



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

“Propiedades de gelificación de una mezcla de aislados proteicos vegetales con contenido de aminoácidos para cubrir los requerimientos de adultos mayores”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta

Ana Lourdes Arceo Tirado

Dirigido por:

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

Querétaro, Qro. a Mayo 2022



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Propiedades de gelificación de una mezcla de aislados proteicos vegetales con contenido de aminoácidos para cubrir los requerimientos de adultos mayores”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta

Ana Lourdes Arceo Tirado

Dirigido por:

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

Presidente

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

Secretario

Dra. Rocío Campos Vega

Vocal

Dra. Marcela Gaytán Martínez

Suplente

Dra. Diana Karina Baigts Allende

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro,

Fecha de aprobación por el Consejo Universitario Junio, 2020

México

## DEDICATORIA

### *A Dios*

*Porque cuando por años perdí la fe por ti, jamás me soltaste. Gracias por guiarme y darme la fuerza cuando más la necesitaba, por ofrecerme la oportunidad de volver a ti durante este trayecto tan difícil.*

### *A mi querido ángel*

*Se que intercediste incontables veces por mí. Te amo y te extraño abuelo.*

### *A mi enorme e incondicional familia*

*A mi mamá Ana, mi mamá Mari, mi papá Jorge, mi abuela Lulu, mi abuela Gila, mi abuelo Jorge, a mi adorado hermano, a mis primos, a mi tía Lorena, mi tía Karina, mi tío Eduardo, mi tío Ernesto, mi tío Memo, mi tía Gisela, mi tía Germaine... Y aquellos tíos que son como de la familia, mi tía madrina, mi tío padrino y mi tía Myra. Gracias a todos por su apoyo e impulso, porque a su modo, cada uno me dio palabras de aliento para sacar adelante este proyecto.*

### *A mis amigos*

*A mis amigas Edith, Pau y Jacky por estar siempre en las buenas y las malas. A mi querido Gabriel por ser ese amigo incondicional de años, sin importar la distancia.*

### *A mi papá Greg*

*Sin ti nada de esto hubiese podido ser. Crees en mí y día con día me das la oportunidad de poder ser más en la vida. Agradezco al destino y a Dios por ponerte en nuestros caminos. Que la vida nos conceda más tiempo juntos para poder seguirte haciendo sentir orgulloso.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento otorgado a mi persona, y a la Universidad Autónoma de Querétaro por acogerme como mi segunda alma mater a lo largo de mi trayecto estudiantil.

A la Dra. Sandra por la oportunidad de formar parte de su equipo, por aconsejarme en los momentos más difíciles e impulsarme a siempre dar un poco más. Como académica y persona es usted un ejemplo a seguir.

A la Dra. Flavia mi tutora, por impulsarme a buscar ayuda, por siempre estar pendiente de mi persona más allá de lo estudiantil, por su empatía y su consejo. Por enseñarme que la salud mental es una prioridad.

A la Dra. Marcela por su paciencia y constante guía a lo largo de este proyecto, por su amabilidad y sus ganas por transmitir sus conocimientos. Sin su guía y la disposición para hacer uso del equipo hubiese sido difícil darle una orientación a este proyecto.

A la Dra. Rocío y la Dra. Diana por sus aportaciones y constantes palabras de apoyo, por su empatía a lo largo de estos años de pandemia.

A la Dra. Elisa por su constante apoyo. Es un orgullo haber trabajado con la nueva generación de Doctores. Admiro su profundo amor por la enseñanza.

Al Ing. Saúl Vizcarra por siempre darme palabras de aliento para iniciar este proyecto y por su gran cariño y amistad.

A mis compañeros de laboratorio, Mta. Raquel, Mto. Adolfo y Mta. Carmen por su guía y consejos. Especial agradecimiento a mis increíbles amigos en esta aventura Daniel, Abel, Dr. Juan, Mta. Vane y Sam, sin ustedes simplemente no hubiera podido mantenerme en pie.

A mi estimada Carmelita, siempre tan amable y atenta, así como al resto de los administrativos por su ardua labor.

## RESUMEN

En los años recientes, ha surgido suficiente evidencia científica para sugerir que la ingesta proteica diaria actual en adultos mayores es ineficiente a causa de factores inherentes a la edad; como lo son el catabolismo proteico, dificultades en el proceso de deglución y digestión, entre otras. Es necesario considerar un incremento en el requerimiento proteico, alcanzando entre 1.2 a 1.5 g/kg/día y que, con las tendencias hacia un mayor consumo de proteína vegetal por cuestiones medioambientales, o incluso por indicaciones médicas, abre el panorama para la formulación de productos innovadores que cumplan con tales fines. El objetivo de este trabajo fue elaborar un hidrogel a partir de aislados proteicos de chícharo (APC) (*Pisum sativum*), frijol común (APF) (*Phaseolus vulgaris*) y amaranto (APA) (*Amaranthus hypochondriacus*) que contribuya a alcanzar los requerimientos proteicos y de aminoácidos del adulto mayor. La mayor pureza proteica fue la de APC (81.72%), seguida por APA (74.19%) y APF (68.28%); mientras que la solubilidad a pH=7 se presentó en el orden APA>APF>APC, atribuyendo dicho comportamiento al tratamiento térmico sometido durante el procesamiento de APC y al proceso de agregación proteica. La hidrofobicidad tuvo un comportamiento inverso a la solubilidad. Se trabajó una mezcla 50:35:15% de aislados proteicos de chícharo, amaranto y frijol. De acuerdo con el análisis de aminoácidos, la mezcla tiene un elevado contenido de fenilalanina y valina, y un bajo contenido de lisina, metionina y cisteína; el contenido de aminoácidos totales fue de 42.76 g/100 g de proteína en la mezcla, mayor a lo planteado en la literatura. La mezcla se sometió a tres tratamientos térmicos: calentamiento convencional (MCC), calentamiento óhmico a 30 V (MCO30) y calentamiento óhmico a 40 V (MCO40). Se utilizó como control la mezcla sin calentamiento (MSC). El análisis FTIR y DSC de los diferentes tratamientos mostraron resultados similares. Se puede concluir que el tratamiento térmico tuvo un mayor impacto en el orden MCO40<MCC<MCO30, generando un elevado contenido de estructuras  $\beta$  (hoja  $\beta$  38.10% y giro  $\beta$  42.51%), atribuibles al proceso de agregación, así como un mayor valor  $T_d$  (159.12°C) y entalpía (6.6937 J/g) como resultado de las proteínas rezagadas del proceso de calentamiento.

Palabras clave: Aislado proteico, chícharo, frijol común, amaranto, hidrogel

## ABSTRACT

In recent years, has emerged enough scientific evidence to suggest that current daily protein intake in older adults is inefficient due to different age-related factors, such as protein catabolism, difficulties in the swallowing and digestion process, among others. It is necessary to consider an increase in the protein requirement, reaching between 1.2 to 1.5 g/kg/day, also considering the trends towards greater consumption of vegetable protein for environmental reasons, or even for medical indications. It opens the panorama to the development of innovative products that meet such goals. The objective of this work was to elaborate a hydrogel from protein isolates from pea (PPI) (*Pisum sativum*), common bean (BPI) (*Phaseolus vulgaris*), and amaranth (API) (*Amaranthus hypochondriacus*) that contributes to reaching the protein and amino acids requirements in the elderly. The highest protein purity was from PPI (81.72%), followed by API (74.19%) and BPI (68.28%); the solubility at pH=7 was better in the order API>BPI>PPI, attributing this behavior to the thermal treatment undergone during the processing of PPI and the subsequent protein aggregation phenomena. The hydrophobicity had an inverse behavior to the solubility. A 50:35:15% mixture of protein isolates from pea, amaranth, and bean was established. According to amino acid analysis, the mixture is high in phenylalanine and valine, and low in lysine, methionine, and cysteine; the total amino acid content was 42.76 g/100 g of protein in the mixture, higher than suggested by the literature. The mixture was subjected to three thermal treatments: conventional heating (MCH), ohmic heating at 30 v (MOH30), and ohmic heating at 40 v (MOH40). The mixture without heating (MWH) was used as a control. FTIR and DSC analysis of the different treatments showed similar results. Can be suggested that thermal treatment had a greater impact in the order mco40>mcc>mco30. A higher content of  $\beta$ -structures ( $\beta$ -sheet 38.10% and  $\beta$ -turn 42.51%) were evidenced, attributable to the aggregation phenomena, as well as a higher  $t_d$  (159.12°C) and enthalpy (6.6937 J/g) value, as a result of straggling proteins from the heating process.

Keywords: Protein isolates, pea, bean, amaranth, hydrogel

## **DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DEL ESTUDIANTE**

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que incluí los detalles metodológicos necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se desarrolló y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.



---

**Ana Lourdes Arceo Tirado**

**Nombre y firma del estudiante**

## ÍNDICE GENERAL

<b>DEDICATORIA</b>	<b>I</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>II</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>X</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>XI</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Envejecimiento y sus consecuencias</b>	<b>3</b>
2.1.1 Envejecimiento y desarrollo de disfagia	3
2.1.2 Envejecimiento y desarrollo de sarcopenia	5
2.1.3 Envejecimiento y desarrollo de malnutrición	6
<b>2.2 Ingesta proteica recomendada en el adulto mayor sano y enfermo</b>	<b>7</b>
2.2.1 Ingesta de aminoácidos recomendada en el adulto mayor sano	8
2.2.1.1 Leucina y la síntesis de masa muscular durante la vejez	10
2.2.2 Estudios de interés sobre el metabolismo proteico	11
<b>2.3 Tendencias actuales en los patrones dietéticos</b>	<b>13</b>
2.3.1. Proteína animal vs proteína vegetal	13
<b>2. 4. Amaranto (<i>Amaranthus hypochondriacus</i>)</b>	<b>14</b>
2.4.1. Generalidades	14
2.4.2. Contenido proteico	15
2.4.2.1. Aislado proteico de amaranto	16
2.4.2.2. Composición de aminoácidos en amaranto y aislado proteico	17
<b>2. 5. Chícharo (<i>Pisum sativum</i>)</b>	<b>18</b>
2.5.1. Generalidades	18
2.5.2. Contenido proteico	18
2.5.2.1. Aislado proteico de chícharo	19
2.5.2.2. Composición de aminoácidos en chícharo y aislado proteico	20
<b>2.6. Frijol (<i>Phaseolus vulgaris L.</i>)</b>	<b>21</b>
	VI



2.6.1	Generalidades	21
2.6.2	México y el consumo de frijol	21
2.6.3	Variedad pinto saltillo	21
2.6.4	Contenido proteico	22
2.6.4.1.	Aislado proteico de frijol variedad pinto saltillo	22
2.6.4.2.	Contenido de aminoácidos en harina de frijol pinto saltillo	23
	<b>2.7 Importancia del tratamiento térmico</b>	<b>24</b>
2.7.1	Tratamientos térmicos convencionales	24
2.7.1.1	Cocción como tratamiento térmico para el frijol	25
2.7.1.2	Extrusión como método térmico	25
2.7.1.3	Extrusión como tratamiento térmico en aislados	26
2.7.2	Calentamiento óhmico	27
2.7.2.1	Calentamiento óhmico en alimentos	29
	<b>2.8 Hidrogeles</b>	<b>30</b>
	<b>2.9 Papillas</b>	<b>32</b>
3.	<b><i>JUSTIFICACIÓN</i></b>	<b>34</b>
4.	<b><i>OBJETIVOS</i></b>	<b>35</b>
	<b>4.1 Objetivo General</b>	<b>35</b>
	<b>4.2 Objetivo Específico</b>	<b>35</b>
5.	<b><i>MATERIALES Y METODOLOGÍA</i></b>	<b>36</b>
	<b>5.1 Estrategia experimental</b>	<b>36</b>
5.1.1	Fase experimental #1	36
5.1.2	Fase experimental #2	36
5.1.3	Fase experimental #3	38
	<b>5.2 Materiales</b>	<b>40</b>
	<b>5.3 Proceso de obtención del aislado proteico de frijol</b>	<b>40</b>
	<b>5.4 Proceso de obtención del aislado proteico de amaranto</b>	<b>41</b>
5.4.1	Preparación de la harina de amaranto (HEA)	41
5.4.2	Obtención del aislado proteico de amaranto (APA)	41
	<b>5.5 Determinación de contenido de proteína en aislados</b>	<b>42</b>
	<b>5.6 Propiedades fisicoquímicas de los aislados proteicos</b>	<b>42</b>

5.6.1 Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)	42
5.6.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	42
5.6.3 Calorimetría diferencia de barrido (DSC)	43
<b>5.7 Perfil de solubilidad</b>	<b>43</b>
<b>5.8 Hidrofobicidad (<math>H_0</math>)</b>	<b>44</b>
<b>5.9 Color</b>	<b>44</b>
<b>5.10 Formulación de las mezclas</b>	<b>44</b>
<b>5.11 Composición proximal y contenido de aminoácidos totales de la mezcla</b>	<b>45</b>
<b>5.12 Evaluación de calentamiento tradicional y óhmico sobre capacidad gelificante</b>	<b>46</b>
5.12.1 Calentamiento convencional	46
5.12.2 Ensayos de conductividad	47
5.12.3 Calentamiento óhmico	48
<b>5.13 Caracterización fisicoquímica de la mezcla de aislados, previo y posterior a los tratamientos</b>	<b>48</b>
<b>5.14 Análisis estadístico</b>	<b>49</b>
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>50</b>
<b>6.1 Resultados fase experimental #1</b>	<b>50</b>
<b>6.2 Caracterización de aislados de proteína</b>	<b>50</b>
6.2.1 Rendimiento y pureza de los aislados	50
6.2.2 Composición proximal de los aislados	51
6.2.3 Análisis de la estructura de los aislados proteicos	52
6.2.4 Solubilidad de los aislados proteicos	61
6.2.5 Hidrofobicidad ( $H_0$ )	62
6.2.6 Color	64
<b>6.3 Resultados fase experimental #2</b>	<b>67</b>
6.3.1 Electroforesis desnaturalizante de los aislados con y sin tratamiento térmico	67
6.3.2 Solubilidad de los aislados con y sin tratamiento térmico	69
<b>6.5 Resultados fase experimental #3</b>	<b>71</b>
6.5.1 Composición proximal y contenido de aminoácidos totales de la mezcla	71
6.5.2 Resultados de ensayos de conductividad	73
6.5.3 Selección del agente reticulante	74

6.5.4 Selección de la concentración de sales	74
6.5.6 Ensayo final y conclusiones parciales	75
<b>6.6 Resultados fase experimental #4</b>	<b>76</b>
6.6.1 FTIR de los diferentes tratamientos de gelificación	76
6.6.2 DSC de los diferentes tratamientos de gelificación	78
<b>7. CONCLUSIÓN</b>	<b>82</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>85</b>
<b>9. ANEXOS</b>	<b>104</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Recomendación de ingesta total de aminoácidos en mg/kg de peso/día. (Modificado de: FAO/OMS/ONU, 1985). .....	9
<b>Tabla 2.</b> Resumen de los requerimientos de aminoácidos en el adulto (Modificado de: FAO/OMS/ONU, 2007). .....	10
<b>Tabla 3.</b> Contenido de aminoácidos en harina de amaranto en crudo y harina sometida a tratamiento térmico en g/100 g de proteína. (Modificado de: Písaříková et al., 2005). .....	17
<b>Tabla 4.</b> Composición de aminoácidos de harina, concentrado y aislado proteico de chícharo ( <i>Pisum sativum</i> ) en g/100 g de producto. (Modificado de: Tomoskozi et al., 2001). .....	20
<b>Tabla 5.</b> Composición de aminoácidos en harina de frijol variedad pinto ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) en g/100 g de proteína (Modificado de: Albarracín et al., 2010). .....	23
<b>Tabla 6.</b> Contenido tentativo de aminoácidos esenciales en mezclas de aislados proteicos en presentación de 100 y 15 g. ....	45
<b>Tabla 7.</b> Mediciones y cálculos para establecer factor geométrico. ....	47
<b>Tabla 8.</b> Análisis proximal de los aislados de frijol, chícharo y amaranto. ....	52
<b>Tabla 9.</b> Estructura secundaria de los aislados (pH=7) por deconvolución del espectro FTIR. ....	57
<b>Tabla 10.</b> Temperatura y entalpía de desnaturalización de los aislados proteicos. ....	58
<b>Tabla 11.</b> Parámetros de color de los diferentes aislados proteicos. ....	67
<b>Tabla 12.</b> Composición química de la mezcla de aislados proteicos. ....	71
<b>Tabla 13.</b> Composición de aminoácidos de la mezcla acorde a la literatura contra el real. 72	
<b>Tabla 14.</b> Conductividad inicial y final de los diferentes voltajes utilizados en estudios preliminares. ....	73
<b>Tabla 15.</b> Parámetros obtenidos de los diferentes voltajes utilizados en estudios preliminares. ....	74
<b>Tabla 16.</b> Estructura secundaria de las mezclas sin y con tratamiento térmico por deconvolución del espectro FTIR. ....	78
<b>Tabla 17.</b> Temperatura de desnaturalización y entalpía de las mezclas sin y con tratamiento térmico. ....	79

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama esquemático que ilustra el principio de calentamiento óhmico (Extraído de: Sakr & Liu, 2014).....	28
<b>Figura 2.</b> Diagrama de fase experimental #1. Previa cocción de las semillas de frijol para obtención de APF. ....	36
<b>Figura 3</b> Diagrama de fase experimental #2. Obtención de APF y procesamiento con CO. ....	37
<b>Figura 4.</b> Diagrama de fase experimental #3. Desarrollo de hidrogeles por el método de cold-set a pH 7 y adición de CaCl <sub>2</sub> 15 mM. ....	38
<b>Figura 5.</b> Diagrama de proceso de elaboración de las suspensiones al 15%. ....	39
<b>Figura 6.</b> Diagrama de análisis a aislados, mezcla y geles. ....	39
<b>Figura 7.</b> Procesamiento de aislado proteico de frijol a partir de sus harinas. Figura A: Harina tamizada; Figura B: Harina sin tamizar; Figura C: Residuos de fibra; Figura D: Aislado proteico de frijol liofilizado.....	40
<b>Figura 8.</b> Patrón electroforético de APF. Figura A: Patrón con peso molecular; Figura B: Patrón sin peso molecular. (MM) Marcador de peso molecular, (APF +) Aislado proteico de frijol con 2-ME, (APF -) Aislado proteico de frijol sin 2-ME. ....	53
<b>Figura 9.</b> Patrón electroforético de APA. Figura A: Patrón con peso molecular; Figura B: Patrón sin peso molecular. (MM) Marcador de peso molecular, (APA +) Aislado proteico de amaranto con 2-ME, (APA -) Aislado proteico de amaranto sin 2-ME. ....	54
<b>Figura 10.</b> Patrón electroforético de APC. Figura A: Patrón con peso molecular; Figura B: Patrón sin peso molecular. (MM) Marcador de peso molecular, (APC +) Aislado proteico de chícharo con 2-ME, (APC -) Aislado proteico de chícharo sin 2-ME. ....	55
<b>Figura 11.</b> Espectro FTIR de APF y APC. ....	56
<b>Figura 12.</b> Termograma de APF. ....	59
<b>Figura 13.</b> Termograma de APA. ....	60
<b>Figura 14.</b> Termograma de APC. ....	61
<b>Figura 15.</b> Solubilidad de APC y APF. ....	62
<b>Figura 16.</b> Solubilidad e hidrofobicidad superficial de APC y APC a pH 7. ....	63

<b>Figura 17.</b> Pigmentación de APF acorde a los resultados de parámetros colorimétricos. Figura A: Color en fondo negro; Figura B: Color en fondo blanco. ....	65
<b>Figura 18.</b> Pigmentación de APC acorde a los resultados de parámetros colorimétricos. Figura A: Color en fondo negro; Figura B: Color en fondo blanco. ....	65
<b>Figura 19.</b> Pigmentación de APA acorde a los resultados de parámetros colorimétricos. Figura A: Color en fondo negro; Figura B: Color en fondo blanco. ....	66
<b>Figura 20.</b> Patrón electroforético de APF. Figura A: Patrón con peso molecular; Figura B: Patrón sin peso molecular. (MM) Marcador de peso molecular, (APF +) Aislado con 2-ME, (APF -) Aislado sin 2-ME, (APFCO +) Aislado con CO con 2-ME, (APFCO -) Aislado con CO sin 2-ME.....	68
<b>Figura 21.</b> Patrón electroforético de APA y APACO. Figura A: Patrón con peso molecular; Figura B: Patrón sin peso molecular. (MM) Marcador de peso molecular, (APA +) Aislado con 2-ME, (APA -) Aislado sin 2-ME, (APACO +) Aislado con CO con 2-ME, (APACO -) Aislado con CO sin 2-ME. ....	69
<b>Figura 22.</b> Solubilidad de APF y APFCO a diferentes pH.....	70
<b>Figura 23.</b> Solubilidad de APA y APACO a diferentes pH. Figura A: Solubilidad reportada para APA (Extraído de: Cortez-Trejo et al., 2021); Figura B: Solubilidad obtenida de APACO.....	70
<b>Figura 24.</b> Adición de GDL y CaCl <sub>2</sub> en suspensiones previamente calentadas. ....	74
<b>Figura 25.</b> Adición de CaCl <sub>2</sub> a diferentes concentraciones en suspensiones previamente calentadas por calentamiento convencional. ....	75
<b>Figura 26.</b> Producto tipo papilla obtenido posterior a calentamiento convencional, adición de sales y refrigeración. ....	76
<b>Figura 27.</b> Tratamientos seleccionados para el desarrollo de los geles. Figura A: Muestra sin calentamiento (MSC); Figura B: Muestra con calentamiento convencional (MCC); Figura C: Muestra con calentamiento óhmico a 30 V (MCO30); Figura D: Muestra con calentamiento óhmico a 40 V (MCO40).....	76
<b>Figura 28.</b> Espectro FTIR de las mezclas sin y con tratamiento térmico. ....	77
<b>Figura 29.</b> Termograma de MSC.....	80
<b>Figura 30.</b> Termograma de MCC. ....	80

<b>Figura 31.</b> Termograma de MCO30.....	81
<b>Figura 32.</b> Termograma de MCO40.....	81
<b>Figura 33.</b> Curva de calibración de BSA (albumina de suero bovino) en agua destilada para determinación de proteína por el método de Bradford.....	104
<b>Figura 34.</b> Deconvolución de APC con bandas características.....	104
<b>Figura 35.</b> Deconvolución de APF con bandas características.....	105
<b>Figura 36.</b> Deconvolución de MSC con bandas características.....	105
<b>Figura 37.</b> Deconvolución de MCC con bandas características.....	106
<b>Figura 38.</b> Deconvolución de M30 con bandas características.....	106
<b>Figura 39.</b> Deconvolución de M40 con bandas características.....	107

## 1. INTRODUCCIÓN

Con el pasar de los años, en países en vías de desarrollo y desarrollados, se ha visto un incremento del segmento de la población denominada como adultos mayores (Wellman, 2009). En México, se define como adulto mayor al individuo mayor de 60 años (PENSIONISSSTE, 2017), definición que puede variar de un país a otro. Acorde a datos arrojados por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en México el año 2015, 12.5 millones de adultos (10.5% de la población) se encontraban por arriba de los 60 años (INEGI, 2015). Para el 2030 se espera que esta población alcance los 22.2 millones y para mitad del siglo los 36.2 millones (Zúñiga & Vega, 2004). Entre las principales consecuencias del envejecimiento destacan el aumento en la dependencia del individuo relacionado con el cuidado de su salud y la disminución en la funcionalidad motora (Rodríguez-Tadeo *et al.*, 2012).

Durante el envejecimiento ocurren numerosos cambios psicosociales y fisiológicos que impactan en el estado nutricional del individuo. Dentro de los principales cambios fisiológicos y anatómicos que suceden durante este proceso, destaca la pérdida paulatina de la función oral. Dicha función abarca la masticación, salivación y deglución. A su vez, pueden presentarse otras situaciones como la pérdida de piezas dentales y la alteración o disminución en el discernimiento del sabor en alimentos y bebidas. Todas estas alteraciones se encuentran relacionadas con el uso de determinados fármacos, presencia de neuropatías, neoplasias, trastornos del tubo digestivo o endocrinos, enfermedades crónico-degenerativas, dificultad de movimiento y limitaciones económicas, entre otras, que comprometen la ingesta de alimentos en el adulto mayor (Guerrero-García *et al.*, 2015).

Otra consecuencia inevitable del envejecimiento es la disminución gradual de la masa muscular acompañada de la reducción en la fuerza física y ciertas capacidades motoras. Dicha condición no es exclusiva de individuos sedentarios y su deterioro inicia a partir de los 30 años, siendo perceptible en el individuo a partir de 40-50 años. Este deterioro resulta alarmante no solo por el hecho de que el músculo se encuentra implicado en la ejecución de



cualquier tipo de actividad física, también entre sus roles principales destacan el metabolismo proteico y el mantenimiento de un estado de salud óptimo (Houchins *et al.*, 2016).

En la actualidad, la recomendación de consumo proteico resulta mayor en contraste a las directrices de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés) y varía dependiendo del autor. Mientras algunos sugieren un consumo de 1.2-1.5 g/kg/día en adultos mayores enfermos con o sin riesgo a malnutrición (Vasse *et al.*, 2018); otros establecen rangos distintos acordes a la situación metabólica por la que cruza el individuo: 1.0-1.2 g/kg/día para el mantenimiento de la masa muscular y su funcionalidad, 1.2 g/kg/día para individuos activos y de 1.2-1.5 g/kg/día en pacientes con padecimientos específicos (Houchins *et al.*, 2016).

Recientemente, el impacto ambiental negativo asociado a la producción a escala de proteína animal ha promovido la tendencia a un mayor consumo de proteína vegetal. Dado que los requerimientos proteicos durante la vejez son elevados en contraste con lo indicado por la ingesta diaria recomendada (RDA por sus siglas en inglés) y considerando los esfuerzos actuales por implementar dietas que generen un beneficio ambiental, surge la necesidad de establecer mayor investigación en pro de comprender la forma en que estos nuevos patrones dietéticos pueden llegar a impactar en el estado nutricional de los adultos mayores (Houchins *et al.*, 2016).

Es por esta razón que el presente proyecto tiene como objetivo el desarrollo de un producto tipo papilla que parta de una mezcla de aislados proteicos vegetales, utilizando cultivos de importancia en México como lo son el chícharo (*Pisum sativum*), frijol común variedad pinto saltillo (*Phaseolus vulgaris*) y amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). Los aislados proteicos de frijol y amaranto se elaboraron a partir de sus harinas y en conjunto con un aislado proteico comercial de chícharo, se estableció una mezcla en base a su contenido de aminoácidos de los reportes existentes en la literatura, misma que fue sometida a tres diferentes tratamientos térmicos y cuya composición química y de aminoácidos fue analizada, con la finalidad de proponer el desarrollo de un producto apto para el consumo del adulto mayor.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Envejecimiento y sus consecuencias

En Estados Unidos se define como adulto mayor al individuo de 65 años o mayor (Wellman, 2009). Por su parte, las Naciones Unidas consideran como adulto mayor a toda aquella persona que supera los 65 años en países desarrollados y de 60 años en países en desarrollo (Quintanar, 2010)

Durante el proceso de envejecimiento, se da una marcada disminución en la masa muscular y tejido conectivo que conlleva a una pérdida gradual de la fuerza y el rango de movimiento del individuo, dicha condición se denomina sarcopenia y es considerado un importante desencadenante de síndrome de fragilidad y deterioro funcional (Godínez-Escobar *et al.*, 2020). En conjunto, todos estos cambios fisiológicos y anatómicos reducen la eficacia y eficiencia con la que fluye el proceso de deglución de los alimentos a través del tracto aerodigestivo superior. La comida requiere de mayor tiempo de residencia en la cavidad oral, y el tránsito del material a través del tubo digestivo resulta más lento. Con el tiempo, todos estos cambios graduales pero acumulativos dan paso a problemas más serios, como lo es el incremento en la frecuencia con la que el alimento penetra en la vía respiratoria superior al momento de la deglución y generar una acumulación de residuos posterior a las comidas (Sura *et al.*, 2012).

#### 2.1.1 Envejecimiento y desarrollo de disfagia

Fisiopatológicamente, se le conoce como disfagia a cualquier desorden relacionado con el proceso de deglución. Esta patología se asocia a un mayor riesgo de padecer un estado nutricional deficiente, debido a que la función oral se encuentra comprometida para llevar a cabo la ingesta habitual de alimentos y bebidas. El origen de esta alteración se encuentra mayormente asociado a la sarcopenia; sin embargo, existen otras condiciones que pueden ser predisponentes para su desarrollo en este grupo de edad, como la presencia de ciertos tipos de cáncer a lo largo del tracto aerodigestivo, neuropatías, enfermedades neuromusculares y reumatoides. Sin embargo, a pesar de su prevalencia y serias consecuencias, esta condición

pasa desapercibida debido a que sus signos y síntomas son clínicamente silentes (Takeuchi *et al.*, 2014).

Anatómicamente, el proceso de deglución se divide en fase oral, faríngea y esofágica:

- Para que la fase oral sea llevada a cabo de forma eficiente requiere de un correcto cierre de labios, adecuado funcionamiento motriz de la lengua y buena salivación.
- La fase faríngea se encarga de conectar los sucesos que ocurren entre la cavidad oral y el esófago. Se caracteriza por compartir espacio con el proceso de respiración, requiriendo de estructuras cuya principal función es proteger las vías respiratorias durante el proceso de deglución. Se trata de un reflejo complejo cuya coordinación depende del centro de deglución, ubicado en el tronco encefálico. El reflejo se compone de un circuito de retroalimentación donde participa la faringe, músculos hioides y la lengua, mandando señales a la corteza en base a las características que posea el bolo, regulando así el tiempo de cada uno de los eventos durante la deglución (Smithard, 2016).

Entre los principales cambios que trae consigo el envejecimiento al proceso de deglución, destacan: pérdida de piezas dentales, atrofia de los músculos implicados, disminución en la salivación, debilitamiento del músculo esquelético que altera la fase faríngea, disminución en la amplitud de las contracciones peristálticas del esófago, entre otros (Jiménez-Rojas *et al.*, 2018). Sin embargo, la sarcopenia es considerada como la principal causa de estos cambios en el adulto mayor; lo que conlleva a una reducción en la función de la lengua, contracciones faríngeas, movimiento de la laringe y retraso en la cerradura de la laringe. Como última defensa, el reflejo de toser busca proteger el ingreso de materia extraña a las vías respiratorias; sin embargo, en el adulto mayor este tiende a verse debilitado, incrementando el riesgo a aspiración y complicaciones como neumonía (Smithard, 2016).

Algunos autores sugieren que en residencias de adultos mayores se tiene una prevalencia de disfagia por arriba del 68%, mientras que en individuos hospitalizados es del 30%, en pacientes que han sufrido un accidente cardiovascular alrededor del 64% y en

individuos que viven de forma independiente entre un 13-38% (Sura *et al.*, 2012). Otros sugieren que la prevalencia de disfagia en la población en general es de 16 a 23%, pudiendo aumentar hasta un 27% en personas mayores de 76 años, cifra que puede llegar a aumentar dependiendo del grado de fragilidad y dependencia que presenta el individuo. En pacientes con enfermedades neurológicas diagnosticadas, la prevalencia puede ser aún más alta en contraste con la población general (Smithard, 2016).

La disfagia posee serias repercusiones intrahospitalarias, incrementando la morbilidad del individuo, perpetuando la sensación de debilidad, aumentando la demanda al sistema de salud y prolongando los tiempos de residencia en hospitales (Takeuchi *et al.*, 2014).

### **2.1.2 Envejecimiento y desarrollo de sarcopenia**

La sarcopenia se define como la pérdida de masa muscular y fuerza que sufre el individuo, especialmente durante el proceso de envejecimiento; sin embargo, se ha observado que en individuos que llevan un estilo de vida sedentario, el proceso puede verse iniciado durante la juventud (Godínez-Escobar *et al.*, 2020). Su etiología resulta compleja y aún no es clara; sin embargo, la pérdida de masa muscular y fuerza se asocia a diversos factores ambientales y genéticos como lo son inflamación crónica, resistencia a la insulina, niveles hormonales alterados, estrés oxidativo, malnutrición, sedentarismo y presencia de enfermedades crónicas relacionadas con la edad (Granic *et al.*, 2019)

En un estudio realizado en la Ciudad de México donde participaron 293 individuos de distintos grupos etarios se observó una prevalencia de sarcopenia de 15.53%. En el grupo de edad mayor a 60 años se estimó una prevalencia de 22.53%, siendo la mayor cifra. Sin embargo, en el grupo de edad de 18-39 años la prevalencia fue de 14.28%, mostrando una cifra mayor a la que el grupo de 40-59 años mostró (11.5%). Con estas cifras, los autores concluyen que el sedentarismo en los adultos jóvenes está impactando de forma negativa en la masa muscular y que es fundamental evaluar dicho parámetro en edades más tempranas

con la finalidad de disminuir la incidencia de sarcopenia y sus complicaciones una vez se alcance la vejez (Godínez-Escobar *et al.*, 2020).

Entre las principales consecuencias asociadas a la sarcopenia destacan la disminución en la funcionalidad, baja calidad de vida e incremento en la mortalidad, incrementando los costos de atención hasta un 34% (Bloom *et al.*, 2018).

### **2.1.3 Envejecimiento y desarrollo de malnutrición**

Una de las complicaciones más severas de padecer disfagia es el desarrollo de malnutrición, derivado de la reducción en el consumo de alimentos (Takeuchi *et al.*, 2014). Se entiende por malnutrición a cualquier desbalance en el estado nutricional que puede generar en el individuo sobrepeso o bajo peso. Dependiendo de la situación, puede clasificarse como “desnutrición” o “sobrenutrición”. En individuos hospitalizados, sin importar el índice de masa corporal, se observa una tendencia a presentar episodios de desnutrición, esto debido a la pérdida de apetito generado por diversas situaciones patológicas, que conlleva a una reducción en el consumo de alimentos. Entre los principales factores desencadenantes para presentar pérdida de apetito destacan: problemas del tracto gastrointestinal, procedimiento de alimentación asistida por sonda previos, reducción en la capacidad de masticar o deglutir, entre otras situaciones (Tappenden *et al.*, 2013). Es así como una ingesta calórica y proteica deficiente, en conjunto con un estado de estrés catabólico inherente a una determinada patología, conlleva a una importante depleción muscular que afecta la funcionalidad del individuo (Guerrero-García *et al.*, 2015). Considerando que en el adulto mayor ya existe un estado de pérdida progresiva de masa y fuerza muscular, un estado de estrés catabólico sostenido puede funcionar como detonante para generar un estado nutricional por demás deficiente y elevar las tasas de mortalidad en dicho sector de la población (Godínez-Escobar *et al.*, 2020).

Por otro lado, la malnutrición impacta de forma directa a la calidad de vida, asociándose con resultados negativos en los que se incluyen supresión del sistema inmune, mayor padecimiento de infecciones, ulceraciones por presión, caídas, estadías hospitalarias

prolongadas, costos de atención elevados e incluso la muerte (Sura *et al.*, 2012). Sobre la prevalencia de malnutrición, su estimación varía dependiendo del entorno del individuo y el método con el que se realiza la valoración, sin embargo, la prevalencia en hospitales resulta alarmante (Tappenden *et al.*, 2013). Se estima que alrededor del 50% de los pacientes que son ingresados a hospitales poseen un estado nutricional deficiente al momento de su admisión (Avelino-Silva & Jaluul, 2017), y de no ser tratada, aproximadamente dos tercios de esos pacientes experimentarían un importante desgaste en su estado de salud durante su estancia (Tappenden *et al.*, 2013).

En México, aunque no existen cifras exactas, se cree que la prevalencia de malnutrición en adultos mayores varía dependiendo de su entorno. Se estima que en individuos que viven en un domicilio personal es de 4-10%, en individuos en condiciones de aislamiento de 15-38% y en hospitalizados entre 30%-70%. Las principales deficiencias dentro de esta población se deben a una desnutrición proteica y proteico-energética (IMSS, 2014).

Al momento de cursar por estados de estrés como una herida o proceso quirúrgico, el metabolismo proteico entra en acción. Se reconoce que un adecuado porcentaje de masa muscular se relaciona inversamente con padecer enfermedades crónicas en un futuro. Conforme se da el proceso de envejecimiento, la probabilidad de padecer enfermedades crónicas aumenta, pudiéndose generar casos de individuos mayores que cursan por múltiples condiciones patológicas. Es por todas estas situaciones que la preservación de la masa muscular a lo largo del tiempo es una prioridad para mantener un buen estado de salud y para ello se requiere de un buen aporte proteico que se ajuste a las necesidades de cada individuo (Houchins *et al.*, 2016).

## **2.2 Ingesta proteica recomendada en el adulto mayor sano y enfermo**

Acorde al consenso de la FAO y la Organización Mundial de la Salud (OMS) la ingesta diaria recomendada para el consumo de proteína es de 0.8 g/kg/día y se estima como el mínimo de consumo promedio al día para cumplir con los requerimientos de una parte

importante de la población. Para establecer dicho valor se utilizaron diversos estudios donde se evaluaba el balance nitrogenado en hombres sanos como el consumo mínimo necesario de proteína que evita la pérdida de masa magra; sin embargo, actualmente se ha generado un debate en torno a que la RDA resulta deficiente, sobre todo en adultos mayores quienes poseen su metabolismo proteico comprometido debido a la pérdida de masa muscular y disminución de actividad física (Houchins *et al.*, 2016).

El consumo proteico puede variar dependiendo de la situación por la que cruza el paciente. Algunos autores manejan un requerimiento proteico de 1.2-1.5 g/kg/día en individuos que cursan por alguna patología y que pueden o no presentar riesgo de padecer malnutrición (Vasse *et al.*, 2018). Un estudio internacional dirigido por la Sociedad Europea de Medicina Geriátrica en conjunto con otras organizaciones reveló que el requerimiento proteico para un adulto mayor es de 1.0-1.2 g/kg/d cuando se desea preservar la masa muscular, mientras que en individuos con patologías agudas o crónicas se sugiere un consumo de 1.2-1.5 g/kg/d (Houchins *et al.*, 2016). Otros autores incluso llegan a considerar un consumo proteico que ronda hasta los 2 g/kg/día. Un importante número de publicaciones basadas en datos epidemiológicos y estudios a corto plazo poseen como conclusión que el aumento en el consumo diario de proteína genera importantes beneficios para la salud, sobre todo en el adulto mayor, en contraste con individuos más jóvenes, debido a que existe una condición de menor estímulo-respuesta a bajas dosis de consumo de aminoácidos, misma que puede verse superada cuando existe un suficiente aporte de aminoácidos esenciales en la dieta (Baum *et al.*, 2016).

### **2.2.1 Ingesta de aminoácidos recomendada en el adulto mayor sano**

En un consenso llevado a cabo por la FAO, OMS y la Organización de las Naciones Unidas (ONU) en el 1985, se establecieron las recomendaciones diarias de consumo de aminoácidos esenciales para 3 diferentes grupos de edad dentro de la población (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Recomendación de ingesta total de aminoácidos en mg/kg de peso/día.

(Modificado de: FAO/OMS/ONU, 1985).

<b>Aminoácido</b>	<b>Infantes (3-4 meses)</b>	<b>Niños (2 años)</b>	<b>Adultos</b>
Isoleucina	70	31	10
Leucina	161	73	14
Lisina	103	64	12
Metionina + Cisteína	58	27	13
Fenilalanina + Tirosina	125	69	14
Treonina	87	37	7
Triptófano	17	12.5	3.5
Valina	93	38	10
Total	714	352	84

Sin embargo, no fue hasta el año 1991, cuando expertos de la FAO/ONU establecieron un cambio en las recomendaciones establecidas previamente, manifestando que la ingesta diaria de aminoácidos en adultos mayores debía ser similar al de los niños (Kurpad & Vaz, 2000).

Actualmente, los requerimientos para adultos que se consideran como válidos se encuentran establecidos en el reporte publicado en el 2007 y obtenido a partir del consenso de la FAO/OMS/ONU (**Tabla 2**).



**Tabla 2.** Resumen de los requerimientos de aminoácidos en el adulto (Modificado de: FAO/OMS/ONU, 2007).

Aminoácido	2007 FAO/OMS/ONU		1985 FAO/OMS/ONU
	mg/kg/día	mg/g de proteína	mg/kg/día
Histidina	10	15	8-12
Isoleucina	20	30	10
Leucina	39	59	14
Lisina	30	45	12
Metionina + Cisteína	15	22	
<i>Metionina</i>	10	16	13
<i>Cisteína</i>	4	6	
Fenilalanina + Tirosina	25	38	14
Treonina	15	23	7
Triptófano	4	6	3.5
Valina	26	39	10
Total	184	277	93.5

### 2.2.1.1 Leucina y la síntesis de masa muscular durante la vejez

Se estima que alrededor del 40% de la masa que compone al cuerpo humano corresponde a masa muscular, siendo su principal función el regular el metabolismo, mantener erguido el cuerpo y promover el movimiento. A través de la síntesis muscular, el músculo se encuentra frecuentemente bajo un proceso de remodelación como parte de una respuesta a los diferentes esfuerzos y estresores metabólicos. Una reducción en la masa muscular, de naturaleza progresiva y crónica, se traduce en un riesgo importante, reduciendo la independencia en la movilidad, calidad de vida, e incrementando la dependencia del individuo (Wellman, 2009).

La leucina destaca entre los aminoácidos esenciales al ser un potente estimulador en el proceso de síntesis muscular. Varios son los estudios que sugieren que un consumo total de 15 g/día de aminoácidos esenciales resulta suficiente para lograr el mayor estímulo al

momento en que se realiza la síntesis muscular (Baum *et al.*, 2016) mientras que el consumo de leucina idóneo es de 2.0-2.5 g/día (Cheng *et al.*, 2018).

La disminución de la masa muscular durante el envejecimiento se debe principalmente a fallas durante el proceso de señalización. Los principales factores que participan durante este proceso son: hormona de crecimiento, factor de crecimiento insulínico tipo I, ruta de proteína-quinasa, diana de rapamicina (mTOR) y factor de activación de señal RHO/respuesta en suero. Estos factores tienden a ser fácilmente influenciados por el tipo de dieta y el estímulo generado a partir de la contracción muscular (Wellman, 2009).

La síntesis de masa muscular se da específicamente en músculo esquelético, donde los aminoácidos son la principal señal que activa mTORC1. Durante el envejecimiento, el músculo va generando una importante resistencia al efecto estimulador que generan las concentraciones posprandiales de leucina. Este efecto se asocia a que, durante el proceso de envejecimiento, se pierde la capacidad de fosforilar y por ende activar mTORC1. Es así como se fundamenta la propuesta de incrementar la recomendación diaria de proteína en esta población, buscando así generar una respuesta similar a la del adulto joven al momento de activar mTORC1. Sin embargo, el principal reto a afrontar es el de encontrar fuentes de proteína que sean de alto valor biológico, fácil digestión y cuya proporción de aminoácidos atenúe la necesidad por consumir dietas saturadas en productos con rico contenido proteico (Baum *et al.*, 2016).

### **2.2.2 Estudios de interés sobre el metabolismo proteico**

El estudio Health ABC de carácter prospectivo, aparentemente concluyó que solo una dieta con elevado consumo de proteína de origen animal se podía correlacionar significativamente con cambios positivos en la síntesis de masa muscular. En otro estudio de metabolismo proteico en mujeres de edad avanzada se observó una mejora en la síntesis proteica al momento de consumir una dieta con elevado contenido proteico de origen animal en contraste de una cuyo principal aporte era de proteína vegetal. En otro estudio no aleatorizado, se demostró que una dieta rica en proteína animal generaba una mayor ganancia

de masa magra en individuos con un entrenamiento de resistencia, en contraste con individuos que seguían una dieta lacto-ovo-vegetariana (Houchins *et al.*, 2016). Sin embargo, cuando se repitió dicho estudio bajo un esquema de aleatorización y medidas más controladas, se logró observar que no existían diferencias significativas en la hipertrofia muscular sin importar el origen de la proteína, siempre y cuando el consumo fuera el adecuado (Haub *et al.*, 2002).

Houchins *et al.*, (2016) evaluaron la asociación entre la ingesta calórica y proteica de 3 diferentes modelos de dieta en poblaciones de 51 a 70 años y 71 años y mayores, para establecer el mejor patrón dietético con el objetivo de alcanzar una ingesta proteica mayor o igual a 1.0 g/kg/día. Entre los resultados destacó que, considerando el peso actual de los participantes, una dieta elevada en alimentos de origen vegetal con alto contenido proteico y un bajo contenido de productos de origen animal, no lograba alcanzar dicha recomendación en ambos grupos de edad. Por su parte, una dieta considerada normal en la población americana (acorde a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2007-2010), con el doble de porción de productos lácteos, lograba satisfacer dicha demanda. Cabe destacar que, cuando el cálculo de consumo proteico se llevaba a cabo con el peso idóneo para los grupos de edad, el resultado arrojaba datos positivos en cuanto al logro del objetivo. Sin embargo, estudios han dejado en evidencia que un consumo elevado de productos lácteos se encuentra correlacionado con problemas cardiovasculares (Ortolá *et al.*, 2020).

Por otro lado, las dietas lacto-ovo-vegetariana pueden ser la mejor opción en adultos mayores, siempre y cuando tenga una adecuada planeación, esto debido a que los requerimientos de consumo calórico disminuyen con la edad, mientras que se genera un incremento en nutrientes como calcio, vitamina D y B6, así como proteína. La principal causa por la que un individuo opta por este tipo de dietas en edades avanzadas es debido a los beneficios que posee frente a enfermedades crónicas; ejemplo de ello es la reducción de los niveles plasmáticos de hemoglobina glicosilada, mejor control de la glicemia en diabetes tipo 2 por el alto contenido de fibra, reducción en la concentración de colesterol plasmático, reducción en la tasa de mortalidad por enfermedades cardiovasculares, reducción del riesgo a padecer cáncer, entre otros (Rojas-Allende *et al.*, 2017).

## **2.3 Tendencias actuales en los patrones dietéticos**

Acorde a cifras establecidas por la organización North America Meat Institute, en el año 2017 la industria cárnica y avícola procesó alrededor de 9 mil millones de animales de corral en Estados Unidos. En promedio, esta población ganadera supera el peso de la población humana que reside en los Estados Unidos aproximadamente en 5 veces. Algunas de estas especies, como las aves de corral y los cerdos, consumen exclusivamente granos, mientras que el ganado lechero, ganado vacuno y corderos consumen tanto granos como forraje.

Se estima que todo el ganado de Estados Unidos consume alrededor de 7 veces más granos que la población de dicho país. El monto que se consume para alimentar al ganado sería suficiente para la alimentación de 840 millones de personas con una dieta a base de proteína vegetal. Al año se producen 8 millones de toneladas en dicho país para poder abastecer la demanda de su población, y a la par se consume una cantidad significativa de energía fósil, tierra y agua. La adquisición de una dieta lacto-ovo-vegetariana parece ser la opción más viable en la actualidad debido a que no se consumen tantos recursos para su producción como en el caso de una dieta carnívora y puede contribuir a garantizar la seguridad alimentaria (Pimentel & Pimentel, 2003).

### **2.3.1. Proteína animal vs proteína vegetal**

El consumo de una adecuada cantidad de alimentos con suficiente aporte de nutrientes resulta un gran reto para individuos mayores de 71 años; es por esto por lo que el consumo de proteína animal resulta mayormente benéfico ya que su aporte proteico por onza es elevado en contraste con fuentes de proteína vegetal. Se sabe que la tasa de síntesis muscular se ve influenciada por la calidad de la proteína que se ingiere, y se relaciona con el porcentaje de contenido, su nivel de digestibilidad y la biodisponibilidad de los aminoácidos que la conforman (Houchins *et al.*, 2016).

La proteína vegetal se encuentra presente en leguminosas, semillas, nueces y verduras, y se caracteriza porque su contenido proteico es considerado como de baja calidad

o incompleto, esto debido a que no contienen todos los aminoácidos considerados como esenciales para el ser humano. Sin embargo, existen proteínas de origen vegetal que son la excepción a la regla, como la soya, el amaranto y la quinua. Un punto a favor acerca del consumo de proteína de origen vegetal es, que, al combinar diferentes ingredientes, puede obtenerse una proteína de alta calidad biológica, proceso denominado como complementación proteica dentro de la industria de alimentos. Por medio de la aplicación de nuevas y diversas tecnologías, el tecnólogo de alimentos es capaz de complementar proteínas vegetales con la finalidad de obtener productos con un valor agregado. Tal es el caso de algunas pastas enriquecidas con soya o harinas a base de leguminosas (Marcus, 2013).

Otras ventajas interesantes acerca del consumo de proteína vegetal por sobre la proteína animal es su asociación a un menor riesgo de perder masa muscular, padecer fragilidad o fractura de cadera, desarrollar diabetes tipo 2 y mortalidad cardiovascular. Por otro lado, un elevado consumo de carnes rojas se asocia a riesgo elevado de desarrollar enfermedades crónicas degenerativas, algunos tipos de cáncer como el de colon, mayor mortalidad cardiovascular, entre otros (Ortolá *et al.*, 2020).

## **2. 4. Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*)**

### **2.4.1. Generalidades**

De origen mexicano, el amaranto es considerado un cultivo antiguo, cuyo uso data de aproximadamente hace 4000 años, con probable origen en Tehuacán. Se caracteriza por ser un cultivo tolerante a condiciones adversas y suelos pobres, así como de fácil adaptabilidad a altitudes por encima de los 2500 metros arriba del nivel del mar (Cordero-de-los-Santos *et al.*, 2005).

Actualmente existen 3 especies de grano considerados de consumo humano, siendo *A. cruentus* L. y *A. hypochondriacus* L. originarias de Norteamérica y Centroamérica, mientras que *A. caudatus* L. es originaria de Sudamérica. El interés por este cultivo es reciente y se debe principalmente a su potencial uso como sustituto en formulaciones de alimentos, siendo

una de sus principales aplicaciones la panadería (Miranda-Ramos *et al.*, 2019; Joshi *et al.*, 2018).

#### **2.4.2. Contenido proteico**

El amaranto es considerado un pseudocereal por poseer una proteína balanceada, con elevado contenido de aminoácidos esenciales y una buena biodisponibilidad, además de no contener gluten (López *et al.*, 2018). El principal interés sobre este pseudocereal es su contenido proteico, que ronda entre un 13.1-21%, cifra por demás superior en contraste con otros cereales, y que se compone principalmente de albuminas y globulinas de fácil digestión (Joshi *et al.*, 2018). Su contenido de aminoácidos se caracteriza por ser rico en lisina, triptófano y metionina, tener un contenido aceptable de cisteína (Cordero-de-los-Santos *et al.*, 2005), siendo la leucina su aminoácido deficiente (Chávez-Jáuregui *et al.*, 2000); aun así, su contenido puede considerarse de balance cercano al óptimo para el consumo humano. Otra ventaja del amaranto por sobre otros cereales es la fracción proteica que lo compone, siendo rico en globulinas y albuminas, y tener un contenido bajo o nulo de prolaminas, siendo estas las de mayor predominancia en cereales y ser tóxicas en pacientes diagnosticados con enfermedad celiaca (Aceituno-Medina *et al.*, 2013).

La calidad de su proteína, su funcionalidad y su bajo contenido de factores antinutricios ha resultado ser tan atractivo para la industria que su uso como aislado proteico se ha incrementado en la industria alimentaria. El proceso habitual para su obtención es la utilización de medios alcalinos para la solubilización de la proteína y posteriormente someter a medios ácidos para conducir a la precipitación isoeléctrica. Sin embargo, existen una serie de desventajas por utilizar este método tradicional: pérdida de propiedades funcionales, generación de factores antinutricios como complejo lisinoalanina, concentración de factores antinutricios como ácido fítico e inhibidor de tripsina, y reducción en la calidad proteica. La principal aplicación en alimentos de los aislados proteicos de amaranto es como agente espumante y emulsificante en un pH de 5.5-7 (Mondor *et al.*, 2009; Cordero-de-los-Santos *et al.*, 2005).

#### 2.4.2.1. Aislado proteico de amaranto

En el estudio realizado por Cordero-de-los-Santos *et al.*, (2005) se llevó a cabo una comparación entre el aislado proteico de amaranto obtenido por punto isoeléctrico (IP por sus siglas en inglés; “*Isoelectric protein*”) y por método micelar (PM por sus siglas en inglés; “*Miscellisation protein*”); a su vez se analizaron sus características fisicoquímicas y propiedades funcionales, contrastando ambos resultados obtenidos contra los de un aislado proteico de soya comercial (CSI). Concluyeron que la proteína recuperada por medio de IP fue mayor en comparación con la precipitación micelar (56.4% vs 15.9%).

En otro estudio realizado por Aceituno-Medina *et al.*, (2013) determinaron que el contenido proteico de un concentrado comercial de amaranto era de  $30.9 \pm 0.4\%$ . Posterior a la purificación que se llevó a cabo, se obtuvo un contenido de proteína de  $85.5 \pm 0.2\%$ .

En cuanto a las propiedades funcionales, los aislados de amaranto son ligeramente más oscuros que los concentrados proteicos de soya, lo que se ha relacionado con las reacciones proteína-polifenol donde se generan polímeros coloreados. Por otro lado, la solubilidad del aislado dependerá de la metodología de obtención, para aislados de amaranto obtenidos por la metodología de punto isoeléctrico, los valores máximos de solubilidad son a un pH de 3 y 9 con 30% y 70% respectivamente (Cordero-de-los-Santos *et al.*, 2005).

En general, la proteína de amaranto posee una peculiar y única distribución que lo hace diferente de otros cereales y leguminosas (Cordero-de-los-Santos *et al.*, 2005). Sus fracciones proteicas se dividen en un 40% albumina, 25-30% glutelina, 20% globulina y 2-3% prolamina. Se dice que el elevado valor nutricional de la proteína de amaranto se debe a su contenido de globulinas, además de ser la fracción que le otorga excelentes propiedades funcionales como lo es la capacidad emulsificante (Tamsen *et al.*, 2018).

El aislado proteico de amaranto posee la capacidad de gelificar a una concentración de 7% w/v cuando es calentado a 70°C. La utilización de concentraciones elevadas, temperatura y tiempo de calentamiento tienen como resultado la obtención de geles mucho más ordenados (López *et al.*, 2019).

Otro punto por destacar es la digestibilidad proteica que, acorde a un estudio realizado por Rodríguez *et al.*, (2020) donde se midió grado de hidrólisis como referencia a digestibilidad, se observaron resultados de entre 55-63%. Cabe destacar que el aislado no se sometió a un tratamiento térmico previo, pudiendo afectar el proceso de digestión.

#### 2.4.2.2. Composición de aminoácidos en amaranto y aislado proteico

El contenido de aminoácidos en la semilla cruda y la semilla tratada por medio de “Popping” se muestran en la **Tabla 3**. Se puede observar una disminución importante en el contenido de leucina asociado a que dicho tratamiento térmico, ampliamente utilizado en el mercado, somete el grano a condiciones extremas de temperatura, utilizando aire caliente que alcanza los 170-190°C durante un periodo de 30 segundos (Písaříková *et al.*, 2005).

**Tabla 3.** Contenido de aminoácidos en harina de amaranto en crudo y harina sometida a tratamiento térmico en g/100 g de proteína. (Modificado de: Písaříková *et al.*, 2005).

Aminoácido	Crudo	"Popping"
Cisteína	2.9	3.4
Aspartato	10.7	10.2
Metionina	2.3	2.1
Treonina	4.5	4.9
Serina	9.3	8.5
Glutamato	17.7	16.3
Prolina	3.7	3.2
Glicina	15.2	14.4
Alanina	6.2	5.8
Valina	5.3	4.8
Isoleucina	3.8	3.7
Leucina	6.9	5.8
Tirosina	n/d	0.5
Histidina	1.7	1.6
Lisina	8.0	7.4
Arginina	14.5	13.2

Abreviación: n/d = determinado



## **2. 5. Chícharo (*Pisum sativum*)**

### **2.5.1. Generalidades**

El origen de *Pisum* spp. se registró por primera vez en el Suroeste de Asia, donde se incluye Afganistán, India y Pakistán; posteriormente el cultivo se extendió a regiones tropicales y subtropicales. Habitualmente se le conoce a *Pisum sativum* como chícharo chino, guisante, guisante de jardín, guisante verde, siendo la denominación preferente en México, chícharo (Aguilar-Vázquez *et al.*, 2018).

El chícharo es una de las leguminosas más ampliamente difundidas alrededor del mundo, con una producción global de 13.5 millones de toneladas al año. Se caracteriza por tener excelentes rendimientos, ser ampliamente disponible y un muy bajo precio de producción. Comparado contra la soya, el chícharo no posee alérgenos y su contenido nutricional es relativamente elevado, además de no tener modificaciones genéticas (Ge *et al.*, 2020).

### **2.5.2. Contenido proteico**

La semilla de chícharo destaca por tener un contenido proteico de entre 23-31%. Las principales fracciones presentes en la proteína son globulinas en un 70-80% y albuminas en un 10-20%. En general, sus proteínas se consideran de buena calidad por su rico contenido de aminoácidos esenciales, especialmente ramificados. Sin embargo, su principal cualidad es el elevado contenido de lisina, otorgándole la capacidad de ser incorporado como ingrediente en la elaboración de productos panificados, cuyo principal aminoácido limitante es la lisina (Ge *et al.*, 2020; Bogahawaththa *et al.*, 2019), siendo su principal aminoácido limitante triptófano (Roy & Chakrabarti, 2003). En otro estudio se menciona que los principales aminoácidos limitantes son la cisteína y metionina (Corgneau *et al.*, 2019).

### 2.5.2.1. Aislado proteico de chícharo

La obtención del aislado proteico de chícharo se logra por medio de la solubilización de la proteína y posterior precipitación a través de punto isoeléctrico, obteniendo productos con un contenido final de hasta 85%. Las fracciones proteicas que predominan en el chícharo son las globulinas con un contenido de 66% (Aguilar-Vázquez *et al.*, 2020).

Estudios de solubilidad proteica reportan valores mínimos a pH de 4.5, mientras que se observa un incremento gradual por debajo y arriba de dicho pH, hasta alcanzar el máximo a un pH 8 y 2. La importancia de la solubilidad radica en su correlación con otras propiedades como lo son la formación de emulsiones, espumas y gelatinas, mismas que condicionan su implementación en matrices alimentarias (Ladjal-Ettoumi *et al.*, 2016). Otro estudio reporta una solubilidad del 99% a pH 7.5 bajo condiciones de no temperatura y utilizando dispersiones proteína-agua al 8%, destacando que la solubilidad es dependiente al equilibrio proteína-solvente y las interacciones proteína-proteína (Bogahawaththa *et al.*, 2019).

Otros parámetros importantes para considerar son las propiedades térmicas de las proteínas globulares y su asociación con el comportamiento de agregación y gelación. Cuando una proteína posee una elevada temperatura de desnaturalización ( $T_d$ ) se asocia a que sus proteínas globulares tienen una elevada estabilidad térmica. Este parámetro refleja la ruptura de puentes hidrógeno, perpetuando las estructuras terciarias y cuaternarias. Una  $T_d$  elevada sugiere que los polipéptidos poseen una estructura terciaria compacta. Al evaluar la  $T_d$  de la proteína de chícharo, esta alcanzó 104.6°C de  $T_d$  máximo, misma que se asocia a un elevado contenido de puentes disulfuro en la proteína globular (Ladjal-Ettoumi *et al.*, 2016).

El aislado proteico posee la capacidad de gelificar a concentración crítica de 17% (w/v) (Moreno *et al.*, 2020). Sin embargo, bajo la revisión de Ge *et al.*, (2020) los autores concluyeron que una temperatura de 93°C con una concentración de 19.6% (w/w) son las condiciones óptimas para formar un gel.

En cuanto a digestibilidad proteica, un estudio previo demostró que un aislado proteico comercial poseía una digestibilidad del 90%. El elevado resultado se asoció al efecto

del tratamiento térmico sobre los factores antinutricios, reduciendo así su contenido (Corgneau *et al.*, 2019). En otro estudio donde se analizó la digestibilidad de un aislado proteico comercial se obtuvo un resultado del 96% (Guillin *et al.*, 2019). Actualmente, el uso de aislado proteico de chícharo es amplio dentro de la industria por su bajo costo de producción, ausencia de alteraciones genéticas y de alergenos que se encuentran presentes de forma natural en cereales, siendo utilizado en bebidas, productos de panificación e incluso sustitutos de productos cárnicos (Bogahawaththa *et al.*, 2019).

### 2.5.2.2 Composición de aminoácidos en chícharo y aislado proteico

El contenido de aminoácidos de la harina, concentrado proteico y aislado proteico de chícharo se observan en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.** Composición de aminoácidos de harina, concentrado y aislado proteico de chícharo (*Pisum sativum*) en g/100 g de producto. (Modificado de: Tömösközi *et al.*, 2001).

<b>Aminoácido</b>	<b>Harina</b>	<b>Concentrado proteico</b>	<b>Aislado proteico</b>
Aspartato	10.46	11.58	11.52
Treonina	3.66	3.12	3.69
Serina	4.37	4.96	6.09
Glutamato	16.60	16.39	17.03
Prolina	5.56	4.30	5.01
Glicina	4.43	4.50	4.68
Alanina	4.53	4.13	4.41
Cisteína	0.34	0.35	0.73
Valina	5.20	5.13	4.81
Metionina	0.86	0.85	0.78
Isoleucina	3.80	3.48	3.68
Leucina	6.36	6.94	8.16
Tirosina	3.05	3.35	3.79
Fenilalanina	4.54	4.67	5.18
Lisina	8.58	8.12	8.96
Histidina	3.40	3.39	3.81
Triptófano	0.50	0.51	0.51
Arginina	13.76	14.22	7.15

## **2.6. Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)**

### **2.6.1 Generalidades**

Los frijoles pertenecientes al género *Phaseolus* tienen su origen en el continente americano, donde su domesticación data de hace más de 7000 años. A partir de ese entonces, el frijol se convirtió en uno de los tres cultivos básicos de la milpa, pues su consumo podía ser a partir de vainas tiernas como ejotes para consumo inmediato o en semillas secas que podían ser almacenadas, además de ayudar a fijar el nitrógeno necesario para abastecer al maíz (Rodríguez-Licea *et al.*, 2010).

### **2.6.2 México y el consumo de frijol**

Para México, el frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es uno de los principales alimentos que existe en la dieta básica ya que proporciona una gran cantidad de proteína a bajo costo; sin embargo, actualmente su consumo se enfrenta a una sociedad cambiante, donde los hábitos alimenticios han sido modificados de manera importante a causa del urbanismo, migración y empleo (Fernández-Valenciano & Sánchez-Chávez, 2017). Su importancia e historia data de los tiempos precortesianos donde, de acuerdo con el Códice Mendocino, los aztecas lo incluían en los tributos exigidos a otros pueblos y nunca desapareció de la dieta nacional durante los 500 años que siguieron. Su papel resulta más significativo en clases de menores recursos que, al no tener acceso a proteínas de origen animal, hallan en el frijol ese aporte necesario (Muñoz, 2010). Sin embargo, una de sus principales desventajas es su importante contenido de compuestos antinutricios como lo son los factores inhibidores de tripsina, quimiotripsina y amilasa; otros componentes como ácido fítico, oligosacáridos que producen flatulencias, saponinas y lecitinas que interfieren con la biodisponibilidad del hierro (Morales-de-León *et al.*, 2007).

### **2.6.3 Variedad pinto saltillo**

Dentro del género *P. vulgaris*, existen una gran variedad de especímenes que, dependiendo de la región, es la demanda que recibe. En el norte del país hay mayor demanda

de frijoles pintos, en el occidente de claros y en el centro y sur de negros. La producción de frijol, por ende, se ha concentrado en las variedades comerciales de mayor demanda, como lo son los negros, pintos, flores de mayo y junio, peruanos y bayos (Rodríguez-Licea *et al.*, 2010). La subvariedad pinto saltillo surgió como una tendencia por la especialización para producir grano de frijol de la variedad pinto, ya que favorece al incremento del precio del grano y la liberación de variedades mejoradas que se adaptan a condiciones de sequía, poseen alto rendimiento y una mayor calidad comercial. En específico, la variedad de frijol pinto saltillo se caracteriza por tener un rendimiento alto, tolerancia al oscurecimiento acelerado y un tiempo de cocción inferior a los 45 minutos. También ha mostrado tolerancia a enfermedades características del cultivo (Sánchez-Valdez *et al.*, 2009).

#### **2.6.4 Contenido proteico**

Se establece que la variedad pinto saltillo posee un contenido proteico de entre 21.4-23.6%, siendo sus principales aminoácidos limitantes triptófano, cisteína y metionina (Nosworthy *et al.*, 2018). La ventaja de utilizar esta variedad radica en su elevado contenido de proteínas globulares (21 g/100 g de base seca) compuestas principalmente por vicilina y convicilina, que le dan excelentes propiedades funcionales (Peña-Cháidez *et al.*, 2021).

##### **2.6.4.1. Aislado proteico de frijol variedad pinto saltillo**

En los años recientes se ha visto un incremento en la producción de aislado proteico de frijol con la finalidad de incorporarlo como ingrediente funcional dentro de la industria de alimentos para mejorar la calidad nutricional de una amplia gama de productos. El método más reconocido para su obtención es la precipitación alcalina y posterior precipitación por punto isoeléctrico, esto debido a que los químicos son de bajo costo y el uso de los equipos requiere de una simple capacitación, lo que le da ventaja por sobre otros métodos como la ultrafiltración por membrana (Morales-de-Léon *et al.*, 2007).

En un estudio previo donde se elaboró aislado proteico de frijol pinto, los autores reportaron un contenido proteico de 70.89 g de equivalente de BSA/100 g de aislado; además de un comportamiento en “U” en el perfil de solubilidad, donde el menor valor se registró a

pH 5, efecto atribuible a la fracción faseolina predominante, dónde otros autores reportaron resultados similares a pH 4.1 y 4.7 (Cortez-Trejo *et al.*, 2021).

En cuanto a sus propiedades térmicas, el aislado proteico de frijol pinto posee una  $T_d$  de 110.2°C, misma que se encuentra asociada a la resistencia térmica de las proteínas globulares, en este caso vicilina, misma que se divide en tres subunidades durante el proceso de desnaturalización. Por otro lado, se reporta que a concentraciones de 6 a 14%, el aislado no posee la capacidad para gelificar; mientras que a concentraciones de 16% se observan geles débiles, pudiendo asociarse a su elevada estabilidad térmica. Durante el proceso de gelificación se utilizan temperaturas de 100°C lo que sugiere no ser suficiente para generar la desnaturalización y desdoblamiento de las proteínas (Tan *et al.*, 2014).

El aislado proteico posee una digestibilidad proteica del 71.3%. Su aparente baja digestibilidad se asocia a la resistencia frente a hidrólisis enzimática de vicilina (Tan *et al.*, 2014).

#### 2.6.4.2. Contenido de aminoácidos en harina de frijol pinto saltillo

Aunque existe una gran cantidad de reportes acerca del contenido de aminoácidos en aislados proteicos de distintas variedades de frijol, para la variedad frijol pinto saltillo se encontró exclusivamente el contenido de aminoácidos esenciales en sus harinas (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** Composición de aminoácidos en harina de frijol variedad pinto (*Phaseolus vulgaris*) en g/100 g de proteína (Modificado de: Albarracín *et al.*, 2010).

Aminoácidos	Harina de frijol
Isoleucina	4.8
Leucina	7.6
Lisina	6.2
Fenilalanina + Tirosina	9.9
Histidina	2.1
Treonina	4.0
Triptófano	n/d
Valina	5.5

Abreviación: n/d = determinado

## 2.7 Importancia del tratamiento térmico

### 2.7.1 Tratamientos térmicos convencionales

Las leguminosas son consideradas como una fuente económica de proteínas, carbohidratos, fibra, vitaminas y energía en las dietas alrededor del mundo; además, su consumo está asociada a efectos fisiológicos benéficos ya que contribuyen a controlar y prevenir varias enfermedades metabólicas (Tharanathan & Mahadevamma, 2003). Sin embargo, su utilización en la dieta está ligado con el aporte de factores antinutricios que se caracterizan por interferir con la ingesta y digestión de proteínas y minerales en animales monogástricos. Los factores antinutricios que destacan en las leguminosas son:  $\alpha$ -galactosidasa, inhibidores de tripsina y ácido fítico (Champ, 2002).

Para limitar el consumo de estas sustancias, los tratamientos térmicos han demostrado tener un efecto benéfico ya que su aplicación contribuye a disminuir los inhibidores de tripsina, mejorar la digestibilidad proteica y modificar el contenido de  $\alpha$ -galactosidasa y ácido fítico (Vidal-Valverde *et al.*, 1997).

En el caso del amaranto, los factores antinutricios presentes en el grano son el ácido fítico, fitatos, taninos, inhibidor de amilasa e inhibidores de tripsina. Estudios previos han demostrado que someter a tratamiento térmico la semilla de la variedad *A. cruentus* y *A. caudatus*, por cocción o “popping”, contribuye a disminuir de manera significativa su contenido, lo que sugiere una mejora en su digestibilidad (Gamel *et al.*, 2006). El denominado proceso de “popping” o reventado implementa temperaturas de entre 170-190°C por medio de aire caliente. Se trata de un método de cocción ampliamente utilizado en la industria por su bajo costo. Sin embargo, es bien sabido que el uso de elevadas temperaturas genera daño y modificación a las concentraciones de aminoácidos, resultando en una disminución en su contenido. Temperaturas por arriba de 100°C producen reacciones en aminoácidos ligados y libres, pero sobre todo en aminoácidos esenciales, lo que los hace inutilizables para el humano (Tovar *et al.*, 1989; Bressani *et al.*, 1987). Una forma de procesar

el amaranto sin dañar su contenido proteico y de aminoácidos es a través de la combinación de humedad y calor (Bressani *et al.*, 1992).

### **2.7.1.1 Cocción como tratamiento térmico para el frijol**

Considerado como un método tradicional, es el más utilizado para la preparación de frijoles en el hogar. La cocción trae consigo beneficios como la disminución de factores antinutricios y el aumento de la digestibilidad de la proteína (Wang *et al.*, 2010). Se sabe que, por medio de este método, el contenido proteico se puede ver incrementado por medio de la pérdida de carbohidratos durante el proceso (Wu *et al.*, 1996). En cuanto al contenido de aminoácidos, algunos estudios sugieren un incremento posterior a la cocción, mientras que otros señalan una pérdida en la concentración de metionina, tirosina y treonina (Candela *et al.*, 1997).

En el estudio de Wang *et al.*, (2010) los autores concluyeron que el proceso de cocción afecta la composición nutrimental tanto de frijoles como de garbanzos. Se observó un incremento significativo en el contenido de proteína cruda, almidón, grasa, fibra insoluble y fibra total; mientras que se tuvo una reducción en el contenido de cenizas, potasio, inhibidores de tripsina, taninos, sacarosa y oligosacáridos. Por otro lado, una de las desventajas asociadas a este método es el proceso de agregación que sufren las proteínas frente a un proceso térmico intenso. Esto conlleva a una insolubilización proteica que, de eliminar el agua de cocción genera una pérdida importante de nutrientes, o bien, la inactivación de moléculas con actividad biológica (Cheftel, 1986).

### **2.7.1.2 Extrusión como método térmico**

La extrusión se caracteriza por ser una tecnología que combina elevadas temperaturas con cortos tiempos de procesamiento. Entre sus numerosas ventajas destacan su versatilidad, alta productividad, bajos costos de operación, eficiencia energética, elevada calidad en los productos procesados y una mejora marcada en la digestibilidad y el valor biológico de las proteínas (Gutiérrez-Dorado *et al.*, 2008). El uso de la extrusión de harinas contribuye a la producción de una importante gama de alimentos debido a que posee una importante cantidad



de reacciones que les da un valor agregado. Ejemplo de ello es la pre-gelatinización de gránulos de almidón, lo que genera la pérdida del orden molecular y la degradación de polímeros, con la respectiva formación de fragmentos altamente solubles. Es por ello por lo que las suspensiones generadas a partir de harinas precocinadas por extrusión son capaces de incrementar su viscosidad, con una mínima tendencia a generar bultos gracias a que los gránulos de almidón han sido modificados y poseen la capacidad de hincharse bajo condiciones de frío o calor, lo que hace de las harinas extruidas un ingrediente idóneo para la preparación de alimentos instantáneos como bebidas (Vasanthan *et al.*, 2001).

En el caso de las proteínas, una ventaja de la extrusión es que al someter a elevadas temperaturas la matriz alimentaria, la agregación proteica no promueve la pérdida proteica ya que esta permanece en el producto, en contraste con el método de cocción. En el caso particular de las proteínas vegetales, el desdoblamiento y agregación promueven la formación de estructuras fibrosas, características de productos cárnicos para la producción de análogos de carne. Sin embargo, una de sus desventajas es la presencia de reacciones de Maillard que comprometen la disponibilidad de lisina en presencia de azúcares reductores a condiciones elevadas de temperatura y baja humedad; así como la formación de complejos lisinoalanina (Cheftel, 1986).

Noguchi *et al.*, (1982) se plantearon la idea de remover los azúcares reductores de la harina para minimizar las pérdidas por reacciones de Maillard durante el proceso de extrusión, sin embargo, la presencia de almidón y sacarosa darían lugar a más de estos compuestos debido a la hidrólisis por efecto de cizalla. Es así como surgen los primeros indicios de someter a extrusión concentrados y aislados proteicos.

### **2.7.1.3 Extrusión como tratamiento térmico en aislados**

Una de las tecnologías implementadas directamente en aislados proteicos ha sido la extrusión, con el objetivo de sustituir parcialmente el consumo de alimentos cárnicos por productos homólogos de origen vegetal. Aunque la extrusión convencional ha demostrado severas desventajas como la disminución en el contenido de aminoácidos (Osen *et al.*, 2014),

la extrusión con elevada humedad resulta en un método ventajoso que disminuye la pérdida de aminoácidos por reacciones de Maillard o formación de complejos, además de mejorar la digestibilidad. Sin embargo, su aplicación es exclusiva a procesos industriales por la cantidad de materia prima que se requiere para su implementación (Osen *et al.*, 2015). Actualmente en el mercado pueden encontrarse productos a base de proteína de chícharo en conjunto con otros alimentos de origen vegetal, que ofrecen productos homólogos a la carne (“Beyond meat”, “Asanté”, “Longeve”, entre otras marcas).

### 2.7.2 Calentamiento óhmico

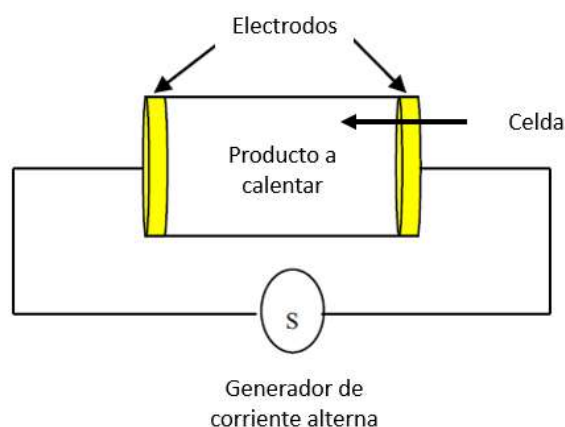
El uso de calentamiento óhmico como proceso térmico en alimentos surge como una alternativa a los procesos térmicos convencionales (pasteurización y métodos de esterilización) al no someter el producto a elevadas temperaturas que generen una disminución en su valor nutricional o afecte sus características organolépticas. Su ventaja radica en que el calentamiento se da directamente en el interior del producto, dejando de lado el coeficiente de transferencia de calor o la dificultad que genera la pared superficial del producto para que penetre el calor (Indiarto & Rezaarsanto, 2020).

Su principio se basa en que una corriente eléctrica alterna atraviesa el alimento, provocando un incremento controlado y homogenizado de la temperatura interna generado por la resistencia del material al paso de la corriente eléctrica. Bajo esta perspectiva, la corriente y el voltaje funcionan como parámetros directos a la temperatura alcanzada (Sastry & Li, 1996). En la **Figura 1** puede observarse en esquema los principios del calentamiento óhmico. Al generarse un calentamiento rápido y uniforme, se obtiene una mayor retención de sabores y garantiza la integridad de las partículas, siendo esta la razón del porqué es considerada como una de las tecnologías con mayor potencial de desarrollo en la industria de alimentos (Li *et al.*, 2018).

La aplicación de esta tecnología se dio inicialmente con el objetivo de pasteurizar leche; sin embargo, entre sus desventajas se observaron elevados costos de operación y la corrosión de sus electrodos. En la actualidad, su aplicación abarca una amplia gama de

productos como productos cárnicos, frutas y verduras, entre otros (Moreira *et al.*, 2019), pudiendo aplicarse de forma continua o por lotes (Indiarto & Rezaharsamto, 2020).

Entre las ventajas de utilizar esta tecnología se encuentra la capacidad de obtener de forma rápida las temperaturas deseadas, un calentamiento rápido y uniforme, no se genera un efecto de calor residual una vez se apaga la fuente, bajo costo de mantenimiento al no haber partes móviles en el equipo y evitar la emisión de ruidos fuertes como en el uso de otros equipos; sin embargo, también posee ciertas desventajas como la falta de información generalizada en su operación y el conocimiento en los ajustes individuales de los parámetros para cada producto (Sakr & Liu, 2014).



**Figura 1.** Diagrama esquemático que ilustra el principio de calentamiento óhmico (Extraído de: Sakr & Liu, 2014).

Para que un alimento pueda ser procesado por medio de calentamiento óhmico, debe cumplir con una serie de requisitos. La eficiencia con la que se da el calentamiento depende de la conductividad que el material ofrezca. La conductividad de un material depende de una serie de parámetros donde se incluyen el poder de los iones, el contenido de agua libre y la microestructura que posea. El tamaño de partícula del material es otro punto para considerar, pues a mayor tamaño menor capacidad para conducir electricidad. La viscosidad del material o líquido definirá que tan rápido o lento se dará el calentamiento; a mayor viscosidad se obtiene un calentamiento más rápido; mientras que materiales con una concentración más

alta de sólidos obtendrá una tasa de flujo de calor más elevada, esto porque las partículas servirán para dejar fluir de forma más eficiente la corriente eléctrica a lo largo de la matriz (Indiarto & Rezaharsanto, 2020).

### **2.7.2.1 Calentamiento óhmico en alimentos**

Aunque su aplicación inicial iba destinada a procesos de pasteurización, actualmente el calentamiento óhmico se utiliza para llevar a cabo inactivación microbiana, procesos de extracción, blanqueado, descongelamiento, gelatinización y evaporación (Indiarto & Rezaharsanto, 2020).

En el caso específico de leguminosas, García-Mier (2012) implementó el uso de calentamiento óhmico para la reducción de contenido de taninos en harinas de frijol, promoviendo su uso con la finalidad de inactivar factores antinutricios conservando el contenido nutricional. Posteriormente, Lima-Becerra (2020) sometió harinas de frijol a tratamiento térmico por extrusión, cocción y calentamiento óhmico, demostrando que no se presentaban diferencias sobre las propiedades tecnofuncionales al comparar dichos métodos; sin embargo, los valores más altos en capacidad espumante, emulsificante y viscosidad los obtuvo el calentamiento óhmico. Otro hallazgo importante fue la disminución de compuesto antinutricios, a la par que se preservaba el perfil de solubilidad y los patrones electroforéticos de las proteínas. Es así como la autora concluye que el uso de esta tecnología supera a las tradicionales al tener una mayor eficiencia energética, reducir los tiempos de proceso, evitar la lixiviación de nutrientes al no haber una pérdida en el caldo de cocción y preservar las propiedades tecnofuncionales.

Los autores Li *et al.*, (2018) sometieron leche de soya a calentamiento óhmico obteniendo como resultado un cambio importante en la estructura y propiedades funcionales de las proteínas, comparado con los tratamientos convencionales. Los resultados obtenidos demostraron que al implementar esta tecnología los aminoácidos libres se incrementaban hasta un 14%. Además, el contenido total de grupos sulfhidros y la superficie hidrófoba se

redujo, lo que afecto directamente su capacidad para formar espumas y emulsificar, evidenciando un cambio importante en la estructura proteica.

Específicamente en proteínas, estudios han indicado que al aplicar calentamiento óhmico a proteínas globulares se generan cambios conformacionales en la estructura, resultando en la obtención de películas y geles con propiedades específicas. Moreira *et al.*, (2019) llevaron a cabo un estudio utilizando caseinato de sodio y encontraron que la solubilidad proteica se incrementaba conforme se intensificaba el campo eléctrico, asociando el efecto a que el campo genera cambios en las cargas y reorienta los residuos hidrofóbicos, reflejándose en un cambio en la solubilidad. Sin embargo, con estos cambios se vio afectada la capacidad para formar geles debido a que las alteraciones previamente mencionadas pudieron afectar la formación de la red del gel, disminuyendo la capacidad para retener agua y produciendo un efecto de sinéresis. Por otro lado, Pereira *et al.*, (2017) sugieren el uso de intensidades de  $3 \text{ V.cm}^{-1}$  para promover la formación de geles de proteína de suero resistentes, y la adición de  $\text{Fe}^{2+}$  en un proceso denominado como gelación en frío. Es así como los autores sugieren la implementación de calentamiento óhmico para la producción de geles que funcionen como espesantes o como transportadores de sustancias bioactivas para incrementar el valor nutrimental de alimentos funcionales innovadores.

## **2.8 Hidrogeles**

Los hidrogeles se definen como redes poliméricas con una gran afinidad al agua, utilizando macromoléculas con grupos hidrofílicos para prevenir que se disuelvan a través de la formación de una estructura entrecruzada. Su uso posee aplicaciones biomédicas, farmacéuticas y alimentarias para la industria (Liu *et al.*, 2012). En el caso de los alimentos, su aplicación data del siglo II después de Cristo en Asia, donde ya existían geles comibles de konjac y Tofu, un alimento popular que utiliza la gelificación de proteínas de soya (Zhang *et al.*, 2020).

Para la formación de hidrogeles, el uso de polímeros naturales ofrece ventajas por sobre los sintéticos en cuanto a seguridad y cuidado del medio ambiente. Las proteínas y

polisacáridos son por excelencia, excelentes formadores de hidrogeles. En el caso de la industria de alimentos, la aplicación de estos geles radica en mejorar la estabilidad y la encapsulación/liberación de compuestos bioactivos, o bien, generar películas biodegradables que funcionen como empaque (Klein & Poverenov, 2020).

La funcionalidad de las proteínas radica en su estructura y la formación de hidrogeles se da a partir de su desdoblamiento, provocando la ruptura de sus estructuras terciarias y secundarias, exponiendo sus aminoácidos y aumentando su capacidad para interactuar. Posteriormente se da la formación de oligómeros que interactúan entre sí obteniendo el gel. La agregación depende directamente del contenido de proteína, la temperatura, el pH y las fuerzas iónicas que participan (Pereira *et al.*, 2017). La formación del gel se da mayormente por interacciones no covalente entre proteínas (puentes hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y electrostáticas) aunque también pueden darse, de forma menos frecuente, enlaces covalentes (enlaces disulfuro). Aplicar temperatura, altas presiones, ácidos, sales o hidrólisis enzimática favorece la gelación; sin embargo, se puede hacer uso de agentes entrecruzantes externos con el objetivo de ofrecer una estructura más rígida, un ejemplo es la adición de celulosa (Klein & Poverenov, 2020).

Un método habitual para la formación de hidrogeles es la gelación en frío que se da en dos pasos:

- a) Desdoblamiento de las proteínas por medio del calentamiento de la solución, por arriba de la temperatura de desnaturalización.
- b) Enfriamiento a temperatura ambiente que puede incluir la modificación de pH o la adición de sales como NaCl o CaCl<sub>2</sub>.

La adición de sales para inducir la gelación de proteínas globulares o aislados contribuye a filtrar las repulsiones electrostáticas, o bien, a formar puentes de sal entre proteínas cargadas negativamente y moléculas o agregados, facilitando la gelación. Como resultado a este procedimiento se obtienen geles con más fuerza y mejor capacidad para retener agua, evitando la sinéresis (Pereira *et al.*, 2017).

## 2.9 Papillas

La elevada tasa de malnutrición dentro de la población de adultos mayores se asocia principalmente a un deficiente consumo de proteína, que a su vez puede asociarse a múltiples factores como la incapacidad para trasladarse a hacer las compras y preparar sus alimentos, abriendo la necesidad de desarrollar productos instantáneos o listos para consumir que contribuyan a alcanzar de forma parcial sus requerimientos de nutrimentos a lo largo del día (Borkent *et al.*, 2019). Cabe destacar que el consumo de este tipo de productos con propiedades nutricionales, que requieran un mínimo de manejo en la cocina y tiempo de preparación, han tenido un incremento en su demanda a nivel internacional (Kaur *et al.*, 2018).

Las papillas se caracterizan por ser alimentos listos para consumir que en la actualidad atraen la atención de los consumidores por su practicidad como parte de un desayuno nutritivo (Hussain & Kaul, 2019). Su origen parte de la incorporación de diferentes granos de cereal como trigo o avena a agua o leche hirviendo. Su popularidad yace en sus propiedades nutricionales al incorporar granos enteros, generando productos ricos en fibra y proteína (Kaur *et al.*, 2018).

Actualmente en el mercado se pueden encontrar productos tipo papilla que utilizan como ingrediente principal sémola de diversos cereales fortificadas con proteínas de origen vegetal u animal, con el objetivo de combatir la malnutrición. Sai-Manohar *et al.*, (2011) desarrollaron una papilla a partir de sémola de trigo enriquecida con aislado proteico de soya y leche desgrasada en polvo; para ello sometieron a proceso de reventado las mezclas, utilizando un tostador de tambor escala laboratorio a 140°C durante 10 minutos con el objetivo de inducir el fenómeno de gelatinización y retrogradación.

En otro estudio realizado por Kaur *et al.*, (2018) sometieron harina de maíz y de maíz con alta calidad proteica a proceso de extrusión para la obtención de papillas instantáneas, obteniendo resultados muy similares, encontrado apto el procesamiento de la proteína bajo este tipo de tecnología para la obtención de productos enriquecidos.

### **II.8.1. Normatividad**

La norma oficial mexicana NOM-131-SSA1-2012 establece que en papillas elaboradas a partir de frutas y/o cereales el contenido de carbohidratos no debe exceder de 20 g/100 g de producto listo para consumir. Cabe destacar que en la actualidad no existe una norma que declare estipulaciones específicas para la producción de papillas, en especial dirigidas a adultos mayores.

Por otro lado, considerando el método por gelificación en frío, es importante considerar el contenido de sales a incorporar en la mezcla, donde la NOM-086-SSA1-1994 estipula que las sales de potasio no deben exceder del 4% masa/masa. En cuanto a otras características del producto especificadas en esta norma se tiene que al ser un producto con un contenido de grasa menor a 0.5 g/porción, puede considerarse un producto de bajo contenido de grasa.



### 3. JUSTIFICACIÓN

La investigación propuesta busca estudiar las propiedades de gelificación de una mezcla de proteínas de origen vegetal, integrando aislados proteicos de chícharo (*Pisum sativum*), frijol común (*Phaseolus vulgaris*) y amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*), que contribuya a alcanzar los requerimientos proteicos y de aminoácidos de adultos mayores. El trabajo considera como grupo vulnerable a este sector de la población por poseer un elevado riesgo a generar un estado nutricional deficiente originado por diversos factores, como la dificultad para llevar a cabo de forma exitosa la función oral y digestiva, su estado socioeconómico y de salud, grado de dependencia, entre otros.

Se trabajó con dichas proteínas, considerando las nuevas tendencias sobre impacto ambiental, ofreciendo una fuente de proteína alternativa generada a partir de cultivos importantes en México. La intención fue establecer una mezcla con un determinado contenido de aminoácidos, que fue sometida a diferentes tratamientos térmicos para determinar su capacidad de gelificación para proponer un producto tipo papilla manteniendo un determinado perfil de aminoácidos.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Estudiar las propiedades de gelificación de una mezcla de aislados proteicos de chícharo (*Pisum sativum*), frijol común (*Phaseolus vulgaris*) y amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) que contribuya a cubrir el requerimiento proteico y de aminoácidos en adultos mayores.

### 4.2 Objetivo Específico

4.2.1 Obtener los aislados proteicos de amaranto y frijol por precipitación isoelectrica.

4.2.2 Caracterizar fisicoquímicamente los aislados proteicos de amaranto, frijol y chícharo.

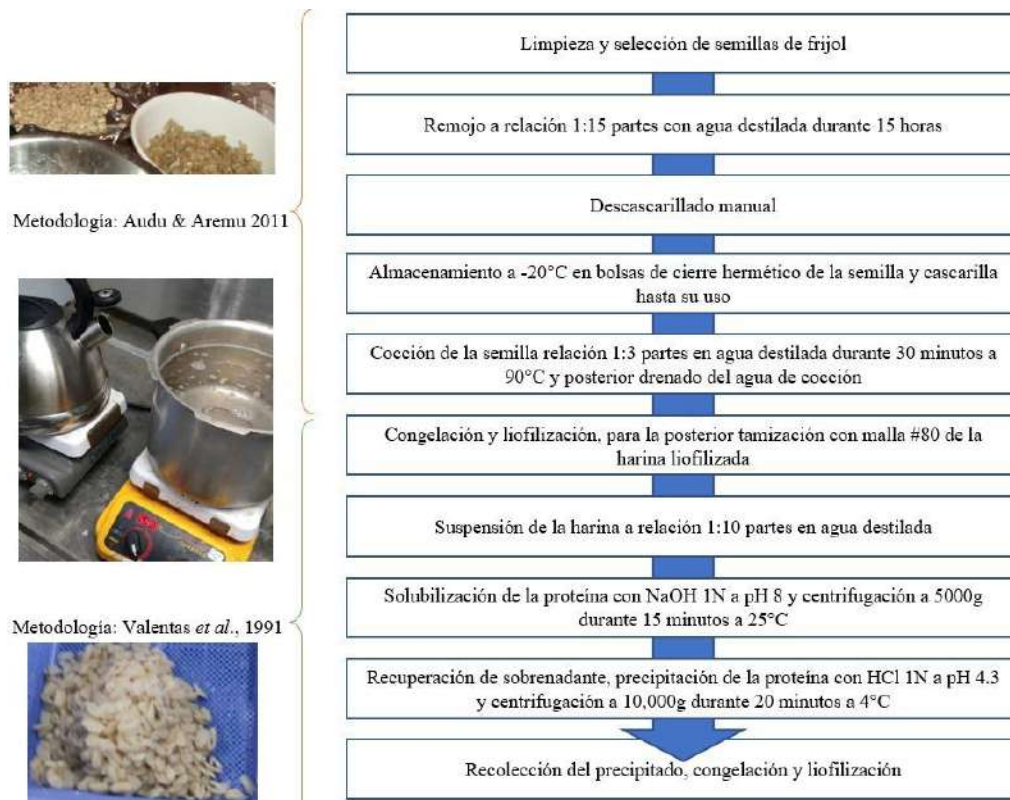
4.2.3 Determinar el efecto de calentamiento óhmico y convencional sobre las características de gelificación de una mezcla de aislados proteicos vegetales.

## 5. MATERIALES Y METODOLOGÍA

### 5.1 Estrategia experimental

#### 5.1.1 Fase experimental #1

Consistió en someter a un proceso de cocción previo las semillas de frijol con el objetivo de mejorar la digestibilidad proteica e inhibir el efecto de los factores antinutricios en la muestra. El procedimiento se muestra en la **Figura 2**.

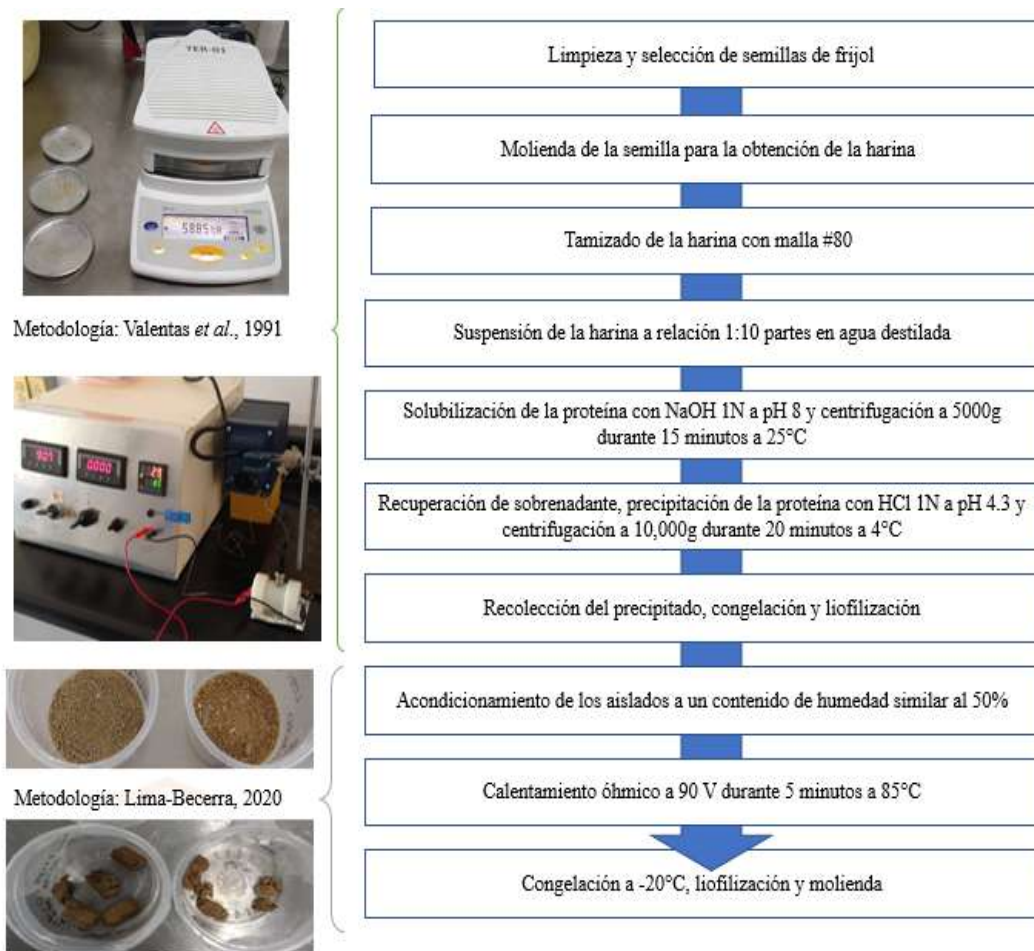


**Figura 2.** Diagrama de fase experimental #1. Previa cocción de las semillas de frijol para obtención de APF.

#### 5.1.2 Fase experimental #2

Se decidió someter el APF y APA a calentamiento óhmico con el objetivo de inhibir los factores antinutricios presentes en las muestras (**Figura 3**), obteniendo así el aislado

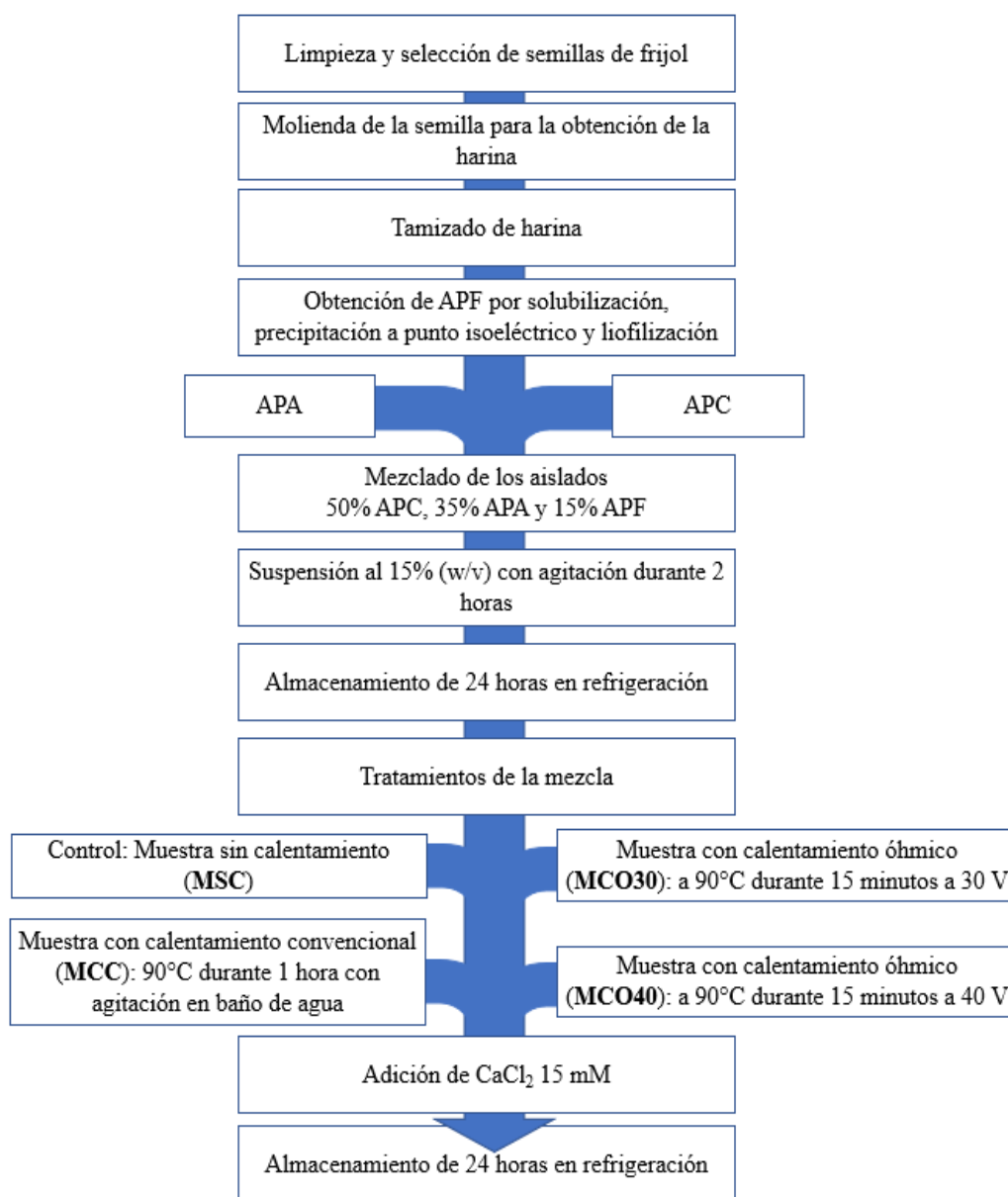
proteico de frijol y amaranto con calentamiento óhmico (APFCO, APACO). Cabe destacar que APC no fue sometido a calentamiento óhmico ya que la muestra comercial fue sometida a un tratamiento térmico previo como método de pasteurización (138-142°C durante 15-20 segundos) considerado lo suficientemente fuerte como para generar cambios en la solubilidad (**Figura 15**) y porcentaje de estructuras de la proteína (**Tabla 9**), quedando exento de este segundo tratamiento térmico.



**Figura 3** Diagrama de fase experimental #2. Obtención de APF y procesamiento con CO.

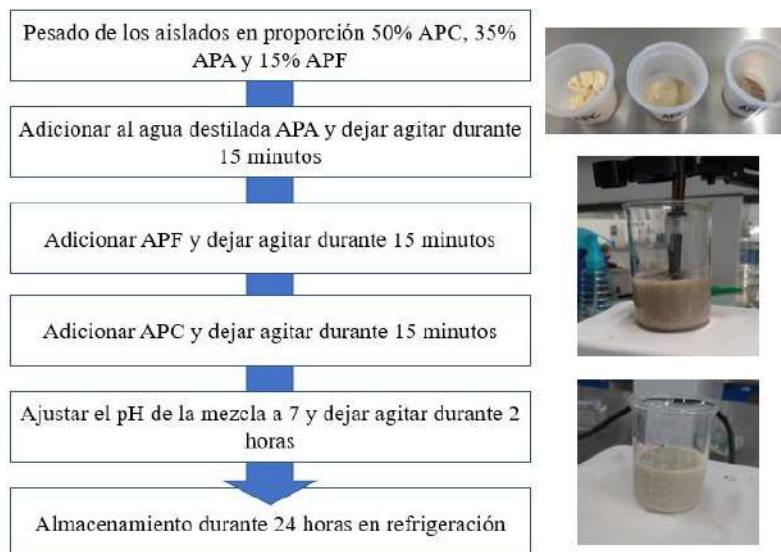
### 5.1.3 Fase experimental #3

Considerando los resultados obtenidos bajo las condiciones experimentales anteriores, se optó por evaluar el desarrollo de hidrogeles aplicando como metodología de desnaturalización el calentamiento óhmico en conjunto con el método “cold-set” (**Figura 4**).



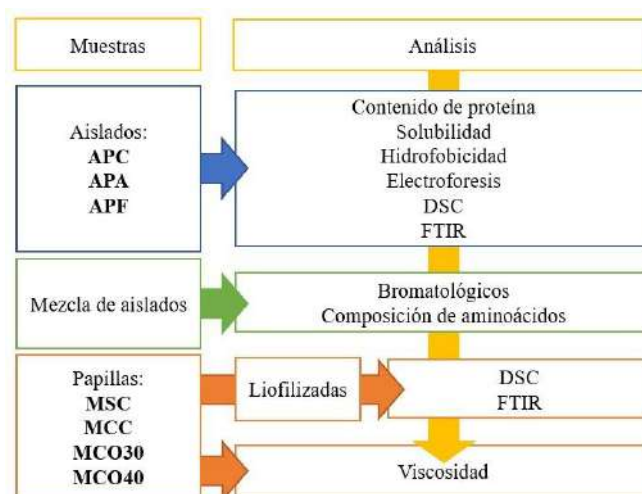
**Figura 4.** Diagrama de fase experimental #3. Desarrollo de hidrogeles por el método de cold-set a pH 7 y adición de  $\text{CaCl}_2$  15 mM.

La proporción de los aislados en la suspensión se planificó utilizando los resultados de solubilidad para cada aislado. Para su elaboración se siguió una serie de pasos planteados en la **Figura 5** con la finalidad de obtener una mezcla homogénea.



**Figura 5.** Diagrama de proceso de elaboración de las suspensiones al 15%.

En la **Figura 6** se observan de forma general los análisis realizados de forma independiente en los aislados, en la mezcla, y en las papillas sin y con tratamiento térmico.



**Figura 6.** Diagrama de análisis a aislados, mezcla y geles.

## 5.2 Materiales

Se utilizó como materia prima para elaborar el aislado proteico de frijol (APF) 5 kg de semillas de frijol común cultivar Pinto Saltillo (*Phaseolus vulgaris*) comprados en un mercado local. 120 g de aislado proteico de chícharo (APC) fueron donados por la empresa GranoLife (*Pisum sativum*). El grano de *Amaranthus hypochondriacus* fue proporcionado por la empresa Nutrisol. Se utilizaron solventes de grado analítico de la empresa JT Baker y Sigma (México).

## 5.3 Proceso de obtención del aislado proteico de frijol



**Figura 7.** Procesamiento de aislado proteico de frijol a partir de sus harinas. Figura A: Harina tamizada; Figura B: Harina sin tamizar; Figura C: Residuos de fibra; Figura D: Aislado proteico de frijol liofilizado.

El APF (**Figura 7**) se obtuvo a partir de la metodología de Valentas *et al.*, (1990) con ligeras modificaciones. Para la obtención de la harina, los 5 kg de semilla fueron molidos utilizando un molino de la marca Pulvex. La harina resultante fue tamizada utilizando malla #80 y fue almacenada en contenedores de plástico sellados con Parafilm a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La harina tamizada se suspendió en agua a una proporción 1:10 (g/ml) bajo agitación continua hasta obtener una suspensión homogénea. Una vez obtenida la suspensión, el pH se ajustó a 8 utilizando NaOH 1N manteniendo la agitación durante 1 hora a temperatura ambiente para promover la solubilización de la proteína. Transcurrido el tiempo, se centrifugó durante 15 minutos a 5000g a una temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  utilizando una centrifuga

marca Beckman Coulter Inc. El sobrenadante se almacenó a 4°C hasta su uso mientras que el precipitado se rescató para realizar una segunda solubilización bajo las mismas condiciones. Una vez obtenido el sobrenadante de la segunda extracción, el pH de este y el sobrenadante de la primera extracción fue ajustado a 4.3 utilizando HCl 1N. Ambas suspensiones fueron centrifugadas por separado a 10,000 g durante 20 minutos a 4°C y su precipitado se recogió y almaceno a -20°C para su posterior liofilización.

Para obtener el rendimiento de extracción de los aislados se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso de la muestra liofilizada}}{\text{Peso de la muestra inicial}} \times 100$$

#### **5.4 Proceso de obtención del aislado proteico de amaranto**

##### **5.4.1 Preparación de la harina de amaranto (HEA)**

El aislado proteico de amaranto se obtuvo a partir de la metodología propuesta por Aceituno *et al.*, (2013). Para la obtención de la harina, las semillas fueron molidas en un molino marca Pulvex y la harina se tamizó utilizando malla #80. Su almacenamiento se llevó a cabo utilizando contenedores de plástico sellados con Parafilm a -20°C.

Previo a la obtención del aislado, la harina fue desgrasada a una proporción 1:9 (g/ml) con hexano durante 48 horas en agitación.

##### **5.4.2 Obtención del aislado proteico de amaranto (APA)**

La harina obtenida se suspendió a una proporción 1:10 con agitación hasta obtener una suspensión homogénea. Posteriormente se llevó a un pH de 9 utilizando NaOH 1N en agitación continua por 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, la suspensión se centrifugó a 9000g durante 20 minutos a 25°C en una centrifuga marca Beckman Coulter Inc y se rescató el sobrenadante, ajustando su pH a 5 con HCl 1N. Se



centrifugó a 9000g durante 20 minutos a 4°C y el precipitado se rescató almacenándose a -20°C para posteriormente ser liofilizado.

## **5.5 Determinación de contenido de proteína en aislados**

Para determinar el contenido de proteína se utilizó el método de Bradford por equivalentes de BSA. La técnica se llevó a cabo siguiendo la metodología establecida por el proveedor para su aplicación en microplaca, utilizando un espectrofotómetro modelo SpectraMax 190 UV de la marca Molecular Devices LLC para realizar las lecturas de absorbancia a 595 nm.

## **5.6 Propiedades fisicoquímicas de los aislados proteicos**

### **5.6.1 Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)**

La proteína total de los tres aislados proteicos se analizó mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Se tomó 1 mg de cada aislado proteico y se suspendieron en 1 ml de NaOH (0.1 N) para garantizar su solubilización. Las suspensiones se agitaron utilizando un vortex durante 5 minutos y se almacenaron a -20°C hasta su uso. 100 µl de cada muestra se colocaron en tubos Eppendorf, añadiendo 100 µl de buffer de carga (con y sin β-mercaptoetanol), y llevando a incubación y agitación (95°C, 300 rpm durante 4 minutos) con un Thermomixer R para eppendorf de 2 mL. Se tomó una alícuota de 15 µl de cada muestra y se colocó a lo largo de los diferentes pocillos del gel. El gel se corrió en la cámara electroforética (marca BIO RAD) a 110 volts durante 95 minutos. El análisis se llevó a cabo utilizando un fotodocumentador de la marca ProteinSimple y su respectivo software (AlphaImager HP 3.4.0).

### **5.6.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)**

Se realizó Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés) a las muestras de APC y APF a pH 7 en un rango de número de onda 4000-650 cm<sup>-1</sup> utilizando un espectrómetro de la marca Spectrum GX. Previo a su análisis, los aislados

proteicos fueron dispersos en agua y agitados durante 60 minutos para posteriormente ajustar su pH utilizando NaOH 0.1 N o HCl 0.1 N. Los aislados se congelaron y liofilizaron. Se realizó la deconvolución de la banda correspondiente a amida I (1700-1600  $\text{cm}^{-1}$ ) para la determinación de estructuras secundarias, utilizando un modelo Gaussiano mediante el software Origin 8.4.

### 5.6.3 Calorimetría diferencia de barrido (DSC)

Las propiedades térmicas de APC y APF a pH 7 se determinaron por medio de calorímetro diferencial de barrido (DSC por sus siglas en inglés, TA Q 2000, TA Instruments, New Castle, DE, USA). Se pesaron 5 mg de muestra en crisoles de aluminio y el análisis se realizó en seco para evitar la apertura de los crisoles, realizando un barrido de 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  en un rango de 30 a 200 $^{\circ}\text{C}$ .

### 5.7 Perfil de solubilidad

La solubilidad se determinó por medio de la metodología de He *et al.*, 2018. 20 mg de muestra se disolvieron en 10 mL de agua destilada dejando en agitación constante durante 1 hora. Su pH se ajustó a un rango de 2 a 12 utilizando NaOH y HCl 1 N, y se dejó en agitación constante durante 30 min. Posteriormente se llevó a centrifugación a 10,000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente. La concentración de proteína en el sobrenadante se determinó por medio del método de Bradford (ver **Anexo 1**) y se utilizó la siguiente fórmula para obtener el porcentaje de solubilidad (PS):

$$PS (\%) = \left( \frac{W1}{W0} \right) \times 100$$

Donde W1 hace referencia a la cantidad de proteína en sobrenadante expresada en gramos y W0 a la cantidad inicial de proteína agregada expresada en gramos.

## 5.8 Hidrofobicidad ( $H_0$ )

Se utilizó 1-anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS) como sonda fluorescente para determinar  $H_0$  siguiendo la metodología propuesta por Cortez-Trejo *et al.*, 2021. Se utilizaron dispersiones proteicas (1.5mg/mL) en buffer fosfato 0.1 M a pH 7. Las suspensiones se centrifugaron a 8000xg durante 20 minutos a 17°C. El sobrenadante se diluyó en buffer fosfato (0.001 a 0.10 mg/mL). Posteriormente se preparó la solución ANS 8 mM utilizando el buffer fosfato, añadiendo 40  $\mu$ l de ANS/2 mL de solución proteica. La intensidad de la fluorescencia (IF) se midió a través de un equipo Varioskan Flash Multimode Reader a 364 nm (excitación) y 485 nm (emisión). El cálculo se realizó como la pendiente de IF contra la concentración de proteína.

## 5.9 Color

Se estableció color por el método de Condés *et al.*, 2015. Para ello se hizo uso de un colorímetro (Konica Minolta, modelo CM-600d, Japón) con escala de color CIE Lab con el objetivo de obtener los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  para cada aislado. Se realizó el cálculo de cromaticidad ( $C^*$ ) y valor del ángulo *Hue* ( $^\circ$ ) por medio de las siguientes ecuaciones:

$$C^* = \sqrt{a^2 + b^2}$$

$$Hue (^\circ) = \arctan\left(\frac{b}{a}\right)$$

Para las imágenes representativas de cada aislado proteico se utilizó el programa “Nix Color Sensor”.

## 5.10 Formulación de las mezclas

La formulación de las mezclas se llevó a cabo mediante la recopilación bibliográfica referente a contenido de aminoácidos y digestibilidad proteica (**Tabla 6**). Considerando la digestibilidad proteica de cada aislados, se optó por utilizar la mezcla 1.

**Tabla 6.** Contenido tentativo de aminoácidos esenciales en mezclas de aislados proteicos en presentación de 100 y 15 g.

Aminoácido	g/100g de proteína			Mezcla 1*		Mezcla 2**	
	Amaranto <sup>1</sup>	Chícharo <sup>2</sup>	Frijol <sup>3</sup>	100 g	15 g	100 g	15 g
Histidina	1.70	1.87	2.10	1.85	0.28	1.82	0.27
Isoleucina	3.80	3.49	4.80	3.80	0.57	3.85	0.58
Leucina	6.90	6.70	7.60	6.91	1.04	3.84	0.58
Lisina	8.00	5.65	6.20	6.56	0.98	6.91	1.04
Metionina + Cisteína	5.20	8.26	2.10	6.27	0.94	5.81	0.87
Fenilalanina + Tirosina	Nd	8.97	9.90	5.97	0.90	4.62	0.69
Treonina	4.50	2.77	4.00	3.56	0.53	3.82	0.57
Triptófano	Nd	0.77	Nd	0.39	0.06	0.27	0.04
Valina	5.30	4.16	5.00	4.69	0.70	4.86	0.73
<b>Aminoácidos totales</b>				<b>39.97</b>	<b>5.99</b>	<b>38.88</b>	<b>5.37</b>

(\*) Mezcla 1: 35% APA, 50% APC y 15% APF.

(\*\*) Mezcla 2: 50% APA, 35% APC y 15% APF.

(<sup>1</sup>) Fuente: Písaříková *et al.*, 2005. Basado en harina de amaranto crudo.

(<sup>2</sup>) Fuente: Reporte de contenido de aminoácidos de la empresa donadora.

(<sup>3</sup>) Fuente: Albarracín *et al.*, 2010. Basado en harina de frijol pinto.

Para la obtención de los geles se utilizó una dispersión al 15% de la mezcla de aislados. Dicha decisión recae en que los sistemas de hidrogeles se saturan a altas concentraciones, impidiendo una correcta integración. Las concentraciones habituales de trabajo para hidrogeles cold-set con proteínas vegetales se ubican en un amplio rango de 4-15% (Brito-Oliveira *et al.*, 2020; Kaspchak *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2020; Brito-Oliveira *et al.*, 2018; Svanberg *et al.*, 2018). De igual forma se consideró que los productos dirigidos a este grupo de edad contienen 15 gramos de proteína por porción (ejemplo: Ensure Advance), aportando así 11 g de proteína/15 g de mezcla. La mezcla seleccionada para el presente trabajo fue la 2 partiendo del contenido de leucina, al tratarse de un aminoácido crítico para el mantenimiento de un adecuado metabolismo muscular (Apartado II.2.1.1.)

### 5.11 Composición proximal y contenido de aminoácidos totales de la mezcla

El análisis bromatológico de la mezcla se realizó en la unidad de servicios de la Facultad de Ciencias Naturales. Se determinó humedad (NMX-F-83-1986), cenizas (AOAC

942.05), proteína por el método de Dumas (AOAC 968.06), fibra (NFV-03-040) y grasa por el método de extracto etéreo (AOAC 2003.05). La determinación de carbohidratos se realizó por diferencia, siguiendo la siguiente ecuación (FAO,1993):

$$\%CT = 100 - (\% Humedad + \% Cenizas + \% Proteína + \% Grasa)$$

El análisis de aminoácidos totales se realizó en la unidad de servicios externos del CIATEJ por el método INS-SM/US-260.

### **5.12 Evaluación de calentamiento tradicional y óhmico sobre capacidad gelificante**

Para la obtención de los geles se utilizaron el método por calentamiento tradicional y el método por calentamiento óhmico, utilizando una concentración 15 mM de CaCl<sub>2</sub> para promover la agregación proteica (Mession *et al.*, 2015). Se evaluó el desempeño como agentes reticulantes NaCl 300 mM (Brito-Oliveira *et al.*, 2020), CaCl<sub>2</sub> 10 mM (Bryant & McClements, 2000) y gluco- $\delta$ -lactona (GDL) 15 g/L (López *et al.*, 2020).

Para ambos casos, se trabajaron dispersiones al 15% con un contenido de APC de 50%, APA de 35% y APF de 15%. Inicialmente se agregó APF, permitiendo agitar durante 15 minutos, después APC agitando durante 15 minutos para su incorporación y posteriormente APA por el mismo periodo de tiempo. Transcurrido el periodo de integración de los aislados se hizo el ajuste de pH a 7 utilizando NaOH (0.1 N) y se dejó la mezcla en agitación durante 2 horas. Previo a su calentamiento, las suspensiones fueron almacenadas durante toda la noche a 4°C.

#### **5.12.1 Calentamiento convencional**

Para el calentamiento convencional se siguió la metodología de Mession *et al.*, 2015 con ligeras modificaciones de Bryant & McClements, 2000. Tres mililitros de suspensión se calentaron en baño María durante 1 hora a 90°C con agitación. Transcurrido el tiempo, se llevó a baño de hielo durante 10 minutos para posteriormente agregar 0.1 mL de CaCl<sub>2</sub> 15 mM y llevar a agitación durante 5 minutos. Las muestras fueron cubiertas con Parafilm y

papel aluminio, almacenando bajo refrigeración durante 24 horas para posteriormente congelar a -20°C y liofilizar.

### 5.12.2 Ensayos de conductividad

Para seleccionar el voltaje al cual trabajar el calentamiento óhmico se realizaron ensayos preliminares aplicando 4 niveles de voltaje con una réplica, utilizando como muestra para cada corrida 3 mL de mezcla de aislados proteicos. Como paso previo para establecer la conductividad se llevaron a cabo los cálculos de área del electrodo o área útil (A), distancia entre los electrodos (L) y factor geométrico (**Tabla 7**).

$$A = a \times b$$

Dónde a representa la altura y b la base de la celda. Para la estimación de L se mide la distancia (longitud) entre un electrodo y el otro.

$$\text{Factor geométrico} = \frac{A}{L}$$

Dónde A representa el área del electrodo o área útil y L la distancia entre los electrodos.

**Tabla 7.** Mediciones y cálculos para establecer factor geométrico.

<b>Dimensión geométrica</b>	<b>Valor</b>
b (Base)	0.02 m
a (Altura)	0.0134 m
A (Área)	0.000268 m <sup>2</sup>
L (Longitud)	0.02 m
A/L	0.0134 m

Para los cálculos de conductividad ( $\sigma$ ) para cada tratamiento se consideró voltaje (V), intensidad (i), resistencia (R), resistividad ( $\rho$ ) y sus respectivos valores finales.

$$R = \frac{V}{i}$$

$$\rho = R \times A/L$$

$$\sigma = \frac{l}{\rho}$$

### 5.12.3 Calentamiento óhmico

Para el calentamiento óhmico se siguió la metodología de Rodrigues *et al.*, (2020) con ligeras modificaciones. El equipo utilizado consta de un transformador variable (Variac, 220 VAC), un control de temperatura con rampa de calentamiento e interfaz tipo RS-232 (Waltlow Serie 981), multímetros de sobremesa (modelo 34410A, Agilent) para obtener los valores de tensión y corriente en una computadora. Se realizaron ensayos a 20, 30, 40 y 50 V para seleccionar el mejor tratamiento para el mantenimiento de 90°C. Los ensayos demostraron que las condiciones que permitían alcanzar la temperatura eran de 30 y 40 V. Se utilizó una celda de 2 x 2 x 2 cm de acrílico con electrodos acoplados de acero inoxidable y la temperatura se midió utilizando un termopar tipo T aislado (Physitemp Instruments, model IT-18). Las muestras fueron sometidas a un calentamiento de 15 minutos (5 minutos para alcanzar los 90°C y 10 minutos de calentamiento con agitación). Posterior a su calentamiento fueron llevadas a baño de hielo durante 10 minutos para posteriormente agregar 0.1 mL de CaCl<sub>2</sub> 15 mM y llevar a agitación durante 5 minutos. Las muestras fueron cubiertas con Parafilm y papel aluminio, almacenando bajo refrigeración durante 24 horas para posteriormente llevar -20°C y liofilizar.

### 5.13 Caracterización fisicoquímica de la mezcla de aislados, previo y posterior a los tratamientos

FTIR y DSC se determinó de acuerdo con la metodología descrita para los aislados proteicos individuales.

#### **5.14 Análisis estadístico**

Se utilizó la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para comparar las medias y el software JMP versión 8.0 para la interpretación de los datos.



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Resultados fase experimental #1

Los resultados en cuanto a rendimiento de aislado proteico de frijol de esta fase no fueron los esperados (5.2%), descartando dicho proceso. Acorde a lo reportado en la literatura, la temperatura es considerada como uno de los factores críticos a manipular al momento de procesar una proteína (Wang *et al.*, 2010). Las interacciones hidrofóbicas juegan un papel importante durante la estabilización de la estructura nativa de una proteína y son las que determinan la solubilidad de las proteínas al promover interacciones proteína-proteína y la formación de agregados (Carbonaro *et al.*, 2012). Las proteínas de leguminosas se caracterizan por tener un contenido elevado de aminoácidos polares con cargas opuestas (por un lado, de la cadena ácido glutámico y aspártico, y por el otro lado lisina y arginina), lo que promueve el fenómeno de asociación y disociación que define la propiedad de solubilidad (Carbonaro *et al.*, 1993). En este caso, el contenido de proteína en la muestra, al pasar por un proceso térmico prolongado, se sugiere que generó agregados con baja solubilidad que se perdieron al momento de drenar el agua de cocción, lo que implicó una pérdida importante de dicho nutriente. Es así como se decide trabajar con la harina sin proceso térmico previo para la obtención de los aislados, realizando su caracterización.

### 6.2 Caracterización de aislados de proteína

#### 6.2.1 Rendimiento y pureza de los aislados

El análisis químico del proveedor de las semillas de frijol expresa un contenido proteico de 20%, lípidos 1.6%, fibra 6% y carbohidratos 56% aproximadamente. Valores similares han sido previamente reportados para la misma variedad con valores de proteína de 21.85%, lípidos 1.59%, fibra 1.91% y carbohidratos de 58.98% (Peña-Cháidez *et al.*, 2021), mientras que en estudios más generalizados en diferentes variedades de frijol refieren un rango de contenido proteico mayor, de 22.36-28.50% (Rui *et al.*, 2011).

La extracción de aislado proteico de frijol (APF) generó un rendimiento de 11.67% para la primera extracción, obteniendo un rendimiento total de 14.67% con la segunda extracción. Valores similares de extracción se han reportado para la variedad frijol terciopelo (8.85-12.74%), mientras que en frijol negro se observaron valores más altos (21.7%) (do-Evangelho *et al.*, 2017; Ríos *et al.*, 2000). El grado de pureza del aislado fue de  $68.28 \pm 0.78$  g de equivalentes de BSA/100 g aislado. Resultados similares han sido reportados en un rango de 67-70.89 g/100 g para la variedad pinto saltillo (Peña-Cháidez *et al.*, 2021; Cortez-Trejo *et al.*, 2021).

### 6.2.2 Composición proximal de los aislados

En la **Tabla 7** se pueden observar los resultados de análisis proximal para cada aislado. En el caso del aislado proteico de amaranto (APA), contenidos proteicos similares han sido reportados para *A. cruentus*, mismos que varían dependiendo del pH implementado para la extracción y precipitación dentro de un rango de 75.8-83.4% (Salcedo-Chávez *et al.*, 2002). En el estudio realizado por Bejosano & Corke (1998) se reportaron los contenidos proteicos de aislados obtenidos de diferentes variedades de amaranto, reportando un rango de 674-753 g kg<sup>-1</sup> (67.4-75.3%). En cuanto a contenido de carbohidratos, este puede variar en un rango de 15.7-17.6% dependiendo el método de extracción (Bejarano-Luján *et al.*, 2010).

Para el caso del aislado proteico de chícharo (APC), valores similares han sido previamente reportados en la literatura (Fernández-Quintela *et al.*, 1997). En estudios realizados en aislados proteicos de origen vegetal, el chícharo destaca por ser una de las fuentes que registra uno de los mayores contenidos proteicos (80%) (Gorissen *et al.*, 2018); mientras que en otros incluso se ha llegado a comparar contra el aislado proteico de soya (89.7%) y ciertas variedades de frijol (Shevkani *et al.*, 2015).

**Tabla 8.** Análisis proximal de los aislados de frijol, chícharo y amaranto.

Muestra	Proteína	Lípidos	Humedad	Cenizas	Carbohidratos
APF*	68.28 ± 0.78	n/d	n/d	n/d	n/d
APC**	80-84	6-10	n/d	n/d	4-5
APA***	74.19 ± 2.35	1.08 ± 0.01	3.93 ± 0.15	6.74 ± 0.15	13.92 ± 0.64

Los datos se expresan en porcentaje (%) sobre base seca.

(\*) Establecido a partir del ensayo de contenido de proteína. Datos se expresan como la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes.

(\*\*) Establecido de lo expresado por el proveedor.

(\*\*\*) Establecido de los análisis realizados por la unidad de servicios, Facultad de Ciencias Naturales.

Los datos se expresan como la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes.

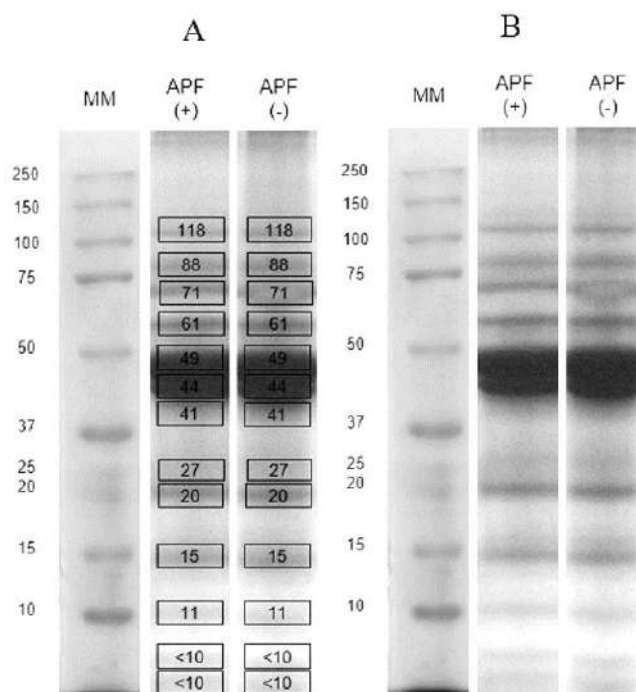
Abreviación: n/d = determinado

### 6.2.3 Análisis de la estructura de los aislados proteicos

#### 6.2.3.1 Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)

Los resultados obtenidos de la electroforesis de APF se pueden observar en el patrón electroforético correspondiente a la **Figura 8**. En él se observa la presencia de un conjunto de subunidades proteicas que rondan de ~10 a ~118 kDa, siendo las bandas predominantes las de ~49 y ~44 kDa que se asocian a la presencia de faseolina. Considerada una glicoproteína de carácter mayormente hidrofóbico y rica en metionina, es reconocida por ser de difícil digestión para las enzimas tripsina, quimiotripsina y pepsina de mamíferos por su estructura compacta y rígida que dificulta el acceso de dichas enzimas, es por ello que la aplicación de tratamientos térmicos resulta esencial para su procesamiento ya que contribuye al desdoblamiento de la proteína, alterando su estructura terciaria y cuaternaria volviéndola susceptible a la proteólisis (Montoya *et al.*, 2010; Nielsen *et al.*, 1988). Estudios previos en la variedad pinto han demostrado la presencia de bandas en intervalos similares a las reportados en el presente trabajo, de entre ~6 a ~202 kDa. La asociación de las bandas es principalmente con las subunidades 7S vicilina a ~41 kDa y fitohemaglutininas a ~27 y 15 kDa (Tan *et al.*, 2014). También se observó la presencia de inhibidor de tripsina a ~20 kDa (Morales-de-León *et al.*, 2007) e inhibidor de  $\alpha$ -amilasa a ~18 kDa (Rui *et al.*, 2011). Por otro lado, la presencia de globulinas y albuminas se asocian a bandas de ~16 a ~86 kDa, siendo faseolina (Globulina G<sub>1</sub>) la proteína predominante (~49) (Morales-de-León *et al.*,

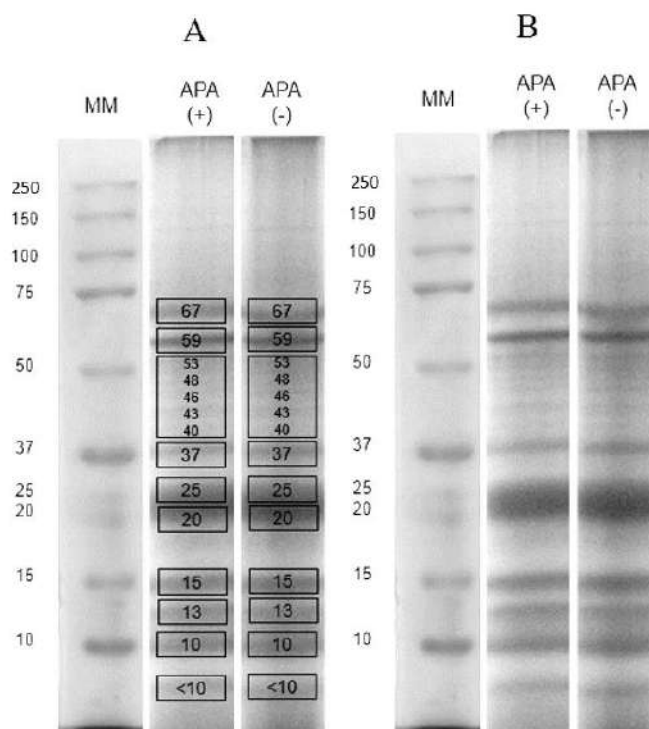
2007). Cabe destacar que no se observaron cambios en condiciones reductoras y no reductoras.



**Figura 8.** Patrón electroforético de APF. Figura A: Patrón con peso molecular; Figura B: Patrón sin peso molecular. (MM) Marcador de peso molecular, (APF +) Aislado proteico de frijol con 2-ME, (APF -) Aislado proteico de frijol sin 2-ME.

En la **Figura 9** se puede observar el patrón electroforético obtenido de APA donde se indica la presencia de un conjunto de subunidades proteicas que van de ~10 a ~67 kDa. Resultados similares han sido reportados previamente, en un rango de ~10 a ~83 kDa (Aceituno-Medina *et al.*, 2013) y ~20 a ~65 kDa (Avanza *et al.*, 2005). Las globulinas, albuminas y glutelinas destacan por ser las fracciones de mayor presencia, siendo las dos primeras ricas en lisina y valina, mientras que las glutelinas aportan mayormente leucina, treonina e histidina (Singh *et al.*, 2019). De estas fracciones, las globulinas 7S y 11S son las principales subunidades de almacenamiento. Globulina 7S puede observarse entre ~41 a ~45 kDa, mientras que globulina 11S posee dos subunidades que se distinguen entre ~33 a ~36

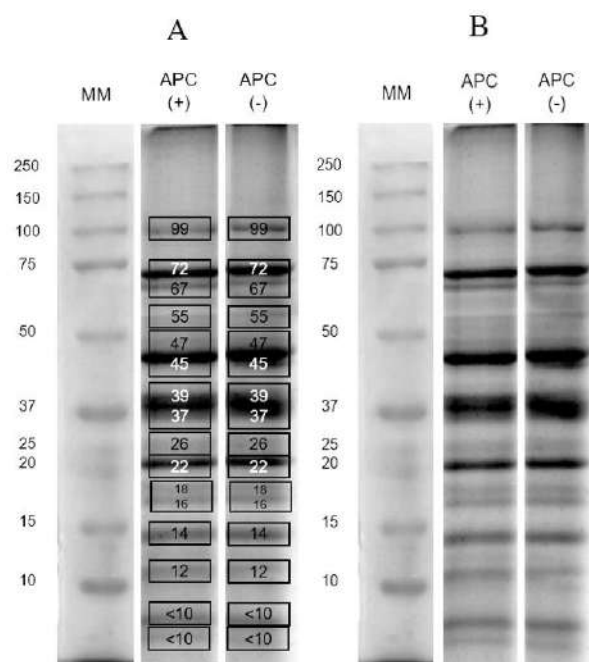
kDa (polipéptido ácido) y ~16 a ~19 kDa (polipéptido básico). En bandas iguales o menores a ~10 kDa se distingue la fracción albumina 2S (Acosta *et al.*, 2016).



**Figura 9.** Patrón electroforético de APA. Figura A: Patrón con peso molecular; Figura B: Patrón sin peso molecular. (MM) Marcador de peso molecular, (APA +) Aislado proteico de amaranto con 2-ME, (APA -) Aislado proteico de amaranto sin 2-ME.

Para el caso de APC, en la **Figura 10** se observa su patrón electroforético. Los resultados indican la presencia de un conjunto de subunidades proteicas en un rango de peso molecular de ~10 a ~99 kDa, siendo las bandas predominantes las de ~72, ~45 y ~37 kDa's, que se asocian a la presencia de convicilina, vicilina y legumina respectivamente. Legumina se caracteriza por un alto contenido de aminoácidos azufrados y arginina, mientras vicilina se caracteriza por alto contenido de isoleucina, leucina, fenilalanina y lisina; por otro lado, convicilina contiene mayormente aminoácidos azufrados. (Lam *et al.*, 2016; Owusu-Ansah, & McCurdy, 1991). Cabe destacar que las fracciones mantuvieron bandas similares bajo condiciones no reductoras y reductoras, lo que podría asociarse a una baja presencia de

enlaces disulfuro, resultados similares a los presentados por Adebisi & Aluko (2011). Previamente se han reportado bandas en leguminosas que van de ~25 a ~75 kDa, donde la gran mayoría de los polipéptidos forman parte de legumina (~37 a ~25 kDa), convicilina (~70 kDa) y vicilina (~50 kDa). La determinación de bandas menores a ~19 sugiere la presencia de compuestos sin enlaces disulfuro (Bogahawaththa *et al.*, 2019).

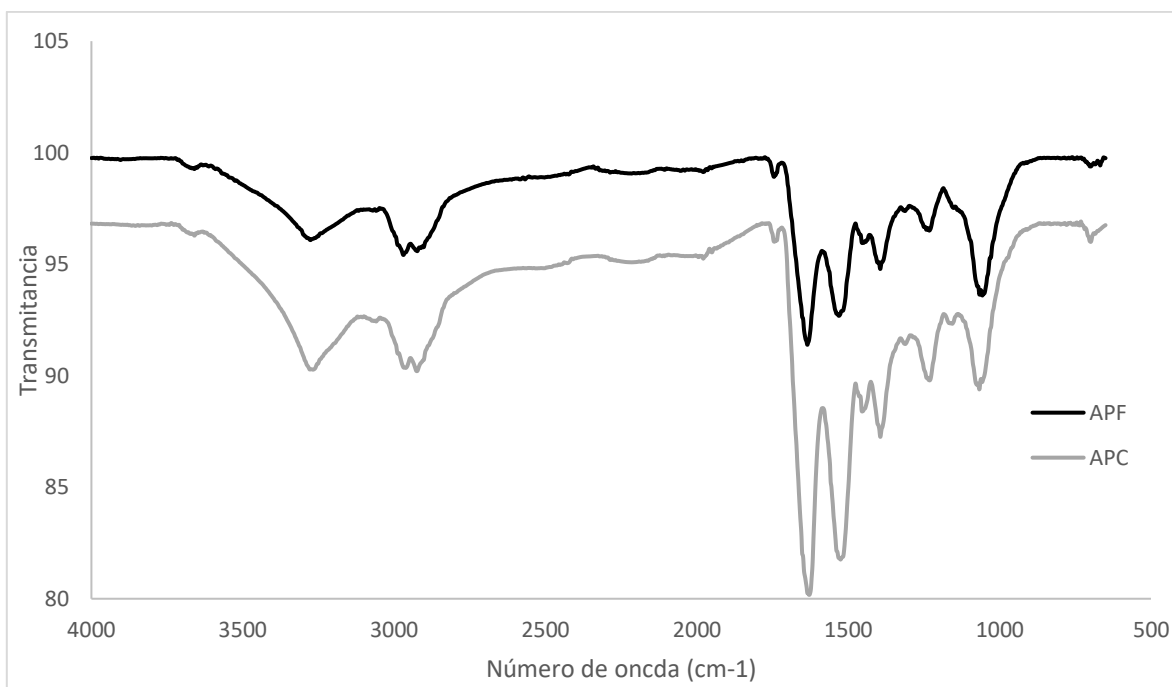


**Figura 10.** Patrón electroforético de APC. Figura A: Patrón con peso molecular; Figura B: Patrón sin peso molecular. (MM) Marcador de peso molecular, (APC +) Aislado proteico de chícharo con 2-ME, (APC -) Aislado proteico de chícharo sin 2-ME.

### 6.2.3.2 FTIR

El espectro IR de APF y APC se muestra en la **Figura 11**. Se puede observar un patrón muy similar en ambos casos. La banda dentro de la región  $3500-3200\text{ cm}^{-1}$  corresponde a Amida A y se asocia a la tensión N-H (frecuencias vibracionales de enlaces hidrógeno intra e intermolecular). La banda dentro de la región de  $3100-3000\text{ cm}^{-1}$  se asocia a la tensión  $=\text{C-H}$  correspondiente a la vibración de compuestos hidrocarbonados insaturados o vibraciones C-H aromáticas pertenecientes a moléculas lipídicas, lo que sugiere la

presencia de fracciones lipídicas en el aislado. Las bandas dentro de la región  $3000-2900\text{ cm}^{-1}$  representan las tensiones antisimétricas y simétricas CH de los grupos metilo y metileno que se encuentran en la cadena alifática de algunas proteínas. Las bandas en las regiones  $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ ,  $1600-1500\text{ cm}^{-1}$  y  $1450-1350\text{ cm}^{-1}$  corresponden a la amida I (tensión C=O), amida II (flexión N-H o tensión C-N) y amida III (tensión C-N) respectivamente. Por otro lado, las bandas a  $1449\text{ cm}^{-1}$  y  $1236\text{ cm}^{-1}$  aproximadamente, se atribuyen a la flexión  $\text{CH}_2$  y a las tensiones C-N; mientras que los picos cerca de  $1152$  y  $1069\text{ cm}^{-1}$  se asocian a la tensión antisimétrica de C-O-C (Tan *et al.*, 2014).



**Figura 11.** Espectro FTIR de APF y APC.

Se realizó la deconvolución de los espectros FTIR de APC (ver **Anexo 2**) y APF (ver **Anexo 3**) con el objetivo de estimar su contenido de estructuras secundarias (**Tabla 9**). Para los tres aislados se observó una predominancia en las estructuras  $\beta$  a pH 7, hecho que se asocia a que las principales subunidades proteicas en estos aislados son las globulinas (Rahmati *et al.*, 2018), mismas que poseen un muy bajo contenido de hélice  $\alpha$  (Rui *et al.*, 2011). Dichas estructuras, en especial hoja  $\beta$ , limitan el acceso de las enzimas para ejercer

su acción proteolítica, ofreciendo resistencia frente a la digestión (Montoya *et al.*, 2010), pero además resultan esenciales para favorecer las interacciones proteína-proteína durante la formación de un gel por medio de los puentes hidrogeno intermoleculares que funcionan como zonas de unión, estabilizando la red (Avanza, 2005). En el caso de APF, Carbonaro *et al.*, (2012) reportaron valores de hoja  $\beta$  similares a los encontrados en el presente trabajo (43.6%), estructura que asocian a la predominancia de la globulina 7S. Por su parte, Cortez-Trejo *et al.*, (2021) reportaron valores similares en cuanto a contenido de estructuras  $\beta$  (41.78% de hoja  $\beta$  y 37.33% para giro  $\beta$ ), mientras que las estructuras en espiral al azar y hélice  $\alpha$  fueron las de menor presencia.

En el caso del APC, Shevkani *et al.*, (2015) establecieron que las estructuras  $\beta$  eran las predominantes en los aislados de chícharo (30% de hoja  $\beta$  y 21.7% de giro  $\beta$ ); datos que concuerdan con el estudio de Cui *et al.*, (2020) donde establecieron rangos de valores para diferentes cultivares de chícharo amarillo (48.78-50.03% de hoja  $\beta$  y 6.24-16.15% de giro  $\beta$ ), ambos casos a pH 7. Sin embargo, en dichos trabajos se observó la tendencia por un contenido elevado de hélice  $\alpha$  en contraste con el obtenido en el presente trabajo (28.0% y 19.64-23.04%, respectivamente). Se ha observado en aislados proteicos de frijol que al someter la proteína a temperaturas de 60-65°C o incluso 70-75°C provoca un incremento en la estructura hoja  $\beta$  como parte de una agregación térmica (Rui *et al.*, 2011), efecto que pudo derivarse del tratamiento térmico por parte del proveedor al APC, generando una reducción en las otras estructuras.

**Tabla 9.** Estructura secundaria de los aislados (pH=7) por deconvolución del espectro FTIR.

<b>Muestra</b>	<b>Hoja <math>\beta</math></b>	<b>Giro <math>\beta</math></b>	<b>Espiral al azar</b>	<b>Hélice <math>\alpha</math></b>
APF	44.80	33.81	20.97	0.43
APC	35.51	32.40	31.72	0.38
APA*	39.04	39.20	19.16	2.60

Los datos se expresan en porcentaje (%).

(\*) Extraído de Cortez-Trejo *et al.*, 2021



### VI.2.3.3 DSC

Se realizaron diferentes metodologías para obtener los termogramas por DSC, esto por problemas durante la realización del análisis. Inicialmente las muestras se prepararon añadiendo a los aislados 5  $\mu$ l de agua desionizada una vez pesados en los crisoles (Ladjal-Ettoumi *et al.*, 2015), otra preparación de muestra para DSC fue la obtención de suspensiones al 15% (Shevkani *et al.*, 2015). En ambos casos, durante el uso del equipo de DSC se observó la apertura de los crisoles; es por ello por lo que se decidió realizar el análisis de las muestras en seco, sin embargo, se observó un desplazamiento de los picos debido al efecto que el agua ejerce en el análisis de la muestra al acortar los rangos de temperatura del barrido (León *et al.*, 2003). En la **Tabla 10** se exponen los resultados obtenidos para las diferentes muestras analizadas.

**Tabla 10.** Temperatura y entalpía de desnaturalización de los aislados proteicos.

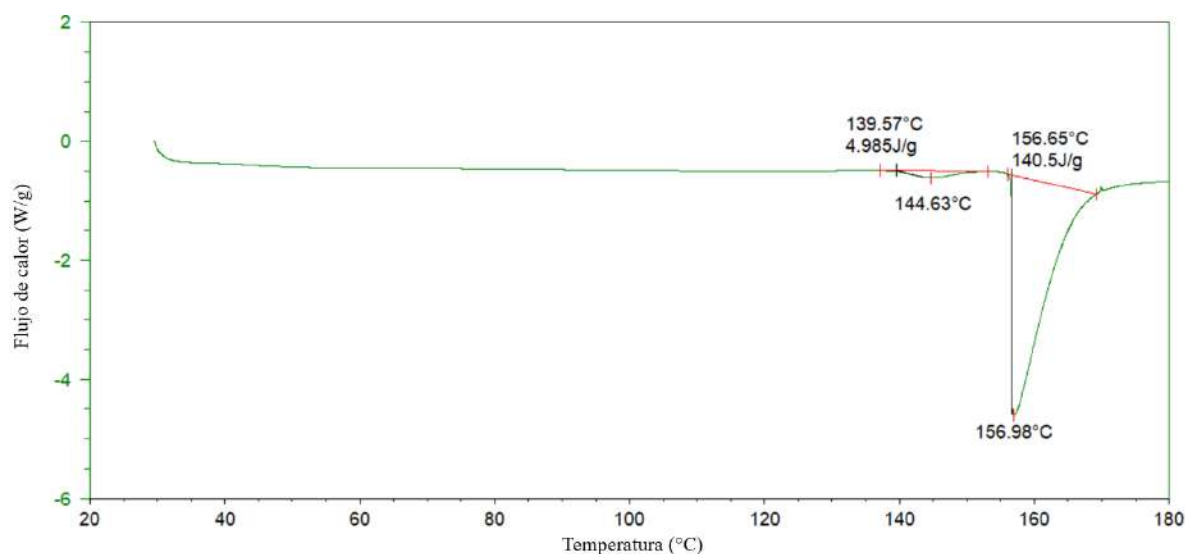
Muestra	T <sub>0</sub>	T <sub>d</sub>	$\Delta H$
APF	156.7	156.9	140.5
APA	122.8	122.9	0.48
APC	151.7	152.0	4.47

T<sub>0</sub>: Temperatura inicial expresada en °C; T<sub>d</sub>: Temperatura de desnaturalización expresada en °C;  $\Delta H$ : Entalpía de desnaturalización expresada en J/g.

En la **Figura 12** se observa el termograma obtenido para el aislado proteico de frijol. Se pueden observar dos eventos endotérmicos, el primero a 144.6°C y el segundo a 156.9°C. El primero se puede asociar a la temperatura de desnaturalización de la fracción vicilina mientras que la T<sub>d</sub> más alta corresponde a la desnaturalización de legumina, encontrándose reportados en la literatura dentro de un rango de 75.2-110.2°C (Peña-Cháidez *et al.*, 2021; Sharan *et al.*, 2021; Tan, *et al.*, 2014; Rui *et al.*, 2011).. Cabe destacar que, dentro de las leguminosas, incluso frente a otras especies de frijol, como el frijol pinto posee uno de los valores T<sub>d</sub> más elevados, lo que se asocia a una elevada estabilidad térmica de sus proteínas globulares (Tan, *et al.*, 2014). Esto puede resultar contraproducente al momento de buscar la formación de un gel debido a que dichas proteínas deben pasar previamente por un proceso de desnaturalización para posteriormente continuar con el proceso de agregación,

volviéndolas reactivas y favoreciendo la formación de puentes hidrogeno intermoleculares, pudiendo requerir temperaturas de hasta 115-117°C (Aliabbasi *et al.*, 2021).

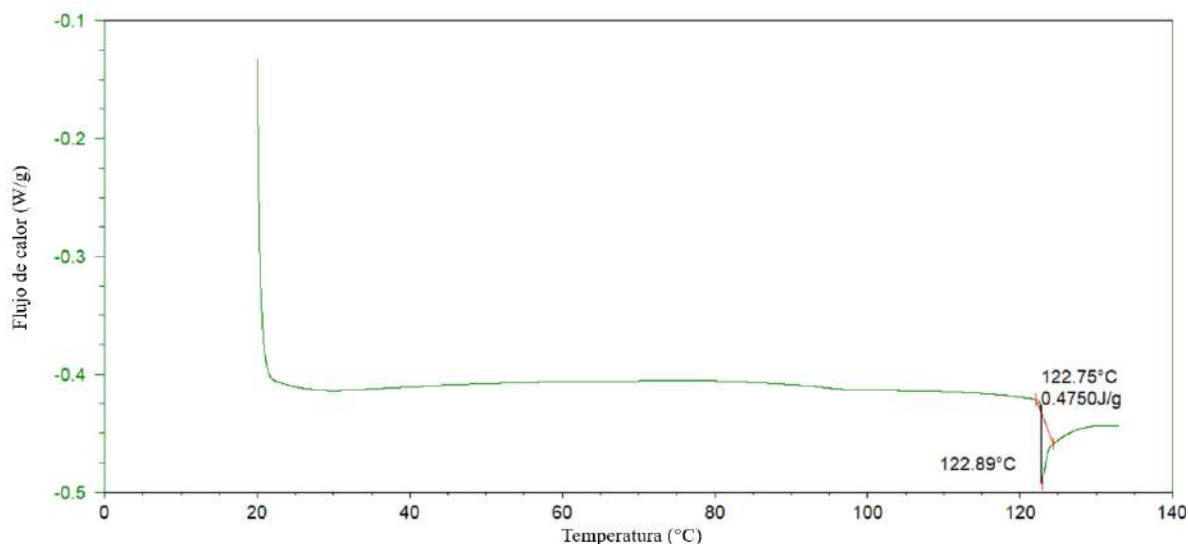
La entalpia de desnaturalización ( $\Delta H$ ) expresada como J/g de proteína fue de 140.5 J/g. En este caso,  $T_d$  hace referencia a la estabilidad de las proteínas frente a la temperatura y  $\Delta H$  nos expresa la proporción de proteína desnaturalizada, representando la extensión de una estructura proteica ordenada (Ling *et al.*, 2019; Shevkani *et al.*, 2015). Rui *et al.*, (2011) reportaron un valor de entalpia de 10.4 J/g en una muestra de aislado proteico de frijol variedad pinto saltillo al analizar a partir de una concentración de 10% (p/v) y un rango de temperatura de 20-120°C.



**Figura 12.** Termograma de APF.

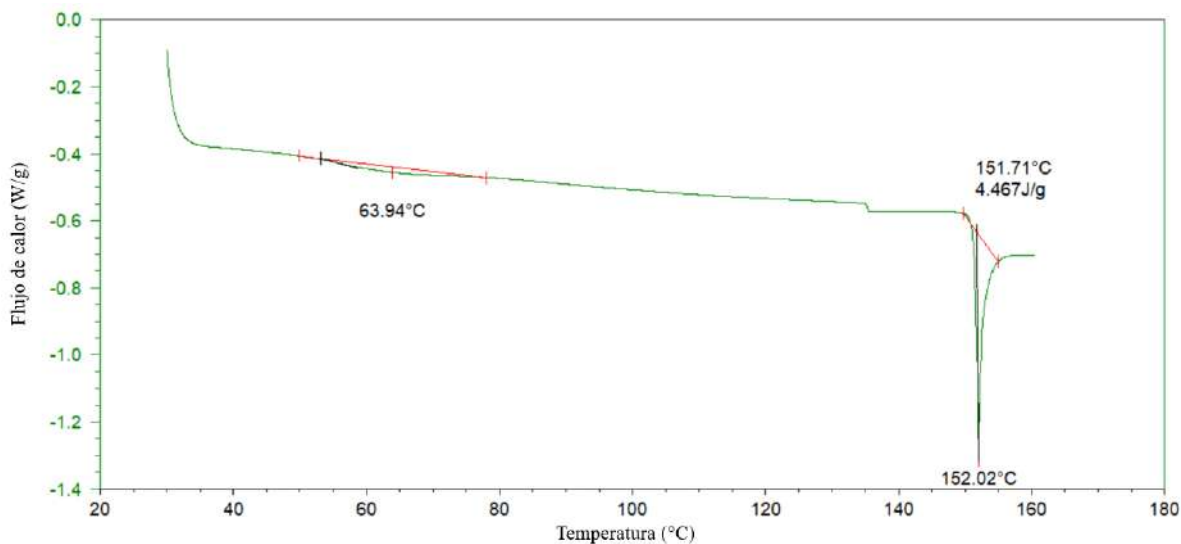
En la **Figura 13** se observa el termograma generado a partir del APA. Se encontró la presencia de un solo pico correspondiente a  $T_d = 122.89^\circ\text{C}$ . Acorde a la literatura, aislados proteicos de amaranto usualmente presentan dos picos endotérmicos donde el primero corresponde a la desnaturalización de globulina 7S, albuminas y globulinas, y el segundo a la desnaturalización de globulinas y glutelinas (Martínez & Anón, 1996). Cordero-de-los-Santos *et al.*, (2005) reportaron un pico a 78.3°C y otro a 98.7°C, siendo este último el de mayor predominancia, y una  $\Delta H$  total de 3.0 J/g de proteína de ambas transiciones. Por otro

lado, Bejarano-Luján *et al.*, (2010) establecieron valores de  $T_d$  en  $69.87^\circ\text{C}$  y  $101.57^\circ\text{C}$  encontrando valores de  $\Delta H$  en un rango de 1.55 a 6.85 J/g de proteína. Los datos de  $\Delta H$  difieren de los estudios previamente mencionados, con un valor de 0.48 J/g de proteína.



**Figura 13.** Termograma de APA.

En la **Figura 14** se puede observar el termograma obtenido para el APC. Se observó la presencia de un único pico correspondiente a  $T_d$  a  $151.71^\circ\text{C}$ . Acorde a la literatura, este puede ubicarse dentro de un rango de  $71.40$ - $104.6^\circ\text{C}$  (Feyzi *et al.*, 2018; Ladjal-Ettoumi *et al.*, 2015; Shevkani *et al.*, 2015; Osen *et al.*, 2014). Aguilar-Vázquez *et al.*, (2018) llevaron a cabo el análisis de APC en base seca como se realizó en el presente estudio, reportando un pico endotérmico a  $188^\circ\text{C}$  correspondiente a su punto de fusión. La entalpia ( $\Delta H$ ) para la muestra fue de 4.47 J/g. Osen *et al.*, (2014) reportaron una entalpia de 1.3 J/g para aislado de chícharo (*Pisum sativum*), mientras Feyzi *et al.*, (2018) reportaron valores de 16.8 y 12.6 J/g en dos muestras de chícharo de hierba (*Lathyrus sativus* L.). Además, se observa una transición térmica a  $63.9^\circ\text{C}$  que se puede asociar a la gelatinización del almidón, dato que coincide con lo reportado por Wee *et al.*, (2019) donde establecen rangos de  $60$ - $65^\circ\text{C}$  para este fenómeno.



**Figura 14.** Termograma de APC.

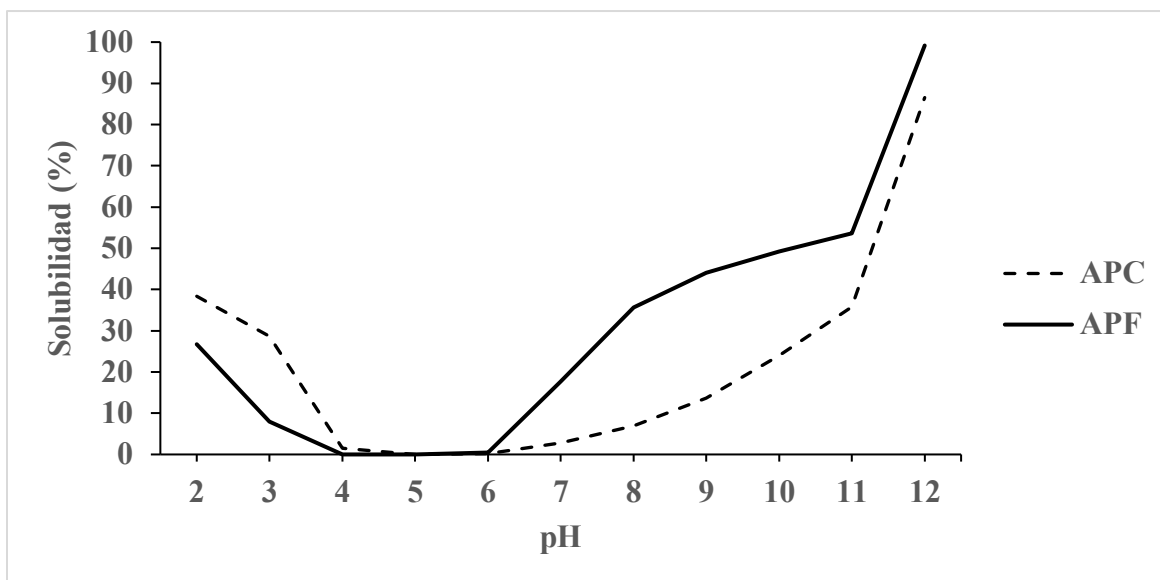
#### 6.2.4 Solubilidad de los aislados proteicos

La solubilidad de APF resultó ser mayor frente al APC (**Figura 15**), estudios previos han demostrado que los aislados proteicos de diversas variedades de frijol poseen una solubilidad elevada frente a otros aislados de leguminosas como lo es el chícharo, lenteja, garbanzo, e incluso otros aislados vegetales como la canola y soya (Rahmati *et al.*, 2018).

La mayor solubilidad para APC se observó a pH 12 (88.83%) mientras que la menor solubilidad se registró a pH 4-5. Los resultados concuerdan con lo reportado previamente en la literatura, asociando una elevada solubilidad de estas proteínas a pH alcalino, baja solubilidad cercana al punto isoeléctrico y moderada a pH ácido (Tömösközi *et al.*, 2001). La baja solubilidad proteica a pH 4.5 (punto isoeléctrico) se asocia a que las proteínas adquieren una carga neta de cero, inhibiendo cualquier fuerza de repulsión electrostática y promoviendo la formación de agregados; por otro lado, a pH altos se genera un incremento en la carga total negativa, favoreciendo la disociación de los agregados e incremento así la solubilidad (Ladjal-Ettoumi *et al.*, 2015; Scopes, 1993).

Para APF se observó un comportamiento similar al de APC. Los resultados obtenidos concuerdan con los ya reportados en la bibliografía, donde se presenta nula solubilidad dentro

del rango de pH de 4-5.5, mientras que los valores mejoran por debajo de pH 3 (8.01%) y por arriba de pH 6 (0.50%) (Tan, *et al.*, 2014). En otros estudios, la mejora de la solubilidad resulta por arriba del pH 7 (17.65%), mientras que el valor mínimo se registra a pH 5, y se observa una alta solubilidad a pH 12 (99.17%) (Cortez-Trejo *et al.*, 2021).



**Figura 15.** Solubilidad de APC y APF.

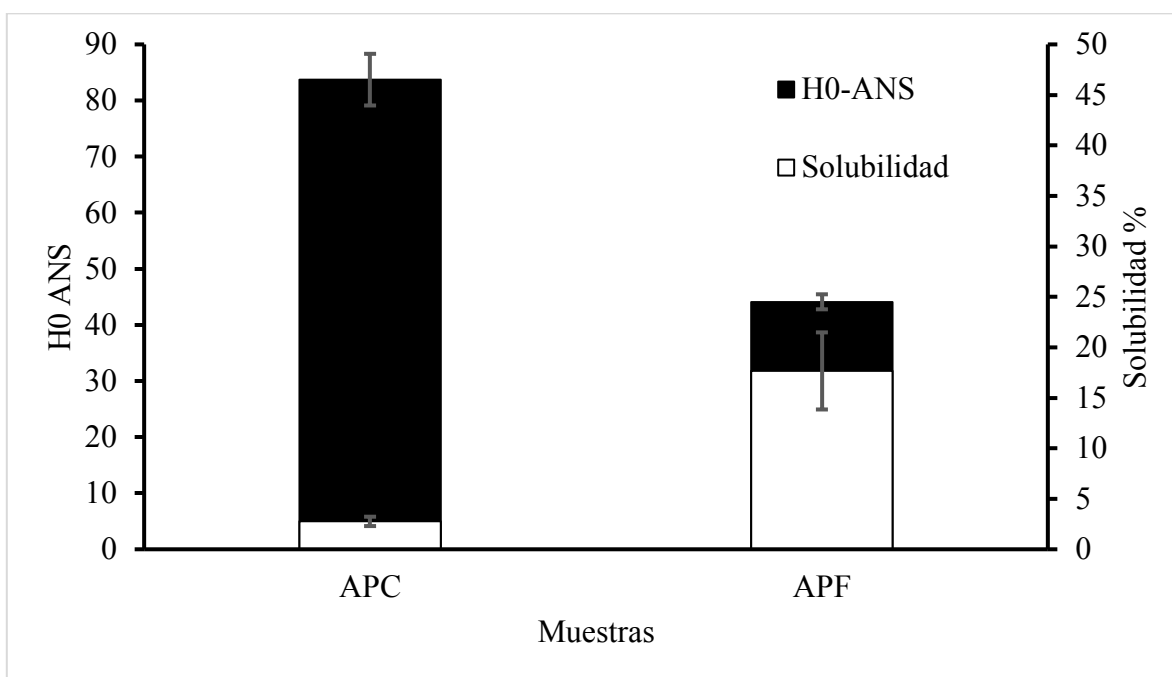
En cuanto a la solubilidad del APA, Cortez-Trejo *et al.*, (2021) reportaron la solubilidad más baja a pH 5, correspondiente a su punto isoeléctrico; mientras que el comportamiento de la curva resultó muy similar al de APC y APF, con un incremento de la solubilidad a pH >3 y <7.

### 6.2.5 Hidrofobicidad ( $H_0$ )

La hidrofobicidad de los aislados proteicos se evaluó a pH 7. En la muestra de APC se observó una mayor hidrofobicidad superficial, en contraste con APF (**Figura 16**). Shevkani *et al.*, (2015) reportaron la hidrofobicidad superficial de 5 muestras de aislados proteicos de chícharo con un promedio de 563. El incremento en la hidrofobicidad se asocia a procesos térmicos, mismos que favorecen el desdoblamiento de las proteínas y la

exposición de aminoácidos hidrofóbicos. Esta exposición promueve las interacciones proteína-proteína y por ende la agregación (Burger & Zhang, 2019).

En la muestra de APF se observó una baja hidrofobicidad superficial, acorde a lo reportado previamente por Cortez-Trejo *et al.*, 2021. Los autores sugieren que la hidrofobicidad incrementa debido a que el pH disminuye, hecho que concuerda con lo ya reportado en la literatura (Rahmati *et al.*, 2018), denotando una relación inversa entre la solubilidad proteica y la hidrofobicidad superficial, comportamiento que se asocia a la estructura que adquiere una proteína con la influencia del pH, permitiendo una mayor exposición de los residuos hidrofílicos o, en su caso, hidrofóbicos.

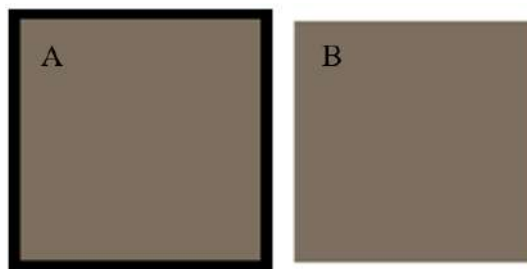


**Figura 16.** Solubilidad e hidrofobicidad superficial de APC y APC a pH 7.

Por otro lado, Cortez-Trejo *et al.*, (2021) reportaron valores de  $H_0$ -ANS para APA dentro de un rango de pH 2 a 9, estableciendo un valor de 30 aproximadamente para pH 7.

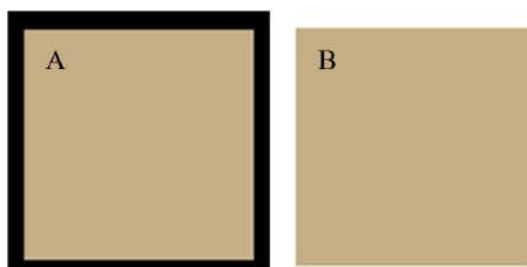
## 6.2.6 Color

En la **Tabla 11** pueden observarse los valores de los parámetros colorimétricos para cada aislado, considerando que el valor  $L^*$  corresponde de blanco a negro,  $a^*$  de rojizo a verdoso y  $b^*$  de amarillento a azulado (Hu *et al.*, 2009). En el caso de APF (**Figura 17**), en el estudio llevado a cabo por Wani *et al.*, (2015) se establecieron rangos de valor para aislados de diferentes variedades de frijol riñón. El valor de  $L^*$  se encontraba dentro del rango de 81.25-83.21, el valor de  $a^*$  de 0.14-1.20 y  $b^*$  de 7.82-12.57. Los datos obtenidos se encuentran dentro del rango para  $b^*$  y cercanos a  $a^*$ . Un bajo parámetro de  $L^*$  se asocia principalmente a su proceso de obtención, ya que se ha demostrado que la liofilización de proteínas de frijol descascaradas, molidas, extraídas por alcalinización y precipitadas a punto isoeléctrico generan una coloración oscura (Sharan *et al.*, 2021). Algunos autores asocian este comportamiento al contenido de polifenoles que se unen a proteínas y co-precipitan durante la extracción, produciendo la oxidación de dichos compuestos y generando pigmentos coloreados (Steffolani *et al.*, 2016; Salcedo-Chávez *et al.*, 2002); sin embargo, López *et al.*, (2018) al analizar aislados proteicos de chíá, encontraron que las interacciones proteínas-polifenoles no eran responsables de la disminución en luminosidad al comparar dicho valor en dos muestras de aislado proteico de chíá con contenidos similares de polifenoles (0.133 mg de ácido gálico/mg de aislado), obteniendo valores diferentes para cada muestra. Concluyeron que valores bajos de  $L^*$  y altos de  $b^*$  se debían principalmente al contenido de cenizas. Cabe destacar que los parámetros colorimétricos de un aislado proteico de frijol varía ampliamente dependiendo la variedad de frijol utilizado; por lo que en la actualidad no existe referencia acerca del color de APF variedad pinto saltillo para establecer una comparativa.



**Figura 17.** Pigmentación de APF acorde a los resultados de parámetros colorimétricos. Figura A: Color en fondo negro; Figura B: Color en fondo blanco.

Los parámetros colorimétricos del APC (**Figura 18**) coinciden con lo reportado en la bibliografía, siendo  $L^*$  (79.36) el valor más alto, seguido por  $b^*$ (15.20) y  $a^*$  (-1.26) (Feyzi *et al.*, 2018). Estudios han demostrado que el color amarillo-crema de la harina de chícharo ( $L= 90$ ) tiende a oscurecer cuando se hace un aislado ( $L= 80$ ). El aislado posee un rango de color que va del crema al beige y que es dependiente del proceso de extracción (Owusu-Ansah & McCurdy, 1991). Cabe destacar que cuando un aislado proteico es sometido a un tratamiento térmico, ocurre el efecto de pigmentación o generación de melanoidinas propio de una reacción de Maillard, lo que conlleva a un valor  $L^*$  menor (Feyzi *et al.*, 2018), lo que contribuye a explicar un valor menor al esperado en este aislado.

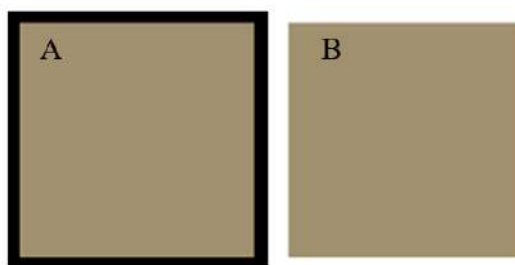


**Figura 18.** Pigmentación de APC acorde a los resultados de parámetros colorimétricos. Figura A: Color en fondo negro; Figura B: Color en fondo blanco.

Para los parámetros de APA (**Figura 19**), López *et al.*, (2019) realizaron una revisión bibliográfica sobre dichos parámetros en diferentes aislados de amaranto, obteniendo valores diferentes a los reportados ( $b^*$  11,  $a^*$  <1 y  $L^*$  80 aproximadamente); sin embargo, prevaleció



lo concluido por los autores, teniendo un valor del parámetro  $L^*$  mayor a  $a^*$  y  $b^*$ . Dichos valores difieren a los obtenidos por Cordero-de-los-Santos *et al.*, (2005) donde reportan valores de 75.6 para  $L^*$  y 9.3 para  $b^*$ . Valores altos de los parámetros  $a^*$  y  $b^*$ , y bajos de  $L^*$  se asocian a contenidos elevados de cenizas en un aislado (López *et al.*, 2019). Este incremento en el valor de cenizas puede deberse principalmente a que la sal utilizada para la solubilización durante el preparado del concentrado queda como remanente, formando parte del producto final (de-Mendoza *et al.*, 2006). Cordero-de-los-Santos *et al.*, (2005) no reportan valores de cenizas, López *et al.*, (2018) reportan valores bajos de  $L^*$  frente a contenidos de cenizas considerados como altos (7.24%) en harinas. Considerando que APA demostró un contenido de 6.74% de cenizas.



**Figura 19.** Pigmentación de APA acorde a los resultados de parámetros colorimétricos. Figura A: Color en fondo negro; Figura B: Color en fondo blanco.

El valor  $C^*$  o cromaticidad corresponde al índice de saturación utilizado para reconocer los diferentes tonos frente al gris, utilizando la misma luminosidad. Entre mayor es su valor, mayor es la intensidad del color. En general, los valores de  $C^*$  resultaron significativamente diferentes entre una muestra y otra. Se puede concluir que dicho valor fue bajo entre las muestras con un rango de 11.30-25.08 donde APF ( $11.30 \pm 0.01$ ) demostró menor luminosidad en comparación con APC ( $25.08 \pm 0.04$ ) (Ucán & Lorenzo, 2017). El ángulo H o valor *Hue* ( $^\circ$ ) se utiliza para definir colores con referencia al gris con la misma luminosidad, lo que se correlaciona con diferencias en la absorbancia a diferentes longitudes de ondas. Se obtuvo resultados significativamente diferentes en un rango de 70.97-83.55 para dicho valor, lo que implica una magnitud de ángulo pequeña con un brillo análogo y de baja intensidad (Lara-Castellanos, 2018)

**Tabla 11.** Parámetros de color de los diferentes aislados proteicos.

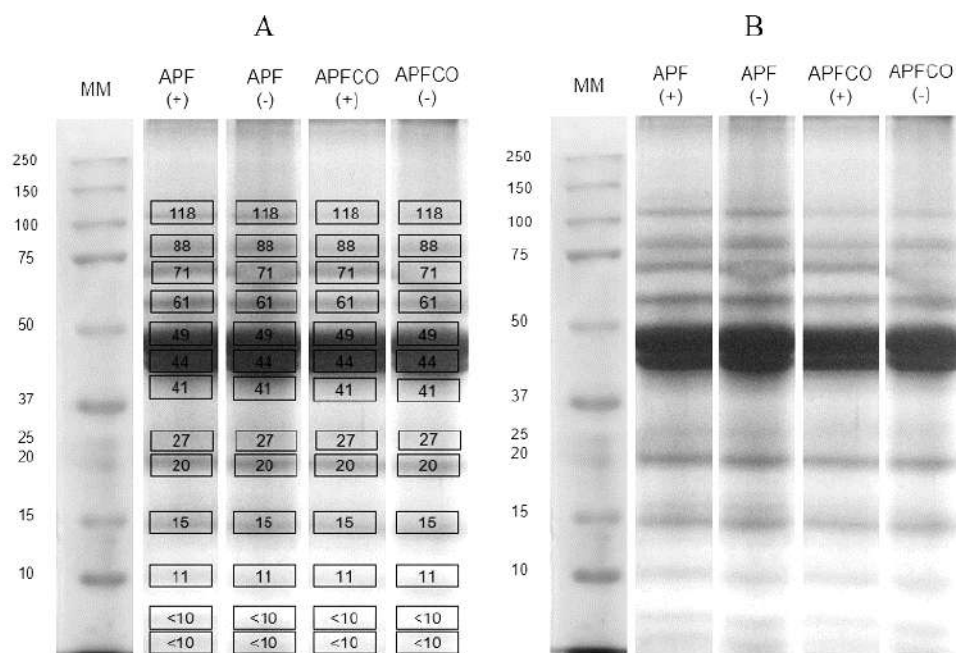
Muestra	L*	b*	a*	C*	Hue (°)
APF	47.65 ± 0.00 <sup>C</sup>	10.68 ± 0.01 <sup>C</sup>	3.68 ± 0.00 <sup>B</sup>	11.30 ± 0.01 <sup>C</sup>	70.97 ± 0.03 <sup>C</sup>
APC	72.47 ± 0.19 <sup>A</sup>	24.73 ± 0.04 <sup>A</sup>	4.15 ± 0.01 <sup>A</sup>	25.08 ± 0.04 <sup>A</sup>	80.48 ± 0.05 <sup>B</sup>
APA	60.80 ± 0.33 <sup>B</sup>	20.34 ± 0.09 <sup>B</sup>	2.30 ± 0.08 <sup>C</sup>	20.47 ± 0.10 <sup>B</sup>	83.55 ± 0.21 <sup>A</sup>

Los datos se expresan como la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes.

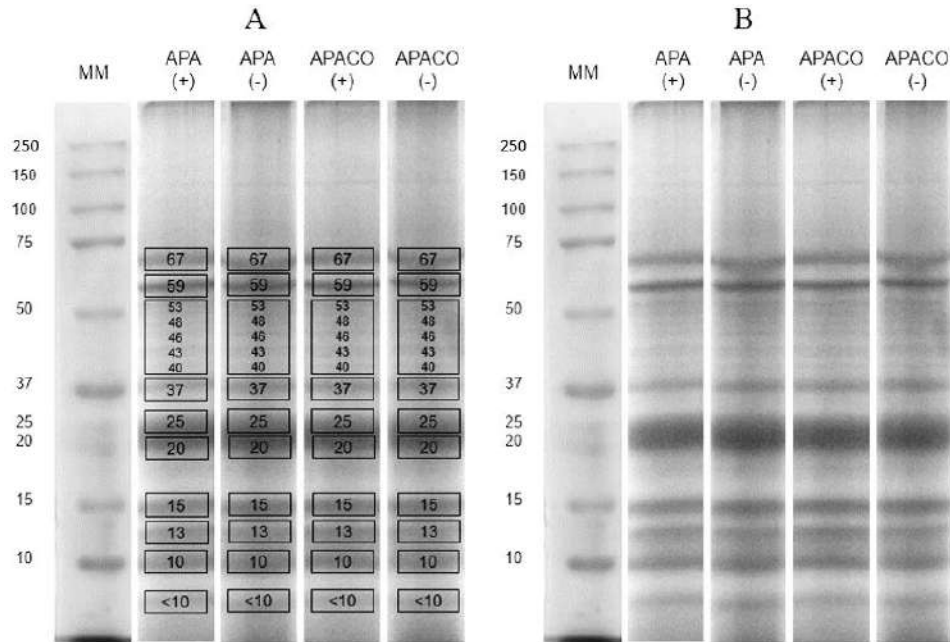
## 6.3 Resultados fase experimental #2

### 6.3.1 Electroforesis desnaturalizante de los aislados con y sin tratamiento térmico

Los perfiles electroforéticos de APF/APFCO (**Figura 20**) y APA/APACO se muestran en la **Figura 21** y no presentan cambios en el patrón electroforético. En estudios previos donde se implementaron tecnologías emergentes como la extrusión con elevada humedad en aislados proteicos de chícharo comerciales, se han observado cambios en los patrones electroforéticos, asociados a la formación de una red macromolecular en los extrudidos (Osen *et al.*, 2015). Cabe destacar que las condiciones térmicas que se utilizan dentro de un extrusor (60 hasta 140°C) son lo suficientemente elevadas para provocar la desnaturalización de proteínas y formar asociaciones proteína-proteína, o incluso reaccionando con macromoléculas no proteicas presentes en las muestras (Chen *et al.*, 2011). Este efecto disminuye la solubilidad de proteínas. Por otro lado, en un estudio realizado por Cha (2011), al someter aislado proteico de soya a calentamiento óhmico, no se observaron cambios en el patrón electroforético, hecho que asocian a que dicho tratamiento térmico no genera hidrólisis en la proteínas, manteniendo su estructura primaria intacta. Se puede proponer entonces que, posterior al tratamiento térmico, los aislados no presentaron hidrólisis proteica ni interacciones proteína-proteína o interacciones con otro tipo de macromolécula no proteica, algo que se esperaba inicialmente por tratarse de un tratamiento térmico que garantiza un calentamiento rápido y uniforme, y que garantiza la integridad de las partículas (Li *et al.*, 2018).



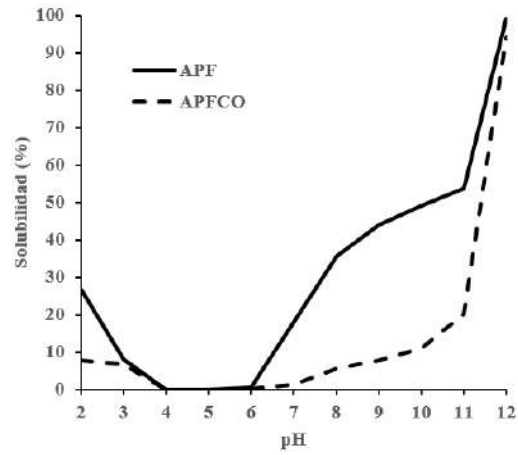
**Figura 20.** Patrón electroforético de APF. Figura A: Patrón con peso molecular; Figura B: Patrón sin peso molecular. (MM) Marcador de peso molecular, (APF +) Aislado con 2-ME, (APF -) Aislado sin 2-ME, (APFCO +) Aislado con CO con 2-ME, (APFCO -) Aislado con CO sin 2-ME.



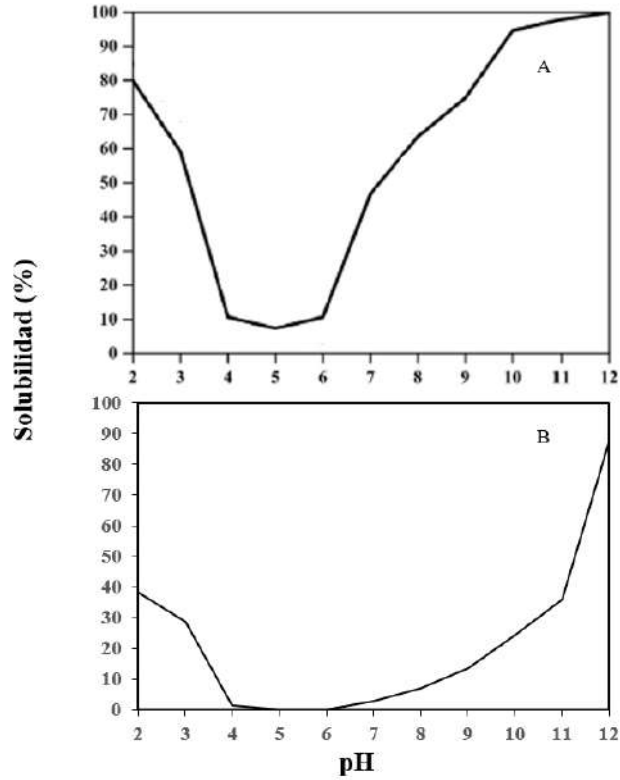
**Figura 21.** Patrón electroforético de APA y APACO. Figura A: Patrón con peso molecular; Figura B: Patrón sin peso molecular. (MM) Marcador de peso molecular, (APA +) Aislado con 2-ME, (APA -) Aislado sin 2-ME, (APACO +) Aislado con CO con 2-ME, (APACO -) Aislado con CO sin 2-ME.

### 6.3.2 Solubilidad de los aislados con y sin tratamiento térmico

Contrario a lo que se esperaba, se observó una reducción de la solubilidad en APFCO y APACO frente APF (**Figura 22**) y APA (**Figura 23**), encontrando una reducción importante de dicho parámetro posterior al tratamiento térmico. Aunque en la literatura no existen valores de referencia para los aislados con CO, su comportamiento se puede adjudicar a que las proteínas sufren de un desdoblamiento completo al ser sometidas a un tratamiento térmico agresivo, lo que facilita el proceso de agregación y por ende la baja solubilidad de las proteínas (Brishti *et al.*, 2020). La baja solubilidad proteica que sufrieron los aislados es comparable con lo ocurrido durante el proceso de cocción de la semilla de frijol.



**Figura 22.** Solubilidad de APF y APFCO a diferentes pH.



**Figura 23.** Solubilidad de APA y APACO a diferentes pH. Figura A: Solubilidad reportada para APA (Extraído de: Cortez-Trejo et al., 2021); Figura B: Solubilidad obtenida de APACO.

## 6.5 Resultados fase experimental #3

### 6.5.1 Composición proximal y contenido de aminoácidos totales de la mezcla

Se obtuvo el análisis proximal de la mezcla seleccionada para trabajar (**Tabla 12**). El contenido de proteína se puede atribuir a su mayor contenido en APC (50%), mismo que por su composición, resultó ser el de mayor pureza (80%) frente al APA y APF. Por otro lado, el contenido de carbohidratos puede ser atribuible al APA, ya que acorde a lo establecido en la bibliografía, en aislados de variedad frijol negro se reportan contenido de carbohidratos de  $8.2 \pm 0.09$  (Morales-de-León *et al.*, 2007), mientras que, en otro estudio realizado en 9 variedades diferentes, se reportó un contenido de carbohidratos de 4.49-10.03% en los aislados (Rui *et al.*, 2011). En cuanto al contenido de lípidos, este se esperaba que fuera mayor considerando que APC tenía un contenido de 6-10% y era el de mayor composición en la mezcla.

**Tabla 12.** Composición química de la mezcla de aislados proteicos.

Muestra	Proteína	Lípidos	Humedad	Cenizas	Carbohidratos
Mezcla*	$76.157 \pm 0.027$	$0.763 \pm 0.003$	$3.950 \pm 0.005$	$3.362 \pm 0.007$	$15.768 \pm 0.012$
APF**	$68.28 \pm 0.78$	n/d	n/d	n/d	n/d
APC***	80-84	6-10	n/d	n/d	4-5
APA****	$74.23 \pm 0.57$	$1.08 \pm 0.01$	$3.93 \pm 0.15$	$6.74 \pm 0.15$	$13.92 \pm 0.64$

Los datos se expresan en porcentaje (%) sobre base seca.

(\*) Establecido de los análisis realizados por la unidad de servicios, Facultad de Ciencias Naturales. Los datos se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes.

(\*\*) Establecido a partir del ensayo de contenido de proteína. Datos se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes.

(\*\*\*) Establecido de lo expresado por el proveedor.

(\*\*\*\*) Establecido de los análisis realizados por Laboratorio Euronutec. Los datos se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes.

Abreviación: n/d = determinado

La composición de aminoácidos de la mezcla, aunque resultó distinto a lo esperado en cuanto a distribución, el contenido total de aminoácidos esenciales fue similar al previamente establecido en la literatura (**Tabla 13**); esto considerando que hubo reportes incompletos en la composición previamente descrita (**Tabla 6**). Aunque dentro de la

bibliografía los resultados en aislados proteicos y sus harinas de origen poseen contenido de aminoácidos casi similares (Sharan *et al.*, 2021; Tomozkosi *et al.*, 2001; Bejosano & Corke, 1998; Fernández-Quintela *et al.*, 1997), la tendencia es observar un contenido mayor de aminoácidos en los aislados. Considerando que el estudio actual partió de contenidos relativos basados en la literatura, era de esperarse diferencias en el contenido de aminoácidos entre las harinas y el de los aislados. Cabe destacar que el consumo elevado de fenilalanina puede ser contraproducente en pacientes que experimentan fenilcetonuria (Benevenga & Steele, 1984) e hiperfenilalanemia (Matthews, 2007); sin embargo, en pacientes que no presentan defectos en el sistema de hidroxilación (fenilalanina hidroxilasa, coenzima tetrahidrobiopterina o BH<sub>4</sub> y varias enzimas que participan en la regeneración de BH<sub>4</sub>), el exceso de fenilalanina seguirá la ruta de oxidación hacia tirosina hasta convertirse en CO<sub>2</sub> y agua (Kaufman, 1999).

**Tabla 13.** Composición de aminoácidos de la mezcla acorde a la literatura contra el real.

Aminoácido	Composición literatura*		Composición total	
	100 g	15 g	100 g	15 g
Histidina	1.85	0.28	1.20	0.18
Isoleucina	3.80	0.57	2.91	0.44
Leucina	6.91	1.04	4.64	0.70
Lisina	6.56	0.98	0.01	0.00
Metionina + Cisteína	6.27	0.94	0.01	0.00
Fenilalanina + Tirosina	5.97	0.90	20.69	3.10
Treonina	3.56	0.53	2.98	0.45
Triptófano	0.39	0.06	0.03	0.01
Valina	4.69	0.70	10.30	1.55
<b>Aminoácidos totales</b>	<b>39.97</b>	<b>5.99</b>	<b>42.76</b>	<b>6.41</b>

Los datos se expresan en gramos.

(\*) Composición de aminoácidos de acuerdo con lo expresado en la literatura

## 6.5.2 Resultados de ensayos de conductividad

Los resultados obtenidos de los ensayos de conductividad se muestran en la **Tabla 14**.

**Tabla 14.** Conductividad inicial y final de los diferentes voltajes utilizados en estudios preliminares.

Parámetros	Tratamientos			
	20 V	30 V	40 V	50 V
Voltaje inicial (V)	20	31	40.8	50.1
Intensidad inicial (A)	0.059	0.18	0.222	0.284
Resistencia inicial ( $\Omega$ )	338.983	172.222	183.784	176.408
Resistividad inicial ( $\Omega\text{m}$ )	4.542	2.308	2.463	2.364
Voltaje final (V)	22.5	32.3	40.6	48.1
Intensidad final (A)	0.182	0.250	0.263	0.268
Resistencia final ( $\Omega$ )	123.626	129.2	154.373	179.478
Resistividad final ( $\Omega\text{m}$ )	1.657	1.731	2.069	2.405
Conductividad inicial (S/m)	0.220	0.433	0.406	0.423
Conductividad final (S/m)	0.604	0.578	0.483	0.416

Los datos se expresan a partir de una sola réplica.

Se determinó usar 30 y 40 V debido a que en el resto de los tratamientos no se alcanzó la temperatura requerida para el experimento (**Tabla 15**).



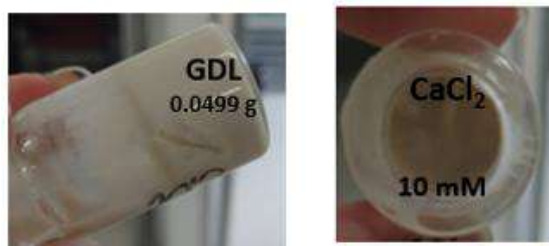
**Tabla 15.** Parámetros obtenidos de los diferentes voltajes utilizados en estudios preliminares.

Parámetros	Tratamientos			
	20 V	30 V	40 V	50 V
Temperatura inicial (°C)	23	28	28	28
Temperatura final (°C)	68	89	90	>90
Tiempo transcurrido	01:18:50	00:14:37	00:04:12	00:03:39
Razón de calentamiento (°C/min)	0.573	4.245	15.049	18.289

Los datos se expresan a partir de una sola réplica.

### 6.5.3 Selección del agente reticulante

Se observaron resultados visualmente favorables (sin sinéresis) para la concentración de GDL y  $\text{CaCl}_2$  (**Figura 24**), sin embargo, la GDL se caracteriza por ser un agente acidulante, requiriendo de ensayos más específicos para establecer el pH adecuado para su adición y el posterior seguimiento de su efecto, por lo que se descartó su uso, seleccionando  $\text{CaCl}_2$  como agente gelificante.

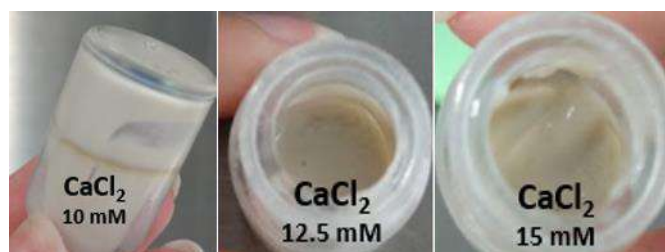


**Figura 24.** Adición de GDL y  $\text{CaCl}_2$  en suspensiones previamente calentadas.

### 6.5.4 Selección de la concentración de sales

El siguiente paso fue establecer las concentraciones de sales a añadir. Bryant & McClements (2002) reportan sobre gelificación “cold-set” en proteína de suero de leche con

adición de sales reportaron resultados favorables en cuanto a fuerza final del gel (Modulo de Young =  $108,000 \text{ N m}^{-2}$ ) y tasa de gelificación ( $G^*=200 \text{ Pa}$  y  $G^*=500 \text{ Pa}$ , respectivamente) al utilizar concentraciones de 12.5 y 15 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Se realizaron ensayos utilizando dichas concentraciones y se encontraron resultados visualmente favorables (sin sinéresis) a concentración 12.5 y 15 mM; mientras que a concentración 10 mM se observaba sinéresis en la muestra. Se seleccionó la concentración 15 mM de  $\text{CaCl}_2$  para continuar los experimentos (**Figura 25**).



**Figura 25.** Adición de  $\text{CaCl}_2$  a diferentes concentraciones en suspensiones previamente calentadas por calentamiento convencional.

#### 6.5.6 Ensayo final y conclusiones parciales

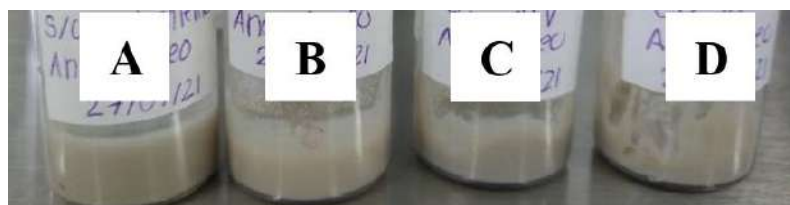
El objetivo de la presente fase experimental fue desarrollar hidrogeles que sirvieran como un producto de fácil consumo y atractivo para adultos mayores; sin embargo, a pesar de que se realizaron diversos ensayos con el objetivo de obtener dichas estructuras, se llegó a la conclusión de que la mezcla de aislados no tenía la capacidad de formar hidrogeles bajo las condiciones experimentales establecidas (**Figura 26**).



**Figura 26.** Producto tipo papilla obtenido posterior a calentamiento convencional, adición de sales y refrigeración.

#### 6.6 Resultados fase experimental #4

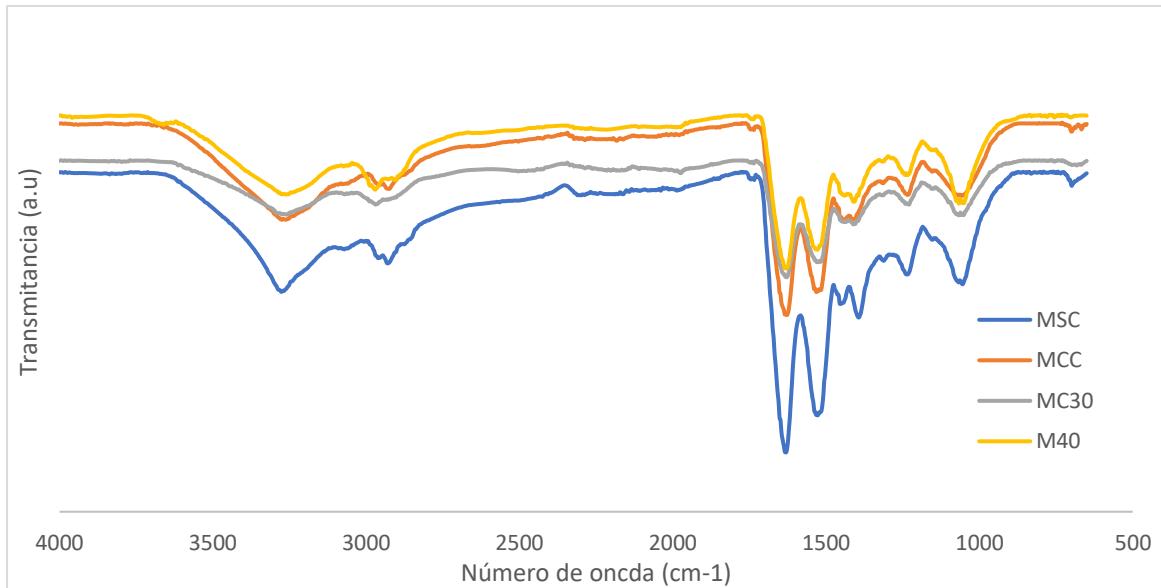
La revisión metodológica para esta fase experimental resultó extensa, descartando diseños experimentales conforme se realizaban los experimentos. A continuación, se resume algunos diseños y resultados seguidos durante dicha fase. Se estableció entonces el estudio del efecto de CO sobre la capacidad gelificante de la mezcla de aislados (**Figura 27**).



**Figura 27.** Tratamientos seleccionados para el desarrollo de los geles. Figura A: Muestra sin calentamiento (MSC); Figura B: Muestra con calentamiento convencional (MCC); Figura C: Muestra con calentamiento óhmico a 30 V (MCO30); Figura D: Muestra con calentamiento óhmico a 40 V (MCO40).

##### 6.6.1 FTIR de los diferentes tratamientos de gelificación

Los espectros FTIR para los cuatro tratamientos (**Figura 28**) resulta similar al patrón observado en los aislados por separado (**Figura 11**).



**Figura 28.** Espectro FTIR de las mezclas sin y con tratamiento térmico.

La deconvolución en las mezclas sin (ver **Anexo 4**) y con tratamiento térmico (ver **Anexo 5, 6 y 7**) mostro diferencias entre los diferentes tratamientos y sus respectivas estructuras (**Tabla 15**). MSC fue el tratamiento con menor contenido de hoja  $\beta$  (28.62%) con las muestras que recibieron tratamiento térmico. Estos hallazgos coinciden con los reportados por Moreno *et al.*, (2020) donde llevaron a cabo el proceso de gelificación de APC a diferentes concentraciones. Para ello sometieron las muestras a un tratamiento térmico de 80°C durante 5 minutos, comparando los resultados contra la muestra hidratada (sin calentamiento). Los autores encontraron que las estructuras  $\beta$  fueron predominantes en todos los geles al asociarse a la formación de agregados; además de observar que el contenido de hojas  $\beta$  aumentaba en contraste con lo encontrado en las muestras hidratadas. Resultados similares han sido ya reportados en la literatura, donde posterior a un tratamiento térmico el contenido de hoja  $\beta$  incrementa en la muestra (Bogahawaththa *et al.*, 2019; Rui *et al.*, 2011). Sin embargo, en estudios previos se ha logrado demostrar una correlación entre el grado de digestibilidad y el contenido de estructuras  $\beta$ , observándose una disminución en el porcentaje debido a la formación de dichos agregados que se ven incrementados con el calor, reduciendo la accesibilidad de las enzimas a sitios de acción (Carbonaro *et al.*, 2012).

En cuanto al contenido de espiral al azar, esta estructura se caracteriza por ser la más hidrofílica, contrario a hélice  $\alpha$  que es la estructura más hidrofóbica (Rahmati *et al.*, 2018), observando una disminución en el contenido de las muestras con tratamiento térmico y un incremento en M30 (1.02%) frente a los otros tratamientos, respectivamente.

Se puede sugerir entonces que por el contenido de hojas  $\beta$  de las muestras, MCC resultó en un tratamiento térmico más agresivo, seguido por M40 y por último M30, esperando que la formación de agregados genere un impacto negativo en la digestibilidad de las mezclas.

**Tabla 16.** Estructura secundaria de las mezclas sin y con tratamiento térmico por deconvolución del espectro FTIR.

Muestra	Hoja $\beta$	Giro $\beta$	Espiral al azar	Hélice $\alpha$
MSC*	28.62	43.83	27.07	0.48
MCC**	41.04	32.15	26.36	0.45
MCO30***	35.40	37.46	26.12	1.02
MCO40****	38.10	42.51	19.05	0.33

Los datos se expresan en porcentaje (%).

(\*) MSC: Muestra sin calentamiento

(\*\*) MCC: Muestra con calentamiento convencional

(\*\*\*) MCO30: Muestra con calentamiento óhmico a 30 V

(\*\*\*\*) MCO40: Muestra con calentamiento óhmico a 40 V

### 6.6.2 DSC de los diferentes tratamientos de gelificación

Se le realizó DSC a las mezclas con y sin tratamiento liofilizadas en seco, mostrando los datos en la **Tabla 17**. Se observó un incremento en el valor de  $T_d$  en los tres tratamientos respecto al de MSC. Feyzi *et al.*, (2018) establecieron que en muestras que han pasado por un tratamiento térmico el valor de  $T_d$  tiende a elevarse como respuesta a las proteínas que quedan rezagadas del proceso térmico sometido. La muestra MCO30 mostró problemas para realizar el análisis, observándose un artefacto en el termograma durante la etapa de enfriamiento (**Figura 31**), lo que afecta la medición final y sus resultados, omitiéndolos de la tabla.

**Tabla 17.** Temperatura de desnaturalización y entalpía de las mezclas sin y con tratamiento térmico.

Muestra	T <sub>0</sub>	T <sub>d</sub>	ΔH
MSC*	152.9	153.2	3.18
MCC**	155.5	156.1	5.49
MCO40***	159.1	159.2	6.81

T<sub>0</sub>: Temperatura inicial expresada en °C; T<sub>d</sub>: Temperatura de desnaturalización expresada en °C; ΔH: Entalpía de desnaturalización expresada en J/g.

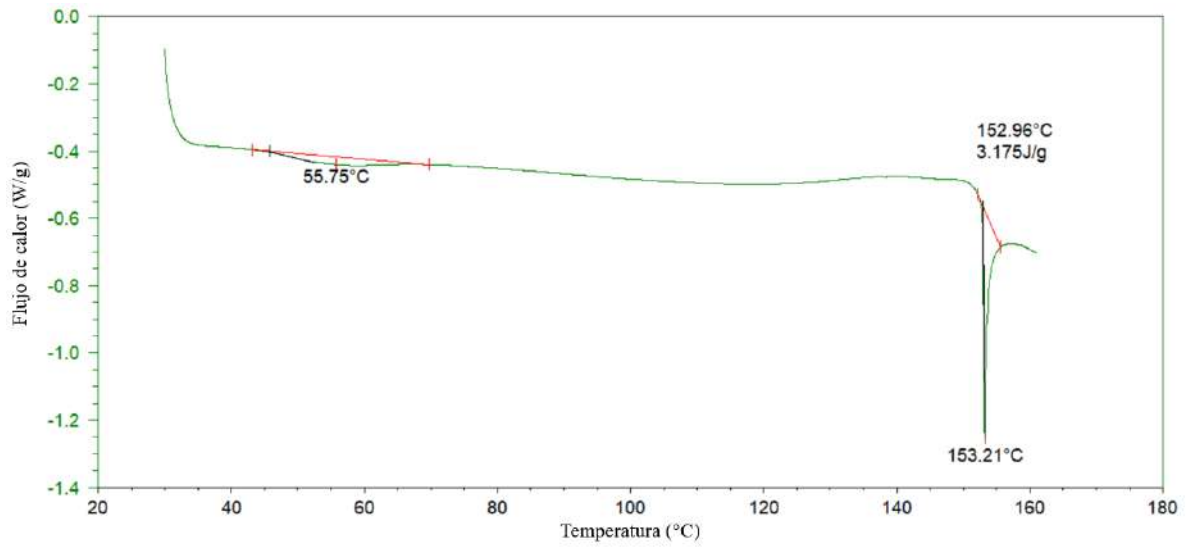
(\*) MSC: Muestra sin calentamiento

(\*\*) MCC: Muestra con calentamiento convencional

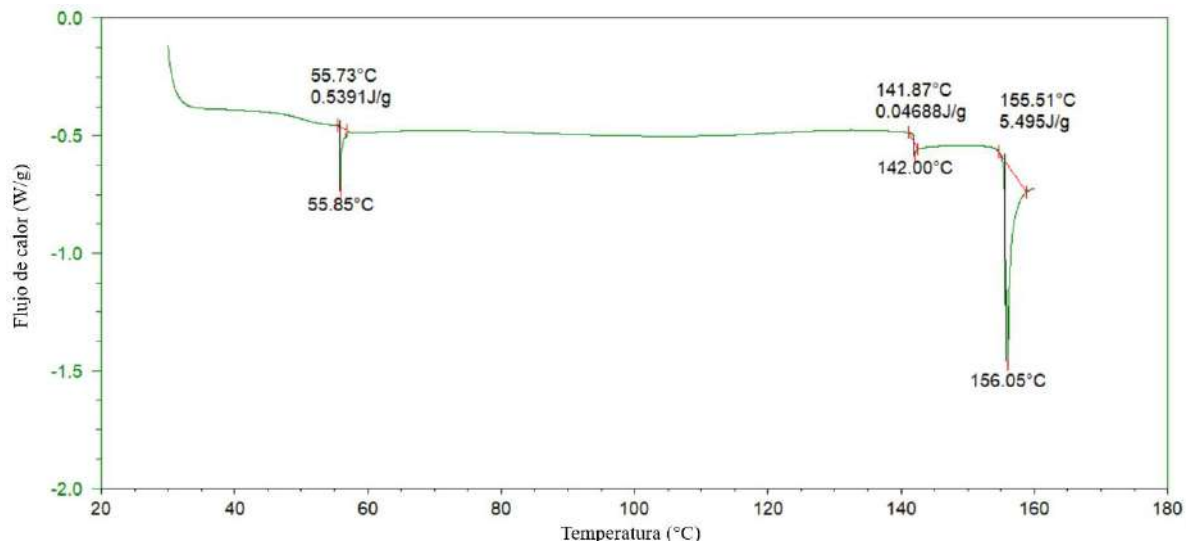
(\*\*\*) MCO40: Muestra con calentamiento óhmico a 40 V

En el termograma de MCC (**Figura 30**) y MCO40 (**Figura 32**) se puede observar un pico 142°C y 144.2°C respectivamente, que coincide con los resultados de APF para la desnaturalización de la fracción vicilina (**Figura 12**). Por otro lado, en el termograma de MSC (**Figura 29**), MCC (**Figura 30**) y MCO40 (**Figura 32**) a 55.8°, 58.9°C y 58.9°C respectivamente, se puede observar la transición térmica correspondiente a la gelatinización de almidón encontrada en la muestra de APC (**Figura 12**).

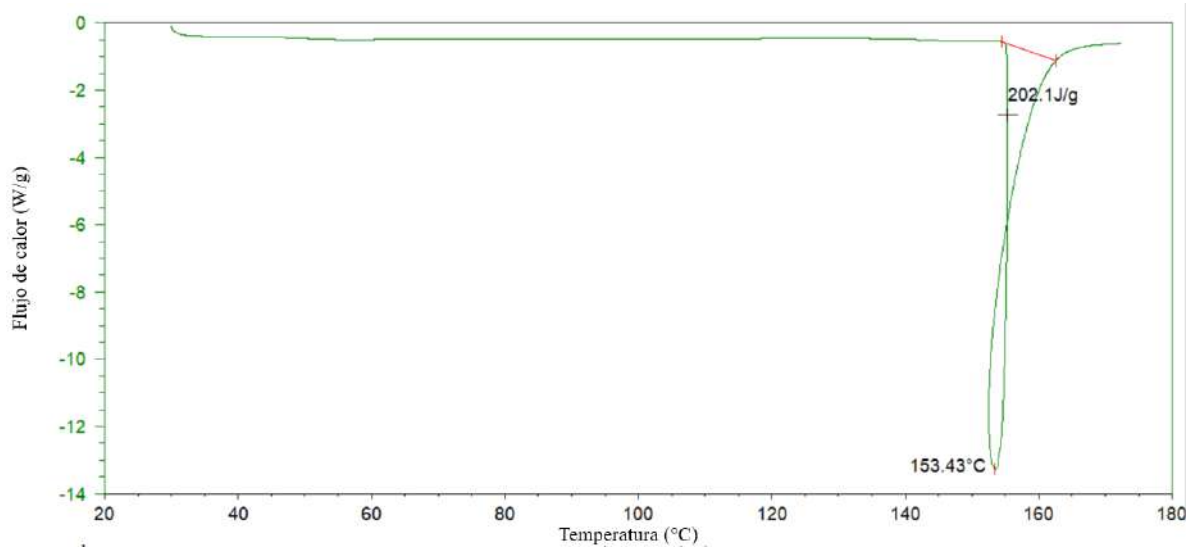
Las diferencias en las entalpías de desnaturalización (ΔH) de las muestras sin y con tratamiento térmico sugiere un mayor contenido de proteína nativa en la muestra para MSC (3.18 J/g) y un menor contenido para MCO40 (6.81 J/g) (Antuña *et al.*, 2009).



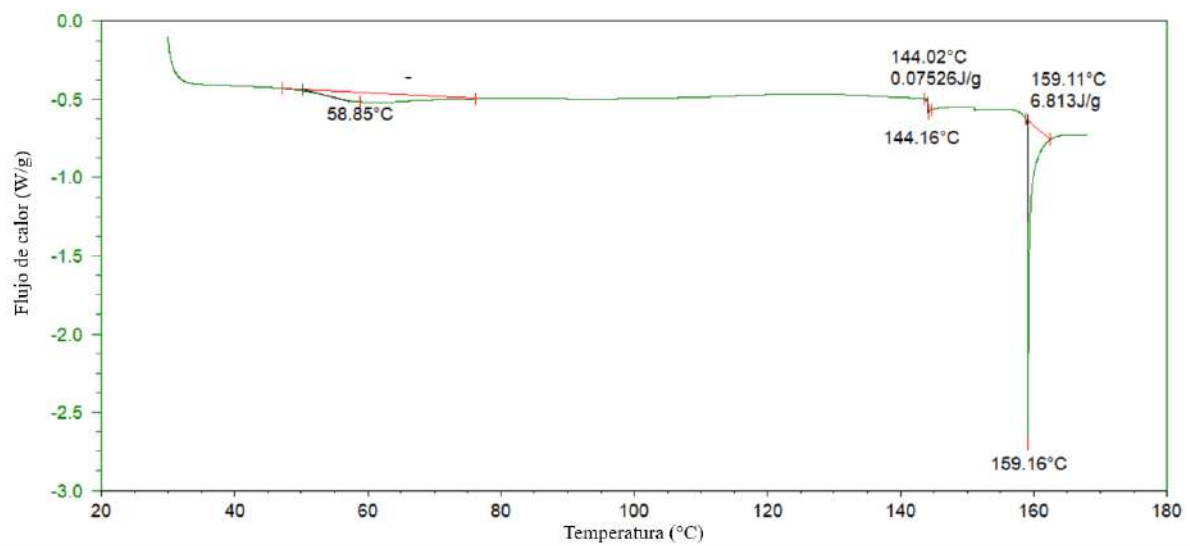
**Figura 29.** Termograma de MSC.



**Figura 30.** Termograma de MCC.



**Figura 31.** Termograma de MCO30.



**Figura 32.** Termograma de MCO40.



## 7. CONCLUSIÓN

El objetivo principal del presente trabajo fue elaborar un producto a partir de tres aislados proteicos de origen vegetal, que sirviera para enriquecer la dieta de adultos mayores al ser considerados una población susceptible por los diversos cambios anatómicos y fisiológicos por los que cruzan.

Una de las principales preocupaciones era la de alcanzar un determinado contenido de aminoácidos, así como una buena digestibilidad. Para ello, se integraron los aislados en una proporción de 50% APC, 35% APA y 15% APF, obteniendo una composición de 76.16% de proteína, siendo APC el principal aporte de proteína (80%) y APA el de carbohidratos (13.92%). Este valor hizo que nuestra mezcla se catalogara como un concentrado proteico (<90%) y no un aislado proteico (>90%) como se planteaba inicialmente. Además, la mezcla obtuvo un contenido total de aminoácidos esenciales de 42.76 g/100 g de mezcla, con un elevado contenido de fenilalanina, tirosina y valina, frente a lo previamente revisado en la literatura. El perfil de aminoácidos no fue lo esperado acorde a lo planteado en la teoría, donde se esperaba un contenido mayor de leucina al ser un aminoácido esencial crítico en este grupo de edad; sin embargo, el contenido de aminoácidos esenciales resultó ser mayor frente al teórico. Esta composición puede resultar contraproducente en pacientes fenilcetonuricos.

En pro de mejorar la digestibilidad de los aislados, y siendo conscientes de la presencia de factores antinutricios en ellos que dificultan la digestión y absorción de proteínas, se planteó la fase experimental #1 que consistió en someter a cocción el frijol previo a la obtención de APF, y someter APA a extrusión. Sin embargo, la cocción del frijol resultó en un bajo rendimiento de extracción (5.2%) por efecto de agregación proteica, insolubilizando las proteínas. Por otro lado, el procesamiento de APA por extrusión resultó en un reto al requerir de una gran cantidad de materia para poder implementar dicha tecnología, siendo la liofilización la etapa crítica por problemas con el equipo.

Es así como surge la fase experimental #2 que consistió en someter de forma individual los aislados a calentamiento óhmico preservando la idea de mejorar su digestibilidad. Se procedió a extraer la proteína de frijol y amaranto de sus respectivas harinas y ser tratados con CO con un acondicionamiento previo de humedad (50%). Como resultado se obtuvieron solubilidades a pH 7 extremadamente bajas (<10%), evidenciando un efecto similar al de cocción por agregación proteica, descartando el proceso al considerar su nula aplicación tecnológica.

En un tercer intento surge la fase experimental #3, evaluando las propiedades gelificantes de la mezcla por medio de la técnica cold-set, y comparando CO frente a calentamiento convencional. Para ello se manejaron suspensiones al 15% (p/v) y se probaron diversos agentes reticulantes (NaCl, gluco- $\delta$ -lactona y CaCl<sub>2</sub>) y concentraciones. Por efecto visual se seleccionó CaCl<sub>2</sub> 15 mM. Para los análisis, una vez elaboradas y tratadas las mezclas estas fueron liofilizadas por la practicidad en su manipulación.

Los análisis FTIR de las mezclas sin (MSC) y con tratamiento térmico (MCC, MCO30 y MCO40) demostraron que, por su contenido de hojas  $\beta$ , el calentamiento convencional resultaba ser el tratamiento más agresivo (41.04%), seguido por MCO40 (38.10%) y MCO30 (35.40%), partiendo de un contenido inicial de 28.62% para la muestra sin tratamiento térmico. Para los resultados de DSC se observó una mayor temperatura y entalpía de desnaturalización para MCO40 (1591.1°C y 6.81 J/g). Cabe mencionar que hubo presencia de almidón en la muestra por la transición térmica observada a 55.8°C-58.9°C en los termogramas, atribuible a APC, mostrando en su termograma dicha transición a 63.94°C. Por otro lado, se generaron picos correspondientes a la fracción vicilina de APF perceptibles en los termogramas de MCC y MCO40 a 142°C y 144.2°C. En cuanto a los valores de entalpía de desnaturalización, MCO40 resultó ser el tratamiento con menor contenido de proteína nativa.

Por cuestiones de tiempo y debido a la pandemia cursada, no se pudieron realizar análisis de digestibilidad, presencia de factores antinutricios y pruebas reológicas a las muestras obtenidas. Se considera de interés establecer dichos parámetros, sobre todo a MSC

(control), MCC y MCO40 para conocer las bondades de implementar CO como una propuesta para el manejo de aislados proteicos y la obtención de productos alternativos a los encontrados actualmente en el mercado, que contribuyan a satisfacer las necesidades del grupo de edad blanco bajo las nuevas tendencias de alimentación.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Aceituno-Medina, M., López-Rubio, A., Mendoza, S., & Lagaron, J. M. (2013). Development of novel ultrathin structures based in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolate through electrospinning. *Food Hydrocolloids*, *31*(2), 289-298. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.009>.

Acosta, C., Carpio, C., Vilcacundo, R., & Carrillo, W. (2016). Identification of proteins isolate from amaranth (*Amaranthus caudatus*) by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with water and NaCl 0.1 m solvents. *Asian J. Pharm. Clin. Res*, *9*(3), 331-4.

Adebiyi, A. P., & Aluko, R. E. (2011). Functional properties of protein fractions obtained from commercial yellow field pea (*Pisum sativum L.*) seed protein isolate. *Food Chemistry*, *128*(4), 902-908.

Aguilar-Vázquez, G., Loarca-Piña, G., Figueroa-Cárdenas, J. D., & Mendoza, S. (2018). Electrospun fibers from blends of pea (*Pisum sativum*) protein and pullulan. *Food Hydrocolloids*, *83*, 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.051>.

Aguilar-Vázquez, G., Ortiz-Frade, L., Figueroa-Cárdenas, J. D., López-Rubio, A., & Mendoza, S. (2020). Electrospinnability study of pea (*Pisum sativum*) and common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) using the conformational and rheological behavior of their protein isolates. *Polymer Testing*, *81* (106217). <https://doi.org/10.1016/J.POLYMERTESTING.2019.106217>.

Albarracín, W., Acosta, L. F., & Sánchez, I. C. (2010). Elaboración de un producto cárnico escaldado utilizando como extensor harina de frijol común (*Phaseolus spp.*). *Vitae*, *17*(3), 264-271.

Aliabbasi, N., Emam-Djomeh, Z., Askari, G., & Salami, M. (2021). Pinto bean protein-based acid-induced cold-set gels as carriers for curcumin delivery: Fabrication and characterization. *Food Hydrocolloids for Health*, *1*, 100035.

Antuña, S., Celeghin, A. G., & Rubiolo, A. C. (2009). Estudio de la Desnaturalización Térmica y Agregación de las Proteínas de Suero por Calorimetría Diferencial de Barrido. *FABICIB*, *13*(1), 51-57.

Avelino-Silva, T. J., & Jaluul, O. (2017). Malnutrition in hospitalized older patients: management strategies to improve patient care and clinical outcomes. *International Journal of Gerontology*, *11*(2), 56-61.

Baum, J. I., Kim, I. Y., & Wolfe, R. R. (2016). Protein consumption and the elderly: What is the optimal level of intake? *Nutrients*, *8*(6), 359. <https://doi.org/10.3390/nu8060359>.

Bejarano-Luján, D. L., Da Cunha, R. L., & Netto, F. M. (2010). Structural and rheological properties of amaranth protein concentrate gels obtained by different processes. *Food Hydrocolloids*, *24*(6-7), 602-610.

Bejosano, F. P., & Corke, H. (1998). Protein quality evaluation of Amaranthus wholemeal flours and protein concentrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *76*(1), 100-106.

Benevenga, N. J., & Steele, R. D. (1984). Adverse effects of excessive consumption of amino acids. *Annual review of nutrition*, *4*(1), 157-181.

Bloom, I., Shand, C., Cooper, C., Robinson, S., & Baird, J. (2018). Diet quality and sarcopenia in older adults: a systematic review. *Nutrients*, *10*(3), 308.

Bogahawaththa, D., Bao-Chau, N. H., Trivedi, J., Dissanayake, M., & Vasiljevic, T. (2019). Impact of selected process parameters on solubility and heat stability of pea protein isolate. *LWT - Food Science and Technology*, *102*, 246–253. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.034>

Borkent, J. W., Beelen, J., Linschooten, J. O., Roodenburg, A. J., & de van der Schueren, M. A. (2019). The ConsumeER study: a randomised trial towards the effectiveness of protein-rich ready-made meals and protein-rich dairy products in increasing protein intake of

community-dwelling older adults after switching from self-prepared meals towards ready-made meals. *Journal of nutritional science*, 8.

Bressani, R., Kalinowski, L. S., Ortiz, M. A., & Elías, L. G. (1987). Nutritional evaluation of roasted, flaked and popped *A. caudatus*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 37(3), 525-531.

Bressani, R., Sánchez-Marroquín, A., & Morales, E. (1992). Chemical composition of grain amaranth cultivars and effects of processing on their nutritional quality. *Food Reviews International*, 8(1), 23-49. <https://doi.org/10.1080/87559129209540928>.

Brishti, F. H., Chay, S. Y., Muhammad, K., Ismail-Fitry, M. R., Zarei, M., Karthikeyan, S., & Saari, N. (2020). Effects of drying techniques on the physicochemical, functional, thermal, structural, and rheological properties of mung bean (*Vigna radiata*) protein isolate powder. *Food Research International*, 138, 109783.

Brito-Oliveira, T. C., Bispo, M., Moraes, I. C. F., Campanella, O. H., & Pinho, S. C. (2018). Cold-Set Gelation of Commercial Soy Protein Isolate: Effects of the Incorporation of Locust Bean Gum and Solid Lipid Microparticles on the Properties of Gels. *Food Biophysics*, 13(3), 226–239. doi:10.1007/s11483-018-9529-4

Brito-Oliveira, T. C., Cavini, A. C. M., Ferreira, L. S., Moraes, I. C., & Pinho, S. C. (2020). Microstructural and rheological characterization of NaCl-induced gels of soy protein isolate and the effects of incorporating different galactomannans. *Food Structure*, 26, 100158.

Bryant, C. M., & McClements, D. J. (2000). Influence of NaCl and CaCl<sub>2</sub> on cold-set gelation of heat-denatured whey protein. *Journal of Food Science*, 65(5), 801-804.

Burger, T. G., & Zhang, Y. (2019). Recent progress in the utilization of pea protein as an emulsifier for food applications. *Trends in Food Science & Technology*, 86, 25-33.

Candela, M., Astiasaran, I., & Bello, J. (1997). Cooking and warm-holding: effect on general composition and amino acids of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*), chickpeas (Cicer

arietinum), and lentils (*Lens culinaris*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(12), 4763-4767. <https://doi.org/10.1021/jf9702609>.

Carbonaro, M., Maselli, P., & Nucara, A. (2012). Relationship between digestibility and secondary structure of raw and thermally treated legume proteins: a Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study. *Amino acids*, 43(2), 911-921.

Carbonaro, M., Vecchini, P., & Carnovale, E. (1993). Protein solubility of raw and cooked beans (*Phaseolus vulgaris*): role of the basic residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(8), 1169-1175.

Cha, Y. H. (2011). Effect of ohmic heating on characteristics of heating denaturation of soybean protein. *The Korean Journal of Food And Nutrition*, 24(4), 740-745.

Chávez-Jáuregui, R. N., Silva, M. E. M. P., & Arêas, J. A. G. (2000). Extrusion cooking process for amaranth (*Amaranthus caudatus L.*). *Journal of Food Science*, 65(6), 1009-1015. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb09408.x>.

Champ, M. M. J. (2002). Non-nutrient bioactive substances of pulses. *British Journal of Nutrition*, 88(S3), 307-319. <https://doi.org/10.1079/BJN2002721>.

Cheftel, J. C. (1986). Nutritional effects of extrusion-cooking. *Food chemistry*, 20(4), 263-283.

Cheng, H., Kong, J., Underwood, C., Petocz, P., Hirani, V., Dawson, B., & O'Leary, F. (2018). Systematic review and meta-analysis of the effect of protein and amino acid supplements in older adults with acute or chronic conditions. *British Journal of Nutrition*, 119(5), 527-542.

Condés, M. C., Añón, M. C., Mauri, A. N., & Dufresne, A. (2015). Amaranth protein films reinforced with maize starch nanocrystals. *Food Hydrocolloids*, 47, 146-157.

Cordero-de-los-Santos, M. Y., Osuna-Castro, J. A., Borodanenko, A., & Paredes-López, O. (2005). Physicochemical and functional characterization of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates obtained by isoelectric precipitation and micellization. *Food Science and Technology International*, *11*(4), 269–280. <https://doi.org/10.1177/1082013205056491>.

Corgneau, M., Gaiani, C., Petit, J., Nikolova, Y., Banon, S., Ritié-Pertusa, L., ... Scher, J. (2019). Nutritional quality evaluation of commercial protein supplements. *International Journal of Food Science & Technology*, *54*(8), 2586–2594. doi:10.1111/ijfs.14170.

Cortez-Trejo, M. C., Mendoza, S., Loarca-Piña, G., & Figueroa-Cárdenas, J. D. (2021). Physicochemical characterization of protein isolates of amaranth and common bean and a study of their compatibility with xanthan gum. *International Journal of Biological Macromolecules*, *166*, 861-868.

Cui, L., Bandillo, N., Wang, Y., Ohm, J. B., Chen, B., & Rao, J. (2020). Functionality and structure of yellow pea protein isolate as affected by cultivars and extraction pH. *Food Hydrocolloids*, *108*, 106008.

de-Mendoza, M. E. C., Rivas, N., Dorta, B., de Delahaye, E. P., & Bertsch, A. (2006). Obtención y caracterización de dos concentrados proteicos a partir de biomasa de *Kluyveromyces marxianus var. marxianus* cultivada en suero lácteo desproteinizado. *Revista Científica*, *16*(3), 315-324.

do-Evangelho, J. A., Vanier, N. L., Pinto, V. Z., De-Berrios, J. J., Dias, A. R. G., & da-Rosa-Zavareze, E. (2017). Black bean (*Phaseolus vulgaris L.*) protein hydrolysates: Physicochemical and functional properties. *Food chemistry*, *214*, 460-467.

Fernández-Quintela, A., Macarulla, M. T., Del-Barrio, A. S., & Martínez, J. A. (1997). Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. *Plant Foods for Human Nutrition*, *51*(4), 331-341.



Fernández-Valenciano, A. F., & Sánchez-Chávez, E. (2017). Estudio de las propiedades fisicoquímicas y calidad nutricional en distintas variedades de frijol consumidas en México. *Nova scientia*, 9(18), 133-148.

Feyzi, S., Milani, E., & Golimovahhed, Q. A. (2018). Grass pea (*Lathyrus sativus* L.) protein isolate: The effect of extraction optimization and drying methods on the structure and functional properties. *Food Hydrocolloids*, 74, 187-196.

García-Mier, L., Morales-Sánchez, E., Reyes-Vega, M. L., Loarca-Piña, F. G., González-Jasso, E., Gaytán-Martínez, M., & de la Cruz, G. V. (2012). Ohmic Heating Effect in the Condensed Tannins Content of *Phaseolus vulgaris* L. *Food Science and Food Biotechnology Essentials: A Contemporary Perspective*, 295.

Gamel, T. H., Linssen, J. P., Mesallam, A. S., Damir, A. A., & Shekib, L. A. (2006). Seed treatments affect functional and antinutritional properties of amaranth flours. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(7), 1095-1102.

Ge, J., Sun, C. X., Corke, H., Gul, K., Gan, R. Y., & Fang, Y. (2020). The health benefits, functional properties, modifications, and applications of pea (*Pisum sativum* L.) protein: Current status, challenges, and perspectives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 1835-1876.

Godínez-Escobar, K., Luna, G. D., Meneses-Acero, I., Vargas-Ayala, G., Ovando-Hurtado Jennifer, P., Guerrero-García, C., & Rubio-Guerra, A. F. (2020). Prevalencia de Sarcopenia por Grupos Etarios en una Población de la Ciudad de México. *Archivos en Medicina Familiar*, 22(1), 7-12.

Gorissen, S. H., Crombag, J. J., Senden, J. M., Waterval, W. H., Bierau, J., Verdijk, L. B., & van Loon, L. J. (2018). Protein content and amino acid composition of commercially available plant-based protein isolates. *Amino acids*, 50(12), 1685-1695.

Granic, A., Sayer, A. A., & Robinson, S. M. (2019). Dietary patterns, skeletal muscle health, and sarcopenia in older adults. *Nutrients*, *11*(4), 745.

Guerrero-García, N. B., Gómez-Lomelí, Z. M., Leal-Mora, D., & Loreto-Garibay, O. (2015). Fragilidad en ancianos y estado nutricional según el Mini Nutritional Assessment. *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, *54*(3), 312–317. <http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2016/im163h.pdf>.

Guillin, F., Calvez, J., Guérin-Deremaux, L., Lefranc-Millot, C., Khodorova, N., Tomé, D., & Gaudichon, C. (2019). Nutritional Quality Evaluation of a Pea Protein Isolate in Rats with or Without Amino Acid Supplementation (P08-064-19). *Current Developments in Nutrition*, *3*(Supplement\_1), nzz044-P08.

Gutiérrez-Dorado, R., Ayala-Rodríguez, A. E., Milán-Carrillo, J., López-Cervantes, J., Garzón-Tiznado, J. A., López-Valenzuela, J. A., ...& Reyes-Moreno, C. (2008). Technological and nutritional properties of flours and tortillas from nixtamalized and extruded quality protein maize (*Zea mays L.*). *Cereal chemistry*, *85*(6), 808-816. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-85-6-0808>.

Haub, M. D., Wells, A. M., Tarnopolsky, M. A., & Campbell, W. W. (2002). Effect of protein source on resistive-training-induced changes in body composition and muscle size in older men. *The American journal of clinical nutrition*, *76*(3), 511-517. <https://doi.org/10.1093/ajcn/76.3.511>.

He, F., Wang, Z., Han, B., Wu, Q., Chen, D., Li, J., ... Kai, J. J. (2018). Solid solubility, precipitates, and stacking fault energy of micro-alloyed CoCrFeNi high entropy alloys. *Journal of Alloys and Compounds*, *769*, 490–502. doi:10.1016/j.jallcom.2018.07.336.

Houchins, J. A., Cifelli, C. J., Demmer, E., & Fulgoni, V. L. (2016). Diet modeling in older Americans: The impact of increasing plant-based foods or dairy products on protein intake. *Journal of Nutrition, Health and Aging*, *21*(6), 673–680. <https://doi.org/10.1007/s12603-016-0819-6>.

Hu, X.-Z., Cheng, Y.-Q., Fan, J.-F., Lu, Z.-H., Yamaki, K., & Li, L.-T. (2009). Effects of drying method on physicochemical and functional properties of soy protein isolates. *Journal of food processing and preservation*, 34(3), 520–540. Doi:10.1111/j.1745-4549.2008.00357.x.

Hussain, A., & Kaul, R. (2019). Nutritional, sensory and storage studies of instant multigrain porridge mix. *Food science*, 10(1), 94-100.

IMSS. (2014). Evaluación y seguimiento nutricional del adulto mayor en el primer nivel de atención. Recuperado de [http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/095\\_GPC\\_Evaycontrolnutric\\_eneladultomayor/NUTRICION\\_AM\\_RR\\_CENETEC.pdf](http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/095_GPC_Evaycontrolnutric_eneladultomayor/NUTRICION_AM_RR_CENETEC.pdf)

Indiarto, R., & Rezaharsanto, B. (2020). A review on ohmic heating and its use in food. *Int. J. Sci. Technol. Res*, 9(2), 485-490.

INEGI. (2015). Principales resultados encuesta intercensal. [https://www.inegi.org.mx/contenidos/programas/intercensal/2015/doc/eic\\_2015\\_presentacion.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/programas/intercensal/2015/doc/eic_2015_presentacion.pdf)

Jiménez-Rojas, C., Corregidor-Sánchez, A. I., & Gutiérrez-Bezón, C. (2018). Disfagia. En Sociedad Española de Geriatria y Gerontología (Ed.), *Tratado de geriatría para residentes* (pp. 545-553). Recuperado de [https://www.segg.es/tratadogeriatría/pdf/s35-05%2000\\_primeras.pdf](https://www.segg.es/tratadogeriatría/pdf/s35-05%2000_primeras.pdf)

Joshi, D. C., Sood, S., Hosahatti, R., Kant, L., Pattanayak, A., Kumar, A., ... & Stetter, M. G. (2018). From zero to hero: the past, present and future of grain amaranth breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 131(9), 1807-1823.

Kaspchak, E., Silveira, J. L. M., Igarashi-Mafra, L., & Mafra, M. R. (2020). Effect of antinutrients on heat-set gelation of soy, pea, and rice protein isolates. *Journal of Food Science and Technology*. doi:10.1007/s13197-020-04458-7.

Kaufman, S. (1999). A model of human phenylalanine metabolism in normal subjects and in phenylketonuric patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(6), 3160-3164.

Kaur, N., Singh, B., & Sharma, S. (2018). Comparison of quality protein maize (QPM) and normal maize with respect to properties of instant porridge. *LWT*. doi:10.1016/j.lwt.2018.09.070.

Klein, M., & Poverenov, E. (2020). Natural biopolymer-based hydrogels for use in food and agriculture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(6), 2337-2347.

Kurpad, A. V., & Vaz, M. (2000). Protein and amino acid requirements in the elderly. *European journal of clinical nutrition*, 54(3), S131-S142. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601035>.

Ladjal-Ettoumi, Y., Boudries, H., Chibane, M., & Romero, A. (2016). Pea, chickpea and lentil protein isolates: Physicochemical characterization and emulsifying properties. *Food Biophysics*, 11(1), 43–51. <https://doi.org/10.1007/s11483-015-9411-6>.

Lam, A. C. Y., Can-Karaca, A., Tyler, R. T., & Nickerson, M. T. (2016). Pea protein isolates: Structure, extraction, and functionality. *Food Reviews International*, 34(2), 126–147. doi:10.1080/87559129.2016.1242135

Lara-Castellanos, M. D. J. (2018). Modificación de caseína bovina mediante criogenización, ultrasonido y lipofilización.

León, A., Rosell, C. M., & Benedito-de-Barber, C. (2003). A differential scanning calorimetry study of wheat proteins. *European Food Research and Technology*, 217(1), 13–16. doi:10.1007/s00217-003-0699-y.

Li, X., Ye, C., Tian, Y., Pan, S., & Wang, L. (2018). Effect of ohmic heating on fundamental properties of protein in soybean milk. *Journal of Food Process Engineering*, 41(3), e12660.

Lima-Becerra, I. I. (2020). Calentamiento óhmico como herramienta para el mejoramiento de las propiedades tecno-funcionales de harina de frijol (Tesis, Universidad Autónoma de Querétaro).

Ling, B., Ouyang, S., & Wang, S. (2019). Effect of radio frequency treatment on functional, structural, and thermal behaviors of protein isolates in rice bran. *Food chemistry*, 289, 537-544.

Liu, L. S., Kost, J., Yan, F., & Spiro, R. C. (2012). Hydrogels from Biopolymer Hybrid for Biomedical, Food, and Functional Food Applications. *Polymers*, 4(2), 997-1011. doi:10.3390/polym4020997.

López, D. N., Galante, M., Robson, M., Boeris, V., & Spelzini, D. (2018). Amaranth, quinoa and chia protein isolates: Physicochemical and structural properties. *International journal of biological macromolecules*, 109, 152-159.

López, D. N., Galante, M., Raimundo, G., Spelzini, D., & Boeris, V. (2019). Functional properties of amaranth, quinoa and chia proteins and the biological activities of their hydrolyzates. *Food Research International*, 116, 419-429.

López, D. N., Ingrassia, R., Busti, P., Wagner, J., Boeris, V., & Spelzini, D. (2018). Effects of extraction pH of chia protein isolates on functional properties. *LWT*, 97, 523-529. doi:10.1016/j.lwt.2018.07.036

López, D. N., Ingrassia, R., Busti, P., Wagner, J., Boeris, V., & Spelzini, D. (2021). Acid-induced aggregation and gelation of heat-treated chia proteins. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(4), 1641-1648.

Marcus, J. B. (2013). Chapter 5-Protein basics: Animal and vegetable proteins in food and health: Healthy protein choices, roles and applications in nutrition, food science and the culinary arts. *Culinary nutrition*, 189-230. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-391882-6.00005-4>,

Martínez, E. N., & Añón, M. C. (1996). Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*(9), 2523-2530.

Matthews, D. E. (2007). An overview of phenylalanine and tyrosine kinetics in humans. *The Journal of nutrition*, *137*(6), 1549S-1555S.

Mession, J. L., Chihi, M. L., Sok, N., & Saurel, R. (2015). Effect of globular pea proteins fractionation on their heat-induced aggregation and acid cold-set gelation. *Food Hydrocolloids*, *46*, 233-243.

Miranda-Ramos, K. C., Sanz-Ponce, N., & Haros, C. M. (2019). Evaluation of technological and nutritional quality of bread enriched with amaranth flour. *LWT*, *114*, 108418.

Mondor, M., Aksay, S., Drolet, H., Roufik, S., Farnworth, E., & Boye, J. I. (2009). Influence of processing on composition and antinutritional factors of chickpea protein concentrates produced by isoelectric precipitation and ultrafiltration. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *10*(3), 342–347. doi:10.1016/j.ifset.2009.01.007 .

Montoya, C. A., Lallès, J.-P., Beebe, S., & Leterme, P. (2010). Phaseolin diversity as a possible strategy to improve the nutritional value of common beans (*Phaseolus vulgaris*). *Food Research International*, *43*(2), 443–449. doi:10.1016/j.foodres.2009.09.040.

Morales-de-León, J. C., Vázquez-Mata, N., Torres, N., Gil-Zenteno, L., & Bressani, R. (2007). Preparation and characterization of protein isolate from fresh and hardened beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of food science*, *72*(2), C96-C102. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00244.x>.

Moreira, T. C. P., Pereira, R. N., Vicente, A. A., & da Cunha, R. L. (2019). Effect of Ohmic heating on functionality of sodium caseinate—A relationship with protein gelation. *Food research international*, *116*, 628-636.

Moreno, H. M., Domínguez-Timón, F., Díaz, M. T., Pedrosa, M. M., Borderías, A. J., & Tovar, C. A. (2019). Evaluation of gels made with different commercial pea protein isolate: Rheological, structural, and functional properties. *Food Hydrocolloids*, 105375. doi:10.1016/j.foodhyd.2019.105375.

Muñoz, S. (2010). Frijol, rica fuente de proteínas. CONABIO. *Biodiversitas*, 89, 7-11.

Nielsen, S. S., Deshpande, S. S., Hermodson, M. A., & Scott, M. P. (1988). Comparative digestibility of legume storage proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(5), 896–902. doi:10.1021/jf00083a004.

Noguchi, A., Mosso, K., Aymard, C., Jeunik, J. & Cheftel, J. C. (1982). Maillard reactions during extrusion cooking of protein enriched biscuits. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 15, 105-10.

North America Meat Institute. (2017). Obtenido de North America Meat Institute: <https://www.meatinstitute.org/index.php?ht=d/sp/i/47465/pid/47465>

Nosworthy, M. G., Medina, G., Franczyk, A. J., Neufeld, J., Appah, P., Utioh, A., & House, J. D. (2018). Effect of processing on the in vitro and in vivo protein quality of beans (*Phaseolus vulgaris* and *Vicia Faba*). *Nutrients*, 10(6), 671. <https://doi.org/10.3390/nu10060671>.

Ortolá, R., Struijk, E. A., García-Esquinas, E., Rodríguez-Artalejo, F., & Lopez-Garcia, E. (2020). Changes in Dietary Intake of Animal and Vegetable Protein and Unhealthy Aging. *The American Journal of Medicine*, 133(2), 231-239. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2019.06.051>.

Osen, R., Toelstede, S., Wild, F., Eisner, P., & Schweiggert-Weisz, U. (2014). High moisture extrusion cooking of pea protein isolates: Raw material characteristics, extruder responses, and texture properties. *Journal of Food Engineering*, 127, 67-74.

Osen, R., Toelstede, S., Eisner, P., & Schweiggert-Weisz, U. (2015). Effect of high moisture extrusion cooking on protein–protein interactions of pea (*Pisum sativum L.*) protein isolates. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(6), 1390-1396.

Owusu-Ansah, Y. J., & McCurdy, S. M. (1991). Pea proteins: a review of chemistry, technology of production, and utilization. *Food Reviews International*, 7(1), 103-134.

PENSIONISSSTE. (2017, 25 agosto). Día del Adulto Mayor. Recuperado 14 de diciembre de 2020, de <https://www.gob.mx/pensionissste/articulos/dia-del-adulto-mayor-123010?idiom=es#:~:text=En%20M%C3%A9xico%20se%20considera%20Adulto,metas%20familiares%20%20profesionales%20y%20sociales.&text=En%20el%20M%C3%A9xico%20prehisp%C3%A1nico%20los,mexicas%20como%20por%20los%20mayas>.

Peña-Cháidez, J. E., Rosas-Flores, W., Salazar-Montoya, J. A., Morales-Contreras, B. E., Gallegos-Infante, J. A., Morales-Castro, J., & Medrano-Roldán, H. (2021). Rheological and thermal characterization of Pinto Saltillo bean (*Phaseolus vulgaris L.*) protein isolates/sodium alginate gels. *LWT*, 111419.

Pereira, R. N., Rodrigues, R. M., Altinok, E., Ramos, Ó. L., Xavier Malcata, F., Maresca, P., ... Vicente, A. A. (2017). Development of iron-rich whey protein hydrogels following application of ohmic heating – Effects of moderate electric fields. *Food Research International*, 99, 435–443. doi:10.1016/j.foodres.2017.05.023.

Pimentel, D., & Pimentel, M. (2003). Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3 SUPPL.), 660–663. <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.3.660s>.

Písaříková, B., Kráčmar, S., & Herzig, I. (2005). Amino acid contents and biological value of protein in various amaranth species. *Czech Journal of Animal Science*, 50(4), 169-174. <https://doi.org/10.17221/4011-CJAS>.



Quintanar, A. (2010). Análisis de calidad de vida en adultos mayores del municipio de Tetepango, Hidalgo: A través del instrumento WHOQOL-BREF. *Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo*. [http://www.uaeh.edu.mx/nuestro\\_alumnado/esc\\_sup/actopan/licenciatura/Analisis de la calidad de vida.pdf](http://www.uaeh.edu.mx/nuestro_alumnado/esc_sup/actopan/licenciatura/Analisis_de_la_calidad_de_vida.pdf)

Rahmati, N. F., Koocheki, A., Varidi, M., & Kadkhodae, R. (2018). Introducing Speckled sugar bean (*Phaseolus vulgaris*) protein isolates as a new source of emulsifying agent. *Food Hydrocolloids*, *79*, 498-508.

Ríos, L. C., Guerrero, L. C., & Ancona, D. B. (2000). Extracción de las fracciones de almidón y proteína del grano de la leguminosa *Mucuna pruriens*. *Tecnología, Ciencia, Educación*, *15*(1), 37-41.

Rodrigues, R. M., Fasolin, L. H., Avelar, Z., Petersen, S. B., Vicente, A. A., & Pereira, R. N. (2020). Effects of moderate electric fields on cold-set gelation of whey proteins—From molecular interactions to functional properties. *Food Hydrocolloids*, *101*, 105505.

Rodríguez-Licea, G., García-Salazar, J. A., Rebollar-Rebollar, S., & Cruz-Contreras, A. C. (2010). Preferencias del consumidor de frijol (*Phaseolus vulgaris L*) en México: factores y características que influyen en la decisión de compra diferenciada por tipo y variedad. *Paradigma Económico*, *1*, 121–145.

Rodríguez, M., Fillería, S. F. G., & Tironi, V. A. (2020). Simulated gastrointestinal digestion of amaranth flour and protein isolate: Comparison of methodologies and release of antioxidant peptides. *Food Research International*, *138*, 109735.

Rodríguez-Tadeo, A., Wall-Medrano, A., Gaytan-Vidana, M. E., Campos, A., Ornelas-Contreras, M., & Novelo-Huerta, H. I. (2012). Malnutrition risk factors among the elderly from the us-Mexico Border: The “one thousand” study. *Journal of Nutrition, Health and Aging*, *16*(5), 426–431. <https://doi.org/10.1007/s12603-011-0349-1>.

Rojas-Allende, D., Figueras-Díaz, F., & Durán-Agüero, S. (2017). Ventajas y desventajas nutricionales de ser vegano o vegetariano. *Revista chilena de nutrición*, 44(3), 218-225.

Roy, S. K., & Chakrabarti, A. K. (2003). Vegetables of temperate climates: Commercial and Dietary Importance.

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.

Sai-Manohar, R., Urmila Devi, G. R., Bhattacharya, S., & Venkateswara Rao, G. (2011). Wheat porridge with soy protein isolate and skimmed milk powder: Rheological, pasting and sensory characteristics. *Journal of Food Engineering*, 103(1), 1–8. doi:10.1016/j.jfoodeng.2010.09.00

Sakr, M., & Liu, S. (2014). A comprehensive review on applications of ohmic heating (OH). *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 39, 262-269.

Salcedo-Chávez, B., Osuna-Castro, J. A., Guevara-Lara, F., Domínguez-Domínguez, J., & Paredes-López, O. (2002). Optimization of the isoelectric precipitation method to obtain protein isolates from amaranth (*Amaranthus cruentus*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6515-6520.

Sánchez-Valdez, I., Acosta-Gallegos, J. A., Ibarra-Pérez, F., Rosales-Serna, R., & Cuéllar-Robles, E. I. (2009). Pinto saltillo: Variedad Mejorada de Frijol para el Estado de Durango.

Sastry, S. K., & Li, Q. (1996). Modeling the ohmic heating of foods: Ohmic heating for thermal processing of foods: Government, industry, and academic perspectives. *Food technology (Chicago)*, 50(5), 246-248.

Scopes, R. K. (1993). Protein purification: principles and practice. Springer Science & Business Media.

Sharan, S., Zanghelini, G., Zotzel, J., Bonerz, D., Aschoff, J., Saint-Eve, A., & Maillard, M. N. (2021). Fava bean (*Vicia faba L.*) for food applications: From seed to ingredient processing and its effect on functional properties, antinutritional factors, flavor, and color. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), 401-428.

Shevkani, K., Singh, N., Kaur, A., & Rana, J. C. (2015). Structural and functional characterization of kidney bean and field pea protein isolates: a comparative study. *Food Hydrocolloids*, 43, 679-689.

Singh, N., Singh, P., Shevkani, K., & Viridi, A. S. (2019). Amaranth: Potential Source for Flour Enrichment. Flour and Breads and Their Fortification in Health and Disease Prevention, 123–135. doi:10.1016/b978-0-12-814639-2.00010-1.

Smithard, D. G. (2016). Dysphagia: A geriatric giant? *IMedPub Journals*, 2, 1-5. <https://doi.org/10.21767/2471-299X.100014>.

Steffolani, M. E., Villacorta, P., Morales-Soriano, E. R., Repo-Carrasco, R., León, A. E., & Pérez, G. T. (2016). Physicochemical and Functional Characterization of Protein Isolated from Different Quinoa Varieties (*Chenopodium quinoa Willd.*). *Cereal Chemistry Journal*, 93(3), 275–281. doi:10.1094/cchem-04-15-0083-r.

Sura, L., Madhavan, A., Carnaby, G., & Crary, M. A. (2012). Dysphagia in the elderly: Management and nutritional considerations. *Clinical Interventions in Aging*, 7, 287–298. <https://doi.org/10.2147/CIA.S23404>.

Svanberg, L., Wassén, S., Gustinelli, G., & Öhgren, C. (2018). Design of microcapsules with bilberry seed oil, cold-set whey protein hydrogels and anthocyanins: effect of pH and formulation on structure formation kinetics and resulting microstructure during purification processing and storage. *Food Chemistry*. doi:10.1016/j.foodchem.2018.11.129.

Takeuchi, K., Aida, J., Ito, M., Furuta, M., Yamashita, Y., & Osaka, K. (2014). Community-dwelling frail older adults. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, *18*(4), 352–357. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12603-014-0025-3>.

Tamsen, M., Shekarchizadeh, H., & Soltanizadeh, N. (2018). Evaluation of wheat flour substitution with amaranth flour on chicken nugget properties. *LWT*, *91*, 580-587.

Tan, E. S., Ying-Yuan, N., & Gan, C. Y. (2014). A comparative study of physicochemical characteristics and functionalities of pinto bean protein isolate (PBPI) against the soybean protein isolate (SPI) after the extraction optimisation. *Food chemistry*, *152*, 447-455.

Tappenden, K. A., Quatrara, B., Parkhurst, M. L., Malone, A. M., Fanjiang, G., & Ziegler, T. R. (2013). Critical role of nutrition in improving quality of care: An interdisciplinary call to action to address adult hospital malnutrition. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, *37*(4), 482–497. <https://doi.org/10.1177/0148607113484066>.

Tharanathan, R. N., & Mahadevamma, S. (2003). Grain legumes-a boom to human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, *14*(12), 507-518. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.07.002>.

Tömösközi, S., Lásztity, R., Haraszi, R., & Baticz, O. (2001). Isolation and study of the functional properties of pea proteins. *Food/Nahrung*, *45*(6), 399-401.

Tovar, L. R., Brito, E., Takahashi, T., Miyazawa, T., Soriano, J., & Fujimoto, K. (1989). Dry heat popping of amaranth seed might damage some of its essential amino acids. *Plant Foods for Human Nutrition*, *39*(4), 299-309. <https://doi.org/10.1007/BF01092066>.

Ucán, C., & Lorenzo, S. (2017). Caracterización de las proteínas de la semilla de calabaza (*Cucurbita argyrosperma Huber*) y la determinación de su calidad nutricional.

Valentas, K. J., Clark, J. P., & Levin, L. (1990). Food processing operations and scale-up (Vol. 42). CRC Press.

Vasanthan, T., Yeung, J., & Hoover, R. (2001). Dextrinization of starch in barley flours with thermostable alpha-amylase by extrusion cooking. *Starch-Stärke*, 53(12), 616-622.

Vasse, E., Beelen, J., de Roos, N. M., Janssen, N., & de Groot, L. C. (2018). Protein intake in hospitalized older people with and without increased risk of malnutrition. *European Journal of Clinical Nutrition*, 72(6), 917–919. <https://doi.org/10.1038/s41430-018-0171-5>

Vidal-Valverde, C., Frias, J., Diaz-Pollan, C., Fernandez, M., Lopez-Jurado, M., & Urbano, G. (1997). Influence of processing on trypsin inhibitor activity of faba beans and its physiological effect. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(9), 3559-3564. <https://doi.org/10.1021/jf9700236>.

Wang, N., Hatcher, D. W., Tyler, R. T., Toews, R., & Gawalko, E. J. (2010). Effect of cooking on the composition of beans (*Phaseolus vulgaris L.*) and chickpeas (*Cicer arietinum L.*). *Food Research International*, 43(2), 589-594. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.012>.

Wani, I. A., Sogi, D. S., Shivhare, U. S., & Gill, B. S. (2015). Physico-chemical and functional properties of native and hydrolyzed kidney bean (*Phaseolus vulgaris L.*) protein isolates. *Food Research International*, 76, 11-18.

Wee, M. S. M., Loud, D. E., Tan, V. W. K., & Forde, C. G. (2019). Physical and sensory characterisation of noodles with added native and denatured pea protein isolate. *Food chemistry*, 294, 152-159.

Wellman, N. S. (2009). Handbook of clinical nutrition and aging (pp. 106-108). C. W. Bales, & C. S. Ritchie (Eds.). New York, NY, USA:: Humana Press.

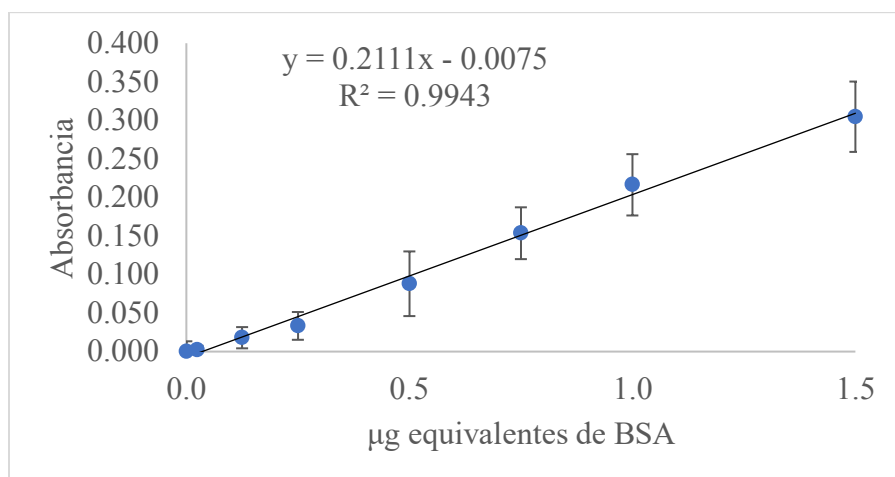
Wu, W., Williams, W. P., Kunkel, M. E., Acton, J. C., Huang, Y., Wardlaw, F. B., & Grimes, L. W. (1996). Amino acid availability and availability-corrected amino acid score of red kidney beans (*Phaseolus vulgaris L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(5), 1296-1301. <https://doi.org/10.1021/jf9503016>.

Zhang, H., Zhang, F., & Yuan, R. (2020). Applications of natural polymer-based hydrogels in the food industry. In *Hydrogels based on natural polymers* (pp. 357-410). Elsevier.

Zúñiga, E., & Vega, D. (2004). Envejecimiento de la Población de México: Reto del siglo XXI. *Consejo Nacional de Población*.

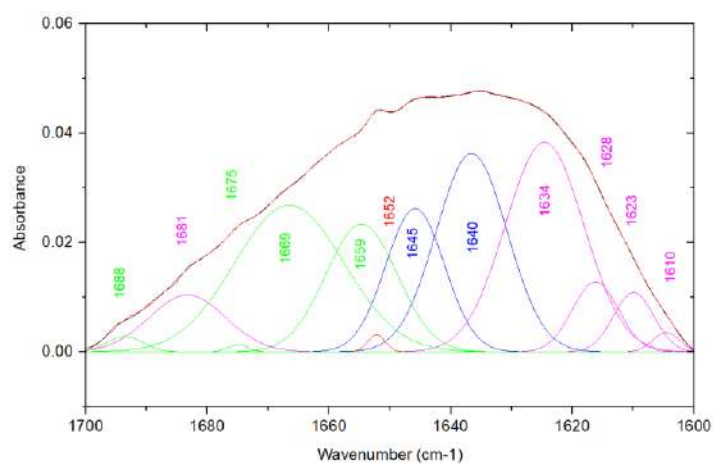
## 9. ANEXOS

**Anexo 1.** Curva de calibración de BSA para cuantificación de proteína por el método de Bradford.



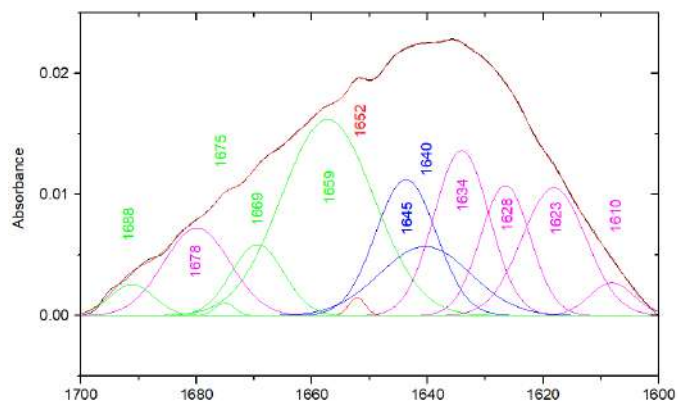
**Figura 33.** Curva de calibración de BSA (albumina de suero bovino) en agua destilada para determinación de proteína por el método de Bradford.

**Anexo 2.** Deconvolución de espectro FTIR de APC.



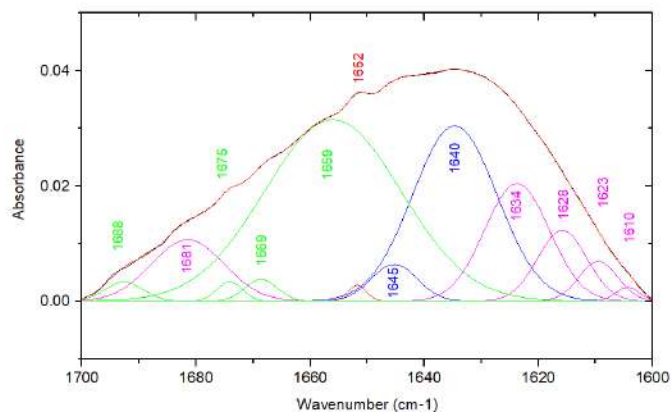
**Figura 34.** Deconvolución de APC con bandas características.

**Anexo 3.** Deconvolución de espectro FTIR de APF.



**Figura 35.** Deconvolución de APF con bandas características.

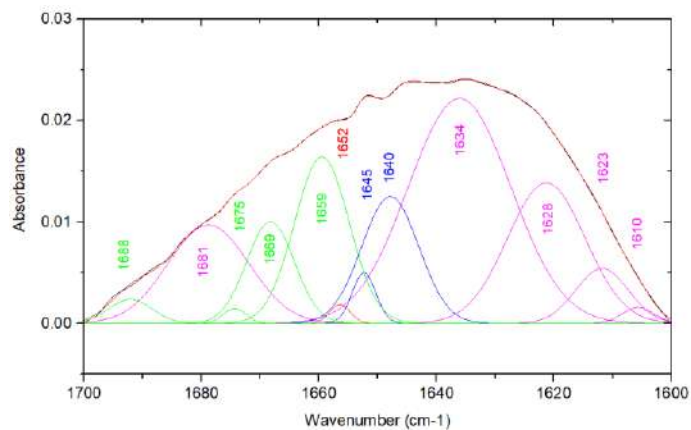
**Anexo 4.** Deconvolución de espectro FTIR de MSC.



**Figura 36.** Deconvolución de MSC con bandas características.

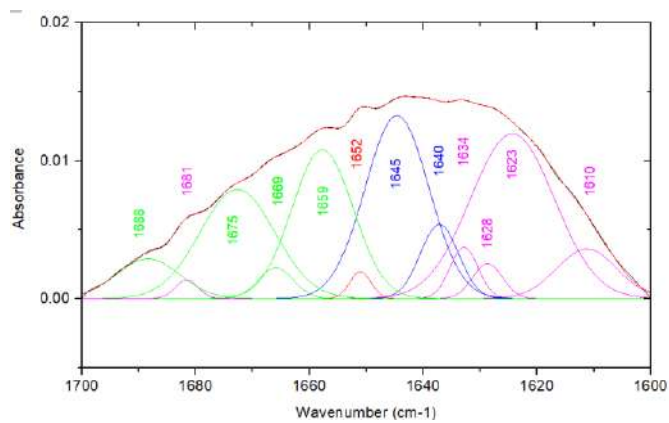


**Anexo 5.** Deconvolución de espectro FTIR de MCC.



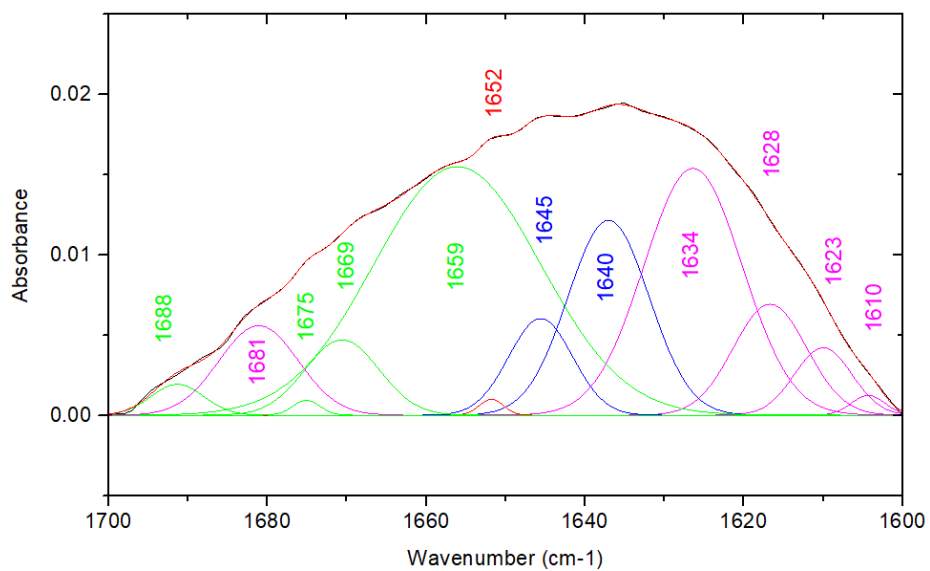
**Figura 37.** Deconvolución de MCC con bandas características.

**Anexo 6.** Deconvolución de espectro FTIR de M30.



**Figura 38.** Deconvolución de M30 con bandas características.

**Anexo 7.** Deconvolución de espectro FTIR de M40.



**Figura 39.** Deconvolución de M40 con bandas características.