.86 ± 0.03	93.55 ± 1.24	0.45 ± 0.06 ^A	1.73 ± 0.83 ^A	23.47 ± 0.43 ^A	6.42 ± 0.20 ^A	14
Nuez (2mg Fe ⁺²)	3.43 ± 0.01	0.86 ± 0.04	93.45 ± 1.11	0.42 ± 0.04 ^{AB}	1.79 ± 0.55 ^A	16.84 ± 0.06 ^B	5.78 ± 0.02 ^B	14
Vainilla (3mg Fe ⁺²)	3.33 ± 0.05	0.85 ± 0.03	93.32 ± 1.39	0.44 ± 0.05 ^A	2.05 ± 0.45 ^B	24.45 ± 0.18 ^A	6.38 ± 0.06 ^{AB}	14
Vainilla (2mg Fe ⁺²)	3.35 ± 0.02	0.83 ± 0.01	93.38 ± 1.60	0.41 ± 0.03 ^{AB}	2.04 ± 0.29 ^B	15.92 ± 0.08 ^B	5.70 ± 0.17 ^B	14

Los datos se expresan como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes por la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), las letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre renglones. La composición química está expresada en porcentaje (%) en base a 100 mL.

¹ Carbohidratos se determinan por diferencia.

² Expresados en partes por millón (ppm).

³ Basado en la cantidad de calcio agregado en la formulación de las bebidas expresados en partes por millón (ppm)

En el cuadro 15 se muestra la composición de carbohidratos presentes en las formulaciones destacando los siguientes parámetros: los azúcares reductores que son aquellos que contienen en sus extremos grupos carbonilos, que interactúan reduciendo otras moléculas, se destaca principalmente di, tri o polisacárido de glucosa (almidón y celulosa). En México no existe una normativa que clasifique los alimentos de acuerdo a esta característica, sin embargo, la normativa y legislación europea menciona que las bebidas no alcohólicas se pueden clasificar de acuerdo a la concentración de azúcares reductores totales en: no dulces (menos de 5 g de glucosa/L), poco dulces (5 -15 g de glucosa/L), semidulces (15-25g de glucosa/L) y dulces (25-125g de glucosa/L). Con base en lo anterior la bebida de frijol se clasifica en no dulce debido a que la concentración varía de 2.5 a 3.04 g de glucosa/L, mientras que una bebida comercial de soya arrojó valores de 5.19 g de glucosa/L clasificándola como en poco dulce (Sözgen *et al.*, 2016; EFSA, 2007). En lo referente a las diferentes formulaciones se aprecian diferencias significativas en azúcares, dependiente del saborizante, que aumenta al compararse con la bebida natural, sin embargo disminuye en presencia de hierro, siendo directamente proporcional a la concentración presente (Fe^{+2}), esto podría atribuirse a que estos azúcares reducen el hierro férrico a ferroso y por lo tanto los resultados muestran una disminución significativa en la bebida con una concentración de hierro de 3 ppm.

En cuanto a la fibra dietaria total no hubo diferencias significativas entre las formulaciones, sin embargo estos valores son altos en comparación con lo reportado por Stephen *et al.*, (2018) para leche de vaca con 2-3 mg en 250 mL, lo que conlleva a tener mejores efectos benéficos a la salud, proporcionando mejor calidad nutritiva en el producto. Nilufer *et al.*, (2008) obtuvieron valores similares para leche de soya con un contenido de fibra soluble de 2.9 % y fibra insoluble 0.142 %, así mismo concluyeron ser buena fuente de fibra tanto soluble como insoluble, esto a ser complementario por una saludable dieta. Es de destacar que una ventaja de la bebida de frijol es que presenta mayor contenido de fibra respecto a la leche de vaca, lo que es atribuido a la leguminosa(s). Dentro de la fibra dietaria insoluble se identificó almidón resistente, esto a pesar que sus proporción no representa una parte prioritaria dentro de su composición nutrimental, se comparó con la formulación descrita por Chico (2015) obteniendo mayores contenidos de un 166% más, esto debido a la naturaleza de la cosecha. Resultados que permiten sugerir que la bebida

desarrollada con frijol común e independientemente del saborizante contienen excelentes parámetros nutricionales, quedando por evaluar si en estas bebidas se encuentran biodisponibles y bioaccesibles.

Cuadro 25. Contenido de fibra total, soluble, insoluble y almidón en bebidas a base de frijol común

Bebida de frijol	Azúcares reductores totales ²	Fibra dietaria total ¹	Fibra dietaria soluble	Fibra dietaria insoluble	Almidón resistente
Natural	223.8 ± 30.0 ^C	3.43 ± 0.1 ^{AB}	3.29 ± 0.1	0.14 ± 0.004	14.60 ± 0.3 ^B
Vainilla	304.9 ± 27.7 ^A	3.52 ± 0.7 ^{AB}	3.38 ± 0.1	0.14 ± 0.007	13.94 ± 0.5 ^{AB}
Nuez	301.3 ± 21.2 ^A	4.08 ± 0.5 ^A	3.38 ± 0.1	0.15 ± 0.002	14.03 ± 0.6 ^B
Nuez (3mg Fe ⁺²)	259.1 ± 54.2 ^B	3.90 ± 0.3 ^A	3.76 ± 0.3	0.14 ± 0.006	12.25 ± 0.4 ^A
Nuez (2 mg Fe ⁺²)	297.9 ± 21.2 ^{AB}	3.75 ± 0.3 ^A	3.60 ± 0.2	0.15 ± 0.001	12.49 ± 0.8 ^A
Vainilla (3mg Fe ⁺²)	273.5 ± 20.3 ^B	3.98 ± 0.2 ^A	3.85 ± 0.2	0.13 ± 0.011	12.23 ± 0.9 ^A
Vainilla (2mg Fe ⁺²)	296.4 ± 16.6 ^{AB}	3.79 ± 0.1 ^A	3.65 ± 0.1	0.15 ± 0.004	12.79 ± 0.2 ^A

Los datos se expresan como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes, las letras representan diferencias estadísticas entre filas por la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). Los resultados están expresados en porcentaje (%)

¹ Fibra total se determinan por la sumatoria de fibra soluble e insoluble.

² Los azúcares reductores totales se expresan en µg de glucosa por 100 mL.

V.6 Parámetros fisicoquímicos

Los parámetros fisicoquímicos de las diferentes formulaciones de la bebida de frijol se muestran en los Cuadro 16 y 17. Dentro de los valores obtenidos para pH tienen rangos entre 5.33 a 5.83, no teniendo diferencia significativa con el contenido de proteína y de hierro. Marquezi *et al.*, (2017) reportaron para el pH de frijol cocido un rango entre 6.11 a 6.33, siendo valores menos ácidos que en la bebida, esto depende de la cosecha, el tipo de frijol y la cantidad de ácidos orgánicos presentes, por lo que se evaluó la acidez titulable

referente al ácido málico, reportando éste como el ácido mayoritario en esta leguminosa, seguido del ácido esteárico y ácido palmítico (John y Luthria, 2015). El contenido del ácido málico se comparó con una la bebida comercial de soya, y estando correlacionado con el pH (básico de la bebida de soya), fue inferior en comparación a las bebidas de frijol, esto se debe a la naturaleza del grano utilizado, lo que sugiere una mejor resistencia en la digestión principalmente en la parte del estómago, lo que pudiese ayudar a que los péptidos generados y el hierro lleguen de forma casi intacta al intestino delgado donde son absorbidos.

En lo referente a la viscosidad el comportamiento fue el esperado, al aumentar la temperatura de 4 a 18, 21 y 25 °C disminuye la viscosidad, sin embargo dentro de los resultados se pudo observar mayor viscosidad de la bebida de frijol en comparación con la bebida comercial de soya, esto indica mayor presencia de sólidos en las formulaciones de frijol común. De acuerdo a la evaluación de la viscosidad de Liu *et al.*, (2007) a diferentes bebidas de soya a 25 °C, encontraron intervalos de valores entre 18 a 35 cP, resultado que concuerdan con la bebida desarrollada. Sin embargo, debido a que la bebida propuesta en este trabajo es considerada como un producto nuevo no es posible comparar los resultados con una de su propia naturaleza, sino solo interpolarlos con otros productos existentes, como la bebida de soya que tiene una menor viscosidad comparada con la bebida de frijol, sin embargo, a pesar de tener consecuencias en la textura y estabilidad del producto se comprobó que no había diferencias visibles ni de aceptación (ver evaluación sensorial) en cuanto a eso.

En cuanto a la influencia de los ingredientes prioritarios restantes, existe diferencia estadística significativa en los saborizantes, siendo sabor vainilla el de mayor viscosidad esto debido a la influencia del saborizante (sólido) de esta formulación, el saborizante nuez se utilizó de forma líquida no afectando éste parámetro. La cantidad de hierro utilizada en las bebidas también se relacionó con la viscosidad siendo directamente proporcional al aumento en esta propiedad fisicoquímica y estadísticamente significativo, éste tipo de comportamiento aún no ha sido reportado para este tipo de bebidas, sin embargo se puede deber a la formación de posibles complejos que aumentan este parámetro reológico. Lo anterior es importante principalmente para la aceptación del producto, debido a la

influencia de la viscosidad con los aromas y sabores, lo que contribuye con la aceptación del producto (Cook *et al.*, 2004).

Otros parámetros fisicoquímicos que se evaluaron y compraron con la bebida comercial de soya (Cuadro 17) a fin de ver cuál de las formaciones era parecida a la comercial y si esto tenía relación directa con el agrado del consumidor, esto debido a que la bebida debe cumplir con las características que los consumidores están acostumbrados en las bebidas que ya existen en el mercado, observando diferencia en cuanto al grado de sólidos solubles, pH y viscosidad, basados en estos parámetros se evaluó el sabor. Otro parámetro importante es la inocuidad y por lo tanto el deterioro, principalmente por las bacterias deterioradoras, es importante resaltar que todos los datos obtenidos que se puede tomar como referencia sin embargo, a ser un producto nuevo y sin haber referencias para una comparación real, se considera los valores adecuados para la bebida de frijol extrudida.

En cuanto a los sólidos solubles (grado Brix) la bebida de frijol presentó menor concentración en comparación con la bebida comercial de soya, esto se debe a que en la formulación propuesta se utilizó una baja concentración de endulcorantes, así mismo, se observa que existe diferencia significativa en la formulación respecto al tipo el saborizante (vainilla en comparación a la natural y sabor nuez) sin presencia de hierro, las diferencias se atribuyen a que los saborizantes utilizados tiene naturaleza diferente (sólida o líquida); al adicionar el sulfato de hierro a las dos concentraciones propuestas a las formulaciones no se presentó diferencias significativas, esto pudiese ser debido a que el hierro interacciona con los azúcares reductores totales, no con la sacarosa ni sucralosa (azúcares no reductores).

La densidad es definida como la relación entre la masa y volumen, lo cual está asociado con la solubilidad del producto, donde los ingrediente principales son solubles en agua, en cuanto a los hidrófobos se homogenizan durante el procesamiento de elaboración por medio de una homogenización provocando una emulsión en la bebida, Los resultados obtenidos valores estadísticamente significativos sugieren dos fenómenos: 1) con el tipo de saborizante teniendo mayor densidad con la formulación sabor nuez, debido a que este saborizante se encuentra con base líquida, con extracción alcohólica, por lo que los valores obtenidos son esperados debido a la densidad que aumenta en cuanto al tipo de extracción del saborizante, el saborizante vainilla no tubo diferencias significativas al ser comparado con la bebida comercial de soya, lo que se relaciona con la textura y la influencia del gusto.

2) la cantidad de hierro aumenta la densidad en las formulaciones, debido a la posible formación de complejos.

Cuadro 16. Características fisicoquímicas de las bebidas a base de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

Parámetros	Bebida de frijol		
	Natural	Vainilla	Nuez
pH (25 °C)	5.61 ± 0.03 ^B	5.65 ± 0.09 ^B	5.83 ± 0.05 ^A
° Brix (20 °C)	2.9 ± 0.07 ^B	3.4 ± 0.09 ^A	2.8 ± 0.08 ^B
Viscosidad, 4 °C (cP) ¹	82.94 ± 0.98 ^{Aa}	88.32 ± 0.04 ^{Aa}	90.08 ± 0.87 ^{Ba}
Viscosidad, 18 °C (cP) ¹	77.32 ± 0.70 ^{Aa}	77.32 ± 2.06 ^{Aa}	89.03 ± 0.60 ^{Ba}
Viscosidad, 21 °C (cP) ¹	55.63 ± 1.85 ^{Aa}	59.10 ± 1.55 ^{Ab}	70.25 ± 1.83 ^{Bb}
Viscosidad, 25 °C (cP)*	50.28 ± 0.43 ^{Ab}	49.15 ± 0.15 ^{Ac}	61.82 ± 2.87 ^{Bc}
Acidez titulable (%) ²	0.0027 ± 0.001 ^A	0.0034 ± 0.001 ^A	0.0022 ± 0.001 ^A
Taza de asentamiento (%) ³	1.95 ± 0.02 ^B	1.55 ± 0.03 ^{AB}	1.35 ± 0.07 ^A
Taza de asentamiento de sólidos totales (%) ³	59.05 ± 1.00 ^A	53.33 ± 0.98 ^A	52.38 ± 1.02 ^A
Densidad (Grados Baumé; 20 °C)	1.99 ± 0.04 ^A	2.33 ± 0.02 ^A	2.42 ± 0.04 ^A

Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes por la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). Las letras mayúsculas representan diferencias estadísticas entre renglones, y las minúsculas representan diferencias estadísticas entre filas.

¹ La viscosidad en condiciones del tornillo al 50% y RPM 3 a 6.25.

² La acidez titulable referente a mili equivalentes de ácido málico.

³ Respecto al volumen inicial después de 10 días a temperatura ambiente.

En cuanto a la tasa de asentamiento, fueron estadísticamente significativas entre los tipo de saborizante, siendo solo la formulación con una concentración de hierro 3 mg y sabor vainilla igual a la comercial. Esta diferencia puede atribuirse a la incorporación y la

solubilidad de los ingredientes, siendo el saborizante nuez con mayor densidad se obtuvo mayor tasa de asentamiento debido a la base del extracto que provoca interacciones covalentes, mientras que la vainilla que es un saborizante sólido al ser soluble incorpora puentes de hidrógeno e interacciones de van der Waals, logrando así menor porcentaje de sólidos asentados y con ello mayor calidad en el producto. Los parámetros fisicoquímicos encontrados muestran características deseables en todas las formulaciones de acuerdo al tipo de bebida propuesta, siendo la formulación con saborizante vainilla y 2 mg de hierro la más estable entre las bebidas.

Cuadro 17. Parámetros fisicoquímicos de las diferentes formulaciones de la bebida a base de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

Parámetros	Bebida de frijol sabor				Bebida comercial Soya
	Nuez (3mg Fe ⁺²)	Nuez (2mg Fe ⁺²)	Vainilla (3mg Fe ⁺²)	Vainilla (2mg Fe ⁺²)	
pH (25 °C)	5.39 ± 0.01 ^B	5.43 ± 0.01 ^B	5.43 ± 0.01 ^B	5.33 ± 0.01 ^B	8.18 ± 0.02 ^A
Sólidos solubles (° Brix; 20 °C)	2.57 ± 0.06 ^B	2.57 ± 0.06 ^B	2.50 ± 0.1 ^B	2.57 ± 0.05 ^B	6.67 ± 0.05 ^A
Viscosidad, 4 °C (cP) ¹	87.94 ± 9 ^{Aa}	78.51 ± 8 ^{Aba}	87.60 ± 9 ^{Aa}	65.89 ± 6 ^{BCa}	51.20 ± 1.2 ^{Ca}
Viscosidad, 18 °C (cP) ¹	87.36 ± 9 ^{Aa}	70.14 ± 7 ^{Aab}	82.66 ± 7 ^{Aa}	65.04 ± 5 ^{Ba}	49.83 ± 1 ^{Ba}
Viscosidad, 21 °C (cP) ¹	79.22 ± 8 ^{Aab}	55.83 ± 3 ^{BCbc}	66.15 ± 5 ^{Aab}	57.45 ± 3 ^{Bab}	41.03 ± 1 ^{Cb}
Viscosidad, 25 °C (cP) ¹	65.820 ± 5 ^{Ab}	48.73 ± 3 ^{Bc}	65.23 ± 3 ^{Ab}	52.06 ± 3 ^{Bb}	36.53 ± 2 ^{Cc}
Acidez titulable ²	0.0031 ± 1x ^{-3A}	0.0037 ± 1x ^{-3A}	0.0032 ± 1x ^{-4A}	0.0034 ± 1x ^{-3A}	ND
Densidad (° Baumé; 15 °C)	1.77 ± 0.03 ^A	1.52 ± 0.02 ^B	2.10 ± 0.11 ^C	2.13 ± 0.06 ^C	2.04 ± 0.04 ^C
Tasa de asentamiento (%) ³	1.78 ± 0.30 ^C	1.62 ± 0.21 ^C	0.95 ± 0.09 ^{AB}	0.98 ± 0.05 ^B	0.81 ± 0.05 ^A

Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes por la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). Las letras mayúsculas representan diferencias estadísticas entre renglones y las minúsculas representan diferencias estadísticas entre filas. cP: centipoise

¹ La viscosidad expresada en porcentaje (%) en condiciones del tornillo al 50% y RPM 3 a 6.25.

² La acidez titulable referente a mili equivalentes de ácido málico.

³ Respecto al volumen inicial después de 10 días a temperatura ambiente.

V.7 Evaluación sensorial

V.7.0 Puebas microbiológica

A continuación se muestra el resumen la carga bacteriana encontrada en las formulaciones en *Besofilos aerobios* (BMA), bacterias coliformes totales, y hongos y levaduras, cabe resaltar que esta determinación fue realizada por el laboratorio de control y análisis microbiológico de alimentos, todos los resultados entran de acuerdo a lo establecido en la norma **NOM- 091-SSA1-1994**, por lo que fueron aptas para el consumo humano, se prosiguió con la evaluación sensorial.

Muestra	BMA (UFC/g)	Bacterias Coliformes Totales (UFC/g)	Hongos y Levaduras (UFC/g)
Bebida de frijol natural	320	<10	<10
Bebida de frijol nuez	260	<10	<10
Bebida de frijol vainilla	180	<10	<10

V.7.1 Prueba de identificación de sabor, aroma y prueba de agrado general de las formulaciones

El objetivo de esta evaluación fue descartar las formulaciones menos aceptadas evaluando la identificación del aroma y el sabor, así como el agrado general de las bebidas de frijol extruido sin la adición de hierro, con dos concentraciones de saborizante de vainilla, uno de nuez y uno sin saborizante.

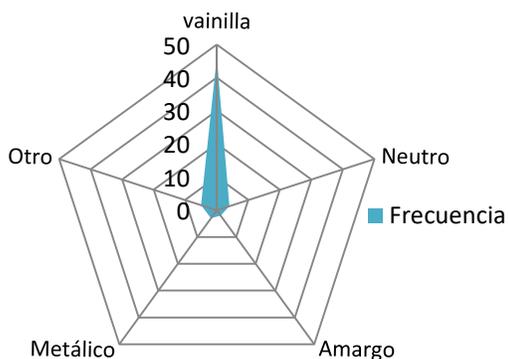
Para todos los resultados de la evaluación de los atributos sensoriales fueron analizados por una prueba de Chi cuadrada, entre la bebida natural y cada una de las formulaciones adicionadas de saborizante, por el programa estadístico JMP, con un valor $\alpha= 0.05$.

V.7.2 Identificación de aroma

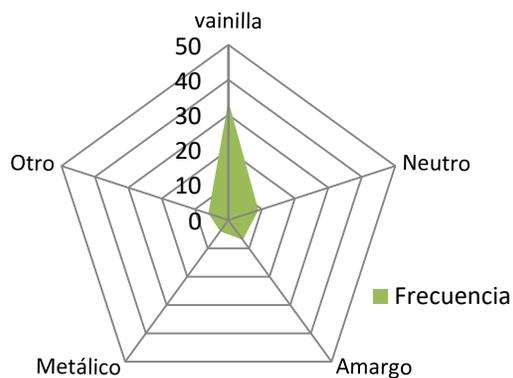
Los resultados fueron analizados con un valor de 1: dulce, 2: neutro, 3: amargo, 4: metálico, 5: otro. La Figura 13 muestra las gráficas de araña representativas de la identificación de aroma.

Las bebidas fueron evaluadas por un panel de 60 personas no entrenadas identificando el aroma predominante en las diferentes formulaciones. Se observó una tendencia de aroma “vainilla”, esto en la formulación con saborizante vainilla y nuez (A,B,C), en cuanto a la formulación sin saborizante se observa una tendencia indefinida a lo neutro y aroma vainilla (D), es importante resaltar que los panelistas identificaron aromas metálicos y amargos, esto pudiera ser por la naturaleza de la leguminosa que proporciona tonalidades aromáticas “no deseables”; en general el aroma predominante es “vainilla”, esto es relevante debido a que esto será influenciado en el sabor y agrado general. En general, la formulación vainilla alta concentración (A, vainilla 2) fue la que los panelistas seleccionaron de manera correcta con más de 60% de la evaluación, dentro de los comentarios se destacó como aroma “dulce”.

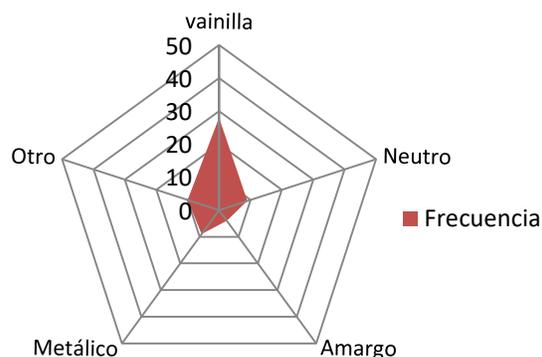
Aroma de la bebida sabor vainilla



Aroma de la bebida sabor nuez



Aroma de la bebida sabor vainilla 2



Aroma de la bebida sabor natural

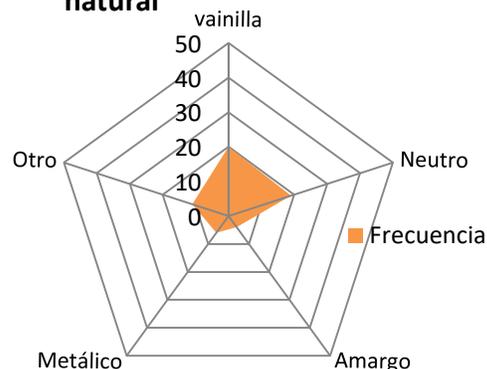


Figura 13. Gráfico de araña de identificación de aroma A) Formulación con la concentración de vainilla más alta, B) Formulación con la concentración de vainilla más baja, C) formulación con saborizante nuez D) Formulación sin saborizante.

V.7.3 Identificación de sabor

Los resultados fueron categorizados con numeración donde 1: dulce, 2: neutro, 3: amargo, 4: metálico, 5: otro. La Figura 14. Muestra las gráficas de araña representativas de la identificación de sabor.

En cuanto al sabor, la formulación con el saborizante vainilla concentración más baja se observa con una tendencia a lo “neutro”, siendo el sabor vainilla el correcto, no identificándose para en la mayoría de los panelistas el saborizante utilizado, lo que no sucede al aumentar la concentración del saborizante, se observó mayoritariamente la identificación correcta en la mayoría de los panelistas no entrenados, en cuanto al saborizante nuez y sin saborizante se observa una mayor proporción a lo “neutro”, destacando una proporción minoritaria a lo “amargo”, aun cuando no se esperaba estas clasificaciones, es deseado, ya que el uso de estas bebidas es para la elaboración de licuados, mezclándose con otros ingredientes como lo son algunas fruta y cereales, por lo que le da una característica deseable en cuanto al uso de las mismas, es importante resaltar que la concentración de vainilla más alta podría proporcionar un consumo directo de esta formulación en el mercado.

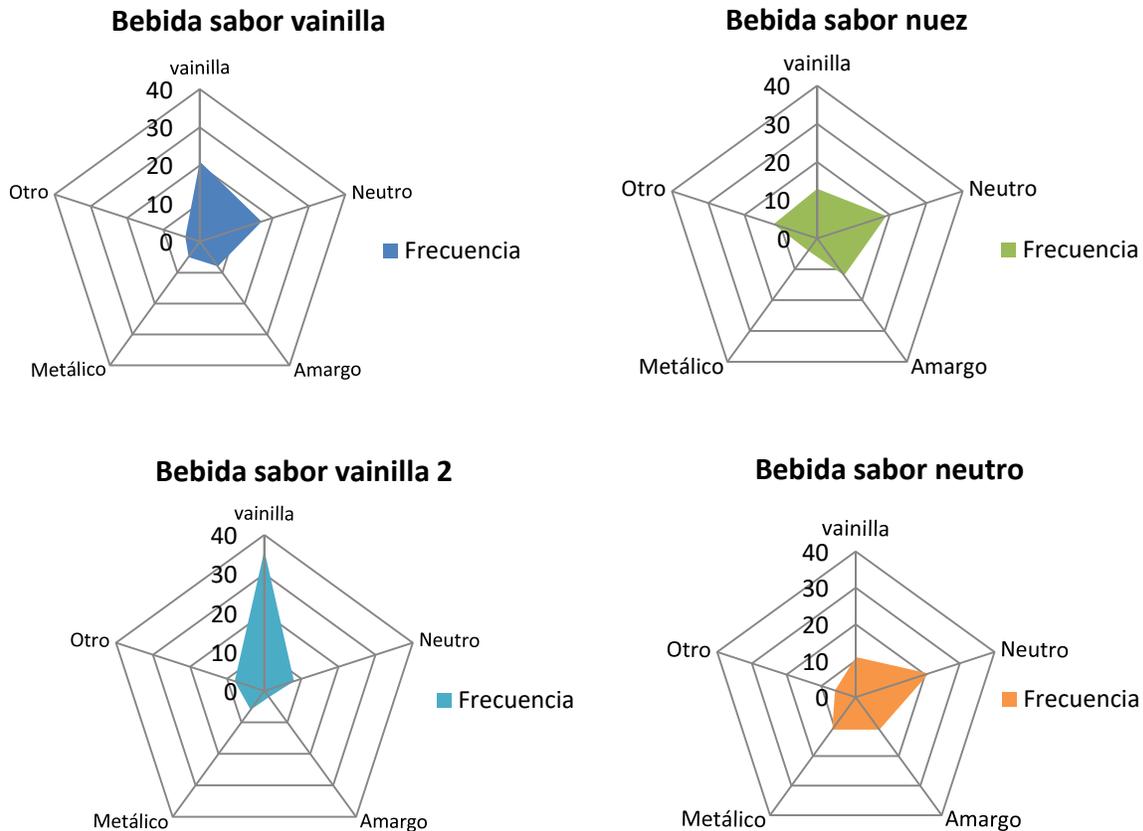


Figura 104. Gráfico de araña de identificación de sabor. A) Formulación con la concentración de vainilla más baja, B) Formulación con la concentración de vainilla más alta, C) formulación con saborizante nuez y D) Formulación sin saborizante

V.7.4 Agrado general

Se realizó una prueba de nivel de agrado mediante una escala de 7 puntos donde el valor de 7: me gusta mucho, 6: me gusta moderadamente, 5: me gusta poco, 4: me es indiferente, 3: me disgusta poco, 2: me disgusta moderadamente, 1: me disgusta mucho, se analizó con Chi cuadrada con un $\alpha:0.01$, los resultados se muestran en la figura 12. Se observa que todas las formulaciones se posicionaron con un 60 al 75% en “me es indiferente a me gusta mucho”, siendo relevante para un producto nuevo y panelistas no entrenados que son posibles consumidores. La formulación con una concentración alta del saborizante vainilla tuvo el mayor nivel de agrado por los panelistas, siendo estadísticamente diferentes, la formulación sabor nuez y vainilla concentración baja fueron

estadísticamente iguales, mientras que la formulación sin saborizante se posicionó con el nivel de agrado más bajo.

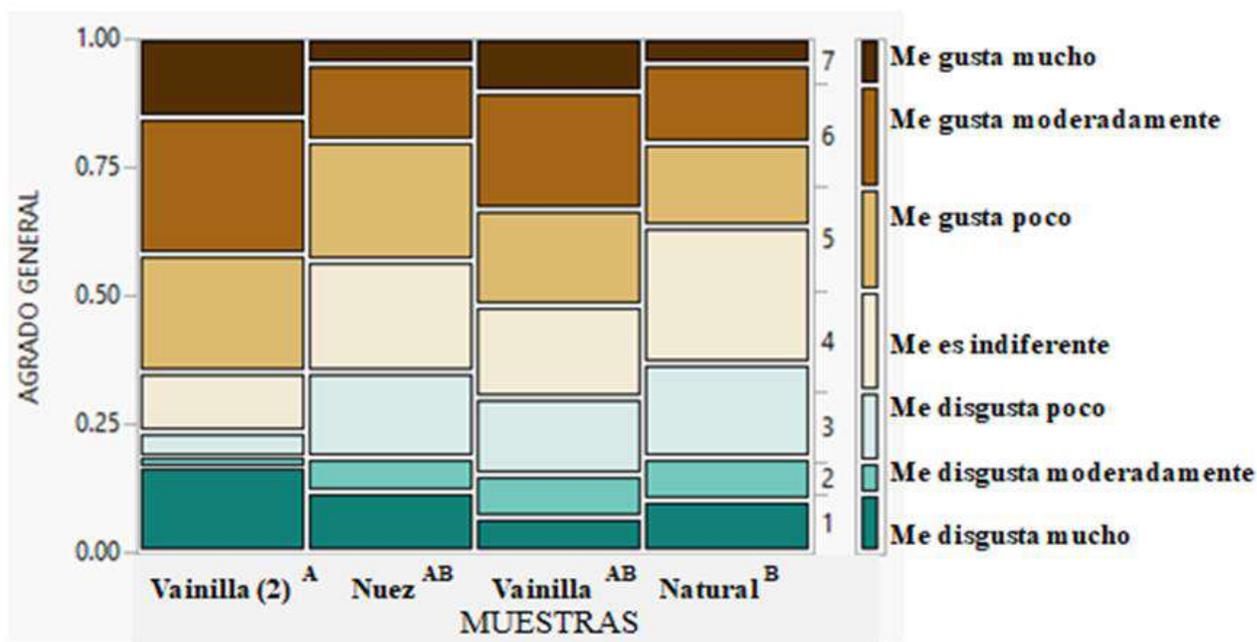


Figura 115. Gráfico de agrado general de las diferentes formulaciones de la bebida de frijol extruido. Las letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre cada muestra.

Los resultados anteriores ayudaron a excluir dos de las formulaciones, dejando la más aceptable vainilla 2 (concentración más alta), y ya que el saborizante nuez y vainilla no tuvieron significancia entre ellas, se decidió seleccionar la formulación con saborizante nuez. A estos dos sabores (vainilla 2 y nuez) se agregaron las dos concentraciones de sulfato de hierro (2 y 3 mg/100 mL), para analizar sus parámetros nutritivos, fisicoquímicos y de nivel de agrado por una prueba preliminar.

V.7.5 Prueba preliminar de nivel de agrado.

Incorporando las concentraciones de saborizantes seleccionada con mayor agrado en la prueba de preferencia se incorporando dos concentraciones de hierro, se realizó una prueba preliminar de nivel de agrado mediante una escala de 7 puntos donde corresponde a lo siguiente: 7: me gusta mucho, 6: me gusta moderadamente, 5: me gusta poco, 4: me es

indiferente, 3: me disgusta poco, 2: me disgusta moderadamente, 1: me disgusta mucho, los resultados se muestran en la Figura 16. El nivel de agrado que cada formulación se obtuvo con las formulaciones de vainilla y nuez con 2 mg de hierro en 100 mL, las que se posicionaron en me gusta moderadamente y me gusta poco respectivamente.

En cuanto a los niveles más altos de hierro utilizados con 3 mg en 100 mL, se posicionaron de la siguiente manera, sabor nuez en me es indiferente y sabor vainilla me disgusta poco, con esto resultados se descartaron las formulaciones más altas de hierro, por la detección y sabor a metal, que más de 80% de los panelistas pudieron identificar. Mientras que las formulaciones más bajas se podrían utilizar para garantizar la aceptabilidad en individuos que tiene deficiencias de hierro y anemia, esto para comprobar como la patología puede influenciar en la detección de sabor y aroma, por lo que para posteriores estudios se recomienda continuar con la bebida de vainilla en alta concentración con 2 mg de hierro y compararla con la de nuez a la misma concentración.

Escala de 7 puntos



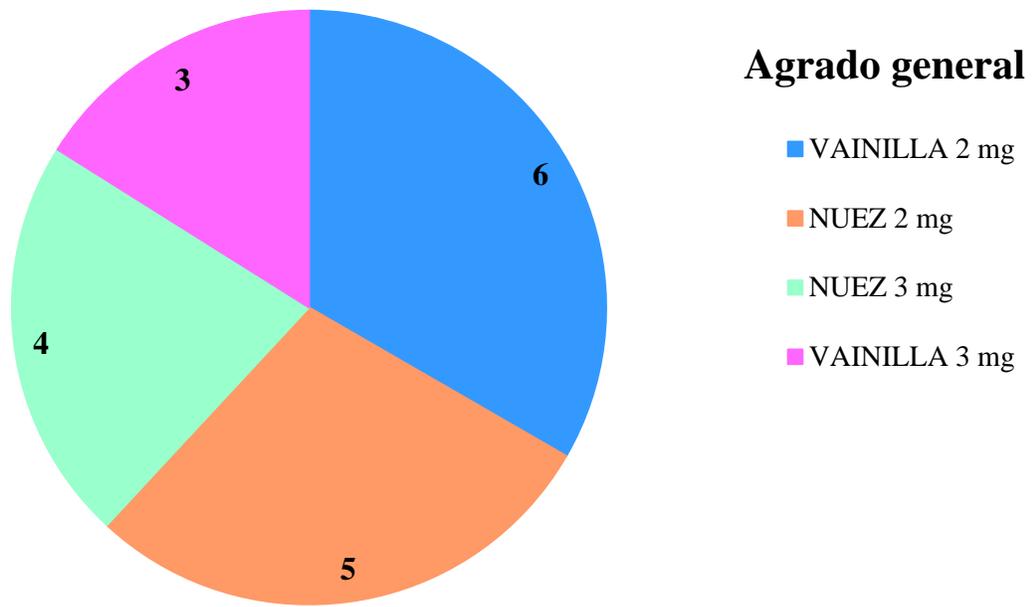


Figura 16. Prueba preliminar de nivel de agrado de 10 panelistas no entrenados de una bebida de frijol enriquecida con proteína y hierro biodisponible.

VI. CONCLUSIONES

El proceso de extrusión usado en el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Bayo Madero, logró disminuir de manera favorable los compuestos antinutricios, principalmente los inhibidores de tripsina (59.49 %), taninos condensados (51.68 %), ácido fítico (21.48 %) y carbonatos totales (58.82 %), posicionando su contenido a niveles deseados y permitidos por la normativa.

Por otra parte, en factores nutritivos evaluados, las harinas con los diferentes tratamientos alcanzaron mayores cantidades en proteína, almidones modificados, fibra dietaria total e insoluble a comparación de la harina de frijol sin tratamiento. Lo que sugiere que esta tecnología emergente (extrusión) podría ayudar a elaborar e implementar nuevos productos con el fin de rescatar el consumo del frijol común como alimento tradicional del mexicano y como una alternativa para el desarrollo de alimentos funcionales para individuos celíacos e intolerante a la lactosa.

El aislado proteico obtenido del frijol extruido mostró tener mejores características fisicoquímicas: mayor rendimiento, solubilidad, índice de absorción de aceite y agua; así como mayor contenido de proteínas desnaturalizadas en comparación del aislado proteico sin tratamiento. Obteniendo un producto adecuado para el enriquecimiento de alimentos principalmente bebidas, o alimentos líquidos.

La modificación propuesta en la formulación de la bebida de frijol, incluyendo el enriquecimiento con aislado proteico de frijol extruido y sulfato ferroso como hierro, permitió ofrecer una alternativa de bebida sucedáneas de leche ya existentes en el mercado como las bebida de soya, almendras o arroz.

La aceptabilidad de la bebida se posicionó como “me gusta moderadamente” sin adición de hierro esto destaca una aceptación significativa para el rango de edades de 13 a 49 años de sexo indistintos, que podrían ser posibles consumidores. Sin embargo, es necesario realizar otras evaluaciones sensoriales con adición del hierro esto a individuos con padecimientos específicos para comprobar la aceptabilidad del producto.

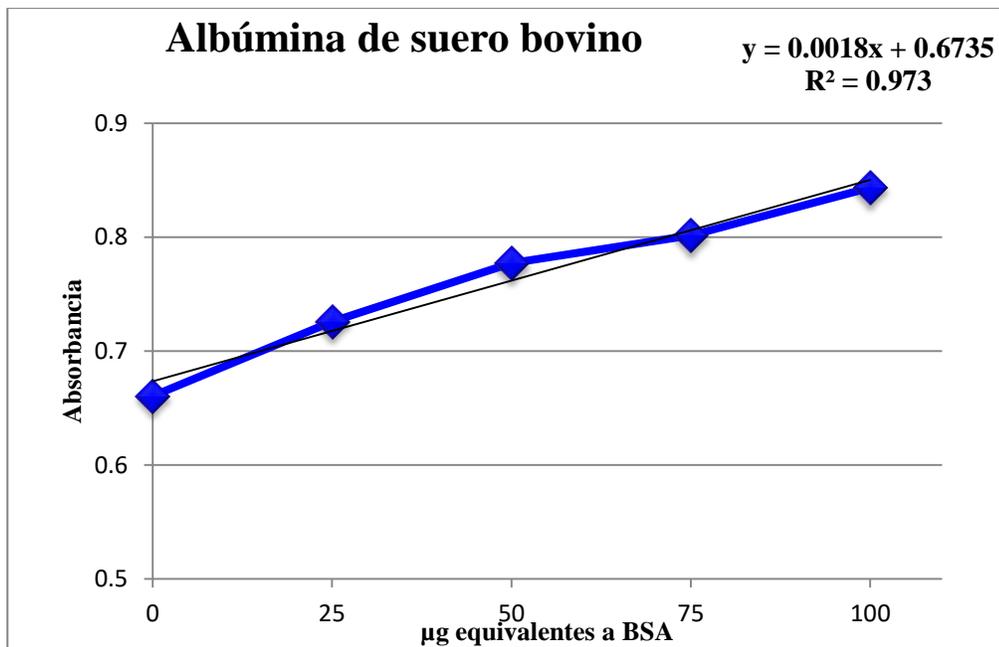
El nuevo producto puede entrar al mercado, y aunque va dirigido al público en general podría tener mayor aceptación en aquellas con estilos de vida específicos como el

veganismo, vegetarianismo y/o problemas de salud como la intolerancia a la lactosa, entre otros.

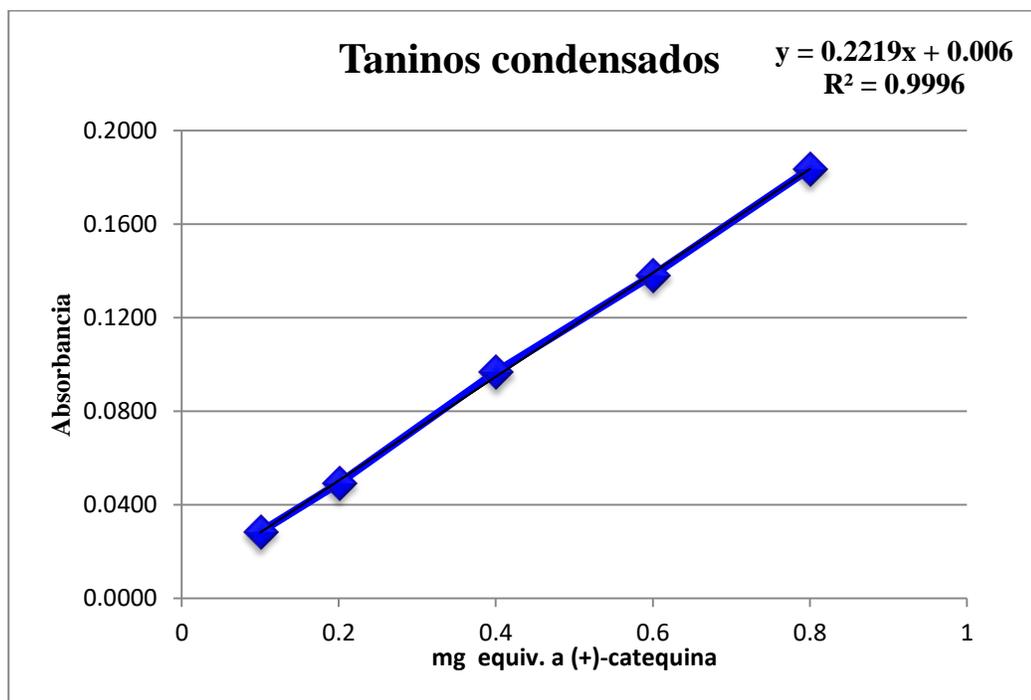
En términos generales la modificación y la innovación de esta bebida abre parámetros a las tecnologías emergentes, aumentando el valor de los alimentos tradicionales, con una visión moderna, renovando productos accesibles, que lleguen a cualquier mercado e incorporando valores agregados nutricionales para el beneficio de la salud de los consumidores.

VII. APÉNDICE

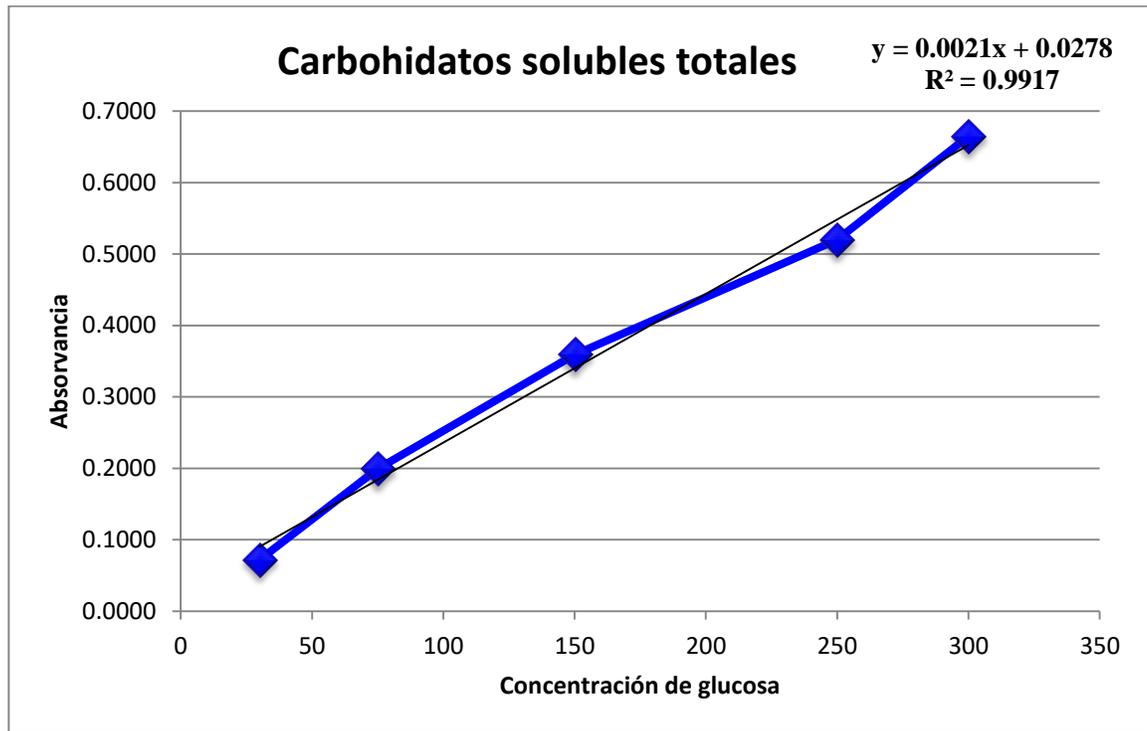
1. Curva de calibración para la determinación de proteína por el método de Bradford expresado en μg equivalentes a albúmina de suero bovino (BSA)



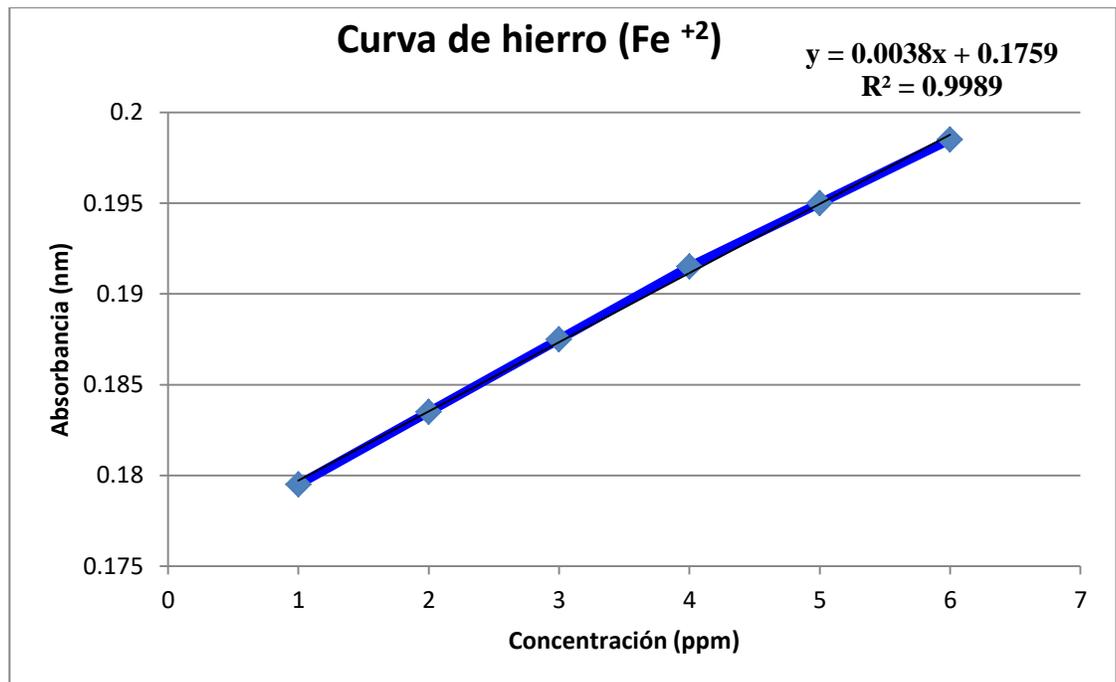
2. Curva de calibración para la determinación de taninos condensados expresado en mg equiv. a (+)-catequina.



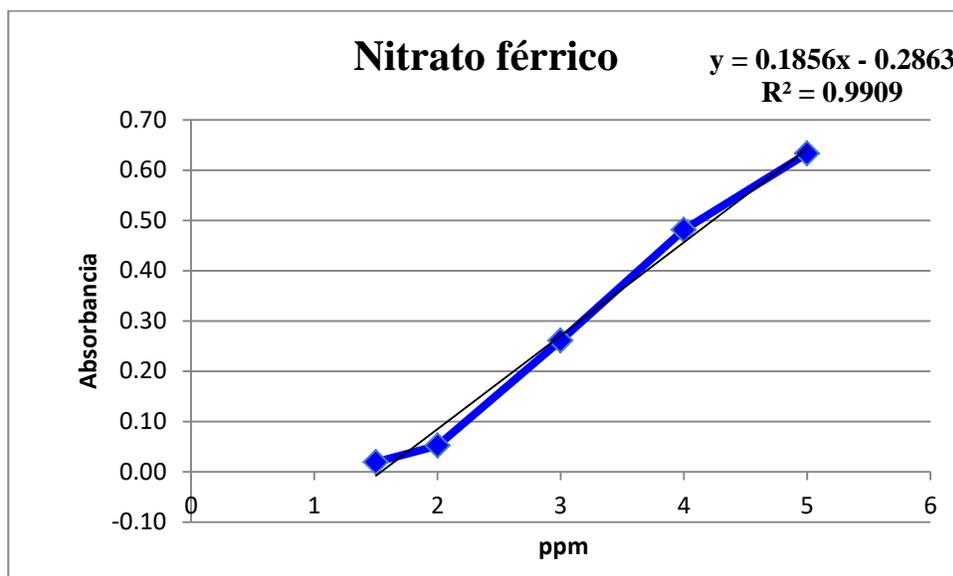
3. Curva de calibración para la determinación de glucosa



4. Curva de calibración para la determinación de hierro ferroso por el método de absorción atómica



5. Curva de calibración para la determinación de hierro férrico por método espectrofotométrico

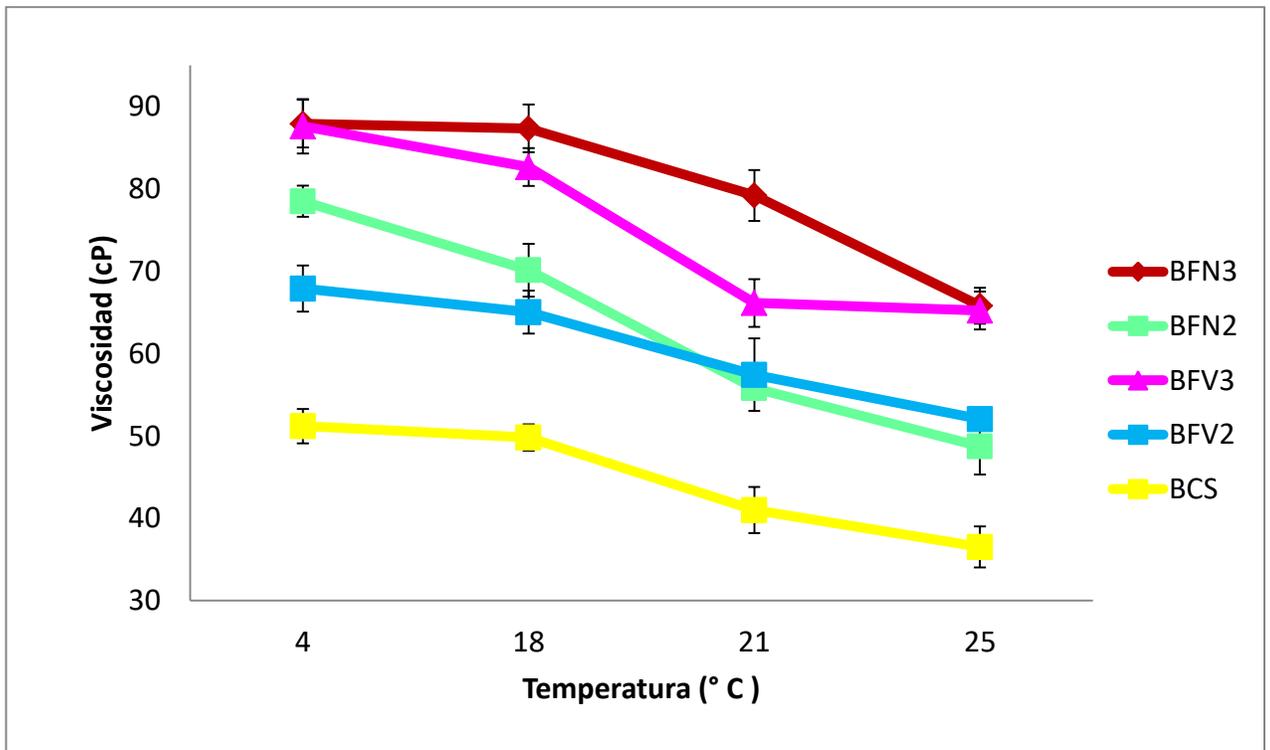


6. Viscosidad de las diferentes formulaciones de la bebida elaborada a base de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

Viscosidad (cP)	Formulación				
	Bebida de frijol nuez (3mg Fe ⁺²)	Bebida de frijol nuez (2mg Fe ⁺²)	Bebida de frijol vainilla (3mg Fe ⁺²)	Bebida de frijol vainilla (2mg Fe ⁺²)	Bebida de soya comercial
4 °C	87.94 ± 8.9 ^{Aa}	78.51 ± 8.2 ^{Aba}	87.60 ± 9.3 ^{Aa}	67.89 ± 5.8 ^{BCa}	51.20 ± 1.1 ^{Ca}
18 °C	87.36 ± 9.1 ^{Aa}	70.14 ± 7.7 ^{Aab}	82.66 ± 7.3 ^{Aa}	75.04 ± 5.6 ^{Aa}	49.83 ± 1.3 ^{Ba}
21 °C	79.22 ± 8.2 ^{Aab}	55.83 ± 3.2 ^{BCbc}	66.15 ± 4.9 ^{Aab}	57.45 ± 2.8 ^{Bab}	41.03 ± 0.8 ^{Cb}
25 °C	65.82 ± 5.1 ^{Ab}	48.73 ± 3.4 ^{Bc}	65.23 ± 3.3 ^{Ab}	57.06 ± 2.9 ^{Bb}	36.53 ± 2.5 ^{Cc}

Los resultados se muestran ± la desviación estándar de tres experimentos realizados en días independientes. Las letras mayúsculas muestran la diferencia significativa entre filas mientras que las minúsculas entre columnas, realizadas por la prueba de Tukey ($p < 0.05$), las condiciones del tornillo fueron al 50% y RPM 3 a 6.25.

7. Viscoamilograma de las diferentes formulaciones de la bebida elaborada a partir de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).



BFN3: Bebida de frijol sabor nuez 3mg Fe ⁺², **BFN2:** Bebida de frijol sabor nuez 2mg Fe ⁺², **BFV3:** Bebida de frijol sabor vainilla 3mg Fe ⁺², **BFV2:** Bebida de frijol sabor vainilla 2mg Fe ⁺²; **BCS:** Bebida comercial de soya

Productos

De este trabajo de tesis esta en proceso de protección de una patente tipo invención de productos por el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, ver número de registro y acta oficial.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abbaspour, N., Hurrell, R., & Kelishadi, R. (2014). Review on iron and its importance for human health., (February), 3–11.
- Alam, M. S., Kaur, J., Khaira, H., & Gupta, K. (2015). Extrusion and Extruded Products: Changes in Quality Attributes as Affected by Extrusion Process Parameters: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 8398(October), 00–00. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.779568>
- Alonso, R., Aguirre, A., Marzo, F. (2000). Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chemistry*, 68(2), 159–165. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00169-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00169-7)
- Amaral, J., Levien, N., Zanella, V., Berrios, J. J. De, Renato, A., Dias, G., & Zavareze, R. (2017). Black bean (*Phaseolus vulgaris* L .) protein hydrolysates : Physicochemical and functional properties. *Food Chemistry*, 214, 460–467. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.046>
- Andreu Ivorra M. J. (2016). Nutrición y salud en la dieta vegana, Universidad Oberta de Caraluya, editorial caraluya, España, ed. 1.
- Badui Dergal, S. (2006). Química de los alimentos. México; Ed. Alhambra Mexicana, Pearson educación México, Cap. 7:11 .
- Bashir, A.; Ashraf, S.A.; Khan, M.A.; Azad, Z.R.A.A. (2015). Development and Compositional Analysis of Protein Enriched Soybean-Pea-Wheat Flour Blended Cookies. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2015, 7(3), 76–83.
- Bemer, R.A., & J.W. Morse (1974). Dissolution kinetics of calcium carbonate in seatwater. IV Theory of calcite dissolution. *Am. J. Sci.* 274:108-134.
- Bernat, N., Cháfer, M., Rodríguez-García, J., Chiralt, A., y González-Martínez, C. (2015). Effect of high pressure homogenisation and heat treatment on physical properties and stability of almond and hazelnut milks. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 488–496. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.045>
- Bhanu, K., Komath, S. S., Maiya, B. G., Swamy, M. J. (1997). Interactions of porphyrins with concanavalin A and pea lectin. *Current Science*, 73(7), 598-602.

- Brennan, M.A., Lan, T., Brennan, C.S., 2016. Synergistic effects of barley, oat and legume material on physicochemical and glyceimic properties of extruded cereal breakfast products. *J. Food Process- Preserv.* 40(3), 405-413.
- Camaschella, C. (2015). Iron-Deficiency Anemia. *New England Journal of Medicine*, 372(19), 1832–1843. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1401038>
- Campos-Vega, R., Loarca-Piña, G., y Oomah, B. D. (2010). Minor components of pulses and their potential impact on human health. *Food Research International*, 43(2), 461–482. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.004>
- Campos-Vega, R., Reynoso-Camacho, R., Pedraza-Aboytes, G., Acosta-Gallegos, J. A., Guzman-Maldonado, S. H., Paredes-Lopez, O., Loarca-Piña, G. (2009). Chemical composition and in vitro polysaccharide fermentation of different beans (*Phaseolus Vulgaris L.*). *Journal of Food Science*, 74(7). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01292.x>
- Chanphai, P., Kreplak, L., Tajmir-riahi, H. A. (2017). Biology Aggregation of trypsin and trypsin inhibitor by Al cation. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 169, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.02.018>
- Chen, P. X., Zhang, H., Marcone, M. F., Pauls, K. P., Liu, R., Tang, Y., Tsao, R. (2017). Anti-inflammatory effects of phenolic-rich bean (*Phaseolus vulgaris L.*) extracts and enhanced cellular antioxidant enzyme activities in Caco-2 cells. *Journal of Functional*
- Chico P. A. (2015). Desarrollo de un sustituto de leche a partir de frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) para obtener el grado de Maestro en ciencia y tecnología de alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química. Programa de posgrado en alimentos del centro de la república (PROPAC).
- Chinedum, E., Sanni, S., Theresa, N., & Ebere, A. (2018). Effect of domestic cooking on the starch digestibility , predicted glyceimic indices , polyphenol contents and alpha amylase inhibitory properties of beans (*Phaseolis vulgaris*) and breadfruit (*Treculia africana*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.005>
- Cook, D. J., Hollowood, T. A., Pettelot, E., Taylor, A. J. (2004). Effects of Viscosity on Flavor Perception : A Multimodal Approach, 240–253.
- Davidsson L, Sarker SA, Fuschs GJ, Walczyk T, Hurrell RF. (2011). Helicobacter pylori infection and iron absorption in Bangladeshi children (abstract). Bioavailability of micronutrients in relation to public health. Interlaken, Suiza.
- De León J. A. R., Marín, R. M. U., Aldana, M. L., Loarca, M. G. F (2013). Avances de

ciencia y tecnología alimentaria en México, Cap. 3 pp: 161:175 "Beneficios del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) contra cáncer de colon. ISBN: 978-607-402-576-7

Deshpande, M., Sathe K. (2018). Interactions with 8-Anilino-naphthalene-1-Sulfonic Acid (ANS) and Surface Hydrophobicity of Black Gram (*Vigna mungo*) Phaseolin, 1–9. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14204>

Di Bernardini, R., Mullen, A. M., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., y Hayes, M. (2012). Assessment of the angiotensin-I-converting enzyme (ACE-I) inhibitory and antioxidant activities of hydrolysates of bovine brisket sarcoplasmic proteins produced by papain and characterisation of associated bioactive peptidic fractions. *Meat Science*, 90(1), 226–235. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.07.008>

EFSA (2007). Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food Adopted on 27 September 2007, Aguilar, F., Autrup, H., Barlow, S., Castle, L., Crebelli, R., Engel, K., Toldrá, F 1–43.

El-Adawy, T.A., Rahma, E.H., El-Bedawey, A.A. and El-Beltagy, A.E. (2003). Nutritional potential and functional properties of germinated mung bean, pea and lentil seeds. *Plant Foods for Human Nutrition* 58: 1-13

ENSANUT (2016). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2016ResultadosNacionales.pdf>

ENSANUT (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>

Espitia Orozco F.J ab, N. T. A. G., L.G.C, O. A., L. G. M. (2016). Caracterización de las proteínas de reserva de la semilla de parota (*Enterolobium cyclocarpum*). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Espitia et Al./ Vol. 1, No. 2 (2016) 147-152, 1(2), 147–152.

Fennema, O. R. (1992). *Química de los alimentos* (No. 664.07 F335q). Zaragoza, ES: Acribia.

Fernández A.C., Nishida W., Da Costa Proenca R.P. (2010). Influence of soaking on the nutrition quality of common bean (*Phaseolus vulgaris*) cooked with or without the soaking water: a review. *International Journal of Food Science and Technology* 45:2209-2218.

FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2017). Protein quality evaluation. <http://www.fao.org/ag/humannutrition/35978-02317b979a686a57aa4593304ffc17f06.pdf>

FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2015).

- Perspectivas alimentarias, resúmenes de mercado. <http://www.fao.org/3/b-i4581s.pdf>
- FAO, Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (2013). Carencia de hierro y otras anemias nutricionales. <http://www.fao.org/docrep/006/W0073S/w0073s0h.htm>
- FIRA, Fideicomisos instituidos en relación con la agricultura. (2016). Panorama Agroalimentario, dirección de investigación y evaluación económica y sectorial, frijol. En sitio web: <https://www.fira.gob.mx/Nd/index.jsp>.
- Gallegos-Infante, J. A. Iniesta-González, J.J., Ibarra-Pérez, J.A. Rocha-Guzmán N.E. (2014). Antinutritional factors and antioxidant activity in improved varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris*) Agronomy Journal 44:2.
- Gani, A.; Broadway, A.A.; Ahmad, M.; Ashwar, B.A.; Wani, A.A.; Wani, S.M.; Masoodi, F.A.; Khatkar, B.S. (2015). Effect of Whey and Casein Protein Hydrolysates on Rheological, Textural and Sensory Properties of Cookies. J. Food Sci. Technol. 52(9), 5718–5726.
- Godoy Marrero S, B., Adashi E, Y., Eindem M, D. (2015). Noncommunicable diseases. Thieme; Semin Reprod Med; 33(01): 035-040. DOI: 10.1055/s-0034-1395277
- González, J. J. F., Maldonado, S. H. G., y Hernández, M. G. H. (2015). Nutritional and nutraceutical attribute of loaf and bars made of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) FLOUR. Biotecnia, 17(3), 9-14.
- Guzmán, B., Tenorio, R., Cruz, D. L., Espinal, C., Juan, A., y Mollinedo, P. (2015). from and chenopodium pallidicaule aellen as biocontrollers of phytopathogen fungi and hemolysis agents, 8–14.
- Haghighatdoost, F., Azadbakht, L. (2015). Probiotic soy milk and anthropometric measures : Is probiotic soy milk beyond soy milk . ARYA Atheroscler, 11(5), 265–267.
- Heliodoro, J. C. A., Pivetta, M. R., Pereira, M. S., Zanutto, M. R., Novelli, P. K., Francisco, V. C. B., & Fleuri, L. F. (2018). Applications. Food Control and Biosecurity. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811446-9/00004-6>
- Hutchins, A. M., Winham, D. M., Thompson, S. V. (2012). *Phaseolus* beans: impact on glycaemic response and chronic disease risk in human subjects. The British Journal of Nutrition, 108(2012), S52–65. <https://doi.org/10.1017/S0007114512000761>
- Jiang, L., Wang, J., Li, Y., Wang, Z., Liang, J., Wang, R., Zhang, M. (2014). Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates. FRIN, 62, 595–601. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.022>

- John, K. M. M., & Luthria, D. (2015). Amino Acid , Organic Acid , and Sugar Profiles of 3 Dry Bean (*Phaseolus vulgaris* L .) Varieties, 80(12), 2662–2669. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13115>
- Kakade, M. L., Rackis, J. J., Mcghee, J. E., & Puski, G.(1974). Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: A collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chem.* 51:376
- Khalid, I. I., & Elhardallou, S. B. (2016). Factors That Compromise the Nutritional Value of Cowpea Fluor and Its Protein Isolates. *Food and Nutrition Sciences*, 7(2), 112–121. <https://doi.org/10.4236/fns.2016.72013>
- Koh, G. Y., & Rowling, M. J. (2017). Resistant starch as a novel dietary strategy to maintain kidney health in diabetes mellitus. *Nutrition Reviews*, 75(5), 350–360. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nux006>
- La Frano, M. R., de Moura, F. F., Boy, E., Lönnerdal, B., & Burri, B. J. (2015). Bioavailability of iron, zinc, and provitamin A carotenoids in biofortified staple crops. *Nutrition Reviews*, 72(5), 289–307. <https://doi.org/10.1111/nure.12108>
- Landa-Habana L., Piña-Hernández A., Agama-Acevedo E., Tova J., Bello-Pérez L. A. (2014). Effect of cooking procedures and storage on starch bioavailability in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Foods for Human Nutrition* 59: 133–136.
- Li, Y. Q., Chen, Q., Liu, X. H., & Chen, Z. X. (2008). Inactivation of soybean lipoxygenase in soymilk by pulsed electric fields. *Food Chemistry*, 109(2), 408–414. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.001>
- Liu, Z. S., Chang, S. K. C. (2007). Soymilk viscosity as influenced by heating methods and soybean varieties. *Journal of Food Processing and Preservation*, 31(3), 320–333. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2007.00128.x>
- Lolas, G. m., & P., Markakis. (1977). The phytase o f navy beans (*Phaseolus vulgaris*). *FOOD SCIENCE*, 42(4), 1094–1097.
- Luna-Vital, D. A., Mojica, L., González de Mejía, E., Mendoza, S., & Loarca-Piña, G. (2015). Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. *Food Research International*, 76(P1), 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.024>
- Mateos-Aparicio, I., Mateos-Peinado, C., & Rupérez, P. (2010). High hydrostatic pressure improves the functionality of dietary fibre in okara by-product from soybean. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(3), 445–450. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.02.003>

- Martínez Roldan, C., y Carbajal Azcona, Á. (2012). Componentes bioactivos de los alimentos. *Manual Práctico de Nutrición Y Salud*, 31–36.
- Martínez-Navarrete M., Camacho, M. M., Martí, J. (2002). Iron deficiency and iron fortified foods a review, 35, 225–231. *Food Research International*. S0963-9969(01)00189-2
- Marquezi, M., Gervin, V. M., Watanabe, L. B., Moresco, R., Amante, E. R. (2017). Chemical and functional properties of different common Brazilian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *Brazilian Journal of Food Technology*, 20, 1–9. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.0616>
- Mc Hunh Tara., & Maller Gilles. (2017). How extrusion shepes food processing, Foof technology, July 2017; Vol. 71 No. 7; Advancinf food y health through sound science.
- McQuaid, J. B., Kustka, A. B., Oborník, M., Horák, A., McCrow, J. P., Karas, B. J., Allen, A. E. (2018). Carbonate-sensitive phytoferritin controls high-affinity iron uptake in diatoms. *Nature*, 555(7697), 534–537. <https://doi.org/10.1038/nature25982>
- Mejia, E.G., & Valadez-vega, M.D. (2005). Tannins, Trypsin Inhibitors and Lectin Cytotoxicity in Tepary (*Phaseolus acutifolius*) and Common (*Phaseolus vulgaris*) Beans. *Plant Foods for Human Nutrition*. <https://doi.org/10.1007/s11130-005-6842-0>
- Morales, P., Berrios, J., Varela, A., Burbano, C., Cuadrado, C., Muzquiz, M. & Pedrosa, M.M. (2015).“Novel fiber-rich lentil flours as snack-type functional foods: an extrusion cooking effect on bioactive compounds”. *Journal of Functional Foods*, 6: 3135-3143.
- Morales-de León J. C., Vázquez-Mata N., Torres N., Gil-Zenteno L., B. R. (2007). Preparation and Characterization of Protein Isolate from Fresh and Hardened Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food and Chemical Toxicology*, 72(2), 96–102. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00244.x>
- Mucuna, G. (2013). Assessment of Nutritional and Antinutritional, Tropical and Subtropical Agroecosystems, 16, 155–169.
- Muthukumarappan, K., Swamy, G. J. (2018). Food Microstructure and Its Relationship with Quality and Stability of extruded products. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100764-8.00009-5>
- Nardi, J., Moras, P. B., Koeppe, C., Dallegrave, E., Leal, M. B., y Rossato-Grando, L. G. (2017). Prepubertal subchronic exposure to soy milk and glyphosate leads to endocrine disruption. *Food and Chemical Toxicology*, 100, 247–252.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.12.030>

- Naozuka J., Oliveirab P. V. (2013) Cooking effects on iron and proteins content of beans (*Phaseolus vulgaris L.*) by GF AAS and MALDI-TOF MS. Journal of the Brazilian Chemical Society..23(1):156–162. doi: 10.1590/s0103-50532012000100022
- Nikmaram, N., Ying, S., Koubaa, M., Zhu, Z. (2017). Effect of extrusion on the anti-nutritional factors of food products: An overview. Food Control, 79, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.027>
- NILUFER, D., BOYACIOGLU, D., VODOVOTZ, Y. (2008). Functionality of Soymilk Powder and Its Components in Fresh Soy Bread Introduction, 73(4), 275–281. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00727.x>
- Nogueira, A.C.; Oliveira, R.A.; Steel, C.J. (2018a). Protein Enrichment of Wheat Flour Dough:Empirical Rheology Using Protein Hydrolysates. Food Sci. Technol. 2018, Submitted.
- Nogueira, A. D. C., Steel, C. J. (2018b). Protein enrichment of biscuits: a review. Food Reviews International, 0(0), 1–14. <https://doi.org/10.1080/87559129.2018.1441299>
- NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- NOM-086-SSA1-1994, Bienes y servicios. alimentos y bebidas no alcoholicas con modificaciones en su composicion. especificaciones nutrimentales.
- NOM-247-SSA1-2008. Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Métodos de prueba.
- Nyau, V. (2014). Nutraceutical perspectives and utilization of common beans (African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development, 9483–9496.
- OMS. Organizacion Mundial de la Salud. (2011). Concentraciones de hemoglobina para diagnosticar la anemia y evaluar su gravedad. Vmnis, 11.1, 7. http://doi.org/10.1007/SpringerReference_31774
- OMS Organización mundial de la salud (2016). www.fao.org/fileadmin/pulses2016/docs/factsheets/HealthSPPRINT.pdf
- Ospina, M. M., Sepulveda, J. U., Restrepo, D. A., Cabrera, K. R., y Suárez, H. (2012). Influencia de goma Xantán y goma Guar sobre las propiedades reológicas de leche saborizada con cocoa. Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial, 10(1), 51–59. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v10n1/v10n1a07.pdf>

- Otemuyiwa, I. O., Sanni, A. M., Oyewumi, E. A. (2017). Comparative Study of Starch Characteristics, In-Vitro Starch Digestibility and Glycemic Index of Some Starchy Foods Consumed in Nigeria, *I*(2), 61–70. <https://doi.org/10.22158/fsns.v1n2p61>
- (OPS) Organización Panamericana de la Salud. (2002). Compuestos de hierro para la enriquecimiento de alimentos: Guías para América Latina y el Caribe., 24. Retrieved from [http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2009/Compustos de hierro_Esp.pdf](http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2009/Compustos%20de%20hierro_Esp.pdf)
- Pasricha, S., Drakesmith, H., Black, J., Hipgrave, D., & Biggs, B. (2013). Control of iron deficiency anemia in low- and middle-income countries. *Blood*, 121(14), 2607–2617. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-453522>.
- Pérez, G., Vittori, D., Pregi, N., Garbossa, G., & Nesse, A. (2005). Homeostasis of iron. Mechanisms of absorption, cellular uptake and regulation. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, 39(3), 301–314.
- Prather, T. A., Miller, D. D. (1992). Calcium carbonate depresses iron bioavailability in rats more than calcium sulfate or sodium carbonate. *The Journal of Nutrition*, 122(2), 327–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1732473>
- Raes, K., Knockaert, D., Struijs., K., Van Camp, J. (2014). Role of processing on bioaccessibility of minerals: Influence of localization of minerals and antinutritional factors in the plant. *Trends in Food Science and Technology*, 37(1), 32-41.
- Ramírez-Jiménez, A. K., Reynoso-Camacho, R., Tejero, M. E., León-Galván, F., & Loarca-Piña, G. (2015). Potential role of bioactive compounds of *Phaseolus vulgaris* L. on lipid-lowering mechanisms. *Food Research International*, 76(P1), 92–104. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.002>
- Ramírez-Jiménez, A., Reynoso-Camacho, R., Mendoza-Díaz, S., & Loarca-Piña, G. (2014). Functional and technological potential of dehydrated *Phaseolus vulgaris* L. flours *Food Chemistry*. 161, 251-260. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.008>
- Rebellato A. P., Lima C. J., Siqueira S. J., Steel J.C., Lima P.J.A. (2017). Mineral bioaccessibility in French breads fortified with different forms iron and its effects on rheological and technological parameters. *Journal of Cereal Science*, 74, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.01.020>
- Reddy, C. K., Suriya, M., & Haripriya, S. (2013). Physico-chemical and functional properties of Resistant starch prepared from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris* . L) starch by enzymatic method. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 220–226. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.060>
- Reglero, G. (2011). Nuevos alimentos, alimentos funcionales y nutracéuticos. *Nutrición*,

salud y alimentos funcionales. Sección de cardiología preventiva y rehabilitación, Sociedad española de cardiología, publicación oficial; Cap1. pp: 5,6,7.

- Reynoso-Camacho, R., González De Mejía, E., & Loarca-Piña, G. (2003). Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). *Food and Chemical Toxicology*, *41*(1), 21–27. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00215-6](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00215-6)
- Robin, A. C., Marshall, D. J., Schultheis, M., Reylé, C. (2012). Stellar populations in the Milky Way bulge region: towards solving the Galactic bulge and bar shapes using 2MASS data. *Astronomy & Astrophysics*, *538*, A106. <https://doi.org/10.1051/0004-6361/201116512>
- Rui, X., Boye, J. I., Ribereau, S., Simpson, B. K., & Prasher, S. O. (2011). Comparative study of the composition and thermal properties of protein isolates prepared from nine *Phaseolus vulgaris* legume varieties. *Food Research International*, *44*(8), 2497–2504. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.008>
- SAGARPA, Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. (2018) Planación agrícola nacional 2017-2030. Primera edición, México, México.
- SAGARPA, Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. (2015) <http://snics.sagarpa.gob.mx/BasicoseIndustrial/Frijol/Generalidades.aspx>
- Sathe, S. K., Desphande, S. S. & Salunkhe, D. K. (1982). Functional properties of lupin protein concentrates. *Journal of Food Science* *47*: 491-497.
- Seth, D., Badwaik, L.S., Ganapathy, V., (2015). Effect of feed composition, moisture content and extrusion temperature on extrudate characteristics of yam-corn-rice based snack food. *J. Food Sci. Technol.* *52* (3), 1830-1838.
- Shi, L., Arntfield, S. D., Nickerson, M. (2017). Changes in levels of phytic acid, lectins and oxalates during soaking and cooking of Canadian pulses. *PT US CR. Food Research International*, volume 107, 660-668. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.056>
- SIAP, Servicio de información agroalimentaria y pesquera. (2016). Panorama agroalimentario, dirección de investigación y evaluación económica y sectorial https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/61950/Panorama_Agroalimentario_Frijol_2015.pdf
- Siong TE, Chao KS, S. S. (1989). Determination of Iron in Foods by the Atomic Absorption Spectrophotometric and Colorimetric Methods. *Pertanika*, *12*(3), 313–322.
- Sözgen, K., Tütem, E., Akyüz, E., Özen, S. (2016). Talanta Spectrophotometric total reducing sugars assay based on cupric reduction, *147*, 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.09.049>

- Stephen, A. M., Champ, M. M., Cloran, S. J., Fleith, M., Lieshout, L. Van, Mejbourn, H., Burley, V. J. (2018). Dietary fibre in Europe : current state of knowledge on definitions , sources , recommendations , intakes and relationships to health Nutrition Research Reviews Nutrition Research Reviews. <https://doi.org/10.1017/S095442241700004X>
- Suárez-Martínez, S. E., Ferriz-martínez, R. A., Campos-vega, R., Elton-puente, J. E., De, K., Carbot, T. (2016). Bean seeds : leading nutraceutical source for human health Semillas del frijol : fuente líder de nutraceuticos para la salud humana, F. De Química, 14(1), 131–137.
- Sunwinchemicals (2017). Fumarato ferroso. Aditivos nutritivos, Aditivos Alimentarios, Ingredientes Farmacéuticos Activos, Fabricante farmacéutico. <http://sunwinchemicals.es/3-2-ferrous-fumarate.html>
- Taylor, P., & Arêas, J. A. G. (2013). Critical Reviews in Food Science and Nutrition Extrusion of Food Proteins, 37–41. <https://doi.org/10.1080/10408399209527604>
- Theil C. Elizabeth. (2011). Iron Homeostasis and Nutritional. Iron Deficiency. The Journal of Nutrition, 1, 724S. <https://doi.org/doi:10.3945/jn.110.127639>.
- Tostado Madrid, T., Benítez Ruiz, I., Pinzón Navarro, A., Bautista Silva, M., & Ramírez Mayans, J. A. (2015). Actualidades de las características del hierro y su uso en pediatría. *Acta Pediatrica de Mexico*, 36(3), 189–200. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84930811717partnerID=tZOtx3y1>
- Topping, D.L., Fukushima M., Bird A.R. (2003) Resistant starch as a prebiotic and symbiotic: state of the art. Proceeding of the Nutrition Society 62, 171-176. DOI:10.1079/PNS2002224.
- Ulloa J. A., Rosas M. P., Ramírez J. J. C., Ulloa R. B. E. (2011). Physicochemical characteristics of instant whole bean (*Phaseolus vulgaris*) produced by drying at room temperature. Book of Abstract. IFT Annual Meeting and Food Expo. New Orleans, Louisiana, USA.. P. 42
- USDA (2011). National Nutrient Database for Standard Reference Release 27. Agricultural Research Service. National Agricultural Library. Retrieved from <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods>
- Valle-Vega, P., Lucas-Florentino, B. (2000). Toxicología de alimentos. México, DF: Instituto Nacional de Salud Pública. Centro Nacional de Salud Ambiental. Retrieved from <http://cetis59.com/biblioteca/toxicologia.pdf>
- Valentine I. Kefeli., Maria V. K., Bruno B. (2013). Phenolic cycle in plants and

environment. *Journal of Cell and Molecular Biology* 2:13-18. Halic University, printed in Turkey

- Varzakas, T., Zakyntinos, G., & Verpoort, F. (2016). Plant Food Residues as a Source of Nutraceuticals and Functional Foods. *Foods*, 5(4), 88. <https://doi.org/10.3390/foods5040088>
- Velasco-González O., Martin-Martínez, E.S., Aguiar-Méndez, M., Pajarito-Ravelero, A. Mora-Escobedo, R. (2013). PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL GRANO DE diferentes Variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris L.*), D. E. F, 25(3), 161–166.
- Vesanto, M., Winston, C., & Levin, S. (2016). Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Vegetarian Diets. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 116(12), 1970–1980. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2016.09.025>
- Wani, S. A., Kumar, P. (2016). Effect of extrusion on the nutritional , antioxidant and microstructural characteristics of nutritionally enriched snacks, 40, 166–173. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12593>
- Yao, Y., Hu, Y., Zhu, Y., Gao, Y., Ren, G. (2015). Comparisons of phaseolin type and α - amylase inhibitor in common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) in China. *ScienceDirect CJ*, 4(1), 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2015.09.002>
- Yu, Y., Kovacevic, Z., Richardson, D. R., & Richardson, D. R. (2017). Tuning Cell Cycle Regulation With an Iron Key ND SC, 4101(April). <https://doi.org/10.4161/cc.6.16.4603>
- Yuliana, M., Thanh, C., Huong, L., Phong, Q., Ju, Y. (2014). Isolation and characterization of protein isolated from defatted cashew nut shell: Influence of pH and NaCl on solubility and functional properties. *LWT - Food Science and Technology*, 55(2), 621–626. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.022>
- Zarei, M., y Kafilzadeh, F. (2013). Effects of using radiation processing in nutrition science and their restriction: A review. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*. Volume 1, Issue 3, Pages 222-231.
- Zhang, G., Hamaker, B. R. (2017). The nutritional property of endosperm starch and its contribution to the health benefits of whole grain foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(18), 3807–3817.
- Zhao, J., Bradfield, J. P., Zhang, H., Sleiman, P. M., Kim, C. E., Glessner, J. T., Grant, S. F. A. (2011). Role of BMI-Associated Loci Identified in GWAS Meta-Analyses in the Context of Common Childhood Obesity in European Americans. *Obesity*, 19(12), 2436–2439. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.237>

|

“Labor Vincit Omnia”