



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**NUTRIMENTOS Y COMPUESTOS FUNCIONALES DE VARIEDADES
DE FRIJOL DEL CENTRO DE MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

LUZALLIE JASSO MATA



CDMX

AÑO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: LEAL LARA HERMILO
VOCAL: Profesor: AGUILAR OSORIO JOSÉ GUILLERMO DE JESÚS
SECRETARIO: Profesor: GÁLVEZ MARISCAL MARÍA AMANDA
1er. SUPLENTE: Profesor: GONZÁLEZ HERNÁNDEZ ILIANA ELVIRA
2° SUPLENTE: Profesor: MORÁN RAMOS SOFÍA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:
LABORATORIO 312, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA,
CONJUNTO E DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:
MARÍA AMANDA GÁLVEZ MARISCAL

SUPERVISOR TÉCNICO :
CINDY ADRIANA ESTRADA HERNÁNDEZ

SUSTENTANTE:
LUZALLIE JASSO MATA

CONTENIDO

1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN	8
3. MARCO TEÓRICO	
3.1 Leguminosas	11
3.1.1 El frijol	13
3.1.1.1 Clasificación botánica del frijol	14
3.1.1.2 Estructura y morfología del frijol	14
3.1.1.3 Panorama sobre la producción y consumo de frijol en el mundo	16
3.1.1.4 Producción de frijol en México	17
3.1.1.5 Composición química del frijol	18
3.2 Almidón en el frijol	20
3.2.1 Fibra dietética del frijol	22
3.3 Actividad antioxidante en el frijol	22
3.3.1 Compuestos fenólicos en frijoles	23
3.4 Factores tóxicos y antinutricionales en el frijol	25
4. ANTECEDENTES	27
5. JUSTIFICACIÓN	29
6. HIPÓTESIS	30
7. OBJETIVO GENERAL	30
7.1 Objetivos particulares	30
8. MUESTRAS	31

9.METODOLOGÍA	33
9.1 Diagrama general de la investigación	33
9.1.1 Cocción de los frijoles	33
9.1.2 Deshidratación	34
9.1.3 Molienda	34
9.1.4 Análisis Químico Proximal	34
9.1.5 Almidón total	35
9.1.6 Almidón resistente	35
9.1.7 Amilosa/Amilopectina	37
9.1.8 Identificación de pectina	38
9.1.9 Actividad antioxidante	39
9.1.9.1 Fenoles totales	39
9.1.9.2 Flavonoides totales	40
9.1.10 Perfil de aminoácidos	40
9.1.11 Inhibidores de tripsina	40
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
10.1 Análisis Químico Proximal	41
10.2 Almidón total	44
10.3 Almidón resistente	46
10.4 Amilosa/Amilopectina	49
10.5 Identificación de pectina	51
10.6 Actividad Antioxidante	53
10.6.1 Fenoles totales	53
10.6.2 Flavonoides totales	56
10.7 Inhibidores de tripsina	59
11. CONCLUSIONES	61
12. PERSPECTIVAS	62
13.BIBLIOGRAFÍA	63

AGRADECIMIENTO

Al DGAPA-PAPIIT por su apoyo en la realización de este proyecto.

1. RESUMEN

El frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) es un alimento tradicional distintivo innegable de identidad gastronómica para México. De consumirse 18.45 kg/ per cápita en los años sesenta, ahora el consumo es de 8.4 kg/per cápita, disminuyendo más del 45% de su consumo. Los productos procesados, altos en sodio, azúcares y grasas, cada vez más accesibles y disponibles en la sociedad urbana, han contribuido a un decrecimiento marcado en el consumo de frijol y otros alimentos de la dieta tradicional. Aunado a eso, el aumento del consumo diario del huevo y carne se adoptó como una “buena alimentación”, siguiendo las dietas de países industrializados.

Una restitución del consumo de frijol, que contiene compuestos funcionales además de sus nutrimentos, puede ayudar a revertir la situación nutrimental de la población y, eventualmente, promover su producción nacional. Es importante fortalecer el consumo de alimentos de origen vegetal, puesto que económicamente y ambientalmente, tienen menores impactos que la producción ganadera y pecuaria, cuyos costos son más altos.

Uno de los institutos encargados de desarrollar variedades de vegetales mejoradas con mayores rendimientos y porcentajes de proteína, es el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Pecuarias (INIFAP). La Dra. Carmen Jacinto, investigadora del INIFAP está encargada de generar y registrar nuevas variedades de *Phaseolus* que tengan propiedades agronómicas interesantes para los productores. Este proyecto consiste en evaluar siete variedades de frijoles, seis de ellas desarrolladas en el INIFAP y liberadas para su explotación a nivel comercial, y la variedad Negro Bola de la Central de Abastos. Con el fin de conocer a detalle la composición química y las fracciones de los carbohidratos de las nuevas variedades, se montaron técnicas enzimáticas para la determinación de diversas fracciones: almidón resistente, pectina, amilosa, amilopectina y almidón total. Además, resulta interesante conocer el potencial antioxidante de estos granos coloridos, que, aunado a un análisis de su contenido de aminoácidos, permite complementar la información útil para el INIFAP.

Los resultados de almidón total y almidón resistente obtenidos para las nuevas variedades, son de 53.88% a 60.40%, y 3.89% a 7.22%, respectivamente. La cantidad de amilosa se encuentra en el intervalo de 10.69% a 36.88%, variando entre las muestras crudas y las cocidas, en las cuales la segunda presenta una mayor cantidad de amilosa. La cantidad de pectina identificada enzimáticamente en estas variedades es baja, se encuentra en un intervalo de 2.18×10^{-7} a 2.17×10^{-6} tanto para muestras cocidas como muestras crudas.

Para la determinación de actividad antioxidantes, las variedades de frijol negro presentaron los valores más altos en fenoles totales, obteniendo en promedio 2.90 mg de ácido gálico/g de muestra y 5.13 mg de ácido tánico/ g de muestra. Para flavonoides totales, los valores promedio de las mismas variedades son de 2.21 mg de quercetina/g de muestra y 1.76 mg de quercetina/g de muestra, para variedades crudas y sometidas a tratamiento térmico.

2. INTRODUCCIÓN.

En México, el panorama alimentario y nutrimental está pasando por una llamada transición epidemiológica, que se caracteriza por la persistencia problemas de mal nutrición (obesidad y sobrepeso) y salud, aunados a los sectores socioeconómicos. La población mexicana adoptó desde los años setenta, el consumo de alimentos procesados o de origen animal en mayor proporción y por consecuencia, el consumo de alimentos de origen vegetal disminuyó, al contrario de lo que indican las recomendaciones del sector salud (“El Plato del Bien Comer”) (Bourges, 2001). Uno de los alimentos cuyo consumo y producción ha disminuido marcadamente es el frijol, perdiéndose las ventajas de una fuente importante de proteína vegetal. En la década de 1960 el consumo de frijol era de 18.45 kg por persona/año, fue en el año de 1980 donde comenzó a declinar su consumo, pasando a 16 kg por persona/año y actualmente su consumo es de 8.4 kg por persona/año (El Economista, 2014). A pesar de que el consumo de frijol se asocia a la prevención de algunas de estas enfermedades (Jenkins, 2007; Chung et al., 2008), se ha observado un cambio progresivo hacia dietas del estilo “nórdico” u “occidental” y la disponibilidad de alimentos procesados altos en azúcares y grasas, aunado a otros factores como el sedentarismo y la falta de tiempo, han llevado a la aparición y/o desarrollo de problemas de salud pública como: sobrepeso, obesidad, diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares así como el desarrollo de distintos tipos de cáncer. Estos cambios de dieta y de hábitos han causado la disminución de alimentos de la dieta tradicional, especialmente el frijol (Gálvez & Bourges, 2012; Van’t Veer et al., 2000).

El frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) es una especie que se cosecha anualmente, originaria de Mesoamérica y Sudamérica. Junto con el maíz y el chile, el frijol forma parte de la conocida “Trilogía de alimentos de la época prehispánica”. México como parte de Mesoamérica, es considerado uno de sus centros de origen y domesticación más importantes teniendo 50 de las 150 variedades que se encuentran en el continente americano. En México se cultivan principalmente cuatro especies de las cuales el que más destaca en el comercio es *Phaseolus vulgaris L.* (CONABIO, 2011).

Nutritionalmente, el frijol es reconocido como una buena fuente de proteínas, aunque deficiente en aminoácidos azufrados. Esta deficiencia se compensa al combinarlo con cereales a los que supera en su contenido proteínico, pero que le suplementan los aminoácidos deficientes y viceversa. De esta manera la complementación de sus aminoácidos logra alcanzar una calificación química excelente (Figura 1).

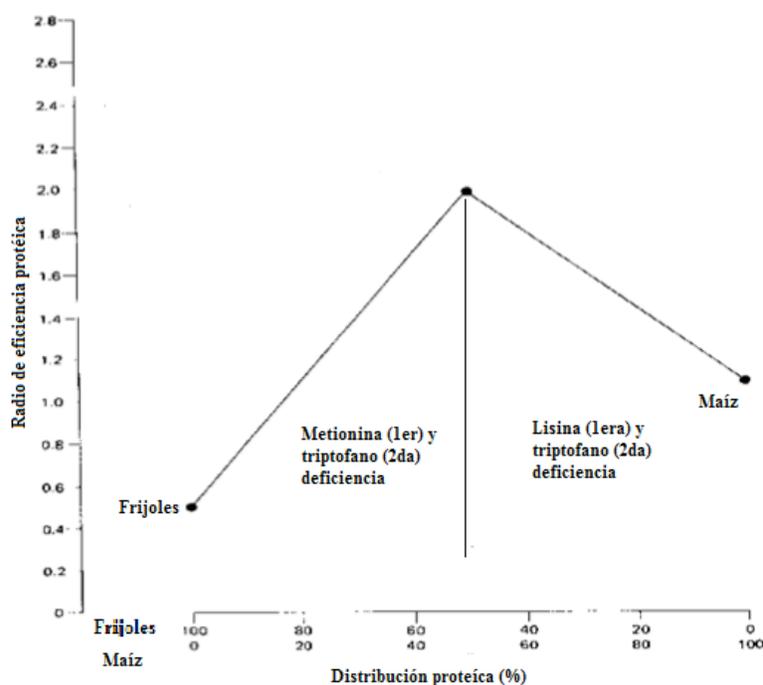


Figura 1. Modificado y traducido de Eficiencia de proteína vs Distribución de proteína (%) entre frijoles y maíz (United Nations University, <http://unu.edu>)

Además, los frijoles son reconocidos como fuente de carbohidratos, fibra y vitaminas como riboflavina, niacina, piridoxina, ácido fólico, y minerales como: calcio, hierro, zinc, fósforo y potasio (Andarwulan et al., 2003; Costa et al., 2006). Adicionalmente, el frijol contiene una gran cantidad de fitoquímicos, compuestos antioxidantes y una amplia gama de flavonoides como: antocianinas, proantocianinas, flavonoles, e isoflavonas (Beninger and Hosfield, 2003; Aparicio-Fernandez et al., 2005; Granito et al., 2008; Lin et al., 2008). Contienen compuestos tóxicos como lectinas y factores antinutricionales como los inhibidores de tripsina que, con un adecuado tratamiento térmico, se inactivan y se logra el aprovechamiento integral de estos granos (Kigel, 1999).

Este proyecto de tesis busca estudiar las fracciones de carbohidratos, fibra dietética, actividad antioxidante e inhibidores de tripsina de nuevas variedades de frijol desarrolladas en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) con el fin de complementar la información agronómica con datos referentes a su composición y valor nutrimental, que son útiles para reforzar la información requerida para que las autoridades puedan emitir recomendaciones, y eventualmente aumentar la producción y el consumo de esta leguminosa.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Leguminosas

Las leguminosas son plantas angiospermas. Una de las características distintivas es tener vainas, las cuales alojan las semillas, abriéndose longitudinalmente en dos valvas a lo largo de dos suturas. El término se refiere a los cultivos de la familia de las fabáceas o leguminosas cosechadas exclusivamente para grano seco (FAO, 2016). Son agrupadas como miembros de la familia *Leguminosae* (Aparicio-Fernández y Espinosa, 2015), donde la subfamilia *Papilionoidae* contiene a las especies más importantes para consumo: soya (*Glycine max*), chícharos (*Pisum sativum*), frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*), cacahuete (*Arachis hypogaea*), y lentejas (*Lens culinaris*) (Aparicio-Fernández y Espinosa, 2015). Las leguminosas tienen la capacidad de asociarse con bacterias del género *Rhizobium*, llamadas fijadoras de nitrógeno, que forman nódulos en las raíces de las plantas. Esta simbiosis proporciona a la bacteria los hidratos de carbono que le serían más difíciles de obtener independientemente, y en contraparte, la leguminosa utiliza el nitrógeno atmosférico para convertirlo en moléculas metabolizables (nitrato NO_3^- , ion amonio NH_4^+) que puedan ser utilizadas para su desarrollo (López, 1993). De esta manera, las leguminosas pueden sintetizar aminoácidos y acumular cantidades elevadas de proteína sin necesidad de usar fertilizantes nitrogenados (Bourges, 1987).

Dentro del grupo de las leguminosas comestibles, el frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) es uno de los más importantes por su distribución en los cinco continentes siendo un elemento indispensable en la dieta, principalmente en Centro y Sudamérica.

Las leguminosas son consideradas en muchos países en desarrollo como clave para la seguridad nacional por ser una de las fuentes principales para la obtención de proteína y energía, mientras que en países desarrollados se ha observado una disminución de su consumo, por ser considerado alimento de bajo nivel socioeconómico (Olmedilla et al., 2010).

- **Composición química de las leguminosas**

Las leguminosas tienen un alto contenido en proteína y en fibra. También son ricas en minerales, vitaminas y antioxidantes (Tabla 1).

Frg

	Soya	Garbanzo	Cacahuete	Chícharo	Haba	Lenteja	Frijol
Humedad %	8.54	11.53	6.5	11.27	10.98	10.4	11.02
Proteína %	36.49	10.3	25.8	24.55	26.12	25.8	21.60
Grasa %	19.94	6.04	49.54	1.16	1.53	1.06	1.42
Cenizas %	4.87	2.48	2.33	2.65	3.08	2.67	3.60
Carbohidratos %	30.16	60.65	16.13	60.37	58.29	60.08	62.36
Fibra total %	9.3	17.4	8.5	25.5	25	30.50	15.2
Ca (mg/100g)	277	105	92	55	103	56	123
Fe (mg/100g)	15.7	6.24	4.58	4.43	70	7.54	5.02
Mg (mg/100g)	280	115	168	115	192	122	171
K (mg/100g)	1797	875	705	981	1062	955	1483
Zn (mg/100g)	4.89	3.43	3.27	3.01	3.14	4.78	3.65
Se(mg/100g)	17.8	8.2	7.2	1.6	8.2	8.3	3.2

B Tabla 1. Composición química proximal de algunas leguminosas (Aparicio-Fernández, 2015)

En cuanto a los carbohidratos que presenta, desde 1993 se reporta que, aunque la mayoría es almidón, tiene una asimilación más lenta a comparación de otros

cereales o tubérculos, produciendo una menor carga de glucosa en sangre que se refleja en un índice glucémico de bajo (Phillips RD, 1993) presentando valores de 30-38 comprándolo con glucosa (100) y con el estándar de pan blanco (56), siendo considerado como un alimento saludable (Foster-Powell,2002).

En la Tabla 2, se presenta los datos generados en el grupo de trabajo, respecto a la complementación proteica lograda entre el frijol y el maíz.

Tabla 2. Aminograma de maíz, concentrado de proteína de frijol, combinación frijol y maíz, frijol crudo entero

	FAO	Maíz*	Frijol crudo entero**	Aislado de proteína de frijol*	Frijol+ Maíz *
Asp		7.65	12.21	15.18	10.84
Glu		25.43	15.25	16.45	18.77
Ser		6.91	5.44	8.63	6.97
His	1.9	2.3	2.78	2.99	2.43
Gly		3.5	3.9	4.76	3.78
Thr	3.4	4.08	4.21	5.91	4.52
Arg		4.22	6.19	7.03	5.1
Ala		10.6	4.19	5.38	6.83
Val	3.5	4.67	5.23	5.75	4.78
Met+Cys	2.5	2.81	2.07	1.5	2.87
Phe+Tyr	6.3	14.3	12.9	6.5	11.6
Met		2.8	1.4	0.8	1.8
Leu	6.3	19.2	7.99	10.44	13.04
Lys	5.2	1.98	6.87	7.81	4.72
Pro		11.53	4.24	4.99	7.38
Trp	0.74	0.76	1.19	1.56	1.03
Ile	2.8	4.0	5.0	5.06	4.3

*Márquez Mota,2016, **Salinas, 2014. En negritas y sombreados se marcan los aminoácidos indispensables y las recomendaciones emitidas por la FAO para preescolares.

El perfil de aminoácidos de las leguminosas, presenta un alto contenido de lisina y treonina, y un bajo contenido de aminoácidos azufrados (metionina, cisteína), por lo que al ser combinados con cereales, logran una complementación proteínica correcta para la dieta humana (Olmedilla et. al., 2010).

3.1.1 El frijol

El cultivo de frijol, representa una tradición productiva y de consumo milenario que ha permanecido a lo largo del tiempo. México posee la mayor diversidad del género *Phaseolus*, dentro de los cuales, el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), es el de

mayor importancia agronómica y económica, por la extensión de su cultivo que se pueden encontrar dentro de la República Mexicana. Le siguen en importancia otras variedades de frijol como el frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*), el frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) y el frijol lima (*Phaseolus lunatus*). El cultivo de estas variedades se ha visto limitado por los hábitos de consumo actuales en cada región (CONABIO, 2011).

3.1.1.1 Clasificación botánica del frijol

El frijol, pertenece a la familia de las leguminosas o fabáceas. El género *Phaseolus*, se clasifica dentro de la familia Leguminosae, subfamilia Papilionoidae, tribu Phaseolae y subtribu Phaseolinae (CONABIO, 2011), de cuales, las dos últimas fueron usadas para nombrar a la proteína principal del frijol: faseolina. Menciona Miranda (1987) que se pueden encontrar alrededor de 150 especies de frijol y que, en México, pudieran estar concentradas 50 de ellas (47 de estas especies ya se identificaron) por la confirmación de CONABIO en 2011.

3.1.1.2 Estructura y morfología del frijol *Phaseolus vulgaris* L.

Es una planta de vida corta, que se enreda en forma de espiral o forma de arbusto. Puede presentar hojas alternas (nacen una a una a lo largo del tallo), pecioladas (unidas al tallo por un rabo), compuestas con tres hojas (foliolos) ovaladas a rómbicas, con el ápice agudo. Presenta flores color de rosa, lilas y violetas.

Las semillas se encuentran en una vaina linear, a veces cubierta de pelillos (Figura 1) (Vibrans, 2009)



Figura 2. Planta de *Phaseolus vulgaris* L. Fuente: CalFlora

Las semillas de las leguminosas pueden tener variadas formas (lenticular, ovoide, redondeada, acorazonada, reniforme, etc.) con una cierta protuberancia que coincide con la posición de la futura radícula.

La estructura que compone al frijol es la siguiente:

Testa o cubierta- Forma una gruesa capa alrededor de la semilla excepto por una cicatriz denominada hilo.

Hilo- Es el punto de sujeción a la pared del ovario a través del funículo.

Micrópilo- Es utilizado para la absorción de humedad y se encuentra conectado con el interior de la semilla.

Cotiledones- Hojas embrionarias que contienen la reserva de almidón y proteína para la plántula unidos a un eje central.

La parte superior del eje consta del **epicotilo**, que tiene en la punta la **plúmula**, también llamada yema embrionaria. La parte inferior consta de dos estructuras: el **hipocotíleo** y la **radícula** que también es la raíz embrionaria. (Figura 2)

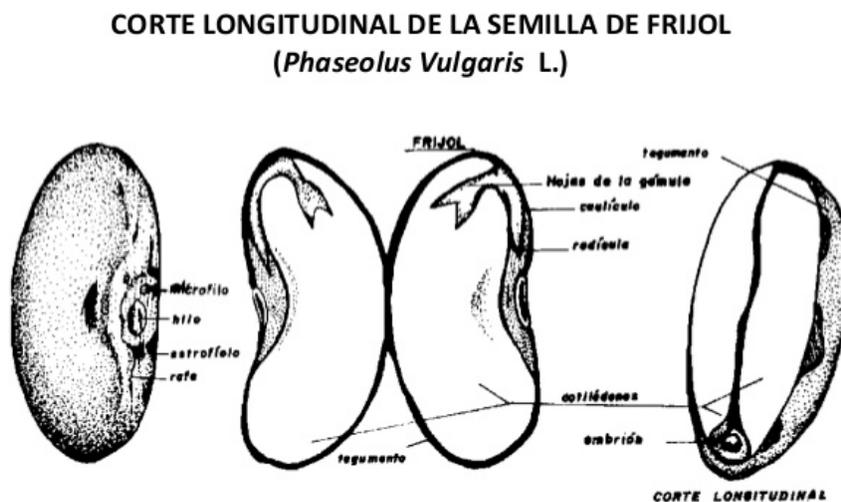


Figura 3. Estructura de la semilla de frijol *Phaseolus vulgaris* L. Fuente:FAO

La temperatura ideal para el cultivo de frijol oscila entre 10 y 27°C, lo que permite agruparla en las denominadas especies termófilas dado a que no soporta bajas temperaturas. La planta es susceptible a cambios extremos en su ambiente por lo que el suelo ideal debe ser aquel de textura ligera, bien drenado y que la temporada de lluvias esté en su ciclo final (CONABIO, 2011). Su siembra y

cosecha se lleva a cabo en los dos ciclos del año agrícola (cultivo cíclico), sin embargo, se ha observado que los mejores meses de cosecha son febrero y noviembre (Panorama Agroalimentario, 2016).

3.1.1.3 Panorama sobre la producción y consumo de frijol en el mundo.

Entre los países productores de frijol, el 63% de la cosecha mundial se concentra en: India, Myanmar, Brasil, Estados Unidos, México, China y Tanzania (Panorama Agroalimentario, 2016).

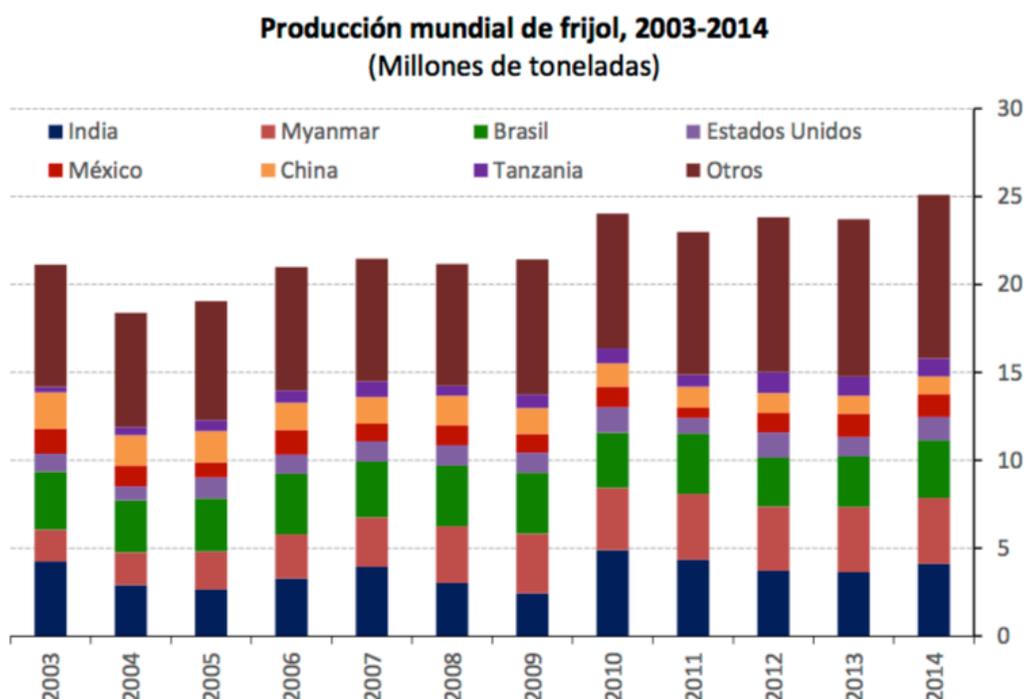


Figura 4. Producción mundial de frijol 2003-2014. Fuente: FAO

México ocupa el cuarto lugar, tomando en cuenta la superficie que ocupa después de otros cultivos como el maíz, el sorgo y pastos. En el año de 2014 la cosecha fue de 1.56 millones de hectáreas, de las cuales el 90% se cultivó en condiciones de temporal; sin embargo en 2015 la cosecha disminuyó únicamente 969.1 miles de toneladas.

Las importaciones del grano, que alcanzaron su nivel máximo en 2012, se redujeron significativamente durante los dos años siguientes y en 2015 se incrementaron 7.7% respecto a 2014, para ubicarse en 88,543 toneladas. Por su parte, las exportaciones se redujeron a una tasa del 43.9% anual, después de haber alcanzado su nivel máximo en la última década en 2014. Durante 2015, las

importaciones netas de frijol representaron el 5.0 por ciento de consumo aparente de frijol en el país (Panorama Agroalimentario, 2016).

El consumo mundial del frijol se estima que se encuentra en 17 millones de toneladas. Los países con un mayor consumo de esta leguminosa son (porcentaje del consumo global): India (24.7 %), Brasil (19%), Estados Unidos (5.5%), México (5.3 %) y Tanzania (3.3%) (Figura 4).

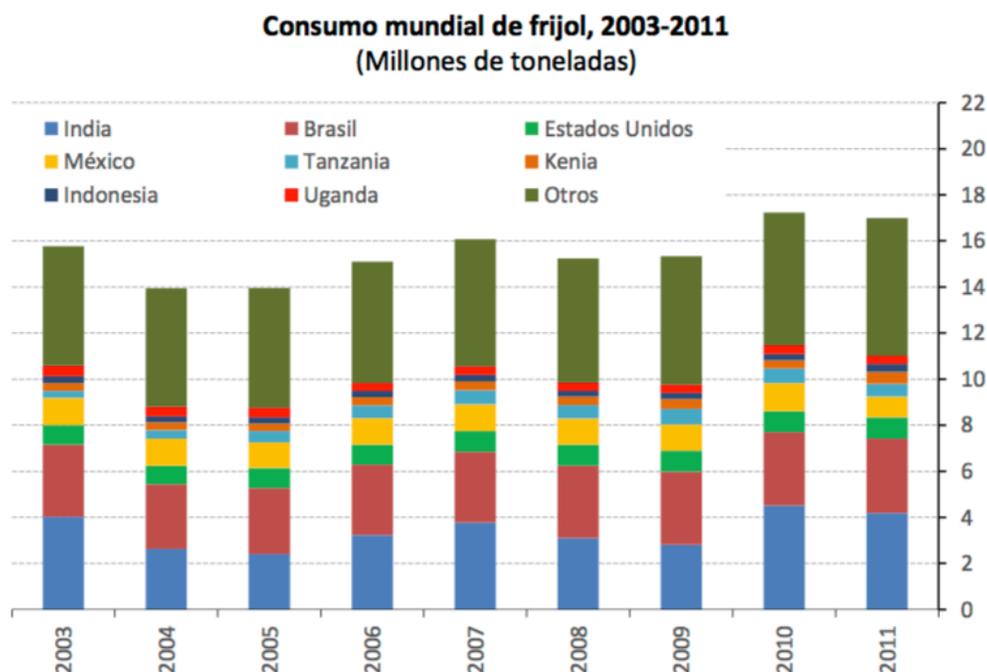


Figura 5. Consumo mundial de frijol 2003-2011 Fuente: FAO

3.1.1.4 Producción de frijol en México

Tanto el frijol como el maíz, son la base de la alimentación en México, siendo así de suma importancia socioeconómica, tanto por la extensión como por el consumo. Al tomar en cuenta la serie de pasos que involucra la producción de frijol, el costo aproximado es de \$15,000.00 pesos por hectárea (SAGARPA, 2011-2012).

En los últimos diez años en México, el área de siembra de frijol, como se observa en la Figura 5, presenta una tendencia a la baja (observado en el periodo 2002-2012). En ese tiempo, el promedio de área sembrada fue de 1.8 millones de hectáreas en el país, con una producción de aproximadamente 27,000 millones de pesos. Cabe mencionar que en el año 2005 y 2011 el área de cosecha se vio

reducida un 28% y un 41.7% respectivamente, tomando en cuenta la relación del periodo 2002-2012 (Lara Miguel, 2015).

El frijol es producido en las 32 entidades del país, sin embargo, las que aportan el mayor volumen son Zacatecas, con el 35.9 % de la producción nacional; Durango, 11.6 %; Chihuahua, 9.5%; Sinaloa, 8.9% y Chiapas 5.5%.

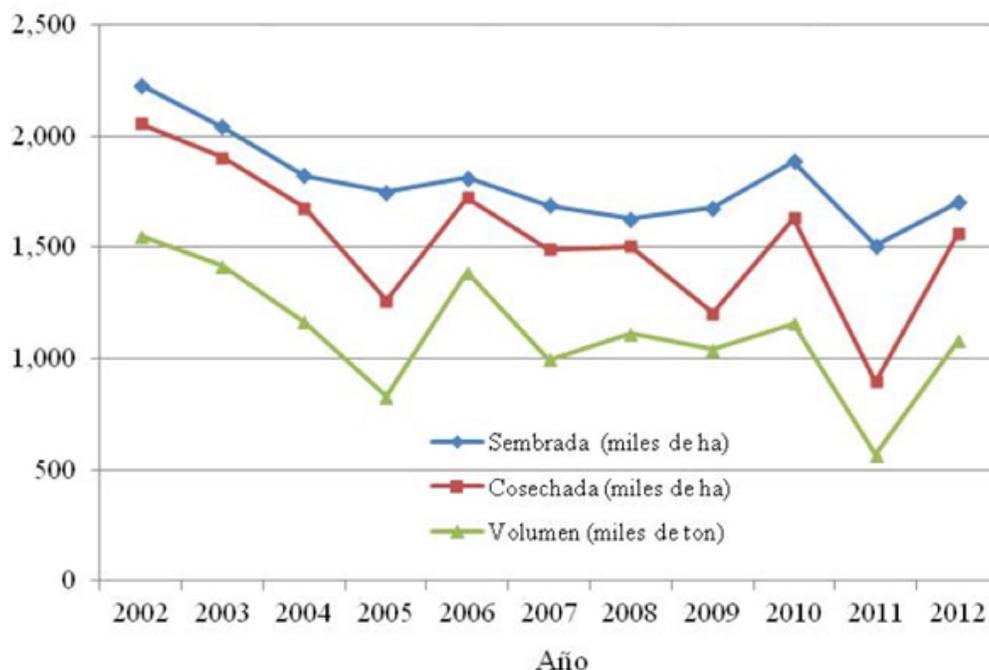


Figura 6. Superficie sembrada, cosechada y volumen de producción de frijol en México (2002-2012). SAGARPA 1980-2012.

3.1.1.5 Composición química del frijol

Presenta contenido de proteínas que va desde un 14% hasta el 33%, dependiendo de la variedad de frijol. En relación al aporte de carbohidratos, es de 52-76%, y una fracción correspondiente de lípidos que va del 14-19%. Es una fuente considerable de micronutrientes (0.14-0.15%) como calcio, hierro, fósforo, magnesio y zinc, y de las vitaminas tiamina (0.9 mg/100g), niacina (1.8 mg/100g) y ácido fólico (0.08 mg/100g) (Ulloa et al. 2007, Mary, 2014, Food News Latam, 2016).

Lípidos

El frijol posee una baja cantidad de lípidos. Su composición mayoritaria corresponde a los ácidos grasos poliinsaturados (omega-3 y omega-6), después los ácidos grasos saturados y por último los monoinsaturados (omega-9) (Delgado-Salinas, 2014).

Proteínas

Las proteínas que se encuentran en la semilla del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) son denominadas argelinas, lectinas y faseolina, cuyo contenido va de 17-25%, de acuerdo con Osborn y Brown, 1988. Estas proteínas son ricas en aminoácidos indispensables, principalmente lisina e histidina, con las deficiencias antes mencionadas de metionina y cisteína.

La mayoría de las proteínas presentes en el frijol son del tipo globulinas (50-75% del total de proteínas). Entre ellas, las faseolinas se han encontrado ser de buen valor para la nutrición humana debido a que son las más representativas de la semilla, así como las más abundantes conformando el 40-60% de la proteína total (Montoya et al., 2008).

Vitaminas

El frijol provee una amplia variedad de vitaminas como: vitamina K, vitamina E, colina, tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), niacina (vitamina B3), ácido pantoténico (vitamina B5), ácido fólico (vitamina B9) y pequeñas cantidades de ácido ascórbico (Siddiq y Sultan, 2011; Lorán- Juárez, 2013)

Minerales

Son alimentos ricos en potasio, fósforo, magnesio, calcio, hierro, sodio, zinc, selenio, manganeso y cobre (Espinosa-García et al., 2016). La biodisponibilidad de dos de sus micronutrientes es baja debido a la presencia de fitatos, compuestos que inhiben la absorción de hierro y zinc. Además, las variedades de frijol negro, presentan un alto contenido en polifenoles que también inhiben la absorción de hierro. La adición de enzimas (fitasas) microbianas parece ser la forma más eficiente para remover fitatos y polifenoles durante el proceso (Sandberg A., 2002) .

Carbohidratos

Estos constituyen la fracción mayoritaria del grano del frijol. El almidón y fibra dietética son los mayores constituyentes, con una pequeña cantidad de mono, di y oligosacáridos. Una de las características de interés reciente es el contenido de carbohidratos no digeribles, que en el frijol están constituidos principalmente por almidón resistente y fibra dietética, de esta última se encuentra la celulosa, hemicelulosa y ligninas, o en algunos casos la pectina. La fibra dietética es dividida

en soluble (FDS) e insoluble (FDI). La segunda, está constituida por lignina, celulosa y hemicelulosa, mientras que la FDS se compone primordialmente por sustancias pécticas, de acuerdo con Silva-Cristóbal y colaboradores (2010).

En cuanto a los azúcares fermentables (oligosacáridos), conformados principalmente por rafinosa, estaquiosa y verbascosa, han demostrado recientemente que lejos de ser indeseables por los problemas de flatulencia asociados, están relacionados con la prevención de enfermedades (JJ. Rackis, 1981). Además, el almidón resistente que poseen los frijoles puede tener el mismo efecto que la fibra soluble en cuanto a la disminución de la síntesis hepática del colesterol (Tungland & Meyer, 2002).

3.2 Almidón en el frijol

El almidón es uno de los carbohidratos que están presentes en mayor cantidad en el frijol con fracciones de amilosa y amilopectina. La amilosa (molécula lineal) tiene un peso molecular entre los 70,000-200,000 Da, con enlaces alfa D-1,4; mientras que la amilopectina consiste en cadenas con enlaces alfa1-4 y ramificaciones en alfa D-1,6 con un peso molecular de aproximadamente 2×10^7 Da (Dona et al., 2010; Hoover et al., 2010) (Figura 7). Con base en la susceptibilidad de la molécula para ser degradada a glucosa y ser absorbida en el tracto gastrointestinal, se puede clasificar como: almidón de lenta digestión (SDS), almidón de rápida digestión (RDS) y el almidón resistente (RS) (Englyst et al., 1992; Zhang et al., 2006). La ingestión de RDS, provoca un aumento de glucosa en sangre, mientras que el SDS hace digestión completamente en el intestino delgado, pero con una velocidad menor que RDS (Hoover & Ratnayake, 2002; Hoover et al., 2010).

El RS es aquel que resiste la hidrólisis de las enzimas amilopécticas (amilasa y amiloglucosidasa) del ser humano (Thompson, 2000). Esta resistencia a la digestión se da en el intestino delgado; sin embargo, es fermentado en el intestino grueso con ayuda de la microbiota presente, produciendo metabolitos como ácidos grasos de cadena corta (ácido acético, propiónico y butírico) (Henningson et al., 2001; Nugent, 2005).

Dependiendo de la naturaleza del almidón resistente puede ser clasificado como:

- *Almidón Resistente Tipo I*

Es aquel almidón que se encuentra en los granos y semillas, el cual se encuentra protegido por una pared celular fibrosa que no permite que las enzimas digestivas puedan atacarlo.

- *Almidón Resistente Tipo II*

El almidón se encuentra en gránulos poco estables que son parcialmente resistentes a hidrólisis.

- *Almidón Resistente Tipo III*

Es el almidón (amilosa) que se ha retrogradado en una estructura más cristalina.

- *Almidón Resistente Tipo IV*

Almidón que ha sido modificado usando agentes químicos (Badui,2012).

La digestibilidad del almidón presente en los frijoles es menor que el almidón en cereales y esto se debe a que presentan un alto contenido de amilosa, resultando en una alta cantidad de almidón resistente (Madhusudhan & Tharanathan, 1995; Tovar & Melito, 1996), así como por las interacciones que presenta con las proteínas de carácter electrostático que pueden reducir su digestibilidad por la formación de un gel más estable al momento de que se lleva a cabo la gelatinización del almidón (Bakar et al., 2002; Ovando-Martínez et al., 2011).

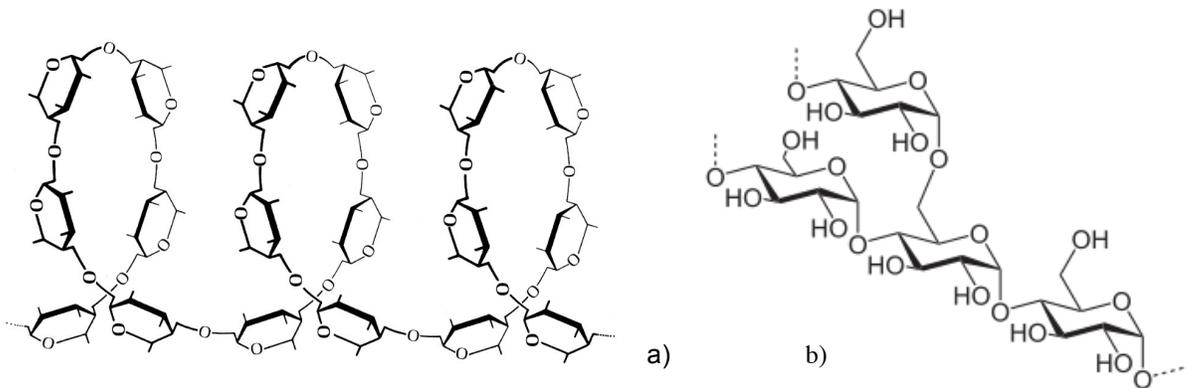


Figura 7. a) Amilosa forma helicoidal, b) Amilopectina. Fuente: French, D. (1969)

3.2.1 Fibra dietética en el frijol.

El frijol también presenta una considerable cantidad de fibra dietética, que consiste principalmente en hemicelulosas, pectinas, oligosacáridos y ligninas, las cuales resisten la digestión en el intestino delgado, pero en el intestino grueso son parcialmente fermentadas trayendo consigo efectos benéficos a la salud de acuerdo con Hughes & Swason, 1989 y con Costa et al., 2006. La fibra insoluble comprende compuestos como: celulosa, hemicelulosa y lignina que promueven los movimientos peristálticos mejorando la laxación; la fibra soluble consiste principalmente en oligosacáridos, glucanos y gomas de galactomananos, los cuales ayudan a una reducción en los niveles de colesterol y glucosa en sangre por su interacción con la microbiota intestinal (Tunghland & Meyer, 2002; Rodríguez et al., 2006).

3.3 Actividad antioxidante del frijol

El estrés oxidativo surge en sistemas biológicos después de una prolongada exposición a agentes oxidantes, o a una disminución de la capacidad antioxidante del sistema, o ambas; esto trae consigo una formación de radicales libres como las especies reactivas de oxígeno, que están relacionadas en la derivación de algunas enfermedades como el cáncer, con problemas cardiovasculares, envejecimiento prematuro y enfermedades cerebrales (Kohen et. al, 1996; Kohen et al, 2002). Un exceso de radicales libres, puede causar la inhibición de enzimas como la superóxido dismutasa, catalasas y peroxidasas, generando efectos letales en las células por la oxidación de lípidos, proteínas, DNA y enzimas, lo que provoca daño en los tejidos. Sin embargo, los compuestos antioxidantes tienen la capacidad de inhibir o interrumpir las reacciones que causan daños oxidativos a las biomoléculas. En los últimos años, los antioxidantes naturales provenientes de plantas han sido frecuentemente usados en diferentes campos de la industria farmacéutica como conservadores en alimentos y en medicina (Halliwell B., 1996). Generalmente la alta actividad antioxidante, está relacionada con un alto contenido de compuestos fenólicos. Las plantas contienen una gran variedad de derivados fenólicos

incluyendo fenoles simples, fenilpropanoides, derivados de ácido benzoico, flavonoides, taninos y ligninas (Shahidi & Nacsk, 2004).

3.3.1 Compuestos fenólicos en frijoles.

Los compuestos fenólicos presentes en frijoles incluyen una variedad de flavonoides como: antocianinas flavonoles, proantocianidinas, taninos, así como una gran cantidad de ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido tánico, etc.) cuyas estructuras primordiales aparecen en la figura 8 y 9.

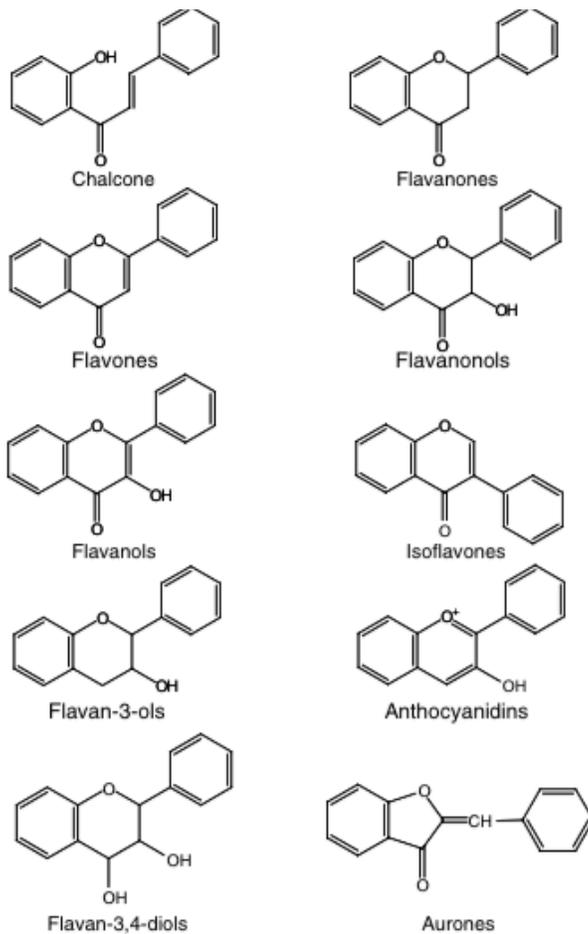


Figura 8. Moléculas de flavonoides principales. (Terahara et al., 1996).

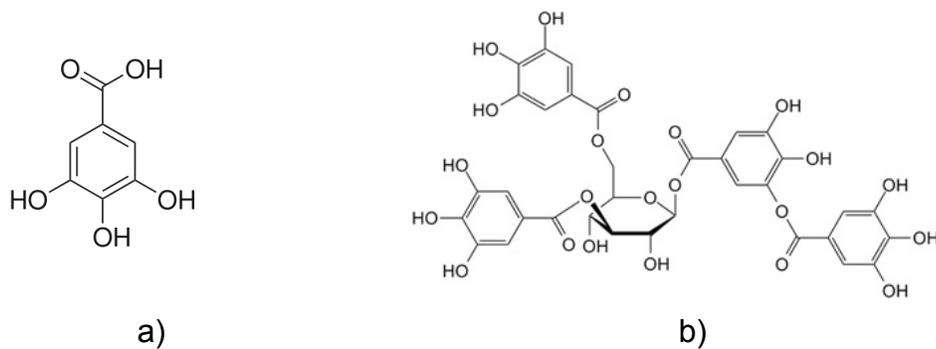


Figura 9. Estructuras del a) ácido gálico y b) ácido tánico

Las antocianinas pueden ser caracterizadas en las variedades de frijol negro (Romani et al., 2004) mientras que las proantocianidinas se encuentran en la mayoría de las variedades de frijol (Guzmán-Maldonado et al., 1998; De Mejía et al., 2003). La mayoría de estos compuestos fenólicos se encuentran en la testa, mientras que los cotiledones pueden contener trazas (De Mejía et al., 1999). La cantidad de compuestos fenólicos totales que se pueden encontrar se ve influenciada por factores genéticos y ambientales (Elizabeth et al., 2007) y son responsables del color de la testa añadiendo la variabilidad en la composición de proantocianidinas, glucósidos flavonoides y antocianinas (Feenstra, 1960). Estos compuestos fenólicos retrasan la formación del anión superóxido, así como la producción de enzimas como la proteína quinasa, xantina oxidasa, lipoxigenasa, cicloxigenasa, S-transferasa, glutatión y NADH oxidasa (Cos et al., 1998). Por otra parte, la capacidad que tienen los flavonoides de formar complejos con iones metálicos, juega un papel importante en la actividad antioxidante, debido a que se ha encontrado una estrecha relación en la cual entre más grupos hidroxilo presente en su núcleo el flavonoide, mejor será su actividad antioxidante (Cao et al., 1997). El flavonoide presente en el frijol es la quercetina (Figura 10) que se encuentra glicosiladas en la tercera posición y presenta una buena complejación con los iones metálicos (Gómez et al., 1998).

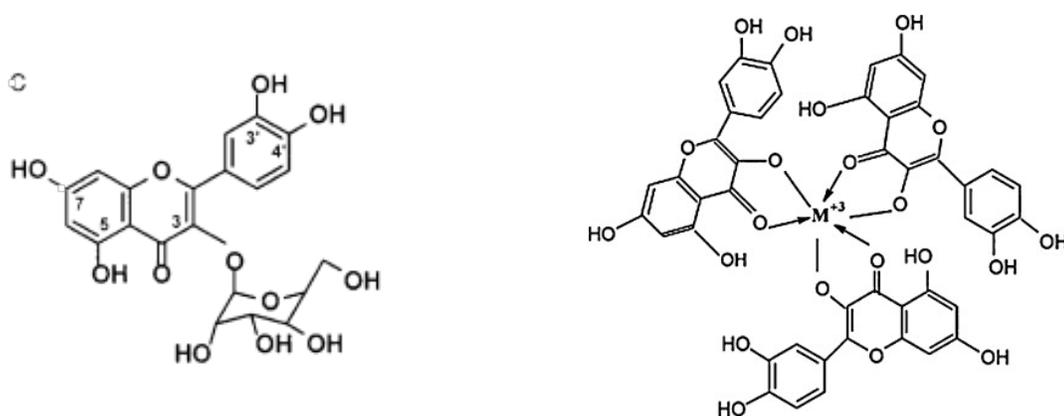


Figura 10. a) Quercetina-3-glucósido (Magreet et al., 2000) b) Quercetina y su acomplejación con metales (Jaffar E., 2010)

3.4 Factores tóxicos y antinutricionales en el frijol

Las leguminosas contienen una amplia variedad de compuestos tóxicos, que hacen limitante su uso en la alimentación, siendo considerados como plantas de cierto riesgo cuando se consumen sin haber sido sometidas a un proceso de cocción para eliminar estos factores tóxicos o antinutricionales (Valle, 2013; Damodaran, 2008; Damodaran, 1994).

El frijol presenta factores tóxicos como las hemaglutininas y factores antinutricionales como los inhibidores de tripsina. Las primeras, son un grupo variado de glicoproteínas capaces de reconocer de manera específica carbohidratos de la superficie celular aglutinando a las células y precipitando glicoconjugados. Debido a la especificidad que presenta ante los eritrocitos de un denominado grupo o subgrupo sanguíneo, fueron denominadas como lectinas derivado del latín *legere* que significa leer (Boyd & Shapleigh, 1954).

Como resultado de la aglutinación, el consumo de leguminosas con un mal tratamiento térmico, puede provocar efectos adversos a la salud, entre ellos, la afectación a las vellosidades intestinales provocando un edema que interfiere con la absorción de nutrimentos (Lajolo & Genovese, 2002), también se ha observado que las lectinas pueden estimular la hipertrofia del páncreas y por otra parte, disminuir el músculo esquelético (Bardocz et al., 1996).

Los inhibidores de proteasas, por otra parte, tienen la capacidad de inhibir la actividad proteolítica de enzimas digestivas como las serina-proteasas mediante la formación de complejos enzima-inhibidor muy estables, interfiriendo en su actividad catalítica. Los más estudiados son aquellos que actúan sobre la tripsina, debido a que esta enzima digestiva es de gran importancia en la digestión de monogástricos como el ser humano. Uno de los efectos que presentan estos inhibidores de tripsina es la disminución de la proteólisis, lo que provoca una escasa absorción de proteína adquirida en la dieta, por lo que se considera como un factor antinutricional. Otros efectos que tienen es la hipertrofia del páncreas, que estimula la liberación de colecistoquinina (hormona sintetizada por las células del intestino delgado que ayuda a la secreción pancreática) al no poder ser degradado el péptido, causando un aumento de peso del órgano (Liener, 1989).

La mayoría de los inhibidores de proteasas son inactivados por la acción del calor. Se ha demostrado que una cocción, de por lo menos tres minutos en agua a ebullición, ayuda a reducir en un 90% los inhibidores, es por ello que la cocción viene acompañada de un incremento en la calidad nutritiva (Saini, 1989; Van der Pool, 1990). También se ha establecido que el contenido de humedad del grano es de suma importancia, ya que un previo remojo disminuye substancialmente tanto el tiempo como la temperatura del proceso (Van der Poel, 1990; Nehad, 1990; Melcion and Van der Poel, 1993).

4. ANTECEDENTES

El papel de las leguminosas, como el frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*), en la alimentación fue reiterado en el Año Internacional de las Leguminosas 2016 (FAO, 2016). Como alimento benéfico, además de su valor nutrimental, presenta la capacidad de neutralizar radicales libres, evitando daños en proteínas, lípidos o ácidos nucleicos, previniendo enfermedades cardiovasculares, carcinogénesis, mutagénesis, diabetes, entre otras (Subedi L. et al., 2014). De los estudios epidemiológicos realizados por la Dra. Lizbeth López Carrillo y su equipo de INSP (Galván et al., 2007) con poblaciones mexicanas de mujeres, las evidencias epidemiológicas han reconocido la capacidad de los frijoles (*Phaseolus vulgaris L.*) y la cebolla como dos elementos en su alimentación para protegerlas contra el cáncer. Debido a lo anterior, es importante fortalecer el consumo de esta fuente de proteína vegetal, cuya producción en campo tiene menores impactos ambientales a comparación con la producción ganadera o de pollo, cuyos costos son sensiblemente mayores (Gálvez & Salinas ,2015).

El importante aporte nutrimental del frijol que se ha dejado de aprovechar al haber disminuido su consumo en México, motivó al grupo de trabajo a realizar el estudio de dos variedades de frijol negro (var. 8025 y var. Bola de Zacatecas). Para lograrlo, se produjo un concentrado de proteína en polvo y otra muestra de frijol entero cocido y deshidratado. Las investigaciones, en asociación con el grupo de los doctores Tovar y Torres del INCMNSZ, generaron datos metabólicos del comportamiento de animales de laboratorio alimentados con proteína de frijol como

única fuente proteínica, lo que permite a su vez, conocer su posible influencia en el mantenimiento de la salud del ser humano que los consuma. Los resultados obtenidos mostraron una influencia en el crecimiento adecuado de animales de laboratorio, así como también, se observó que permite una disminución de la lipogénesis, de la concentración de glucosa en sangre y secreción de insulina. Además, Márquez-Mota en 2016 utilizando el concentrado de frijol reporta la rehabilitación de animales desnutridos utilizando una combinación de proteínas de frijol y maíz, que logró incrementar significativamente el peso corporal y recuperación de sus parámetros bioquímicos, indicando que son un buen tratamiento para su rehabilitación nutricional. Aunado a estos resultados, Hernández-Velázquez, en 2018, generó un modelo de obesidad inducida por dieta en animales de laboratorio, en el cual comprobó que el consumo de concentrado de frijol y de frijol cocido entero permite contrarrestar los efectos de una dieta alta en grasa, manteniendo normales los niveles de glucosa e insulina. Todo lo anterior sugiere que el consumo cotidiano de frijol negro regula la respuesta metabólica postprandial, y contrarresta en cierto grado las consecuencias de la obesidad (Quiñones, 2010; Márquez-Mota, 2016; Hernández V., 2018). Otros estudios del grupo de trabajo han demostrado que la proteína de frijol negro 8025 presenta una gran capacidad para el uso en formulaciones de alimentos, al contar con una alta capacidad de absorción de agua, y baja para la absorción de aceite, contando también con buenas capacidades espumantes y emulsificantes (Salinas G., 2014) Para contribuir con más información que revalorice al frijol como alimento, se propuso estudiar las fracciones de carbohidratos presentes en las nuevas variedades desarrolladas en el INIFAP, y en las variedades ya estudiadas previamente. Además, se generó información sobre su contenido de fibra dietética y poder antioxidante.

5. JUSTIFICACIÓN

El consumo de frijol va acompañado de fibra y fitocompuestos que resultan funcionales como antioxidantes, pero también de una fracción mayoritaria en su composición, de hidratos de carbono que en análisis químicos proximales (AQP), es determinado por diferencia en peso del resto de los componentes presentes. A pesar de ser una fracción mayoritaria, los datos acerca de la composición detallada de las variedades de frijol consumidas, en México es muy escasa. Es interesante investigar esta fracción de carbohidratos debido a que hay estudios que sustentan que el consumo de frijol presenta índices glucémicos bajos de entre 30 hasta 38 (Foster-Powell et al., 2002), cuando se considera que un alimento con alto contenido de almidón muestra valores de 50, que es el límite de recomendación para los diabéticos. Una de las posibles explicaciones, es que el almidón encontrado en esta leguminosa contiene fracciones no digeribles que se comportan como fibra soluble y que es de nuestro interés conocer. Así mismo se desea evaluar la presencia de pectina y para las fracciones de almidón: almidón total, amilosa, amilopectina y almidón resistente, así como la fibra total, dentro de un Análisis Químico Proximal (**AQP**).

Además, se propuso evaluar el efecto que pudiera tener el tratamiento térmico culinario al que se someten los frijoles de México, por lo que las pruebas realizadas en muestras crudas, aplicarán también para los procesados térmicamente.

Son seis variedades nuevas de frijol cuyas fracciones de carbohidratos se pretende caracterizar, además de su capacidad antioxidante e información nutrimental así como su contenido de inhibidores de tripsina, antes de ser liberadas para su explotación a nivel comercial. Además se incluyó en el estudio la variedad de frijol negro Bola, que ya ha sido utilizada en los proyectos mencionados con anterioridad y que es un frijol adquirido de la Central de Abastos de CDMX.

6. HIPÓTESIS

- ❖ Al someter a tratamiento térmico las nuevas variedades de frijol, se observará la prevalencia de almidón resistente y compuestos con actividad antioxidante de importancia para el sector poblacional que sufre diabetes, hipertensión y obesidad; además de la inactivación de sus factores antinutricionales.

7. OBJETIVO GENERAL

- ❖ Obtener un conocimiento más profundo y detallado sobre los nutrimentos y compuestos funcionales de las nuevas variedades de frijol desarrolladas.

7.1 Objetivos particulares

- ❖ Estudiar el efecto del tratamiento térmico más frecuentemente utilizado en la culinaria mexicana sobre: fracciones de hidratos de carbono, fibra dietética, capacidad antioxidante e inhibidores de tripsina.
- ❖ Conocer a detalle la composición de la fracción de hidratos de carbono que se presume contiene una parte de almidón resistente a la digestión.
- ❖ Conocer si hay fracciones que contengan pectina como constituyentes de la fibra dietética soluble de interés en el proyecto.
- ❖ Obtener información nutrimental con el AQP.

8. MUESTRAS

A continuación, se mencionan las muestras de variedades de frijol donadas por el INIFAP para su estudio.

Tabla 3. Variedades de frijol desarrolladas por el INIFAP (Dra. Carmen Jacinto) y sus características agronómicas

Variedad de frijol	Información de cultivo	Características
 Flor de Mayo M-38	Siembra: 15-mayo-2017 Cosecha:29-agosto-2017 Trilla:12-sept-2017	Resistencia a enfermedades comunes en el Estado de México
 Bayo Azteca	Siembra: 15-mayo-2017 Cosecha:29-agosto-2017 Trilla:12-sept-2017	Alto contenido de proteína, resistente a plagas, mayor rendimiento
 Flor de durazno 2	Siembra: 15-mayo-2017 Cosecha:16-agosto-2017 Trilla:7-sept-2017	Resistencia a roya, antracnosis y tizón común



Negro albicampo

Siembra: 15-mayo-2017
Cosecha: 26-agosto-2017
Trilla: 14-sept-2017

Alto rendimiento, alto porcentaje de proteína, plasticidad fenológica



Negro primavera 3

Siembra: 15-mayo-2017
Cosecha: 16-agosto-2017
Trilla: 7-sept-2017

Resistencia a roya, antracnosis y tizón común. Alto contenido de proteína



Negro 8025-1

Siembra: 15-mayo-2017
Cosecha: 16-agosto-2017
Trilla: 7-sept-2017

Resistencia a roya, antracnosis y tizón común

Además, se analizó una muestra de referencia (cruda y cocida) previamente utilizadas por el grupo de trabajo: frijol negro variedad "Bola" donado por el Ing. José Antonio Bojorge de la empresa Campo Verde S.A de C.V., almacenado por un tiempo estimado de dos años, aunque no se cuenta con la información precisa sobre las condiciones de dicho almacenamiento.

9. METODOLOGÍA

9.1 Diagrama general del proyecto de tesis.

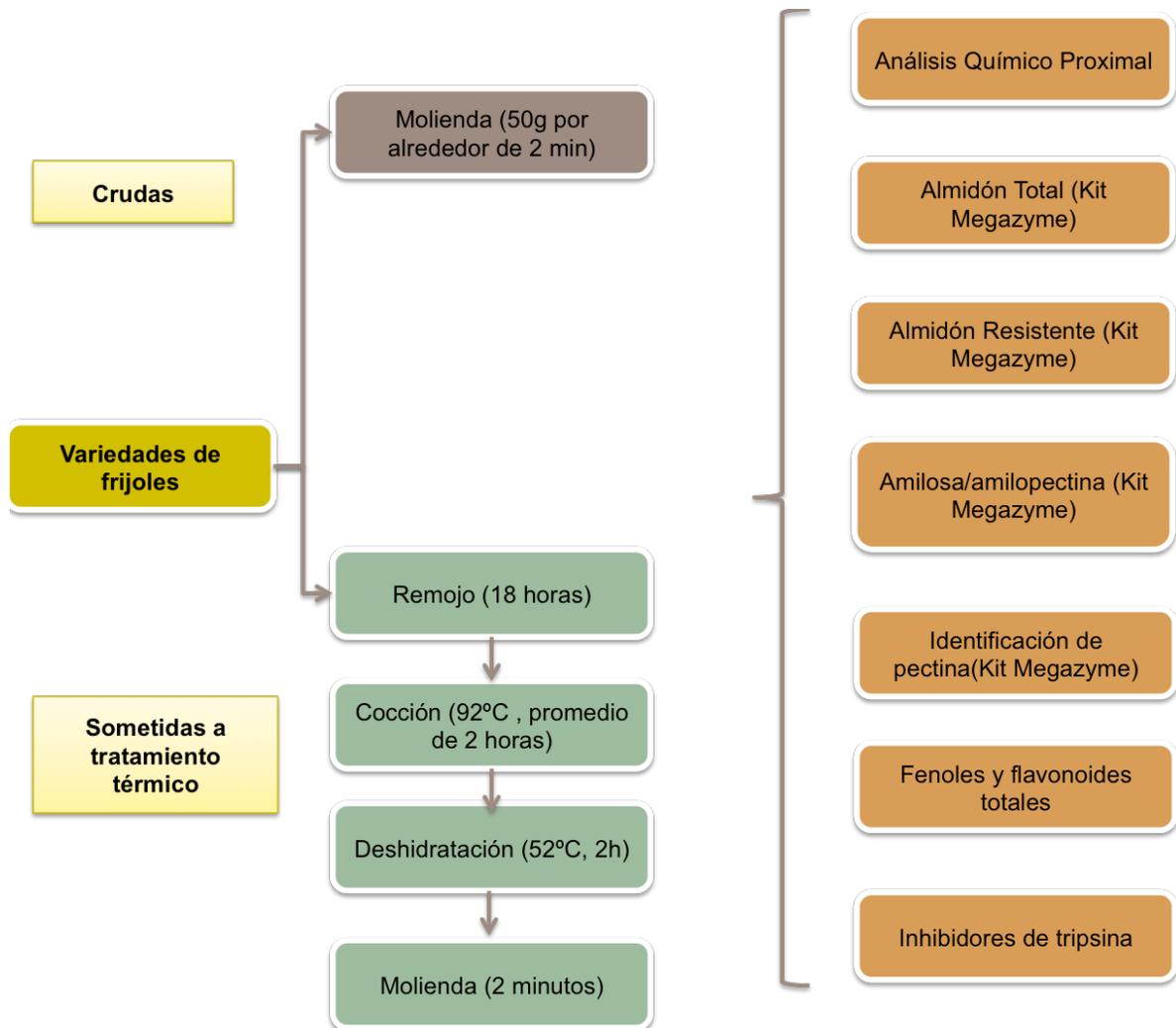


Figura 11. Diagrama general del proyecto de tesis.

9.1.1 Cocción de los frijoles

Se lavaron 170 semillas de cada variedad de frijol, agregando un volumen de 501 mL de agua. Fueron dejados en remojo por 18 horas a temperatura ambiente y al final del periodo de remojo se separaron los granos del agua de remojo.

Se colocaron 300 mL de agua en un vaso de 600 mL (sin vertedero), este mismo fue colocado sobre una placa hasta que el agua estuviera en ebullición. Se agregaron los frijoles y se dejó hervir. Se registró la hora en que el agua con el frijol inicia la ebullición. Se adicionó agua para restituir la que se evapora durante la

ebullición. Cada determinado tiempo varios granos fueron removidos del agua hirviendo y con ello se realizó la prueba sensorial (la semilla se tiene que deshacer con la presión de los dedos) que determina el tiempo de cocción. Se registró el tiempo de cocción de cada grano (Guzmán Maldonado et al, 1995).

9.1.2 Deshidratación

Se colocaron las muestras de frijol cocido en charolas de silicón, para después ser llevadas a un deshidratador TSM PRODUCTS Food Dehydrator, a una temperatura de 52°C por alrededor de dos horas. Una vez terminado el tiempo de deshidratación, se molieron y colocaron en tubos Falcon y se mantuvieron en refrigeración.

9.1.3 Molienda

Se pesaron 50g de cada variedad de frijol y fueron colocados en un molino Krups GX4100. La primera molienda se realiza con la mitad de los granos. Se llevó a cabo por 20 segundos, posteriormente se agregó la muestra faltante y se volvió a moler por 20 segundos más. Finalmente remoler por 10 segundos más, hasta obtener un polvo fino.

9.1.4 Análisis Químico Proximal

La determinación del AQP, se llevó a cabo en el Laboratorio 322 de la USIA del Departamento de Alimentos y Biotecnología, de la Facultad de Química de la UNAM. Los métodos utilizados se mencionan en la Tabla 4.

Tabla 4. Métodos utilizados para realizar el Análisis Químico Proximal

Determinación	Método utilizado
Humedad	AOAC Official Method 930.04. Moisture in plants
Cenizas	AOAC. Official Method 930.05 Ash in plants
Grasa	AOAC Official Method 920.85 Fat (crude) or ether extract in flour.
Proteínas	AOAC Official Method 920.87. Protein Total in flour (Kjeldahl method) N x 6.25=% protein.
Fibra dietética	AOAC Official Method 992.16. Total dietary fiber. Enzymatic-gravimetric method.

Fuente: AOAC (2005). Official Methods of Analysis Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.

9.1.5 Almidón total (Megazyme, Total Starch Kit. No. CatálogoK-STA-50A/K-TSTA-100 06/17)

Se colocaron aproximadamente de 100 mg de muestra en un tubo de ensaye de 16 x 100 mm, la cual fue humedecida con 0.2 mL de etanol 80% v/v y agitada en vórtex. Posteriormente, se adicionaron 2.0 mL de KOH a cada tubo y se dejó resuspender en agitación por 20 minutos sobre un baño de agua hielo y agitación constante. Después, se adicionaron 8.0 mL de buffer de acetato de sodio 1.2 M pH 3.8 a cada tubo con agitación constante e inmediatamente se agregaron 0.1 mL de alfa amilasa termoestable y 0.1 **amiloglucosidasa (AMG)**, mezclando y colocando los tubos en un baño de agua de 50°C por alrededor de 30 minutos, con agitación intermitente en vórtex. Posteriormente, se transfirió el contenido de cada tubo a un matraz volumétrico de 100 mL y se ajustó el volumen con agua destilada. Después, se centrifugó una alícuota a 1,800 g por 10 minutos en el equipo Centra CL2. Se transfirió por duplicado una alícuota de 0.1 mL de la solución a tubos de ensaye de 16 x 100 mm y después se agregaron 3.0 mL de reactivo de **Glucosa Oxidasa Peroxidasa (GOPOD)**. Enseguida se midió la absorbancia de cada muestra a 510 nm, contra el blanco de reacción en un espectrofotómetro Biomate 3 Thermo Scientific. El blanco de reacción contiene todos los reactivos y 0.1 mL de agua destilada en lugar de muestra.

9.1.6 Almidón resistente (Megazyme, Resistant Starch Kit, No. Catálogo K-RSTAR 02/17)

a) Hidrólisis y solubilización del almidón no resistente.

Se pesó una cantidad de muestra de aproximadamente 100 mg colocándola en tubos de vidrio con tapa, agregando 4.0 mL de alfa-amilasa (3U/mL) a cada tubo. Posteriormente, se tapan los tubos y se agitan en vórtex para después ser colocados horizontalmente en una incubadora a 37°C por exactamente 16 horas. Una vez acabado el tiempo de incubación, se les agregó 4.0 mL de etanol (99% v/v) con agitación en vórtex. Se centrifugaron los tubos a 1,500 g por alrededor de 10 minutos. Se decantaron los sobrenadantes y se resuspendieron, agregando enseguida 2.0 mL de etanol (50% v/v), mezclando y posteriormente añadiendo 6.0

mL más de etanol (50%) para finalmente someterlo a centrifugación a 1,500 g por 10 minutos. Nuevamente se decantó el sobrenadante y se repitió la suspensión. Una vez que se decantaron los sobrenadantes, se invirtieron los tubos con los pellets sobre una servilleta para dejar drenar el exceso de líquido.

b) Medición del almidón resistente.

Se añadió a los pellets 2 mL de KOH 2M a cada tubo para resuspenderlos e inmediatamente se les agregó 0.1 mL de AMG, mezclando bien y colocando los tubos en baño de agua a 50°C. Posteriormente se incubaron por 30 minutos con agitación constante. Al acabar el tiempo de incubación, se centrifugaron los tubos a 1,500 g por 10 minutos. De la solución que se obtuvo, fueron tomados 0.1 mL de alícuota colocándolos en tubos de ensaye 16 x 100mm, agregando 3.0 mL del reactivo GOPOD y llevándolo a incubar a 50°C por 20 minutos. Se midió la absorbancia de cada solución a 510 nm contra el blanco de reactivo en el espectrofotómetro Biomate 3 Thermo Scientific.

c) Medición del almidón no resistente solubilizado.

De los sobrenadantes obtenidos, fueron combinados los de la primera centrifugación (parte a) con los sobrenadantes de los subsecuentes lavados con etanol 50%, a estos sobrenadantes, se les llevó a un volumen de 100 mL en un matraz volumétrico con buffer de acetato de sodio 100mM pH 4.5. Mezclando bien. Se incubaron alícuotas de 0.1 mL con 10uL de la solución de AMG diluida en 100 mM de buffer de malato de sodio pH 6.0 por 20 minutos a 50°C. Posteriormente, se agregaron 3.0 mL de reactivo GOPOD y se incubaron los tubos 20 minutos a 50°C. Acabando el tiempo de incubación, se midió su absorbancia a 510 nm contra el blanco de reactivo en un espectrofotómetro Biomate 3 Thermo Scientific.

Para obtener una aproximación del almidón total de las variedades de frijol, se suman los resultados obtenidos en el inciso a y b.

9.1.7 Amilosa/Amilopectina (Megazyme, Amilose/Amilopectin Kit. No. Catálogo K-AMYL 12/16)

a) *Pre-tratamiento del almidón*

Se pesaron aproximadamente 20-25 mg de muestra de cada variedad por duplicado tubos de ensaye de 10 mL con tapa, agregando enseguida 1 mL de **dimetilsulfóxido (DMSO)** agitándolo en vórtex. Posteriormente, se taparon los tubos de ensaye y se colocaron en un baño de agua en ebullición por 1 minuto para lograr la dispersión de la muestra. Se mezclaron y se volvieron a colocar en agua de baño en ebullición por 15 minutos con agitación intermitente en vórtex. Los tubos se dejaron a temperatura ambiente por 15 minutos, al cabo de los cuales se agregaron 2 mL de etanol al 95 % v/v mezclando en vórtex y se agregaron 4.0 mL más de etanol. Se comenzó a observar la formación de un precipitado, dejándolo formarse por 15 minutos. Concluido este tiempo, el contenido se pasa a tubos cónicos de plástico y se sometieron a centrifugación a 2,000g por 5 minutos en el equipo Centra CL2, descartando los sobrenadantes y drenando los tubos en un papel absorbente por 10 minutos, asegurando que todo el etanol estuviese drenado. Posteriormente, se agregaron 2.0 mL de DMSO al pellet que contenía el almidón, colocándolo en un baño de agua en ebullición por 15 minutos con agitación ocasional, inmediatamente se adicionaron 4.0 mL de la solución de **concanavalina (Con A)**, mezclando en vórtex. Esta solución se colocó en un matraz volumétrico de 25 mL adicionando solvente Con A hasta su aforo. Se filtró en papel Whatman No.1 ya que se trata de nuestras de harina de frijol. A esta solución se le nombró **Solución A**.

b) *Precipitación de Amilopectina con Con A y determinación de amilosa.*

Se transfirió 1.0 mL de la **Solución A** a un Eppendorf de 2.0 mL, agregando 0.50 mL de Con A (con concanavalina), se taparon y mezclaron en vórtex. El Eppendorf se dejó reposar 1h a temperatura ambiente y después se centrifugó a 14,000 g por 10 minutos a temperatura ambiente en el equipo Allegra X-30R Centrifuge. Posteriormente, se transfirió 1 mL del sobrenadante a un tubo de centrifuga de 15 mL agregando 3.0 mL de buffer de acetato de sodio 100 mM pH 4.5. Se mezcló el contenido del tubo y se colocó en un baño de agua en ebullición por 5 minutos para

desnaturalizar la Con A. Después, se colocó en incubación por 5 minutos a 40°C, concluido el tiempo se agregó 0.1 mL de enzima amiloglucosidasa / alfa-amilasa y se colocó en incubación a 40°C por 30 min. Se midió la absorbancia de cada muestra y de los controles de D-glucosa a 510 nm, contra el blanco de reactivo en el espectrofotómetro Biomate 3 Thermo Scientific.

c) Determinación de Almidón total.

Se mezclaron 0.5 mL de la **Solución A** con 4 mL de buffer de acetato de sodio 100mM pH 4.5 agregando 0.1 mL de amiloglucosidasa / alfa-amilasa y se incubaron a 40°C por 10 minutos. Se transfirieron alícuotas de 1.0 mL a tubos de ensaye, adicionando 4 mL del reactivo de GOPOD. Se incubó a 40°C por 20 minutos. Enseguida se midió la absorbancia de cada muestra a 510 nm, contra el blanco de reacción en un espectrofotómetro Biomate 3 Thermo Scientific.

9.1.8 Identificación de pectina (Megazyme, Pectin identification Kit. No. Catálogo K-PECID 05/16)

Se pesaron 50 mg de la muestra colocando dos gotas de isopropanol. Posteriormente, se agregaron 50 mL de agua desionizada y se agitó en el equipo MAXQ 4000, Thermo Scientific por alrededor de 20-30 minutos. Se ajustó el pH de la solución a 12 con una adición cuidadosa de NaOH 0.5 M, dejando actuar por 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se disminuyó el pH a 8.0 con la adición de HCl 0.5M. Se finalizó ajustando el volumen a 100 mL con agua desionizada.

A cada muestra se agregaron los reactivos siguientes, y después se midió la absorbancia a 235 nm después de 30 min.

Tabla 5. Adición de reactivos para identificación de pectina. Fuente: traducido de *Pectin Identification MEGAZYME*.

	Buffer Tris-HCl (pH 8.0) mL	Muestra mL	Agua Desionizada mL	Enzima diluída mL
Blanco de enzima	0.5	1.0	1.0	-
Blanco de muestra	0.5	-	1.5	0.5
Reacción	0.5	1.0	0.5	0.5

9.1.9 Actividad Antioxidante

Se llevaron a cabo dos determinaciones, el primero midió la cantidad de fenoles que se encuentran en las distintas variedades de frijol estudiadas, y el segundo, los flavonoides totales que pueden estar presentes en cada una de las muestras.

9.1.9.1 Fenoles Totales

Se pesaron 0.5 g de muestra, agregando 10 mL de metanol-agua (80:20) y ácido acético (1%). La mezcla se llevó a sonicación 30°C/20 min, se filtró al vacío y se obtuvo un extracto de antocianinas. Del extracto anterior, se tomaron 50 uL, agregando 3 mL de agua destilada, 250 uL del reactivo Folin-Ciocalteu's y 750 uL de una solución de NaCO₃ 7%, todo colocándolo en un tubo de ensaye 16 x100 mm. Posteriormente se agitó en vórtex y se dejó reposar 8 minutos a temperatura ambiente. Después de concluido el tiempo, se añadieron 950 uL de agua destilada. La muestra se dejó por 2 horas a temperatura ambiente. Para finalizar, se midió absorbancia en el espectrofotómetro Biomate 3 Thermo Scientific, a una longitud de onda de 765 nm contra un blanco de reactivo. La cantidad de fenoles totales se expresa como equivalentes de ácido gálico y ácido tánico (mg ácido / g de muestra) (Singleton and Rossi, 1965; Singleton and Raventos, 1999).

9.1.9.2 Flavonoides totales

Se utilizó el método colorimétrico Heimler et al., 2005 para determinar el contenido total de flavonoides. Se colocaron 0.25 mL del extracto de leguminosa de la sección anterior, agregando 1.25 mL de agua destilada en un tubo de ensaye,

posteriormente se agregaron 75 uL de NaNO_2 al 5%. Después de 6 minutos, se añadieron 150 uL de una solución de $\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, dejándolo reposar por 5 minutos más para después agregar 0.5 mL de NaOH 1M. A esta solución se le agregaron 2.5 mL de agua destilada y se mezcló apropiadamente. Se midió a una longitud de onda de 510 nm utilizando un espectrofotómetro Biomate 3 Thermo Scientific. Los resultados se expresan como miligramos de quercetina por cada gramo de muestra. Se realiza previamente una curva estándar con quercetina.

9.1.10 Inhibidores de tripsina

Para la determinación de inhibidores de tripsina, se realizó la miniaturización propuesta por Lima en 2018 del método desarrollado por Kakade (1973) y modificado por Klomklao (2011), permitiendo disminuir los volúmenes de reacción y acortar el tiempo de la determinación. El método es una técnica espectrofotométrica, donde se detecta la actividad proteolítica remanente de la tripsina, después de estar en contacto con el extracto de inhibidores de la muestra. Se utiliza un sustrato sintético, benzoil-arginina-p-nitroanilida (BAPNA), este compuesto presenta un enlace peptídico que es hidrolizado en condiciones adecuadas por la tripsina, produciendo p-nitroanilina el cual proporciona color a la reacción (Figura 12). Los resultados se expresan como unidades de inhibidor de tripsina (UIT) por mg de muestra.

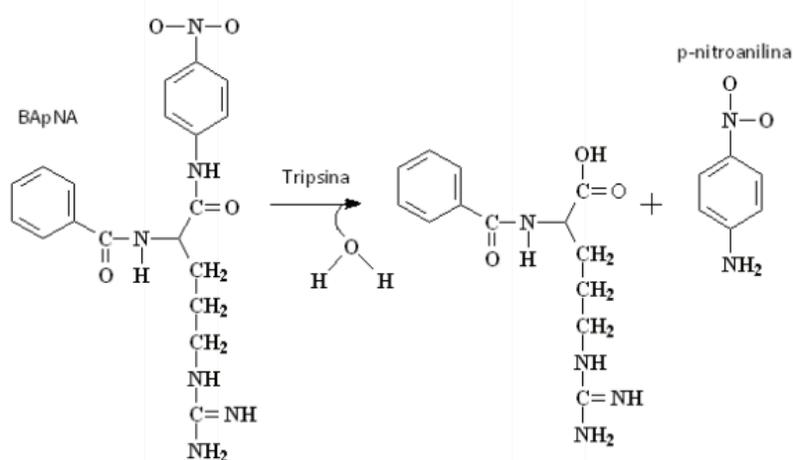


Figura 12. Hidrólisis de BAPNA por acción de tripsina (Sandoval G.,2010)

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

10.1 Análisis Químico Proximal (AQP)

Para poder determinar el aporte nutrimental y la cantidad de fibra dietética de estas nuevas variedades de frijol, fue necesario un AQP tanto a las muestras crudas, como las sometidas a tratamiento térmico culinario. En la Tabla 6 se muestran los resultados para las variedades de frijol crudas, estos se llevaron a cabo, debido a que, aunque el alimento se consume después de un tratamiento térmico, saber sus propiedades en crudo complementa la información relevante para el INIFAP (Laboratorio de la Dra. Carmen Jacinto) para el desarrollo de estas variedades y que estas mismas, puedan ser seleccionadas en la implementación de mejores cultivos con rendimientos y aporte nutrimental más altos.

Tabla 6. Análisis Químico Proximal en base seca de las nuevas variedades de frijol (Crudas).

Muestras	Grasa (extracto etéreo) g/100g	Cenizas (g/100g)	Proteínas (g/100g)	Fibra dietética (g/100g)	Carbohidratos totales (por diferencia) g/100g
Frijol Negro var. Bola	1.83	4.48	19.34	4.08	70.28
Negro 8025-1	2.37	1.65	20.43	20.7	54.85
Negro Albicampo	2.68	1.97	20.96	26.06	48.33
Negro Primavera 3	3.16	1.74	23.97	24.88	46.26
Flor de mayo M-38	3.39	1.31	20.9	23.75	50.64
Flor de durazno 2	4.24	1.19	20.55	21.63	52.4
Bayo azteca	3.41	1.04	23.64	18.57	53.34

Fuente: Análisis realizados en la USIA-FQ, Lab. 322.

Los valores de humedad (9-10g de humedad/100g de muestra) están dentro de las especificaciones descritas por la norma NMX-FF-038-SCFI-2013 para productos alimenticios no industrializados para consumo humano- frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Los valores de cenizas y grasas, se encuentran dentro de los valores reportados por Samman, et al.,1999. Para el caso de la proteína, se observan

valores entre 19-25%, los cuales coinciden con los reportados por Osborn y Brown (1988).

Las variedades que presentan una mayor cantidad de proteína son: Negro Primavera 3 y Bayo Azteca, lo que corrobora lo esperado para estas variedades.

Los valores de fibra dietética en las muestras crudas, presentan valores altos, siendo la variedad Negro Albicampo la más alta con un valor de 26.06 g de fibra dietética /100 g de muestra; estos valores pueden atribuirse, como es de esperarse al grosor de la testa de cada variedad, a su contenido de pectina y otros compuestos que tienen efectos benéficos para la salud como el almidón resistente.

Los carbohidratos totales en las muestras crudas (Tabla 6) se encuentran dentro de los intervalos reportados en la literatura; sin embargo, las variedades Negro 8025-1, Flor de Durazno 2 y Bayo Azteca, son las que contienen una mayor proporción.

Al someter a tratamiento térmico a las variedades de frijol, los nutrimentos aumentan sus valores, como lo han reportado Schoeninger et al. en el 2017, se observa en la Tabla 7.

Tabla 7. Análisis Químico Proximal de las nuevas variedades de frijol y el frijol de referencia, en base seca (con tratamiento térmico).

Muestras	Grasa (extracto etéreo) g/100g	Cenizas (g/100g)	Proteínas (g/100g)	Fibra dietética (g/100g)	Carbohidratos totales (por diferencia) g/100g
Frijol Negro var. Bola	4.55	3.70	22.23	13.25	56.32
Negro 8025-1	4.51	1.83	22.18	24.16	55.49
Negro albicampo	4.18	1.88	21.15	30.52	53.65
Negro primavera 3	4.43	1.44	24.46	28.27	51.43
Flor de mayo M-38	4.13	1.91	23.88	28.34	50.62
Flor de durazno 2	4.84	1.52	21.45	29.00	52.75
Bayo azteca	3.97	1.81	24.61	23.63	52.84

La cantidad de proteínas, sigue encontrándose dentro de los valores reportados por la literatura, obteniendo de igual manera que en las muestras crudas, valores más altos para las variedades Negro Primavera 3 y Bayo Azteca.

Los carbohidratos constituyen la fracción principal en las semillas de frijol, los más importantes son el almidón, la fibra dietética y pequeñas cantidades de oligosacáridos (Bravo et al., 1998); sin embargo, en México no se tiene información sobre estas fracciones de carbohidratos (almidón resistente, amilosa y amilopectina). Son reconocidos solamente como una fuente proteínica, es por ello que el revisar las fracciones de carbohidratos era importante para el grupo de trabajo, ya que los hallazgos nutrimentales y de alimentación animal con frijol entero como única fuente de proteína requieren de un mejor conocimiento sobre tal composición.

10.2 Almidón total

La Tabla 8 muestra la cantidad de almidón total, componente que puede ser resistente o no a la digestión de las enzimas y que en este rubro se cuantifica en conjunto. Los valores se encuentran alrededor de los 58-60% de almidón en base seca, y coinciden con el almidón total reportado en la literatura para variedades de frijol negro (Aparicio-Fernández, 2015).

Las variedades que presentan una mayor cantidad de almidón total son: Bayo Azteca, Flor de Mayo M-38, Negro 8025-1 y Negro Albicampo 3. Los valores obtenidos por el método enzimático resultan superiores comparados con los obtenidos por el Análisis Químico Proximal (calculado por diferencia); este aumento se atribuye a que se trata de un ensayo enzimático cuyos resultados son más específicos al obtenerse maltodextrinas, con alfa-amilasa, y posteriormente ser transformadas a D-glucosa con la amiloglucosidasa.

Tabla 8. Porcentaje de Almidón total para el frijol negro var. Bola y nuevas variedades de frijol del INIFAP.

Muestras	g de Almidón Total/100g de muestra seca	
	Crudas	Tratamiento térmico
Frijol Negro var. Bola	54.36±0.44	56.76±0.92
Negro 8025-1	56.76±0.92	60.28±0.90
Negro albicampo 3	56.73±0.64	53.25±0.05
Negro primavera	54.69±0.65	59.15±0.43
Flor de mayo M-38	59.04±0.94	56.91±1.18
Flor de durazno	53.88±0.62	57.37±0.57
Bayo azteca	63.40±0.49	58.05±0.26

El frijol negro variedad bola, que en este estudio es utilizado como referencia de lo que se consume y distribuye comúnmente en la población, provino de la Central de Abastos del la CDMX, por lo que el tiempo desde su cosecha hasta que fue recogido para iniciar los análisis, es desconocido. Indirectamente se puede decir que se trata de un frijol con un almacenamiento prolongado y que no se trataba de un frijol nuevo (como sucede con las muestras de INIFAP), ya que al ser sometido

al proceso de concentración (Salinas,2014), el rendimiento disminuyó a la mitad de lo que sucede con un frijol recién cosechado, en proyectos de tesis anteriores mencionadas en la parte de antecedentes de este proyecto utilizando la variedad del INIFAP Negro-8025.

El mal almacenamiento o un tiempo prolongado de almacén pueden afectar la composición de una leguminosa. El denominado efecto “hard to cook” o “frijol endurecido” por las razones antes mencionadas, provoca una disminución en la susceptibilidad del almidón a ser digerido por las enzimas, principalmente por la amiloglucosidasa (García E & Lajolo F, 1994), debido a que la amilosa tiende a formar más fácilmente puentes de hidrógeno intermoleculares que la amilopectina, o bien, se ha demostrado en estudios anteriores que aunado a lo anterior mencionado, los compuestos fenólicos también pueden participar en este efecto de endurecimiento (Hincks & Stanley, 1987; Srisuma et al., 1989),

Los valores obtenidos de almidón total, se encuentran dentro del intervalo reportado por la literatura, y se puede apreciar que también son cercanos a algunos porcentajes de las variedades desarrolladas en el INFAP. Se realizaron las mismas determinaciones con las muestras sometidas a un tratamiento térmico (Tabla 8).

Las tres variedades: Negro Primavera, Flor de Mayo M-38 y Bayo Azteca cocidas que muestran una ligera disminución en el contenido de almidón total, podrían indicar un mayor ordenamiento de los gránulos de almidón dentro de la semilla que dificultara la gelatinización y la hidrólisis enzimática (Alcazar-Alay, 2015). Sin embargo, por medio de un análisis estadístico se determinó que no existen diferencias significativas entre los resultados de muestras crudas y cocidas.

Una vez obtenidos los valores de almidón total para cada una de las variedades, se prosiguió con la determinación de cuánto del almidón total, puede clasificarse como almidón resistente mediante un ensayo enzimático

10.3 Almidón resistente

El almidón resistente es asociado con varios efectos benéficos a la salud debido a que se encuentra dentro de los compuestos denominados como fibra dietética. En la tabla 9, se observan los valores de almidón resistente y almidón soluble de las variedades de frijol crudas, comparándolas con el de referencia, Frijol Negro variedad Bola.

Los valores obtenidos se encuentran en un intervalo de 2.78-7.21% de almidón resistente. Para el frijol negro se han reportado valores de entre tres y cinco gramos de almidón resistente por cada 100 gramos de muestra (Fabbri et al., 2016). Las variedades que presentan valores más altos, son la variedad Negro 8025-1 y Bayo Azteca, pudiendo tener repercusiones en la disminución del índice glicémico; las demás variedades al encontrarse dentro de los intervalos reportados en la literatura, también pueden presentar IG de alrededor de 20-30 (IG considerados como bajos) (Foster & Powell, 2012).

Tabla 9. Porcentaje de Almidón resistente y almidón soluble para nuevas variedades de frijol del INIFAP y el frijol negro variedad Bola.

Muestras	g de almidón resistente /100g muestra seca		g de almidón soluble/100g muestra seca	
	Crudas	Tratamiento térmico	Crudas	Tratamiento térmico
Frijol Negro Var. Bola	4.65±0.09	3.88±0.24	55.57±0.29	43.48±0.30
Negro 8025-1	7.21±0.01	5.40±0.35	60.63±0.79	57.21±2.11
Negro albicampo	4.30±0.05	5.50±0.01	50.67±0.59	54.68±0.85
Negro primavera 3	4.36±0.07	4.56±0.02	58.71±0.53	52.82±1.4
Flor de mayo M-38	2.78±0.01	1.81±0.04	49.73±0.13	53.07±0.84
Flor de durazno 2	4.82±0.08	4.63±0.05	50.96±0.51	43.74±0.12
Bayo azteca	5.28±0.07	4.55±0.06	51.31±0.33	49.01±1.42

El caso de frijol de referencia muestra una tendencia similar a las demás variedades, por lo que, a pesar de ser una variedad que no fue cosechada al mismo tiempo que las muestras de frijol del INIFAP, su composición no muestra alteraciones que se esperaría encontrar en semillas de frijol cosechadas y almacenadas por un tiempo prolongado (García E. & Lajolo F, 1994).

Al ser sometidas a tratamiento térmico, se observa en la tabla 9 que el porcentaje tanto de almidón soluble como almidón resistente son cercanos a lo obtenido en las variedades crudas. Es importante recordar que el tratamiento térmico provoca la gelatinización del almidón, por lo que los enlaces glucosídicos del almidón se encuentran más disponibles para la acción enzimática, lo que explica los valores menores de las variedades sometidas a tratamiento térmico.

En las variedades italianas estudiadas por Fabbri en 2016, siempre disminuyen los valores de almidón resistente al cocerse, como sucede con estas variedades, excepto Negro Albicampo y Negro Primavera 3, este comportamiento, como se observó en la determinación de almidón total, puede deberse a la estructura de los gránulos del almidón que se encuentra más ordenada impidiendo la buena acción enzimática.

Una variable a considerar en esta discusión son las condiciones específicas de cocción indicadas en los métodos de evaluación de rutina que se hace a las variedades desarrolladas en el INIFAP, ya que se trata de una cocción a presión atmosférica, por alrededor de 2 horas, con un remojo previo de 18 horas y el punto final de la cocción se determina sensorialmente (los granos deben ser fácilmente deshechos entre los dedos). Las condiciones de tratamiento podrían explicar el que haya variaciones en los contenidos esperados debido a las diferencias entre las variedades.

Los valores obtenidos para las muestras cocidas en porcentaje de almidón resistente, se encuentran entre 3.80-5.50% que se encuentran dentro del intervalo indicado por Baljeet S et al., 2009 y por Fabbri et al. 2016.

En comparación con otras leguminosas como el frijol mungo (5.70 ± 0.08), caupí (3.55 ± 1.29) y la soya (0.10 ± 0.01), se puede observar que las variedades desarrolladas en el INIFAP presentan un buen valor de almidón resistente

Eashwarage et al., 2017), además de que sus valores podrían estar relacionados con la cantidad de amilosa presente en la muestra debido a que en estudios realizados por Khongsak en 2013, indican que ambos son proporcionales con respecto a la prevalencia que presentan en la semilla de la porción del almidón.

Para predecir el comportamiento de un producto de frijol en aplicaciones de alimentos, es importante saber en qué proporción se encuentran las moléculas que componen el almidón total, obteniendo los valores de almidón soluble y almidón resistente presente en las variedades de frijol. Sin embargo, hay que tener presente que la microbiota intestinal juega un papel clave en el metabolismo del almidón resistente, la cual tiene el último efecto sobre estos compuestos.

10.4 Amilosa/Amilopectina

Para las muestras de frijol crudas (Tabla 10) se observa que la variedad que presenta un menor porcentaje de amilosa es el frijol negro var. bola.

Tabla 10. Porcentaje de amilosa para nuevas variedades de frijol del INIFAP y el frijol negro variedad Bola.

Muestras	g de amilosa/100g de muestra seca		g de amilopectina/100g de muestra seca*	
	Crudas	Tratamiento térmico	Crudas	Tratamiento térmico
Frijol Negro var. Bola	8.90±0.89	10.21±0.78	45.46	46.55
Negro 8025-1	10.69±0.72	17.27±1.28	46.07	43.01
Negro albicampo	13.16±0.52	32.75±1.56	43.57	20.5
Negro primavera 3	14.06±0.46	19.55±1.51	40.63	39.6
Flor de mayo M-38	14.24±0.27	24.85±0.44	44.80	32.06
Flor de durazno 2	14.63±0.96	24.93±0.57	39.25	32.44
Bayo azteca	25.20±1.35	36.87±1.30	38.20	21.18

*Se obtuvo la cantidad de amilopectina por diferencia entre el porcentaje de almidón total obtenido y el porcentaje de amilosa

La detección específica de amilosa, al ser enzimática, requiere que el sustrato sea disponible para la reacción que se lleva a cabo en medio acuoso y esto necesita una completa gelatinización del almidón para hacerlo más disponible.

La baja proporción de amilosa detectada en la var. Negro Bola, por ser una variedad con un almacenamiento de aproximadamente dos años (comunicación personal con el Ing. Bojorge), podría deberse a que las fracciones lineales de amilosa hayan formado puentes de hidrógeno intermoleculares, creando zonas

“cristalinas” impenetrables al agua y por lo tanto a la enzima, lo que bloquea su acción resultando en una menor detección. Estudios realizados demuestran que entre más cantidad de amilosa presenten los alimentos, menor será su grado de gelatinización, consecuentemente las enzimas digestivas no llegan a degradar los enlaces glucosídicos del almidón con tanta facilidad, y por ende, su índice glicémico resulte bajo (Dipnaik K. & Kokare P., 2017).

Las variedades que presentan un mayor contenido de amilosa, una vez sometidas a tratamiento térmico son las variedades Bayo Azteca y Negro Albicampo, con valores de 36.87 ± 1.30 y 32.75 ± 1.56 % amilosa, respectivamente.

Se calculó la cantidad de amilopectina por diferencia entre el porcentaje de almidón total y el porcentaje de amilosa obtenido. Esta diferencia se debe a que, en el ensayo enzimático a partir del almidón total, se utiliza la lectina concanavalina A para precipitar la amilopectina; una vez precipitada, la cantidad de amilosa se encuentra en solución y es hidrolizada por la amiloglucosidasa; una vez hidrolizada reacciona con el reactivo de glucosa oxidasa-peroxidasa que aporta un color el cual puede ser medido espectrofotométricamente.

10.5 Identificación de pectina

Debido a que diversos autores indican la presencia de pectina en muestras de frijol, se decidió aplicar un ensayo enzimático que utiliza la enzima pectato liasa, encontrada principalmente en hongos y bacterias, cuya acción por beta eliminación forma una doble ligadura al reaccionar con la pectina que se detecta a 235 nm (Anthon et al., 2002).

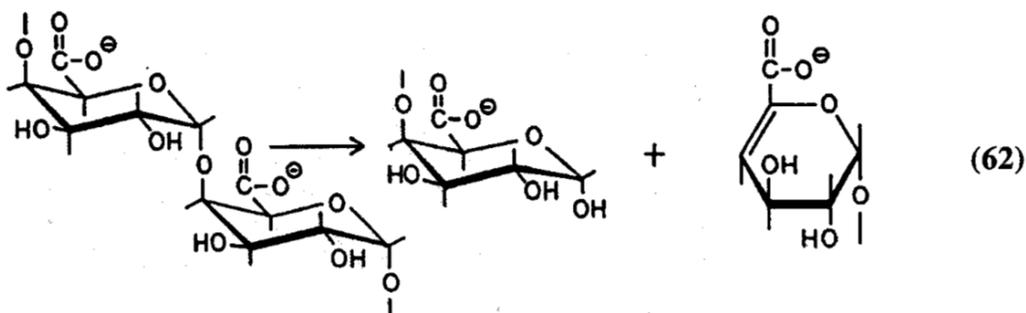


Figura 10. Acción de la enzima pectato liasa sobre la pectina (Willats et al., 2006)

Como se observa en la Tabla 12 en las muestras crudas la cantidad de pectina reportada como producto insaturado, por la acción de la pectato liasa, se encuentra en muy baja proporción comparada con los estándares que proporciona el Kit de Megazyme (Tabla 11), siendo muy cercano a los valores obtenidos para carragenina.

Tabla 11. Estándares del Kit de Megazyme (Producto Insaturado)

Estándar	Producto Insaturado (M) 10^{-7}
Carragenina	35±6.15
Pectina de baja esterificación	1900±118
Pectina de alta esterificación	2200±111
Pectina de remolacha	600±6.15
Pectina amidada de bajo éster	1500±81.5

Para el caso de las muestras sometidas a tratamiento térmico, se puede observar lo mismo, ya que, en comparación con las muestras estándar, se encuentran en una muy baja concentración.

Tabla 12. Producto insaturado de nuevas variedades de frijol del INIFAP y el frijol negro variedad Bola

Muestras	Producto insaturado (M) 10 ⁻⁷	
	Crudas	Tratamiento térmico
Frijol Negro Var. Bola	86.9±0.00	54.3±1.53
Negro 8025-1	13.0±4.61	21.7±0.00
Negro Albicampo	11.9±4.61	19.5±1.54
Negro Primavera 3	16.3±1.53	21.7±3.07
Flor de mayo M-38	13.0±3.07	97.8±4.61
Flor de durazno 2	11.9±1.53	65.2±6.14
Bayo Azteca	18.4±1.53	11.9±1.53

En estudios reportados por Blancas en 2001 se obtuvieron valores de pectina de 1.4% a 3.8% (p/p), precipitada con etanol en un ensayo indirecto. Sin embargo, el estudio realizado en este proyecto fue enzimático por lo que es una detección específica.

Respecto al tratamiento térmico culinario Blancas en 2001 indica que, si se lleva a cabo un remojo previo a la cocción, se tiene un efecto sobre las pectinas, haciendo que disminuyan su peso molecular; esto se aúna a un posterior tratamiento térmico y las pectinas son disueltas y permiten el ablandamiento del tejido.

Los resultados son considerados despreciables por la baja actividad que se obtuvo en el ensayo, y aunque algunos autores indican la presencia de este compuesto en la semilla de frijol (Blancas, 2001), no se pudo comprobar su presencia en las variedades desarrolladas por el INIFAP para este proyecto.

10.6 Actividad antioxidante

Las plantas sintetizan fitoquímicos que pueden mostrar bioactividad. Algunos de ellos son responsables de la pigmentación de los alimentos y son capaces de atribuirles una acción anti-patogénica mientras promueven el crecimiento y desarrollo de la planta (Khoddami et al., 2013). Los polifenoles son compuestos activos en las leguminosas, principalmente en los frijoles, regulando algunos receptores celulares y enzimas involucradas en la oxidación de moléculas (King A. & Young G., 1999). El color de la testa de algunos frijoles (variedades negras), indican la presencia de compuestos fenólicos (antocianinas), los cuales tienen una repercusión benéfica a la salud, presentando funciones como compuestos antidiabéticos, anticarcinogénicos, antiinflamatorios y ayudan al control de la obesidad (Chung et al., 2008; Jenkins et al., 2007). Los polifenoles y antocianos son fitoquímicos que contienen una estructura bioactiva de unidades fenólicas. Estos compuestos, además, se encuentran en frutas, cereales, vegetales, leguminosas, especias, aceites, etc. Su principal función es como antioxidante, la cual previene enfermedades degenerativas como cáncer y síndromes metabólicos (Ganesan et al., 2017). Es importante considerar que el efecto de los polifenoles en la salud, va muy relacionado con la cantidad consumida en la dieta y su biodisponibilidad y la interacción con la microbiota intestinal.

Para evaluar la actividad antioxidante de las variedades de frijol estudiadas se realizaron dos estudios: determinación de fenoles totales y de flavonoides totales. Se utilizaron como estándares el ácido tánico y gálico para fenoles totales y la quercetina para la determinación de flavonoides totales.

10.6.1 Fenoles totales

Por el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965; Singleton & Lamuela-Raventos, 1999) y utilizando el ácido tánico y ácido gálico para preparar una curva estándar (r^2 : 0.99 para ambos casos), se procedió a evaluar la cantidad de fenoles totales que pudiesen estar presentes en las variedades de frijol desarrolladas.

En el Tabla 13, se observa que las variedades de frijol Negro 8025-1, Negro Albicampo y Flor de durazno muestran una cantidad de equivalentes de ácido

gálico y tánico mayor que las demás variedades. Los resultados obtenidos provienen de extractos hechos con metanol y ácido clorhídrico (80:20), como lo reportan Chang (2007) y Cao (1997) quienes reportan valores en frijoles negros en un intervalo de 0.10-2.31 mg de ácido gálico/ g muestra (Chang et al., 2007; Cao et al., 1997). En el presente estudio, se obtuvieron valores en un intervalo de 0.08 a 3.5 mg de ácido gálico/g muestra y de 1.7 a 5.0 mg de ácido tánico/g muestra.

Tabla 13. Fenoles totales expresados en mg de ácido gálico o mg de ácido tánico por gramo de muestra de nuevas variedades de frijol del INIFAP y del frijol negro variedad Bola.

Muestras	mg de ácido gálico/ g muestra seca		mg de ácido tánico/ g de muestra seca	
	Crudas	Tratamiento térmico	Crudas	Tratamiento térmico
Frijol negro var. Bola	1.85±0.01	2.42±0.08	3.24±0.02	4.26±0.15
Negro 8025-1	3.40±0.01	0.89±0.06	5.99±0.02	1.53±0.11
Negro albicampo	2.92±0.16	0.94±0.06	5.14±0.28	1.62±0.10
Negro primavera 3	2.42±0.09	0.96±0.01	4.25±0.16	1.67±0.02
Flor de mayo M-38	2.23±0.02	1.21±0.05	3.91±0.04	2.10±0.09
Flor de durazno 2	3.09±0.26	1.02±0.06	5.45±0.47	1.77±0.10
Bayo azteca	1.78±0.06	0.99±0.04	3.12±0.12	1.71±0.06

Los valores de fenoles totales resultan superiores si se expresan como ácido tánico. Sin embargo, los reportes encontrados sobre la capacidad antioxidante de frijoles negros acostumbran solo expresarlos como ácido gálico. La molécula del ácido tánico tiene una mayor capacidad antioxidante, de acuerdo con Chen et al. 2007, lo que podría explicar los valores encontrados.

Entre los ácidos fenólicos que se han reportado en la bibliografía presentes en frijoles, se puede encontrar el ácido ferúlico, p-cumárico y el ácido sinápico (Sosulski & Dabrowski, 1984). En este estudio el interés fue conocer la capacidad antioxidante, por lo que no se diferencia entre estas moléculas y se expresa su capacidad en términos, generales como ácido gálico/ácido tánico.

Para el caso de las muestras sometidas a tratamiento térmico su capacidad antioxidante se encuentra reportada en la Tabla 13. Cabe mencionar que los fenoles son compuestos susceptibles a los tratamientos térmicos, por lo que los valores, aunque resultaron menores que para las muestras crudas, siguen estando en cantidades importantes para el consumidor, como se denota en la tabla 13.

La variedad que mostró el valor más alto de contenido de fenoles fue la variedad negro Bola, que sabemos que estuvo almacenada por un tiempo indefinido y que mostró más fibra y otras características que se explican por un almacenamiento prolongado. Además, con esta variedad hubo dificultades para eliminar las tonalidades oscuras en los extractos requeridos para la cuantificación de fenoles, lo que puede influir en mayores absorbancias. La otra posibilidad es que los fenoles polimerizados durante el almacenamiento produzcan una mayor capacidad antioxidante, fenómeno que se ha observado *in vitro* de acuerdo con Rice-Evans y colaboradores en 1997.

Al comparar las muestras de variedades de frijol crudas con las sometidas a tratamiento térmico, se observa una disminución en la cantidad de fenoles totales. Es necesario consumir este alimento después de su cocción para eliminar los compuestos tóxicos y anti nutricionales.

Los alimentos más conocidos por su alto contenido de ácidos fenólicos son la cebolla, arándanos y moringa (Tabla 14). Los valores obtenidos para las variedades de frijol cocidas son equiparables con estos alimentos, lo que podría ser un motivo más para revalorizar el consumo de esta leguminosa.

Aunado a esto, la preparación de los frijoles en la gastronomía mexicana incluye cebolla, por lo que el consumo del alimento junto con demás ingredientes, puede aumentar la cantidad de fenoles totales, que tiene repercusiones positivas en cuestiones de salud, lo que se ha confirmado con estudios epidemiológicos realizados en el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) por la Dra. Lizbeth López Carrillo (2014), como se mencionó anteriormente.

Tabla 14. Alimentos con alto contenido de fenoles totales.

Alimento	mg de ácido gálico/g muestra	Referencia
Cebolla morada	1.41-4.67	X. Lu et a., 2011
Arándanos (mora azul)	4.90-8.20	Luke R. et al.,2003
Morínga	0.72-1.32	Boonyadist V. et al.,2013

Considerando que la testa de los frijoles está fuertemente pigmentada por antocianinas, se procedió a realizar un estudio para cuantificar flavonoides totales.

10.6.2 Flavonoides totales

Estos compuestos al igual que los ácidos fenólicos, poseen actividades biológicas, reportados como antioxidantes, antimutagénicos, anticancerígenos e hipoglucemiantes.

Para la curva de calibración se utilizó la quercetina, que en varios estudios se ha demostrado que está presente en variedades de *Phaseolus vulgaris* L. (Long Z. et al., 2007), además de presentar un actividad antiinflamatoria que se ha demostrado en modelos animales (Manjeet et al., 1999; Orsolic et al., 2004).

Para las muestras crudas (Tabla 15) los contenidos de flavonoides que presentan van desde los 0.3-2.8 mg de quercetina/g muestra; comparados con estudios anteriores, los valores obtenidos se encuentran dentro del intervalo reportado para otras variedades de frijol negro por Long en 2007 que va desde los 0.12 a 4.12 mg de quercetina/g de muestra.

Tabla 15. Flavonoides totales expresados como mg de quercetina por gramo de muestra de nuevas variedades de frijol del INIFAP y el frijol negro variedad Bola.

Muestras	mg de quercetina/g de muestra seca	
	Crudas	Tratamiento térmico
Frijol Negro var. Bola	2.27±0.02	0.96±0.04
Negro 8025-1	2.82±0.09	2.01±0.12
Negro albicampo	2.19±0.02	1.97±0.02
Negro primavera 3	1.65±0.09	1.30±0.05
Flor de mayo M-38	2.51±0.05	1.96±0.00
Flor de durazno 2	1.49±0.05	0.91±0.04
Bayo azteca	0.77±0.02	0.55±0.00

Los flavonoides en los frijoles se encuentran primordialmente en la testa y hay trazas en los cotiledones. Es importante recalcar que las variedades de frijol que presentan un mayor contenido de flavonoides son las variedades de Negro 8025-1, Negro Albicampo y Flor de mayo; esto se puede atribuir a que las primeras dos variedades presentan un color negro-morado que indica la presencia de otros flavonoides (antocianinas); para la variedad de Flor de Mayo (ver Tabla 3), se puede atribuir un valor alto, por la cantidad de proantocianidinas de la testa (Cao et al., 1997).

Una vez sometidas a tratamiento térmico, se volvió a evaluar la cantidad de flavonoides totales presentes, obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 15, en la cual se muestra una disminución promedio del 20% de quercetina de la cantidad presente en muestras crudas; sin embargo, la muestra de referencia que es el frijol de bola, presenta la disminución más marcada (casi del 50%), atribuyéndola a los dos tratamientos térmicos que le fueron aplicados (cocido y secado en tambor rotatorio).

Estudios demuestran que los compuestos de flavonoides que en la naturaleza se encuentran glicosilados son hidrolizados en la boca por la presencia de la enzima beta-glucosidasa de la microbiota (Grajek, 2007). La mayor hidrólisis de estos compuestos se produce en el intestino delgado por acción de β -glucosidasas

intestinales, seguido por la difusión pasiva a través de los enterocitos, así como por β -glucosidasas citosólicas (CBG) en las células epiteliales (Donovan et al., 2006). Tras atravesar las vellosidades intestinales, los polifenoles sufren metabolismo hepático, pasan a la circulación sistémica y finalmente se eliminan por la bilis o en la orina.

10.7 Inhibidores de tripsina

Este tipo de inhibidores de proteasas son frecuentes en algunas plantas de valor alimenticio. En especial las leguminosas presentan inhibidores de tripsina, donde la mayor proporción se manifiesta en la semilla.

Las nuevas variedades de frijol estudiadas presentan como característica principal la resistencia a plagas y otros organismos que pudieran comprometer la vida de la planta, por lo que, desde el punto de vista de alimentos, es importante conocer la cantidad de inhibidores de tripsina en las seis variedades de frijoles antes y después de su tratamiento térmico, para con ello aportar información sobre la resistencia que pueda presentar ante las plagas, y una vez que son sometidos a tratamiento térmico, qué tanto de estos inhibidores de tripsina siguen presentes después de la cocción. Los resultados se muestran en la Tabla 16, para la determinación de inhibidores de tripsina, expresados como UIT/mg de muestra.

Tabla 16. Inhibidores de tripsina presentes en las variedades de frijol desarrolladas en el INIFAP.

Muestras	UIT/ mg de muestra	
	Crudas	Tratamiento térmico
Negro Albicampo	55.91±0.17	22.51±0.04
Negro Primavera 3	57.30±0.31	20.35±0.05
Negro 8025-1	66.81±0.32	19.36±0.05
Flor de durazno 2	61.53±0.22	17.27±0.07
Flor de mayo M-38	71.97±0.18	26.61±0.12
Bayo Azteca	60.75±0.18	21.88±0.07

Como era de esperarse, al someter a un tratamiento térmico la semilla, la cantidad de inhibidores de tripsina se ve reducida, obteniendo un valor máximo de 26.61 UIT/ mg de muestra para la variedad Flor de Mayo. Este valor es lo suficientemente bajo para garantizar una buena eficiencia proteínica (Salinas, 2014, Hernández, 2018, comunicación personal Amanda Gálvez).

Los inhibidores presentes en el frijol son de carácter competitivo, de modo que pueden unirse a los sitios activos de la tripsina de la misma manera que lo haría el sustrato de la enzima, resultando en un bloqueo del sitio activo de la tripsina para

hidrolizar la proteína que se encuentre en los alimentos consumidos en ese momento, llevando a una baja Eficiencia Proteínica (Bilbao- Reboledo et al., 2000). Después del tratamiento térmico, los valores determinados en las muestras resultan más altos, comparados con lo reportado por Gómez en 1990, cuyos valores se encuentran entre los 7-9 UIT/mg de muestra, atribuyéndolo a que durante el tratamiento térmico se pueden reducir significativamente la actividad inhibitoria, pero no se logra eliminarla por completo. Esta actividad residual, puede atribuirse al método de cocción utilizado en el proyecto, además de la presencia de factores termoestables (Morrison et al., 2007; López-Barrera, 2011). Uno de los factores termoestables que pueden presentar estas variedades de frijol, son los inhibidores de Bowman-Birk, que pueden ser resistentes a los jugos gástricos y enzimas proteolíticas, en comparación con los de Kunitz que pueden ser fácilmente inactivados por calor y jugos gástricos. El inhibidor Bowman-Birk, inhibe tanto a tripsina como la quimitripsina (Huisman J, 1990; Jansman AJM et al., 1998), y su estabilidad se debe a la configuración de su sitio activo, el cual cuenta con la presencia de siete puentes disulfuro, mientras que el inhibidor de Kunitz solo posee dos puentes disulfuro que lo hacen más sensible a los tratamientos térmicos (Mansilla, 2011). Los frijoles presentan en su mayoría, del tipo Kuntiz (Olivia et al., 2010).

11 CONCLUSIONES

- De acuerdo a la cantidad de proteína y la información brindada por el INIFAP, las variedades Bayo Azteca, Negro Albicampo y Negro Primavera 3, presentan un contenido mayor de proteína, antes y después de ser sometidos a tratamiento térmico, en comparación con las demás variedades. Sin embargo, todas las variedades contienen una cantidad buena de proteína, por lo que el frijol en general puede seguir siendo recomendado para suplir la deficiencia proteínica en los sectores de la población que la requieran, y en general para cualquier persona que desee utilizarla como una fuente alterna a las proteínas animales.
- Los valores de carbohidratos aumentan al someterlos a tratamiento térmico, pudiéndose atribuir este comportamiento a la gelatinización del almidón que facilitan las detecciones enzimáticas.
- La variedad Negro Albicampo en los ensayos de almidón total, almidón resistente, amilosa y pectina, presenta los mayores valores, aún después de ser sometida a tratamiento térmico, por lo que se puede considerar la mejor variedad en cuestiones de disponibilidad de carbohidratos una vez sometidos a la acción enzimática y con una alta cantidad de fibra.
- Las variedades Flor de Mayo M-38 y Bayo Azteca, disminuyen sus compuestos de almidón total y almidón resistente, después de ser sometidas a tratamiento térmico; sin embargo, siguen siendo variedades que pueden aportar energía y fibra en su consumo.
- La cantidad de pectina en ambos casos (crudos y cocidos) se encuentra en muy bajas cantidades.
- Las variedades que presentan una mayor cantidad de fenoles totales son: Negro 8025-1, Negro Albicampo y Flor de durazno; sin embargo, todas las variedades pueden ser consideradas como altas en fenoles totales, en comparación con los alimentos que el público conoce como altos en estos compuestos, pudiendo proporcionar los mismos beneficios de salud.
- En la determinación de flavonoides totales, las variedades que presentan un mayor contenido son: Negro 8025-1, Negro Albicampo y Flor de Mayo M-38.

La variedad Negro Albicampo resultó con una alta actividad antioxidante en las dos determinaciones realizadas, por lo que aunado a las determinaciones de fracciones de carbohidratos, resulta una de las variedades más recomendable en términos de potencial nutracéutico.

- Los inhibidores de tripsina en todas las variedades se ven reducidos en un 40% después de ser sometidos a un tratamiento térmico, pero alcanzan niveles inocuos para la alimentación de animales de laboratorio y de las personas.

12 PERSPECTIVAS

- Evaluar las propiedades antioxidantes de las variedades de frijol negro en un estudio biológico.
- Evaluar las propiedades tecnológicas que tenga la proteína de cada una de estas variedades, así como en la aplicación del desarrollo de un producto alimenticio.
- Diseñar nuevos alimentos con ingredientes derivados de compuestos de frijol, con el fin de aumentar su consumo.

13 BIBLIOGRAFÍA

- Alcázar-Alay [2015]. Physicochemical properties, modifications and applications of starches from different botanical sources. Food Science Technology, ISSN 0101-2061.
- Andarwulan, Nuri & Faridah, Didah & Sylvia Prabekti, Yolanda & Fadhilatunnur, Harum & Mualim, Leo & Aziz, Sandra & Cisneros-Zevallos, Luis. [2003] "Dietary fiber content of dry and processed beans". Food Chemistry, v. 80, n. 3, p. 231-235. *L. (Leguminosae)*. Legume Perspectives 2, 5-7.
- Anthon, G.E., Sekine, Y., Watanabe, N. and Barrett, D.M. [2002]. Thermal inactivation of pectin methyl esterase, polygalacturonase, and peroxidase in tomato juice. J. Agric. Food Chem. 50:6153–6159.
- AOAC [2005] Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists. 18th Edition, Washington, DC.
- Aparicio-Fernandez et al., [2005]. "Characterization of Polyphenolics in the seed Coat black Jamapa Bean (*Phaseolus vulgaris* L.)". J. Agric. Food Chem, 53, 4615-4622
- Aparicio-Fernández y Espinosa [2015]. "El consumo de leguminosas y el efecto sobre la salud". XII Encuentro. Participación de la Mujer en la Ciencia.
- Bakar, Jamilah & Saeed, Mohamed & A. Abbas, K & Abdul Rahman, Russly & Karim, Roselina & M. Hashim, D. (2009). Protein-starch interaction and their effect on thermal and rheological characteristics of a food system: A review. J. Food Agric. Environ. 7
- Baljeet S et al., [2009]. Studies on effect of multiple heating/cooling cycles on the resistant starch formation in cereals, legumes and tubers. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 60 (S4):258-272.
- Bardocz et al. [1996]. The effect of phytohaemagglutinin at different dietary concentrations on the growth, body composition and plasma insulin of the rat. British Journal of Nutrition, v. 4, p.613-626

- Beninger CW, Hosfield GL [2003].” Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions, and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color genotypes.” Journal of Agricultural Food Chemistry.;51:7879–7883.
- Blancas Hugo [2001]. Tesis que para obtener el título de Químico en Alimentos. Estudio de las Modificaciones en la pectina que ocurren durante el reomajo de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). UNAM, Facultad de Química.
- Boonyadist V. et al. [2013]. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of Moringa oleifera leaf extract by the appropriate extraction method. Industrial Crops And Products 44 566-571.
- Bourges [1987]. “Las leguminosas en la alimentación humana (1ra parte).” Cuadernos de Nutrición;10(1):17-32
- Bourges, H. (2001) “Glosario de términos” en Cuadernos de Nutrición. 24: 28-32.
- Bourges, H. [2000], "Modernización de la dieta mexicana", en III Foro sobre seguridad y soberanía alimentaria, Academia Mexicana de Ciencias,3.
- Boyd, W.C. and Shapleigh, E. [1954] Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). Science, 119, 419
- Cao, G. et al.[1997] Antioxidant capacity and prooxidant behavior of flavonoids: structure–activity relationships. Free Radical Biology and Medicine, 22, 749–760
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. [2007]. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis, 10, 178-182.
- Chung, H. J.; Liu, Q.; Pauls, K. P.; Fan, M. Z.; Yada, [2008] “*In vitro* starch digestibility, expected glycemic index and some physicochemical properties of starch and flour from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in Canada”. Food Research Interational, Oxford, v. 41, n. 9, p. 869-875.

- CONABIO. [2011]. Frijol (*Phaseolus vulagris*). 2018, de CONABIO Sitio web: <https://www.biodiversidad.gob.mx/usos/alimentacion/frijol.html>
- Cos P., Ying L., Calomme M., Hu JP., Cimanga K., Van Poel B., Pieters L., Vlietinck AJ., Vanden Berghe D. [1998]. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod.*61:71–76.
- Costa G.E. de A. Queiroz-Monici, K. da S. Reis, S.M.P.M. Oliveira, A.C. de [2006]. Chemical composition, dietary fiber and resistant starch contents of raw and cooked pea, common vean, chickpea and lentil legumes. *Food Chem* 94:327-330.
- De Mejía Guzmán-Maldonado SH, Acosta-Gallegos JA, Reynoso-Camacho R, Ramírez-Rodríguez E, Pons-Hernández JL, González-Chavira MM, Castellanos JZ, Kelly JD.[2003] Effect of cultivar and growing location on the trypsin inhibitors, tannins, and lectins of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in the semi arid highlands of Mexico. *J. Agric. Food Chem.* 51:5962-5966.
- De Mejía, E.; Castaño-Tostado, E. and Loarca-Piña, G. [1999]. Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans. *Mutat. Res.* 441:1-9
- Delgado-Salinas, A. O. [2014]. La historia natural del frijol (*Phaseolus*). In: el frijol. Un regalo de México al mundo. Fundación Herdez. www.fundacionherdez.com.mx.17-18 pp.
- Dipnaik K. & Kokare P. [2017]. Ratio of Amylose and Amylopectin as indicators of glycemic index and in vitro enzymatic hydrolysis of starches of long, médium and short grain rice. *International Journal of Research in Medical Sciences.* Vol.5 Issue 10. 4502-4505.
- Doesburg J. J. [1965]. Pectic Substances in fresh and preserved fruits and vegetables. Institute for Research on Storage and Processing of Horticultural Produce: Wageningen, The Netherlands.
- Donovan, J. L., Manach, C., Faulks, R. M., and Kroon, P. A. [2006]. Absorption and metabolism of dietary plant secondary metabolites. In A.

Crozier, M. N. Clifford, and H. Ashihara (Eds.), Plant secondary metabolites. Occurrence, structure and role in the human diet (pp. 303-341). Oxford: Blackwell Publishing.

- Elizabeth et al. [2007]. Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds in three different color groups of common beans cultivars. Food Chem. 103, 521-527
- Englyst et al. [1992]. "Classification and measurement of nutritionally important starch fractions." Eur J. Clin Nutr. 46:S33-S50
- FAO [2008]. Plan estratégico de la cadena productiva de maíz y frijol. [En línea]
<http://www.fao.org/fsnforum/sites/default/files/discussions/contributions/a00039.pdf>
- Feenstra, W.J. [1960]. Seed Coat Color in *Phaseolus vulgaris* L., Its Chemistry and Associated Health Related Benefits Meded. Landbouwhogeschool Wageningen 60-2:1-53.
- Foster-Powell et al [2002]. International table of glycemic index and glycemic load values. The American Journal of Clinical Nutrition. En línea www.ajcn.org.
- French, D. [1969]. Physical and chemical structure of starch and glycogen., en Carbohydrates and their roles, Ed. H.W. Schultz et al., The Avi Publishing, Westport, Conn.
- Galván, M. et al. [2007] "Assesing phytochemical intake in a group of Mexican women", Salud Pública México, 49(2), pp. 126-13.
- Gálvez Mariscal, A. y G. Salinas, [2015] "El papel del frijol en la salud nutrimental de la población mexicana", en *Revista Digital Universitaria*, Sitio web: <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num2/art12/>.
- Gálvez Mariscal, A. y Héctor Bourges Rodríguez. [2012] "La alimentación en la Ciudad de México", en: Los riesgos para la Salud en la vida de una Megametrópolis. Memoria I. México: UNAM, Facultad de Medicina, Seminario sobre Medicina y Salud, 2012. pp. 366-403, México.

- Ganesan, K.; Xu, B. [2017] A critical review on polyphenols and health benefits of black soybeans. *Nutrients* , 9.
- García, E., and Lajolo, F. M. [1994]. Starch alterations in hard-to-cook beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Agric. Food Chem.* 42:612-615.
- Gómez et al. [1998]. Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants. *Free Radic* ;31:S11–S18.
- Grajek et al. [2007]. The effect of antioxidative vitamins supplementation on oxidative DNA damage and carcinogenesis. *WNT Warszawa*, 277-282
- Granito, M., Paolini, M. and Pérez, S. [2008]. “Polyphenols and antioxidant capacity of *Phaseolus vulgaris* stored under extreme conditions and processed.” *LWT – Food Science and Technology* 41: 994–999.
- Gutiérrez, J.et al. [2012], Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales, Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.
- Guzmán Maldonado, H. Jacinto-Hernández C. Castellanos Z. J. [1995]. Manual de metodologías para evaluar calidad del grano de frijol. SAGAR INIFAP CIRCE. Tema didáctico Núm. 2, 77 p
- Guzmán-Maldonado, et al. [1998] Hábitos preferenciales de los consumidores de frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) en México. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 47(2):163- 167
- Halliwell B., [1996].Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr. Review*, 1 Pt 2: S44-9.
- Heimler D Pamela Vignolini, Maria Giulia Dini, and Annalisa Romani.[2005]. Rapid tests to asses the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris L.*, dry beans. *J Agri Food Chem* 53:3053-6
- Henningson, Nyman EM, Björck IM. [2001]. Content of short chain fatty acids in the hindgut of rats fed processed bean (*Phaseolus vulgaris*) flours varying in distribution and content of indigestible carbohydrates. *Br. J. Nutr.* 86:379–89.

- Hincks, M. J., and D. W. Stanley. [1987]. Lignification: evidence for a role in hard-to-cook beans. *J. Food Biochem.* 11:41.
- Hoover R, Ratnayake WS (2002). Starch characteristics of black bean, chick pea, lentil, navy bean and pinto bean cultivars grown in Canada. *Food Chem.* 78:489-498
- Hoover, R et al. [2010]. Composition, Molecular Structure, Properties, and Modification of Pulse Starches: A review. *Food Research International.* 43, 399–413.
- Hughes & Swason. [1989]. Soluble and Insoluble Dietary Fiber in Cooked Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Food Structure: Vol 8: No. 1, Article 4*
- Huisman J [1990] Antinutritional Effects of Legume Seeds in Piglets, Rats and Chickens. PhD thesis, Wageningen Agricultural University, The Netherlands.
- J.J. Rackis. [1981]. Flatulence Caused by Soya and Its control through Processing. *The Journal of the American oil Chemists society.* Vol. 58, No.3. 503-510.
- Jaffar E. [2010]. Molecular aspects on the interaction of quercetin and its metal complexes with DNA. *International Journal of Biological Macromolecules.* Vol.48. 227-233.
- Jansman AJM et al. [1998] Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds and rapeseed. In: *Proceedings of the 3rd International Workshop on 'Antinutritional Factors in Legume Seed and Rapeseed'*. Wageningen, July 1998. Wageningen: Wageningen Pers.
- Jenkins DJA, Kendall CWC, Marchie A, Jenkins AL, Augustin LSA, Ludwig DS, Barnard ND, Anderson JW. [2007]. Type 2 diabetes and the vegetarian diet. *Am J Clin Nutr* 78:610S–6S.
- Jenkins, A.L. The glycemic index: Looking back 25 years. *Cereal Foods World* 2007, 52, 50–53.
-

- Kakade M., Rackis J., McGhee J., Puski G. [1973]. Determination of Trypsin Inhibitor Activity of Soy Products: A Collaborative Analysis of an Improved Procedure. American Association of Cereal Chemists. Paul Minnesota. 376-382.
- Khoddami Wilkes MA, Roberts TH. [2013]. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*, 18,2328-2375.
- Kigel, J.[1999] "Culinary and nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* seeds as affected by environmental factors." *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, v. 3, n. 4, p. 205-209.
- King, A. and Young, G.[1999]. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J. Am. Diet. Assoc.* 99(2):213-218.
- Klomklao, S., Benjakul, S., Kishmura, H., & Chaijan, M. (2011). Extraction, purification and properties of trypsin inhibitor from Thai mung bean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek). *Food Chemistry*, 129(4), 1348-1354.
- Lajolo, F. M., & Genovese, M. I. [2002]. Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6592-6598.
- Liener I E [1989]. Antinutritional factors in legume seeds: the state of the art. *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds* (Huisman J, van der Poel T F B and Liener I E: Editors) Pudoc, Wageningen, The Netherlands pp6-13
- Lima Sánchez S. [2018]. Tesis para obtener el grado de Química en Alimentos. Tratamiento térmico de la producción de un concentrado de proteína de frijol (*Phaseolus vulgaris*): Desactivación de inhibidores de tripsina. UNAM, Facultad de Química.
- Lin, CH, et al. [2008]. "The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)". *Food Chem.*, 107: 399-410.
- Long Z. et al. [2007]. The polyphenolic profiles of common vean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Food Chem.* 107(1):399-410.
- Lopez O. [1993]. "Hard-to-cook phenomenon in common beans a review". *Crit Rev Food Sci Nutr.* 33(3):227-86.

- Luke R. et al. [2003]. Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83: 1238-1247.
- Madhusudhan & Tharanathan, [1995]. Legume and cereal starch- why differences in digestibility?. Part 1. Isolation and composition of legume (Green gram and Bengal gram) starches. *Stärke*, 47:165-171.
- Manjeet, K.R.; Ghosh, B. [1999] Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production in murine macrophages. *Int. J. Immunopharmacol.*21, 435–443.
- Margreet R. Olthof, Peter C. H. Hollman, Tom B. Vree and Martijn B. Katan. [2000]. Bioavailabilities of Quercetin-3- Glucoside and Quercetin-4*- Glucoside Do Not Differ in Humans¹. *American Society for Nutritional Sciences.*, 0022-3166/00, 1200-1203. *De Human Nutrition and Metabolism— Research Communication.*
- Márquez-Mota, Rodríguez-Gaytan, Pauline Adjibade, Rachid Mazroui, Gálvez Amanda, Granados Omar, Tovar Armando and Torres Nimbe. [2016]. The mTORC1-Signaling Pathway and Hepatic Polyribosome Profile Are Enhanced after the Recovery of a Protein Restricted Diet by a Combination of Soy or Black Bean with Corn Protein. Claudia C. Márquez-Mota, *Nutrients* 2016, 8, 573; doi:10.3390/nu8090573.
- Miles, M.J., V.J. Morris, P.D. Orford, and S.G. Ring (1985). The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch. *Carbohydrate Research* 135:271–281.
- Montoya, C. A., Leterme, P., Victoria N.F., Toro O., Souffrant, W.B., Beebe, S., Lallès J.P. [2008]. Susceptibility of phaseolin to in vitro proteolysis is highly variable across common bean varieties (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.56(6):2183-2191.
- Nancy Espinoza-García , Raquel Martínez-Martínez , José L. Chávez-Servia, Araceli M. Vera-Guzmán , José C. Carrillo-Rodríguez¹ , Elena Heredia-García y Vicente A. Velasco-Velasco.[2016]. Contenido de minerales en

semilla de poblaciones nativas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Rev. Fitotec. Mex. Vol. 39 (3): 215 - 223

- Nugent, A. P. [2005]. Health properties of resistant starch. Nutrition Bulletin, 30(1), 27-54. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-3010.2005.00481.x>
- Olivia M., Silva M., Sallai R., Brito M., Sampaio M. [2010]. A novel subclassification for Kunitz proteinase inhibitors from leguminous seeds. Biochimie. Vol. 92 Issue 11. 1667-1673.
- Orsolich, N.; Knezevic, A.H.; Sver, L.; Terzic, S.; Basic, I. [2004] Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. J. Ethnopharmacol. 94, 307–315.
- Ovando-Martínez, Osorio Díaz, Whitney K., Bello-Pérez.[2011]. Effect of the cooking on physicochemical and starch digestibility properties of two varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under different water regimes. Food Chem. 129:358-365
- Phillips RD, Baker EA [1987] Protein nutritional quality of traditional and novel cowpea products measured by in vivo and in vitro methods. J Food Sci 52(3): 696–701.
- Rawe, K. et al. [2012]., A life free from hunger. Tackling child malnutrition (Report), Save the Children Foundation, UK, pp. 1-116.
- Rodríguez, R. A. J. -Fernández-Bolaños J. -Guillén R. -Heredia A [2006]:. Dietary Fibre from Vegetable Products as a Source of Functional Ingredients. Trends in Food Sciences and Technology, 17, pp. 3-15
- Romani A, Vignolini P, Galardi C, Mulinacci N, Benedettelli S, Heimier D. [2004]. Germplasm characterization of Zolfino landraces (*Phaseolus vulgaris* L.) by flavonoid content. Journal of Agricultural Food Chemistry. ;52:3838–3842.
- Rosin P. Lajolo F., Menezes E. [2002]. Measurement and characterization of dietary starches. Journal of Food Composition and Analysis, 15, 367–377.
- Salinas Gabriela [2014]. Tesis que para obtener el título de Química de Alimentos. Caracterización funcional de un aislado de proteínas de frijol

negro (*Phaseolus vulgaris*) variedad INIFAP-8025 y su aplicación en formulaciones de alimentos. UNAM, Facultad de Química.

- Samman N., Maldonado S., Alfaro M., Farfán N., Gutiérrez J.[1999].Composition of different bean varieties (*Phaseolus vulgaris*) of northwestern Argentina (region NOA): cultivation zone influence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, n. 7, p. 2685-2689.
- Sandberg A. [2002]. Bioavailability of minerals in legumes. *British Journal of Nutrition* Vol. 88, Suppl., 3. 281-285.
- Shahidi, F & Nacak. (2004) Functional Foods: Their Role in Health Promotion and Disease Prevention. *Journal of Food Science*, 69, 146-149.
- Sharma,[2006]. "Genetic diversity of two Indian common bean germplasm collections based on morphological and microsatellite markers".*Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 11("):121-130.
- Siddiq M., Ravi R., Harte J.B., Dolan K.[2010]. "Physical and Functional characteristics of selected dry vean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours. *LWT-Food Sci & Technol* 43:232-237
- Silva-Cristobal, Osorio-Díaz, Tovar J.[2010]. Chemical composition, carbohydrate digestibility, and antioxidant capacity of cooked black bean, chickpea, and lentil Mexican varieties. *Journal of Food*, 8:1, 7-14, DOI: 10.1080/19476330903119218
- Singleton VL., Lamuela-Raventos RM. [1999]. Analysisi of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299:152-78.
- Singleton VL., Rossi JA, [1965]. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult* 16: 144-58.
- Sosulski & Dabrowski, [1984]. Composition of free and hydrolyisable phenolic acids in the flours and hulls of ten legue species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32, 131-133
- Srisuma, N., R. Hammerschmidt, M. A. Uebersax, S. Ruengsakulrach, M. R. Bennink, and G. L. Hosfield. 1989.Storage induced changes of phenolic

acids and the development of hard-to-cook defect in dry beans (*Phaseolus vulgaris* var. *Seafarer*). *J. Food Sci.* 54:311.

- Srisuma, N.; Hammerschmidt, R.; Uebersax, M. A.; Ruengsakulrach, S.; Bennink, M. R.; Hosfield, G. L. [1989]. Storage induced changes of phenolic acids and the development of hard-to-cook in dry beans (*Phaseolus vulgaris*, var. *Seafarer*). *J. Food Sci.* 54, 311-314, 318
- Subedi, A., P. Chaudhary & B. Sthapit. [2014]. Conservación y Uso Sostenible de la Biodiversidad Agrícola. CIP-UPWARD: Filipinas.
- Tarko T., Chodak D., Satora P., Sroka P., Tuszyński T. [2013]. The profile of polyphenols and antioxidant properties of selected apple cultivars grown in Poland. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research.* 18, 39–50
- Terahara, N., M. Oda, T. Matsui, Y. Osajima, N. Saito, K. Toki, and T. Honda [1996]. Five new anthocyanins, ternatins A3, B4, B3, B2, and D2, from *Clitoria ternatea* flowers. *J. Nat. Prod.* 59:139–144.
- Tharanathan [2002] Food-Derived Carbohydrates — Structural Complexity and Functional Diversity, *Critical Reviews in Biotechnology*, 22:1, 65-84, DOI: 10.1080/07388550290789469
- Thompson DB (2000) On the non-random nature of amylopectin branching. *Carbohydr Polym* 43:223–239
- Tovar & Melito [1996]. Steam-cooking and dry heating produce resistant starch in legumes. *J. Agric Food Chem* 44:2642-2645
- Tunland, B.C. and Meyer, D. [2002] Non-Digestible Oligo and Polysaccharides (Dietary Fibre): Their Physiology and Role in Human Health and Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1, 73-92.
- Ulloa J., Ulloa R., Ramírez-Ramírez, Carrillo S., Quintero R. [2007]. Modelling of hydration of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Effect of the low frequency ultrasound. *Italian Journal of Food Science* 29(2):288-301.

- Van't Veer , Jansen MC, Klerk M, Kok FJ.[2000]. Fruits and vegetables in the prevention of cancer and cardiovascular disease. Public Health Nutrition 3(1), 103-107
- Willats, W.G.T., Knox, J.P., Mikkelsen, J.D.[2006] Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. Trends Food Sci. Technol. 17, 97.
- Xiaonan Lu, Jun Wang, Al Qadiri Hamzah, Ross Carolyn, Joseph R., Juming Tang, Barbara A. [2011]. Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of onion (*Allium cepa*) and shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy. Food Chemistry 129 637-644.
- Zhang P., Whistler R., Bemiller J., Hamaker B.[2006] Banana starch: production, physicochemical properties, and digestibility: a review. Carbohydrate Polymers, v. 59, p. 443-458, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.10.014>
- Zhou J., Martin RJ, Tulley RT, Raggio AM, McCutcheon KL, Shen L, Danna SC, Tripathy S, Hegsted M, Keenan MJ. [2004] Dietary resistant starch upregulates total GLP-1 and PYY in a sustained day-long manner through fermentation in rodents. Am J Physiol Endocrinol Metab.;295(5): E1160–1166.

Páginas web:

- C. Mary. [2014]. Niacin. 6 noviembre 2018, de Cancer Care of Western New York Sitio web: <https://www.cancercarewny.com/content.aspx?chunkid=125267>
- Food News Latam. [2016]. Brasil y México desarrollan frijoles con mayor contenido de ácido fólico. 2108, de Food News Sitio web: <http://www.foodnewslatam.com/paises/85-mexico/4339-brasil-y-m%C3%A9xico-desarrollan-frijoles-con-mayor-contenido-de-%C3%A1cido-f%C3%B3lico.html>
- INSP [2014], “80 mil millones de pesos, costos de obesidad y sobrepeso”, [En línea] <http://www.insp.mx/avisos/2697-obesidad-mexico-costos-impacto-salud.html>

- Lara Miguel [2015]. El cultivo de frijol en México. Revista Digital Universitaria. 1 de febrero del 2015, Vol.16, Núm. 2, ISSN 1607-6079. En línea: <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num2/art09/art09.pdf>
- Jenniffer L. [2011]. Beans: Protein-Rich Superfoods. High fiber and antioxidants aren't just for the waistline, they may aid in disease prevention, too. [En línea]: <https://www.webmd.com/diet/features/beans-protein-rich-superfoods#1>
- Panorama Agroalimentario. Dirección de investigación y evaluación Económica y Sectorial. [2016]. Frijol 2016. [En línea] https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200638/Panorama_Agroalimentario_Frijol_2016.pdf
- Olmedilla, Pedrosa MM, Cuadrado C, Brito M, Asensio-S-Manzanera C, Asensio-Vegas C. [2010] Composition of two Spanish common dry beans (*Phaseolus vulgaris*), "Almonga" and "Curruquilla", and their postprandial effect in type 2 diabetics. SCI. [En línea] <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jsfa.5852>
- SAGARPA [2017]. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. Frijol Mexicano. [En línea] https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256428/B_sico-Frijol.pdf