

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

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

ELABORACIÓN DEL ENLATADO DE DOS VARIEDADES DE FRIJOL
COMÚN (*Phaseolus vulgaris*) Y EVALUACIÓN DE SU EFECTO
ANTIDIABÉTICO.

TESIS

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

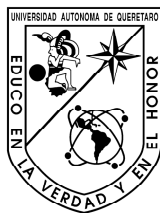
PRESENTA

I.Q. VIRIDIANA ORTEGA CÓRDOVA

DIRIGIDO POR

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO.

C.U. SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO., SEPTIEMBRE 2010



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

ELABORACIÓN DEL ENLATADO DE DOS VARIEDADES DE FRIJOL COMÚN
(*Phaseolus vulgaris*) Y EVALUACIÓN DE SU EFECTO ANTIDIABÉTICO.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de la
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I.Q. Viridiana Ortega Córdova

Dirigido por:

Dra. Rosalía Reynoso Camacho.

SINODALES

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Presidente

Firma

Dr. José Alberto Gallegos Infante
Secretario

Firma

Dra. Ma. Guadalupe Loarca Piña
Vocal

Firma

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Suplente

Firma

Dra. Nuria Elizabeth Rocha Guzmán
Suplente

Firma

Q.B. Magali E. Aguilar Ortíz
Director de la Facultad

Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Septiembre, 2010
México

RESUMEN.

El frijol cocido de manera tradicional posee propiedades antidiabéticas, sin embargo, no existen estudios donde se relacionen estos efectos con el tipo de cocción que se utiliza para su preparación. El objetivo del presente estudio fue enlatar dos variedades de frijol común; Negro 8025 (NL) y Flor de Junio Marcela (FL) y evaluar su efecto antidiabético. A los granos se les determinó factibilidad de enlatado. Se realizó cocción en olla de ambas variedades (NO y FO). Al producto terminado se le evaluó calidad, contenido de fenoles y capacidad antioxidante. Para los estudios *in vivo*, se utilizaron ratas diabéticas alimentadas con una dieta suplementada con frijol al 9%. Las ratas fueron sacrificadas cuantificando lípidos en suero, proteínas en orina y depuración de creatinina, a los riñones se les realizó estudios histopatológicos y se determinó la expresión de VCAM y TNF- α . En los resultados de factibilidad de enlatado y calidad de producto terminado ambas variedades presentaron características adecuadas. El frijol NL y NO presentaron mayores cantidades de taninos condensados (12.4-14.5 mg eq. +catequina/g) y antocianinas (71.5-98.9 mg eq. Cianidina 3-glucósido/kg). La capacidad antioxidante fue mayor en el frijol FL y FO. Para los estudios *in vivo* no se observaron diferencias en los niveles de glucosa con respecto al control (CD), sin embargo, los triglicéridos disminuyeron para NL y FL hasta en un 57%. Se observó que los grupos NO y FL presentaron niveles de proteína en orina menores al CD 33 y 64% respectivamente, en depuración de creatinina el grupo NO presentó un nivel superior (83%) al CD. Los resultados histológicos no mostraron diferencias para los tratamientos. En la cuantificación de VCAM y TNF- α los grupos NO y FL tuvieron menor expresión. Se concluye que los frijoles N8025 y Flor de Junio Marcela presentan características adecuadas para ser enlatados, sin embargo, la protección contra daño renal es dependiente de la variedad y del proceso de cocción.

Palabras claves: Antidiabéticas, cocción en olla, enlatado

SUMMARY.

Beans cooked in the traditional way have anti-diabetic properties; nevertheless, there are no studies that relate these effects to the type of cooking used in their preparation. The objective of this study was to can two types of common beans – 8025 black beans (CB) and *flor de junio Marcela* beans (CF) and to evaluate their anti-diabetic effect. The feasibility of canning was determined for these grains. Both varieties (PB and PF) were cooked in pots. The finished product was evaluated in terms of quality, phenol content and antioxidant capacity. For *in vivo* studies, diabetics rats were sacrificed, and serum lipids, urine proteins and creatinine clearance were quantified. Histopathological studies of the kidneys were carried out and the expression of VCAM and TNF- α was determined. Both varieties showed the proper characteristics in the results from canning feasibility and end product quality. Canned and pot cooked black beans (CB and PB) had greater amounts of condensed tannins (12.4-14.5 mg eq. to +catechin/g) and anthocyanins (71.5-98.9 mg eq. to cyanidin 3-glucoside/kg). The antioxidant capacity was greater in the CF and PF. No differences were observed in the glucose levels in the *in vivo* studies regarding control (DC); nevertheless, the triglycerides decreased for the CB and CF by up to 57%. It was observed that the PB and CF groups had urine protein levels lower than the DC, 33 and 64% respectively. For creatinine clearance the PB had a higher level (83%) than the DC. The histopathological results showed no differences regarding treatment. In the quantification of VCAM and TNF- α , the PB and CF groups had lower levels. Our conclusion is that B8025 and *flor de junio Marcela* beans have the proper characteristics for canning; however, protection against kidney damage depends upon the variety and cooking process.

Key words: Anti-diabetics, cooking in pot, canning

DEDICATORIAS

A Dios:

Por darme la salud, la motivación y las bendiciones necesarias para concluir otra etapa más de la vida que me diste.

A mis padres y mis hermanas:

Por ser mi motivación, mis fuerzas, lo más grande de mi vida, pero sobre todo por su incondicional amor que es mi gran tesoro. Gracias por cuidar de mí siempre, aun en la distancia y los años, con el amor y la ternura que lo hacen. Los amo con todo mi corazón.

A Cain:

Gracias por contar contigo en este tiempo que llevamos juntos, por tu apoyo, por tu abrazo, por compartir conmigo momentos lindos y momentos difíciles, por cuidarme y hacerme reír, gracias de corazón “flako”.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la oportunidad y el apoyo económico brindado.

Al Instituto Tecnológico de Durango, a la Dra. Nuria y al Dr. Alberto gracias por su apoyo y amabilidad durante mi estancia en Durango, por las observaciones y sugerencias al trabajo realizado. Gracias también a sus alumnas por las facilidades que me brindaron a Verito, Angélica, Marisol, Margarita, Maye, Mayra, Cristal. Un muy especial agradecimiento a la Sra. Magda, a Luis y al *chapis* por abrirme las puertas de su hogar, los llevo presentes con mucho cariño 😊.

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí a la I.A. Alicia, I.A. Sandra, M. C. Lorena por su enorme apoyo para la elaboración de los enlatados. Mil gracias.

A la Dra. Loarca y a la Dra. Silvia por su amabilidad, tiempo y disponibilidad en las aportaciones que realizaron a este trabajo, muchas gracias.

A la Dra. Rosalía, por la persona que es, todo mi respeto y admiración para usted como profesional y como mujer, gracias por sus clases, por su paciencia, por su apoyo, por las pláticas que tuvimos...y por las donas de maple y las galletitas 😊.

A la Dra. Mine muchas gracias por lo amable que fue siempre conmigo, por las consultas que le hice, por asistir a nuestros convivios y compartirnos de su persona, por prestarnos su espectro y su laboratorio 😊, muchas gracias doctora.

A mis compañeros de la maestría a Vanesa Saraí, Tessita del Carmen, Almis, Lau, Bere, Chuy, Jore, Alex, Fany y a todos los de la generación, gracias porque de cada uno de ustedes aprendí mucho 😊.

A la Lic. Ceci de la Isla y a mis amigas GSA un especial agradecimiento por el enorme soporte personal y emocional que aportan a mi vida, las quiero mucho.

A mi adorada familia en Oaxaca mis tías, mis primas gracias por sus porras cuando voy, que me hacen regresar a Querétaro con más pila, también a mis amigas (Fany y Wen con especial cariño) y amigos de aquí y de Oaxaca, que me llenan siempre de entusiasmo y alegría vitales para seguir adelante en cualquier proyecto, los quiero mucho 😊.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN.	i
SUMMARY.	ii
ÍNDICE GENERAL.	iiiiv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE CUADROS.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	3
2.1.1 Generalidades	3
2.1.2 Composición química.....	3
2.1.3 Procesamiento del frijol.....	4
2.1.3.1 Enlatado del frijol	5
2.1.3.2 Tratamiento térmico en el proceso de enlatado.....	6
2.1.3.3 Valor de esterilización comercial (F)	7
2.1.4 Estándares de calidad del frijol enlatado.....	8
2.1.5 Efecto del consumo del frijol sobre la salud	8
2.2 Diabetes mellitus.....	10
2.2.1 Definición.....	10
2.2.2 Prevalencia	10
2.2.3 Tipos de diabetes.....	10
2.2.3.1 DM tipo 1	11
2.2.3.2 DM tipo 2	11
2.2.4 Complicaciones de la diabetes.....	12
2.2.4.1 Daños microvasculares.....	12
2.2.4.2 Daños macrovasculares.....	12
2.2.5 Estrés oxidativo en la DM	13
2.2.6 Nefropatía diabética.....	13
III. JUSTIFICACIÓN.....	15
IV. HIPÓTESIS	16
V. OBJETIVOS.....	17

5.1 Objetivo general.....	17
5.2 Objetivos específicos	17
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	18
6.1 Materiales	18
6.1.1 Material químico.....	18
6.1.2 Material biológico.....	18
6.2 Métodos.....	18
6.2.1 Caracterización de los frijoles de las variedades a enlatar	18
6.2.1.1 Tamaño de grano.....	18
6.2.1.2 Ganacia de tamaño al cocer	19
6.2.1.3 Tiempo de cocción.....	19
6.2.1.4 Capacidad de absorción de agua.....	20
6.2.3 Determinación de la dinámica de calentamiento del punto frío de la lata	20
6.2.4 Determinación del valor de esterilización	22
6.2.5 Aplicación de métodos de cocción	22
6.2.5.1 Cocción tradicional casera	22
6.2.5.2 Cocción proceso de enlatado.....	22
6.2.6 Determinación de calidad de producto enlatado	24
6.2.6.1 Integridad.....	24
6.2.6.2 Color	24
6.2.6.3 Textura	25
6.2.7 Evaluación de las propiedades químicas de las harinas	26
6.2.7.1 Extracción de compuestos fenólicos de la muestra.....	26
6.2.7.2 Cuantificación de taninos condensados	27
6.2.7.3 Cuantificación de flavonoides.....	27
6.2.7.4 Cuantificación de antocianinas.....	28
6.2.7.5 Cuantificación de fenoles totales.....	28
6.2.7.6 Determinación de capacidad antioxidante por ABTS.....	29
6.2.7.7 Determinación de capacidad antioxidante por DPPH	30
6.2.8 Evaluación <i>in vivo</i>	30
6.2.8.1 Aclimatación de los animales de experimentación	30
6.2.8.2 Grupos experimentales	30
6.2.8.3 Inducción de diabetes	31

6.2.8.4 Sacrificio	32
6.2.8.5 Determinación de perfil lipídico en sangre.....	32
6.2.8.6 Determinación de proteína en orina	32
6.2.8.7 Determinación de creatinina.....	32
6.2.8.8 Cortes histológicos de riñones y tinción de PAS	33
6.2.8.9 Extracción de RNA	34
6.2.8.10 Amplificación por RT-PCR	34
6.3 Análisis estadístico	35
VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	36
7.1 Caracterización de frijoles a enlatar	36
7.2 Dinámicas de calentamiento y enfriamiento del punto frío de la lata.....	38
7.3 Calidad de producto enlatado	42
7.3. 1. Integridad.....	42
7.3.2. Color	45
7.3.3. Textura	46
7.4 Cuantificación de compuestos fenólicos	47
7.5 Determinación de capacidad antioxidante.....	51
7.6 Evaluación <i>in vivo</i> del efecto antidiabético de las harinas de frijol.....	52
7.6.1 Concentraciones de glucosa.....	52
7.6.2 Peso corporal.....	54
7.6.3 Consumo de alimento	56
7.6.4 Consumo de agua.....	59
7.6.5 Perfil de lípidos	60
7.6.6 Proteína en orina	61
7.6.7 Depuración de creatinina	63
7.6.8 Expresión de TNF α y VCAM en riñones.....	64
7.6.9 Análisis histológico de riñones	66
VIII. CONCLUSIONES.....	68
IV. BIBLIOGRAFÍA	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura renal.	14
2	Posición de los termopares a lo largo de la geometría de la lata.	21
3	Acomodo de las latas con los termopares dentro de la autoclave conectados a un sistema de adquisición de datos.	21
4	Diagrama de flujo del proceso seguido para el enlatado de las variedades en estudio.	23
5	Espacio de color CIE L^* , a^* , b^* CIELAB Commission Internationale d'Eclairage (Comisión Internacional de Iluminación).	25
6	Texturómetro TA- XT2i utilizado para la medición de textura en muestras.	26
7	Dinámica de calentamiento de los termopares posicionados en diferentes puntos de la lata con frijol Negro 8025 durante su tratamiento térmico a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 15 lb de presión. Donde T_a es la temperatura de la autoclave y T_L es la temperatura medida por el termopar a cada tiempo	40
8	Dinámica de calentamiento de los termopares posicionados en diferentes puntos de la lata con frijol Flor de Junio Marcela durante su tratamiento térmico a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 15 lb de presión. Donde T_a es la temperatura de la autoclave y T_L es la temperatura medida por el termopar a cada tiempo.	41
9	Dinámica de enfriamiento de los termopares posicionados en diferentes puntos de la lata con frijol Negro 8025 durante su tratamiento térmico a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 15 lb de presión. Donde T_E es la temperatura de la autoclave en el enfriamiento y T_L es la temperatura medida por el termopar a cada tiempo.	42
10	Dinámica de enfriamiento de los termopares posicionados en diferentes puntos de la lata con frijol Flor de Junio Marcela durante su tratamiento térmico a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 15 lb de presión.	42

Donde T_E es la temperatura de la autoclave en el enfriamiento y T_L es la temperatura medida por el termopar a cada tiempo.

11	Comparación de la integridad de frijoles enlatados, a) Negro 8025, b) Flor de Junio Marcela, c) Negro de marca comercial y d) Bayo de marca comercial.	45
12	Fuerza aplicada a los granos de frijol de cada variedad como medición de la textura sin llegar a la deformación del material.	48
13	Concentración de glucosa sanguínea en ratas diabéticas alimentadas con una dieta suplementada al 9% con frijol de olla y frijol de lata.	54
14	Peso corporal semanal en ratas diabéticas alimentadas con una dieta suplementada al 9% con frijol de olla y frijol de lata.	56
15	Consumo de alimento semanal en ratas diabéticas alimentadas con una dieta suplementada al 9% con frijol de olla y frijol de lata.	58
16	Consumo final de alimento después de tres semanas de tratamiento en ratas sanas alimentadas con dieta normal y con dieta suplementada al 9% con frijol negro de lata (NL).	59
17	Consumo de agua semanal en ratas diabéticas alimentadas con una dieta suplementada al 9% con frijol de olla y frijol de lata.	60
18	Depuración de creatinina en ratas diabéticas alimentadas con una dieta suplementada al 9% con frijol de olla y con frijol de lata.	63
19	Cortes histológicos transversales de riñón de rata con tinción Pas, vistos al microscopio.	64
20	Expresión de VCAM y TNF- α en el riñón de ratas alimentadas con harinas de frijol.	66

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Clasificación de carbohidratos de los frijoles establecida por FAO/OMS de acuerdo a su naturaleza glicémica y no glicémica.	4
2	Clasificación del tamaño del grano de frijol con base en el peso de 100 semillas.	19
3	Clasificación del problema de cocción con base en la Capacidad de Absorción de Agua.	20
4	Grupos experimentales para la evaluación del efecto antidiabético con harinas de frijol obtenidas por proceso de enlatado y por cocimiento tradicional.	31
5	Características de calidad del frijol para el proceso de enlatado.	37
6	Tiempo de tratamiento térmico para la esterilización y cocción del frijol.	43
7	Integridad de frijoles en estudio enlatados comparados con enlatados de marca comercial.	44
8	Parámetros de color de los frijoles enlatados comparados con los cocidos por métodos tradicionales.	46
9	Compuestos fenólicos de las muestras de frijol enlatados y cocidos por métodos tradicionales.	50
10	Capacidad antioxidante expresados como % de Inhibición y como mM equivalentes de Trolox/ g de harina.	52
11	Perfil de lípidos en suero de ratas diabéticas alimentadas con una dieta suplementada al 9% con frijol de olla y con frijol de lata.	62

I. INTRODUCCIÓN

El frijol es uno de los alimentos base en la dieta del mexicano, es una fuente importante de proteína, fibra y otros nutrientes, sobre todo en estratos sociales de bajos ingresos. Sin embargo, en los últimos años ha disminuido su ingesta así como también de otros alimentos como frutas y verduras, lo cual, en combinación con la falta de actividad física, ha impactado en el padecimiento de enfermedades crónico degenerativas como la diabetes.

México ocupa el noveno lugar en números de casos de diabetes en el mundo, esto no ha cambiado hasta el año 2007 según datos de la Federación Internacional de Diabetes. Lo anterior ha originado el desarrollo de diferentes trabajos enfocados a prevenir y controlar este padecimiento.

Diferentes estudios han comprobado el efecto antidiabético del frijol, lo que se ha relacionado principalmente con su bajo aporte calórico, alto contenido de fibra y compuestos fenólicos, ya que se sabe que los niveles de glucosa en sangre y el estrés oxidativo en una persona diabética están estrechamente relacionados con la dieta. La hiperglucemia crónica en la diabetes y el elevado estrés oxidativo se asocia a largo plazo a lesiones que provocan disfunción y alteración de varias células, en especial la de los riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos. Esto se lleva a cabo, por la glicosilación proteica y el aumento de las especies reactivas de oxígeno, que dañan las paredes de los vasos sanguíneos y altera las funciones de su capa interna, lo que puede inducir a las células a la muerte, provocando que los tejidos se lesionen y pierdan su función.

Por otro lado, las estadísticas señalan que el consumo de frijol enlatado se ha incrementado, lo cual se debe a los cambios en los estilos de vida. Lo anterior ha favorecido, que la población incline su preferencia hacia alimentos preparados listos para consumir.

Durante el proceso de enlatado del frijol, así como de otros alimentos, el tratamiento térmico juega un papel importante en la calidad final del producto. El objetivo del tratamiento térmico de un alimento enlatado, es la destrucción de la población microbiana e inactivación de enzimas para prevenir el deterioro del producto, sin embargo, el calentamiento también causa cambios en las características fisicoquímicas y biológicas del alimento. De tal manera que el procesamiento térmico en un alimento enlatado debe alcanzar un equilibrio entre la calidad y sanidad del producto final.

En el presente trabajo, se realizó el enlatado de dos variedades de frijol común Negro 8025 y Flor de Junio Marcela, con énfasis en la determinación del tiempo de tratamiento térmico, buscando el disminuir la pérdida de propiedades funcionales y nutraceuticas. Esto último, debido a que ambas variedades han demostrado un efecto antidiabético en trabajos realizados en la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro, en las cuales se aplicó un método de cocción tradicional (cocción en olla). En base a lo anterior, en este estudio se evaluó el efecto de ambas variedades sometidas a un proceso de enlatado industrial y comparado con un proceso tradicional, sobre el control de la diabetes. Los resultados mostraron que, aunque no hubo un control de los niveles de glucosa y lípidos en suero en los animales diabéticos, se observó un posible efecto protector sobre el daño renal en los grupos alimentados con las harinas de frijol Negro de olla (NO) y Flor de Junio de lata (FL) ya que estos grupos presentaron menores niveles de depuración de creatinina y menor expresión de TNF- α y VCAM.

II. ANTECEDENTES

2.1 Frijol común (*Phaseolus vulgaris*)

2.1.1 Generalidades

Actualmente se consumen en nuestro país más de 70 diferentes variedades de frijol, desde que se distribuyen en 7 grupos: negros, amarillos, blancos, morados, bayos, pintos, moteados (Financiera Rural, 2009)

El consumo de frijol es importante en la dieta del mexicano, ya que es una fuente principal de fibra, proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales, además de algunos lípidos en menor proporción (Guzmán y col., 2000).

El consumo *per capita* de frijol en México ha tenido variaciones en su consumo a través de los años. Se estima que, el consumo *per capita* por año de frijol fue de 1992 a 1996 de 12 kg, en el 2006 se registraron cifras de 9.4 kg y para el 2008 se registró un aumento a valores nuevamente de 12 kg (SAGARPA, 2008).

2.1.2 Composición química

El porcentaje de proteína en el frijol varía de acuerdo a la época de crecimiento y localización geográfica del cultivo, además de otros factores internos oscilando entre el 16 y 33% (Osborn, 1988).

El contenido de carbohidratos varía del 50 al 60% del peso en base seca de la semilla (da Silva y col., 2006). El almidón representa el principal constituyente de esta fracción, siendo aproximadamente el 35% del peso de la semilla en base seca. Otros carbohidratos como la fibra cruda alcanzan niveles de 3 a 10%. Polisacáridos como la hemicelulosa y la lignina que forman la pared de la testa conforman la fibra dietaria cuyo contenido varía de 14 a 19% del peso seco de la semilla (Pak y col., 1990).

El contenido de carbohidratos de los frijoles según la clasificación establecida por la FAO/OMS (1998) pueden ser clasificados de acuerdo a su naturaleza de carbohidratos glicémicos y no glicémicos tal como se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación de carbohidratos de los frijoles establecida por FAO/OMS de acuerdo a su naturaleza glicémica y no glicémica.

Carbohidratos glicémicos	Carbohidratos no glicémicos
Glucosa libre	Fibra dietética total
Almidón total	Fibra soluble
Almidón rápidamente digerible	Fibra insoluble
Almidón lentamente digerible	Almidón resistente

(FAO, OMS, 1998)

El contenido de lípidos oscila entre 1 y 5% del peso seco de la semilla siendo los principales el oleico, linoleico y linolénico (Messina, 1999).

El frijol contiene una gran variedad de microelementos entre los que se destacan las vitaminas como la niacina, tiamina, rivotlavina y ácido fólico; minerales como el Ca, Fe, Cu, Zn, P, K y Mg (Augustin, 1989), y los compuestos fenólicos entre los que podemos citar a los flavonoides, antocianinas, taninos condensados, ácidos fenólicos (ácido p-hidroxibenzoico, ácido vanilínico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico), isoflavonas (genisteína, daizeína) y el fitoestrógeno perteneciente al grupo cumestano denominado cumestrol entre muchos otros (Díaz y col., 2006; Espinoza y col., 2006).

2.1.3 Procesamiento del frijol

Se ha identificado la existencia de un mercado de consumo en crecimiento acelerado para el frijol procesado debido a los cambios sociales, así como al aumento del empleo para las mujeres, lo que disminuye el tiempo de preparación de los alimentos (Valdés y col., 1995).

El 2% de la producción nacional y un volumen no determinado de frijol importado se transforma en productos muy diversos, tales como frijol cocido embolsado, frijol enlatado, deshidratado y combinados con otros productos, etc.

Se ha reportado que 72.5% de los consumidores mexicanos, prefieren el frijol en grano y un 20.62% industrializado, de este último; 13.8% enlatado, 4.62% empacado al vacío, 1.60% en tetra-pack y 0.60% deshidratado (Rodríguez y col., 2008).

2.1.3.1 Enlatado del frijol

Aun cuando las etapas características de un proceso de enlatado de frijol pueden cambiar según la variedad y la empresa empacadora, en términos generales se procede a través de 11 etapas: limpieza, escaldado, preparado, llenado, agotamiento, cierre, esterilización, enfriado, etiquetado, cuarentena y empacado (A. A. P. P. A., 2003).

La limpieza se realiza con el fin de eliminar impurezas; posteriormente se lleva el frijol a un escaldado para inactivar enzimas que pudieran repercutir en el desarrollo de sabores y aromas indeseables en el producto final. Enseguida se realiza la preparación del frijol en donde se incorporan condimentos (sal, cebolla ajo, etc). Una vez preparados los frijoles se realiza el llenado de las latas dejando un espacio de cabeza de aproximadamente de 1 a 2 cm entre el alimento y el borde de la lata. Se realiza el agotamiento, en el que se hacen pasar las latas en un tunel donde se suministra vapor de agua esto con la finalidad de eliminar el oxígeno del alimento y evitar el desarrollo de reacciones indeseables en el alimento. Se cierra o engargola, y se dispone a la esterilización en autoclave o también llamado tratamiento térmico a condiciones propias de tiempo y temperatura para la variedad de frijol que se utilice siendo ésta una etapa crítica del proceso. Pasado el tiempo de esterilización, las latas son enfriadas, ya sea en chorro de agua o sumergiéndolas en tinas con agua fría a 4 °C. Finalmente son etiquetadas y llevadas a cuarentena para monitorear reacciones indeseables

visualizadas por abombamiento de la lata y por último son empaquetadas (Llamas, 2009).

2.1.3.2 Tratamiento térmico en el proceso de enlatado

Un procesamiento térmico efectivo, se basa en la definición de esterilización comercial. En México, la norma oficial NOM-130-SSA1-1995 define a la esterilización comercial como: el tratamiento térmico aplicado al producto para la destrucción de todos los microorganismos viables de importancia en la salud pública y aquellos capaces de reproducirse en el alimento bajo condiciones normales de almacenamiento y distribución, sin la condición de refrigeración.

Los procesos térmicos tienen como finalidad garantizar la esterilidad comercial, minimizar costos, maximizar la retención de nutrientes y optimizar los recursos energéticos. Su objetivo es procesar alimentos seguros, de alta calidad y con un valor que el consumidor esté dispuesto a erogar (Ghani, 2006).

La penetración de calor en un alimento envasado puede realizarse por conducción o por convección por el movimiento de líquidos o gases; o bien por la combinación de ambas que es como ocurre generalmente.

La condición de proceso tiempo-temperatura es un factor decisivo aplicado de acuerdo al tiempo de vida útil esperado para el producto, sin embargo el calentamiento también causa cambios en características fisicoquímicas y biológicas del alimento (Xiong, 1994). De tal manera que, el procesamiento térmico en un alimento debe alcanzar un equilibrio entre la calidad y la sanidad del producto final.

Existen factores que afectan la velocidad de penetración de calor como son: tamaño y forma del envase, relación sólido/líquido, consistencia del alimento, volumen de llenado del envase, material del envase (A. A. P. P. A., 2003). Por lo que para asegurar la calidad del enlatado comercial, es necesario establecer la dinámica de calentamiento del denominado punto frío de la lata (Ghani y col, 1999). La dinámica del punto frío de la lata usualmente se determina de manera

experimental, colocando termopares en varios sitios del recipiente, posteriormente la lata se somete al tratamiento térmico en autoclave y durante todo el proceso se registra la temperatura contra el tiempo, lo que permite inferir la ubicación del punto frío que es el que va a determinar el tiempo de tratamiento para asegurar la esterilidad comercial (Zechman y col., 1989).

2.1.3.3 Valor de esterilización comercial (F)

Varios parámetros de inactivación han sido desarrollados como herramientas matemáticas para obtener una relación tiempo-temperatura. Esta relación es necesaria para alcanzar un tratamiento térmico acertado durante el proceso de enlatado de un alimento. El valor de esterilización F, es un parámetro de gran utilidad que se refiere a los minutos requeridos para destruir un número finito de microorganismos a determinada temperatura. Es decir, es una combinación de la relación tiempo/temperatura recibida por un alimento para asegurar una “esterilidad comercial” (Ramaswamy y col., 2006).

Los métodos de procesamiento térmico aplicados a los alimentos para la destrucción de microorganismos relevantes para la salud pública, integran los efectos letales de los mismos. Entre los métodos más precisos para conocer el valor de esterilización F se encuentran dos clases: 1) Método general descrito por Bigelow y col. (1920) que integra los efectos letales por una gráfica o procedimiento de integración numérica basados en datos de tiempo-temperatura obtenidos a partir de pruebas de procesos en envases bajo condiciones de proceso comerciales actuales y el 2) Método de la fórmula descrito por Ball (1923) que integra los efectos letales por una gráfica o procedimientos de integración numérica basados en datos de tiempo-temperatura. De ellos se han desprendido otra serie de métodos adaptados a diferentes productos.

2.1.4 Estándares de calidad del frijol enlatado

El frijol enlatado es una de las formas principales de consumo de este producto agrícola. Para la obtención de productos enlatados como el frijol, se tienen que considerar diferentes características de la materia prima a enlatar como lo son: la capacidad de absorción de agua, que presente un peso de drenado más alto, bajos tiempos de cocimiento, tamaño uniforme, color aceptable por el consumidor, bajo número de granos rotos y baja cantidad de materia extraña (Wassimi y col., 1990). De igual forma, al producto terminado se le examinan diferentes parámetros entre éstos se destacan: el aspecto del frijol (integridad y color), la consistencia (textura) y el sabor. La integridad se refiere a la aparición de piel floja, frijoles rotos, triturados o manchados. Esta última característica es usada en la evaluación de la calidad del producto final enlatado (Wassimi y col., 1990).

2.1.5 Efecto del consumo del frijol sobre la salud

Los alimentos con bajo índice glucémico (IG) favorecen el control de la glucemia, disminuyendo los requerimientos de insulina y los niveles de triglicéridos plasmáticos (Fontvieille y col., 1992).

Los carbohidratos no glicémicos presentes en el frijol resisten la acción de las enzimas α -amilasas digestivas. Éstos llegan al intestino grueso en donde son fermentados por las bacterias colónicas quienes producen ATP y los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) produciendo un perfil de fermentación acético: propiónico: butírico en una proporción de 71: 12: 17 respectivamente. Los AGCC ejercen efectos fisiológicos sistémicos y locales que repercuten sobre el metabolismo lipídico y colónico (Goñi y col., 2001).

Otra de las ventajas del consumo de frijol es su aporte de fibra, la cual se relaciona con una mayor sensación de saciedad, debido a varias causas: producen un mayor volumen del alimento, mayor tiempo de ingestión, incrementa niveles de colecistocinina lo que ocasiona una mayor sensación de plenitud intestinal, esto último relacionado con las reducciones en los niveles plasmáticos

de glucosa e insulina en pacientes diabéticos por la disminución del consumo de alimento. Muchos de los efectos del consumo de frijoles en las lipoproteínas han sido atribuidos a su contenido en fibra dietética (Duane, 1997).

Entre los compuestos no nutritivos de los frijoles se pueden mencionar los inhibidores de enzimas (tripsina y α -amilasa), lectinas, fitatos, oxalatos, compuestos fenólicos y saponinas entre otras. Muchos de ellos se han identificado debido a los efectos adversos que producen, sin embargo, últimamente se ha demostrado que a dosis controladas, estos podrían ejercer efectos benéficos en la salud y en este sentido muchos autores los clasifican como compuestos bioactivos (Duranti, 2006). Con relación a los inhibidores de amilasa se ha comprobado que pueden reducir la digestibilidad de almidón, y por lo tanto reducir los niveles de glucosa sanguínea y aumentar los niveles de insulina en humanos y animales (Meller, 2006).

En cuanto a los compuestos fenólicos que contiene el frijol, estos están relacionados con la disminución del estrés oxidativo y de la inflamación (Rocha y col., 2007; Xu, 2008). Los polifenoles presentan un amplio espectro de actividades biológicas y se han propuesto como una herramienta terapéutica para controlar o corregir desórdenes crónicos atribuibles a su actividad antiinflamatoria, antioxidante, antidiabética, antimutagénica, antialérgica, antiviral y anticarcinogénica (Kusirisin y col., 2009).

Por todos estos beneficios, el frijol además de ser un alimento de gran valor nutritivo y ampliamente consumido en la población mexicana, ha cobrado una gran relevancia como alimento funcional sobre todo para el tratamiento de enfermedades crónico degenerativas como la diabetes.

2.2 Diabetes mellitus

2.2.1 Definición

La diabetes mellitus (DM) es una alteración metabólica caracterizada por la presencia de hiperglucemia crónica resultante de defectos en la secreción o en la acción de la insulina o de ambos mecanismos, que se acompaña en mayor o menor medida, de alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, de las proteínas y de los lípidos (Conget, 2002).

Los principales síntomas de esta enfermedad son incremento en la orina (poliuria), excesiva sed (polidipsia) y hambre (polifagia). Hay pérdida de peso, deshidratación, y pueden presentarse astenia (debilidad, cansancio) y adinamia (falta de fuerza).

2.2.2 Prevalencia

Actualmente la DM es una de las principales enfermedades crónicas a nivel mundial. Los nuevos hábitos de vida, fundamentalmente el exceso de ingesta calórica, la obesidad y el sedentarismo, permiten predecir un gran incremento en las próximas décadas, en especial en los países que en la actualidad están en vías de desarrollo (Calderon, 2007).

La población en México de personas con diabetes fluctúa entre los 6.5 y los 10 millones (prevalencia nacional de 10.7% en personas entre 20 y 69 años). México ocupa el noveno lugar de números de casos por diabetes en el mundo esto no ha cambiado hasta 2007 según datos de la Federación Internacional de Diabetes.

2.2.3 Tipos de diabetes

La DM es clasificada clínicamente dentro de dos principales formas, DM insulino-dependiente (IDDM) o de tipo 1 y la DM no insulino-dependiente (NIDDM) o de tipo 2 (Kuzuya y col., 2002).

2.2.3.1 DM tipo 1

La DM insulino dependiente (IDDM) o de tipo 1 es una enfermedad autoinmune que comienza generalmente en la niñez o edad adulta (Todd y col., 2007). Esta enfermedad es causada por una reacción corporal anormal en la cual el sistema inmune destruye las células secretoras de insulina en el páncreas. El cuerpo depende de la insulina para metabolizar el azúcar para la energía. La causa de la enfermedad es desconocida, pero se cree que está relacionado con una infección viral puesto que la destrucción de los tejidos secretores de insulina ocurre a menudo después de la inflamación del páncreas (Bupa's health, 2007).

2.2.3.2 DM tipo 2

La DM no insulino dependiente (NIDDM) o de tipo 2 representa el 90-95% de los casos de diabetes (Das y col., 2005). La DM de tipo 2 es caracterizada por una disminución en la acción y secreción de la insulina (Martin y col., 1992). Los tejidos sensibles a la insulina, como músculo y tejido adiposo, son resistentes a la acción metabólica de esta hormona, estado conocido como resistencia a la insulina. A diferencia de la IDDM, la NIDDM se asocia con un aumento de los niveles plásmicos de insulina.

Los niveles elevados de insulina circulante no son suficientes para controlar los niveles de glucosa en sangre, debido a la resistencia a esta hormona que presenta este tipo de pacientes, de tal manera que en últimas etapas de la enfermedad, las células β pancreáticas se agotan y no son capaces de producir suficiente insulina para evitar una hiperglicemia más intensa (Flores y col., 2005), por lo que en etapas más avanzadas de la enfermedad los pacientes con NIDDM pueden presentar características similares a los de la IDDM.

En la NIDDM destacan además de los factores genéticos, ambientales e inmunitarios el sobrepeso, inactividad física, malos hábitos de consumo de alimentos que conducen a la hiperglicemia (alto nivel de glucosa en sangre), hipertensión (alta tensión sanguínea) y dislipidemia (niveles alterados de lipoproteínas en sangre) (Hans y col., 2003).

2.2.4 Complicaciones de la diabetes

Exposiciones largas de hiperglucemia causan cambios reversibles e irreversibles en metabolismo y estructura de tejidos. Estos cambios pueden ser responsables de las complicaciones de la diabetes (Leslie, 1993).

La hiperglucemia crónica de la diabetes se asocia a largo plazo a lesiones que provocan disfunción y alteración de varios órganos, en especial ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (Mediavilla, 2002). Tales complicaciones están clasificadas como daños microvasculares y macrovasculares (Guzmán, 2003).

2.2.4.1 Daños microvasculares

Es un conjunto de problemas circulatorios causados por el daño provocado por glicosilación proteica (aumento de glucosa en la sangre que se combina con las proteínas debido a un tratamiento inadecuado) en la pared de los vasos sanguíneos pequeños, esto altera las funciones de la capa interna de los vasos sanguíneos, produciendo insuficiencia renal, retinopatía, y gangrena en miembros inferiores (Carrillo, 2006).

2.2.4.2 Daños macrovasculares

Los daños macrovasculares afectan a la pared de los grandes vasos por la acumulación de lipoproteínas de baja densidad LDL oxidadas, siendo éste el primer paso en la patogenia de la aterosclerosis. En la diabetes se da un gran estrés oxidativo caracterizado por el incremento de especies reactivas del oxígeno (ROS). Las proteínas de la matriz extracelular sufren glicosilación, y las LDL se unen con más afinidad a las proteínas glicosiladas facilitando su oxidación por los ROS y su acumulación en la pared vascular. Además en la diabetes disminuye el NO, que tiene actividad antiaterogénica (García, 2009).

2.2.5 Estrés oxidativo en la DM

Se ha demostrado que hay una estrecha relación entre el estrés oxidativo y la microangiopatía diabética, considerando que el efecto del equilibrio redox alterado sobre la función endotelial puede contribuir al inicio de macroangiopatía diabética. (Kuyvenhoven, 1999).

En el estudio de las causas implicadas en la aparición de estas patologías se ha demostrado que altos valores de glicemia conducen a un estrés oxidativo. Esto se debe a que la glucosa se autooxida y da lugar a la formación de α -cetoaldehídos, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical superóxido (O_2), entre otras especies reactivas del oxígeno (ROS) (Brownlee, 2001).

El estrés oxidativo puede ser una vía común que relacione mecanismos en apariencia diversos, pero que convergen en el papel que desempeñan el incremento de las ROS, los AGE y los productos de peroxidación lipídica (PL) en la explicación de la fisiopatología de estas enfermedades que frecuentemente padece el paciente diabético (Esposito, 2006).

2.2.6 Nefropatía diabética

El filtrado de la sangre se lleva a cabo en pequeñas unidades dentro de sus riñones llamadas nefronas. La nefrona es parte importante del mecanismo homeostático, que regula la cantidad de agua, sales, urea y glucosa del organismo. El nefrón, Figura 1, está compuesto por un pequeño vaso sanguíneo o capilar, llamado glomérulo, entrelazado a un pequeño conducto recolector de orina llamado túbulo (Parving, 2007).

La nefropatía diabética se refiere a las manifestaciones estrictamente renales de la diabetes mellitus, caracterizadas principalmente por proteinuria e insuficiencia renal. Parte importante de las alteraciones anatomopatológicas de la nefropatía diabética se explican por una acumulación de componentes como los productos finales de glicosilación avanzada (AGEs) que son compuestos que se forman

como consecuencia de la glicosilación de residuos amino en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos y su acumulación produce cambios morfológicos tanto en la estructura glomerular como en el intersticio renal (Fierro, 2009).

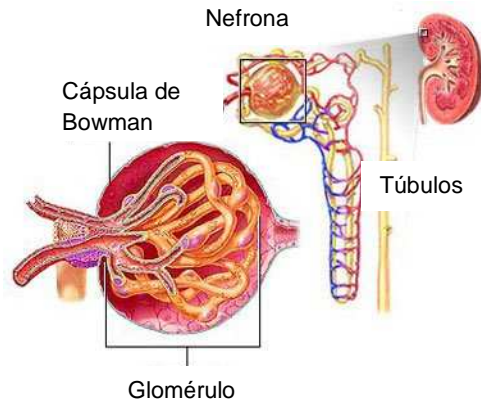


Figura 1. Estructura renal.

Como respuesta a este daño se inicia una reacción del sistema autoinmune en el cual participan monocitos-macrófagos, que generan sustancias químicas citotóxicas, liberan enzimas proteolíticas, liberan citoquinas (proinflamatorias y antiinflamatorias) y secreción de moléculas de adhesión, entre otras (Williams, 2007).

Una de las citocinas proinflamatorias que se ha relacionado ampliamente con el daño renal es la TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa). Cuando TNF- α se une a su receptor activa una serie de cascadas de señalización que incrementan la expresión de otras citocinas y de células de adhesión molecular (CAMs) entre éstas se puede mencionar a las de adhesión vascular (VCAM-1). Éstas últimas tienen un gran uso como biomarcadores de nefropatía diabética ya que la alteración de su adhesión y acumulación en el epitelio tubular puede llevar a su desprendimiento, viajando a través del flujo sanguíneo llegando a causar obstrucción en vasos más pequeños, así como también necrosis celular, atrofiando poco a poco las funciones propias del riñón (Navarro y col., 2006; Schor, 2005).

III. JUSTIFICACIÓN

Recientes investigaciones han demostrado la importancia del frijol como alimento nutraceutico para el control de enfermedades crónico degenerativas como la diabetes. México ocupa el noveno lugar de casos de diabetes en el mundo. Esta situación ha originado la investigación de nuevas alternativas para la prevención y el control de esta enfermedad.

Se sabe que la biodisponibilidad de los componentes del frijol está íntimamente relacionada con el tratamiento térmico aplicado para su cocción. Actualmente, se han reportado estudios donde se abordan los cambios composicionales y funcionales tras algunos tratamientos térmicos, sobre todo para procesamiento por cocimiento a olla abierta o con olla de presión. No obstante, no se encuentran estudios reportados en donde se relacionen los cambios en las propiedades funcionales de frijol enlatado con actividades antidiabéticas. Esto es importante, ya que las estadísticas señalan una tendencia creciente en la preferencia de frijol procesado en forma enlatada, debido al cambio en el estilo de vida en lo que respecta a la preparación de alimentos.

Investigaciones realizadas en la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos han demostrado un efecto antidiabético asociado al consumo de frijol enlatado de marcas "comerciales". En estas investigaciones se ha obtenido una respuesta hipoglucémica, hipolipidémica y se ha observado un efecto benéfico sobre biomarcadores de inflamación y daño renal. Sin embargo en este trabajo no se tomaron en cuenta variables que afectan directamente al producto final como son: las etapas durante el procesamiento, la variedad específica enlatada, el lugar y fecha de cosecha del frijol.

Por tal motivo en esta investigación se buscó evaluar el cambio en tales propiedades funcionales teniendo control sobre las variables anteriormente citadas y tomando como referencia los resultados cuando se utiliza un método de cocción tradicional en olla de aluminio de ambas variedades de frijol.

IV. HIPÓTESIS

El efecto antidiabético de harinas de frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) variedad Negro 8025 y Flor de Junio Marcela sometidas a un proceso de enlatado es similar al frijol cocido en olla (método tradicional).

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Elaborar enlatados de dos variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Negro 8025 y Flor de Junio Marcela y determinar su efecto antidiabético.

5.2 Objetivos específicos

1. Elaborar enlatados de dos variedades de frijol común; Negro 8025 y Flor de Junio Marcela.
2. Determinar compuestos fenólicos como: taninos condensados, flavonoides, antocianinas y fenoles totales, de las harinas de frijol cocido por el proceso de enlatado y por el método tradicional y evaluar su capacidad antioxidante por las técnicas de ABTS y DPPH.
3. Evaluar y comparar las propiedades antidiabéticas de las harinas de frijol enlatado y las obtenidas por cocción tradicional utilizando un modelo animal de diabetes.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

6.1.1 Material químico

- Reactivo de Folin-Ciocalteu, ácido gálico, vainillina, (+) catequina, rutina, 2-aminoetildifenilborato, estreptozotocina, Trizol, DPPH y el trolox fueron de la marca Sigma Aldrich; Na₂CO₃, HCl, etanol, metanol, éter etílico fueron de la marca J.T. Baker y el ABTS de la marca MP biomedical.
- Tiras reactivas para la determinación de glucosa sanguínea fueron de la marca ACCUTREND.
- Kits enzimáticos para la determinación de triglicéridos, colesterol, HDL y creatinina en suero y orina fueron de la marca Randox Laboratories.
- Todos los reactivos para el RT-PCR (Kit para PCR, Oligo dT, dNTPs, Kit para cDNA) fueron de la marca Invitrogen; el bromuro de etidio de la marca Bio Rad.

6.1.2 Material biológico

- Ratas machos Wistar de 280-300 g adquiridas en el bioterio de la UNAM campus Juriquilla.
- Variedad de frijol Negro 8025 y frijol Flor de Junio Marcela cosecha 2009, proporcionada por INIFAP campus Celaya.

6.2 Métodos

6.2.1 Caracterización de los frijoles de las variedades a enlatar

6.2.1.1 Tamaño de grano

El tamaño del grano se evaluó mediante la determinación de su peso, para lo cual se tomaron al azar 100 granos y se pesaron. El peso del grano se reportó en g/100 granos de frijol relacionándose con el tamaño de acuerdo con los datos del

Cuadro 2.

Cuadro 2. Clasificación del tamaño del grano de frijol con base en el peso de 100 semillas.

Peso de 100 semillas (g)	Tamaño
Menos de 18	Muy pequeño
18-25	Pequeño
26-40	Mediano
Mayor de 40	Grande

(INIFAP, 1995)

6.2.1.2 Ganacia de tamaño al cocer

Esta se determinó con la medida de 100 granos tomados al azar a los cuales se les determinó su tamaño midiendo largo, ancho y grosor utilizando un vernier, posteriormente los frijoles fueron cocidos y se volvió a tomar sus medidas.

6.2.1.3 Tiempo de cocción

El tiempo de cocción se determinó utilizando un cocedor Mattson de acuerdo al método descrito por Guzmán y col., (1995), el cual consiste en seleccionar al azar 25 granos de frijol, cada grano se coloca en los orificios de la base del soporte de las agujas del cocedor, éstas agujas son colocadas posteriormente sobre los granos, previamente son calibradas a un peso de 90 ± 0.5 gramos cada una. En seguida el cocedor se introduce en un vaso de precipitados con 2000 mL de agua destilada en ebullición. Se registra el primer tiempo cuando se reanuda la ebullición. Los demás tiempos se registran cuando cada aguja cae al fondo al atravesar los granos de frijol, considerando así los granos atravesados como cocidos. El tiempo de cocción se reporta en minutos, y se determina de acuerdo al periodo necesario para que las 25 agujas, atraviesen los 25 granos de frijol.

6.2.1.4 Capacidad de absorción de agua

Se tomaron al azar 25 granos intactos de frijol y se pesaron para determinar el peso del material seco (PMS). Se sometieron a remojo por 18 horas y después se drenaron y se eliminó el excedente de agua con el papel absorbente. Los granos se pesaron nuevamente para obtener el peso del material remojado (PMR) y se determinó la capacidad de absorción de agua con la siguiente ecuación:

$$CAA = \frac{PMR - PMS}{PMS} \times 100$$

Donde:

CAA = Capacidad de absorción de agua (%), PMR = Peso del material remojado (g), PMS = Peso del material seco (g).

La capacidad de absorción de agua (CAA) se utilizó para determinar si la variedad presenta problemas de cocción, esto de acuerdo a la clasificación mostrada en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Clasificación del problema de cocción con base en la Capacidad de Absorción de Agua.

Capacidad de Absorción de Agua (%)	Problema de cocción
Mayor de 100	Sin problema
70-100	Problema moderado
40-69	Problema severo
0-39	Problema muy severo

(INIFAP, 1995)

6.2.3 Determinación de la dinámica de calentamiento del punto frío de la lata

La dinámica de calentamiento del punto frío de la lata se determinó experimentalmente colocando sensores de temperatura (termopares) en diferentes puntos geométricos de esta (1/4, 1/3 y entre 1/4 y 1/2), tomando como referencia la altura total de la lata como se muestra en la Figura 2, que posteriormente fue

sometida a procesamiento térmico monitoreando tiempo y temperatura con ayuda de un sistema de adquisición de datos donde se conectaron cada uno de los termopares como se muestra en la Figura 3. Los datos registrados permitieron conocer la distribución del calor dentro de la lata y determinar el punto frío de la lata, una vez identificado este punto que es el punto donde más tardó el calor en llegar entonces se seleccionó este perfil tiempo-temperatura para posteriormente realizar los cálculos del valor F utilizando el Método de Ball (1923) y así asegurar una condición de “esterilidad comercial” logrando el equilibrio entre calidad-sanidad.

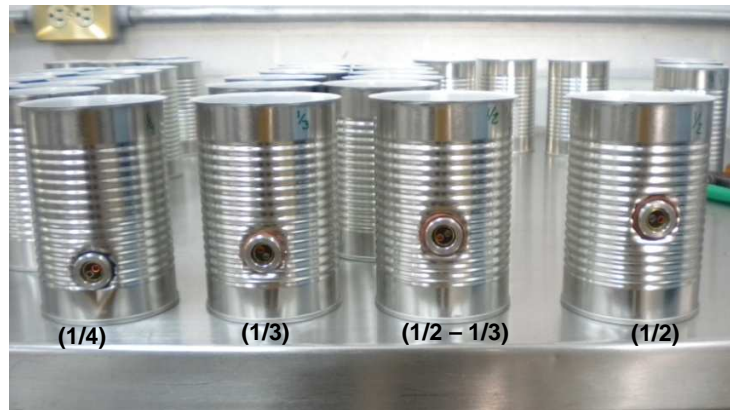


Figura 2. Posición de los termopares a lo largo de la geometría de la lata.



Figura 3. Acomodo de las latas con los termopares dentro de la autoclave conectados a un sistema de adquisición de datos.

6.2.4 Determinación del valor de esterilización

La determinación del valor de esterilización se calculó por el método de la fórmula de Ball (1923). El método de la fórmula de Ball hace uso de los parámetros obtenidos de los datos de la penetración del calor junto con varios procedimientos matemáticos para integrar los efectos letales. La fórmula de Ball es la siguiente:

$$B = f_h[\log j_{ch} I_h - \log g_c]$$

Donde B es el tiempo de proceso o valor de esterilización, f_h es el índice de velocidad de calentamiento, j_{ch} es el factor lag (estos dos parámetros se obtienen de los datos de penetración del calor), I_h es la diferencia inicial de temperatura ($T_r - T_i$), y g_c es la diferencia de temperatura al final de la cocción ($g_c = T_r - \text{Temperatura mínima crítica que se desea alcanzar en el punto central del producto en } ^\circ F$). T_r es la temperatura de la retorta, y T_i es la temperatura inicial del producto. (Ramaswamy y col., 2006).

6.2.5 Aplicación de métodos de cocción

6.2.5.1 Cocción tradicional casera

El frijol se pesó y se lavó. La cocción se realizó en olla de aluminio comúnmente utilizada por amas de casa con una relación 1:5 p/v utilizando agua potable a 96 °C aplicando el tiempo calculado en el punto 6.2.1. Una vez cocido el frijol se trituró y se secó en un horno a 60 °C por 24 horas; posteriormente se molieron en un molino pulvex para la obtención de las harinas las cuales se almacenan a -70 debidamente protegidas de la luz hasta su uso.

6.2.5.2 Cocción proceso de enlatado

El frijol se pesó y se lavó, enseguida se remojó por una hora en agua a temperatura ambiente, posteriormente se realizó el escaldado en agua a 90 °C por

5 minutos, después se llenaron las latas con 140 gramos de frijol Negro 8025 y 120 gramos de frijol Flor de Junio Marcela para obtener un peso final después del procesamiento de producto drenado de aproximadamente 250 gramos, se les incorporó el agua de escaldado dejando 1 cm de espacio de cabeza, luego las latas fueron introducidas al túnel de agotamiento donde se les suministró vapor de agua verificando que a la salida del túnel la temperatura del producto fuera mayor a 80 °C, inmediatamente se les colocó la tapa y utilizando una engargoladora industrial fueron cerradas herméticamente. Finalmente las latas fueron colocadas en la autoclave para realizarse el tratamiento térmico con los tiempos estimados por el Método de Ball y posteriormente enfriadas por inmersión con agua a 10 °C por aproximadamente 30 minutos. Las latas se colocaron en cuarentena a temperatura ambiente por 15 días.

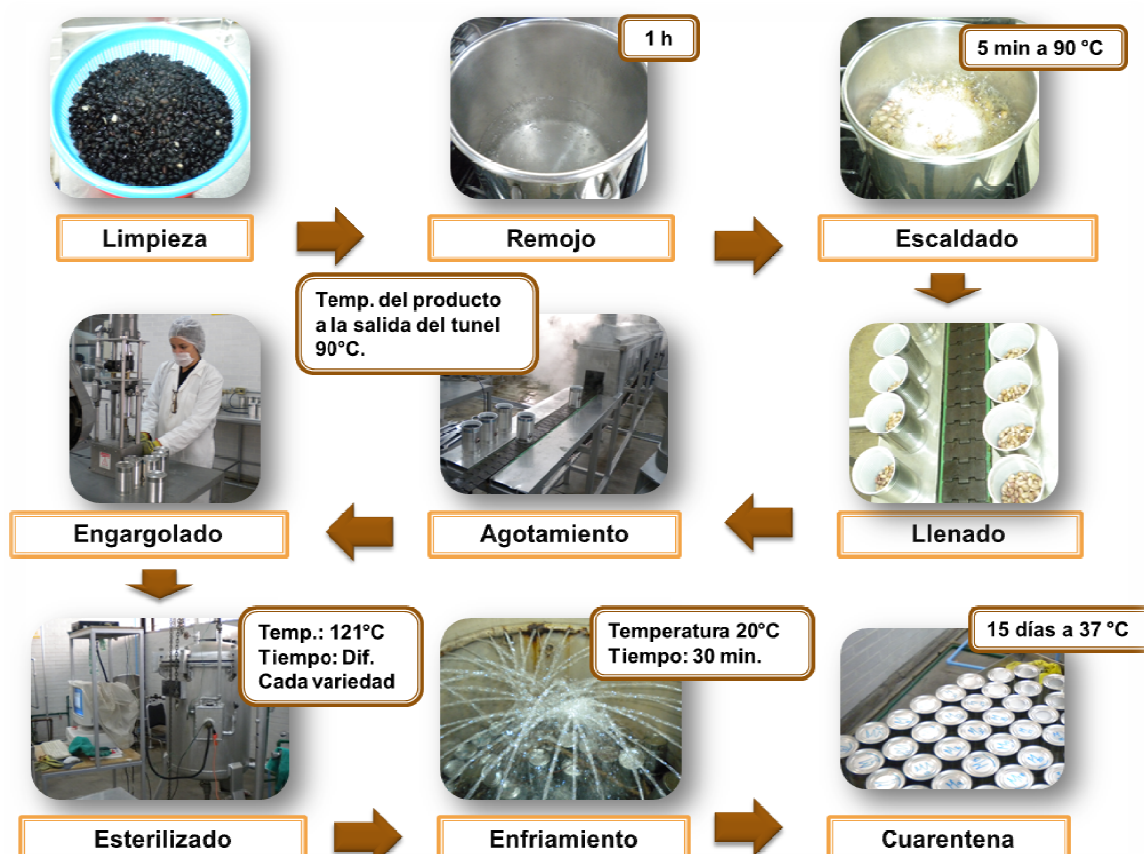


Figura 4. Diagrama de flujo del proceso seguido para el enlatado de las variedades en estudio.

6.2.6 Determinación de calidad de producto enlatado

6.2.6.1 Integridad

De acuerdo a la técnica descrita por Wu (2005), se seleccionaron tres latas de cada variedad para esta evaluación. Considerándose un frijol integro aquellos que no presentaran grietas, ruptura o piel suelta. Las latas fueron abiertas, se extrajeron las muestras de frijol que fueron lavadas con agua destilada para apreciar los defectos. El porcentaje de integridad se definió en función del número de frijoles dañados por cada 100 y se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de frijoles dañados por lata} = \frac{\text{Número de frijoles dañados por lata}}{\text{Número total de frijoles en la lata}} \times 100$$

6.2.6.2 Color

El color de los frijoles se midió usando un espectrofotómetro (Mini Scan Hunter Lab). Con el que se obtuvieron los valores CIE *Lab* (L^* , a^* , y b^*) los cuales indican luminosidad o brillantez y varían de 100 para el blanco a 0 para el negro. Los parámetros a y b miden la cromaticidad, donde: a (longitud de onda) tiende a rojo si el valor es (positivo), al gris si es (neutro) o al verde si es (negativo); mientras que b (intensidad de color) tiende al amarillo cuando es (positivo), al gris si es (neutro) o al azul cuando (negativo), Figura 5. El color de los frijoles fue expresado en función de los parámetros L^* , a^* y b^* y se calculó el valor ΔE (diferencia de color total) que indica la diferencia de color que se presenta respecto a un control, este se calculó para los frijoles enlatados de cada variedad utilizando como control su contraparte cocida en olla. Las barras de color se obtuvieron localizando en el espacio de color CIE los parámetros L^* , a^* y b^* utilizando el software de acceso libre en la red Digital Colour Atlas 3.0.

$$\Delta E_{ab}^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

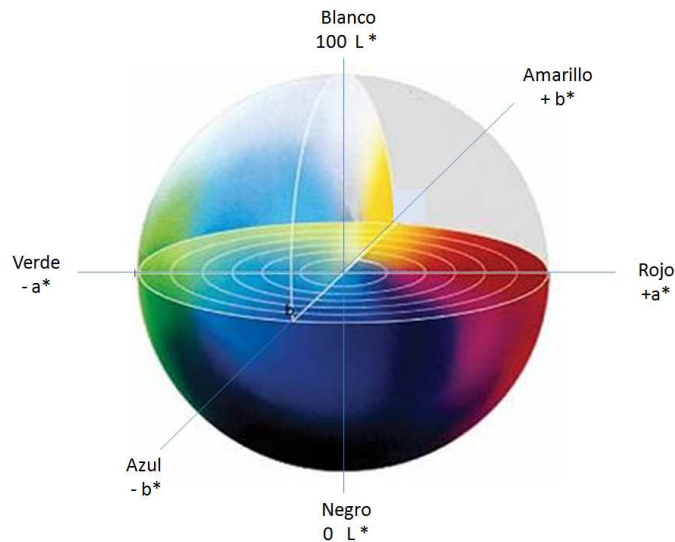


Figura 5. Espacio de color CIE L^* , a^* , b^* CIELAB *Commission Internationale d'Eclairage* (Comisión Internacional de Iluminación).

6.2.6.3 Textura

La textura se midió en un Texturómetro TA-XT2i equipado con una celda de carga de muestra cilíndrica con diámetro de 50 mm y una sonda de extrusión con un disco de compresión de 45 mm de diámetro. Se tomaron de 8 a 10 granos de frijol previamente drenados colocándolos al fondo del cilindro cuidando que la orientación de los granos fuera en forma horizontal, se distribuyeron los granos homogéneamente tratando de ocupar los 50 mm de diámetro de la celda de carga. Los parámetros que utilizaron para programar el equipo fueron: Modelo de ensayo de fuerza de compresión con opción de ensayo de vuelve al inicio, velocidad-preensayo de 2.0 mm/s, velocidad de ensayo de 1.0 mm/s, velocidad-post-ensayo de 10.0 mm/s, porcentaje de deformación 4%. La lectura de interés para la evaluación fue la fuerza máxima dada en gramos fuerza.



Figura 6. Texturómetro TA- XT2i utilizado para la medición de textura en muestras.

6.2.7 Evaluación de las propiedades químicas de las harinas

6.2.7.1 Extracción de compuestos fenólicos de la muestra

La extracción de los compuestos fenólicos se realizó utilizando metanol como solvente, para lo cual en un tubo cónico de 50 mL se pesaron las muestras de harina según la técnica a realizar (taninos condensados y flavonoides 0.8 gramos de muestra y fenoles totales 2 gramos), se adicionaron 10 mL de metanol y se protegieron los tubos de la luz con papel aluminio, se dejaron en agitación durante 24 horas. Posteriormente se realizó una centrifugación a 5000 rpm por 10 minutos, y finalmente se recuperó el sobrenadante.

Para la cuantificación de antocianinas se realizó la siguiente extracción: En un tubo cónico de 50 mL se pesaron 0.5 gramos de muestra, se adicionaron 4 mL de etanol acidificado (85 mL de etanol al 95% + 15 mL de HCl 1.0 N), se mezcló vigorosamente por 2 minutos de manera manual, se ajustó el pH a 1.0 con HCl, se agitó durante 30 minutos protegido de la luz, posteriormente se centrifugó a 10000 rpm por 20 minutos. Finalmente se recuperó el sobrenadante y se aforó a 10 mL en matraz volumétrico usando etanol acidificado.

6.2.7.2 Cuantificación de taninos condensados

La cuantificación de taninos condensados se realizó de acuerdo al método de la vainillina, descrito por Desphande y Cheryan (1987), adaptado para el uso de la microplaca. Protegiendo de la luz, se colocaron 50 μ L de sobrenadante (extracto), se le agregaron 200 μ L de la solución de vainillina al 0.5% recién preparada (vainillina 1% en metanol y HCl 8% en metanol en una relación 1:1). Se preparó un blanco adicionando 50 μ L de metanol más 200 μ L de HCl 4%. Las muestras se cubrieron con papel aluminio y posteriormente se leyeron en un lector de microplaca (Thermo Electron Corp., Multiskan Ascent, model 51118307) a una absorbancia de 500 nm. Se utilizó una curva estándar de (+) catequina (0-0.8 mg/ml) y los resultados obtenidos se expresaron como mg equivalentes de (+) catequina/g de harina.

6.2.7.3 Cuantificación de flavonoides

El ensayo espectrofotométrico para la determinación del contenido de flavonoides fue el reportado por Oomah y col. (2005), adaptado para el uso en microplaca y consistió en colocar en los pozos de la placa 50 μ L de extracto (muestra) y se adicionaron 180 μ L de metanol y 20 μ L de una solución al 1% de 2-aminoetildifenilborato. Las muestras se taparon con papel aluminio. La cuantificación de flavonoides se realizó leyendo la placa en un lector de microplaca (Thermo Electron Corp., Multiskan Ascent, model 51118307) a una absorbancia de 404 nm. Se utilizó una curva estándar de rutina (0-50 μ g/mL) y los resultados obtenidos se expresaron como mg equivalentes de rutina /g de harina.

6.2.7.4 Cuantificación de antocianinas

La determinación de antocianinas totales se realizó siguiendo el método de Abdel-Aal y Hucl (1999) y algunas modificaciones de Rivera (1998). Posterior a la extracción y el aforo con 10 mL de etanol acidificado se cargaron los pozos de la microplaca con 250 μ L de muestra. La cuantificación de antocianinas se realizó leyendo la placa en un lector de microplaca (Spectra Max 190, Molecular Devices S.A. de C.V.) a una absorbancia de 535 nm. El valor de la absorbancia obtenido se sustituye en la siguiente fórmula:

$$C=(A/\epsilon) \times (V/1000) \times (PM \times (1/ g \text{ muestra}) \times 10^6$$

Donde:

C= concentración de antocianinas totales (mg/kg)

A= lectura de absorbancia a 535 nm,

ϵ = coeficiente de absortividad molar cianidina 3-glucósido (25 965 $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$),

V = volumen total del extracto de antocianinas,

PM = Peso molecular de la cianidina 3- glucósido (449 g/g mol).

Los resultados se expresaron como mg equivalentes de cianidina 3- glucósido/kg de muestra.

6.2.7.5 Cuantificación de fenoles totales

La determinación del contenido de fenoles totales se realizará con el método de Folín- Ciocalteu (Singleton y col., 1999). Este método se basa en la oxidación de los compuestos fenólicos por el reactivo de Folín-Ciocalteu, el cual está formado por una mezcla de ácido fosfotungstico y ácido fosfomolibdico que se reduce por acción de los fenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno y molibdeno. La coloración azul producida absorbe a una longitud de onda de 760 nm.

Para la cuantificación de fenoles totales, se tomó una alícuota de 20 μ L de muestra (extracto) y se le adicionó 230 μ L de agua destilada dando un volumen total de 250 μ L, posteriormente se agregaron 125 μ L de reactivo de Folin

Ciocalteu 1N, y se dejó reposar por 6 minutos y en seguida se adicionó 625 μL de Na_2CO_3 al 20% y se agitó. Finalmente se dejó reposar la reacción durante 2 horas en la obscuridad y se midió la absorbancia a 760 nm en un lector de microplaca Spectra Max 190, Molecular Devices S.A. de C.V. Se utilizó una curva estándar de ácido gálico (0-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y los resultados obtenidos se expresaron como μg equivalentes de ácido gálico /g de harina.

6.2.7.6 Determinación de capacidad antioxidante por ABTS

La capacidad antioxidante fue determinada por el método de ABTS 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-6 ácido sulfónico) mediante la técnica descrita por Nenadis y col. (2004) y Prior y col. (2005), adaptado para su uso en microplaca. De manera breve se preparó una solución de ABTS 7 mM en agua destilada y una solución de persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) 140 mM, se mezclaron 5 mL de la solución de ABTS y 88 μL de la solución de persulfato de potasio y se dejó reposar durante 12 horas para la generación del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, posteriormente la absorbancia del radical formado fue ajustado con etanol al 96% (0.5 mL de solución de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ más 20 mL de etanol) a una absorbancia entre 0.7 y 1 medida en un lector de microplaca Spectra Max 190, Molecular Devices S.A. de C.V. Leyendo a una longitud de onda de 734 nm en los tiempos 0 y 6 minutos. Se colocó en una placa de 96 pozos 20 μL de muestra (extracto) y 230 μL de solución de radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Para el blanco se colocaron 20 μL de metanol y 230 μL de etanol y para el control 20 μL de metanol y 230 μL de solución de radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Se utilizó una curva estándar de Trolox (50- 800 μM) para expresar los resultados en μM equivalentes de Trolox por gramo de muestra y con estos resultados se calculó el porcentaje de inhibición de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = [(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{muestra}})/\text{Abs}_{\text{control}}] * 100$$

En donde:

Porcentaje de Inhibición (%) es el porcentaje de inhibición del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ por la muestra determinado por la disminución de su coloración (mayor absorbancia), ($\text{Abs}_{\text{control}}$) Absorbancia del control a 734 nm, ($\text{Abs}_{\text{muestra}}$) Absorbancia de la muestra a 734 nm.

6.2.7.7 Determinación de capacidad antioxidante por DPPH

La capacidad antioxidante determinada por el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) se realizó de acuerdo a la técnica propuesta por Fukomoto y Mazza (2000). Brevemente, se preparó el radical DPPH^{•+} (150 µM) pesando en un matraz de 25 mL 1.5 miligramos de DPPH y se disolvió con 20.5 mL de metanol aforándose a 25 mL con agua destilada. En una microplaca de 96 pozos se adicionan 20 µL de muestra (extracto) y 230 µL de solución DPPH. Para el blanco se colocaron 20 µL de metanol y 230 µL de etanol y para el control se 20 µL de metanol y 230 µL de solución de radical DPPH^{•+}. La placa se leyó a una longitud de onda de 520 nm a los 0, 4, 10, 30 y 90 minutos. Se utilizó una curva estándar de Trolox (50- 800 µM) para expresar los resultados en µM equivalentes de Trolox por gramo de muestra y con estos resultados se calculó el porcentaje de inhibición de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = [(Abs_{\text{control}} - Abs_{\text{muestra}})/Abs_{\text{control}}]*100$$

En donde:

Porcentaje de Inhibición (%) es el porcentaje de inhibición del radical DPPH^{•+} por la muestra determinado por la disminución de su coloración (mayor absorbancia), (Abs_{control}) Absorbancia del control a 520 nm, (Abs_{muestra}) Absorbancia de la muestra a 520 nm.

6.2.8 Evaluación *in vivo*

6.2.8.1 Aclimatación de los animales de experimentación

Las ratas se sometieron a un periodo de adaptación aproximadamente de una semana en el bioterio, bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 h cada uno y con acceso libre a comida y agua.

6.2.8.2 Grupos experimentales

Se utilizaron un total de 36 ratas con peso no mayor de 250 a 300 gramos para los experimentos, distribuidos en seis grupos de seis ratas cada uno. Para el grupo

uno (control sano) y el grupo dos (control diabético), los cuales fueron mantenidos con un consumo de alimento y agua normales después de la inducción. Los grupos tres, cuatro, cinco y seis, se sometieron a una alimentación con incorporación a la dieta normal de harinas de frijol (9%) procedentes de las dos variedades de frijol empleadas y de los dos métodos de cocción enlatado y cocimiento tradicional, la distribución de los grupos y los tratamientos se presenta en el cuadro 5. Los animales fueron tratados durante tres semanas.

Cuadro 4. Grupos experimentales.

Grupo	Tratamiento
CD	Control positivo (diabético).
NO	Tratamiento con harina de frijol cocido por método tradicional variedad Negro 8025.
NL	Tratamiento con harina de frijol cocido por proceso de enlatado variedad Negro 8025.
FO	Tratamiento con harina de frijol cocido por método tradicional variedad Flor de Junio Marcela.
FL	Tratamiento con harina de frijol cocido por proceso de enlatado variedad Flor de Junio Marcela.

6.2.8.3 Inducción de diabetes

Una vez aclimatados los animales se realizó la inducción de diabetes a los grupos dos, tres, cuatro, cinco y seis con estreptozotocina (STZ) y el grupo uno fue inyectado únicamente con 0.5 mL de una solución salina. Para los grupos inducidos con (STZ) la inyección se aplicó por vía intraperitoneal con dosis única de 50 mg/kg de peso corporal disuelta en una solución amortiguadora de citrato de 0.1 M, pH 4.5, la inducción se realizó en un estado de ayuno de 12 horas. Después de cinco días se midió glucosa sanguínea en un estado de ayuno de 12 horas y se seleccionó aquellos animales que presentaron niveles mayores a 180 mg/dL.

Los niveles de glucosa fueron medidos en sangre extraída de la vena caudal de las ratas (localizada en el extremo de la cola del animal) semanalmente. La medición se realizó con tiras reactivas de la marca Accutrend utilizando un glucómetro de la marca ROCHE. En esta técnica el glucómetro mide la corriente generada al convertir la glucosa de la muestra de sangre (colocada sobre la tira) en glucoactona por la enzima glucosa deshidrogenasa. Posterior a la inducción y selección de los animales enfermos se midieron los niveles de glucosa y peso cada semana dejando los animales en ayuno por 12 horas y se determinó también el consumo de alimento y de agua diariamente durante las 3 semanas de tratamiento.

6.2.8.4 Sacrificio

Las ratas se sacrificaron utilizando éter para anesteciarlas y se les extrajo sangre por punción cardiaca. Se recolectó la orina de cada uno de los animales 12 horas antes del sacrificio determinando su volumen.

6.2.8.5 Determinación de perfil lipídico en sangre

En las muestras obtenidas de sangre se obtuvo el suero y se midió perfil lipídico: triglicéridos, colesterol total, HDL mediante kits enzimáticos de la marca Randox Laboratories.

6.2.8.6 Determinación de proteína en orina

Se realizó por el método descrito por Lowry (1951).

6.2.8.7 Determinación de creatinina

De igual manera en las muestras de suero y orina se determinó creatinina mediante kits enzimáticos de la marca Randox Laboratories y con estos datos se calculó la depuración de creatinina.

Los cálculos se realizan mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Creatinina suero (mg/dL)} = \frac{(A2 - A1 \text{ de la Muestra}) \times \text{Concentración Patrón (mg/dL)}}{(A2 - A1 \text{ del Patrón})}$$

$$\text{Creatinina orina (mg/24 horas)} = \frac{* \text{mg/dL} \times \text{volumen urinario (em mL)}}{100}$$

$$\text{Depuración (mL/minuto)} = \frac{U}{S} \times VM$$

Donde:

U = creatinina en la orina (mg/dL) - S = creatinina en el suero (mg/dL)

VM = volumen minuto (Vol. Urinario de 24 h (mL), dividido por 1440 minutos), estos minutos equivalen a 24 horas.

6.2.8.8 Cortes histológicos de riñones y tinción de PAS

Los riñones se colocaron en formaldehído al 4% con buffer de fosfatos, posteriormente se cortaron transversalmente se realizó una serie lavados con alcohol a diferentes concentraciones (0.5% a 100%) para deshidratar el tejido, posteriormente se pasó a xilol para hacer el aclaramiento y finalmente se le agregó la parafina ,colocando la muestra en una estufa de 30 minutos a 6 horas manteniendo la temperatura a 60° C. Finalmente se dejó solidificar a temperatura ambiente, formándose un bloque sólido de parafina con el trozo de tejido incluido. A partir de éste bloque se realizaron los cortes con el criostato con un espesor de 6 µM los cuales fueron fijados en un portaobjetos para posteriormente realizar las tinciones.

De manera general la tinción de PAS se realizó de la siguiente forma: los cortes y se rehidrataron con agua destilada, se sumergieron en solución de ácido peryódico por 5 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con agua destilada varias veces, después se tiñeron con solución de hematoxilina durante 90 segundos, se lavaron los portaobjetos y finalmente se deshidrataron, aclararon y montaron los cortes en un medio con base de xileno.

6.2.8.9 Extracción de RNA

Se utilizó el reactivo de Trizol de la marca Sigma Aldrich haciendo algunas modificaciones. De manera breve se colocó 1 mL de trizol en tubos eppendorf y se mantuvo en hielo, se realizó la trituración del tejido (100 mg por cada mL de trizol) previamente almacenado a -70 °C, con nitrógeno líquido en un mortero enfriado y tratado con agua DEPC, una vez triturado se incorporó rápidamente el tejido al trizol, se agitó vigorosamente y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos a 4 °C, se separó el sobrenadante y se pasó a un nuevo tubo donde se adicionaron 200 µL de cloroformo, se incubó 3 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a no más de 12 000 rpm por 15 minutos a una temperatura de 4 °C, se separó la fase acuosa y se agregaron 500 µL de alcohol isopropílico, se agitó y se repitió el procedimiento de incubación y centrifugación, se obtuvo un precipitado. Se realizó un lavado con etanol al 75%, se mezcló y se centrifugó a 7500 rpm por 5 minutos a 4°C, se vuelve a formar un pellet, se descartó el sobrenadante y se dejó secar 10 min a temperatura ambiente, finalmente se resuspende en 30 µL de agua DEPC, se cuantificó y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %.

6.2.8.10 Amplificación por RT-PCR

Para elaborar el cDNA a partir del RNA de manera breve en un eppendorf se agregaron 1 µL de oligo dT, 10 µg de RNA, 1 µL de dNTP's y agua DEPC c.b.p 11 µL de reacción, posteriormente se calentó a 65 °C por 5 minutos, inmediatamente después se llevó la reacción a agua con hielo y se le agregaron 4 µL de buffer de la enzima, 2 µL de dTT, en seguida se dejó incubar a 42°C por 2 minutos y se agregó 1 µL de enzima Super Script II, se incubó nuevamente a 42°C por 1 hora y finalmente se calentó a 70°C por 15 minutos para inactivar la enzima. Una vez obtenido el cDNA este se llevó a una reacción de PCR común utilizando el kit para PCR invitrogen, se realizaron los cálculos para introducir 600 ng aproximadamente de cDNA, se agregaron 3 µL de buffer, 0.6 µL de dNTP's, 1.5 µL del iniciador

sentido y 1.5 μ L del iniciador antisentido, 1.5 μ L de Mg, 0.2 μ L de enzima Taq, agua HPLC c.b.p. 30 μ L de reacción. Las condiciones del termociclador fueron:

Paso 1: Iniciación.

1 ciclo: a 94°C por 3 minutos.

Paso 2: Amplificación.

35 ciclos: 94°C por 15 segundos (Desnaturalización)

* °C por 30 segundos (Alineamiento)

72°C por 1 minuto (Extensión)

Paso 3: Elongación final.

1 ciclo: 72°C por 7 minutos.

* Temperatura de alineamiento fue diferente para cada iniciador, para: VCAM 58°C, para TNF- α 55°C, para GAPDH 56°C.

Las muestras fueron corridas en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Las fotografías de los geles fueron digitalizadas en escala de grises para su posterior análisis. La evaluación del nivel de expresión de VCAM, TNF- α y GAPDH fue cuantificada por densitometría y cada cantidad fue proporcional al logaritmo de la densidad óptica. La suma de los logaritmos de los valores de los pixeles fueron usados para estimar la cantidad de ácido nucleico en una banda, el cual es expresado en unidades arbitrarias. La cantidad de cDNA amplificado fue normalizada con gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Cada alícuota de RNA fue amplificada por triplicado (Sassy, 2000).

6.3 Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media \pm EE. Se determinó el análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de confianza de 95%. Se realizó el análisis de comparación de medias aplicando la prueba de Tukey, así como también la prueba de Dunnet. Todos estos análisis se realizaron en el programa estadístico JMP 5.0.1.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 Caracterización de frijoles a enlatar

Los atributos del grano que el consumidor prefiere son los que determinan la calidad comercial del mismo. Tanto el ama de casa como el industrial demandan granos de colores y tamaños preferentes de acuerdo a los hábitos alimenticios de la zona pero sobre todo demandan aquellos que sean de rápida cocción (Muñoz y col., 2009). Específicamente los industriales prefieren frijoles de tamaño mediano y grande.

En este estudio los resultados obtenidos en la evaluación de tamaño de grano en crudo se muestran en la Cuadro 5 en el que se observa que el frijol Flor de Junio Marcela presentó un tamaño de grano mediano cumpliendo con lo establecido por el manual del INIFAP (1995), por el contrario, el frijol Negro 8025 presentó un tamaño de grano pequeño colocándolo en cierta desventaja, este resultado coincide con lo reportado en diferentes artículos donde se relaciona la coloración negra del frijol con un tamaño de grano pequeño (Jacinto y col., 1993; Ortega y col., 1996).

Cuadro 5. Características de calidad del frijol para el proceso de enlatado.

Característica	Negro 8025	Flor de Junio Marcela
Tamaño de grano	Pequeño	Mediano
Ganancia de tamaño al cocer (%)	150 ± 6.6 a	205 ± 4.3 b
Capacidad de Absorción de Agua (CAA) (%)	103 ± 0.4 a	102 ± 0.9 a
Tiempo de cocción (cocedor Mattson) (min)	142 ± 0.8 a	139 ± 0.4 a

Los valores se presentan como la media ± E.E. Letras diferentes a y b indican diferencia estadística significativa entre cada variedad, analizados con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

La ganancia de tamaño al cocer está relacionada con una mayor CAA “durante la cocción” y con un mayor rendimiento, es decir, se necesita menor cantidad de frijol crudo para obtener cierta cantidad en peso y volumen de producto final cocido.

En los resultados de la evaluación de esta característica se observó que el frijol Negro 8025 mostró menor ganancia de tamaño al cocer el cual aumentó aproximadamente 1.5 veces su tamaño original en crudo, por el contrario el frijol Flor de Junio Marcela tuvo un aumento del doble de su tamaño en crudo, dándole un mayor valor agregado en cualidades preferidas por el consumidor.

Como ya se había mencionado con anterioridad una alta CAA es una cualidad sobresaliente ya que se ha relacionado con un mayor rendimiento además de menores tiempos de cocción que llevan a menor consumo de energía y por lo tanto menores costos de producción. La CAA tiene una fuerte influencia sobre la calidad de cocción y la palatabilidad del frijol como ha sido demostrado en otros trabajos (Deshpande y col., 1986).

Los resultados mostraron que el frijol Negro 8025 obtuvo un porcentaje de CAA semejante al Flor de Junio Marcela (103–102 %), de acuerdo a los estándares establecidos por el manual del INIFAP (Guzmán y col., 1995). Cuando el grano absorbe agua en más de 80% de su peso, puede ser un indicador de que tenderá a suavizarse rápidamente durante la cocción. Por lo tanto ambas variedades están en el rango de lo recomendado para CAA.

Es importante resaltar que si bien ambas variedades presentaron similar CAA a las 18 horas de remojo en agua, no lo hicieron así cuando se aplicó calor durante su cocción en donde modificaron su tamaño y su peso regulado por una mayor o menor captación de agua por el grano, lo cual nos indica que la calidad de CAA no es la misma al modificar las condiciones de temperatura.

Uno de los parámetros de calidad más importantes en el frijol para consumo directo es el tiempo de cocción. Factores como tamaño de grano, brillo y porcentaje de testa en el grano de frijol son determinantes en el tiempo de cocción (Tapia y col., 1985; Jacinto y col., 1993).

Se conocen dos factores que pueden causar una cocción lenta o deficiente; la "testa dura", que describe un estado físico en el cual las semillas son incapaces de absorber suficiente agua, debido a la impermeabilidad parcial de la testa; y la

"dureza a la cocción" que se refiere a la textura del cotiledón, la cual induce mayor tiempo de cocción (Liu, 1995; Reyes y col., 1993).

Los resultados para la evaluación del tiempo de cocción fueron similares para ambas variedades Negro 8025 y Flor de Junio Marcela (142 y 139 min). Los resultados para el frijol negro coinciden con lo reportado por Pérez y col. (2002) quienes determinaron que las variedades provenientes de la región del altiplano semihúmedo de México presentan tiempos de cocción mayores a 130 minutos, en cuanto a la variedad Flor de Junio Marcela de acuerdo a lo reportado por el INIFAP-Zacatecas, su tiempo de cocción se encuentra entre 65 y 80 minutos determinado en vaso de vidrio y mechero de gas, esta variación de resultados podría deberse al método empleado para evaluar la cocción. El tiempo de cocción también está en función del tiempo de almacenamiento, condiciones de cosecha, etc. Por otra parte se observó que ambas variedades poseen similares CAA y en diferentes trabajos se han reportado correlaciones entre la CAA y el tiempo de cocción, por lo que al poseer ambas CAA similar sus tiempos de cocción fueron también similares (Witcombe y col., 1984).

7.2 Dinámicas de calentamiento y enfriamiento del punto frío de la lata

El diseño del proceso térmico en este estudio se realizó por separado para cada variedad (Negro 8025 y Flor de Junio Marcela) esto debido a que aun tratándose ambas variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) presentan características físicas y químicas diferentes que se reflejan en una diferencia en la forma de propagación de calor en los granos. A pesar de que se encontró que la CAA y los tiempos de cocción determinados con el cocedor Mattson fueron similares y estadísticamente no mostraron diferencia significativa, tres minutos de diferencia en un proceso tecnológico de enlatado marcan un gran cambio en las propiedades fisicoquímicas, nutrimentales y nutracéuticas del alimento, además del gasto energético y económico que esto genera a nivel industrial.

Por otro lado, el porcentaje de ganancia de tamaño al cocer indica que al aplicar calor la captación del agua por el grano se incrementó sobre todo en la variedad Flor de Junio Marcela, lo cual provoca que la transferencia de calor dentro del grano sea más efectiva y por lo tanto se llegue más rápido a la temperatura deseada en la matriz del producto enlatado. Esto puede observarse en las Figuras 7 y 8 que muestran las dinámicas de calentamiento de cada termopar, donde se observa claramente que el mayor tiempo para alcanzar los 121 °C para el termopar 1/3 (punto frío de la alta), se obtuvo aproximadamente a los 17 minutos para el Negro 8025 y 11 minutos para el Flor de Junio Marcela.

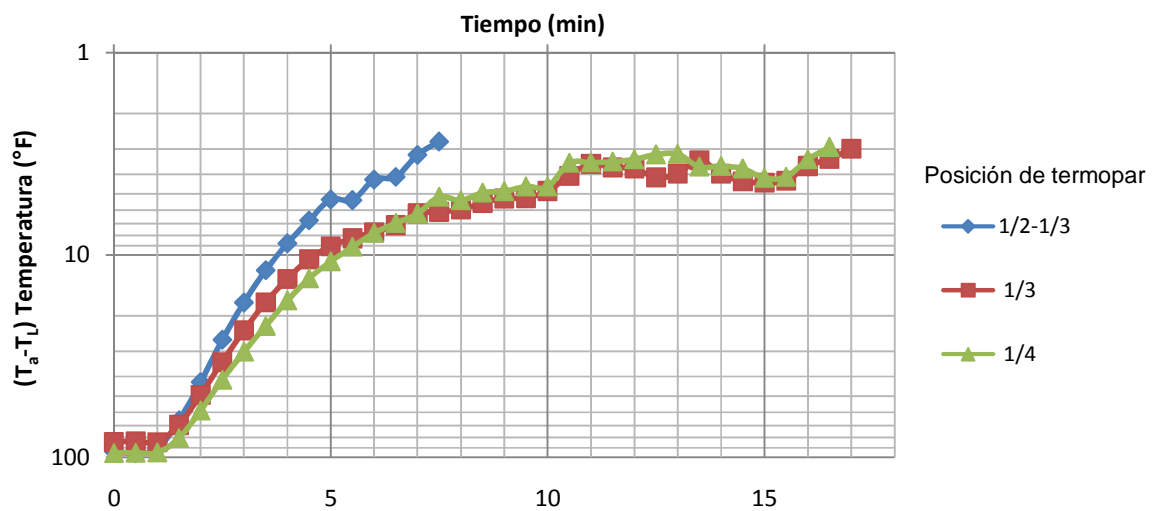


Figura 7. Dinámica de calentamiento de los termopares posicionados en diferentes puntos de la lata con frijol Negro 8025 durante su tratamiento térmico a 121 °C y 15 lb de presión. Donde T_a es la temperatura de la autoclave y T_L es la temperatura medida por el termopar a cada tiempo.

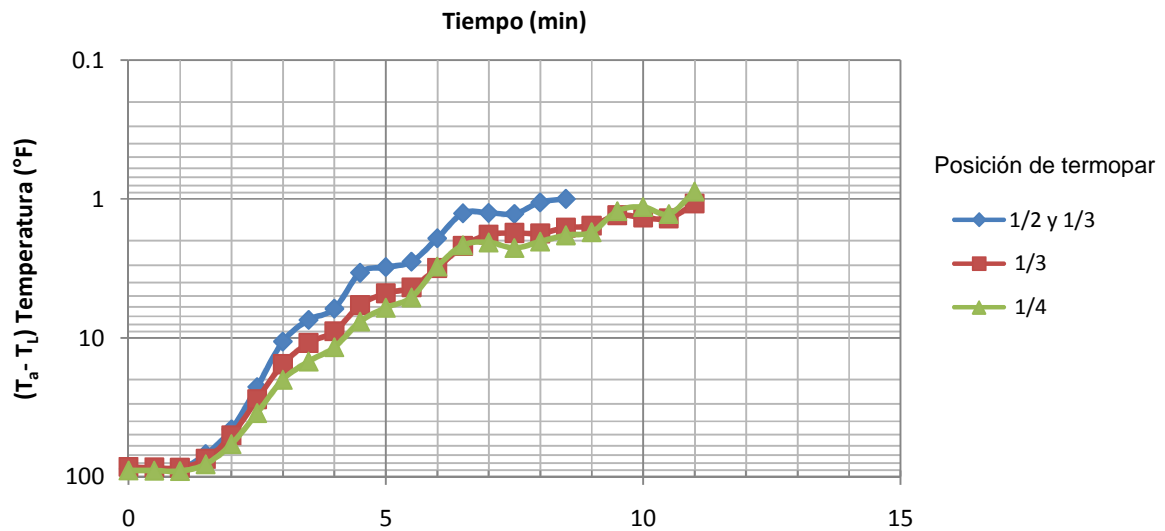


Figura 8. Dinámica de calentamiento de los termopares posicionados en diferentes puntos de la lata con frijol Flor de Junio Marcela durante su tratamiento térmico a 121 °C y 15 lb de presión. Donde T_a es la temperatura de la autoclave y T_L es la temperatura medida por el termopar a cada tiempo.

De igual forma, en las dinámicas de enfriamiento presentadas en las Figuras 9 y 10 (Negro 8025 y Flor de Junio Marcela) respectivamente, se observa que con Negro 8025 se necesitaron aproximadamente 40 minutos para llegar a la temperatura de 30 °C, que se consideró para detener el enfriamiento (temperatura agua de enfriamiento 20 °C) y 38 minutos con Flor de Junio Marcela.

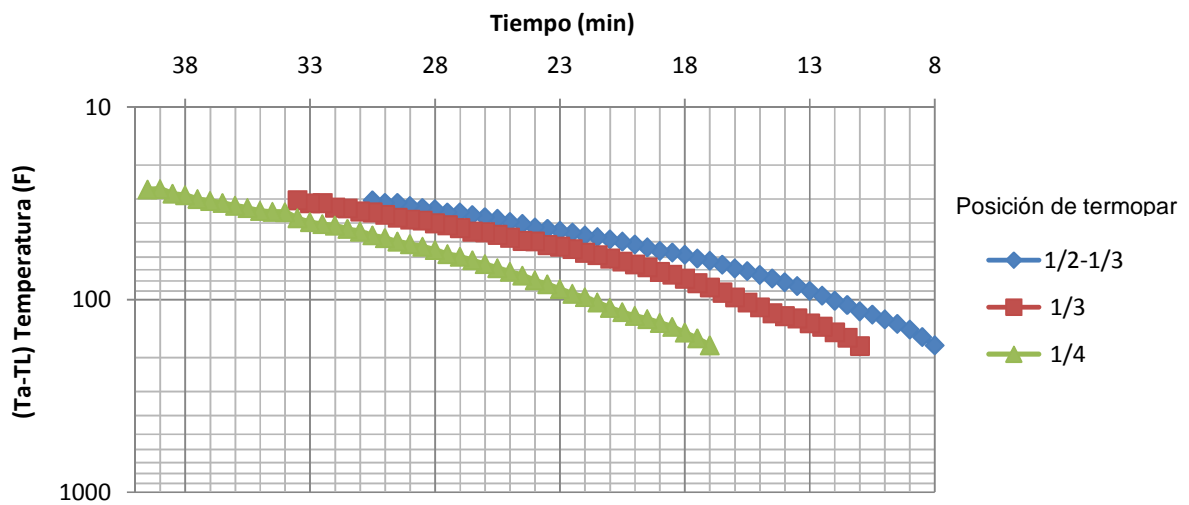


Figura 9. Dinámica de enfriamiento de los termopares posicionados en diferentes puntos de la lata con frijol Negro 8025 durante su tratamiento térmico a 121 °C y 15 lb de presión. Donde T_E es la temperatura de la autoclave en el enfriamiento y T_L es la temperatura medida por el termopar a cada tiempo.

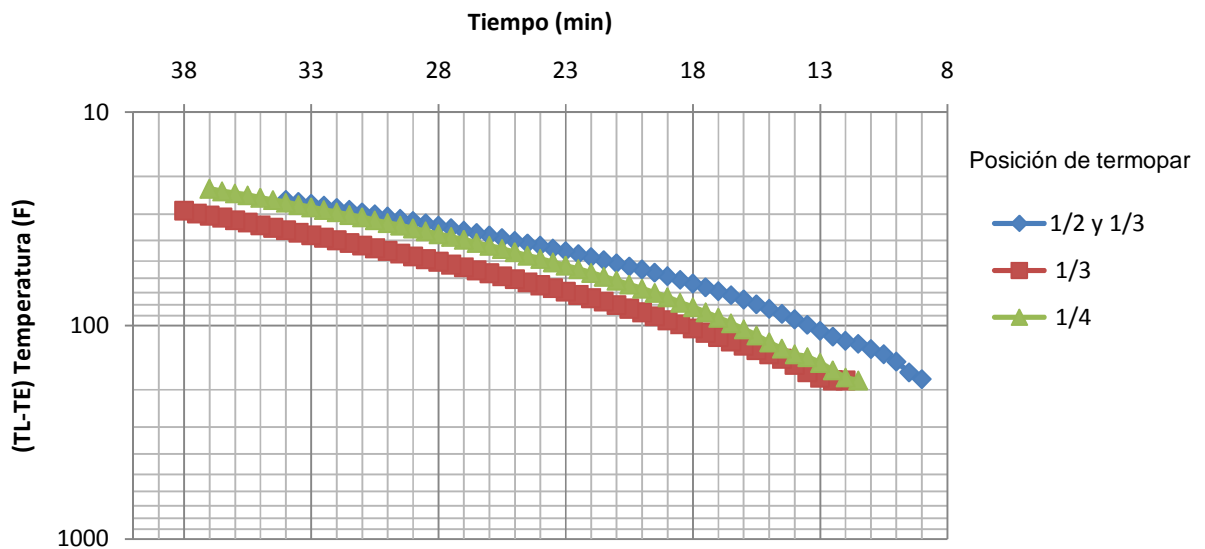


Figura 10. Dinámica de enfriamiento de los termopares posicionados en diferentes puntos de la lata con frijol Flor de Junio Marcela durante su tratamiento térmico a 21 °C y 15 lb de presión. Donde T_E es la temperatura de la autoclave en el enfriamiento y T_L es la temperatura medida por el termopar a cada tiempo.

De acuerdo al análisis gráfico y matemático de las dinámicas de calentamiento y enfriamiento, el punto frío de la lata se localizó en el lugar del termopar posicionado en 1/3 de la lata de ambas variedades. Con los datos del perfil tiempo-temperatura de este termopar y utilizando la ecuación de Ball se realizó el cálculo del tiempo de procesamiento obteniendo los resultados mostrados en la Cuadro 6 que fueron de 11 minutos para el frijol Negro 8025 y 8 minutos para el frijol Flor de Junio Marcela.

Cuadro 6. Tiempo de tratamiento térmico para la esterilización y cocción del frijol.

Variedad	Tiempo de procesamiento
Negro 8025	11 min
Flor de Junio Marcela	8 min

Con éstos resultados se realizó el tratamiento térmico en la etapa de esterilizado a condiciones de 121 °C y 15 libras de presión para cada una de las variedades.

7.3 Calidad de producto enlatado

7.3. 1. Integridad

Durante el procesamiento industrial se afecta la textura de los granos, ya que a medida que se lleva a cabo la cocción los granos se hidratan y se expanden, lo cual afecta adversamente su integridad que va a depender de la capacidad de la testa del grano para adaptarse al nuevo volumen generado por la cocción (Heil y col., 1992).

En este estudio la integridad se evaluó determinando el porcentaje de frijoles dañados por lata y se compararon con una contraparte comercial. Los resultados se presentan en el Cuadro 7, en donde se muestra que los frijoles Negro 8025 enlatados (NL) presentaron el menor porcentaje de frijoles dañados incluso por debajo de lo obtenido para su contraparte comercial (52 vs. 68%), indicando con

esto que los frijoles comerciales presentan un mayor porcentaje de frijoles dañados.

Cuadro 7. Integridad de frijoles enlatados comparados con enlatados de marca comercial.

Variedad	Porcentaje de frijoles dañados
Negro 8025	52.0 ± 3.7 c
Negro comercial	68.5 ± 1.5 b
Flor de Junio Marcela	84.3 ± 1.0 a
Bayo comercial	82.0 ± 1.3 ab

Los valores se presentan como la media del porcentaje de frijoles dañados ± E.E. Letras diferentes a, b y c indican diferencia estadística significativa entre cada tratamiento, evaluado por la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Esta diferencia pudiera estar relacionada con la variedad o variedades negras utilizadas en la marca comercial ya que aun tratándose de un frijol negro en ambos casos se sabe que la calidad del grano de frijol es determinada por distintos factores como la variedad, manejo agronómico, condiciones de cultivo y almacenamiento (Balasubramanian y col., 2000). También es posible que el tratamiento térmico excesivo haya sido el responsable del daño en los frijoles comerciales o por el contrario una mayor integridad en los Negro 8025 se debió a un deficiente tratamiento térmico.

Por otra parte los resultados para los frijoles Flor de Junio Marcela mostraron una integridad similar a su contraparte comercial (84.3 vs. 82%). Sin embargo, a simple vista se observó una mayor exudación de almidón del grano hacia el medio líquido en el Flor de Junio Marcela lo que afectó en parte su apariencia final en comparación con su contraparte comercial, lo cual indica que debe mejorarse el proceso. En la Figura 11 puede apreciarse el aspecto final de los frijoles en estudio comparados con los frijoles enlatados comerciales.



Figura 11. Comparación de la integridad de frijoles enlatados, a) Negro 8025, b) Flor de Junio Marcela, c) Negro de marca comercial y d) Bayo de marca comercial.

El grado de integridad de los frijoles después del enlatado juega un papel importante en el aspecto y consistencia del producto final ya que si la ruptura de estos es alta hay una mayor exudación del almidón hacia el medio acuoso causando el aglutinamiento de los frijoles, además contribuyen los contenidos de pectina soluble y de calcio, sodio y hierro en la testa, esto en conjunto genera una mala apariencia y como consecuencia un rechazo por el consumidor (Hosfield y col., 1980; Lu y col., 1996; Wu, 2002).

El cloruro de calcio (CaCl_2) es usado en la industria del enlatado para incrementar firmeza e integridad de los vegetales y granos de frijol ya que forma un complejo metal-pectina que puede ayudar a incrementar la dureza de la testa y la turgencia de las capas celulares del cotiledón (Lange y col., 2000), obteniendo un producto suave pero con una buena integridad. Sin embargo, debido a que el objetivo del presente estudio es sólo evaluar las propiedades antidiabéticas del frijol como tal, no se adicionaron aditivos en la elaboración del enlatado.





7.3.2. Color

Se ha demostrado que una de las propiedades que los consumidores más valoran en un producto es el color y muchas veces este conduce al rechazo o la aceptación del mismo (Hosfield, 1991).

El color de la cubierta de las semillas es atribuido a la presencia y a la concentración de los polifenoles y su función es proteger a la semilla contra patógenos y predadores (Choung y col., 2003; Islam y col., 2003; Salinas y col., 2005; Romani y col., 2004). Durante el procesamiento térmico hay disminución y cambios en la estructura de éstos compuestos lo que ocasiona el cambio de coloración (Xu y col., 2009). En los alimentos enlatados se requiere que el cambio en esta propiedad sea reducido.

Los resultados de la medición de los parámetros L^* , a^* y b^* se muestran en el Cuadro 8 con los cuales se calculó ΔE y se observó que el mayor cambio de coloración respecto a la que presentan los cocidos en olla se obtuvo para la variedad Flor de Junio Marcela con un valor de aproximadamente 9.91 unidades de color y para la variedad Negro 8025 fue de tan solo 4.9 unidades de color, lo que también pudo apreciarse visualmente.

Cuadro 8. Parámetros de color de los frijoles enlatados comparados con los cocidos por métodos tradicionales.

	L^*	a^*	b^*	ΔE	Color
NO	16.8 ± 0.2 a	6.1 ± 0.2 a	2.8 ± 0.1 a		
NL	20.8 ± 0.5 b	2.9 ± 0.2 b	2.0 ± 0.2 a	4.90 ± 0.3	
FO	37.8 ± 0.3 c	12.7 ± 0.1 c	11.2 ± 0.2 b		
FL	46.4 ± 0.4 d	8.0 ± 0.2 d	10.6 ± 0.3 b	9.91 ± 0.5	

Valores expresados como la media ± E.E. Letras diferentes a y b indican diferencia estadística significativa entre cada tratamiento, evaluado por la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Negro 8025 de Olla (NO), Negro 8025 de Lata (NL), Flor de Junio Marcela de Olla (FO) y Flor de Junio Marcela de Lata (FL). ΔE Valor calculado con respecto al frijol de olla.

Los valores de brillantes (L^*) se han correlacionado con propiedades como hidratación y contenido de antocianinas. Lu y col. (1996a) encontraron que a mayor luminosidad menor hidratación, lo cual fue contrario a lo que se obtuvo en este trabajo, el frijol Flor de Junio Marcela tuvo una mayor luminosidad que el Negro 8025 (37.8–46.4 vs. 16.8–20.8) y presentó mayor hidratación durante la cocción.

7.3.3. Textura

La textura es otra de las características que se ha asociado también con el grado de aceptabilidad de producto por el consumidor y ésta es medida generalmente como una fuerza de corte o de compresión e indica la firmeza de los frijoles. Los consumidores generalmente relacionan esta propiedad con sensaciones como; “muy suave”, “muy duro”, “muy pastoso”, “muy viscoso”, entre otros.

Cabe resaltar que en algunos países como Estados Unidos de Norteamérica ya cuentan con valores de textura establecidos como parte de los estándares de calidad de enlatado, por ejemplo para el cultivar Sanilac (frijol navy) se desean valores de 72 kg 100 g⁻¹ en el producto final utilizando un texturómetro TXT1 (Hosfield, 1980).

Los resultados de esta evaluación se presentan en la Figura 12, en donde se observa que los frijoles que presentaron la mayor fuerza máxima fueron los negros de lata (NL) con valores alrededor de 38 gramos fuerza; para los otros frijoles negro de olla, Flor de Junio de olla y lata (NO, FO y FL) se obtuvieron texturas muy similares entre valores de 25 a 30 gramos fuerza.

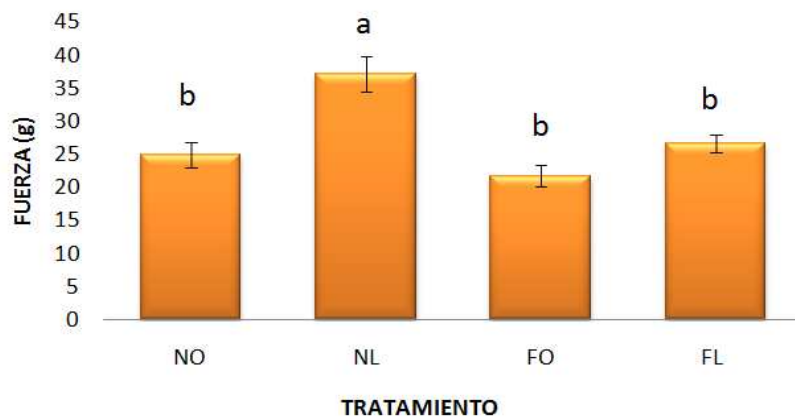


Figura 12. Fuerza aplicada a los granos de frijol de cada variedad como medición de la textura sin llegar a la deformación del material.

Valores expresados como la media de la fuerza en $g \pm E.E.$ Letras diferentes a y b indican diferencia estadística significativa entre cada tratamiento, evaluado por la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Negro 8025 de Olla (NO), Negro 8025 de Lata (NL), Flor de Junio Marcela de Olla (FO) y Flor de Junio Marcela de Lata (FL).

Estos resultados coinciden con lo obtenido en la evaluación de integridad en la cual se observó un mayor número de frijoles íntegros para la variedad Negro 8025 enlatada (48% vs. 16% de los Flor de Junio). Sin embargo cabe resaltar que la integridad no siempre se relaciona con una mayor dureza, un adecuado proceso y tiempo de cocción puede indicar una buena integridad con una menor dureza o mejor textura.

7.4 Cuantificación de compuestos fenólicos

En años recientes los frijoles con color han sido de gran atracción por sus pigmentos con características nutraceuticas, que están relacionadas con la presencia de compuestos fenólicos y estos a su vez con capacidad antioxidante lo que en conjunto promueve efectos benéficos sobre la salud en relación a la prevención de enfermedades crónico degenerativas como enfermedades cardiovasculares, obesidad y diabetes (Bazzano y col., 2001; Cai y col., 2004).

El procesamiento térmico de los frijoles no sólo provee de sabor y palatabilidad de la leguminosas cocidas si no también incrementa la biodisponibilidad de nutrientes, sin embargo, durante el tratamiento térmico se ven afectados los compuestos fenólicos individuales los cuales son responsables de la capacidad antioxidante (Rocha, 2007; Siddhuraju, 2006; Ranilla y col., 2009; Xu y col., 2008-2009).

El color de la cubierta de las semillas es atribuido a la presencia y a la concentración de los polifenoles, tales como; flavonoides, taninos condensados y antocianinas (Salinas y col., 2005; Romani y col., 2004) y su función es proteger a la semilla contra patógenos y predadores (Islamy y col., 2003).

Los polifenoles son un grupo de sustancias químicas encontradas en plantas caracterizadas por la presencia de más de un grupo fenol por molécula. Estos compuestos son capaces de remover los radicales libres, realizar catálisis para quelar metales, activar enzimas antioxidantes e inhibir oxidasas. Este comportamiento se le ha relacionado con actividades antioxidantes, antimutagénicas y anticarcinogénicas y también propiedades contra radicales libres (González y col., 1999; Cardador y col., 2002; Beninger y col., 2003).

En la cuantificación de fenoles totales, presentada en el Cuadro 9, se observó que tanto para el negro de olla (NO) como para el Flor de Junio Marcela de olla (FO) se obtuvieron resultados similares (33.3 y 32 mg eq. Ácido gálico/g) respectivamente, estos resultados corresponden a los mayores niveles de fenoles totales valorados en las muestras. El Flor de Junio Marcela de lata (FL) presentó los mayores niveles de fenoles totales respecto al negro de lata (NL), 27.8 vs. 21.7 mg eq. ácido gálico/g respectivamente. Estos resultados concuerdan por lo reportado por Xu y col. (2009) e Ismail y col. (2004), en los que se observa una disminución del total de compuestos fenólicos al aplicar diferentes procesos térmicos de cocción como ebullición y presión. Esta pérdida puede atribuirse a la solubilización de algunos compuestos fenólicos solubles en agua que pudieron haberse quedado mayoritariamente en el agua de remojo y de cocción o bien por la degradación de estos durante su procesamiento.

Cuadro 9. Compuestos fenólicos de las muestras de frijol enlatados y cocidos por métodos tradicionales.

	Flavonoides	Taninos condensados	Antocianinas	Fenoles totales
Frijol	¹ µg eq. Rutina/g	² mg eq. (+)-Catequina/g	³ mg eq. Cianidina 3-glucósido/kg	⁴ mg eq. Ácido gálico/g
NO	81.7 ± 4.0 b	12.5 ± 0.08 ab	71.6 ± 1.05 a	33.3 ± 0.14 a
NL	119.6 ± 7.0 a	14.6 ± 0.95 a	99.0 ± 2.90 b	21.7 ± 0.006 c
FO	80.5 ± 5.0 b	9.9 ± 0.40 bc	ND	32.0 ± 0.79 a
FL	94.0 ± 1.0 b	9.3 ± 0.57 c	ND	27.8 ± 0.29 b

^{1,2,4} Expresados en g de harina, ³ Expresados en kg de harina. Valores expresados como la media ± E.E. Letras diferentes a, b y c indican diferencia estadística significativa entre cada tratamiento para cada parámetro evaluado por la prueba de Tukey (p<0.05). Negro 8025 de Olla (NO), Negro 8025 de Lata (NL), Flor de Junio Marcela de Olla (FO) y Flor de Junio Marcela de Lata (FL).

Los flavonoides pueden clasificarse, según las isomerizaciones y los grupos funcionales que les son adicionados, en seis clases principales: las chalconas, las flavonas, los flavonoles, los flavandioles, las antocianinas, y los taninos condensados (Winkel, 2001).

Dentro de los resultados de la cuantificación de flavonoides se observó una diferencia estadística significativa únicamente en los frijoles negros de lata en el que se obtuvo un valor de 119 µg eq. rutina /g contra valores de 80- 94.0 µg eq. rutina/g de muestras en los otros frijoles (NO, FO y FL). Comparando los resultados del negro de lata y negro de olla se observó una concentración mayor en los NL esto debido a que muchas veces el proceso térmico hace más biodisponibles algunos compuestos, eliminando interferencias en su cuantificación.

En lo que respecta a los taninos se sabe que son compuestos biológicamente activos, su color va desde el amarillo hasta el castaño oscuro y pueden tener efectos nutricionales benéficos o adversos que más adelante se discutirá (Chung y col., 1998).

En la cuantificación de taninos condensados se observó que los negros de olla y de lata presentaron una mayor cantidad de este compuesto en comparación con los Flor de Junio Marcela, de acuerdo al análisis estadístico no hubo diferencia significativa entre los NO y NL (12.5–14.6 mg eq. (+)-Catequina/g). Los Flor de Junio Marcela mostraron menores niveles de taninos condensados que los negros y de igual manera hubo similitud de resultados en los de olla y de lata (9.9-9.3 mg eq. (+)-Catequina/g).

Iniestra y col. (2005) encontraron una asociación entre el contenido de taninos con coloraciones más negras y valores más bajos de luminosidad lo cual coincidió con la evaluación de color donde NO y NL obtuvieron los valores más bajos de luminosidad (16.8–20.8 unidades de color) correspondientes a coloraciones más oscuras comparadas con los FO y FL que presentaron valores más altos (37.8–46.4 unidades de color). Estos resultados estuvieron relacionados con los obtenidos en la evaluación de textura en los cuales los frijoles negros presentaron una mayor textura que como se mencionó anteriormente la presencia de estos compuestos está ligada con una mayor dureza de la testa.

Finalmente, las antocianinas son las moléculas mas bioactivas que llevan consigo los efectos fisiológicos más fuertes que ningún otro compuesto vegetal, son pigmentos de tejidos epidermales que imparten el color rojo, azul y morado a las plantas y a los alimentos, las principales fuentes son las frutas y vegetales rojos y morados (Clifford, 2000). Existen muchos reportes en los cuales se demuestran propiedades antiinflamatorias, vasotónicas y antioxidantes de las antocianidinas (Cardador y col., 2002; García y col., 2004).

En la cuantificación de antocianinas se observó que los frijoles negros fueron los únicos que presentaron niveles detectables de antocianinas con valores de 71.6 y 99 mg eq. Cianidina 3-glucósido/kg para el negro de olla y el de lata y se observa que de acuerdo al análisis estadístico, el contenido de antocianinas fue significativamente mayor en el negro de lata, la explicación podría deberse de igual forma a una mayor biodisponibilidad de este compuesto al someter el frijol a tratamiento térmico o bien, se ha reportado ampliamente que las determinaciones

fenólicas basadas en la coloración pueden sobreestimar a veces el contenido fenólico de las muestras debido a ciertos compuestos no fenólicos que dan una reacción positiva (Xu y col., 2009).

7.5 Determinación de capacidad antioxidante

Los métodos de determinación de la actividad antioxidante se basan en comprobar cómo un agente induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o la muestra. En el Cuadro 10 se muestra la capacidad antioxidante de las harinas de frijol en estudio.

Cuadro 10. Capacidad antioxidante de las harinas de frijol.

Frijol	¹ ABTS	² ABTS	³ DPPH	⁴ DPPH
NO	46.17 ± 0.35 a	5.84 ± 0.04	17.75 ± 1.40 b	1.84 ± 0.01
NL	49.34 ± 1.66 a	6.23 ± 0.04	27.76 ± 3.39 a	2.77 ± 0.02
FO	61.66 ± 1.67 b	7.73 ± 0.03	29.15 ± 0.80 a	3.23 ± 0.01
FL	57.14 ± 1.76 b	7.18 ± 0.02	30.20 ± 1.43 a	3.36 ± 0.01

^{1,3} Expresados como % de Inhibición, ^{2,4} Expresados como mM equivalentes de Trolox /g de harina. Valores expresados como la media ± E.E. Letras diferentes a y b indican diferencia estadística significativa entre cada tratamiento para cada parámetro evaluado, evaluado por la prueba de Tukey (p < 0.05). Negro 8025 de Olla (NO), Negro 8025 de Lata (NL), Flor de Junio Marcela de Olla (FO) y Flor de Junio Marcela de Lata (FL).

Los resultados para la evaluación de la capacidad antioxidante mostraron que se observó un menor porcentaje de inhibición del radical ABTS• y DPPH• en los negros de olla y de lata (NO y NL), para ABTS fue (46.17 y 49.34%) y para DPPH (17.75 y 27.76 %) en este último resultado la inhibición valorada del NL fue similar a lo evaluado para el Flor de Junio Marcela quien en ambas técnicas mostró mayores niveles de porcentaje de inhibición, para ABTS (61.66 y 57.14 %) y para DPPH (29.15 y 30.20 %).

Estos resultados no concuerdan con mayor contenido de compuestos fenólicos en la variedad color negra. La explicación a estos resultados podría deberse a que la capacidad antioxidante que se observó en mayores niveles en el frijol Flor de Junio podría deberse a la presencia de algún otro compuesto fenólico diferente a flavonoides, taninos condensados, antocianinas y los detectables por la técnica de fenoles totales.

Cabe mencionar que los métodos *in vitro* son útiles para comparar la actividad antioxidante de diferentes muestras de alimentos, sin embargo, en algunas ocasiones no se reproduce la situación fisiológica.

Las transformaciones metabólicas que sufren los compuestos antioxidantes en el organismo modifican su actividad. Ciertos compuestos fenólicos poliméricos que presentan una baja actividad *in vitro* pueden, sin embargo, contribuir a la capacidad antioxidante del plasma después de su transformación metabólica en compuestos más simples (Ghiselli, 2000).

7.6 Evaluación *in vivo* del efecto antidiabético de las harinas de frijol

7.6.1 Concentraciones de glucosa

La diabetes puede ser causada por muy poca producción de insulina, resistencia a ésta o ambas. La glucosa es fuente de energía para las células del organismo, entra en el torrente sanguíneo y el páncreas produce la insulina secretada por las células β del páncreas, cuyo papel es transportar la glucosa del torrente sanguíneo hasta los músculos, tejido adiposo y las células hepáticas, donde puede utilizarse como energía. Las personas con diabetes presentan hiperglucemia, debido a que el páncreas no produce suficiente insulina, o bien los músculos, la grasa y las células hepáticas no responden de manera normal a la insulina o por ambas razones (Calderon, 2007).

El tipo de diabetes inducido a los animales experimentales es una diabetes de tipo 1, en la cual hay una destrucción de las células β pancreáticas originado por el

fármaco inyectado estreptozotocina (STZ) vía intraperitoneal. Por lo tanto al no haber insulina que permita incorporar glucosa por tejidos dependientes de insulina, la glucosa permanece y se va incrementando en el torrente sanguíneo a medida que avanza la enfermedad y va causando complicaciones al atrofiar otros órganos por este incremento glicémico.

En la Figura 13 se muestran los resultados de los niveles de glucosa con respecto al tiempo y se observa que durante todo el experimento no se presentó un control sobre la glucosa.

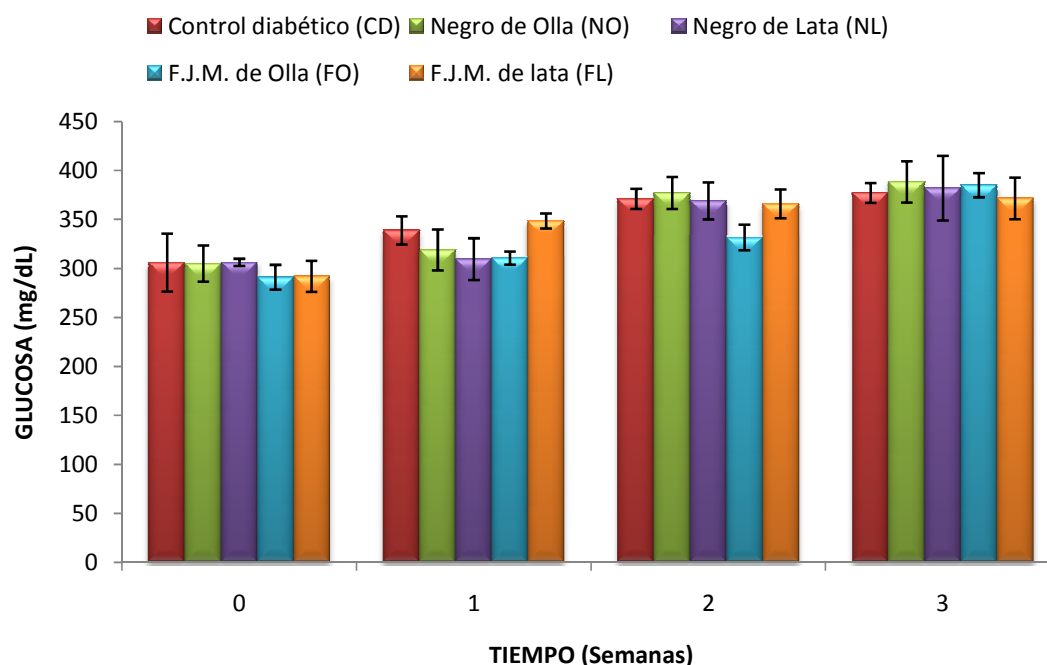


Figura 13. Concentración de glucosa sanguínea en ratas diabéticas alimentadas con una dieta suplementada al 9% con frijol de olla y frijol de lata.

Los valores se presentan como la media de la concentración de glucosa en sangre \pm E.E.

Estos resultados pueden deberse a que los niveles de glucosa con los que iniciaron los animales fueron muy elevados, correspondientes a una enfermedad muy avanzada, cabe destacar que por tratarse de una diabetes de tipo 1, inducida con una dosis muy elevada de STZ los animales enferman más rápido y llegan a

una etapa terminal en un lapso no mayor a 3 semanas como fue el caso en este estudio. Por esta razón en etapas avanzadas de la enfermedad ya no es posible controlar los niveles de glucosa con la dieta y se debe administrar fármacos.

Se ha reportado que la calidad del grano de frijol es determinada por distintos factores como la variedad, manejo agronómico, condiciones de cultivo y almacenamiento que repercuten en las características nutrimentales y nutracéuticas del frijol (Balasubramanian y col., 2000), por lo que a pesar de haberse reportado ya en diferentes trabajos que la variedad Negro 8025 posee efectos antidiabéticos en ratas diabéticas inducidas con STZ, este efecto puede ser diferente aun tratándose de la misma variedad de frijol (García, 2006; Lomas, 2008; Mendoza, 2009).

En diferentes trabajos de sustento científico se comprueba que el frijol tiene efectos benéficos sobre la diabetes, y en los resultados obtenidos en este trabajo, aunque no se observó disminución de los niveles de glucosa, tampoco se observó un aumento en éstos por el consumo de frijol, ya que existen reportes que no recomiendan el consumo de frijol por su alto índice glicémico (IG).

Por otro lado, el control de la enfermedad no sólo se da a través de la disminución de los niveles de glucosa sanguínea, puede darse también sobre el control del estrés oxidativo, por la conservación de células productoras de insulina o estimulación de éstas o disminuyendo las complicaciones propias de la enfermedad (Venkateswaran, y col. 2001-2002; Tormo y col., 2004; Pari y col., 2004).

7.6.2 Peso corporal

En las alteraciones metabólicas propias de la diabetes interviene también la secreción sin oposición de hormonas de contrarregulación como (glucagón, catecolaminas, hormona de crecimiento y adrenalina) que aceleran la condición catabólica. La baja asimilación de la glucosa por los tejidos muscular y adiposo produce una disminución de los depósitos de glucógeno y lípidos respectivamente,

además en el hígado la glucogénesis se incrementa para compensar las necesidades de glucosa en el organismo y dicha glucosa es producida a partir de aminoácidos provenientes del músculo, todas estas alteraciones generan una pérdida de peso durante la diabetes tipo uno (Guyton, 2001).

Los resultados obtenidos en la medición del peso corporal en las tres semanas de tratamiento se presentan en la Figura 14 en la cual se observa que respecto al control diabético (CD) no hubo diferencias significativas en los grupos tratados con las harinas de frijol (NO, NL, FO y FL).

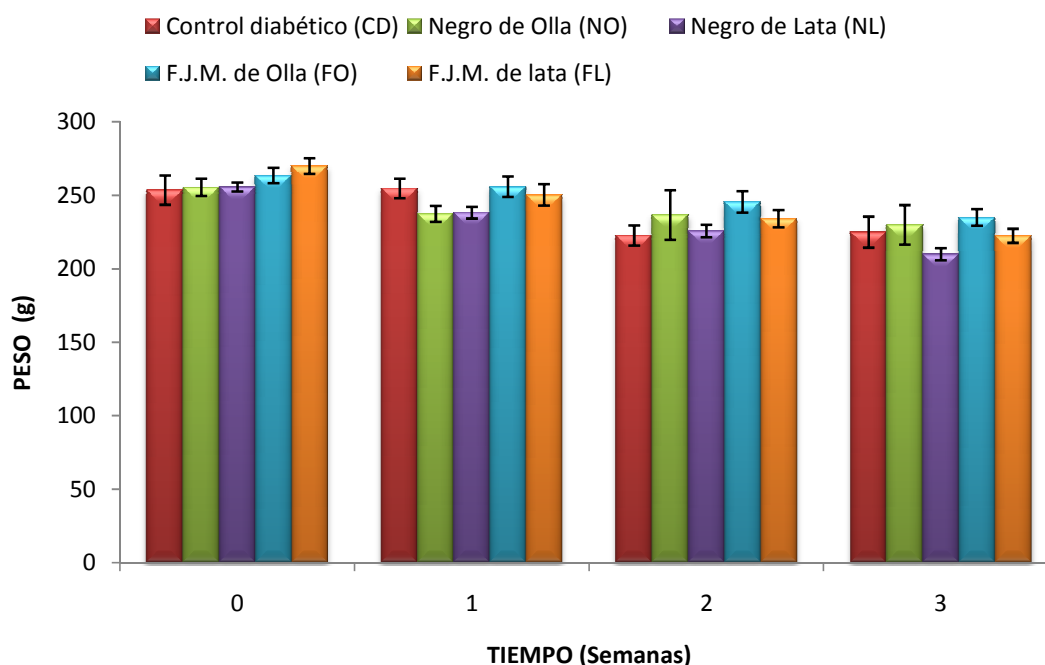


Figura 14. Peso corporal semanal en ratas diabéticas alimentadas con una dieta suplementada al 9% con frijol de olla y frijol de lata.

Los valores se presentan como la media del peso corporal de los animales \pm E.E.

Se puede apreciar una tendencia a la disminución de peso en todos los grupos. La disminución que tuvo el CD al finalizar las 3 semanas de tratamiento fue de 11.3% de su peso inicial, de 10.0%, 17.8%, 10.8% y 17.6% para NO, NL, FO y FL respectivamente. Con estos resultados se puede observar que si bien no hubo una diferencia estadística significativa del peso de los animales respecto al CD, los

grupos alimentados con las harinas NO y FO (10- 10.8%) tuvieron una pérdida de peso similar a la del CD (11.3%), y los animales alimentados con NL Y FL (17.8 – 17.6%), fueron los que presentaron una mayor disminución de peso al finalizar las tres semanas. Esto sugiere que el consumo de los frijoles NL y FL influyó de alguna manera en una mayor pérdida de peso de los animales que consumieron estas harinas lo cual en condiciones catabólicas propias de la diabetes tipo 1 es indicativo de un efecto adverso.

7.6.3 Consumo de alimento

El aumento en el consumo de alimento (polifagia) se desencadena debido a que el hipotálamo que es la estructura del cerebro encargada de regular el hambre, el apetito y la saciedad lo realiza por medio de hormonas y péptidos y por el nivel de glucosa en la célula. Al no poder entrar la glucosa a la célula por la deficiente acción de la insulina no se manda la señal de saciedad al hipotálamo lo que origina que el individuo sienta el deseo de comer más para sentirse satisfecho (Jara, 2001).

En los resultados mostrados en la Figura 15 se presenta el consumo de alimento en las tres semanas de tratamiento. Se observa que esta cantidad es mayor comparada con la reportada para animales sanos (35 g).

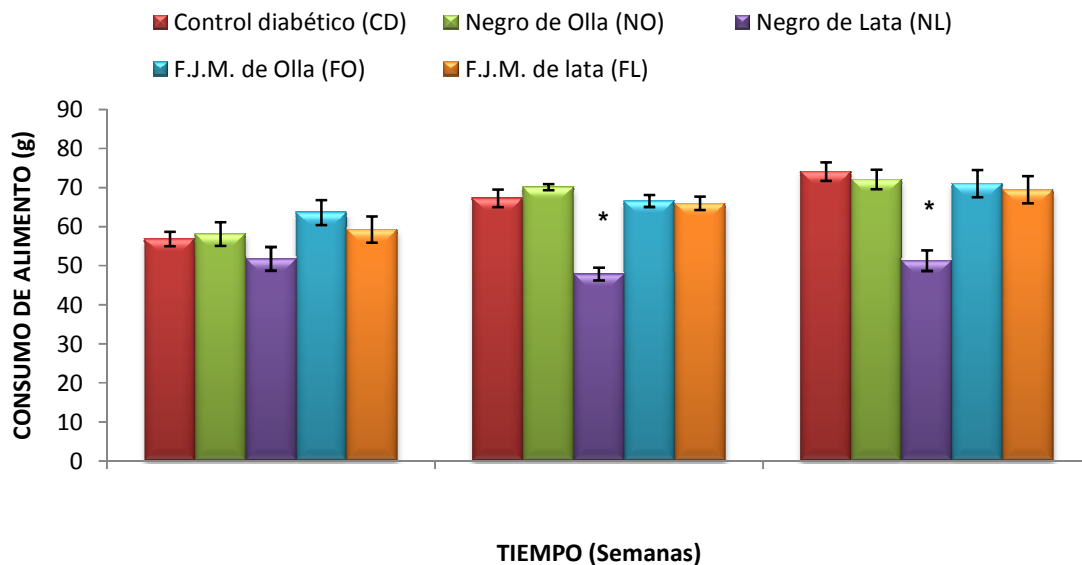


Figura 15. Consumo de alimento semanal en ratas diabéticas alimentadas con una dieta suplementada al 9% con frijol de olla y frijol de lata.

Los valores se presentan como la media del consumo de alimento \pm E.E. * Indican diferencia estadísticamente significativa respecto al control diabético, analizadas con la prueba de Dunnet ($p < 0.05$).

Con respecto a los animales alimentados con dieta suplementada con frijol se observa que en la primera semana no se tuvo diferencia de consumo en los diferentes grupos tratados con las harinas NO, NL, FO y FL respecto al CD, lo que sugiere que el consumo de frijol, no está ejerciendo un control sobre este parámetro, sin embargo, para la segunda y tercera semana hubo una disminución del consumo de alimento por los animales tratados con las harinas de NL hasta de un 31% respecto al CD, lo cual pareciera relacionarse con un efecto benéfico, sin embargo dados los resultados que más adelante se obtuvieron en la evaluación de perfil de lípidos y daño renal, dicha disminución sugiere un efecto adverso, relacionados al parecer con la presencia de compuestos antinutricios.

Experimento con animales sanos.

Dados los resultados anteriores, se realizó un segundo experimento con animales sanos para corroborar la presencia de compuestos antinutricios en la harina NL

que presentó los efectos más marcados de disminución de consumo de alimento y ganancia de peso en los animales diabéticos relacionados al parecer con la presencia de compuestos antinutricios. En los resultados de este experimento de igual forma, se obtuvo una disminución estadísticamente significativa del consumo de alimento en los animales tratados con NL fue 11.5% menor al control, que consumió alimento normal. Estos resultados se presentan en la Figura 16.

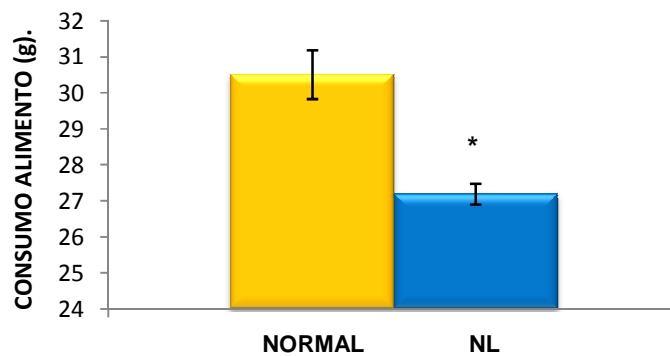


Figura 16. Consumo de alimento después de tres semanas de tratamiento en ratas sanas alimentadas con dieta normal y con dieta suplementada al 9% con frijol negro de lata (NL).

Los valores se presentan como la media del consumo de alimento \pm E.E. * Indican diferencia estadísticamente significativa respecto al control diabético, analizadas con la prueba de Dunnet ($p < 0.05$).

En este segundo experimento se evaluó también, el aumento de peso en los animales sanos al finalizar tres semanas de tratamiento, y se obtuvo una menor ganancia en el grupo alimentado con NL el cual ganó un total de 94 gramos y los alimentados con dieta normal un total de 142 gramos representando una diferencia entre ambos grupos de 34%. Esta disminución de ganancia de peso por parte de los animales tratados con NL en ambos experimentos (con animales diabéticos y animales sanos) pudiera atribuirse a la presencia de compuestos antinutricios que pudieron quedar activos en los frijoles (NL). Estos compuestos tipo lectinas, inhibidores de tripsina, inhibidores de alfa-amilasa, etc., producen efectos

adversos relacionados principalmente con mala absorción de nutrientes, alteraciones digestivas y efecto inhibitorio de enzimas digestivas, además de desencadenar diarrea, náusea, vómito, así como, inhibición de crecimiento en animales experimentales (Bollini y col., 1999; Múzquiz y col., 1999).

7.6.4 Consumo de agua

Cuando la diabetes no está bien controlada, en la persona que la padece puede incrementar su sed y tomar una gran cantidad de líquido (polidipsia) es el término médico que se usa para describir esta situación. En las personas diabéticas, la polidipsia ocurre porque el nivel de azúcar en sangre es elevado. Esto significa que los riñones tienen que funcionar más de lo normal para eliminar el azúcar. Para lograrlo, los riñones producen más orina. Como el cuerpo elimina mucho líquido, la persona tendrá mucha sed y tratará de tomar más líquido para reponerlo (Mahía y col., 2007).

Los resultados de la medición de consumo de agua se presentan en la Figura 17, en los que se observa que para la segunda semana de tratamiento, el consumo de agua por el grupo CD fue significativamente superior a los otros grupos tratados con las harinas en un porcentaje alrededor 66.5 %, sin embargo, para la tercera semana el grupo NL presentó un consumo de agua similar al del CD, lo que nos sugiere que en estos dos grupos el consumo de agua no se controló de la misma manera que para los grupos tratados con NO, FO y FL los cuales mostraron un consumo similar en las tres semanas de tratamiento.

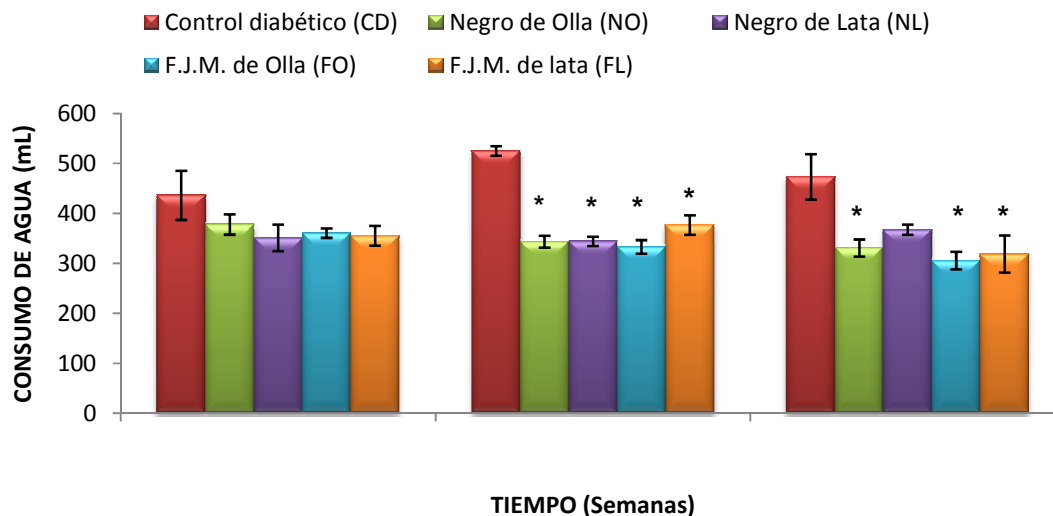


Figura 17. Consumo de agua semanal en ratas diabéticas alimentadas con una dieta suplementada al 9% con frijol de olla y frijol de lata.

Los valores se presentan como la media del consumo de agua \pm E.E. * Indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) respecto al control diabético, analizadas con la prueba de Dunnet. . Negro 8025 de Olla (NO), Negro 8025 de Lata (NL), Flor de Junio Marcela de Olla (FO) y Flor de Junio Marcela de Lata (FL).

7.6.5 Perfil de lípidos

La diabetes mellitus se ha relacionado estrechamente con anomalías de lípidos en plasma que incluyen la reducción de lipoproteínas de alta densidad (HDL), predominio de lipoproteínas de baja densidad (LDL) pequeñas y densas y elevados niveles de triglicéridos VLDL (ADA, 2003).

Estas alteraciones están asociadas con el incremento en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares que es una de las principales causas de muerte en pacientes diabéticos (Ronald y col., 2004).

En el Cuadro 11 se presentan los resultados de la evaluación del perfil de lípidos, en donde se observa que no hubo variación de los niveles de colesterol total y HDL en los animales tratados con las harinas de frijol respecto al CD.

Cuadro11. Perfil de lípidos en suero de ratas diabéticas alimentadas con una dieta suplementada al 9% con frijol de olla y con frijol de lata.

TRATAMIENTO	COLESTEROL	TRIGLICERIDOS	HDL
CD	72.4 ± 6.62	139.9 ± 33.58	24.6 ± 1.95
NO	77.0 ± 4.28	125.1 ± 21.35	30.5 ± 1.76
NL	68.7 ± 4.19	60.8 ± 6.57 *	38.9 ± 7.40
FO	67.8 ± 7.28	127.4 ± 17.94	31.5 ± 4.25
FL	69.2 ± 3.66	59.6 ± 14.04 *	22.8 ± 3.35

Los valores se presentan como la media ± E.E. * Indican diferencia estadísticamente significativa respecto al control diabético, analizadas con la prueba de Dunnet ($p < 0.05$). Negro 8025 de Olla (NO), Negro 8025 de Lata (NL), Flor de Junio Marcela de Olla (FO) y Flor de Junio Marcela de Lata (FL).

Los niveles de triglicéridos se vieron disminuidos en los animales tratados con NL y FL, aunque esto podría indicar un efecto benéfico más bien puede tratarse de niveles muy bajos de triglicéridos que han sido vinculados con desnutrición y síndrome de malabsorción (Semenkovich, 2007).

Integrando los resultados de consumo de alimento, ganancia de peso y los que más adelante se presentan en la evaluación de daño renal se sugiere nuevamente la presencia de compuestos antinutricios que pudiera estar vinculada con los resultados obtenidos en los niveles de triglicéridos para estos dos grupos NL y FL.

7.6.6 Proteína en orina

La albúmina es una proteína que se encuentra en gran proporción en el plasma sanguíneo, siendo la principal proteína de la sangre; posee una carga negativa, lo que impide su filtración glomerular a la orina ya que la membrana basal del glomérulo renal también posee carga negativa. La hiperglicemia puede alterar la permeabilidad del glomérulo renal disminuyendo su carga negativa permitiendo así el paso de las proteínas (Bazari, 2007).

Un examen de proteína urinaria mide la cantidad de proteínas, como albúmina, que se encuentra en una muestra de orina y esto se ha utilizado como referencia para evaluar daño renal.

Los resultados de la evaluación de proteína en orina se presentan en la Figura 18 y mostraron que los animales alimentados con FL tuvieron los niveles más bajos de proteína en orina 64% menor que el CD, de igual forma los animales que consumieron NO, aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos mostraron una disminución del 33% respecto al CD. Lomas en (2008), reporta una disminución en la tasa de filtración de proteína en animales diabéticos tratados con frijol negro 8025 cocido en olla, resultado similar a lo obtenido en este trabajo. Así, estos resultados pudieran sugerir un efecto protector sobre daño renal asociado al consumo de estas harinas.

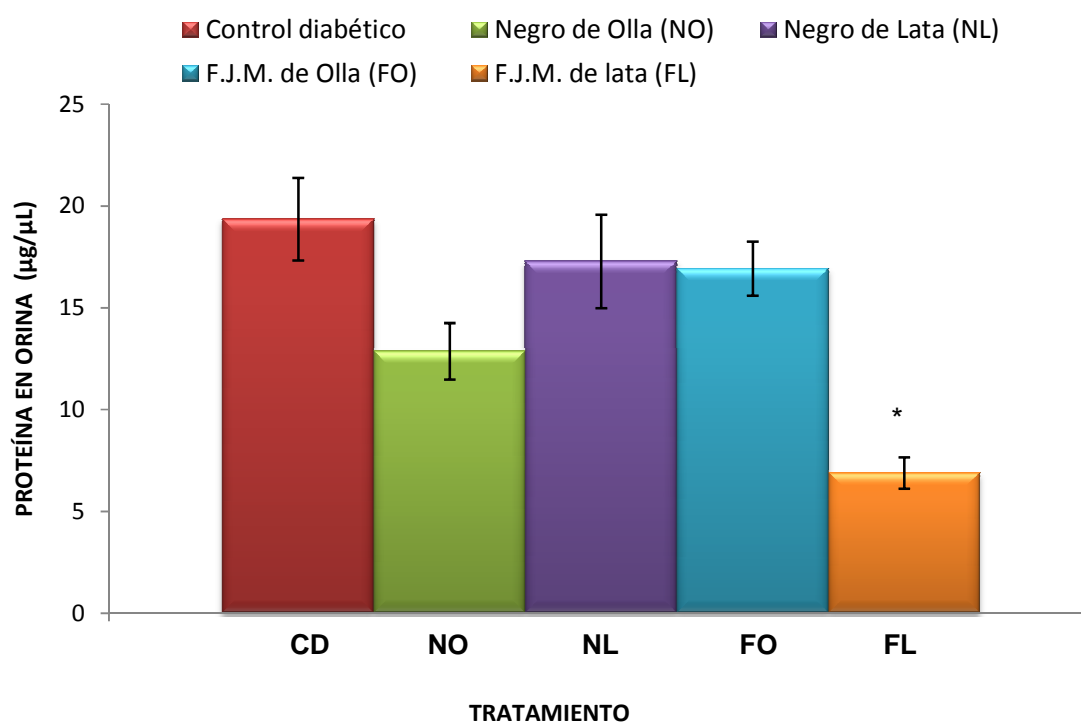


Figura 18. Proteína en orina en ratas diabéticas alimentadas con una dieta suplementada al 9% con frijol de olla y con frijol de lata.

Los valores se presentan como la media de los niveles de proteína en orina \pm E.E. * Indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) respecto al control diabético, analizadas con la prueba de Dunnet.

Estas alteraciones renales ya han sido reportadas con anterioridad en modelos experimentales de diabetes inducida con estreptozotocina, en los que se ha observado hipertrofia glomerular, hiperfiltración y un incremento en excreción urinaria de proteínas (Grønbæk y col., 2008).

7.6.7 Depuración de creatinina

La creatinina es un compuesto generado a partir de la degradación de la creatina que es un nutriente útil para los músculos. Es un producto de desecho del metabolismo normal de los músculos que usualmente es producida por el cuerpo en una tasa muy constante (dependiendo de la masa de los músculos), y normalmente filtrada por los riñones y excretada en la orina (Bazari, 2007).

La medición de la creatinina es la manera más simple de monitorizar la correcta función de los riñones. El examen de depuración de creatinina compara el nivel de creatinina en la orina con el nivel en la sangre y es una medida de la rapidez con la cual los riñones remueven la creatinina de la sangre, niveles por debajo de los establecidos en los humanos indican una afectación renal (Fierro, 2009).

Los resultados para la evaluación de depuración de creatinina presentados en la Figura 19, mostraron que los animales tratados con las harinas NO tuvieron niveles de depuración estadísticamente significativos 83% superiores al CD lo cual concuerda con los resultados de la evaluación de proteína en orina en la que se observó que los animales que consumieron NO presentaron los niveles bajos de este parámetro junto con los que consumieron FL lo que sugiere que el consumo de estas harinas tuvieron un efecto protector sobre la función renal. Estos resultados coinciden con los de Lomas (2008), quien encontró que el consumo de frijol Negro 8025 ejerce un efecto protector sobre daño renal en ratas diabéticas disminuyendo los niveles de albúmina en orina y reduciendo la concentración sérica de TNF- α e IL-6.

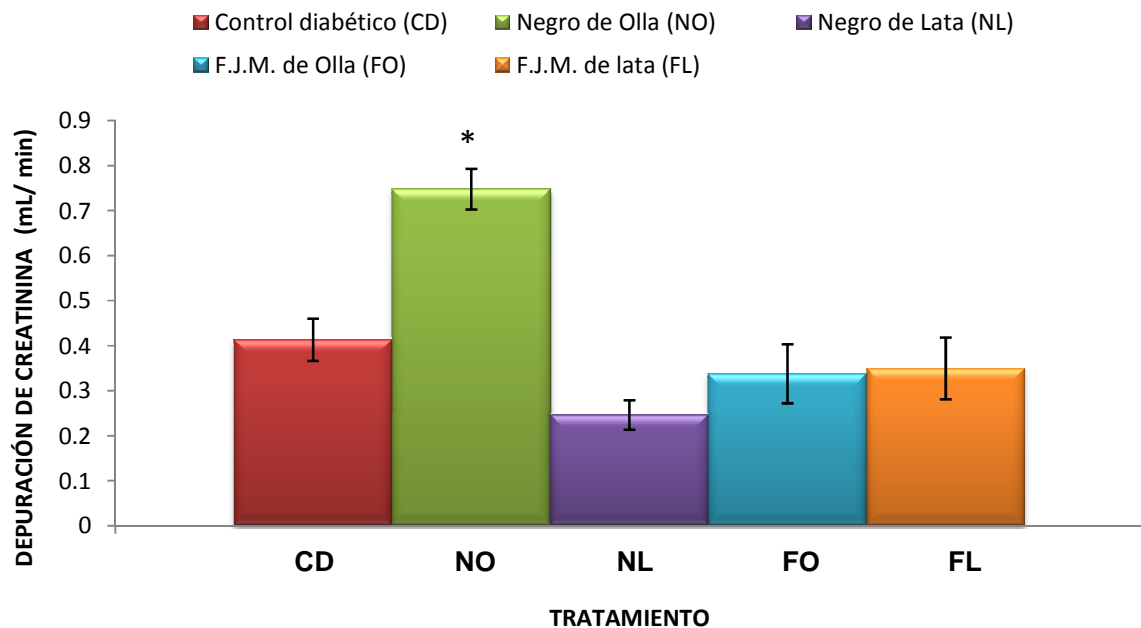


Figura 19. Depuración de creatinina en ratas diabéticas alimentadas con una dieta suplementada al 9% con frijol de olla y con frijol de lata.

Los valores se presentan como la media de la depuración de creatinina \pm E.E. * Indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) respecto al control diabético, analizadas con la prueba de Dunnet.

Por otro lado se observó que el grupo tratado con NL mostró los niveles más bajos de depuración de creatinina 39% menor al CD y en la evaluación de proteína en orina mostró valores altos lo que pudiera indicar nuevamente que el consumo de este frijol tuvo un efecto adverso sobre daño renal.

7.6.8 Expresión de TNF α y VCAM en riñones

Es conocido que diversos elementos celulares a nivel renal (células endoteliales, mesangiales, glomerulares y tubulares) tienen capacidad para producir citocinas, incluyendo TNF α y se ha demostrado que existe un incremento de estas citocinas a nivel de los glomérulos en ratas diabéticas respecto a la observada en un control sano (Nakamura y col., 1993).

En la Figura 20 se presentan los resultados de la evaluación de la expresión de mRNA VCAM y TNF- α en unidades arbitrarias representadas como la relación del área de pixeles de cada mRNA entre el área de pixeles del control interno de carga GAPDH (gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa).

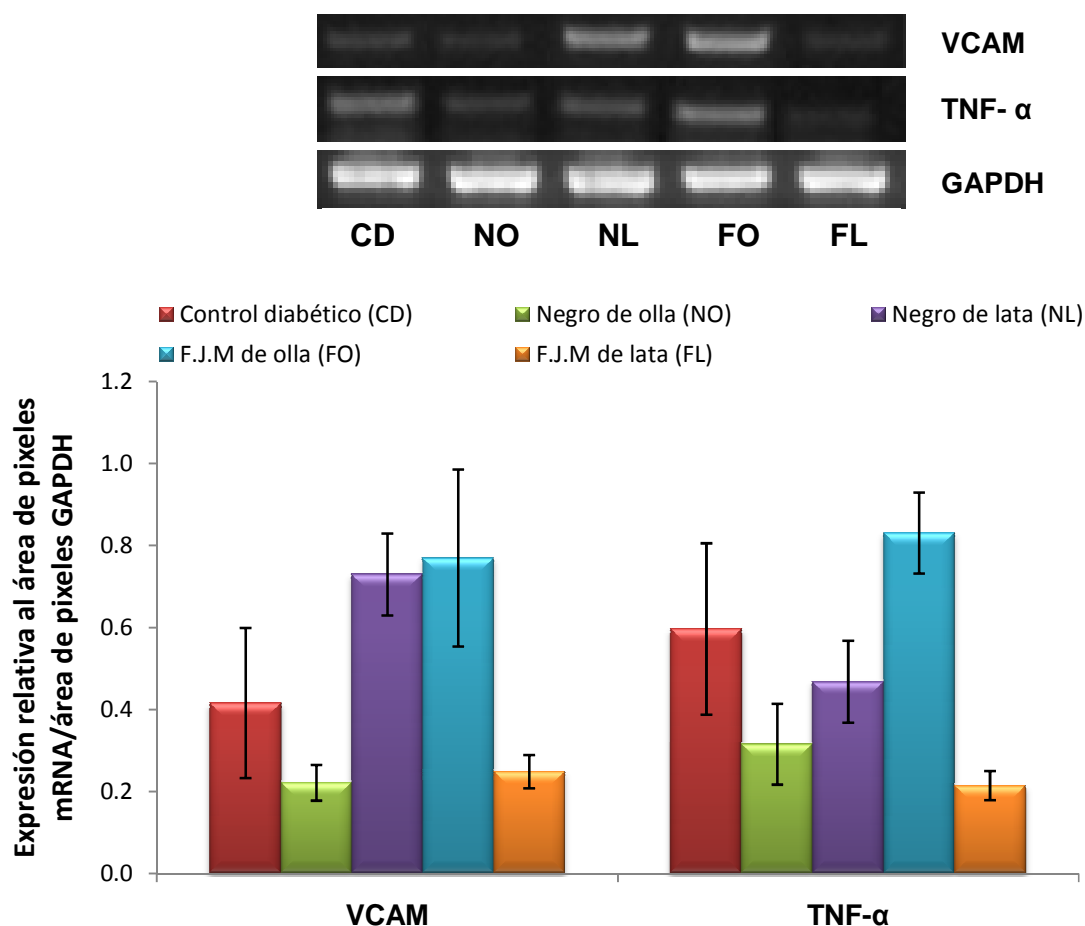


Figura 20. Expresión de VCAM y TNF- α en el riñón de ratas alimentadas con harinas de frijol.

Los valores se presentan como la media de la expresión relativa al área de pixeles \pm E.E.

Los resultados para la evaluación del nivel de expresión de VCAM mostraron que a pesar no existir diferencia estadística significativa, los animales que consumieron NL y FO tuvieron un mayor nivel de expresión aproximadamente 85% respecto al CD, coincidiendo con los resultados de la evaluación de proteína en orina en la

cual ambos grupos presentaron valores altos, indicando una mayor afectación renal. Se observa también que NO y FL presentaron los niveles más bajos de expresión de VCAM aproximadamente 43 % menor que el CD lo que también coincide con los resultados de proteína en orina y depuración de creatinina.

La expresión de TNF- α fue mayor para los animales que consumieron FO en un 39% respecto al CD, y menor para los que consumieron NO (47%) y FL (58 %) respecto al CD. Estos resultados muestran que existe un estado inflamatorio menor en los animales alimentados con NO y FL, lo cual coincide con menor concentración de proteínas en las orina.

Se ha observado que el consumo diversos alimentos puede ejercer una regulación de citocinas proinflamatorias y moléculas de adhesión (Manzoor, 2008). Esto sugiere, que compuestos bioactivos en el frijol pueden disminuir los niveles de marcadores de inflamación y daño renal, independientemente del efecto hipoglucémico.

7.6.9 Análisis histológico de riñones

Con la finalidad de corroborar los resultados anteriores se realizaron cortes histológicos de los riñones de las ratas y se les hizo una tinción de PAS (Periodic Acid-Schiff). La reacción de PAS en los cortes de tejido es útil para la demostración de mucopolisacáridos, mucoproteínas, glucoproteínas, glucolípidos y fosfolípidos. Cuando se tratan con ácido periódico, los glicoles se oxidan en aldehídos. Tras la reacción con el reactivo Schiff, se libera un producto de pararosanilina que tiñe los componentes celulares que contienen glicol. Las sustancias PAS-positivas tiñen en magenta y el núcleo en azul (Sigma-Aldrich, 2003). Los altos niveles de glucosa en la diabetes originan la formación y acumulación de estos compuestos, por lo que la tinción indicaría la severidad del daño en cada riñón y sería proporcional a una tinción magenta más marcada cuando más severo es el daño por la presencia de mayor cantidad de compuestos glicosidados, además que se observaría un aumento del engrosamiento de las membranas basales y atrofia tubular entre otras alteraciones (Fierro, 2009).

Los resultados de las tinciones de los cortes presentados en la Figura 21 no mostraron una diferencia apreciable en el grado de tinción de los túbulos y glomérulos, ni en el engrosamiento de la membrana basal, esto pudiera deberse a que los niveles de glucosa fueron similares en todos los grupos por lo que la glucosidación de proteínas y lípidos se dio en similar proporción en todos los riñones. Con estos resultados se podría sugerir que a pesar de llevarse a cabo la glicosilación, los frijoles podrían disminuir el daño desencadenado posterior a estas reacciones como los procesos inflamatorios.

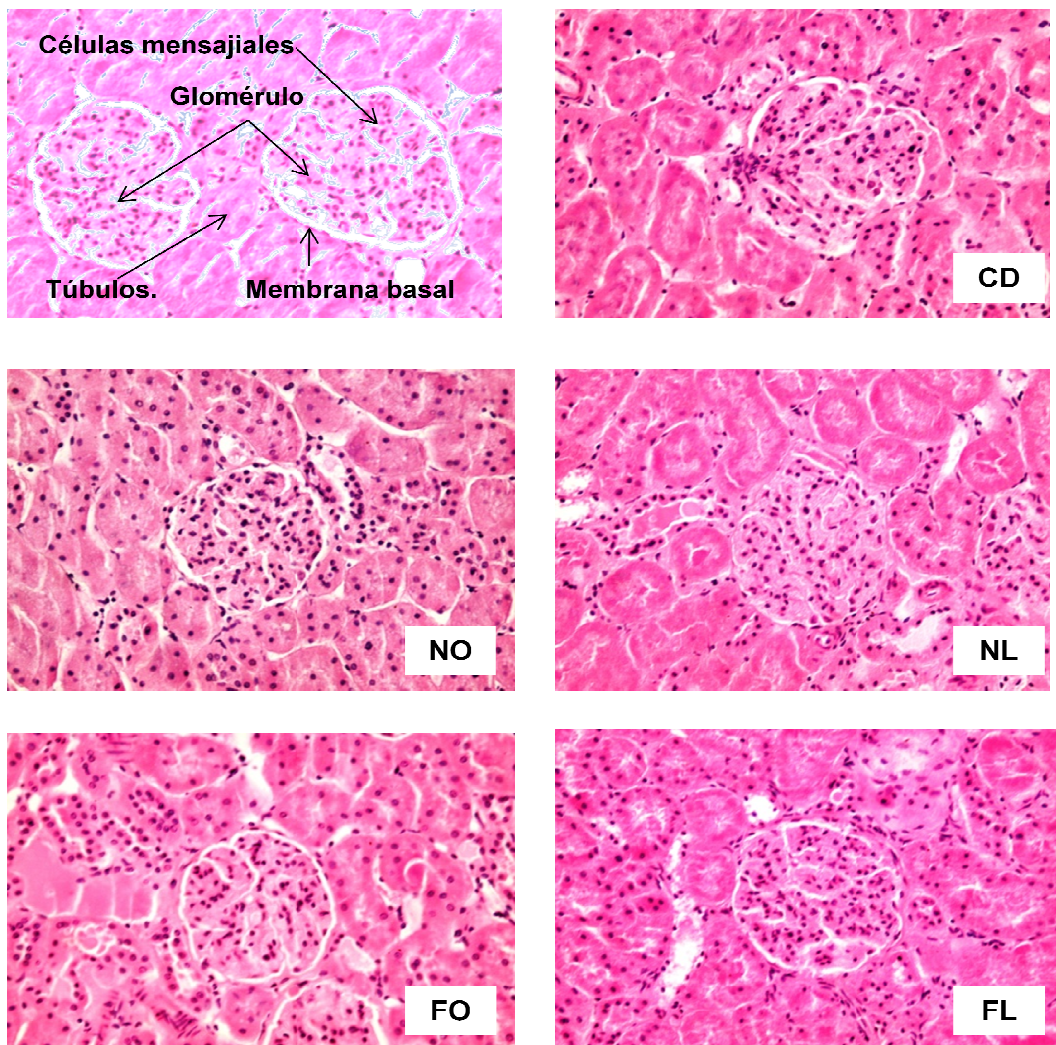


Figura 21. Cortes histológicos transversales de riñón de rata con tinción Pas, vistos al microscopio.

VIII. CONCLUSIONES

Las variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) Negro 8025 y Flor de Junio Marcela presentan la factibilidad para ser enlatadas, sin embargo la variedad Flor de Junio Marcela presentó mayores ventajas.

En cuanto a los resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos de ambas variedades, los frijoles Negro 8025 de olla y de lata (NO y NL) presentaron mayor cantidad de taninos condensados y antocianinas, respecto a los Flor de Junio Marcela de olla y de lata (FO y FL), sin embargo, la capacidad antioxidante fue mayor para estos últimos que para los Negro 8025.

En los estudios *in vivo* el frijol negro de lata (NL), mostró efectos adversos en el modelo de diabetes avanzada tipo I, que al parecer están relacionados más bien con un problema de absorción de nutrientes por la presencia de compuestos antinutricios que pudieron quedar activos durante el procesamiento de enlatado.

Los frijoles en estudio no mostraron un control glicémico, sin embargo frijol negro de olla (NO) y el Flor de Junio Marcela enlatado (FL) protegieron contra daño renal evaluado a través de proteínas en orina y expresión de VCAM, y TNF- α .

Los beneficios del frijol son dependientes de la variedad y del proceso de cocción, la variedad Negro 8025 muestra mayores beneficios cocido por métodos tradicionales, mientras que Flor de Junio Marcela es más recomendable cuando se somete al proceso de enlatado.

IV. BIBLIOGRAFÍA

- A. A. P. P. A. 2003. Academia del área de plantas piloto de alimentos. Introducción a la tecnología de alimentos. 2da Edición. Editorial Limusa. Pag 58.
- Abdel, M.S., Hucl, A. 1999. A rapid method for quantifying total anthocianins in blue aleurone and purple paricarp wheats. *Cereal Chem.* 76: 350-354.
- ADA. American Diabetes Association. 2003. Management of dyslipidemia in adults with diabetes (Position Statement). *Diabetes Care* 26 (Suppl. 1): S83-S86.
- Augustin, J., Klein, B. P. 1989. Nutrient composition of raw, cooked, canned and sprouted legumes. *Legumes, chemistry, technology and human nutrition.* P187.
- Balasubramanian, P., Slinkard, A., Tyler, R., and Vandenberg, A. 2000. A modified laboratory canning protocol for quality evaluation of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Sci Food Agric.* 80: 732-738.
- Ball, C. O. 1923. Thermal Process time for canned food. *Bull Natl Res Council.* 7:109-76.
- Bazari, H. 2007. Approach to the patient with renal disease. In: Goldman L, Ausiello D, eds. *Cecil Medicine.* 23rd ed. Saunders Elsevier; 2007:chap 115.
- Bazzano, L., He, J., Ogden, L. G., Loria, C. 2001. Legume consumption and risk of coronary heart disease in US men and women. *Arch Intern Med.* 161: 2573-2578.
- Beninger, C.W., Hosfield, G.L. 2003. Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. Seed coat color genotypes. *J Agric Food Chem.* 51: 7879-7883.
- Bigelow, W. C. Bohart, G. S., Richardson, A. C., Ball, C. O. 1920. "Heat penetration in processing canned foods". National Canners Association. *Bull* 16L. pp. 1-128.

- Bollini, R. E., Carnovale, B.C. 1999. Removal of antinutritional factors from vean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *Biotechnol Agron Soc Environ.* 3:217-219.
- Brownlee, M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 414: 813-820 .
- Bupa's published health information team Type 1 diabetes. Revisado el día 28 de junio de 2009 en la pagina web: http://hcd2.bupa.co.uk/fact_sheets/html/diabetes1.html#2
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* 74:2157–84.
- Calderón, A. 2007. Epidemiología, genética y mecanismos patogénicos de la diabetes mellitus. *Rev Esp Cardiol Supl.* 7:3H-11H.
- Cardador, A., Loarca, G., Oomah, B.D. 2002. Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus Vulgaris* L.). *J Agric Food Chem.* 50: 6975-6980.
- Carrillo, J.L., Perales, L. H. 2006. Diabetes mellitus, primer lugar en tasa de mortalidad en el país. *Revista Conversus.* Revisado el día 19 de mayo de 2009 en la página web: <http://www.periodistasenlinea.org>
- Choung. M.G., Choi, B.R., An, Y.N, Chu, Y.H, Cho, Y.S. 2003. Anthocyanin profile of Korean cultivated kidney bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *J Agric Food Chem.* 51: 7040-7043.
- Chung, K.T., Wei, C.I., Johnson, M.G. 1998. Are tannins a double-edged sword in biology and health. *Trends Food Sci Tech.* 9: 168-175.
- Clifford, M.N. 2000. Anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.* 80: 1063-1072.
- Conget, I. 2002. Diagnóstico, clasificación y patogenia de la diabetes mellitus. *Endocrinología y Diabetes. Rev Esp Card.* 55:528-38.

- da Silva, F. L., Guimarães, V.M., de Barros, E.G., Moreira, M.A. 2006. Biochemical composition and indigestible oligosaccharides in *Phaseolus vulgaris* L. seeds. *Plant Foods Hum Nutr.* 61(2):87-9.
- Das, S.K, Chakrabarti, R. 2005. Non-insulin dependent diabetes mellitus: present therapies and new drug targets. 5:1019-1034.
- De Lange, A.F, Labuschagne, M. 2000. Multivariate assessment of canning Quality, chemical characteristics and yield of small white canning beans (*Phaseolus Vulgaris* L) in South Africa. *J Sci Food Agric.* 81:30-35.
- Deshpande, S. S., Cheryan, M. 1987. Determination of phenolic compounds of dry beans using vanillin, redox and precipitation assays. *J Food Sci.* 52: 332–334.
- Deshpande, S.S., Cheryan, M. 1986. Water uptake during cooking of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Food Hum Nutr.* 36:157-165.
- Diaz-Batalla, L., Widholm, J. M., Fahey, G. C., Castaño-Tostado, E., Paredes-López, O. 2006. Chemical Components with Health Implications in Wild and Cultivated Mexican Common Bean Seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem.* 54:2045-2052.
- Duane, W. 1997. Effects of legume consumption on serum cholesterol. biliary lipids and sterol metabolism in humans. *J Lipid Res.* 38:1120-1128.
- Duranti M. 2006. Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia.* 77:67-82.
- Espinoza, G. L., Lygin, A., Widholm, J. M, Valverde, M. E., Paredes, O. 2006. Polyphenols in Wild and Weedy Mexican Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agric. Food Chem.* 54:4.
- Esposito, K., Ciotola M., Giugliano D. 2006. Oxidative Stress in the Metabolic Syndrome. *J Endocrin Inv.* 29:791-795.
- FAO/OMS. 1998. Carbohydrates in Human Nutrition: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, 14-18 April 1997, Rome. *FAO Food Nutr Paper No.* 66.

- Fierro, J. A. 2009. Diabetic nephropathy: physiopathology, diagnosis, clinical progressing and epidemiology. Rev Med Clin Condes. 20(5): 639 - 650
- Financiera Rural. 2009. Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial. Monografía de frijol. Revisado el día 8 de agosto de 2010 en la página web: <http://www.financierarural.gob.mx>
- Flores, S. E., Machorro, L. 2005. Diabetes Mellitus. Epidemiología molecular en la diabetes mellitus y sus complicaciones. 3ª ed. Ed. McGraw-Hill. Pp. 35-69
- FMD. Federación Mexicana de Diabetes A.C. Revisado el día 19 de mayo de 2009 en la pagina web: <http://www.fmdiabetes.org>
- Fontvieille, A., Rizkalla, S., Penfornis, A. 1992. The use of low glycemic index foods improves metabolic control of diabetic patients over five weeks. Diab Med. 9: 1- 7.
- Fukumoto, L.R., Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. J Agric Food Chem. 48: 3597-3604.
- García G. 2006. Capacidad hipoglucemiante de diferentes variedades de harinas de frijol cocido (*Phaseolus vulgaris L.*) y su posible mecanismo de acción en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
- García, V. A. Revisado el día 11 de agosto de 2009 en la página web: http://www.uam.es/personal_pdi/medicina/algvilla/db/macroangio.html.
- García, M., Pascual, T. S., Santos, C., Rivas, J.C. 2004. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. Food Chem. 84:13–18.
- Ghani, A. G., Farid, M. M., Chen, X. D., Richards, P. 1999. Numerical simulation of natural convection heating of canned food by computational fluid dynamics. J Food Eng. 41:55-64.
- Ghani, A. G. 2006. "A computer simulation of heating and cooling liquid food during sterilization process using computational fluid dynamics". Association for Computing Machinery New Zealand Bulletin. Vol. 2. pp. 1-14.

- Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., Scaccini, C. 2000. Total antioxidant capacity is a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med.* 29: 1106-1114.
- González, E., Castaño, E., Loarca, G. 1999. Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans. *Mut Res.* 441:1–9.
- Goñi, I., Martín-Carrón, N. 2001. Fermentación colónica de fibra dietética y almidón resistente. *Fibra dietética en Iberoamérica: Tecnología Sr salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos.* Ed. Varela. 311-338.
- Grønbaek, H., Vogel, I., Østerby, R., Lancranjan, I., Flyvbjerg, A., Ørskov, H. 1998. Effect of octreotide, captopril or insulin on renal changes and UAE in long-term experimental diabetes. *Kidney Int.* 53:173-180.
- Guyton, H. 2001. *Tratado de fisiología médica.* Editorial Mc. Graw-Hill Interamericana. Décima edición.
- Guzmán, M. H.; Jacinto, H. C., Castellanos, Z. J. 1995. Manual de metodologías para evaluar calidad de grano de frijol. SAGAR, INIFAP, CIRCE. 75 p. (Tema Didáctico Núm. 2).
- Guzmán, M. H, Acosta, G. J., Paredes, L. O. 2000. Protein and mineral content of a novel collection of wild and weedy common bean (*Phaseolus vulgaris* L). *J Sci Food Agric.* 80:1874-1881.
- Guzmán, N., Madrigal, B.E. 2003. Revisión de las características clínicas, metabólicas y genéticas de la diabetes mellitus. *Bioquímica.* 28: 14-23
- Hans, H., Parving, O. P., Peter, G. 2003. Intervención sobre múltiples factores de riesgo de diabetes tipo 2: el triunfo del Steno-2. Volumen 48. Número especial.
- Hosfield, G.L., 1991. Genetic control of production and food quality factors in dry bean. *Food Tech.* 45:98-103.

- Hosfield, G.L., Uebersax, M.A., 1980. Variability in physiochemical properties and nutritional components of tropical and domestic dry bean germplasm. *J Am Soc Hort Sci.* 105:246.
- Iniestra, J.J., Ibarra, F.J., Gallegos, J.A., Rocha, N.E., González, R. F. 2005. Factores antinutricios y actividad antioxidante en variedades mejoradas de frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*). *Agrociencias.* 39:603-610.
- INIFAP. 1995. Manual de métodos para determinar características de calidad en el frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*). Campo experimental Bajío. Celaya, Gto. México. Tema didáctico. 2:11-20.
- Islam, F., Rengifo, J., Redden, R.J., Basford, K.E., Beebe, S.E. 2003. Association between seed coat polyphenolics (tannins) and disease resistance in common bean. *Plant Foods Hum Nutr.* 58:285-297.
- Ismail, A., Marjan, Z. M., Foong, C. W. 2004. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chem.* 87:581–586.
- Jacinto, H.C., Campos, A. 1993. Efecto de la cocción sobre algunas características nutricionales del frijol. *Agronomía mesoamericana* 4: 42-47.
- Jacinto, H.C., Acosta, J.A. y Ortega A.J., 1993b. Caracterización del grano de variedades mejoradas de frijol en México. *Agric Tec Mex.* 19: 167-179.
- Jara, A. 2001. *Endocrinología.* Editorial Medica Panamericana. Primera edición.
- Jiménez, A., 2009. Regulación de biomarcadores de inflamación y daño renal en ratas diabéticas por el consumo de frijol procesado industrialmente. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
- Kusirisin, W., Srichairatanakool, S., Lerttrakarnnon. 2009. Antioxidative activity, polyphenolic content and anti-glycation effect of some Thai medicinal plants traditionally used in diabetic patients. *Med Chem.* 5:139-47.
- Kuyvenhoven, J.P., Meinders, A.E. 1999. Oxidative stress and diabetes mellitus. Pathogenesis of long-term complications. *Eur J Intern Med.* 10:9-19

- Kuzuya, T., Nakagawa, S., Satoh, J., Kanazawa, Y., Iwamoto Y. 2002. Committee of the Japan Diabetes Society on the diagnostic criteria of diabetes mellitus 1. *Diabetes Res Clin Pract.* 55:65-85
- Lange, A. D., Labuschagne, M. 2000. Multivariate assessment of canning quality, chemical characteristics and yield of small white canning beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in South Africa. *J Sci Food Agric.* 81:30-35.
- Leslie, R.D. 1993. Metabolic changes in diabetes. 7 (Pt 2):205-8.
- Liu, K. 1995. Cellular, biological, and physicochemical basis for the hard to-cook defect in legume seeds. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 35:263–298.
- Llamas, J., 2009. Revisado el día 2 de julio de 2009 en la página web: <http://www.antad.org.mx/articulos/enlatados.pdf>
- Lomas, C. 2008. El consumo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y su relación con citocinas proinflamatorias involucradas en el daño renal y aterosclerosis en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagen. *J Biol Chem.* 193: 265-275
- Lu, W., Chang, K.C. 1996. Correlations between chemical compositions and canning quality attributes of navy bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Cereal Chem.* 73:785-787.
- Mahía, J., Bernal, A., Puerto, A. 2007. Transtornos del comportamiento regulatorio: polidipsia primaria, polidipsia secundaria y su tratamiento. *Int J Clin Health Psychol.* 7:509-525.
- Manzoor, A., Agrewala, J. 2008. Polyphenols and Health: Dietary polyphenols on modulation of immune system. Ed. Naville-Vasallo. Pp. 245-272.
- Martin, B.C., Warram, J.H, Krolewski, A.S., Bergman, R.N. 1992. Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25 year follow up study. *Lancett.* 17:925-9.

- Mediavilla-Bravo, J.J. 2002. La diabetes mellitus tipo 2. *Med Integral*. 39:25-35.
- Mendoza M. 2009. El efecto protector del frijol Negro 8025 sobre el daño pancreático y renal generado durante el desarrollo y complicaciones de la diabetes. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
- Messina, M.L. 1999. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am J Clin Nutr*. 70:439S-450S.
- Muzquiz, M., Burbano, C., Ayet, G. 1999. The investigation of antinutritional factors in *Phaseolus vulgaris*. Environmental and varietal differences. *Biotechnol Agron Soc Environ*. 3:210-216.
- Nakamura, T., Fukui, M., Ebihara, I., Osada, S. 1993. mRNA expression of growth factors in glomeruli of diabetic rats. *Diabetes*. 42: 450-456.
- Navarro, J.F., Mora, C. 2006. The role of TNF-alpha in diabetic nephropathy: pathogenic and therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev*. 17:441-450.
- Nenadis, N., Lang-Fen, W., Tsimidou, M., Hong-Yu, Z. 2004. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using ABTS⁺ assay. *J Agric Food Chem*. 52:4669-4674.
- Oomah, B. D., Cardador, A., Loarca, G. 2005. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *J Sci Food Agric*. 85:935-942.
- Ortega, D.A., Vinay, J.C., López, E. 1996. Caracterización de la calidad tecnológica y nutricional, de variedades mejoradas y criollas de frijol negro tropical (*Phaseolus vulgaris* L.) *Agron mesoamer*. 7: 20-25.
- Osborn, T.C. 1988. Genetic control of bean seed protein. *CRC Critical Rev Plant Sc*. 7:93.
- Parving, H.H., Mauer, M., Ritz, E, and Brenner, H. 2007. *The Kidney*. 8.th edition, Saunders.

- Pak, N., Ayala, C., Vera, G., Pennacchiotti, I., Ayala, H. 1990. Fibra dietaria soluble e insoluble en cereales y leguminosas cultivados en Chile. Arch Lat Nutr. 40: 116-121.
- Pari, L., Venkateswaran, S. 2004. Protective role of *Phaseolus vulgaris* on changes in the fatty acid composition in experimental diabetes. J Med Food. 7:204–209.
- Pérez, P., Esquivel, G., Rosales, R., Acosta, J.A. 2002. Caracterización física, culinaria y nutricional de frijol del altiplano subhúmedo de México. Arch Latinoam Nutr. 52:172-180.
- Prior, R., Wu, X., Schaich, K. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. J Agric Food Chem. 53: 4290-4302.
- Ranilla, G., Genovese, M.I., Lajolo, F. M. 2009. Effect of different cooking conditions on phenolic compounds and antioxidant capacity of some selected Brazilian bean (*Phaseolus vulgaris* L). J Agric Food Chem. 57(13):5734-5742.
- Ramaswamy, M. 2006. Food processing. Principles and applications. Editorial Taylor and Francis Group. P 91-112.
- Reyes, C., Paredes, O. 1993. Hard to cook phenomenon in common beans a review. Crit Rev Food Sci Nutr. 33:227–286.
- Rocha, N. E., Herzog, A., González, R. F., Ibarra, F. J., Zambrano, G., Gallegos, J. A. 2007. Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds in three different colour groups of common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*). Food Chem. 103: 521–527.
- Rocha, N. E., González, R. F., Ibarra, F. J., Gallegos, J. A. 2007. Effect of pressure cooking on the antioxidant activity of extracts from three common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. Food Chem. 100: 31–35
- Rodríguez L., García Salazar J., Rebollar S., Cruz, A. 2008. Preferencias del consumo de frijol en México. Memorias: 1er Congreso Internacional y feria del frijol 2008.

- Romani, A., Vignolini, P., Galardi, C., Mulinacci, N., Benedettelli, S., Heimler, D. 2004. Germplasm characterization of Zolfino landraces (*Phaseolus vulgaris* L.) by flavonoid content. *J Agric Food Chem.* 52: 3838-3842.
- Ronald, M., Krauss, M. 2004. Dlipids and lipoproteins in patients with type 2 diabetes. *Diabetes care.* 27:1496–1504.
- SAGARPA 2008. Revisado el día 11 de agosto de 2009 en la página web: <http://www.sagarpa.gob.mx>
- Salinas, Y., Rojas, L., Sosa, E., Pérez, P. 2005. Anthocyanin composition in black bean varieties grown in Mexico. *Agrociencia.* 39:385-394.
- Sassy, P. C., Heudes, D., Mandet, C., Odile, M. 2000. Early glomerular macrophage recruitment in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes.* 49:466-475.
- Schor, N. 2005. Fisiopatología da insuficiencia renal aguda: aspectos celulares e moleculares. *MEDICINA (Buenos Aires).* 65 (Supl. II): 26-28
- Semenkovich, C.F. Disorders of lipid metabolism. In: Goldman L, Ausiello D, eds. *Cecil Medicine.* 23rd ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2007:chap 217.
- Siddhuraju, P. 2006. The antioxidant activity and free radical scavenging capacity of phenolics of raw and dry heated moth bean (*Vigna aconitifolia*) (Jacq.) Marechal seed extracts. *Food Chem.* 99: 149–157.
- Singlenton V., Orthofer R., Lamuela, R. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by jeans of Foling- Ciocalteu reagent. *Method Enzymol.* 299: 152-178.
- Tapia, B., López, S., Estrada, B. 1985. Evaluación de un método para reducir el tiempo de cocción en frijol común. *Memorias de la XXXI Reunión Anual del PCCMCA, San Pedro Sula, Honduras.* p. 67.
- Todd, J. A., Walker, N., Cooper, J., Smyth, D. J., Downes, K. 2007. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nature Genet.* 39: 857-864.

- Tormo, M.A., Gil, I., Romero, A., Campillo, J.E. 2004. Hypoglycemic and anorexigenic activities of an alpha-amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) in Wistar rats. *Br J Nutr.* 92:785–790.
- Valdés, T., Gomariz, E. 1995. *Mujeres Latinoamericanas en Cifras* (México). Editorial Instituto de la Mujer, Ministerio de Asuntos Sociales España, FLACSO. Primera edición.
- Varma, M. N., Kannan, A. 2006. CFD studies on natural convective heating of canned food in conical and cylindrical containers. *J Food Eng.* 77:1024-1036.
- Venkateswaran, S., Pari, L. 2002. Antioxidant effect of *Phaseolus vulgaris* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Clin Nutr.* 11: 206–209.
- Wassimi, N. N., Hosfield, G. L., Uebersax, M. A. 1990. Inheritance of physico-chemical seed characters related to culinary quality in dry bean. *J Am Soc Hort Sci.* 115:492-499.
- Williams, M.D., Nadler, J.L. 2007. Inflammatory mechanisms of diabetic complications. *Curr Diab Rep* 7: 242–248.
- Winkel, B. 2001. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiol.* 126: 485-493.
- Witcombe, J.R., Erskine, W. 1984. Genetic resources and their exploitation chickpeas, fababeans and lentils. *Series advances in Biotech.* The Hague Netherlands p. 82-86.
- Wu, X., James, R., Anderson, A. 2005. Mineral contents in seed coat and canning quality of selected cultivars of dark red kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Food Process.* 29: 63-74
- Xiong, Y.L. and Blanshard, S.P. 1994. Myofibrillar protein gelation: viscoelastic changes related to heating procedures. *J Food Sci.* 59:734-738.

- Xu, B., Chang, K. 2008. Total phenolic content and antioxidant properties of eclipse black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by processing methods. *J Food Sci.* 73:H19-27.
- Xu, B., Chang, K. C. 2009. Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. *J Agric Food Chem.* 57:4754–4764
- Zechman, L. G., Pflug, I. J. 1989. Location of the Slowest Heating Zone for Natural-Convection-Heating Fluids in Metal Containers. *J Food Sci.* 54: 205-209, 226.