UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DESARROLLO DE BOTANA FUNCIONAL DE TERCERA GENERACIÓN ELABORADA CON INGREDIENTES AUTÓCTONOS: MAÍZ AZUL (*Zea mays* L.) Y FRIJOL AYOCOTE (*Phaseolus coccineus* L.)

Por

VICTOR ANDRÉS AYALA RODRÍGUEZ

Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTORADO EN MANEJO Y APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE RECURSOS BIÓTICOS

2026

DESARROLLO DE BOTANA FUNCIONAL DE TERCERA GENERACIÓN

ELABORADA CON INGREDIENTES AUTÓCTONOS: MAÍZ AZUL

(*Zea mays* L.) Y FRIJOL AYOCOTE (*Phaseolus coccineus* L.)

Comité de Tesis



Dr. Carlos Abel Amaya Guerra
Presidente



Dra. Minerva Bautista Villareal
Secretaria



Dra. Sandra L. Castillo Hernández
Vocal



Dr. Juan Gabriel Báez González
Vocal



Dr. Aldo Rodrigo González Luna
Vocal



Dra. Kathushka Arévalo Niño
Subdirectora de Posgrado

SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

DESARROLLO DE BOTANA FUNCIONAL DE TERCERA GENERACIÓN ELABORADA CON INGREDIENTES AUTÓCTONOS: MAÍZ AZUL (*Zea mays* L.) Y FRIJOL AYOCOTE (*Phaseolus coccineus* L.)

Dirección de Tesis



Dr. Carlos Abel Amaya Guerra
Director de Tesis



Dr. Jesús Alberto Vázquez Rodríguez
Director externo

AVISO DERCHOS DE AUTOR

DERECHOS RESERVADOS© PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación no habría sido posible sin el apoyo de diversas instituciones y organismos que contribuyeron de manera significativa en su desarrollo.

En primer lugar, agradezco profundamente a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), sede académica en la que realicé el programa de Doctorado. Extiendo también mi reconocimiento a la Facultad de Salud Pública y Nutrición (UANL), donde se llevaron a cabo parte de los experimentos que enriquecieron este proyecto.

De igual forma, agradezco al Tecnológico de Monterrey, en especial al Centro de Biotecnología FEMSA, por las facilidades brindadas en el uso de su laboratorio, donde se realizaron los procesos de extrusión.

Mi gratitud se extiende a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua, que me abrió sus puertas durante la estancia de investigación realizada en el año 2024, experiencia que fortaleció los alcances de este trabajo.

Reconozco también el apoyo recibido en la Incubadora de Biotecnología del Instituto de Innovación y Transferencia de Tecnología de Nuevo León (I2T2), en el PIIT, a través de la Convocatoria “Estímulo al Emprendimiento de Base Tecnológica en las Incubadoras del I2T2 2025”, cuyo respaldo fue esencial para la consolidación de este proyecto.

Finalmente, expreso mi agradecimiento al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo otorgado en el marco de sus programas para la formación de investigadores y científicos, los cuales representan un pilar fundamental en el desarrollo de la ciencia en México.

A todas estas instituciones, mi más sincero reconocimiento por haber sido parte esencial en el desarrollo y conclusión de este trabajo de investigación.

DEDICATORIAS

A Dios.

…Sea bendito el nombre de Dios desde la eternidad hasta la eternidad; porque suya es la sabiduría y el poder. Y Él cambia los tiempos y las sazones; quita reyes, y pone reyes; da la sabiduría a los sabios, y la ciencia a los entendidos.

Dn 2:20 - 21

ÍNDICE

ÍNDICE ..... **III**
ÍNDICE DE TABLAS ..... **VI**
ÍNDICE DE FIGURAS ..... **VIII**
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS ..... **X**
RESUMEN **1**
ABSTRACT **2**
I. INTRODUCCIÓN **3**
II. ANTECEDENTES **5**
2.1 BOTANAS COMO PRODUCTOS ALIMENTICIOS DE CONVENIENCIA 5
2.1.1 Consumo *5*
2.1.1.1 Implicaciones metabólicas del consumo de botanas convencionales 6
2.2 EXTRUSIÓN COMO TECNOLOGÍA DE TRANSFORMACIÓN DE MATRICES ALIMENTARIAS 7
2.2.1 Parámetros del sistema de extrusión *7*
2.2.2 Parámetros independientes *8*
2.2.3 Parámetros del sistema *8*
2.2.4 Parámetros de salida *9*
2.3 BOTANAS EXTRUIDAS 9
2.3.1 Clasificación según el proceso de elaboración *9*
2.3.1.1 Botanas de tercera generación 10
2.3.1.2 Proceso de expansión y propiedades tecno funcionales 10
2.3.2 Formulaciones típicas para botanas de tercera generación *11*
2.4 MATERIAS PRIMAS ALTERNATIVAS PARA BOTANAS EXTRUIDAS 12
2.4.1 Maíz azul (Zea mays) *12*
2.4.1.1 Contenido nutrimental 13
2.4.1.1.1 Antocianinas del maíz azul 14
2.4.2 Frijol ayocote (Phaseolus coccineus) *15*
2.4.2.1 Contenido nutrimental 16
2.4.2.1.1 Factores antinutricionales 17
2.5 PROPIEDADES TECNOFUNCIONALES, ESTRUCTURALES Y POTENCIAL BIOACTIVO EN SISTEMAS CEREAL CON LEGUMINOSA EXTRUIDOS 19
2.5.1 Complementariedad cereal con leguminosa: perfil de aminoácidos y calidad proteica *19*
2.5.2 Modificaciones estructurales inducidas por el procesamiento *20*
2.5.2.1 Microestructura y organización estructural 20
2.5.3 Efecto del procesamiento sobre compuestos de interés nutricional y potencial bioactivo *21*
2.5.3.1 Antocianinas 22
2.5.3.1.1 Estructura y clasificación de antocianinas 22
2.5.3.1.2 Estabilidad de las antocianinas durante el procesamiento por extrusión 23
2.5.3.2 Acido fítico 23
2.5.3.2.1 Estructura e interacciones fisicoquímicas del ácido fítico 23
2.5.3.2.2 Estabilidad del ácido fítico durante el procesamiento por extrusión 24
2.5.4 Digestibilidad y fracción con potencial bioaccesible in vitro *25*
2.6 IMPORTANCIA DEL DESARROLLO DE BOTANAS SALUDABLES 27
III. JUSTIFICACIÓN **29**

IV. HIPÓTESIS 31
V. OBJETIVO DEL TRABAJO 31
5.1 Objetivo general 31
5.2 Objetivos particulares 31
VI. MATERIAL Y MÉTODOS 33
6.1 Diseño del estudio 33
6.2 Área de trabajo 33
6.3 Objetivo particular 1: Elaboración de extruidos 35
6.3.1 Obtención de las materias primas 35
6.3.2 Acondicionamiento de las materias primas para la extrusión 35
6.3.3 Proceso de extrusión 36
6.4 Objetivo particular 2: Propiedades nutrimentales y tecnofuncionales 36
6.4.1 Proceso de expansión por microondas 36
6.4.2 Índice de expansión 37
6.4.3 Densidad aparente 37
6.4.4 Textura 38
6.4.5 Índice de absorción de agua e índice de solubilidad en agua 38
6.4.6 Parámetros de color 39
6.4.7 Análisis proximal 40
6.5 Objetivo particular 3: Calidad nutrimental y proteica 40
6.5.1 Perfil de aminoácidos 40
6.5.2 Puntaje de aminoácidos y aminoácido limitante 41
6.5.3 Relación de eficiencia proteica estimada 41
6.5.4 Simulación estática in vitro de la digestión gastrointestinal 41
6.5.5 Digestibilidad aparente in vitro de la materia seca 43
6.5.6 Digestibilidad proteica in vitro 43
6.5.7 Puntaje de aminoácidos corregido por digestibilidad proteica in vitro 44
6.6 Objetivo particular 4: Efecto en compuestos bioactivos 45
6.6.1 Contenido fenólico total 45
6.6.2 Actividad captadora de radicales DPPH y ABTS 45
6.6.2.1 Ensayo DPPH 46
6.6.2.2 Ensayo ABTS 46
6.6.2.3 Curva de calibración y expresión de resultados 46
6.6.3 Antocianinas monoméricas totales 47
6.6.4 Determinación de ácido fítico 48
6.7 Objetivo particular 5: Análisis microestructural 49
6.7.1 Evaluación de cambios en el perfil proteico mediante electroforesis SDS-PAGE 49
6.7.1.1 Preparación de las muestras 49
6.7.1.2 Preparación de geles y corrida electroforética 49
6.7.1.3 Tinción y análisis de bandas 50
6.7.1.4 Análisis de imágenes 50
6.7.2 Microscopía Electrónica de Barrido 50
6.7.3 Difracción de rayos X 50
6.7.4 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier 51
6.8 Objetivo particular 6: Evaluación sensorial 51
6.9 Análisis estadístico 52
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 54

7.1 Objetivo particular 1: Elaboración de extruidos....54
7.1.1 Desarrollo del producto y establecimiento de las condiciones de extrusión....54
7.2 Objetivo particular 2: Propiedades nutrimentales y tecnofuncionales....56
7.2.1 Proceso de expansión por microondas....56
7.2.2 Índice de expansión, densidad aparente, textura, índice de absorción de agua e índice de solubilidad en agua....60
7.2.3 Parámetros de color....65
7.2.4 Análisis proximal....67
7.3 Objetivo particular 3: Calidad nutrimental y proteica....69
7.3.1 Perfil de aminoácidos, puntaje de aminoácidos, aminoácido limitante y relación de eficiencia proteica estimada....69
7.4 Objetivo particular 4: Efecto en compuestos bioactivos....73
7.4.1 Digestibilidad aparente in vitro de la materia seca, digestibilidad proteica in vitro y puntuación de aminoácidos corregida por digestibilidad proteica in vitro....73
7.5 Objetivo particular 4: Efecto en compuestos bioactivos....77
7.5.1 Compuestos fenólicos totales, antocianinas monoméricas totales y actividad antioxidante (DPPH y ABTS)....77
7.5.2 Ácido fítico....83
7.6 Objetivo particular 5: Análisis microestructural....87
7.6.1 Evaluación de cambios en el perfil proteico mediante electroforesis SDS-PAGE....87
7.6.1.1 Maiz azul....88
7.6.1.2 Frijol ayocote....92
7.6.2 Microscopía Electrónica de Barrido....98
7.6.3 Difracción de rayos X....103
7.6.4 Análisis por Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier con reflectancia total atenuada....107
7.7 Objetivo particular 6: Evaluación sensorial....112
7.7.1 Aceptabilidad sensorial....112
7.7.2 Preferencia del consumidor e intención de consumo y compra....114
VIII. CONCLUSIONES....116
IX. PERSPECTIVAS....117
LIMITACIONES DEL ESTUDIO....118
X. BIBLIOGRAFÍA....119
XI. APÉNDICE....133
Apéndice 11.1 Formato de consentimiento informado....133
XII. RESUMEN BIOGRÁFICO....145
XIII. ARTÍCULOS....146

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Formulaciones típicas para botanas de tercera generación…….	12
2	Composición nutrimental de genotipos de maíz nativo (*Zea mays*) de México……..	14
3	Contenido de antocianinas y compuestos fenólicos de genotipos de maíz nativo (*Zea mays*) de México…….	14
4	Composición nutrimental de semillas secas y crudas por especies *Phaseolus*……..	16
5	Contenido de compuestos fenólicos, antocianinas y actividad antioxidante *in vitro* de semillas secas y crudas de especies *Phaseolus*……..	17
6	Composición de los fluidos digestivos simulados. Las concentraciones se expresan en milimolar (mM)……	42
7	Desarrollo del producto y establecimiento de las condiciones de extrusión para la elaboración de botanas de tercera generación a base de maíz azul (*Zea mays* L.) y frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.)……...	54
8	Efecto del enriquecimiento con *Phaseolus* coccineus sobre la expansión por microondas de botanas extruidas de maíz azul (*Zea mays*) a diferentes tiempos de exposición……...	62
9	Efecto del enriquecimiento con *Phaseolus coccineus* sobre los parámetros de color CIELAB (L*, a*, b*) de botanas extruidas de maíz azul (*Zea mays*), antes y después de la expansión por microondas…….	65
10	Perfil nutrimental de harinas crudas y mezclas extruidas de maíz azul (*Zea mays* L.) y frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.)…….	67
11	Perfil de aminoácidos y calidad de la proteína de harinas crudas, harinas extruidas y mezclas maíz–frijol, expresado en g/100 g de proteína, en comparación con el patrón de referencia de la FAO (2013) para niños mayores, adolescentes y adultos…….	70
12	Digestibilidad aparente *in vitro* de la materia seca (A-IVDMD), digestibilidad proteica *in vitro* (IVPD) y puntuación de aminoácidos corregida por digestibilidad proteica *in vitro* (IV-PDCAAS) de	73

harinas crudas y mezclas extruidas de maíz azul (*Zea mays* L.) y frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.)……..

13 Peso molecular (kDa) de las proteínas identificadas mediante SDS-PAGE en la harina cruda de maíz azul……. 89

14 Peso molecular (kDa) de las proteínas identificadas mediante SDS-PAGE en la harina cruda de frijol ayocote……... 94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Esquema simplificado del proceso de extrusión y su sistema de múltiples entradas y múltiples salidas…….....	8
2.	Categorías de los compuestos antinutricionales en leguminosas….....	18
3.	Subdivisión de los flavonoides en diferentes subclases……..……	25
4.	Esquema general de trabajo……...	34
5.	Morfología de los pellets obtenidos durante el desarrollo del producto…….	55
6.	Cinética de expansión por microondas de pellets extruidos de maíz azul y formulaciones enriquecidas con *Phaseolus coccineus*……...	58
7.	Comparación fotográfica de botanas extruidas de maíz azul (*Zea mays*) enriquecidas con diferentes niveles de *Phaseolus coccineus* (10–45%) y expandidas por microondas…….……...	59
8.	Contenido total de fenoles (mg GAE/g BS); Actividad captadora del radical DPPH (µmol TE/g BS); Actividad captadora del radical ABTS (µmol TE/g BS); y Contenido total de antocianinas (mg C3G/100 g BS) en mezclas crudas, mezclas extruidas y mezclas extruidas y expandidas de maíz azul y *Phaseolus coccineus*…….....	78
9.	Contenido de ácido fítico (mg/g MS) de harinas crudas y extruidas y expandidas elaboradas con maíz azul (*Zea mays*) y diferentes proporciones de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*)…….……..	84
10.	Perfil electroforético SDS-PAGE de las proteínas presentes en muestras de maíz azul sometidas a diferentes tratamientos……..…..	88
11.	Proteínas identificadas mediante el software GelAnalyzer 26.1 en la harina cruda de maíz……	89
12.	Perfil electroforético SDS-PAGE de las proteínas presentes en muestras de frijol ayocote sometidas a diferentes tratamientos……	93
13.	Proteínas identificadas mediante el software GelAnalyzer 26.1 en la harina cruda de frijol ayocote…….	94
14.	Micrografías de barrido electrónico (SEM) de maíz azul (*Zea mays*) de frijol ayocote morado (*Phaseolus coccineus*) el extruido no expandido de maíz azul enriquecido con 30% de *P. coccineus*……	99

15. Perfiles de difracción de rayos X (XRD) de botanas extruidas de maíz azul enriquecidas con *Phaseolus coccineus*, que muestran cambios en la cristalinidad del almidón según el nivel de inclusión. 103

16. Espectros ATR-FTIR de las materias primas y formulaciones extruidas de maíz azul enriquecidas con *Phaseolus coccineus*…..…. 108

17. Perfil sensorial de botanas de tercera generación expandidas por microondas, elaboradas con maíz azul y diferentes niveles de sustitución con *Phaseolus coccineus* (30, 40 y 45%)……..… 112

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Símbolo / Abreviatura	Significado
°C	Grados Celsius
A-IVDMD	Digestibilidad aparente *in vitro* de la materia seca
AAS	Puntaje de aminoácidos (*Amino Acid Score*)
ABTS	Ácido 2,2′-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATR	Reflectancia total atenuada
C3GE	Cianidina-3-glucósido equivalente* (o Cianidina-3-glucósido, según corresponda)
cm	Centímetro
CoA	Coenzima A
DE	Desviación estándar
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilhidracilo
E-PER	Relación de eficiencia proteica estimada (*Estimated Protein Efficiency Ratio*)
ET	Equivalentes de Trolox
FT-IR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
g	Gramo
GAE	Equivalentes de ácido gálico
h	Hora
Hz	Hertz
IE	Índice de expansión
InsP6 o IP6	Ácido fítico o *myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisfosfato
IVPD	Digestibilidad proteica *in vitro*
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramo
kV	Kilovoltio
L	Litro
M	Molaridad
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mol	Mol
MS	Materia seca
MW	Peso molecular (*Molecular Weight*)
µL	Microlitro

Símbolo / Abreviatura	Significado
μm	Micrómetro
μmol	Micromol
N	Newton
NBD	Nitrobenzofurazán
nm	Nanómetro
OPA	*o*-ftaldialdehído
PS	Peso seco
p	Peso
pH	Potencial de hidrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SDS–PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SGF	Fluido gástrico simulado
SIF	Fluido intestinal simulado
SSF	Fluido salival simulado
TPC	Contenido fenólico total
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
UV-Visible	Espectroscopía ultravioleta-visible
V	Voltio
v	Volumen
WAI	Índice de absorción de agua
WSI	Índice de solubilidad en agua
XRD	Difracción de rayos X

RESUMEN

La incorporación de materias primas con mayor aporte nutrimental constituye una alternativa para diversificar la oferta de botanas y mejorar su composición respecto a productos caracterizados por una elevada densidad energética y limitado valor nutricional. En este trabajo se desarrollaron botanas de tercera generación a base de maíz azul (*Zea mays* L.) y frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.), con el propósito de evaluar la influencia de la formulación y del procesamiento sobre sus propiedades nutrimentales, tecnofuncionales y estructurales, así como la aceptación sensorial de las formulaciones seleccionadas.

Se formularon mezclas con niveles de incorporación de frijol ayocote entre 10 y 45%, a partir de las cuales se obtuvieron pellets por extrusión que posteriormente fueron expandidos mediante microondas. La caracterización incluyó propiedades físicas y tecnofuncionales, composición proximal, perfil de aminoácidos, digestibilidad *in vitro* e indicadores de calidad proteica, además de compuestos fenólicos, antocianinas, ácido fítico y capacidad antioxidante *in vitro*. Las modificaciones estructurales se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), difracción de rayos X (XRD), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (ATR-FTIR) y electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). La aceptación de las formulaciones seleccionadas se determinó mediante una prueba sensorial con consumidores.

La incorporación de frijol ayocote aumentó el contenido de proteína, fibra dietética, lisina y el puntaje de aminoácidos. La extrusión favoreció la digestibilidad aparente *in vitro* de la materia seca, pero redujo la digestibilidad proteica y el puntaje de aminoácidos corregido por digestibilidad proteica *in vitro*. En la fase intestinal recuperada, la capacidad antioxidante mostró respuestas dependientes del método, mientras que las antocianinas, determinadas directamente en las muestras, disminuyeron con la extrusión y aumentaron parcialmente después de la expansión por microondas. Los análisis estructurales evidenciaron modificaciones en la organización de la matriz a diferentes niveles. En conjunto, la formulación y el procesamiento condicionaron las propiedades nutrimentales, tecnofuncionales, estructurales y de digestibilidad. Las formulaciones seleccionadas con 30–45% de frijol mantuvieron una aceptación sensorial favorable, demostrando la factibilidad tecnológica de incorporar ayocote en botanas de tercera generación a base de maíz azul.

ABSTRACT

The incorporation of ingredients with higher nutritional value represents an alternative for diversifying snack products and improving their composition compared with energy-dense products of limited nutritional value. In this study, third-generation snacks based on blue maize (*Zea mays* L.) and ayocote bean (*Phaseolus coccineus* L.) were developed to evaluate the influence of formulation and processing on their nutritional, techno-functional, and structural properties, as well as the sensory acceptance of the selected formulations.

Blends containing 10–45% ayocote bean were formulated and processed by extrusion to obtain pellets, which were subsequently expanded by microwave heating. Characterization included physical and techno-functional properties, proximate composition, amino acid profile, *in vitro* digestibility and protein quality indicators, as well as phenolic compounds, anthocyanins, phytic acid, and *in vitro* antioxidant capacity. Structural modifications were analyzed by scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), attenuated total reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR), and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Sensory acceptance of the selected formulations was assessed through a consumer test.

The incorporation of ayocote bean increased protein, dietary fiber, and lysine contents, as well as the amino acid score. Extrusion enhanced *in vitro* apparent dry matter digestibility but reduced protein digestibility and the *in vitro* protein digestibility-corrected amino acid score. In the recovered intestinal fraction, antioxidant capacity showed method-dependent responses, whereas anthocyanins, determined directly in the samples, decreased after extrusion and partially increased following microwave expansion. Structural analyses revealed modifications in matrix organization at different levels. Overall, formulation and processing influenced the nutritional, techno-functional, structural, and digestibility properties. Selected formulations containing 30–45% ayocote bean maintained favorable sensory acceptance, demonstrating the technological feasibility of incorporating ayocote bean into blue maize-based third-generation snacks.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónicas no transmisibles constituyen un desafío relevante para la salud pública mundial y su creciente prevalencia se relaciona, entre múltiples factores, con patrones de alimentación que incluyen un consumo elevado de productos ultraprocesados y energéticamente densos. Dentro de esta categoría, las botanas han adquirido una presencia importante en la dieta debido a factores como su accesibilidad, practicidad y aceptación. No obstante, muchos de estos productos se caracterizan por un elevado aporte de grasas y carbohidratos refinados, acompañado de cantidades limitadas de proteína y fibra dietética. Este panorama ha favorecido el interés por desarrollar botanas con una composición nutrimental mejorada mediante la incorporación de materias primas que aporten componentes de interés nutricional (Instituto Nacional de Salud Pública y Secretaría de Salud, 2022; Mielmann y Brunner, 2019; Shamah-Levy et al., 2024).

En este contexto, la extrusión se ha establecido como una tecnología versátil para la elaboración de botanas debido a su alta productividad, bajo consumo de aceite y capacidad para modificar las propiedades fisicoquímicas de los ingredientes. Particularmente, las botanas de tercera generación constituyen una alternativa de interés, ya que permiten incorporar ingredientes funcionales y utilizar métodos de expansión, como el calentamiento por microondas, para obtener productos con mejores características nutrimentales y tecnológicas respecto a las botanas fritas convencionales (Kantrong et al., 2022; Neder-Suárez et al., 2024; Shere y Agrawal, 2024).

El maíz azul (*Zea mays* L.) destaca entre los maíces nativos de México por su importancia alimentaria, cultural y nutrimental. Su empleo como materia prima para productos extruidos resulta de interés por su contenido de compuestos fenólicos, entre los que sobresalen las antocianinas por su capacidad antioxidante. Sin embargo, como ocurre con otros cereales, su proteína presenta un contenido limitado de lisina, aminoácido esencial que condiciona su calidad nutrimental cuando el maíz constituye la única fuente proteica de la formulación (Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura [FIRA], 2024; Sánchez-Madrigal et al., 2014).

La incorporación de leguminosas constituye una alternativa para complementar las limitaciones nutrimentales de los cereales. Entre ellas, el frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.), una especie nativa de México con limitado aprovechamiento industrial, destaca por su aporte de proteína, fibra dietética y lisina. Su combinación con cereales favorece un perfil de aminoácidos más equilibrado debido a la complementariedad entre ambas fuentes proteicas. No obstante, la inclusión de harinas

de leguminosas puede modificar el comportamiento de la matriz durante el procesamiento y, en consecuencia, propiedades como la expansión, textura y digestibilidad, además de la conservación de algunos de sus componentes y la aceptación sensorial del producto extruido (Aquino-Bolaños et al., 2021; Schmidt y Oliveira, 2023; Shevkani et al., 2019).

En este contexto, resulta necesario evaluar de manera integral las modificaciones asociadas con la incorporación de leguminosas y su procesamiento. Aunque se han estudiado productos extruidos elaborados con cereales y diferentes leguminosas, existe información limitada sobre botanas de tercera generación que combinen maíz azul y frijol ayocote y sobre los cambios nutrimentales, tecnofuncionales y estructurales asociados con su procesamiento y posterior expansión por microondas (Schmidt y Oliveira, 2023; Shevkani et al., 2019). Por ello, este estudio tuvo como objetivo desarrollar botanas de tercera generación elaboradas con maíz azul (*Zea mays* L.) y frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.), y evaluar la influencia de la formulación y del procesamiento sobre sus propiedades nutrimentales, tecnofuncionales y estructurales, así como la aceptación sensorial de las formulaciones seleccionadas.

II. ANTECEDENTES

2.1 Botanas como productos alimenticios de conveniencia

El número, tamaño y composición de los momentos de comida por día varían en el tiempo, la historia y la cultura. En las sociedades industrializadas modernas, la ingesta de alimentos se compone de comidas y botanas. El término "comida" generalmente se refiere a los tres principales momentos de alimentación del día, incluyendo el desayuno por la mañana, el almuerzo al comienzo de la tarde y la cena al comienzo de la noche. Por lo regular son en momentos relativamente predecibles y en lugares específicos, el término botana se refiere a otros momentos de alimentación e incluye todos los alimentos y bebidas consumidos fuera del contexto de las tres comidas principales. Las botanas son diferentes a las comidas en términos de perfil nutricional, tiempo y frecuencia de consumo (Dashti et al., 2019)

En México, el PROY-NOM-216-SSA1-2002, (2002) definió técnicamente las botanas como productos obtenidos a partir de materias primas como cereales, leguminosas, tubérculos, féculas, granos, frutas o semillas, entre otras, que pueden someterse a distintos métodos de procesamiento, incluidos la fritura, el horneado, la extrusión y el tostado, con la posibilidad de incorporar sal, otros ingredientes y aditivos alimentarios.

Las botanas son porciones pequeñas de alimentos simples, convenientes y fáciles de preparar que se pueden consumir entre las comidas regulares. Su consumo se describe como el acto de comer un refrigerio, independientemente de si se consumen opciones saludables. Estos bocadillos a menudo se venden en porciones predeterminadas, lo que inconscientemente sugiere una norma sobre cuánto se debe consumir. Esto lleva a que los consumidores a menudo tomen malas decisiones en términos de nutrición, lo que les impide evitar comer en exceso y mantener un peso corporal saludable (Mielmann y Brunner, 2019).

2.1.1 Consumo

La ingesta de botanas se ha incrementado de manera importante en distintos grupos de edad y regiones del mundo, reflejando cambios en los patrones alimentarios contemporáneos. En Estados Unidos, un análisis de las encuestas nacionales de consumo alimentario mostró que la prevalencia del consumo de botanas entre adultos aumentó del 71 % durante 1977–1978 al 97 % en el periodo 2003–2006, lo que refleja la creciente incorporación de estos alimentos en los patrones dietéticos

de la población. Asimismo, la frecuencia promedio de consumo se incrementó de 1.26 a 2.23 ocasiones por día, mientras que la contribución energética de estos alimentos a la ingesta total aumentó de 18 % a 24 % (Vatanparast et al. 2019). Estimaciones más recientes del programa *What We Eat in America* de NHANES (2017–2020), aproximadamente el 95 % de los adultos estadounidenses consumen al menos una botana en un día determinado, y cerca del 78 % reportan dos o más ocasiones de consumo diario, mientras que entre niños y adolescentes la prevalencia de consumo alcanza cerca del 93 %. En términos energéticos, los alimentos consumidos como botanas pueden aportar alrededor de una cuarta parte de la ingesta energética diaria (Hoy et al., 2024).

El consumo de botanas en México ha mostrado una tendencia creciente durante los últimos años. En 2013 se estimó una ingesta de 4 kg per cápita; además, estos productos estaban presentes en el 99.7% de los hogares y cerca de la mitad de los consumidores los adquiría más de 4.2 veces por semana (Procuraduría Federal del Consumidor [PROFECO] 2013). Para 2020, el consumo per cápita alcanzó 4.7 kg, reflejando un aumento en la demanda nacional pese al incremento en los precios registrado durante ese periodo (Aguilar 2021). Estimaciones posteriores sitúan el consumo de botanas saladas en aproximadamente 10.9 kg per cápita para 2025 y señalan a los productos elaborados a base de maíz entre los de mayor preferencia, con una participación cercana al 58% (Statista Market Forecast, 2025).

2.1.1.1 Implicaciones metabólicas del consumo de botanas convencionales

Las botanas de elevada densidad energética pueden contribuir a aumentar la ingesta diaria de energía cuando se consumen con frecuencia y formar parte de patrones alimentarios relacionados con enfermedades crónicas no transmisibles. En México, el exceso de peso continúa siendo un problema relevante de salud pública: la ENSANUT Continua 2023 registró una prevalencia de 76.2% entre los adultos. Paralelamente, el consumo habitual de botanas, dulces y postres permanece presente en la alimentación de niños y adolescentes (Shamah-Levy et al., 2024; ENSANUT, 2022).

Muchas botanas convencionales presentan cantidades elevadas de grasas, sodio y carbohidratos refinados, mientras que su aporte de micronutrientes y otros componentes de interés nutricional suele ser limitado. El consumo habitual de alimentos con estas características, dentro de patrones dietéticos de baja calidad, se ha relacionado con alteraciones metabólicas y procesos como la inflamación crónica de bajo grado y el estrés oxidativo, asociados a distintas enfermedades crónicas

no transmisibles (Di Domenico et al., 2019; Y. Zhou et al., 2021). Ante este panorama, la reformulación de botanas mediante materias primas con mayor aporte nutrimental constituye una alternativa para mejorar la composición de productos de consumo habitual (Hossain et al., 2025).

2.2 Extrusión como tecnología de transformación de matrices alimentarias

La extrusión se consolidó durante el siglo XX como una tecnología relevante para el procesamiento de alimentos. Durante este proceso, la matriz alimentaria es sometida simultáneamente a condiciones controladas de temperatura, presión y fuerzas de cizallamiento, para posteriormente atravesar una matriz que determina la geometría del producto. Una de sus principales ventajas es la integración de distintas operaciones en un mismo sistema, entre ellas mezclado, homogeneización, cocción, gelatinización, deshidratación, expansión y conformación del alimento (Bouvier y Campanella, 2014).

Durante la cocción por extrusión, la matriz alimentaria se somete durante periodos cortos a un tratamiento termomecánico en el que actúan simultáneamente temperatura, presión y cizallamiento. Estas condiciones modifican sus componentes y pueden provocar gelatinización del almidón, desnaturalización proteica e inactivación enzimática, con repercusiones sobre la digestibilidad y estabilidad del producto (Shere y Agrawal, 2024). Asimismo, el procesamiento puede disminuir la presencia o actividad de algunos factores antinutricionales y componentes indeseables, incluidos inhibidores de tripsina y determinadas enzimas, como lipasas y lipoxidasas, además de ciertos contaminantes naturales de las materias primas (Panak-Balentic et al. 2017).

2.2.1 Parámetros del sistema de extrusión

El proceso de cocción por extrusión transforma la materia prima en una masa caliente y fluida, cuyas propiedades físicas y estructurales continúan modificándose durante su paso por el extrusor hasta ser forzada a salir a través de la matriz. En esa etapa, la masa debe haber alcanzado la forma ideal para crear una estructura en el producto extruido. Esta transformación de las materias primas tiene un rango óptimo para la mayoría de los tipos de productos. La extrusión se puede considerar como un sistema de múltiples entradas y múltiples salidas (**Figura 1**). Varios parámetros de procesamiento de extrusión se pueden clasificar ampliamente en tres categorías: parámetros independientes (parámetros de entrada), parámetros del sistema (parámetros dependientes) y propiedades del producto (parámetros de salida) (Guy, 2016).

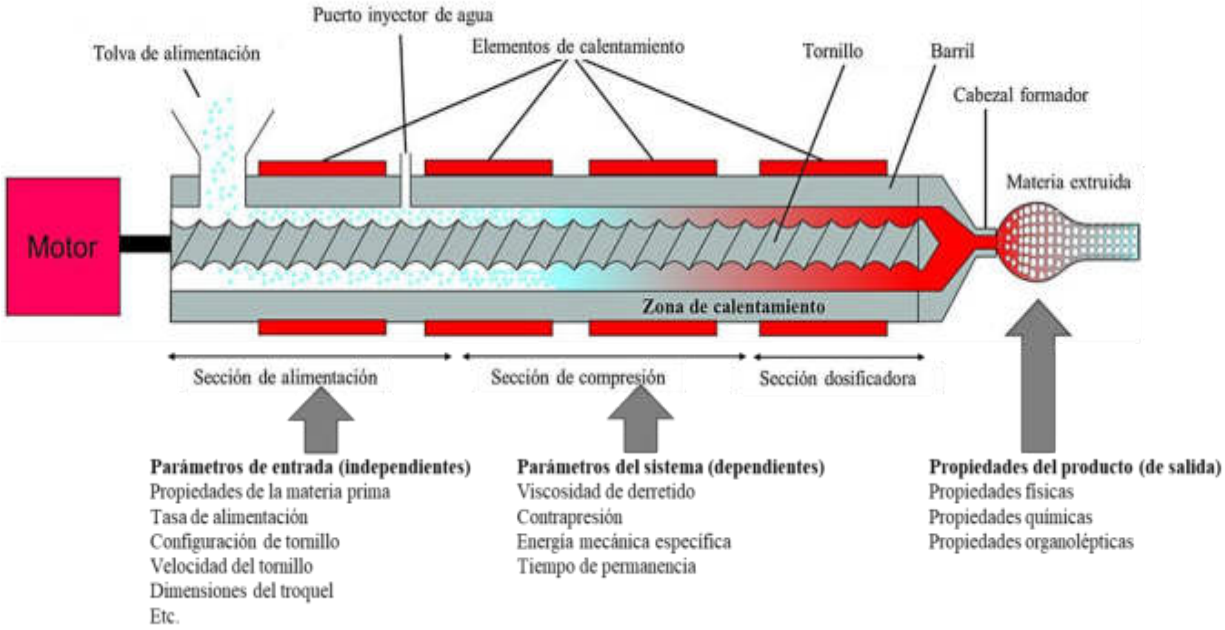


Figura 1. Esquema simplificado del proceso de extrusión y su sistema de múltiples entradas y múltiples salidas. Fuente: adaptado de Gu *et al.* (2017).

2.2.2 Parámetros independientes

Los parámetros de entrada son los parámetros sobre los que el operador de la extrusora tiene control directo. Estos incluyen las propiedades de la materia prima (ingrediente) y los parámetros de la operación de extrusión, como la velocidad de alimentación, las temperaturas del cilindro, las configuraciones del tornillo, las velocidades del tornillo, las dimensiones del troquel y otros. Al modificar los parámetros independientes, el operador puede lograr cambios en los parámetros del sistema y las propiedades del producto final (Saldivar, 2016).

2.2.3 Parámetros del sistema

Los parámetros dependientes son aquellos sobre los que el operador de la extrusora no tiene control directo, pero el operador puede influir en ellos cambiando los parámetros independientes. El tiempo de residencia medio, la distribución del tiempo de residencia, la contrapresión, el par motor y la energía mecánica específica que se aplica al material son los parámetros del sistema que se pueden medir. Estos afectan las propiedades del producto final, pero solo pueden modificarse indirectamente variando los parámetros independientes (Gu et al. 2017).

2.2.4 Parámetros de salida

Las propiedades del producto son parámetros que ayudan a describir la calidad final del producto extruido. Esto puede incluir propiedades físicas (relación de expansión, densidad, etc.), propiedades químicas (absorción de agua y solubilidad, etc.) y propiedades sensoriales (crujiente, crocante, textura, etc.). Describir el proceso de extrusión con el sistema múltiples entradas y múltiples salidas ayuda a controlar el proceso de extrusión para fabricar productos alimenticios de manera uniforme (Moscicki, 2016).

2.3 Botanas extruidas

La versatilidad de la extrusión permite obtener diversos alimentos, entre ellos botanas, cereales para desayuno, pastas, fideos y productos de proteína vegetal texturizada. En particular, la formulación de productos extruidos con ingredientes de mayor aporte nutrimental ha adquirido interés como estrategia para modificar su composición. Para este propósito se han incorporado materias primas ricas en proteína y fibra, como leguminosas y otras fuentes vegetales, así como diferentes harinas, frutas y hortalizas, tanto en productos terminados como en mezclas destinadas a procesos posteriores (Kosović et al. 2016).

La elaboración de botanas extruidas implica el transporte, la mezcla y la compresión de alimentos húmedos para formar masas que pueden extruirse como varillas simples o, en el caso de la pasta, como formas bien definidas. La base de esta tecnología es el sistema de tornillo, confinado dentro de un barril que transporta la masa hacia pequeñas aberturas al final del barril llamadas troqueles. En el espacio confinado del barril, la masa se comprime y se calienta a altas temperaturas, mientras se somete a altas presiones, antes de ser extruida a través de las matrices hacia la exterior. En la cocción por extrusión, una materia prima de polvos húmedos también se transporta, mezcla y comprime antes de darle forma en un troquel (Riaz 2019).

2.3.1 Clasificación según el proceso de elaboración

Las botanas pueden clasificarse de acuerdo con su proceso de elaboración en distintas generaciones. Las botanas de primera generación corresponden a productos obtenidos a partir de materias primas naturales con procesamiento mínimo, como palomitas de maíz, nueces o frutos secos. En contraste, la mayoría de las botanas comerciales actuales pertenecen a las botanas de segunda generación, las cuales se obtienen principalmente mediante procesos de extrusión directa que generan productos expandidos listos para su consumo después de etapas posteriores de secado

y sazonado. Una categoría más avanzada corresponde a las botanas de tercera generación, también conocidas como *pellets*, que se producen inicialmente como productos intermedios de alta densidad mediante extrusión. Estos *pellets* requieren un proceso adicional de expansión, que puede realizarse mediante fritura, horneado o microondas, para desarrollar su estructura final. Debido a su alta densidad aparente y menor contenido de humedad, estos productos presentan ventajas logísticas importantes, como mayor estabilidad durante el almacenamiento y facilidad para su empaque y transporte (Kantrong et al., 2022; Saldivar, 2016).

2.3.1.1 Botanas de tercera generación

En la elaboración de botanas de tercera generación, la extrusión se utiliza para producir *pellets* densos y estables que funcionan como intermediarios antes de la etapa de expansión. Las condiciones termomecánicas del proceso generan modificaciones en los componentes de la matriz alimentaria que pueden alterar la digestibilidad del almidón y las proteínas, la solubilidad de algunas fracciones de fibra y el contenido o actividad de determinados factores antinutricionales y enzimas oxidativas (Tovar-Jímenez et al. 2016).

Las botanas de tercera generación o "*pellets*" se refiere a un semi o medio producto que tiene una apariencia similar a un gel duro y muy denso. Este tipo de productos debido a que después de la cocción por extrusión se secan hasta un contenido de humedad estable, requiere un proceso adicional para inflarse o expandirse, como aceite caliente, inflado con aire caliente, microondas o calentamiento por infrarrojo como nuevas variantes. Después de la expansión, los productos se condimentan con varios tipos de especias y también se pueden saborizar antes de la expansión y ofrecerse como gránulos. Las botanas de tercera generación han cobrado interés debido a que se son fáciles de empaquetar y transportar y se pueden conservar por más tiempo que otras botanas. Estas botanas en gránulos se pueden vender como alimentos listos para consumir o se pueden vender directamente al consumidor para que los prepare en casa (Panak Balentic et al., 2018).

2.3.1.2 Proceso de expansión y propiedades tecno funcionales

Entre los diferentes métodos de expansión utilizados para pellets de tercera generación, la fritura ha sido históricamente el más empleado debido a su capacidad para generar una rápida expansión y una textura crujiente característica del producto final. Sin embargo, en años recientes se han explorado alternativas como el horneado, el aire caliente y la expansión por microondas,

principalmente con el objetivo de reducir el contenido de grasa y mejorar el perfil nutrimental de las botanas expandidas (Neder-Suárez et al., 2024).

Entre los métodos empleados para expandir *pellets*, el calentamiento por microondas constituye una alternativa basada en la generación rápida de calor dentro de la matriz. La absorción de energía por el agua presente en el producto favorece su vaporización y el incremento de la presión interna, lo que promueve la expansión y el desarrollo de una estructura porosa (Acurio et al., 2023). La magnitud de estos cambios depende de las condiciones previas y durante el calentamiento; particularmente, la humedad del *pellet* y el tiempo de exposición pueden modificar el grado de expansión, la densidad aparente y las características texturales del producto obtenido.

El índice de absorción de agua (WAI) y el índice de solubilidad en agua (WSI) son parámetros utilizados para caracterizar el comportamiento de hidratación de productos extruidos. El WAI refleja la capacidad de la matriz para retener agua, mientras que el WSI se relaciona con la proporción de componentes solubles liberados al medio. Ambos parámetros pueden modificarse como consecuencia de transformaciones ocurridas durante el procesamiento, entre ellas la gelatinización y fragmentación del almidón y los cambios en las proteínas, y contribuyen a describir las propiedades tecnofuncionales del producto obtenido (Jacquet et al., 2025).

La microestructura desarrollada durante la expansión se relaciona con el comportamiento tecnofuncional de los productos extruidos. Aspectos como el tamaño, la distribución y la uniformidad de las celdas pueden repercutir en propiedades físicas como la densidad y la textura, así como en la interacción de la matriz con el agua. De esta manera, las características del producto final reflejan tanto las transformaciones estructurales de la matriz como las condiciones empleadas durante su procesamiento(Osuna-Gallardo et al., 2023).

2.3.2 Formulaciones típicas para botanas de tercera generación

En su formulación se puede agregar y enriquecer con diferentes tipos de proteínas, como carne (camarones frescos, pollo, ternera), productos lácteos (sólidos lácteos, queso, yogur) y proteínas de leguminosas (soya, frijol, chícharo, haba) (**Tabla 1**). Se pueden emplear cantidades de hasta un 30-35% y aun así mantener la alta calidad del producto final. La harina de maíz azul también puede ser utilizada en la elaboración de estas botanas, con características fisicoquímicas de alta calidad, con los potenciales beneficios para la salud derivados de sus características nutrimentales (Kantrong et al., 2022; Panak Balentic et al., 2018).

Tabla 1. Formulaciones típicas para botanas de tercera generación

Objetivo tecnológico	Formulación base	Composición (% p/p)
Textura dura y crujiente	Formulación 1	92% maíz molido 5% almidón de maíz 0.5 % de monoglicérido 2.5% manteca líquida
	Formulación 2	94.5% harina de maíz o trigo 5% almidón de maíz o trigo 0.5 % de monoglicérido
Textura suave y esponjosa	Formulación 1	55% almidón de maíz 30% almidón de trigo 14% almidón de tapioca lecitina desaceitada al 1%
	Formulación 2	56% harina de maíz 27,5% almidón de trigo 14% almidón de tapioca 2.5 aceite vegetal
	Formulación 3	7% harina de trigo 9% harina de arroz 80% harina de tapioca 13% aceite vegetal 1% sal

Fuente: Modificado de Panak Balentic et al., (2018).

2.4 Materias primas alternativas para botanas extruidas

Las botanas extruidas se fabrican con mayor frecuencia a partir de mezclas populares a base de cereales, como maíz, trigo y arroz. Dependiendo de su calidad, el material debe ser molido y pesado correctamente, de acuerdo con la formulación, y mezclado completamente antes de iniciar el proceso. Si se requiere acondicionar, se agrega agua y/o vapor a la materia prima antes de mezclar (Panak Balentic et al., 2018). Para la elaboración de botanas extruidas, se pueden utilizar materias primas alternativas con un posible valor agregado como las leguminosas, o en algunos casos, subproductos alimenticios y/o variedades no explotadas comercialmente (Moscicki 2016).

Se puede seleccionar y agregar una amplia gama de materias primas para producir botanas de tercera generación de buena calidad. Para la formulación de nuevas recetas se debe contemplar que actualmente los consumidores se preocupan más por su salud, en consecuencia, se ha incrementado el interés hacia alimentos más naturales, orgánicos y producidos a partir de fuentes de materias primas más saludables que puedan aportar beneficios funcionales (Kantrong et al., 2022).

2.4.1 Maíz azul (*Zea mays*)

El maíz (*Zea mays* L.), especie perteneciente a la familia *Poaceae*, constituye uno de los cultivos de mayor importancia en la producción agrícola mundial. Durante 2024 se obtuvieron

aproximadamente 1.22 mil millones de toneladas, volumen que lo situó como el cereal con mayor producción global. Su importancia también se extiende a la industria alimentaria, donde el grano se emplea directamente o como materia prima para la obtención de productos como harina, almidón, jarabes y aceite (FAO, 2025).

El maíz fue domesticado en México a partir del teocintle silvestre anual (*Zea mays* subsp. *parviglumis*) hace alrededor de 9000 años. El proceso de domesticación implicó la adaptación del maíz desde su origen tropical a las condiciones ambientales templadas y diversas, sufriendo una importante transformación morfológica en la planta y la arquitectura de la inflorescencia (Gálvez Ranilla, 2020).

El maíz ocupa un lugar central en la alimentación y cultura de México, además de constituir uno de los cultivos de mayor relevancia para el país. En 2023, su consumo alcanzó aproximadamente 133.6 kg por habitante al año, cifra que ubicó a México como el mayor consumidor per cápita a nivel mundial. El territorio mexicano también forma parte del centro de origen y diversificación de esta especie y alberga alrededor de 59 razas nativas. Dentro de esta diversidad se encuentra el maíz azul, cuyos granos se distinguen por la presencia de compuestos fenólicos, principalmente antocianinas, que contribuyen a su capacidad antioxidante y aumentan su interés como materia prima para el desarrollo de productos alimenticios (Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura [FIRA], 2024; Sánchez-Madrigal et al., 2014).

2.4.1.1 Contenido nutrimental

El maíz contiene principalmente carbohidratos, proteínas lípidos y fibra dietética. El endospermo concentra principalmente almidón y proteínas, mientras que el germen presenta una mayor proporción de lípidos y el pericarpio constituye la principal fracción fibrosa del grano. Aunque el almidón y las proteínas son los principales compuestos de los granos de maíz, en variedades pigmentadas se han encontrado otras sustancias producidas por el metabolismo secundario, como los carotenoides y las antocianinas (Moreira et al. 2015).

La composición química del maíz varía en función del genotipo y de factores como las condiciones ambientales, el manejo del cultivo y el momento de cosecha (**Tabla 2**). Parte de esta diversidad se manifiesta en la coloración de los granos, que comprende variedades blancas, amarillas, rojas, moradas y azules. Estas tonalidades están relacionadas con la presencia y distribución de diferentes pigmentos; entre ellos, los carotenoides contribuyen principalmente a las coloraciones amarillas y

anaranjadas, mientras que las antocianinas, pigmentos hidrosolubles pertenecientes al grupo de los flavonoides, participan en las tonalidades rojas, púrpuras y azules de los tejidos vegetales (Kuhnen et al. 2011).

Tabla 2. Composición nutrimental de genotipos de maíz nativo (*Zea mays*) de México

Componente (g/100g)	Variedad			
	Amarillo	Azul Chalaqueño suave	Azul Chalaqueño duro	Azul Tarahumara
Humedad	9.67	-	-	10.99
Cenizas	1.00	1.5	1.5	1.20
Proteína	12.12	8.9	10.8	6.42
Lípidos	3.67	5.8	6.6	5.95
Fibra cruda	1.76	1.2	1.5	2.2
Carbohidratos	71.77	81.4	79.9	73.39

Fuente: Navarro Cortez *et al.,* 2016; Rodríguez-Salinas et al. (2020).

2.4.1.1.1 Antocianinas del maíz azul

Los maíces pigmentados se caracterizan por un contenido elevado de metabolitos fenólicos, particularmente antocianinas, aunque su concentración y perfil dependen del genotipo y de la fracción del grano analizada. Además de las antocianinas, se han identificado flavonoides y ácidos fenólicos que contribuyen a la capacidad antioxidante de estas matrices (Navarro Cortez et al. 2016).

La producción de maíz azul en México se extiende a estados como Campeche, Chiapas, Jalisco, Chihuahua, Guerrero, Puebla y Michoacán, mientras que el Estado de México sobresale con una producción aproximada de 200 mil toneladas anuales (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, 2020). Además de su empleo en alimentos tradicionales, los granos de maíz azul contienen antocianinas, carotenoides y otros compuestos fenólicos (**Tabla 3**). La presencia de estos componentes influye en la capacidad antioxidante de los maíces pigmentados, que puede ser superior a la registrada en materiales no pigmentados (Harakotr et al. 2014).

Tabla 3. Contenido de antocianinas y compuestos fenólicos de genotipos de maíz nativo (*Zea mays*) de México

Compuestos fenólicos (mg/100g)	Variedad			
	Amarillo	Blanco	Azul	Morado
Totales**	551	170	343	465
Libres**	104	33.4	73.1	83.7
Conjugados**	447	136	271	381
Antocianinas*	70.2	1.54	99.5	93.2

*Concentración expresada en mg de cianidina-3-glucósido/100 g de muestra. **Concentración expresada en mg de ácido gálico/100 g de muestra. Fuente: Lopez-Martinez et al. (2009).

El color azul del maíz es causado por las antocianinas, que se encuentran principalmente en la capa de aleurona y pericarpio. Las antocianinas son flavonoides que presentan capacidad antioxidante y propiedades que brindan beneficios para la salud, son solubles en agua, inestables a pH básico y se ven afectadas por las altas temperaturas durante el procesamiento (Sánchez-Madrigal et al., 2014). El color de estos compuestos depende del número y posición de los sustituyentes en la molécula; un aumento en la cantidad de grupos hidroxilo produce tonos de pigmento azul y, por el contrario, un predominio de metoxilos da como resultado tonos rojos (Flores-Calderón et al. 2017).

2.4.2 Frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*)

Los frijoles *Phaseolus* son leguminosas de grano o cultivos de legumbres de relevancia en el mundo en términos de consumo humano y animal. Este género, comprende varias especies silvestres y cultivadas que incluyen frijol común, (*P. vulgaris*), frijol lima (*P. lunatus*), frijol tépari (*P. acutifolius*), frijol perenne (*P. polyanthus*) y frijol ayocote (*P. coccineus*). Los cultivos de frijoles comunes y ayocotes se domesticaron de forma independiente dentro de dos centros de diversidad, lo que dio lugar a dos acervos genéticos, mesoamericano y andino, estos con diversas características consecuencia de su aislamiento reproductivo y geográfico (Sinkovič et al. 2019).

El frijol ocupa un lugar relevante en la alimentación tradicional de México y contribuye al aporte de proteína vegetal y fibra dietética, además de contener diversos componentes de interés nutrimental. A pesar de su importancia, su consumo ha disminuido durante las últimas décadas, pasando de valores superiores a 15 kg per cápita al año a aproximadamente 8 kg anuales. México alberga, además, una amplia diversidad de especies y variedades nativas del género *Phaseolus*; sin embargo, solo una proporción reducida se comercializa de manera extensiva. Esta diversidad constituye una oportunidad para estudiar y aprovechar materiales nativos con características nutrimentales y tecnológicas de interés (CIAD, 2025; FIRA, 2024).

Una de estas especies es el frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*), en donde resalta su variedad morada, que cuenta con altas cantidades de compuestos bioactivos, destacando los flavonoides (Alvarado-López et al. 2019). El frijol ayocote es una especie perenne que puede vivir hasta 10 años, aunque fuera de Centroamérica y México se suele cultivar como anual, ya que no puede sobrevivir a las heladas. Es nativo de México, Guatemala y Honduras, y las formas silvestres probablemente no sean todas ancestrales. En México y Centroamérica, la mayor diversidad de *P.*

vulgaris y *P. coccineus* se conservan como parte de los sistemas tradicionales de cultivo, traspatios y bosques (Rodriguez et al. 2013).

2.4.2.1 Contenido nutrimental

En gran parte de la población mundial el género *Phaseolus* es considerado parte importante de la dieta habitual, debido a que es una fuente considerable de proteína, carbohidratos complejos y fibra **(Tabla 4)**. A nivel mundial, la producción de frijol seco supera 30 millones de toneladas anuales, con una superficie de cosecha cercana a 36 millones de hectáreas, lo que refleja la importancia de este cultivo dentro de los sistemas alimentarios globales (FAOSTAT, 2023).

El frijol ayocote constituye una fuente de proteína vegetal, fibra dietética, vitaminas y minerales como hierro, potasio, magnesio y zinc. Su perfil de aminoácidos puede complementar al de los cereales, particularmente por su aporte de aminoácidos esenciales que se encuentran en proporciones limitadas en estas matrices. Asimismo, contiene diversos compuestos fenólicos, entre ellos ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, flavonoides y lignanos, cuya presencia contribuye al interés nutrimental de esta leguminosa (Aquino-Bolaños et al. 2021).

Tabla 4. Composición nutrimental de semillas secas y crudas por especies *Phaseolus*

Componente (g/100g)	**Especie**		
	P. coccineus	*P. lunatus*	*P. vulgaris*
Humedad	11.20	9.62	10.16
Cenizas	4.27	3.48	3.78
Lípidos	1.87	1.60	2.22
Proteína	17.28	19.68	20.48
Carbohidratos	65.39	65.62	62.57
Fibra	4.18	5.21	5.02
Energía	424.54	445.98	444.78

Fuente: Alcázar-Valle et al. (2020).

Se ha demostrado que en algunas especies de frijol común (*P. vulgaris*) y variedades de *P. coccineus* y *P. lunatus*, los componentes fenólicos (**Tabla 5)** tienen capacidad antioxidante. Además, existe evidencia de que las especies nativas de frijol son esenciales porque contienen importantes componentes nutricionales para la seguridad y suplementación alimentaria; por ejemplo, el contenido de aminoácidos libres predominantes en los frijoles son la arginina, el ácido aspártico, la asparagina, el ácido glutámico y la leucina. Estos, desempeñan un papel clave en funciones estructurales como fisiológicas y son importantes precursores de metabolitos. Además, pocas cantidades de aminoácidos libres como triptófano, fenilalanina, isoleucina o prolina pueden actuar como antioxidantes (Alcázar-Valle et al., 2021; Aquino-Bolaños et al., 2021).

Tabla 5. Contenido de compuestos fenólicos, antocianinas y capacidad antioxidante *in vitro* de semillas secas y crudas de especies *Phaseolus*

Determinación	Especie	
	P. coccineus	*P. vulgaris*
Cascara de la semilla		
Compuestos fenólicos totales[1]	152.4	81.7
Flavonoides[2]	22.0	10.6
Antocianinas[3]	0.15	5.12
Actividad antioxidante[4]	1169.4	874.2
Cotiledones		
Compuestos fenólicos totales[1]	2.41	1.86
Flavonoides[2]	0.30	0.30
Capacidad antioxidante[4]	8.11	7.41

[1]mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca; [2]mg equivalentes de catequina por gramo de muestra seca; [3]mg de cianidina-3-glucósido por gramo de muestra seca; [4]micromoles de equivalentes de Trolox por gramo de muestra seca. Fuente: Capistrán-Carabarin et al. (2019).

La incorporación de derivados de frijol en productos elaborados con cereales ha sido evaluada como una estrategia para modificar su composición nutrimental. Mariscal-Moreno et al. (2021) estudiaron la adición de 10 y 20% de harina de frijol en pan y observaron un mayor aporte de minerales, fibra y otros nutrimentos, manteniendo características de digestibilidad y aceptación sensorial adecuadas en niveles de incorporación inferiores al 20%. Por su parte, Sánchez-Villa et al. (2020) emplearon aislados proteicos de frijol ayocote en tortillas de maíz nixtamalizado y reportaron una mejora en su composición nutrimental sin cambios significativos en las propiedades reológicas, texturales y sensoriales ni en la aceptabilidad del producto (Sánchez-Villa et al. 2020).

A pesar de su valor nutrimental y de su adaptación a sistemas tradicionales de cultivo, el aprovechamiento comercial del frijol ayocote continúa siendo limitado. En este contexto, su incorporación como materia prima en nuevos productos alimenticios representa una alternativa para diversificar su aprovechamiento y promover el consumo de esta leguminosa nativa (Schwember et al. 2017).

2.4.2.1.1 Factores antinutricionales

Los factores antinutricionales (**Figura 2**) comprenden diversos componentes presentes naturalmente en alimentos de origen vegetal que, bajo determinadas condiciones, pueden disminuir la utilización de nutrimentos al afectar la digestibilidad de proteínas y carbohidratos o limitar la disponibilidad de algunos minerales (Thakur et al*.,* 2019). Las leguminosas del género *Phaseolus*, además de su aporte nutrimental, contienen compuestos clasificados como antinutricionales, entre los que se incluyen ácido fítico, lectinas, inhibidores de enzimas digestivas (como tripsina,

quimotripsina y amilasa), saponinas, oligosacáridos y taninos (Boye et al., 2010; Lacaille-Dubois y Melzig, 2016).

No obstante, la clasificación de estos compuestos como factores antinutricionales no excluye que algunos presenten otras propiedades de interés, cuya relevancia depende de su naturaleza y concentración (Sánchez-Arteaga et al., 2015; Singh et al., 2017). Por ejemplo, algunas lectinas aisladas de especies del género *Phaseolus* han mostrado capacidad antioxidante *in vitro* mediante el ensayo DPPH, lo que evidencia que sus propiedades no se limitan exclusivamente a sus efectos antinutricionales (Alcázar-Valle et al., 2020).

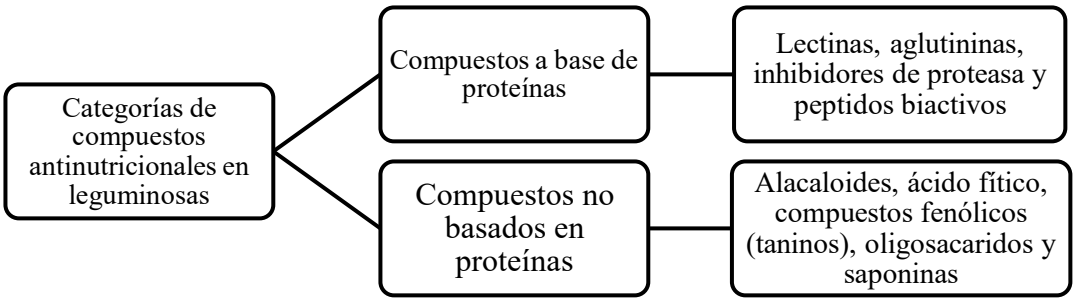


Figura 2. Categorías de los compuestos antinutricionales en leguminosas.

Entre los factores antinutricionales presentes en los frijoles destacan los inhibidores de tripsina, el ácido fítico y los α-galacto-oligosacáridos. Los primeros reducen la actividad de la tripsina y pueden limitar la hidrólisis de las proteínas durante la digestión. El ácido fítico, por su capacidad para interactuar con minerales como hierro, zinc, calcio y magnesio, puede disminuir su disponibilidad para la absorción. En contraste, los α-galacto-oligosacáridos no son digeridos en el intestino delgado debido a la ausencia de α-galactosidasa en el organismo humano y alcanzan el colon, donde su fermentación por la microbiota puede ocasionar producción de gases y distensión abdominal (Njoumi et al., 2019). Para disminuir los efectos antinutricionales de estos componentes se han empleado tratamientos como remojo, cocción, fermentación, germinación y extrusión, cuya eficacia depende de la naturaleza del compuesto y de las condiciones de procesamiento (Mojica et al., 2017).

2.5 Propiedades tecnofuncionales, estructurales y potencial bioactivo en sistemas cereal con leguminosa extruidos

Durante el procesamiento por extrusión, las condiciones de alta temperatura, presión y cizallamiento generan modificaciones importantes en la matriz alimentaria, incluyendo cambios en la organización del almidón, las proteínas y otros componentes estructurales. Estas transformaciones estructurales pueden influir en las propiedades tecnofuncionales, la digestibilidad y la estabilidad o disponibilidad de determinados compuestos presentes en la matriz, evidenciando la estrecha relación entre procesamiento, estructura y composición del producto final (Osuna-Gallardo et al., 2023).

Estas modificaciones estructurales no solo dependen de las condiciones de procesamiento, sino también de la interacción entre los principales componentes de la matriz, particularmente almidón y proteínas, los cuales forman una red tridimensional durante la extrusión. Esta red estructural desempeña un papel determinante en la retención de agua, la formación de estructuras celulares y la estabilidad del producto, lo que impacta directamente propiedades como la expansión, la textura y la digestibilidad. En este sentido, la microestructura del alimento se considera un factor clave para comprender la relación entre el procesamiento y la funcionalidad del producto final, por lo que su evaluación mediante técnicas instrumentales permite interpretar de manera integral los cambios inducidos por la extrusión (Corzo-Ríos et al., 2020; Guy, 2016).

2.5.1 Complementariedad cereal con leguminosa: perfil de aminoácidos y calidad proteica

La combinación de cereales y leguminosas constituye una estrategia ampliamente utilizada para mejorar la calidad proteica de los alimentos. Los cereales suelen presentar un contenido limitado de lisina, mientras que las leguminosas pueden ser deficientes en aminoácidos azufrados, principalmente metionina y cisteína. Debido a esta complementariedad, la incorporación de harinas de leguminosas en matrices a base de cereales puede favorecer un perfil de aminoácidos esenciales más equilibrado y mejorar la calidad nutrimental de la proteína respecto de formulaciones elaboradas únicamente con cereales (Schmidt y Oliveira, 2023; Shevkani et al., 2019).

La incorporación de leguminosas no solo modifica el aporte proteico de una formulación, sino también el comportamiento de la matriz durante el procesamiento. Las interacciones entre proteínas, almidón y otros constituyentes pueden repercutir en la organización estructural del producto, sus propiedades tecnofuncionales y la digestibilidad de las proteínas. Por ello, los efectos

derivados de la combinación cereal-leguminosa deben analizarse considerando tanto la proporción de los ingredientes como las condiciones empleadas durante el procesamiento (Schmidt y Oliveira, 2023).

2.5.2 Modificaciones estructurales inducidas por el procesamiento

2.5.2.1 Microestructura y organización estructural

Las propiedades físicas y tecnofuncionales de las botanas extruidas están estrechamente relacionadas con las transformaciones estructurales que experimentan sus principales biopolímeros durante el procesamiento. La combinación de temperatura, humedad, presión y esfuerzo de corte durante la extrusión puede provocar gelatinización y pérdida de la organización granular del almidón, así como modificaciones conformacionales y agregación de proteínas. Posteriormente, durante la expansión, la generación y liberación de vapor favorece la formación de una estructura celular cuya distribución, tamaño y continuidad influyen sobre propiedades macroscópicas como expansión, densidad y textura. En matrices cereal y leguminosa, estas transformaciones pueden ser particularmente complejas debido a la interacción entre almidón, proteínas, fibra y lípidos, cuya proporción modifica la continuidad y capacidad de deformación de la matriz (Aguilar-Palazuelos et al., 2006; Navarro Cortez et al., 2016; Neder-Suárez et al., 2021).

La microscopía electrónica de barrido (SEM) permite examinar estas modificaciones a escala morfológica, incluyendo la pérdida de integridad de los gránulos de almidón, la formación de una matriz continua después de la extrusión y las características de las estructuras generadas durante la expansión. En botanas de tercera generación, la microestructura resultante depende tanto de las condiciones de procesamiento como de la composición de la formulación, ya que la incorporación de proteínas y fibra puede modificar la formación y estabilidad de las celdas y, consecuentemente, las propiedades físicas del producto (Neder-Suárez et al., 2024; Osuna-Gallardo et al., 2023). Por ello, el análisis microestructural proporciona un vínculo entre las transformaciones inducidas durante el procesamiento y propiedades tecnológicas como expansión, densidad y textura.

Sin embargo, las modificaciones morfológicas observadas mediante SEM representan solamente uno de los niveles de organización de la matriz. La difracción de rayos X (XRD) permite evaluar el orden cristalino de largo alcance, particularmente de la fracción amilácea. Los almidones de cereales presentan comúnmente un patrón cristalino tipo A, cuya organización puede disminuir durante la extrusión como consecuencia de la gelatinización y desestructuración de las regiones

semicristalinas. Esta pérdida de orden no necesariamente conduce a una matriz completamente amorfa, ya que durante el procesamiento y enfriamiento pueden producirse fenómenos de reorganización molecular y formación de nuevos arreglos, incluidos complejos amilosa y lípido asociados con estructuras cristalinas tipo V (Aguilar-Palazuelos et al., 2006; Navarro Cortez et al., 2016; Neder-Suárez et al., 2021). En sistemas elaborados con maíz azul y frijol, se han observado disminuciones de las reflexiones características del almidón nativo y aparición o modificación de señales relacionadas con estos procesos de reorganización después del procesamiento (Neder-Suárez et al., 2021).

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier acoplada a reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) permite caracterizar el entorno molecular de los principales componentes de una matriz alimentaria a partir de sus grupos funcionales y patrones de vibración. En sistemas constituidos principalmente por almidón y proteínas, las regiones correspondientes a O–H/N–H, Amida I y Amida II, así como el intervalo de 1200–900 cm^{-1} asociado con polisacáridos, pueden reflejar modificaciones en estos biopolímeros. Dentro de esta última región, las bandas cercanas a 1047, 1022 y 995 cm^{-1} se han empleado para evaluar la organización de corto alcance del almidón, mientras que Amida I aporta información relacionada con el entorno conformacional de las proteínas (Hong et al., 2021; Usoltsev et al., 2019). En matrices cereal-leguminosa, las variaciones en la formulación y las transformaciones inducidas por el procesamiento pueden alterar la organización molecular del almidón y las proteínas, así como las interacciones entre ambos componentes (Garcia-Valle et al., 2021; Neder-Suárez et al., 2021, 2024).

La integración de estas técnicas permite relacionar las transformaciones estructurales inducidas por la extrusión y la expansión con las propiedades tecnofuncionales de las botanas de tercera generación, particularmente en formulaciones cereal y leguminosa cuya composición puede modificar la respuesta de la matriz durante el procesamiento.

2.5.3 Efecto del procesamiento sobre compuestos de interés nutricional y potencial bioactivo

Diversos componentes presentes naturalmente en los alimentos, particularmente en matrices vegetales, han sido estudiados por sus propiedades químicas y por su posible interacción con procesos biológicos. Entre ellos se encuentran compuestos fenólicos y otros metabolitos presentes en frutas, hortalizas, semillas, nueces y cereales integrales. Su interés en ciencia de alimentos deriva tanto de su presencia en la matriz como de las modificaciones que pueden experimentar durante el

procesamiento y la digestión, factores que condicionan su disponibilidad y sus propiedades *in vitro* (Le et al. 2020). En este contexto, la caracterización de estos componentes constituye una herramienta para estudiar el efecto de la formulación y del procesamiento en el desarrollo de nuevos productos alimenticios (Cazarin et al. 2022).

La pigmentación de diversos alimentos vegetales se relaciona con la presencia de compuestos fenólicos, entre los que destacan las antocianinas por su contribución al color y sus propiedades antioxidantes (Nouri *et al.* 2016). En frijoles pigmentados se han identificado distintos perfiles de antocianinas según la variedad. Los frijoles negros contienen principalmente 3-*O*-glucósidos de delfinidina, petunidina y malvidina, además de haberse reportado malvidina-3,5-diglucósido. En frijoles pintos se han identificado cianidina-3-*O*-glucósido, pelargonidina-3-*O*-glucósido y pelargonidina-3-*O*-malonilglucósido (Dueñas et al. 2015; Lin et al. 2008).

Los alimentos autóctonos, como el maíz azul y el frijol ayocote, han ganado cada vez más atención por su excelente fuente de antioxidantes dietéticos. No solo son ricas fuentes de componentes nutricionales como proteínas y vitaminas, sino también excelentes fuentes de constituyentes funcionales que incluyen fibra y compuestos bioactivos (compuestos fenólicos) (Kan et al. 2016). Sin embargo, estos generalmente no han recibido mucha atención como fuentes de antioxidantes, y esto podría deberse a su falta de popularidad y falta de aplicaciones comerciales.

2.5.3.1 Antocianinas

2.5.3.1.1 Estructura y clasificación de antocianinas

Las antocianinas se clasifican según cinco grupos funcionales: estructuras básicas comunes, estructuras metiladas comunes, estructuras 3-desoxi, estructuras raramente hidroxiladas y estructuras raramente metiladas. Las antocianinas se biosintetizan a partir de malonil CoA y *p*-cumaroil CoA por la chalcona sintasa. Malonil CoA se deriva de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos y *p*-cumaroli CoA de fenilalanina. El análisis de antocianinas es complejo debido a su capacidad de transformaciones estructurales y múltiples reacciones (Kim et al. 2020).

Las antocianinas pertenecen al grupo de los flavonoides y corresponden a formas glicosiladas de las antocianidinas. Su diversidad estructural depende principalmente del patrón de hidroxilación y metoxilación del anillo B, así como del número, tipo y posición de los azúcares unidos a la molécula, entre los que se encuentran glucosa, galactosa y arabinosa. Estas variaciones

estructurales originan una amplia diversidad de antocianinas y condicionan las características de estos pigmentos hidrosolubles, responsables de numerosas tonalidades rojas, púrpuras y azules presentes en tejidos vegetales (Singla et al., 2019).

2.5.3.1.2 Estabilidad de las antocianinas durante el procesamiento por extrusión

La estabilidad de las antocianinas durante el procesamiento y almacenamiento está condicionada por múltiples factores relacionados tanto con su estructura química como con el entorno de la matriz alimentaria. Entre ellos se encuentran el pH, la temperatura y duración del tratamiento, concentración de los pigmentos, exposición al oxígeno y la luz, actividad enzimática y presencia de proteínas e iones metálicos (Patras et al., 2010). En particular, una mayor intensidad térmica puede favorecer su degradación; sin embargo, la magnitud de estas pérdidas varía según la estructura de las antocianinas, el tiempo de exposición y las características de la matriz en la que se encuentran (Hirth et al., 2014; Patras et al., 2010).

La degradación térmica puede involucrar diferentes transformaciones estructurales. Entre los mecanismos propuestos se encuentran la apertura del anillo pirilio y formación de chalconas, así como la hidrólisis del enlace glucosídico con la consecuente formación de la aglicona. Asimismo, la presencia de oxígeno puede favorecer procesos oxidativos durante el procesamiento, por lo que la pérdida de antocianinas resulta de mecanismos cuya magnitud depende tanto de las condiciones de tratamiento como de la estructura química y el entorno en el que se encuentran estos compuestos (Patras et al., 2010).

En procesos de extrusión, la estabilidad de las antocianinas adquiere mayor complejidad debido a la acción simultánea de temperatura, humedad, esfuerzo mecánico y tiempo de residencia. La extrusión es un proceso de alta temperatura y corto tiempo, por lo que los tiempos reducidos de exposición pueden limitar algunas reacciones de degradación; sin embargo, las temperaturas elevadas y los esfuerzos de corte pueden incrementar las pérdidas de compuestos termolábiles (Hirth et al., 2014; Patras et al., 2010).

2.5.3.2 Acido fítico

2.5.3.2.1 Estructura e interacciones fisicoquímicas del ácido fítico

En cereales y leguminosas, una proporción importante del fósforo de reserva se encuentra como ácido fítico, químicamente identificado como *myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisfosfato (InsP6 o

IP6). La molécula contiene seis grupos fosfato esterificados a un anillo de *myo*-inositol, cuya ionización le confiere múltiples cargas negativas en función del pH. Esta propiedad explica su afinidad por diferentes cationes y su capacidad para establecer interacciones con otros constituyentes de la matriz alimentaria (Cheryan y Rackis, 1980; Fileppi et al., 2010).

La capacidad de ionización de sus grupos fosfato permite la formación de complejos con minerales divalentes y proteínas, cuya estabilidad depende de factores como el pH, la fuerza iónica, la concentración relativa de los componentes y las características estructurales de las proteínas (Cheryan y Rackis, 1980). En medios ácidos, la presencia de grupos proteicos con carga positiva favorece interacciones electrostáticas con el anión fitato, mientras que los cambios en el estado de ionización de las proteínas pueden modificar la magnitud de estas asociaciones (Alli y Baker, 1981).

Además de formar complejos binarios con proteínas o minerales, el ácido fítico puede participar en asociaciones ternarias proteína, fitato y mineral. La estabilidad de estos complejos está influida por el pH, la fuerza iónica y la concentración de cationes, particularmente calcio y magnesio, por lo que cambios en las condiciones del medio pueden modificar su solubilidad y sus interacciones con otros constituyentes de la matriz (Sarkhel y Roy, 2022). Estas propiedades son relevantes durante el procesamiento de alimentos, ya que las modificaciones estructurales de las proteínas y del entorno fisicoquímico pueden alterar la forma en que el fitato se encuentra asociado dentro del sistema alimentario.

2.5.3.2.2 Estabilidad del ácido fítico durante el procesamiento por extrusión

El contenido y comportamiento del ácido fítico pueden modificarse durante el procesamiento de cereales y leguminosas. En particular, la extrusión constituye un tratamiento de alta temperatura y corto tiempo en el que actúan simultáneamente temperatura, humedad, presión y esfuerzo mecánico, condiciones capaces de modificar la estructura y reactividad de los componentes de la matriz. Durante este proceso se han reportado reducciones en el contenido de ácido fítico asociadas con su hidrólisis parcial, cambios en su reactividad química y formación de complejos con otros componentes (Sarkhel y Roy, 2022).

La magnitud de estas modificaciones depende de las condiciones de extrusión y de las características de la materia prima. En harinas de chícharo, frijol y haba se han observado reducciones de ácido fítico después de la extrusión, acompañadas por la hidrólisis parcial IP6 hacia

formas con menor grado de fosforilación, principalmente IP5 e IP4 (Sarkhel y Roy, 2022). Asimismo, el contenido de humedad de la alimentación se ha señalado como un factor relevante, ya que puede favorecer las transformaciones del fitato durante el tratamiento termomecánico. En consecuencia, las variaciones observadas después de la extrusión no dependen exclusivamente de la temperatura, sino de la interacción entre humedad, tiempo de residencia, condiciones mecánicas y composición de la matriz (Amat et al., 2023).

Las modificaciones del ácido fítico durante el procesamiento tampoco deben interpretarse únicamente como destrucción térmica. Debido a su capacidad para interactuar con proteínas y minerales, los cambios inducidos por la extrusión en la conformación proteica, la solubilidad y la disponibilidad de grupos cargados pueden modificar simultáneamente la formación y estabilidad de complejos fitato, proteína y mineral. Por tanto, los cambios en el contenido cuantificable de ácido fítico después del procesamiento pueden reflejar distintos fenómenos fisicoquímicos asociados con la hidrólisis, complejación y modificación de su interacción con la matriz alimentaria (Amat et al., 2023; Sarkhel y Roy, 2022).

2.5.4 Digestibilidad y fracción con potencial bioaccesible *in vitro*

La caracterización química y nutrimental de los alimentos funcionales constituye una herramienta importante para estimar su potencial biológico; sin embargo, la presencia de compuestos bioactivos en una matriz alimentaria no garantiza necesariamente su estabilidad, liberación o disponibilidad fisiológica después del proceso digestivo. Diversos compuestos de interés funcional, como polifenoles, antocianinas, carotenoides, péptidos y otros metabolitos bioactivos, pueden sufrir transformaciones estructurales, degradación o interacciones con la matriz alimentaria durante la digestión gastrointestinal, modificando significativamente su bioaccesibilidad y actividad biológica (Chen et al., 2016; Nicolescu et al., 2023). Por ello, en los últimos años se ha incrementado el interés por incorporar modelos de digestión gastrointestinal *in vitro* en la evaluación de alimentos funcionales y compuestos biactivos.

La bioaccesibilidad se define como la fracción de un compuesto que permanece disponible para su absorción a nivel intestinal después de los procesos fisiológicos asociados a la digestión, incluyendo cambios de pH, acción enzimática e interacciones con otros componentes de la matriz alimentaria (Nicolescu et al., 2023). En este contexto, la digestión gastrointestinal *in vitro* permite aproximar el comportamiento fisiológico de diferentes compuestos bioactivos bajo condiciones

simuladas del tracto gastrointestinal, proporcionando información relevante sobre su estabilidad, liberación y posible disponibilidad biológica. Asimismo, estos modelos permiten evaluar modificaciones en la digestibilidad de macronutrientes y cambios estructurales inducidos por el procesamiento de alimentos, particularmente en productos sometidos a tratamientos térmicos como la extrusión (Brodkorb et al., 2019; Nicolescu et al., 2023).

Actualmente, el método INFOGEST es uno de los modelos de digestión *in vitro* más utilizados y aceptados para la evaluación de alimentos. Este protocolo fue desarrollado mediante consenso internacional con el objetivo de armonizar las condiciones experimentales utilizadas en estudios de digestión gastrointestinal, incorporando parámetros fisiológicamente relevantes relacionados con las fases oral, gástrica e intestinal, incluyendo pH, actividad enzimática, sales biliares, tiempos de incubación y composición de fluidos digestivos simulados (Brodkorb et al., 2019). Su implementación ha permitido mejorar la reproducibilidad y comparabilidad entre estudios, favoreciendo la evaluación estandarizada de digestibilidad, bioaccesibilidad y liberación de compuestos bioactivos en diferentes matrices alimentarias.

En alimentos funcionales elaborados a partir de cereales y leguminosas, la digestión gastrointestinal *in vitro* adquiere especial relevancia debido a que el procesamiento puede modificar significativamente la estructura de proteínas, almidones y compuestos fenólicos. Procesos como la extrusión pueden inducir desnaturalización proteica, gelatinización del almidón y ruptura de estructuras celulares, afectando la liberación y accesibilidad de compuestos bioactivos durante la digestión (H. Zhou et al., 2023). De manera particular, las antocianinas y otros compuestos fenólicos presentes en matrices vegetales son altamente susceptibles a cambios de pH, degradación enzimática e interacciones con macromoléculas alimentarias, lo cual puede alterar su estabilidad y actividad antioxidante después de la digestión gastrointestinal (Brodkorb et al., 2019; Nicolescu et al., 2023).

En consecuencia, la incorporación de modelos de digestión gastrointestinal *in vitro* en la evaluación de alimentos funcionales representa una herramienta relevante para estimar de manera más precisa el potencial bioactivo de los alimentos después de su consumo. Estos modelos permiten complementar la caracterización química convencional y generar información más cercana al posible comportamiento fisiológico de compuestos bioactivos y nutrimentos bajo condiciones

gastrointestinales simuladas, fortaleciendo así la evaluación funcional de nuevas formulaciones alimentarias.

En este contexto, la combinación de maíz azul (*Zea mays* L.) y frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.) resulta de interés por la complementariedad de su composición nutrimental. El maíz azul aporta principalmente carbohidratos y compuestos fenólicos, entre ellos antocianinas, mientras que el frijol ayocote contribuye con proteína, fibra dietética y lisina, además de diversos compuestos fenólicos. La incorporación conjunta de ambas materias primas en productos extruidos permite obtener formulaciones con un perfil nutrimental más equilibrado; sin embargo, las características de la matriz y las condiciones de procesamiento pueden modificar tanto sus componentes como las propiedades tecnofuncionales del producto obtenido (Espinosa-Ramírez et al., 2022; Sánchez-Madrigal et al., 2014; Shevkani et al., 2019; Teniente-Martínez et al., 2022).

2.6 Importancia del desarrollo de botanas saludables

A medida que cambia el estilo de vida de las personas y aumenta la industrialización de alimentos, se incrementa la transición hacia el consumo de alimentos hipercalóricos y poco saludables. Las botanas son una de las formas más concentradas de energía alimentaria, debido a que la mayoría contienen grandes cantidades de aceite, almidón y están prácticamente libres de agua. El contenido de fibra dietética, vitaminas, minerales y proteínas y la calidad de la mayoría de las botanas son bajos, ya que generalmente se fabrican para formar sémolas de cereal y almidones refinados. (Allan et al. 2015).

Las botanas deben formularse no solo en función de los intereses y preferencias de los consumidores, sino también de sus necesidades nutricionales. El consumo de botanas poco saludables puede traer diferentes problemas de salud como obesidad, caries dental y enfermedades crónicas. Además, el consumo botanas no saludables durante la niñez y la adolescencia, aumenta el riesgo de desarrollar problemas de salud en la edad adulta como enfermedades cardiovasculares, hipertensión y diabetes mellitus (Bastami et al. 2019).

En los últimos años, numerosas investigaciones han priorizado el desarrollo de botanas con valor agregado en cuanto al mantenimiento y protección de la salud, mejorando la nutrición del consumidor y promoviendo una buena salud. Desde que las Naciones Unidas publicaron los Objetivos de Desarrollo Sostenible (United Nations 2015), se han adoptado diversas estrategias en todo el mundo, tanto la ciencia como la industria alimentaria se han enfrentado al desafío de buscar

soluciones para promover el uso de alimentos que están siendo desaprovechados. Algunos de estos alimentos son de especial interés porque suelen contener cantidades significativamente elevadas de determinados compuestos (componentes bioactivos, fibras dietéticas, vitaminas, minerales, etc.), que constituyen una materia prima muy valiosa para la producción y desarrollo de nuevos productos (Jozinović et al. 2021).

De igual manera, existe un creciente interés en la población sobre la relación entre alimentos, nutrición y salud, además de una mayor conciencia de los consumidores hacia un buen estilo de vida y enfatizar la necesidad de limitar el consumo de botanas con alto contenido de aceite, calorías provenientes de grasas y colesterol, entre otros. Hoy en día, los consumidores están más interesados en productos saludables y con propiedades sensoriales (sabor, textura y aceptabilidad general), similares en comparación con otras botanas de alto consumo (Petersen et al. 2019). Uno de estos productos son las botanas de tercera generación a base de ingredientes saludables con potencial funcional debido al contenido de compuestos bioactivos, además, estos productos son cada vez más populares y consumidos en todos los grupos de edad de la población (Grasso 2020).

III. JUSTIFICACIÓN

La industria alimentaria ha mostrado un creciente interés por el desarrollo de productos de consumo habitual con una composición nutrimental mejorada y elaborados a partir de materias primas alternativas. En este contexto, el aprovechamiento de ingredientes autóctonos poco utilizados representa una oportunidad para diversificar la formulación de botanas extruidas y, al mismo tiempo, promover el uso de recursos alimentarios locales con características nutrimentales y tecnológicas de interés.

El maíz azul se distingue de los maíces no pigmentados por la presencia de compuestos fenólicos asociados con la coloración del grano, entre los que destacan las antocianinas y los ácidos fenólicos. Estos compuestos presentan propiedades antioxidantes relacionadas con su estructura química y con su capacidad para participar en reacciones de transferencia de electrones o átomos de hidrógeno, mecanismos involucrados en la neutralización de especies radicalarias (Menchaca-Armenta et al., 2020; Pojer et al., 2013). La presencia de estos componentes incrementa el interés del maíz pigmentado como materia prima para el desarrollo de alimentos con una composición nutrimental y fenólica diferenciada.

En este contexto, el maíz azul representa un ingrediente de gran interés por su potencial funcional. Sus propiedades funcionales derivan de metabolitos secundarios, principalmente antocianinas y ácidos fenólicos, los cuales contribuyen a la actividad antioxidante y han mostrado capacidad de proteger a las células frente al daño oxidativo. Estos compuestos, especialmente las antocianinas, poseen la capacidad de donar hidrógeno, lo que les confiere un efecto directo en la neutralización de radicales libres. Además, su consumo ha demostrado ser seguro, respaldado por amplia evidencia científica y farmacológica Dichas características sustentan el aprovechamiento del maíz pigmentado como alternativa viable para la producción de alimentos con propiedades funcionales.

Por otra parte, el frijol ayocote destaca frente a otras especies del género *Phaseolus* por su riqueza en compuestos bioactivos, particularmente fenólicos. Aunque sus semillas poseen un perfil nutrimental comparable al de otros frijoles, su consumo sigue siendo bajo y limitado a zonas específicas de cultivo (Alvarado-López et al., 2019). Esto resalta la necesidad de incentivar su aprovechamiento mediante productos de alta demanda, como las botanas extruidas.

En conjunto, la integración de maíz azul y frijol ayocote representa una alternativa para el desarrollo de botanas de tercera generación con mejor perfil nutrimental y contenido de compuestos con potencial bioactivo, al tiempo que favorece el aprovechamiento de materias primas nativas desaprovechadas.

IV. HIPÓTESIS

La incorporación de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.) en botanas de tercera generación elaboradas con maíz azul (*Zea mays* L.) mejorará su composición nutrimental y modificará sus propiedades fisicoquímicas y tecnofuncionales en función de la formulación y del procesamiento, sin comprometer la viabilidad tecnológica ni la aceptación sensorial de las formulaciones seleccionadas.

V. OBJETIVO DEL TRABAJO

5.1 Objetivo general

Desarrollar botanas de tercera generación elaboradas con maíz azul (*Zea mays* L.) y frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.), y evaluar el efecto de la formulación y del procesamiento sobre sus propiedades nutrimentales, fisicoquímicas, tecnofuncionales y estructurales, así como la aceptación sensorial de las formulaciones seleccionadas.

5.2 Objetivos particulares

1. Establecer las formulaciones y condiciones de procesamiento para la elaboración de botanas de tercera generación a partir de maíz azul (*Zea mays* L.) y frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.), mediante extrusión y expansión por microondas.
2. Determinar las propiedades nutrimentales y tecnofuncionales de las botanas de tercera generación, mediante el análisis de su composición proximal, propiedades de hidratación, expansión, densidad y textura.
3. Evaluar la digestibilidad *in vitro* y la calidad nutrimental proteica de las formulaciones, mediante la determinación de la digestibilidad *in vitro* de la materia seca y de la proteína, y la estimación de indicadores de calidad proteica.
4. Evaluar el efecto del procesamiento y de la digestión *in vitro* sobre los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante *in vitro* de las formulaciones, mediante la cuantificación de compuestos fenólicos totales y los ensayos DPPH y ABTS, así como determinar los cambios en el contenido de antocianinas y ácido fítico asociados al procesamiento.
5. Analizar las transformaciones estructurales y microestructurales de las formulaciones durante el procesamiento, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), difracción de rayos X

(XRD), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (ATR-FTIR) y electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

6. Evaluar la aceptación sensorial de las formulaciones seleccionadas de botanas de tercera generación expandidas por microondas, mediante una prueba afectiva con consumidores no entrenados.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño del estudio

El presente proyecto corresponde a un estudio experimental y analítico, orientado al desarrollo, caracterización integral y evaluación funcional de botanas extruidas de tercera generación elaboradas a partir de maíz azul (*Zea mays* L.) y frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.) como ingredientes autóctonos. La estrategia metodológica contempla etapas secuenciales que abarcan desde la obtención y procesamiento de materias primas hasta el análisis sensorial de los productos elaborados, conforme a los objetivos específicos planteados (**Figura 4**).

6.2 Área de trabajo

El trabajo experimental se llevó a cabo en múltiples sedes institucionales con infraestructura especializada, durante el periodo comprendido de agosto de 2022 a julio de 2026. Las instituciones participantes fueron: 1) Laboratorio de Alimentos Unidad B, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL); 2) Laboratorio de Cereales y Oleaginosas, Centro de Biotecnología FEMSA, Instituto Tecnológico de Monterrey (ITESM); 3) Laboratorio de Alimentos, Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública, Facultad de Salud Pública y Nutrición (FaSPyN-UANL); 4) Laboratorio de Alimentos I, II y Laboratorio de Evaluación Sensorial, Facultad de Ciencias Químicas, Campus Universitario II, Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH); y 5) Incubadora de Biotecnología, Instituto de Innovación y Transferencia de Tecnología de Nuevo León (I2T2), Parque de Investigación e Innovación Tecnológica de Nuevo León (PIIT).

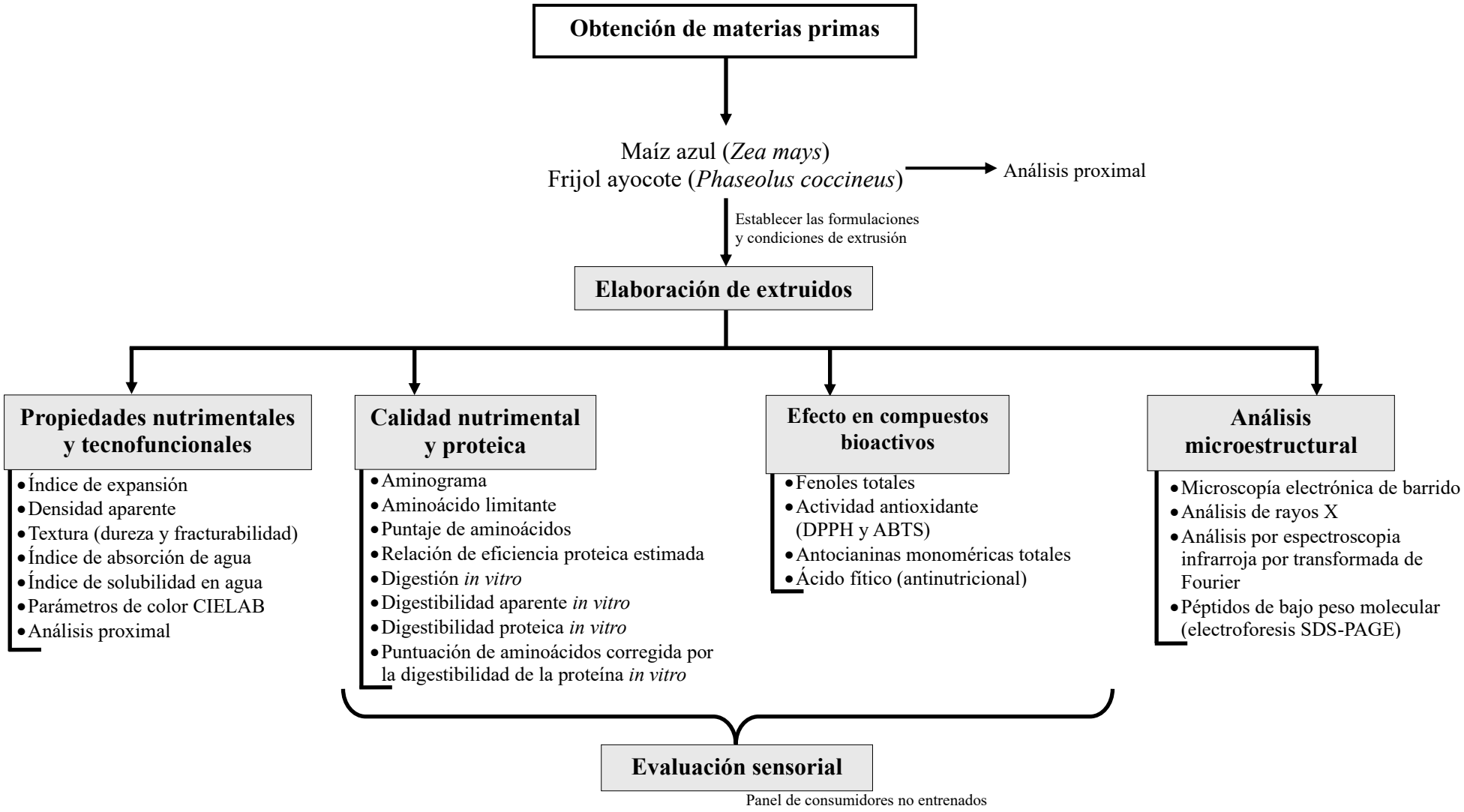


Figura 4. Esquema general de trabajo.

6.3 Objetivo particular 1: Elaboración de extruidos

6.3.1 Obtención de las materias primas

Las semillas de frijol ayocote morado (*Phaseolus coccineus* L.) fueron adquiridas en un mercado local de productores ubicado en una zona rural del estado de Puebla, México, mientras que la variedad nativa de maíz azul (*Zea mays* L.) se obtuvo directamente de pequeños productores pertenecientes a comunidades de la Sierra Tarahumara, Chihuahua, México, una región reconocida por su diversidad de razas nativas y sistemas tradicionales de cultivo de temporal.

Ambas materias primas fueron cosechadas en madurez fisiológica completa, secadas de forma natural y almacenadas bajo condiciones ambientales antes de su adquisición. Al llegar al laboratorio, las semillas y los granos fueron inspeccionados manualmente para retirar unidades rotas, dañadas o visiblemente deterioradas, con el fin de asegurar una calidad homogénea para las etapas posteriores de molienda y procesamiento.

Previo a la elaboración de las muestras utilizadas en el presente estudio, se llevó a cabo una etapa de desarrollo del producto orientada al establecimiento de las formulaciones y condiciones de extrusión. Durante esta fase se realizaron corridas preliminares y ajustes sucesivos tanto en la composición de las mezclas como en las variables de procesamiento, con el propósito de obtener pellets con adecuada estabilidad física y comportamiento tecnológico para su posterior caracterización. Las condiciones finales establecidas durante esta etapa corresponden al protocolo descrito en los apartados siguientes, mientras que los resultados del proceso de desarrollo se presentan en la sección 7.1.

6.3.2 Acondicionamiento de las materias primas para la extrusión

Las semillas de frijol ayocote morado y maíz azul se procesaron por separado en un molino de martillos (Pulvex, modelo 200; Ciudad de México, México) equipado con un tamiz de 2 mm, y posteriormente las harinas obtenidas se tamizaron nuevamente utilizando una malla de 400 µm para garantizar una granulometría fina y homogénea, adecuada para el proceso de extrusión.

A partir de estas harinas se prepararon cinco formulaciones experimentales, sustituyendo parcialmente la harina de maíz azul con harina de frijol ayocote en proporciones de 10, 20, 30, 40 y 45 % p/p. Además, se consideraron dos tratamientos control, correspondientes a las harinas puras de maíz azul (100 %) y frijol ayocote (100 %), con el fin de contar con puntos de referencia para

la comparación de las propiedades tecnofuncionales, nutrimentales y bioactivas. Las mezclas formuladas y las harinas individuales se envasaron en bolsas plásticas de poliuretano de alta densidad, se protegieron de la luz y se almacenaron en condiciones de laboratorio (22 ± 2 °C, humedad relativa controlada) hasta su utilización, evitando la exposición a humedad o radiación directa que pudiera alterar su composición o estabilidad.

6.3.3 Proceso de extrusión

La extrusión se llevó a cabo en lotes de 5 kg por formulación, siguiendo la metodología propuesta por Neder-Suárez *et al.* (2021), con modificaciones. El procesamiento se realizó en una extrusora de doble husillo co-rotante (BTSK-20/40, Bühler AG, Uzwil, Suiza) equipada con un barril de 600 mm y una relación longitud/diámetro (L/D) de 20. El sistema operó con una tasa de alimentación de sólidos de 2.8 kg/h, a la que se añadió un flujo de agua de aproximadamente 3.26 L/h directamente en la zona de alimentación, manteniendo una velocidad de tornillo de 200 rpm. El barril estuvo dividido en cuatro zonas de temperatura controlada, programadas de la siguiente manera:

- Zona 1 (alimentación): 58 °C
- Zonas 2 y 3 (cocción): 120 °C y 118 °C, respectivamente
- Zona 4 (cercana a la matriz): 65 °C

El material fue conformado mediante una matriz circular de 2 mm de diámetro, y el sistema de corte operó a 303 rpm. Los extruidos obtenidos se secaron en un horno de convección (Zucchelli Alpha, Zucchelli, Italia) a 85 °C durante 60 minutos, con el fin de reducir el contenido de humedad y estabilizar la estructura del pellet previo a la expansión. Posteriormente, los productos se envasaron al vacío en bolsas de polietileno, se protegieron de la luz y se almacenaron a -20 °C hasta su utilización en las etapas subsecuentes.

6.4 Objetivo particular 2: Propiedades nutrimentales y tecnofuncionales

6.4.1 Proceso de expansión por microondas

La expansión por microondas se ejecutó mediante un enfoque secuencial de optimización y aplicación. Primero, se realizó un análisis cinético de expansión con base en Delgado-Nieblas *et al.* (2012), con modificaciones, para definir el tiempo óptimo de máxima expansión volumétrica. Para cada formulación (e incluidos los controles), se colocaron 30 pellets sobre placas Petri y se

sometieron a calentamiento en un horno de microondas doméstico (Emerson MW8107WA SUFFIX A; 1,300 W, 2,450 Hz) a distintos tiempos de exposición (9, 12, 15, 18, 20 y 21 s). La medición del diámetro (sin expandir y expandido) se efectuó con un calibrador vernier digital (DOGOTULS MA2011; precisión ± 0.01 mm) en tres puntos (centro y extremos) por pellet. A partir del diámetro promedio se calculó el índice de expansión.

Con base en la cinética, se estableció un tiempo óptimo de 20 s, que produjo máxima expansión y estructura porosa homogénea sin colapsos ni quemaduras superficiales. En la segunda etapa, dicho tiempo se aplicó de manera estandarizada para expandir todas las muestras siguiendo Neder-Suárez *et al.,* (2021), con ligeras modificaciones. Tras la expansión, los productos se enfriaron a 22 ± 2 °C, se molieron en molino analítico (IKA A11 basic, IKA®-Werke GmbH y Co. KG, Staufen, Alemania) y se almacenaron a -20 °C en recipientes sellados y protegidos de la luz hasta su análisis posterior.

6.4.2 Índice de expansión

El índice de expansión (IE) de los extruidos y expandidos se determinó siguiendo la metodología descrita por Alvarez-Martinez *et al.* (1988), con ligeras modificaciones. Para cada formulación y controles, se seleccionaron aleatoriamente extruidos representativos (n = 5) y se midieron los diámetros antes y después de la expansión con un calibrador vernier digital (DOGOTULS MA2011; precisión 0.01 mm), realizando mediciones en tres puntos (centro y extremos) por unidad para obtener un valor promedio y reducir la variabilidad experimental.

El IE se calculó como la relación entre el diámetro del extruido (D_e) y el diámetro de la boquilla del extrusor (D_d = 2 mm), de acuerdo con la ecuación 1 (**Ec. 1**):

$$IE = \frac{D_e}{D_d} \qquad \textbf{(Ec. 1)}$$

Esta determinación permitió cuantificar la expansión transversal de cada formulación tras el procesamiento por extrusión y expansión por microondas en las condiciones previamente optimizadas.

6.4.3 Densidad aparente

La densidad aparente (D, $kg \cdot m^{-3}$) se determinó en los extruidos de todas las formulaciones siguiendo la metodología descrita por Delgado-Nieblas *et al.* (2019), con ligeras modificaciones.

Para cada tratamiento se realizaron cinco réplicas, utilizando extruidos individuales de aproximadamente 20 mm de longitud.

La masa (ws) de cada muestra se registró en una balanza analítica (±0.0001 g), mientras que el diámetro (*d*) y la longitud (*l*) se midieron con un calibrador vernier digital (DOGOTULS MA2011; precisión 0.01 mm). El diámetro se obtuvo como el promedio de tres mediciones equidistantes a lo largo del extruido (extremo inicial, centro y extremo final). La densidad aparente se calculó aplicando la ecuación 2 (**Ec. 2**):

$$D = \frac{ws}{\left[(\pi)\left(\frac{d}{2}\right)^2(l)\right]} \qquad \textbf{(Ec. 2)}$$

donde *ws* es el peso de la muestra (kg), *d* el diámetro (m) y *l* la longitud (m).

6.4.4 Textura

La dureza (N) y fracturabilidad (N) de los extruidos, tanto en estado expandido como no expandido, se determinaron utilizando un analizador de textura CT3 Brookfield (Brookfield Engineering, Middleboro, MA, EE. UU.) equipado con un TA-RT Probe Kit y una punta TA7 tipo cuchilla (ancho 60 mm). Las muestras, de aproximadamente 25 mm de longitud, se colocaron horizontalmente sobre un accesorio de flexión de tres puntos y se comprimieron con una carga de activación inicial de 1 N, hasta alcanzar una distancia objetivo de 2 mm, a una velocidad de prueba de 2.00 mm/s.

Para cada tratamiento se realizaron n = 25 mediciones con el fin de reducir el coeficiente de variación y el error estándar, conforme a las recomendaciones de R. T. Patil *et al.,* (2007). La evaluación se basó en la obtención de curvas fuerza–tiempo para determinar la fuerza máxima (dureza) y el punto de fractura, siguiendo enfoques metodológicos empleados en estudios previos sobre caracterización textural de extruidos (Ding *et al.,* 2005). Los valores promedio y la desviación estándar se calcularon y reportaron para cada variable analizada.

6.4.5 Índice de absorción de agua e índice de solubilidad en agua

El índice de absorción de agua (WAI) y el índice de solubilidad en agua (WSI) se determinaron por triplicado siguiendo el método descrito por Anderson *et al.* (1970), con ligeras modificaciones. Para este análisis se utilizaron las harinas correspondientes a las formulaciones originales (muestras no extruidas) y los extruidos expandidos por microondas, los cuales fueron fueron fragmentados en una licuadora doméstica (Oster BEST02-E01) y posteriormente molidos finamente en un molino

analítico de laboratorio (IKA® A 11 basic, IKA®-Werke GmbH y Co. KG, Staufen, Alemania) hasta obtener una harina homogénea.

Se pesó 1 g de muestra en tubos de plástico de 50 mL previamente tarados, y se adicionaron 12 mL de agua destilada. Las suspensiones se agitaron en un vórtex (VX-200, LABNET, EE. UU.) durante 30 minutos a temperatura ambiente, se dejaron reposar por 5 minutos, y luego se centrifugaron a 3000 × g durante 15 minutos en una centrífuga Hermle (Z 216 MK, Hermle Labortechnik GmbH, Alemania).

El sobrenadante se transfirió cuidadosamente a charolas de aluminio previamente pesadas y se secó en un horno de convección (Felisa FE-292D, México) hasta peso constante para determinar el residuo seco soluble. El sedimento hidratado restante en los tubos se pesó inmediatamente después de la centrifugación.

El WAI se expresó como la cantidad de agua retenida por gramo de muestra seca después de la centrifugación y se calculó con la ecuación 3 (**Ec. 3**):

$$\text{WAI (g/g)} = \frac{\text{Peso del sedimento (g)}}{\text{Peso inicial de la muestra seca (g)}} \qquad \textbf{(Ec. 3)}$$

El WSI se expresó como el porcentaje de sólidos solubles liberados en el sobrenadante tras la centrifugación, y se obtuvo mediante la ecuación 4 (**Ec. 4**):

$$\text{WSI (\%)} = \frac{\text{Peso del residuo seco del sobrenadante (g)}}{\text{Peso inicial de la muestra seca (g)}} \times 100 \qquad \textbf{(Ec. 4)}$$

6.4.6 Parámetros de color

El color de las diferentes formulaciones extruidas, así como de los controles en estado sin expandir y expandido, se evaluó mediante un espectrofotómetro de reflectancia triestímulo ColorFlex EZ (HunterLab, Reston, VA, EE. UU.) con geometría 45°/0°, diseñado para simular la percepción del color por el ojo humano. Las mediciones se realizaron utilizando el iluminante D65 y un ángulo de observación de 10°, registrando los valores en el espacio de color CIELAB (L*, a*, b*).

Cada muestra se colocó en una celda de vidrio transparente, compactándola ligeramente de manera uniforme para evitar vacíos de aire y cubrir completamente la apertura de medición del instrumento. Para cada tratamiento se efectuaron tres lecturas independientes, calculando el

promedio y la desviación estándar de los valores obtenidos con el fin de garantizar la precisión de los resultados.

6.4.7 Análisis proximal

La composición proximal se determinó en las siete formulaciones descritas en la Sección 6.3.3, que incluyen harinas crudas (controles) y sus correspondientes extruidos antes de la expansión por microondas. Se evaluaron los contenidos de humedad, cenizas, lípidos, proteína cruda y fibra dietética total, siguiendo los métodos oficiales de la AOAC International, (2023): 934.06 (humedad), 942.05 (cenizas), 920.39 (lípidos, extracción Goldfish), 992.15 (proteína, combustión Dumas) y 985.29 (fibra dietética total, método enzimático–gravimétrico).

La fibra dietética total se determinó utilizando el Total Dietary Fiber Assay Kit TDF-100A (Sigma-Aldrich, EE. UU.), que se basa en digestiones enzimáticas secuenciales (α-amilasa, proteasa y amiloglucosidasa), precipitación con etanol, filtración y secado del residuo, con correcciones por cenizas y proteínas. Los resultados se expresaron en porcentaje de fibra dietética total en base seca.

6.5 Objetivo particular 3: Calidad nutrimental y proteica

6.5.1 Perfil de aminoácidos

La composición de aminoácidos se determinó para las siete formulaciones descritas en la Sección 6.3, que incluyen las formulaciones harinas crudas (controles) y las formulaciones extruidas posteriores al proceso de expansión por microondas. El análisis se realizó conforme al método cromatográfico en fase reversa descrito por Vázquez-Ortiz *et al.* (1995), basado en la derivatización precolumna de aminoácidos primarios con o-ftaldialdehído (OPA) y de aminoácidos secundarios con 4-cloro-7-nitrobenzofurazán (NBD).

Brevemente, los aminoácidos primarios se derivatizaron con OPA en tampón borato (0.5 M, pH 10.4) y se separaron en una columna de fase reversa Microsorb Short-ones C18 (10 cm × 4.6 mm, 3 μm) mediante un gradiente de elución en siete pasos. Los aminoácidos secundarios se derivatizaron con NBD y se separaron en una columna Lichrosorb FW-C18 (30 cm × 4.6 mm, 5 μm) bajo un programa de elución independiente. La detección se llevó a cabo por fluorometría, utilizando una longitud de onda de excitación de 330 nm y un filtro de emisión de 418 nm para los derivados con OPA, y 220 nm de excitación y 370 nm de emisión para los derivados con NBD.

Se emplearon curvas de calibración preparadas con estándares de aminoácidos, utilizando α-aminobutírico como estándar interno. Los resultados se expresaron en gramos de cada aminoácido por 100 g de proteína.

6.5.2 Puntaje de aminoácidos y aminoácido limitante

El puntaje de aminoácidos (Amino Acid Score, *AAS*), también denominado puntaje químico de la proteína, se determinó comparando el contenido de cada aminoácido esencial presente en 1 g de proteína de las muestras con el patrón de referencia de la FAO/WHO (FAO, 2013).

Para cada aminoácido indispensable, el *AAS* se calculó mediante la ecuación 5 (**Ec. 5**):

$$AAS = \frac{\text{mg de aminoácido en 1 g de proteína de la muestra}}{\text{mg de aminoácido en el patrón de referencia}} \qquad \textbf{(Ec. 5)}$$

El aminoácido limitante se definió como aquel que presentó la relación más baja respecto al patrón de referencia, y su valor se consideró el *AAS* de la proteína.

Dado que este estudio se enfoca en el desarrollo de botanas dirigidas a la población general, se utilizó el patrón correspondiente a la categoría "niños mayores, adolescentes y adultos" recomendado por la FAO (2013), que establece los valores de referencia (mg/g proteína) para cada aminoácido indispensable.

6.5.3 Relación de eficiencia proteica estimada

La relación de eficiencia proteica estimada (E-PER) se determinó para las formulaciones de harinas crudas y los extruidos sin expansión, utilizando los datos de composición de aminoácidos obtenidos previamente. El cálculo se realizó siguiendo la ecuación 6 (**Ec. 6**) predictiva propuesta por Alsmeyer *et al.* (1974), la cual permite estimar el E-PER a partir de los contenidos de leucina y tirosina (g por 100 g de proteína):

$$\text{E-PER} = -0.468 + 0.454(\text{Leu}) - 0.105(\text{Tyr}) \qquad \textbf{(Ec. 6)}$$

6.5.4 Simulación estática *in vitro* de la digestión gastrointestinal

La digestión *in vitro* se realizó siguiendo el protocolo estandarizado INFOGEST propuesto por Brodkorb *et al.* (2019), con ligeras modificaciones para adecuarlo a las características fisicoquímicas y estructurales de las muestras analizadas. Se prepararon fluidos salival (SSF),

gástrico (SGF) e intestinal (SIF) simulados, reproduciendo la composición iónica característica de las secreciones digestivas humanas (Tabla 6).

Tabla 6. Composición de los fluidos digestivos simulados. Las concentraciones se expresan en milimolar (mM)

Compuesto	SSF[a] (pH 7)	SGF[b] (pH 3)	SIF[c] (pH 7)
KCl	15.1	6.9	6.8
KH_2PO_4	3.7	0.9	0.8
$NaHCO_3$	13.6	25.0	85.0
NaCl	–	47.2	38.4
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.15	0.12	0.33
$(NH_4)_2CO_3$	0.06	0.5	–
HCl	1.1	15.6	8.4
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1.5	0.15	0.6

[a]SSF = fluido saliva simulado; [b]SGF = fluido gástrico simulado; [c]SIF = fluido intestinal simulado. Los ajustes de pH se realizaron con HCl (5 M) o NaOH (5 M), según correspondiera.

Las digestiones *in vitro* se realizaron por triplicado analítico a partir de una muestra homogeneizada correspondiente a cada formulación y tratamiento, incluyendo una réplica adicional para el ajuste de pH y un blanco enzimático por tratamiento. El control metodológico consistió en harinas crudas y extruidos (maíz azul y frijol ayocote) que fueron sometidos a todo el procedimiento de digestión (contacto con fluidos simulados, ajustes de pH y condiciones de incubación) pero sin adición de enzimas digestivas, con el fin de descartar posibles interferencias derivadas de la matriz o de los fluidos empleados.

Se evaluaron las harinas crudas (controles) y sus correspondientes extruidos expandidos. Estos últimos fueron previamente molidos finamente en un molino analítico (IKA A11 basic, IKA®-Werke GmbH y Co. KG, Staufen, Alemania) y almacenados en envases herméticos protegidos de la luz hasta su análisis. Para cada réplica se pesaron 3 g de muestra en tubos de polipropileno ámbar de 50 mL (Corning®).

La digestión se realizó a 37 °C en una incubadora con agitación orbital (VWR 1575 Signature, VWR International, Radnor, PA, EE. UU.) ajustada a 60 rpm. El pH de cada fase se ajustó al inicio mediante soluciones de NaOH 5 M o HCl 5 M según correspondiera.

- Fase oral: las muestras se mezclaron con 9.0 mL de SSF y 45 µL de $CaCl_2$ 0.3 M (relación 1:3 p/v). De acuerdo con los objetivos del estudio, no se añadió α-amilasa salival. El bolo se homogeneizó en vórtex e incubó durante 2 min.

- Fase gástrica: el bolo oral se mezcló (1:1 v/v) con SGF, pepsina [≥400 unidades/mg proteína] (16 mg/mL) y 6 µL de $CaCl_2$ 0.3 M. El pH se ajustó a 3.0, se homogeneizó y se incubó durante 2 h.
- Fase intestinal: el quimo gástrico se mezcló (1:1 v/v) con SIF, pancreatina (48 mg; 4× USP), extracto biliar (120 mg; B8631 – 100G) y 48 µL de $CaCl_2$ 0.3 M. El pH se ajustó a 7.0 y se incubó durante 2 h adicionales.

Al finalizar, los digeridos se ajustaron a pH 10.5 para inactivar las enzimas y se almacenaron a −80 °C hasta su posterior análisis.

6.5.5 Digestibilidad aparente *in vitro* de la materia seca

La digestibilidad aparente *in vitro* de la materia seca (A-IVDMD) se determinó por gravimetría después de la digestión *in vitro*, siguiendo la extensión del protocolo INFOGEST descrita por Pérez-Burillo *et al.* (2021). Al finalizar la digestión, se obtuvieron aproximadamente 48 mL de digerido por tubo, los cuales se centrifugaron a 4000 × g durante 10 minutos en una centrífuga universal (Z 366, Hermle) para recuperar el residuo insoluble.

El pellet resultante se secó en un horno eléctrico (Felisa FE-292D) a 50 °C durante 24 h, hasta alcanzar peso constante, y se registró como masa seca del residuo (DM_{res}). La fracción soluble del digerido, que permanece en el sobrenadante, se considera como la fracción potencialmente absorbible en el tracto gastrointestinal, mientras que el residuo insoluble representa la fracción no digerida, análoga a la "excreta *in vitro*" generada tras el proceso digestivo (Pérez-Burillo *et al.*, 2021).

La digestibilidad aparente *in vitro* de la materia seca (A-IVDMD, %) se calculó mediante la ecuación 7 (**Ec. 7**):

$$\text{A-IVDMD (\%)} = \frac{DM_0 - DM_{res}}{DM_0} \times 100 \qquad \textbf{(Ec. 7)}$$

donde DM_0 corresponde a la masa seca inicial de la muestra antes de la digestión, y DM_{res} a la masa seca del residuo después de la digestión.

6.5.6 Digestibilidad proteica *in vitro*

La digestibilidad proteica *in vitro* (IVPD) se determinó empleando el residuo insoluble (pellet) recuperado en el ensayo de A-IVDMD. El contenido de nitrógeno del residuo seco se cuantificó

mediante el método de combustión de Dumas, utilizando un analizador LECO FP-528 (LECO Corp., St. Joseph, MI, EE. UU.), reconocido por su alta precisión y reproducibilidad en matrices alimentarias complejas. Posteriormente, el contenido de proteína se calculó aplicando el factor de conversión N × 6.25.

De forma paralela, el contenido proteico inicial (P_0) de cada muestra sin digerir se determinó con la misma metodología para asegurar la comparabilidad analítica entre muestras digeridas y no digeridas. La digestibilidad proteica se expresó como porcentaje de proteína potencialmente hidrolizada tras la digestión estática, de acuerdo con la ecuación 8 (**Ec. 8**):

$$\text{IVPD (\%)} = \frac{P_0 - P_{\text{res}}}{P_0} \times 100 \qquad \textbf{(Ec.8)}$$

donde P_0 corresponde al contenido de proteína inicial y P_{res} representa el contenido proteico remanente en el residuo post-digestión.

El cálculo se realizó siguiendo el enfoque propuesto por Li *et al.,* (2017), con ligeras adaptaciones para matrices mixtas de cereales y leguminosas, con el objetivo de capturar posibles sinergias o limitaciones derivadas de la complementación proteica. Esta determinación se aplicó a las harinas crudas y a los extruidos expandidos de todas las formulaciones.

6.5.7 Puntaje de aminoácidos corregido por digestibilidad proteica *in vitro*

El puntaje de aminoácidos corregido por digestibilidad proteica *in vitro* (IV-PDCAAS) se calculó adaptando la metodología propuesta por la FAO/WHO (FAO, 2013). Este indicador integra simultáneamente la composición de aminoácidos esenciales y la fracción efectivamente digerible de las proteínas, proporcionando una estimación más completa y fisiológicamente relevante de la calidad proteica en comparación con el uso aislado del AAS o de la digestibilidad.

En esta adaptación metodológica, la digestibilidad verdadera fecal tradicionalmente obtenida mediante estudios *in vivo* es sustituida por la digestibilidad proteica *in vitro* (IVPD) determinada según lo descrito en la Sección 6.5.6, lo que permite aplicar este enfoque en estudios de laboratorio de manera más accesible, reproducible y ética.

El IV-PDCAAS se estimó mediante la ecuación 9 (**Ec. 9**):

$$\text{IV-PDCAAS (\%)} = \text{IVPD (\%)} \times \text{AAS} \qquad \textbf{(Ec. 9)}$$

donde IVPD corresponde a la digestibilidad proteica *in vitro* (%) y AAS representa el puntaje del aminoácido limitante de cada formulación.

Este procedimiento adaptado ha sido reportado previamente en estudios de evaluación de calidad proteica utilizando el modelo INFOGEST, mostrando buena correlación con resultados *in vivo* en matrices vegetales y productos extruidos (Ayala-Rodríguez *et al.,* 2022; Le Roux *et al.*, 2020).

6.6 Objetivo particular 4: Efecto en compuestos bioactivos

6.6.1 Contenido fenólico total

El contenido fenólico total (TPC) se determinó en la fracción soluble obtenida tras la fase intestinal de la digestión *in vitro*, la cual representa los compuestos potencialmente biaccesibles. Para ello se utilizó el método colorimétrico de Folin–Ciocalteu, de acuerdo con Singleton y Rossi, (1965), con ligeras modificaciones.

Se tomaron 10 µL del sobrenadante digerido de cada muestra y se mezclaron con 90 µL de agua destilada, seguidos de 750 µL de reactivo Folin–Ciocalteu (0.2 N) y 750 µL de solución de carbonato de sodio (6 % p/v), obteniéndose un volumen final de reacción de 1.6 mL. Las mezclas se homogenizaron y se incubaron durante 90 minutos en oscuridad a temperatura ambiente para permitir el desarrollo del color característico. La absorbancia se midió a 760 nm en un espectrofotómetro UV–Vis (Evolution 300LC, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.).

Para la curva de calibración, se preparó una solución madre de ácido gálico (0.5 g en 10 mL de agua destilada) y se elaboraron soluciones estándar de trabajo (20–300 µL) diluidas hasta 10 mL con agua, tratadas de manera idéntica a las muestras. El blanco de reactivos se preparó sustituyendo el estándar o la muestra por agua destilada.

Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de materia seca (mg GAE/g MS). Todos los análisis se realizaron por triplicado para asegurar la precisión y reproducibilidad de los datos.

6.6.2 Actividad captadora de radicales DPPH y ABTS

La capacidad antioxidante de las fracciones solubles intestinales obtenidas tras la digestión *in vitro* se determinó mediante los métodos espectrofotométricos de captura de radicales libres DPPH• y $ABTS^{\bullet+}$.

6.6.2.1 Ensayo DPPH

La actividad captadora de radicales DPPH• se determinó siguiendo el protocolo descrito por Bondet *et al.* (1997), con ligeras modificaciones. Se mezclaron 25 µL de sobrenadante del digerido con 975 µL de una solución fresca de DPPH (0.024 g/L en metanol), obteniendo un volumen final de reacción de 1.0 mL. Las mezclas se incubaron durante 60 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente, y posteriormente se midió la disminución de la absorbancia a 515 nm utilizando un espectrofotómetro UV–Vis (Evolution 300LC, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.).

6.6.2.2 Ensayo ABTS

La actividad captadora de radicales $ABTS^{\bullet+}$ se determinó siguiendo la metodología descrita por van den Berg *et al.* (1999), con ligeras modificaciones. La solución stock de $ABTS^{\bullet+}$ se preparó mezclando 7 mM de ABTS con 2.45 mM de persulfato de potasio (1:1 v/v) y dejándola reposar de 12 a 16 horas en oscuridad a temperatura ambiente para permitir la formación completa del radical. La solución de trabajo se obtuvo diluyendo 2.5 mL de la solución stock con etanol hasta alcanzar una absorbancia de 0.70–0.80 a 734–735 nm.

Para el análisis, 20 µL de sobrenadante no diluido se mezclaron con 980 µL de la solución de trabajo de $ABTS^{\bullet+}$ (volumen final 1.0 mL), se incubaron durante 7 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente y se midió la disminución de la absorbancia a 734–735 nm en el espectrofotómetro UV–Vis (Evolution 300LC, Thermo Scientific, EE. UU.).

6.6.2.3 Curva de calibración y expresión de resultados

La curva de calibración para ambos métodos se preparó a partir de una solución stock de Trolox ~1 mM (0.0025 g en 10 mL de metanol). Se tomaron alícuotas de 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 µL, las cuales se llevaron a un volumen final de 1.0 mL con agua destilada y se procesaron bajo las mismas condiciones que las muestras. El agua destilada se utilizó como blanco. Las curvas de calibración se construyeron relacionando la absorbancia obtenida con la concentración de Trolox expresada en µM.

La actividad antioxidante se calculó a partir de la concentración equivalente de Trolox obtenida mediante la ecuación de regresión correspondiente a cada ensayo (ABTS y DPPH). Posteriormente, los resultados se corrigieron considerando el volumen total del digerido y la masa de muestra

utilizada en la digestión *in vitro*, y se expresaron como micromoles de equivalentes de Trolox por gramo de materia seca (μmol ET/g MS).

En cada ensayo se incluyó un blanco enzimático de la digestión *in vitro*, preparado siguiendo todo el procedimiento estándar (preparación de fluidos, ajustes de pH y tiempos de incubación), pero sin adición de muestra. Este blanco permitió cuantificar la absorbancia atribuible a los reactivos y enzimas digestivas por sí solas, la cual se restó de la absorbancia de las muestras digeridas para obtener la respuesta neta derivada exclusivamente de la muestra. Esta corrección se aplicó a los datos de contenido fenólico total y actividad antioxidante (ABTS y DPPH). Los valores del blanco no se incluyeron en el análisis estadístico (ANOVA), ya que no corresponden a formulaciones experimentales reales.

6.6.3 Antocianinas monoméricas totales

El contenido total de antocianinas monoméricas se cuantificó mediante el método diferencial de pH descrito por Giusti y Wrolstad, (2001). Para la extracción, 0.5 g de muestra finamente molida (harinas crudas, extruidos sin expansión y extruidos expandidos) se mezclaron con 5 mL de etanol acidificado (0.1 % HCl, v/v) y se sometieron a sonicación durante 20 min a < 20 °C. Posteriormente, los extractos se centrifugaron a 4700 × g durante 10 min a 14 °C, y el sobrenadante se filtró a través de filtros de jeringa de 0.22 μm.

Para el análisis espectrofotométrico, alícuotas del extracto se diluyeron 1:3 con etanol acidificado (50 μL de extracto + 150 μL de etanol acidificado) y se completaron a 1.0 mL con tampón cloruro de potasio 0.025 M (pH 1.0) o con tampón acetato de sodio 0.4 M (pH 4.5). Las mezclas se dejaron en equilibrio durante 15 min en oscuridad a temperatura ambiente, y la absorbancia se registró a 510 y 700 nm (UV–Vis Evolution 300LC, Thermo Scientific). Todos los valores de absorbancia se mantuvieron < 1.2 para asegurar la linealidad.

La absorbancia corregida (A) se calculó mediante la ecuación 10 (**Ec. 10**):

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH1.0} - (A_{510} - A_{700})_{pH4.5} \qquad \textbf{(Ec. 10)}$$

El contenido de antocianinas se expresó en equivalentes de cianidina-3-glucósido (C3GE) utilizando un peso molecular (*MW*) de 449.2 g/mol y un coeficiente de extinción molar (ε) de 26,900 L/mol·cm de acuerdo con la ecuación 11 (**Ec. 11**):

$$\text{Antocianinas (mg C3GE/L)} = \frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\varepsilon \times l} \quad \textbf{(Ec. 11)}$$

donde *DF* es el factor de dilución y *l* la longitud de celda (1 cm). Los resultados se reportaron como mg C3GE/100 g de materia seca (mg C3GE/100 g MS). Todos los análisis se realizaron por triplicado, protegiendo las muestras de la luz.

6.6.4 Determinación de ácido fítico

El contenido de ácido fítico se determinó en harinas crudas y muestras extruidas y expandidas mediante el método colorimétrico descrito por Gao *et al.* (2007) con ligeras modificaciones. Las harinas crudas y las muestras extruidas expandidas fueron molidas y tamizadas para obtener una harina fina y homogénea previo a su análisis. En ambos casos, las muestras fueron tamizadas para obtener una harina fina y homogénea previo a su análisis.

Para la extracción, se pesaron 0.5 g de muestra molida y se adicionaron 10 mL de HCl al 2.4%. Las muestras se mantuvieron bajo agitación orbital a 220 rpm durante 16 h a temperatura ambiente. Posteriormente, los extractos se centrifugaron a 1000 × g durante 20 min a 10 °C y el sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo que contenía 1 g de NaCl. La mezcla se agitó a 350 rpm durante 20 min a temperatura ambiente y posteriormente se mantuvo a −20 °C durante 20 min para favorecer la precipitación de compuestos interferentes. Las muestras se centrifugaron nuevamente a 1000 × g durante 20 min a 10 °C. El sobrenadante recuperado se sometió a una tercera centrifugación bajo las mismas condiciones con el fin de mejorar la clarificación del extracto. Finalmente, el sobrenadante se filtró mediante filtros de membrana de 0.45 μm.

Para la cuantificación, se mezclaron 3 mL del extracto filtrado con 1 mL de reactivo de Wade, preparado fresco antes de cada análisis y compuesto por 0.03% de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ y 0.3% de ácido sulfosalicílico. La mezcla se homogenizó en vortex durante 30 s y se transfirió a una celda para la determinación espectrofotométrica. La absorbancia se registró a 500 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Visible (Evolution 300, Thermo Scientific, EE.UU.). La cuantificación se realizó mediante una curva estándar preparada a partir de fitato de sodio en concentraciones de 0, 25, 50, 75, 100 y 125 mg/L. Los resultados se expresaron como mg de ácido fítico por 100 g de muestra en base seca.

6.7 Objetivo particular 5: Análisis microestructural

6.7.1 Evaluación de cambios en el perfil proteico mediante electroforesis SDS-PAGE

El perfil de péptidos de bajo peso molecular se evaluó mediante electroforesis unidimensional desnaturalizante en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS–PAGE), empleando un sistema de tampón discontinuo de acuerdo con Laemmli, (1970), con modificaciones basadas en Xing *et al.* (2017) para mejorar la resolución en el rango peptídico. Esta técnica permitió visualizar cualitativamente los fragmentos proteicos y péptidos generados durante el procesamiento térmico (extrusión y expansión por microondas) y la digestión gastrointestinal *in vitro* simulada.

6.7.1.1 Preparación de las muestras

Se analizaron las harinas crudas (maíz azul y frijol ayocote morado), los extruidos expandidos y los digeridos correspondientes a las fases gástrica e intestinal obtenidos mediante el protocolo INFOGEST. Las muestras no digeridas se prepararon pesando 3 g en balanza analítica (HR-250AZ, AyD Weighing) y completando a 48 mL con los fluidos simulados (oral, gástrico e intestinal) en sus respectivas proporciones, cambios de pH y sin enzimas digestivas. En todos los casos, las suspensiones se homogeneizaron en un vórtex para eliminar grumos y asegurar una distribución uniforme de proteínas y péptidos.

6.7.1.2 Preparación de geles y corrida electroforética

Los geles se prepararon siguiendo el protocolo del fabricante (Bio-Rad Laboratories, 2014), utilizando geles de poliacrilamida al 12% en la fase de resolución, con el fin de optimizar la separación en el rango de <50 kDa, y al 4% en la fase concentradora, con un espesor de 0.8 mm. De cada muestra, se tomaron 25 µL, se mezclaron en proporción 1:2 con buffer de muestra conteniendo β-mercaptoetanol, y se calentaron a 95 °C por 4 min para desnaturalizar las proteínas. Se cargaron 22 µL por carril y 16 µL de marcador de peso molecular (BIO BASIC® wide range protein molecular weight marker) como referencia.

La electroforesis se realizó en un sistema de electroforesis vertical de una cara (Thermo Scientific Owl P81 Single-Sided Vertical Electrophoresis System) con un sistema de tampón discontinuo. Se aplicó inicialmente un voltaje de 60 V hasta que el frente migratorio alcanzó el gel de resolución, posteriormente se incrementó a 120 V hasta completar la corrida.

6.7.1.3 Tinción y análisis de bandas

Los geles se tiñeron toda la noche con una solución de azul Coomassie (0.1% en 45% metanol y 45% ácido acético glacial) con agitación constante (80 rpm). El desteñido se realizó con solución metanol–agua–ácido acético (50:45:5) hasta eliminar completamente el fondo. Finalmente, se enjuagaron con agua destilada para obtener bandas nítidas correspondientes a proteínas y péptidos.

6.7.1.4 Análisis de imágenes

Los eles teñidos fueron escaneados y analizados con el software GelAnalyzer 26.1 (Istvan, 2026) para identificar diferencias cualitativas en el perfil electroforético y la distribución de las bandas proteicas, con énfasis en la presencia, ausencia o cambios en la intensidad de bandas de bajo peso molecular (<15 kDa) después de la digestión gastrointestinal simulada. Los cambios observados se analizaron comparativamente entre las muestras crudas y extruidas, considerando las diferentes formulaciones evaluadas, con el propósito de describir las modificaciones en el perfil proteico asociadas al procesamiento y a la digestión *in vitro*.

6.7.2 Microscopía Electrónica de Barrido

El análisis microestructural mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) se realizó para caracterizar las modificaciones en la matriz de las formulaciones extruidas y expandidas en comparación con sus materias primas. Se analizaron muestras de maíz azul, frijol ayocote, mezclas sin extruir y formulaciones extruidas antes y después del proceso de expansión por microondas. Todas las muestras fueron molidas y tamizadas hasta obtener un tamaño de partícula inferior a malla 170 (88 µm) y se ajustaron a un contenido de humedad aproximado del 5 % previo al análisis. Las muestras se montaron sobre soportes metálicos mediante cinta de carbono conductiva y se recubrieron con una fina capa de oro utilizando un evaporador Denton Vacuum Desk II bajo alto vacío. Posteriormente, se examinaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5800LV (Akishima, Japón), equipado con detector de electrones secundarios y operado a un voltaje de aceleración de 10 kV. Se obtuvieron micrografías de al menos tres campos por muestra a diferentes aumentos para su posterior análisis cualitativo.

6.7.3 Difracción de rayos X

El análisis por difracción de rayos X (XRD) se realizó para caracterizar las modificaciones estructurales inducidas por los procesos de extrusión y expansión. Se analizaron muestras de las materias primas (maíz azul y frijol ayocote) y de formulaciones extruidas representativas. Las

determinaciones se realizaron en un difractómetro X'Pert Pro-MRD (Malvern Panalytical, Reino Unido), operado a 40 kV y 35 mA, utilizando radiación Cu-Kα con una longitud de onda de 0.154056 nm. Los patrones de difracción se registraron en un intervalo de ángulo 2θ de 5° a 30°, con una velocidad de adquisición de 0.5° s^{-1}. Posteriormente, la posición e intensidad relativa de los principales picos de difracción se analizaron mediante el software Xpowder (versión 2004.04.70), comparándolos con patrones de referencia para identificar las fases cristalinas presentes y establecer las diferencias estructurales entre las materias primas y las muestras procesadas.

6.7.4 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier

El análisis mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) se realizó en muestras de las distintas formulaciones extruidas y expandidas por microondas de maíz azul y frijol ayocote para evaluar las modificaciones estructurales inducidas por el procesamiento. Los espectros se obtuvieron utilizando un espectrómetro PerkinElmer ATR-FTIR (PerkinElmer, Norwalk, EE. UU.) equipado con un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR). Las mediciones se realizaron en un intervalo de número de onda de 4000 a 650 cm^{-1}, con una resolución de 4 cm^{-1} y un promedio de 10 escaneos por muestra, siguiendo la metodología descrita por Neder-Suárez *et al*. (2024). Posteriormente, los espectros se analizaron comparando las principales bandas características del almidón y de las proteínas entre las diferentes formulaciones.

6.8 Objetivo particular 6: Evaluación sensorial

El diseño experimental de la evaluación sensorial se estableció con base en la metodología descrita por Neder-Suárez et al. (2024), realizando las adecuaciones necesarias para las características del producto y los objetivos del presente estudio. La evaluación sensorial se realizó con el propósito de determinar la aceptabilidad de botanas extruidas de tercera generación elaboradas a partir de maíz azul (*Zea mays*) enriquecido con frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*). Se evaluaron cuatro formulaciones: un control elaborado con 100 % de maíz azul y tres formulaciones con sustitución parcial de harina de frijol ayocote (30, 40 y 45 %). Todas las muestras se expandieron durante 20 s en horno de microondas, utilizando las condiciones de expansión previamente estandarizadas.

Participaron 81 consumidores no entrenados, mayores de 18 años y sin alergias conocidas al maíz o a leguminosas, quienes aceptaron participar voluntariamente mediante la firma de un consentimiento informado (**Apéndice 12.1**). La evaluación se realizó en una sola sesión en el

Laboratorio de Evaluación Sensorial de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), en cabinas individuales con iluminación blanca y temperatura ambiente controlada (22 ± 2 °C).

Cada muestra consistió en una porción de tres piezas de botana y se presentó en recipientes plásticos codificados con números aleatorios de tres dígitos, asignando dos códigos independientes para cada formulación con el fin de minimizar posibles sesgos de reconocimiento. El orden de presentación de las muestras fue aleatorizado y se proporcionó a cada participante un vaso con 6 oz de agua para el enjuague bucal entre muestras.

Los participantes evaluaron los atributos de apariencia, dureza percibida, sabor, crujencia y aceptabilidad global mediante una escala hedónica estructurada de siete puntos (1 = extremadamente desagradable; 7 = extremadamente agradable). Al concluir la evaluación, se solicitó identificar la muestra de mayor preferencia y responder tres preguntas adicionales relacionadas con el efecto de conocer los ingredientes sobre la percepción del producto, así como con la disposición a consumirlo y comprarlo.

Los datos sensoriales se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Friedman para identificar diferencias entre formulaciones en cada uno de los atributos evaluados. Cuando se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$), se realizaron comparaciones múltiples mediante la prueba de rangos con signo de Wilcoxon con corrección de Bonferroni. En todos los casos se consideró un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

6.9 Análisis estadístico

Los datos experimentales se expresaron como media ± desviación estándar (DE). Previo al análisis inferencial, se verificó el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas mediante las pruebas de Shapiro–Wilk y Levene, respectivamente. En aquellos casos en que se cumplieron dichos supuestos, se aplicaron análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías, según el diseño experimental correspondiente a cada ensayo. Cuando se detectaron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$), las comparaciones múltiples de medias se realizaron mediante la prueba de Tukey HSD. Para la evaluación sensorial, debido a la naturaleza ordinal de los datos obtenidos mediante la escala hedónica, se empleó la prueba no paramétrica de Friedman, seguida de comparaciones múltiples mediante la prueba de rangos con signo de Wilcoxon con corrección de Bonferroni cuando fue necesario.

El tamaño de muestra se estableció de acuerdo con la naturaleza de cada determinación experimental y se especifica en la metodología correspondiente de cada ensayo. En términos generales, los análisis fisicoquímicos y químicos se realizaron por triplicado, mientras que las pruebas instrumentales o de consumidores se efectuaron utilizando el número de observaciones requerido para cada metodología. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando IBM SPSS Statistics versión 27 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) y GraphPad Prism versión 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). En todos los casos se consideró un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Objetivo particular 1: Elaboración de extruidos

7.1.1 Desarrollo del producto y establecimiento de las condiciones de extrusión

El desarrollo de las botanas extruidas incluyó una etapa preliminar de optimización de las formulaciones y condiciones de procesamiento, con el objetivo de establecer un protocolo que permitiera obtener pellets con propiedades tecnológicas adecuadas para su posterior caracterización. Este proceso se llevó a cabo entre 2022 y 2024 mediante cuatro etapas sucesivas, ajustando progresivamente la composición de las mezclas y las condiciones de extrusión, secado y almacenamiento hasta definir el protocolo final empleado en el presente estudio.

La primera etapa tuvo como objetivo evaluar la factibilidad de producir pellets extruidos a partir de mezclas de maíz azul y frijol ayocote, utilizando como referencia la metodología de Neder-Suárez *et al.* (2021).. Los resultados confirmaron la viabilidad del proceso y permitieron redefinir las formulaciones para incrementar el contenido proteico sin afectar su procesabilidad (**Tabla 7**).

Tabla 7. Desarrollo del producto y establecimiento de las condiciones de extrusión para la elaboración de botanas de tercera generación a base de maíz azul (*Zea mays* L.) y frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.)

Lote experimental	Objetivo de la etapa	Principal observación	Decisión adoptada
I. Desarrollo inicial	Verificar la factibilidad de elaborar pellets extruidos y establecer una formulación base.	Se obtuvo un producto tecnológicamente viable; el análisis proximal indicó la necesidad de incrementar el contenido proteico.	Reformulación de las mezclas aumentando la proporción de harina de frijol ayocote.
II. Ajuste del proceso	Evaluar las nuevas formulaciones bajo condiciones modificadas de extrusión.	Los pellets presentaron superficie ampollada y comportamiento tecnológico inadecuado durante el secado y la expansión.	Ajuste de las condiciones de extrusión para obtener pellets con superficie uniforme.
III. Validación del proceso	Evaluar la estabilidad del producto obtenido bajo las condiciones de procesamiento establecidas.	Se identificaron problemas de estabilidad durante el almacenamiento, asociados a una estabilización insuficiente del producto.	Modificación de las condiciones de secado y almacenamiento antes de producir los lotes definitivos.
IV. Protocolo definitivo	Establecer las condiciones finales de elaboración para la producción de las muestras experimentales.	Se obtuvieron pellets con superficie uniforme, adecuada estabilidad física y comportamiento tecnológico reproducible.	Definición del protocolo definitivo de extrusión empleado en todas las etapas posteriores de caracterización.

Las observaciones obtenidas en cada lote experimental permitieron establecer de manera progresiva el protocolo definitivo de extrusión empleado para la elaboración de todas las muestras analizadas en el presente estudio.

Durante la segunda etapa se realizaron modificaciones en las condiciones de extrusión; sin embargo, las condiciones reales de operación no alcanzaron los valores programados, dando lugar a pellets con superficie ampollada (**Figura 5a**). De acuerdo con la evaluación técnica realizada durante el proceso, esta morfología dificultaba el secado y afectaba la capacidad de expansión del producto, por lo que se efectuaron nuevos ajustes en las variables de procesamiento hasta obtener pellets con superficie uniforme (**Figura 5b**).

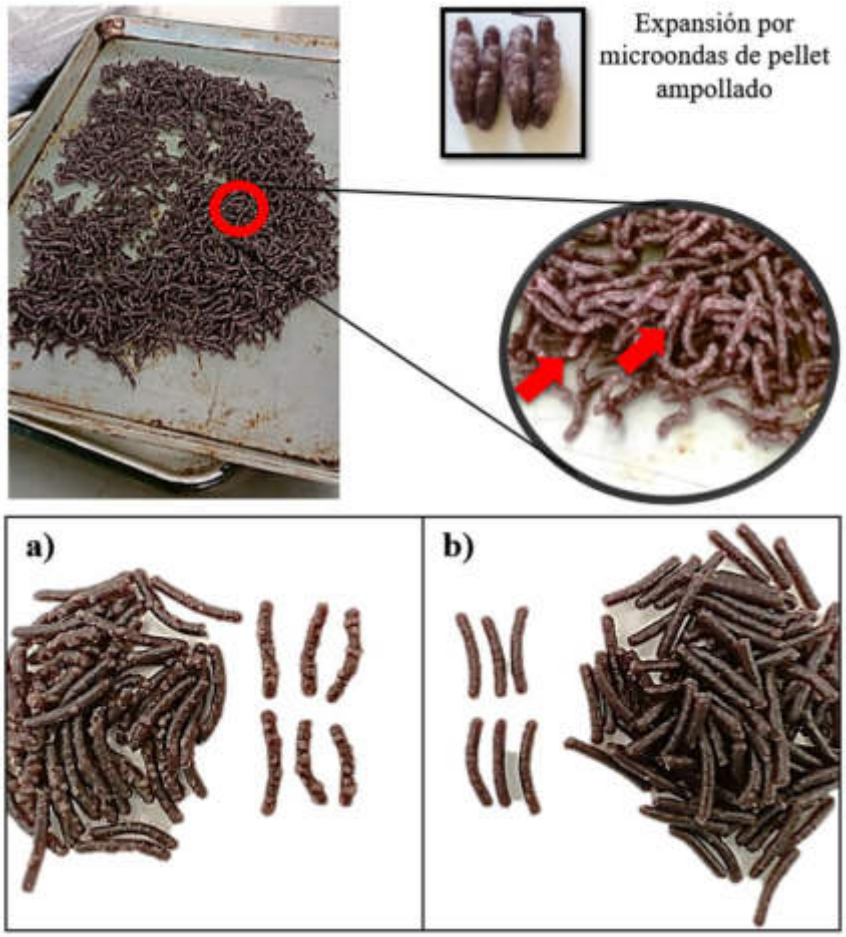


Figura 5. Morfología de los pellets obtenidos durante el desarrollo del producto. En la parte superior se muestran pellets con superficie ampollada y su expansión por microondas. En la parte inferior se compara **a)** el producto obtenido durante las corridas preliminares de extrusión y **b)** el producto obtenido bajo las condiciones definitivas de procesamiento.

Una vez obtenidos pellets con características superficiales adecuadas, se evaluó su estabilidad durante el almacenamiento. En esta etapa se identificaron problemas de estabilidad durante el almacenamiento, evidenciando que las condiciones de estabilización aún requerían ajustes antes de producir los lotes destinados a la caracterización experimental. Estas observaciones permitieron

redefinir el procedimiento de secado y almacenamiento previo al establecimiento del protocolo definitivo.

Como resultado de este proceso, se establecieron las condiciones definitivas de extrusión mediante ajustes en las variables de operación del equipo, incluyendo el perfil térmico, la velocidad de tornillo y el suministro de agua, obteniéndose pellets con superficie uniforme y comportamiento tecnológico reproducible. Las condiciones definidas durante esta etapa corresponden al procedimiento descrito en la Sección 6.3 y fueron empleadas para la elaboración de todas las formulaciones utilizadas en las determinaciones fisicoquímicas, tecnofuncionales, nutrimentales, bioactivas y estructurales presentadas en los apartados siguientes.

7.2 Objetivo particular 2: Propiedades nutrimentales y tecnofuncionales

7.2.1 Proceso de expansión por microondas

La expansión por microondas estuvo influenciada significativamente tanto por el tiempo de exposición como por la formulación (**Tabla 8**). En todas las formulaciones, el diámetro de expansión aumentó progresivamente durante el calentamiento, alcanzando los valores máximos entre los 18 y 21 s. El análisis de varianza de una vía, seguido de la prueba HSD de Tukey ($p < 0.05$), evidenció diferencias significativas entre formulaciones para la mayoría de los tiempos evaluados y un incremento progresivo del diámetro dentro de cada formulación hasta alcanzar una meseta entre los 20 y 21 s (**Figura 6**). De forma consistente, el ANOVA de dos vías (**Apéndice 11.2**) mostró efectos altamente significativos de la formulación y del tiempo de exposición ($p < 0.001$; η^2 parcial = 0.650 y 0.788, respectivamente), así como una interacción significativa entre ambos factores ($F(30,168) = 1.757$, $p = 0.014$; η^2 parcial = 0.239), indicando que la respuesta al calentamiento dependió de la composición de la mezcla. En conjunto, el modelo explicó el 85.5% de la variabilidad observada ($R^2 = 0.855$; R^2 ajustado = 0.819).

El pellet elaborado únicamente con maíz azul presentó la mayor expansión (4.40 ± 0.08 mm), seguido por las formulaciones con 10 y 45% de *Phaseolus coccineus*, cuyos valores fueron estadísticamente comparables al control. En contraste, el frijol ayocote puro mostró el menor diámetro de expansión y una estructura más compacta y de menor volumen, mientras que las formulaciones con mayor expansión presentaron una morfología más abierta y porosa (**Figura 7**).

Tabla 8. Efecto del enriquecimiento con *Phaseolus coccineus* sobre la expansión por microondas de botanas extruidas de maíz azul (*Zea mays*) a diferentes tiempos de exposición (media ± desviación estándar).

Formulación	mm de expansión a diferentes tiempos (s)						
	0 s	**9 s**	**12 s**	**15 s**	**18 s**	**20 s**	**21 s**
Maíz azul	2.68 ± 0.09^{cA}	3.22 ± 0.36^{aB}	3.92 ± 0.37^{bC}	4.13 ± 0.13^{cCD}	4.43 ± 0.12^{dD}	4.32 ± 0.14^{cdCD}	4.40 ± 0.08^{dD}
Frijol ayocote	2.39 ± 0.04^{aA}	2.88 ± 0.36^{aB}	3.24 ± 0.44^{aBC}	3.32 ± 0.13^{aBC}	3.54 ± 0.08^{aC}	3.49 ± 0.09^{aC}	3.47 ± 0.10^{aC}
+10% frijol	2.54 ± 0.05^{bA}	3.17 ± 0.23^{aB}	3.83 ± 0.33^{bC}	4.12 ± 0.09^{cCD}	4.17 ± 0.11^{cdCD}	4.42 ± 0.13^{dD}	4.38 ± 0.20^{dD}
+20% frijol	2.69 ± 0.04^{cA}	3.09 ± 0.18^{aB}	3.39 ± 0.16^{abB}	4.01 ± 0.15^{cC}	4.05 ± 0.31^{bcC}	4.15 ± 0.07^{bcdC}	4.17 ± 0.18^{cdC}
+30% frijol	2.70 ± 0.05^{cA}	2.88 ± 0.10^{aA}	3.65 ± 0.12^{abB}	3.69 ± 0.18^{bB}	3.84 ± 0.11^{abBC}	3.98 ± 0.13^{bC}	3.84 ± 0.07^{bBC}
+40% frijol	2.61 ± 0.04^{bcA}	2.94 ± 0.23^{aA}	3.41 ± 0.29^{abB}	3.93 ± 0.14^{bcC}	4.05 ± 0.14^{bcC}	4.03 ± 0.18^{bcC}	4.00 ± 0.18^{bcC}
+45% frijol	2.67 ± 0.04^{cA}	3.08 ± 0.11^{aB}	3.67 ± 0.16^{abC}	3.95 ± 0.13^{bcD}	4.24 ± 0.06^{cdE}	4.33 ± 0.20^{dE}	4.19 ± 0.10^{cdDE}

Los valores representan el diámetro de expansión (mm) a cada tiempo de exposición en microondas (0–21 s). Las mediciones se realizaron en tres puntos de cada extruido (centro y ambos extremos). Las letras minúsculas en superíndice indican diferencias significativas entre formulaciones dentro de la misma columna, mientras que las letras mayúsculas señalan diferencias entre tiempos de microondas dentro de la misma formulación ($p < 0.05$, prueba HSD de Tukey). Cada media corresponde a cinco repeticiones ($n = 5$)

El incremento progresivo del diámetro durante el calentamiento corresponde al comportamiento característico de las botanas de tercera generación, donde la rápida vaporización del agua retenida genera presión interna suficiente para deformar la matriz viscoelástica y promover el crecimiento de las celdas hasta que la rigidización estructural limita la expansión. Moraru y Kokini (2003) atribuyeron este fenómeno al equilibrio entre la presión de vapor y la resistencia mecánica de la matriz, mientras que Tovar-Jímenez *et al.* (2016) y Vicente-Jurado *et al.* (2024) señalaron que una adecuada gelatinización durante la extrusión y la capacidad del pellet para almacenar presión antes de la transición de estado vítreo a gomoso son determinantes para lograr una expansión uniforme. En el presente estudio, el máximo de expansión se alcanzó entre los 20 y 21 s, ligeramente antes de los ~26 s reportados por Neder-Suárez *et al.* (2021) para pellets de maíz azul, frijol negro y acelga, diferencia atribuible a la composición de las formulaciones, el contenido residual de humedad y las condiciones de extrusión, factores que modifican la velocidad de generación de vapor y la plastificación de la matriz durante el calentamiento.

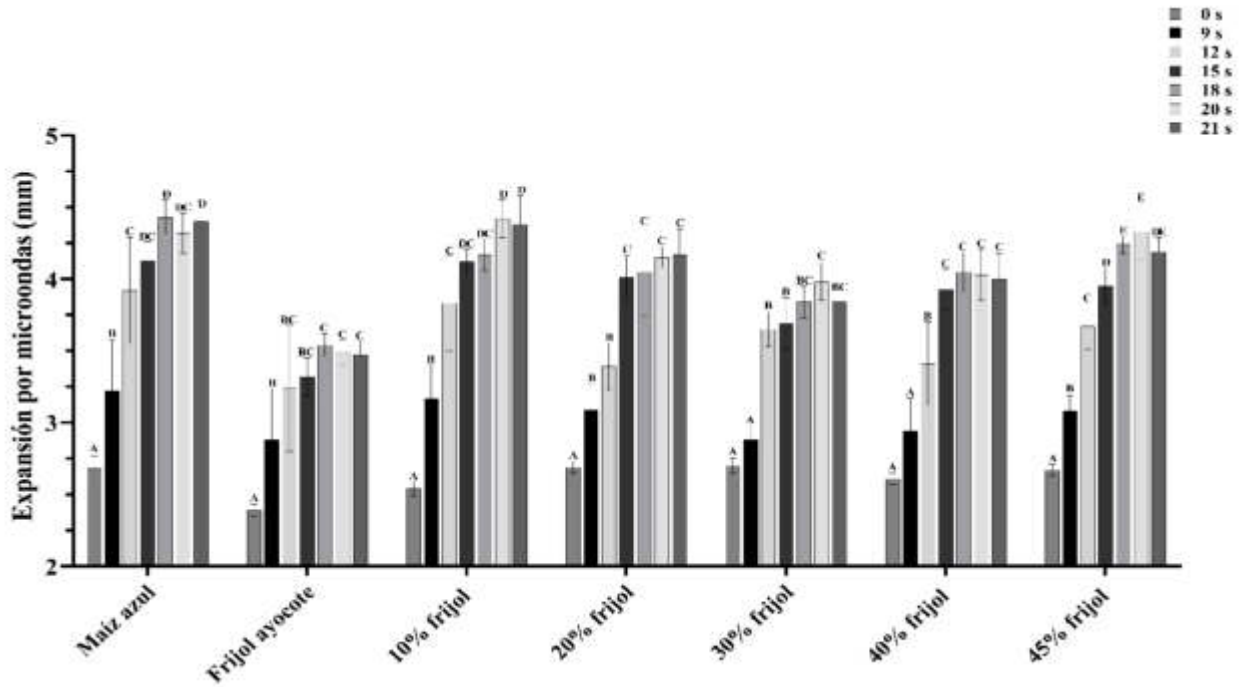


Figura 6. Cinética de expansión por microondas de pellets extruidos de maíz azul y formulaciones enriquecidas con *Phaseolus coccineus*. Las barras muestran el diámetro promedio del extruido (mm) medido a 0, 9, 12, 15, 18, 20 y 21 segundos de exposición en microondas (n = 5; media ± DE). Las barras correspondientes a 0 segundos representan el pellet sin expansión por microondas. El eje y se trunca en 2 mm, equivalente al diámetro de la matriz; por lo tanto, los valores por encima de esta línea base representan el diámetro del pellet en relación con la matriz, y los incrementos desde 0 s hacia tiempos posteriores representan la expansión inducida por microondas. Los superíndices indican diferencias significativas (ANOVA de una vía, prueba HSD de Tukey, $p < 0.05$): mayúsculas = diferencias entre tiempos dentro de cada formulación.

La disminución de la expansión conforme aumenta el contenido de proteína y fibra ha sido ampliamente documentada y se atribuye a la reducción de la fracción de almidón disponible para gelatinizar, así como al incremento de la rigidez de la matriz, limitando el crecimiento y la estabilización de las burbujas de vapor (Altan et al., 2009a). Resultados similares fueron descritos por Delgado-Nieblas *et al.* (2012) en mezclas maíz y frijol y por Alam *et al*. (2016) en sistemas cereal con leguminosa, quienes demostraron que la respuesta expansiva depende de la interacción entre almidón, proteína, fibra y las condiciones de humedad y temperatura de extrusión. Asimismo, Pasqualone *et al.* (2020) concluyeron que la expansión está determinada por el equilibrio entre la composición de la matriz y las condiciones de procesamiento más que por el porcentaje de leguminosa incorporado.

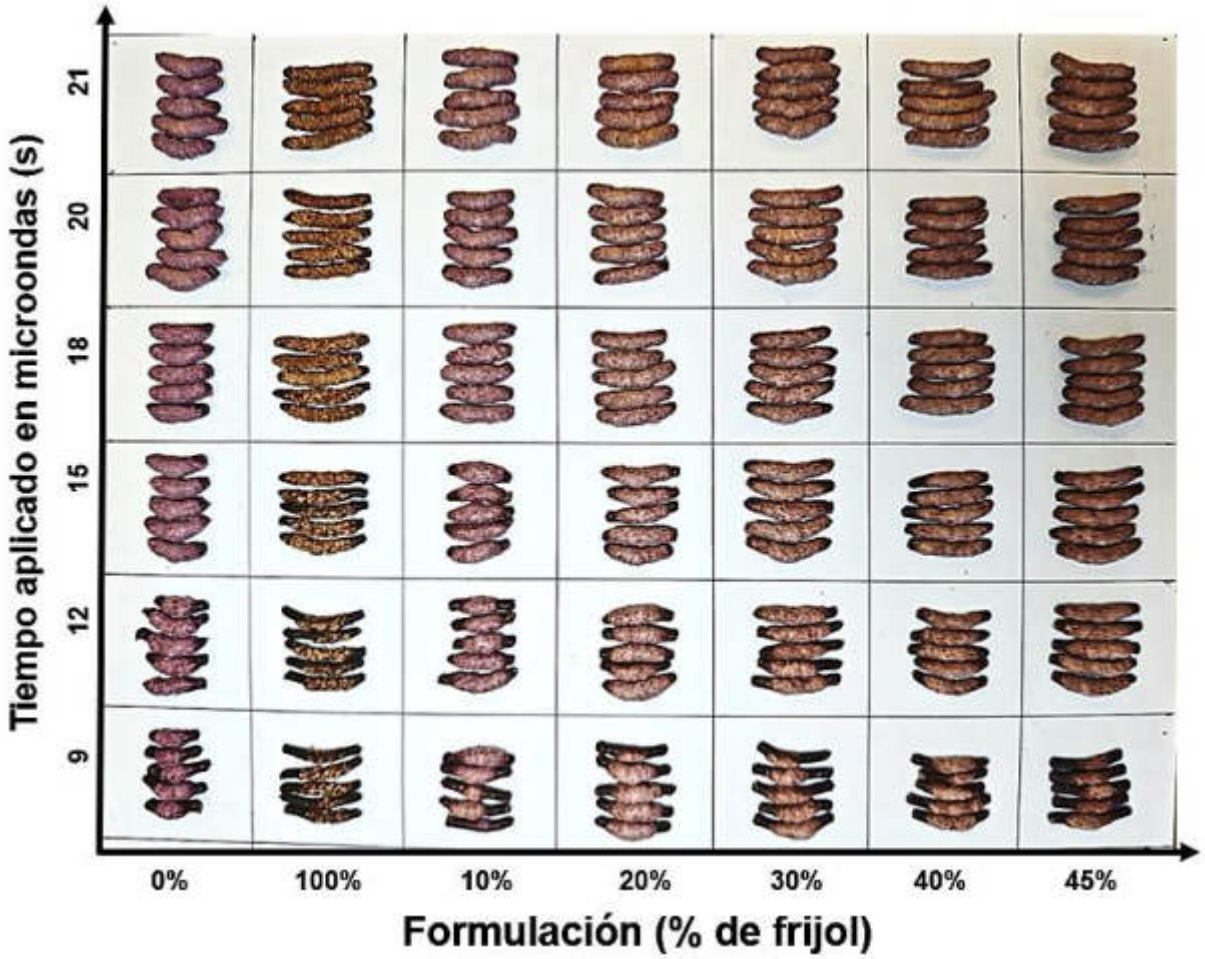


Figura 7. Comparación fotográfica de botanas extruidas de maíz azul (*Zea mays*) enriquecidas con diferentes niveles de *Phaseolus coccineus* (10–45%) y expandidas por microondas. Las muestras fueron expandidas a diferentes tiempos para identificar la máxima expansión.

En este contexto, resulta particularmente relevante que la formulación con 45% de *Phaseolus coccineus* alcanzara una expansión comparable al control elaborado exclusivamente con maíz azul. Este comportamiento, contrario a la tendencia generalmente descrita para matrices enriquecidas con leguminosas, sugiere que las condiciones de extrusión favorecieron una adecuada plasticización, redistribución de la humedad y desarrollo de una matriz capaz de retener la presión interna durante el calentamiento, compensando parcialmente el efecto esperado del incremento en proteína y fibra. Esta interpretación coincide con Riaz (2019) y Vicente-Jurado *et al.* (2024), quienes demostraron que la respuesta expansiva depende de la capacidad estructural del pellet para almacenar presión antes del calentamiento, además de su composición química. En contraste, el frijol ayocote puro presentó la menor expansión durante todo el ensayo, resultado consistente con su menor contenido de almidón gelatinizable y mayor proporción de proteínas y fibra estructural, componentes que incrementan la resistencia mecánica de la matriz y restringen el crecimiento de las celdas de vapor. De forma similar, Osuna-Gallardo *et al.* (2023) reportaron que la extrusión del frijol ayocote modifica la estructura del almidón y las proteínas e incrementa el índice de absorción y solubilidad en agua, pero no genera una matriz tan eficiente para la expansión como la obtenida en sistemas dominados por cereales ricos en almidón.

En conjunto, los resultados demuestran que la expansión por microondas estuvo determinada por la interacción entre la formulación y las transformaciones estructurales inducidas durante la extrusión. Más que depender exclusivamente del contenido de *Phaseolus coccineus*, la respuesta expansiva estuvo gobernada por la capacidad de la matriz para almacenar presión de vapor y desarrollar una estructura estable durante el calentamiento, lo que permitió incorporar hasta 45% de frijol ayocote sin comprometer significativamente la capacidad de expansión cuando las condiciones de extrusión favorecieron el desarrollo de una arquitectura adecuada.

7.2.2 Índice de expansión, densidad aparente, textura, índice de absorción de agua e índice de solubilidad en agua

La incorporación de *Phaseolus coccineus* y la expansión por microondas modificaron significativamente las propiedades fisicoquímicas y tecnofuncionales de las botanas extruidas (**Tabla 8**). En términos generales, la expansión incrementó el índice de expansión (IE) y el índice de absorción de agua (WAI), mientras que redujo la densidad aparente, la dureza y la fracturabilidad

en todas las formulaciones. Por su parte, el índice de solubilidad en agua (WSI) aumentó conforme se incrementó la proporción de frijol.

Antes de la expansión, el IE de los pellets osciló entre 1.20 ± 0.02 y 1.35 ± 0.02, correspondiendo el valor más bajo al frijol ayocote. Después del tratamiento por microondas, todas las formulaciones incrementaron significativamente su expansión, alcanzando valores entre 1.64 ± 0.23 y 2.21 ± 0.07, siendo la formulación con 10% de frijol la que presentó el mayor IE, mientras que el frijol ayocote conservó el menor. Este comportamiento estuvo acompañado por una disminución marcada de la densidad aparente, la cual pasó de 1249.33–1683.83 $kg \cdot m^{-3}$ en los pellets extruidos a 380.91–604.42 $kg \cdot m^{-3}$ en los productos expandidos.

El control de maíz azul presentó los mayores valores de dureza y fracturabilidad antes y después de la expansión, mientras que el frijol ayocote mostró la menor resistencia mecánica, manteniéndose diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0.05$).

En las harinas sin extruir, tanto el WAI como el WSI aumentaron conforme se incrementó la proporción de *P. coccineus*. En los productos expandidos, el WAI alcanzó su valor máximo en la formulación con 10% de frijol (5.13 ± 0.06 $g \cdot g^{-1}$), mientras que el frijol ayocote presentó el valor más bajo (4.17 ± 0.12 $g \cdot g^{-1}$). En contraste, el WSI aumentó progresivamente desde 4.01 ± 0.39% en el control de maíz azul hasta 15.03 ± 0.39% en la formulación elaborada exclusivamente con frijol.

Tabla 8. Efecto del enriquecimiento con *Phaseolus coccineus* sobre el índice de expansión, la densidad aparente, la textura y las propiedades de hidratación de botanas extruidas de maíz azul (*Zea mays*), antes y después de la expansión por microondas (media ± desviación estándar)

Formulación	Muestras extruidas						Muestras extruidas con expansión por microondas					
	IE	Densidad aparente ($kg \cdot m^{-3}$)	Dureza (N)	Fracturabilidad (N)	WAI ($g \cdot g^{-1}$)	WSI (%)	IE	Densidad aparente ($kg \cdot m^{-3}$)	Dureza (N)	Fracturabilidad (N)	WAI ($g \cdot g^{-1}$)	WSI (%)
Maíz azul	1.34 ± 0.04^{c}	1249.33 ± 53.47^{a}	14.41 ± 2.24^{e}	11.26 ± 4.26^{c}	2.56 ± 0.04^{a}	9.45 ± 0.33^{a}	2.16 ± 0.07^{b}	436.58 ± 29.06^{ab}	9.76 ± 3.39^{c}	6.59 ± 3.01^{c}	4.78 ± 0.04^{b}	4.01 ± 0.39^{a}
Frijol ayocote	1.20 ± 0.02^{a}	1350.35 ± 74.45^{a}	2.88 ± 0.56^{a}	2.33 ± 0.89^{a}	3.04 ± 0.10^{d}	21.08 ± 0.21^{f}	1.64 ± 0.23^{a}	604.42 ± 63.63^{b}	3.87 ± 0.79^{a}	2.83 ± 1.54^{a}	4.17 ± 0.12^{a}	15.03 ± 0.39^{e}
+10% frijol	1.27 ± 0.03^{b}	1683.83 ± 69.25^{c}	7.89 ± 1.04^{d}	6.69 ± 2.30^{b}	2.67 ± 0.05^{ab}	10.52 ± 0.18^{b}	2.21 ± 0.07^{b}	380.91 ± 24.41^{a}	6.56 ± 1.21^{b}	5.16 ± 2.14^{bc}	5.13 ± 0.06^{c}	4.82 ± 0.36^{a}
+20% frijol	1.34 ± 0.02^{c}	1309.26 ± 84.86^{a}	7.83 ± 0.81^{d}	6.82 ± 2.46^{b}	2.74 ± 0.04^{bc}	11.45 ± 0.23^{c}	2.08 ± 0.04^{b}	480.18 ± 20.16^{ab}	4.74 ± 0.58^{a}	3.90 ± 1.55^{ab}	4.74 ± 0.01^{b}	6.46 ± 0.40^{b}
+30% frijol	1.35 ± 0.02^{c}	1263.62 ± 78.93^{a}	6.78 ± 0.74^{c}	5.73 ± 2.27^{b}	2.79 ± 0.05^{bc}	12.37 ± 0.27^{d}	1.99 ± 0.07^{b}	495.77 ± 44.05^{ab}	4.53 ± 0.67^{a}	3.33 ± 1.84^{a}	4.80 ± 0.04^{b}	8.53 ± 0.70^{c}
+40% frijol	1.31 ± 0.02^{bc}	1529.42 ± 112.82^{b}	5.69 ± 1.10^{b}	5.52 ± 1.37^{b}	2.83 ± 0.03^{c}	13.45 ± 0.33^{e}	2.02 ± 0.09^{b}	532.37 ± 62.15^{ab}	4.32 ± 0.80^{a}	2.99 ± 1.68^{a}	4.87 ± 0.11^{b}	8.87 ± 0.47^{c}
+45% frijol	1.34 ± 0.02^{c}	1283.05 ± 34.09^{a}	6.17 ± 1.15^{bc}	5.77 ± 1.58^{b}	2.85 ± 0.02^{c}	13.99 ± 0.17^{e}	2.16 ± 0.10^{b}	395.40 ± 69.18^{a}	4.35 ± 0.84^{a}	3.63 ± 1.51^{ab}	4.77 ± 0.16^{b}	12.75 ± 0.57^{d}

Cada valor representa la media ± desviación estándar de las mediciones realizadas. El índice de expansión (IE), la densidad aparente y la cinética de expansión por microondas se determinaron con cinco repeticiones por tratamiento ($n = 5$); los parámetros de textura (dureza y fracturabilidad) se evaluaron con veinticinco repeticiones ($n = 25$); el índice de absorción de agua (WAI) y el índice de solubilidad en agua (WSI) se determinaron por triplicado ($n = 3$). Las determinaciones de IE, densidad aparente y textura se realizaron en pellets extruidos antes y después de la expansión por microondas, mientras que WAI y WSI se determinaron en las harinas correspondientes a las formulaciones originales (muestras no extruidas) y en los extruidos expandidos por microondas. Las letras superíndice indican diferencias significativas dentro de cada columna ($p < 0.05$) de acuerdo con la prueba HSD de Tukey.

El incremento del índice de expansión acompañado por la disminución de la densidad aparente confirmó que la incorporación de *Phaseolus coccineus* modificó la arquitectura de la matriz expandida. Los valores de IE obtenidos (1.64–2.21) fueron comparables con el 1.86 ± 0.03 reportado por Neder-Suárez *et al.* (2021), mientras que las densidades aparentes de los productos expandidos (0.381–0.604 $g \cdot cm^{-3}$) se encontraron dentro del intervalo descrito por Altan *et al.* (2009b) para extrudidos de cebada (0.278–0.553 $g \cdot cm^{-3}$). Asimismo, la relación inversa entre el índice de expansión y la densidad aparente coincidió con la fuerte correlación negativa reportada por Neder-Suárez *et al.* (2024) ($r = -0.98$) y con la tendencia descrita por Altan *et al.* (2009b) ($r = -0.479$), confirmando que ambas propiedades constituyen parámetros complementarios para describir el desarrollo de la estructura celular durante la expansión. Moraru y Kokini (2003) establecen que este comportamiento depende del equilibrio entre la presión de vapor generada durante el calentamiento y las propiedades viscoelásticas del fundido, mientras que Alam *et al.* (2016) señalan que, en sistemas cereal-leguminosa, la respuesta está determinada por la interacción entre la composición de la mezcla y las condiciones de extrusión, más que por un porcentaje universal de sustitución. De manera consistente, Acurio *et al.* (2023) observaron que la expansión por microondas incrementó el volumen de pellets elaborados con tubérculos andinos, confirmando la importancia del tratamiento térmico posterior a la extrusión. En conjunto, estos resultados demuestran que, bajo las condiciones de procesamiento empleadas, fue posible incorporar hasta 45% de *P. coccineus* sin comprometer las características estructurales requeridas para el desarrollo de botanas de tercera generación.

La expansión por microondas redujo significativamente la dureza y la fracturabilidad en todas las formulaciones, reflejando el desarrollo de estructuras menos compactas y con menor resistencia mecánica. Un comportamiento similar fue descrito por Kantrong et al. (2022) y Acurio *et al.* (2023), quienes atribuyeron la disminución de la dureza y el desarrollo de productos más ligeros y crujientes a la formación de una estructura celular más uniforme durante el expandido. En el presente estudio, aunque la formulación con 10% de *Phaseolus coccineus* presentó simultáneamente el mayor índice de expansión y una de las menores densidades aparentes, la disminución de la dureza no fue estrictamente proporcional al grado de expansión, lo que sugiere que la respuesta mecánica también estuvo influenciada por la organización estructural de la matriz generada durante la extrusión. En este sentido, Jacquet *et al.* (2025) señalan que las propiedades texturales de productos extruidos dependen de la historia termomecánica del fundido y de las

características de las paredes celulares formadas durante el procesamiento. Asimismo, Delgado-Nieblas *et al.* (2019) reportaron una fuerte correlación positiva entre la densidad aparente y la dureza ($r = 0.93$), confirmando que ambas propiedades están estrechamente relacionadas, aunque la resistencia mecánica final también depende de la composición y de la organización de la estructura expandida.

Las propiedades de hidratación también reflejaron las modificaciones estructurales inducidas por la extrusión y la expansión por microondas. El índice de absorción de agua (WAI) de los productos expandidos osciló entre 4.17 y 5.13 $g \cdot g^{-1}$, valores comparables con los 4.02 $g \cdot g^{-1}$ reportados por Neder-Suárez *et al.* (2021) en botanas de tercera generación elaboradas con maíz azul, frijol negro y acelga. En contraste, Altan *et al.* (2009b) registraron valores de WAI entre 7.32 y 7.70 $g \cdot g^{-1}$ en extrudidos de cebada sin diferencias significativas entre tratamientos, mientras que en el presente estudio este parámetro permitió discriminar entre formulaciones, evidenciando que la incorporación de *Phaseolus coccineus* modificó la capacidad de hidratación de la matriz. Por su parte, el índice de solubilidad en agua (WSI) aumentó conforme se incrementó la proporción de frijol, alcanzando valores entre 4.01 y 15.03%, los cuales incluyeron el 10.69% informado por Neder-Suárez *et al.* (2021)y fueron comparables con el intervalo de 13.1–17.8% reportado por Delgado-Nieblas *et al.* (2012) en cereales para desayuno extruidos con bagazo deshidratado de naranjita. Este comportamiento indica que, mientras el WAI estuvo asociado principalmente con la capacidad de la matriz reorganizada para retener agua, el WSI reflejó una mayor disponibilidad de componentes solubles generados durante el procesamiento, fenómeno relacionado con la desnaturalización de proteínas, la degradación parcial del almidón y la presencia de polisacáridos no amiláceos descritas por Neder-Suárez *et al.* (2024) y Kantrong et al. (2022). En conjunto, ambas propiedades demuestran que la incorporación de *P. coccineus* modificó el comportamiento funcional de la matriz sin alterar el patrón tecnológico esperado para botanas expandidas de tercera generación.

En conjunto, los resultados demuestran que la interacción entre la formulación y las condiciones de procesamiento determinó las propiedades físicas y funcionales de las botanas expandidas. La evaluación integrada del índice de expansión, la densidad aparente, la textura y las propiedades de hidratación permitió identificar formulaciones con hasta 45% de *Phaseolus coccineus* que

mantuvieron características tecnológicas comparables a las descritas para botanas de tercera generación.

7.2.3 Parámetros de color

Los resultados correspondientes a los parámetros de color CIELAB (L*, a*, b*) de las muestras extruidas y extruidas con expansión se presentan en la **Tabla 9**. Se observaron diferencias significativas entre formulaciones para los tres parámetros cromáticos evaluados ($p < 0.05$), evidenciando que tanto la incorporación de *Phaseolus coccineus* como la expansión por microondas modificaron la apariencia de los productos.

Tabla 9. Efecto del enriquecimiento con *Phaseolus coccineus* sobre los parámetros de color CIELAB (L*, a*, b*) de botanas extruidas de maíz azul (*Zea mays*), antes y después de la expansión por microondas (media ± desviación estándar)

Formulación	Muestras extruidas			Muestras extruidas con expansión por microondas		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
Maíz azul	18.01 ± 0.46^{b}	5.05 ± 0.19^{e}	0.02 ± 0.01^{a}	34.86 ± 0.38^{e}	10.05 ± 0.55^{f}	-0.48 ± 0.11^{a}
Frijol ayocote	16.30 ± 0.21^{a}	2.36 ± 0.03^{a}	1.34 ± 0.11^{b}	30.73 ± 0.62^{bc}	7.41 ± 0.12^{bc}	8.52 ± 0.39^{f}
+10% frijol	21.00 ± 0.02^{c}	5.95 ± 0.02^{f}	1.29 ± 0.02^{b}	30.53 ± 0.33^{b}	8.48 ± 0.01^{e}	1.67 ± 0.16^{b}
+20% frijol	19.84 ± 0.56^{bc}	4.75 ± 0.14^{d}	1.50 ± 0.11^{bc}	34.29 ± 0.50^{de}	8.04 ± 0.11^{d}	2.91 ± 0.03^{c}
+30% frijol	18.38 ± 0.34^{a}	3.73 ± 0.01^{c}	1.38 ± 0.07^{b}	32.68 ± 0.76^{cd}	7.61 ± 0.72^{c}	3.56 ± 0.04^{d}
+40% frijol	18.66 ± 0.40^{ab}	3.36 ± 0.01^{b}	1.68 ± 0.09^{c}	32.25 ± 1.49^{bc}	7.18 ± 0.14^{b}	4.16 ± 0.10^{e}
+45% frijol	31.82 ± 0.78^{d}	6.86 ± 0.11^{g}	4.95 ± 0.19^{d}	17.37 ± 0.01^{a}	2.99 ± 0.01^{a}	1.50 ± 0.02^{b}

Las mediciones de color se realizaron por triplicado ($n = 3$) utilizando un espectrofotómetro de reflectancia de triple estímulo, bajo iluminación D65 y condiciones de observador estándar de 10°. L* indica luminosidad (0 = negro, 100 = blanco), a* representa el eje rojo–verde (positivo = rojo, negativo = verde) y b* representa el eje amarillo–azul (positivo = amarillo, negativo = azul). Las letras superíndices dentro de cada columna indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0.05$) según la prueba HSD de Tukey.

En las muestras extruidas, la luminosidad (L*) osciló entre 16.30 ± 0.21 y 31.82 ± 0.78, correspondiendo el valor más alto a la formulación con 45 % de frijol, mientras que el frijol ayocote puro presentó la menor luminosidad. Los valores de a* variaron entre 2.36 ± 0.03 y 6.86 ± 0.11, con máximos en las formulaciones con 10 % y 45 % de frijol. El parámetro b* permaneció positivo en todas las formulaciones (0.02–4.95), mostrando una tendencia creciente conforme aumentó la proporción de frijol. Después de la expansión por microondas, la mayoría de las formulaciones incrementaron su luminosidad, alcanzando los valores más altos el control de maíz azul (34.86 ± 0.38) y las formulaciones con 20–40 % de frijol (32.25–34.29). En contraste, la formulación con 45 % de frijol presentó una disminución marcada de L* (17.37 ± 0.01). Asimismo, el parámetro a* aumentó en todas las formulaciones respecto a los pellets extruidos, mientras que b* presentó la

mayor variación entre tratamientos (−0.48 a 8.52), observándose el único valor negativo en el control de maíz azul y el mayor valor positivo en el frijol ayocote.

La luminosidad fue el parámetro cromático más sensible al procesamiento, mostrando un comportamiento contrastante entre la extrusión y la expansión por microondas. Mientras que la formulación con 45 % de *Phaseolus coccineus* presentó el mayor valor de L* antes de la expansión (31.82 ± 0.78), después del calentamiento registró la menor luminosidad (17.37 ± 0.01), en oposición al control de maíz azul, que alcanzó el mayor valor (34.86 ± 0.38). Resultados similares fueron descritos por Altan *et al.,*(2009), quienes observaron modificaciones significativas de los parámetros CIELAB durante la extrusión de mezclas cereal con vegetal como consecuencia de los cambios físicos de la matriz. De manera complementaria, Khanal *et al.* (2009) demostraron que el procesamiento térmico altera la estabilidad de las antocianinas y, por tanto, la expresión visual del color. En conjunto, estos antecedentes y los resultados obtenidos sugieren que la respuesta de L* estuvo determinada por la interacción entre la composición de la formulación y las modificaciones estructurales inducidas por el procesamiento, más que por el contenido de pigmentos considerado de forma aislada.

Las coordenadas cromáticas a* y b* reflejaron una modificación progresiva del equilibrio entre los tonos característicos del maíz azul y los aportados por el frijol ayocote. Después de la expansión, el control presentó el mayor valor de a* (10.05 ± 0.55), mientras que el frijol ayocote alcanzó el mayor valor de b* (8.52 ± 0.39), indicando un desplazamiento gradual hacia tonalidades más amarillas conforme aumentó la proporción de leguminosa. La respuesta no lineal observada para a*, particularmente en las formulaciones con 10 % y 45 % de frijol, coincide con lo propuesto por Alvarez-Jubete et al. (2010), quienes atribuyeron este comportamiento a interacciones entre los pigmentos y los componentes de la matriz alimentaria. Por otra parte, el incremento progresivo de b* fue consistente con lo reportado por Delgado-Nieblas et al. (2019) y Altan et al. (2009), quienes observaron que la extrusión modifica el balance cromático de productos enriquecidos con ingredientes vegetales. En el presente estudio, estos cambios evidencian una transición gradual desde los tonos azul violáceos característicos del maíz azul hacia tonalidades más claras y amarillentas conforme aumentó el contenido de frijol.

En conjunto, los resultados demuestran que la apariencia final de las botanas no dependió exclusivamente del contenido de pigmentos aportados por el maíz azul y el frijol ayocote, sino

también de los cambios físicos inducidos por la extrusión y la expansión por microondas, los cuales modificaron la interacción de la luz con la matriz alimentaria. Esta interpretación coincide con lo descrito para otras botanas de tercera generación, donde las propiedades ópticas representan la respuesta conjunta entre la formulación y las transformaciones estructurales generadas durante el procesamiento (Acurio et al., 2023; Altan et al., 2009a). Bajo las condiciones evaluadas, fue posible incrementar el contenido de *Phaseolus coccineus* conservando la identidad visual característica del maíz azul en las formulaciones con niveles intermedios de sustitución, mientras que la incorporación del 45 % produjo la modificación cromática más evidente del sistema.

7.2.4 Análisis proximal

La composición proximal de las harinas crudas, las harinas y las mezclas extruidas de maíz azul y *Phaseolus coccineus* se presenta en la **Tabla 10.** Se observaron diferencias significativas entre tratamientos para todos los parámetros evaluados ($p < 0.05$).

Tabla 10. Perfil nutrimental de harinas crudas y mezclas extruidas de maíz azul (*Zea mays* L.) y frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.)

Composición de la mezcla	Humedad (%)	Minerales (%)	Proteína (%)	Lípidos (%)	Fibra dietética total (%)
Maíz azul	10.15 ± 0.05^{b}	2.40 ± 0.04^{c}	8.80 ± 0.01^{a}	3.30 ± 0.06^{e}	10.45 ± 0.58^{a}
Maíz azul extruido	15.80 ± 0.12^{e}	1.62 ± 0.02^{a}	8.89 ± 0.03^{a}	1.50 ± 0.05^{bc}	10.72 ± 0.60^{a}
Frijol ayocote	9.55 ± 0.10^{a}	5.30 ± 0.06^{f}	20.45 ± 0.08^{g}	1.68 ± 0.12^{d}	21.60 ± 1.20^{f}
Frijol ayocote extruido	16.10 ± 0.18^{f}	4.95 ± 0.03^{e}	21.21 ± 0.07^{h}	0.65 ± 0.05^{a}	22.65 ± 0.42^{f}
+10% frijol	14.25 ± 0.09^{c}	1.80 ± 0.11^{a}	10.12 ± 0.03^{b}	1.85 ± 0.04^{d}	11.60 ± 0.70^{ab}
+20% frijol	14.45 ± 0.08^{c}	2.15 ± 0.15^{b}	11.35 ± 0.03^{c}	1.55 ± 0.07^{c}	13.10 ± 0.52^{bc}
+30% frijol	14.60 ± 0.10^{d}	2.48 ± 0.04^{c}	12.49 ± 0.03^{d}	1.30 ± 0.05^{b}	14.15 ± 0.50^{cd}
+40% frijol	14.30 ± 0.18^{c}	2.92 ± 0.06^{d}	13.82 ± 0.03^{e}	$1.40 \pm 0.04b^{c}$	15.40 ± 0.38^{de}
+45% frijol	14.95 ± 0.09^{d}	3.12 ± 0.15^{d}	14.43 ± 0.04^{f}	1.20 ± 0.06^{b}	16.00 ± 0.35^{e}

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar de determinaciones por triplicado. Letras superíndice diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$, prueba HSD de Tukey). Los datos se expresan en base a peso seco.

La humedad fue mayor en las harinas extruidas de maíz y frijol que en sus respectivas materias primas, mientras que las mezclas extruidas presentaron valores intermedios. En contraste, el contenido de lípidos disminuyó después de la extrusión en ambas materias primas y se mantuvo bajo en todas las formulaciones mezcladas, registrándose el valor mínimo en el frijol ayocote extruido ($0.65 \pm 0.05\%$).

La incorporación de *P. coccineus* incrementó progresivamente el contenido de minerales, proteína y fibra dietética total. El frijol ayocote presentó los mayores valores de estos componentes tanto en estado crudo como extruido, mientras que el maíz azul mostró los menores. En las mezclas

extruidas, la proteína aumentó de 10.12 ± 0.03% en la formulación con 10% de frijol a 14.43 ± 0.04% con 45% de sustitución, acompañada por incrementos graduales en minerales y fibra dietética total, esta última de 11.60 ± 0.70% a 16.00 ± 0.35% conforme aumentó la proporción de frijol.

Las diferencias observadas entre las materias primas crudas y extruidas indican que el procesamiento afectó principalmente la distribución y disponibilidad de algunos componentes de la matriz, más que su composición química global. La humedad aumentó ligeramente después de la extrusión, particularmente en los controles de maíz azul y frijol ayocote, comportamiento consistente con lo reportado por Pasqualone *et al.* (2020) y Kantanen *et al.* (2024), quienes atribuyen este efecto a la mayor capacidad de retención y redistribución de agua en matrices con elevado contenido de proteínas y fibra durante el enfriamiento y la estabilización posterior a la extrusión. En este estudio, las diferencias de humedad entre formulaciones fueron reducidas, lo que sugiere que el incremento observado respondió principalmente a la incorporación de agua durante el proceso y a la capacidad de la matriz para retenerla, más que a cambios en la organización física de la matriz durante el procesamiento.

El efecto del procesamiento fue más evidente en el contenido de lípidos, particularmente en el frijol ayocote, cuya fracción lipídica extraíble disminuyó de 1.68% a 0.65% después de la extrusión. Este comportamiento se ha atribuido a la formación de complejos amilosa y lípido e interacciones proteína y lípido inducidas por la temperatura y la cizalla, las cuales reducen la extracción por solventes sin implicar necesariamente una pérdida real de grasa (Tan *et al*., 2025; Zhuang *et al.*, 2022). En contraste, el contenido total de proteína permaneció prácticamente inalterado, en concordancia con estudios que indican que la extrusión moderada conserva su contenido cuantitativo, aunque puede inducir desnaturalización, agregación y cambios conformacionales (Fu *et al.*, 2024; Salazar-Villanea *et al.*, 2016; S. Singh *et al.,* 2007). En conjunto, estos resultados indican que la extrusión modificó principalmente la extractabilidad de los lípidos, mientras preservó el contenido proteico de las materias primas.

La incorporación de *Phaseolus coccineus* produjo un incremento progresivo en el contenido de proteína, minerales y fibra dietética total, confirmando el valor del ayocote como ingrediente para el enriquecimiento nutricional de matrices basadas en maíz azul. El contenido de proteína aumentó de 10.12% en la formulación con 10% de frijol a 14.43% con 45% de sustitución, mientras que la

fibra dietética total se incrementó de 11.60% a 16.00%, acompañada por un aumento gradual en el contenido de minerales. Este comportamiento coincide con lo reportado por Cotacallapa-Sucapuca *et al.* (2021), quienes observaron incrementos significativos en proteína y fibra tras la incorporación de leguminosas en productos extruidos, atribuidos a la elevada densidad nutricional de estos ingredientes más que al efecto del procesamiento.

Más que al procesamiento, el enriquecimiento observado respondió a la composición del ayocote, la extrusión no comprometió la conservación de estos componentes. En el caso de los minerales, las variaciones reportadas tras el procesamiento suelen atribuirse a cambios en la extractabilidad más que a pérdidas reales (Adepeju *et al.,* 2024). Por su parte, el incremento cuantitativo de fibra representa una ventaja nutricional; sin embargo, la extrusión puede modificar simultáneamente su organización estructural, favoreciendo la transformación parcial de fracciones insolubles en componentes más solubles y de menor peso molecular (Al Faruq *et al.,* 2025; Naumann *et al.,* 2021). Estos resultados demuestran que la incorporación de *P. coccineus* mejoró el perfil nutrimental de las formulaciones sin comprometer la conservación de sus principales componentes durante el procesamiento.

En conjunto, los resultados demuestran que la composición proximal de las botanas estuvo determinada por la interacción entre la formulación y el procesamiento por extrusión. Mientras la extrusión preservó la composición de los principales nutrientes y modificó principalmente la disponibilidad de humedad y la extractabilidad de los lípidos, la incorporación de *Phaseolus coccineus* mejoró el perfil nutrimental de las formulaciones. Estos hallazgos confirman el potencial de la combinación maíz azul y frijol ayocote para desarrollar botanas extruidas con mayor calidad nutricional sin comprometer la estabilidad composicional del producto.

7.3 Objetivo particular 3: Calidad nutrimental y proteica

7.3.1 Perfil de aminoácidos, puntaje de aminoácidos, aminoácido limitante y relación de eficiencia proteica estimada

Los resultados del perfil de aminoácidos de las harinas crudas, harinas extruidas y mezclas maíz y frijol se presentan en la **Tabla 11**. Se observaron diferencias entre materias primas y formulaciones en la concentración de aminoácidos esenciales y no esenciales, reflejando el efecto de la incorporación de *Phaseolus coccineus* y, en menor medida, del procesamiento por extrusión.

Tabla 11. Perfil de aminoácidos y calidad de la proteína de harinas crudas, harinas extruidas y mezclas maíz–frijol, expresado en g/100 g de proteína, en comparación con el patrón de referencia de la FAO (2013) para niños mayores, adolescentes y adultos.

Aminoácido (g / 100g de proteína)	Maiz azul		Frijol ayocote		Formulaciones										FAO (2013)
					+10% frijol		+20% frijol		+30% frijol		+40% frijol		+45% frijol		
	Raw	*Extr.*	*Raw*	*Extr.*	*Raw*	*Extr.*	*Raw*	*Extr*	*Raw*	*Extr.*	*Raw*	*Extr.*	*Raw*	*Extr.*	
Ile	1.94	2.12	2.81	2.65	2.08	2.20	2.21	2.28	2.31	2.34	2.41	2.40	2.45	2.43	3.0
Leu	6.59	7.45	6.17	5.68	6.52	7.16	6.46	6.91	6.41	6.69	6.36	6.50	6.34	6.41	6.1
Lys	1.76	1.81	3.64	3.44	2.07	2.07	2.34	2.31	2.58	2.51	2.78	2.69	2.88	2.77	4.8
Met+Cys[1]	3.02	4.12	1.57	1.73	2.78	3.73	2.57	3.39	2.39	3.09	2.23	2.83	2.16	2.71	2.3
Phe+Tyr[2]	7.78	10.09	9.20	8.74	8.02	9.87	8.22	9.68	8.40	9.51	8.56	9.36	8.63	9.29	4.1
Thr	13.24	11.32	10.39	13.86	12.76	11.74	12.36	12.10	12.00	12.41	11.69	12.69	11.54	12.82	2.5
Trp[3]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.5
Val	2.05	2.68	2.98	2.98	2.20	2.72	2.34	2.77	2.45	2.80	2.55	2.84	2.60	2.85	4.0
His	16.96	12.81	13.16	18.68	16.33	13.77	15.79	14.60	15.31	15.33	14.89	15.98	14.70	16.27	1.6
Arg[4]	2.37	2.82	4.18	4.17	2.67	3.04	2.93	3.23	3.15	3.40	3.35	3.55	3.44	3.62	-
Ala	3.38	3.53	3.66	2.45	3.43	3.35	3.47	3.20	3.50	3.06	3.54	2.94	3.55	2.89	-
Asp	3.98	4.61	8.63	7.91	4.75	5.15	5.41	5.62	6.00	6.03	6.51	6.39	6.74	6.56	-
Glu	14.58	16.33	13.26	13.94	14.36	15.94	14.17	15.60	14.01	15.30	13.86	15.04	13.80	14.92	-
Gly	4.38	4.19	6.61	4.32	4.75	4.21	5.07	4.23	5.35	4.25	5.59	4.26	5.70	4.27	-
Ser	3.48	3.01	4.20	4.62	3.60	3.27	3.70	3.50	3.79	3.70	3.87	3.88	3.91	3.96	-
Aminoácido limitante	Lys	Lys	Met+ Cys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	-
AAS	0.37	0.38	0.68	0.72	0.43	0.43	0.49	0.48	0.54	0.52	0.58	0.56	0.60	0.58	-
E-PER	2.02	2.18	1.81	1.60	1.98	2.08	1.95	1.99	1.92	1.92	1.90	1.85	1.89	1.82	-

Los valores se expresan en g/100 g de proteína. Los valores de referencia de la FAO (2013) se convirtieron de mg/g de proteína requerida a g/100 g de proteína para facilitar la comparación. [1]SAA: aminoácidos azufrados; [2]AAA: aminoácidos aromáticos; [3]Trp: no fue determinado en las muestras experimentales; [4]Arg: considerado semi-esencial.

Entre los aminoácidos esenciales, la suma de fenilalanina + tirosina, treonina y leucina presentó las mayores concentraciones en la mayoría de las muestras y superó los valores de referencia establecidos por la FAO (2013), mientras que isoleucina y valina permanecieron por debajo del patrón de referencia en prácticamente todas las formulaciones. La lisina fue el aminoácido limitante en todas las formulaciones basadas en maíz, mientras que en el frijol ayocote crudo el aminoácido limitante correspondió a los aminoácidos azufrados (metionina + cisteína). El contenido de lisina aumentó progresivamente con la incorporación de frijol, pasando de 1.76 a 2.88 g/100 g de proteína, mientras que la concentración de metionina + cisteína disminuyó gradualmente, evidenciando la complementariedad característica entre proteínas de cereales y leguminosas.

El puntaje de aminoácidos (AAS) mostró una mejora progresiva conforme aumentó el nivel de sustitución con frijol, incrementándose de 0.37 en el maíz azul hasta 0.60 en la formulación con 45% de frijol, mientras que el frijol ayocote presentó los valores más altos (0.68–0.72). Por su parte, la relación de eficiencia proteica estimada (E-PER) osciló entre 1.60 y 2.18, con valores intermedios en las mezclas maíz–frijol y diferencias moderadas entre muestras crudas y extruidas.

La extrusión produjo modificaciones puntuales en la concentración relativa de algunos aminoácidos; sin embargo, el patrón general de calidad proteica se conservó. Las formulaciones extruidas mantuvieron la lisina como aminoácido limitante y conservaron la tendencia de incremento del contenido de lisina y del AAS conforme aumentó la proporción de *P. coccineus*, sin cambios importantes en los valores estimados de E-PER.

La calidad del perfil aminoacídico estuvo determinada principalmente por la complementariedad nutricional entre el maíz azul y el frijol ayocote. La incorporación de *Phaseolus coccineus* incrementó el contenido de lisina y redujo proporcionalmente los aminoácidos azufrados, reflejando la complementariedad característica entre proteínas de cereales y leguminosas descrita por Samtiya *et al.* (2020). Este comportamiento coincide estrechamente con lo reportado por Neder-Suárez *et al.,* (2024), quienes observaron incrementos de lisina de 1.98 a 2.42 g/100 g de proteína conforme la incorporación de frijol negro aumentó de 11 a 33%, manteniéndose la lisina como aminoácido limitante en todas las formulaciones. Asimismo, Ayala-Rodríguez *et al.,* (2022) identificaron a los aminoácidos azufrados como limitantes en proteínas de haba, confirmando que las principales limitaciones nutricionales difieren entre cereales y leguminosas. En conjunto, estos resultados demuestran que el principal beneficio de combinar ambas materias primas radica en compensar

parcialmente sus deficiencias aminoacídicas, mejorando el equilibrio del perfil de aminoácidos sin eliminar completamente el aminoácido limitante.

La mejora del perfil aminoacídico se reflejó en un incremento progresivo del AAS, tendencia comparable a la descrita por Neder-Suárez *et al.,* (2024), quienes reportaron valores de 0.37 a 0.67 conforme aumentó el contenido de frijol negro. De manera consistente, Ayala-Rodríguez *et al.,* (2022) obtuvieron valores entre 0.44 y 0.78 en diferentes tratamientos de haba, confirmando que la calidad aminoacídica de las proteínas de leguminosas depende principalmente del aminoácido limitante. En contraste, el E-PER mostró variaciones considerablemente menores, comportamiento consistente con los intervalos reportados por Neder-Suárez *et al.,* (2024) (1.49–1.80) y Ayala-Rodríguez *et al.,* (2022) (1.43–2.15). Dado que este índice se estima a partir del contenido de leucina y tirosina (Alsmeyer *et al.*, 1974), pequeñas modificaciones en estos aminoácidos generan cambios relativamente discretos, aun cuando el equilibrio global de aminoácidos esenciales mejore de forma apreciable. En consecuencia, el AAS fue más sensible para evidenciar el efecto de la incorporación de frijol, mientras que el E-PER reflejó la conservación del potencial nutricional de la proteína.

Las modificaciones inducidas por la extrusión fueron limitadas y no alteraron el patrón general de calidad proteica de las formulaciones. Un comportamiento similar fue descrito por Neder-Suárez *et al.,* (2024), quienes observaron que la extrusión y la expansión por microondas modificaron ligeramente la concentración de aminoácidos individuales, aunque conservaron la tendencia general del perfil aminoacídico y de los índices de calidad proteica. De manera análoga, Ayala-Rodríguez *et al.,* (2022) señalaron que los tratamientos térmicos modifican principalmente la digestibilidad y disponibilidad de aminoácidos, más que el contenido cuantitativo de proteína. Estos resultados concuerdan con Pasqualone *et al.*, (2020), Bosch (2022), Duque-Estrada *et al.*, (2023) y Shah *et al.*, (2022), quienes atribuyen estas modificaciones a cambios conformacionales de las proteínas, interacciones proteína y almidón y reacciones de Maillard que afectan preferentemente la disponibilidad de aminoácidos sensibles al calor, particularmente la lisina, sin alterar sustancialmente el equilibrio global de aminoácidos esenciales. En consecuencia, la formulación ejerció una influencia considerablemente mayor sobre la calidad proteica que el propio proceso de extrusión.

En conjunto, los resultados demuestran que la calidad proteica de las formulaciones estuvo determinada principalmente por la complementariedad aminoacídica entre el maíz azul y el frijol ayocote, mientras que la extrusión preservó este equilibrio durante el procesamiento. La evaluación

conjunta del perfil aminoacídico, el aminoácido limitante, el AAS y el E-PER confirma que la combinación cereal y leguminosa constituye una estrategia eficaz para mejorar la calidad nutricional de la proteína sin comprometer su estabilidad durante el procesamiento, en concordancia con lo reportado para otros sistemas de botanas extruidas de tercera generación y proteínas de leguminosas.

7.4 Objetivo particular 4: Efecto en compuestos bioactivos

7.4.1 Digestibilidad aparente *in vitro* de la materia seca, digestibilidad proteica *in vitro* y puntuación de aminoácidos corregida por digestibilidad proteica *in vitro*

Los valores de digestibilidad aparente *in vitro* de la materia seca (A-IVDMD), digestibilidad proteica *in vitro* (IVPD) y puntuación de aminoácidos corregida por digestibilidad proteica *in vitro* (IV-PDCAAS) de las harinas crudas y formulaciones extruidas de maíz azul y frijol ayocote se presentan en la **Tabla 12.** El análisis de varianza de dos vías mostró efectos significativos de la formulación, el tratamiento (crudo × extruido) y de su interacción sobre las tres variables evaluadas ($p < 0.001$). El tratamiento explicó la mayor proporción de la variabilidad observada en la A-IVDMD ($\eta^2 = 0.994$) y la IVPD ($\eta^2 = 0.962$), mientras que la formulación ejerció el mayor efecto sobre el IV-PDCAAS ($\eta^2 = 0.991$) (**Apéndice 11.3 – 11.5**).

Tabla 12. Digestibilidad aparente *in vitro* de la materia seca (A-IVDMD), digestibilidad proteica *in vitro* (IVPD) y puntuación de aminoácidos corregida por digestibilidad proteica *in vitro* (IV-PDCAAS) de harinas crudas y mezclas extruidas de maíz azul (*Zea mays* L.) y frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.)

Formulación	A-IVDMD[1]		IVPD[2]		IV-PDCAAS[3]	
	Raw	***Extr.***	***Raw***	***Extr.***	***Raw***	***Extr.***
Maiz azul	48.21 ± 0.90^{c}	65.04 ± 0.42^{b}	63.20 ± 1.09^{b}	52.86 ± 0.79^{b}	23.38 ± 0.40^{a}	20.09 ± 0.30^{a}
Frijol ayocote	38.85 ± 0.64^{a}	56.73 ± 0.48^{a}	67.51 ± 0.36^{c}	47.66 ± 1.55^{a}	45.91 ± 0.24^{e}	34.31 ± 1.12^{e}
+10% frijol	41.71 ± 1.21^{ab}	64.42 ± 1.39^{b}	54.99 ± 1.69^{a}	46.87 ± 1.37^{a}	23.65 ± 0.73^{a}	20.15 ± 0.59^{a}
+20% frijol	42.18 ± 1.21^{b}	65.81 ± 1.12^{b}	57.47 ± 1.18^{a}	48.27 ± 1.90^{a}	28.16 ± 0.58^{b}	23.17 ± 0.91^{b}
+30% frijol	40.94 ± 1.54^{ab}	63.95 ± 0.91^{b}	56.97 ± 1.27^{a}	46.97 ± 1.75^{a}	30.76 ± 0.68^{c}	24.42 ± 0.91^{b}
+40% frijol	39.61 ± 1.58^{ab}	64.11 ± 0.75^{b}	58.21 ± 1.60^{a}	48.74 ± 1.16^{a}	33.76 ± 0.93^{d}	27.29 ± 0.65^{c}
+45% frijol	39.05 ± 0.92^{ab}	63.75 ± 0.41^{b}	58.02 ± 0.58^{a}	50.69 ± 0.65^{ab}	34.81 ± 0.35^{d}	29.40 ± 0.38^{d}

[1]Digestibilidad aparente *in vitro* de la materia seca; [2]Digestibilidad proteica *in vitro*; y [3]Puntuación de aminoácidos corregida por digestibilidad proteica *in vitro*. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar de determinaciones por triplicado. Letras superíndice diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0.05$; ANOVA de una vía, prueba HSD de Tukey). El ANOVA de dos vías indicó efectos principales significativos de la formulación, el tratamiento (crudo × extruido) y su interacción ($p < 0.001$; resultados detallados no mostrados).

La A-IVDMD aumentó en todas las formulaciones después de la extrusión, pasando de 38.85–48.21 % en las harinas crudas a 56.73–65.81 % en las muestras extruidas. El menor valor correspondió al frijol ayocote crudo (38.85 ± 0.64 %), mientras que la mayor digestibilidad se registró en la formulación con 20 % de frijol (65.81 ± 1.12 %). En contraste, la IVPD disminuyó en todas las

formulaciones, de 54.99–67.51 % en las harinas crudas a 46.87–52.86 % tras la extrusión, con el mayor valor en el frijol ayocote crudo (67.51 ± 0.36 %) y el menor en el frijol ayocote extruido (47.66 ± 1.55 %). Por su parte, el IV-PDCAAS aumentó progresivamente con la incorporación de *P. coccineus*, aunque disminuyó después de la extrusión, manteniendo la misma tendencia de mejora conforme se incrementó la proporción de leguminosa.

El incremento de la A-IVDMD demuestra que la extrusión favoreció la degradación de la matriz alimentaria y aumentó la desaparición aparente de materia seca durante la digestión INFOGEST. El elevado tamaño del efecto del tratamiento ($\eta^2 = 0.994$) y de la interacción formulación × tratamiento ($\eta^2 = 0.754$) confirma que este comportamiento dependió tanto del procesamiento como de la composición de la mezcla. Dado que este método estima la diferencia entre la masa inicial y el residuo insoluble recuperado tras la digestión, el incremento observado refleja una mayor hidrólisis y solubilización de carbohidratos, proteínas y otros constituyentes, sin representar una medida directa de absorción fisiológica. Este comportamiento coincide con lo descrito por Pérez-Burillo *et al.* (2021), quienes señalaron que la digestión gastrointestinal simulada incrementa progresivamente la accesibilidad de los nutrientes al desestructurar la matriz alimentaria, y con Pismag *et al.,* (2024), quienes atribuyeron este efecto a la gelatinización del almidón, la pérdida de organización granular y la formación de fracciones de menor peso molecular durante la extrusión. La concordancia con las tendencias observadas previamente en WAI y WSI respalda esta interpretación, ya que ambos parámetros reflejan cambios en la hidratación y en la liberación de componentes solubles de la matriz. De manera similar, Omosebi *et al.* (2018) reportaron que la digestibilidad *in vitro* del almidón de mezclas de maíz y soya aumentó de 40.24 % a 59.85–60.25 % después de la extrusión como consecuencia de la pérdida de integridad estructural y la mayor susceptibilidad enzimática del almidón, comportamiento consistente con el incremento de la A-IVDMD observado en el presente estudio.

La respuesta opuesta observada entre la A-IVDMD y la IVPD evidencia que una mayor desestructuración y solubilización global de la matriz después de la extrusión no se tradujo necesariamente en una mayor recuperación de la fracción proteica soluble. Mientras que la gelatinización y desorganización del almidón pudieron favorecer considerablemente la desaparición de materia seca, las proteínas estuvieron sujetas simultáneamente a modificaciones estructurales e interacciones con otros componentes de la matriz capaces de alterar su comportamiento durante la

digestión y la posterior centrifugación (Omosebi et al., 2018; Pérez-Burillo et al., 2021; Pismag et al., 2024).

En contraste con la A-IVDMD, la disminución de la IVPD indica que la extrusión modificó el comportamiento de la fracción proteica durante la digestión simulada. Aunque el tratamiento explicó la mayor proporción de la variabilidad observada ($\eta^2 = 0.962$), la elevada interacción formulación × tratamiento ($\eta^2 = 0.773$) confirma que la respuesta dependió también de la composición de la matriz. Dado que este método cuantifica la proteína recuperada en la fase soluble tras la digestión y centrifugación, la reducción de la IVPD no implica necesariamente una menor hidrólisis enzimática, sino que también puede reflejar cambios en la solubilidad, dispersabilidad y recuperación de las proteínas inducidos por el procesamiento. Este comportamiento puede atribuirse a la desnaturalización y agregación proteica, la formación de interacciones proteína y almidón, las reacciones de Maillard y la estabilización de agregados mediante enlaces disulfuro y otras interacciones intermoleculares (Delgado-Andrade et al., 2007; Duque-Estrada et al., 2023; Hülsebusch et al., 2025; Pasqualone et al., 2020; Shah et al., 2022)

Adicionalmente, en matrices de leguminosas, la solubilidad y el estado de asociación de las proteínas pueden estar condicionados por sus interacciones con el fitato y los minerales. Debido a su elevada densidad de carga negativa, el ácido fítico puede establecer complejos con proteínas y participar en asociaciones proteína, fitato y mineral, cuya formación y estabilidad dependen del pH, la fuerza iónica, la presencia de cationes y el estado conformacional de las proteínas (Amat et al., 2023). En especies de *Phaseolus*, Alli y Baker, (1981) observaron que la asociación proteína y fitato dependió de la disponibilidad de grupos básicos positivamente cargados de las proteínas y varió en función del pH. Estas interacciones adquieren particular relevancia durante la digestión gastrointestinal simulada, en la que las proteínas atraviesan condiciones sucesivas de pH y fuerza iónica que pueden modificar su estado de asociación y solubilidad. Por consiguiente, las modificaciones estructurales inducidas por la extrusión podrían haber alterado no solo la susceptibilidad de las proteínas a la hidrólisis enzimática, sino también su distribución entre las fracciones soluble e insoluble recuperadas después de la digestión.

A diferencia del incremento de la IVPD observado en botanas de maíz azul y frijol negro por Neder-Suárez *et al.* (2024), quienes reportaron valores de 31.52–35.54 % en las harinas crudas y de 88.21–95.22 % tras la extrusión, así como de los resultados descritos por Ayala-Rodríguez *et al.* (2022) y

Omosebi *et al.* (2018), atribuidos a la inactivación de factores antinutricionales, la desnaturalización de las proteínas y la mayor exposición de sitios susceptibles a la hidrólisis, los resultados del presente estudio evidencian que la respuesta de la proteína a la extrusión depende de la severidad del tratamiento, la composición de la formulación, la presencia de compuestos fenólicos, el grado de agregación proteica y la metodología empleada para estimar la digestibilidad. Asimismo, considerando que el ácido fítico presente naturalmente en cereales y leguminosas puede establecer asociaciones con proteínas y minerales, las interacciones proteína y fitato y proteína, fitato y mineral constituyen un mecanismo adicional que podría contribuir a modificar la solubilidad y recuperación de la fracción proteica durante la digestión. No obstante, dichas asociaciones no fueron determinadas directamente en el presente estudio, por lo que su posible contribución debe considerarse únicamente como un mecanismo respaldado por la literatura. La concordancia con las modificaciones observadas previamente en WAI y WSI sugiere, además, que los cambios estructurales inducidos por la extrusión afectaron simultáneamente la capacidad de hidratación de la matriz y el comportamiento de la fracción proteica durante la digestión gastrointestinal simulada.

El IV-PDCAAS integró los efectos de la digestibilidad proteica y la calidad aminoacídica, reflejando que, aunque la extrusión redujo la IVPD, la incorporación progresiva de *P. coccineus* continuó mejorando la calidad nutrimental de la proteína. El predominio de la formulación sobre el tratamiento ($\eta^2 = 0.991$ contra 0.966) confirma que la complementariedad aminoacídica entre maíz y frijol ejerció una mayor influencia sobre este indicador que el propio procesamiento. Este comportamiento evidencia que la calidad proteica de las formulaciones estuvo determinada por dos componentes que respondieron de manera diferente: por una parte, la incorporación de la leguminosa mejoró el balance de aminoácidos esenciales; por otra, el procesamiento disminuyó la fracción proteica recuperada durante la digestión *in vitro*. De esta manera, el incremento de la proporción de frijol compensó parcialmente la disminución asociada con la IVPD, permitiendo conservar una tendencia ascendente del IV-PDCAAS conforme aumentó la incorporación de *P. coccineus*. Considerando las medias marginales de ambos tratamientos, el IV-PDCAAS aumentó de 21.73 % en el maíz azul a 32.11 % en la formulación con 45 % de frijol, mientras que el frijol ayocote presentó la mayor media marginal (40.11 %).

Esta tendencia coincide con los resultados de Félix-Medina et al. (2021), quienes reportaron un PDCAAS de 57.20 % en una botana extruida maíz y frijol (70:30), así como con Neder-Suárez et al.

(2024) y Omosebi et al. (2018), quienes observaron mejoras progresivas en la calidad proteica de mezclas cereal y leguminosa asociadas con la complementariedad aminoacídica y la reducción de factores antinutricionales. En el presente estudio, sin embargo, la disminución de la IVPD después de la extrusión limitó parcialmente el efecto favorable del perfil aminoacídico sobre el IV-PDCAAS, lo que pone de manifiesto que un perfil de aminoácidos más equilibrado no necesariamente se traduce en una mejora proporcional de la calidad proteica cuando la fracción recuperada durante la digestión es simultáneamente afectada por el procesamiento.

En conjunto, los resultados muestran que la extrusión modificó de manera diferencial el comportamiento de los principales componentes de la matriz durante la digestión simulada. La mayor A-IVDMD fue consistente con una mayor desestructuración y solubilización global de la matriz, mientras que la disminución de la IVPD evidenció un comportamiento diferente de la fracción proteica, potencialmente relacionado con cambios en su solubilidad, agregación e interacción con otros constituyentes. A pesar de este efecto del procesamiento, la incorporación de *P. coccineus* mejoró progresivamente el IV-PDCAAS mediante la complementariedad aminoacídica entre cereal y leguminosa, evidenciando la contribución independiente de la formulación y el procesamiento sobre los diferentes componentes de la calidad nutricional de estas matrices.

7.5 Objetivo particular 4: Efecto en compuestos bioactivos

7.5.1 Compuestos fenólicos totales, antocianinas monoméricas totales y actividad antioxidante (DPPH y ABTS)

Los compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante determinada mediante los ensayos DPPH y ABTS se evaluaron en la fase intestinal recuperada después de la digestión gastrointestinal *in vitro* de las harinas crudas y de los productos extruidos y expandidos, previamente molidos. Por tanto, las comparaciones entre muestras crudas y procesadas corresponden a determinaciones realizadas al término de la digestión simulada y reflejan los compuestos o la capacidad antioxidante recuperados en la fase intestinal. En contraste, las antocianinas monoméricas totales se determinaron directamente, sin digestión *in vitro*, en las harinas crudas, los productos extruidos y los productos extruidos y expandidos, con el propósito de evaluar los cambios asociados con las diferentes etapas del procesamiento.

Los resultados del contenido de compuestos fenólicos totales se presentan en la **Figura 8a**. Los valores oscilaron entre 4.30 ± 0.84 y 11.40 ± 0.22 mg EAG/g PS. El ANOVA de dos vías (**Apéndice**

11.6) mostró efectos significativos de la formulación ($F(6,28) = 57.67$, $p < 0.001$, $\eta p^2 = 0.925$), del tratamiento ($F(1,28) = 57.56$, $p < 0.001$, $\eta p^2 = 0.673$) y de la interacción formulación × tratamiento ($F(6,28) = 17.89$, $p < 0.001$, $\eta p^2 = 0.793$). En términos globales, el contenido determinado en la fase intestinal aumentó de aproximadamente 5.24 a 6.41 mg EAG/g PS después del procesamiento, equivalente a un incremento cercano al 22 %. Sin embargo, la interacción significativa indica que este comportamiento dependió de la formulación. Los mayores incrementos se observaron en el frijol ayocote y en la formulación con 10 % de frijol, mientras que la formulación con 20 % presentó una disminución y la de 45 % permaneció prácticamente sin cambios.

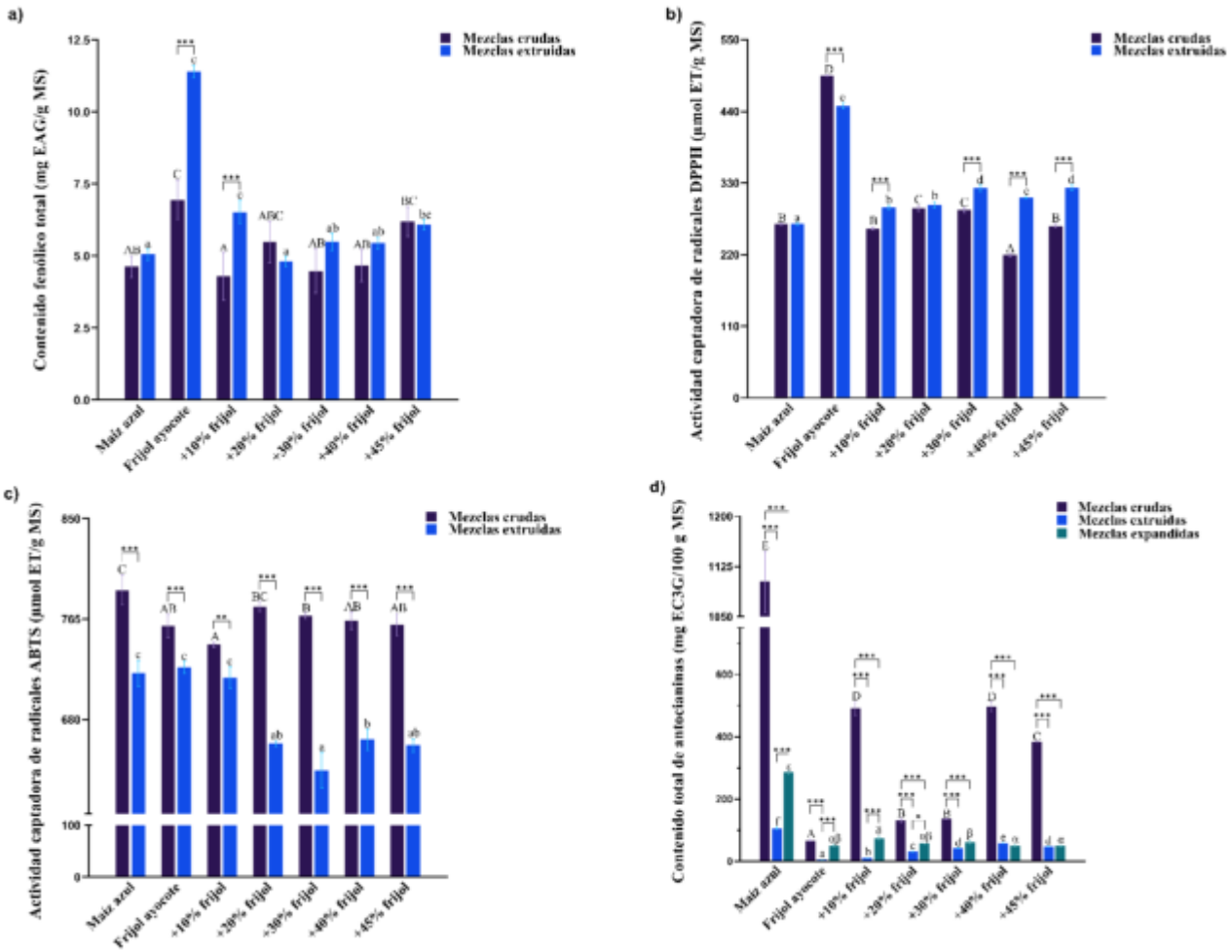


Figura 8. **a)** Contenido total de fenoles (mg GAE/g BS); **b)** capacidad captadora del radical DPPH (µmol TE/g BS); **c)** capacidad captadora del radical ABTS (µmol TE/g BS), determinados en la fase intestinal recuperada después de la digestión gastrointestinal *in vitro* de las harinas crudas y de los productos extruidos-expandidos; y **d)** contenido total de antocianinas (mg C3G/100 g BS), determinado directamente, sin digestión *in vitro*, en harinas crudas, productos extruidos y productos extruidos-expandidos de maíz azul y *Phaseolus coccineus*. Las barras representan la media ± DE (n = 3). Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre extruidos, las letras mayúsculas entre mezclas crudas y las letras griegas entre mezclas expandidas (ANOVA de una vía, prueba HSD de Tukey; $p < 0.05$). Los asteriscos denotan

diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de dos vías, prueba de Tukey; $p < 0.05$, *$p < 0.033$, **$p < 0.002$, ***$p < 0.001$).

La capacidad antioxidante determinada mediante DPPH también estuvo significativamente influenciada por la formulación ($F(6,28) = 3099.07$, $p < 0.001$, $\eta p^2 = 0.998$), el tratamiento ($F(1,28) = 626.13$, $p < 0.001$, $\eta p^2 = 0.957$) y su interacción ($F(6,28) = 273.72$, $p < 0.001$, $\eta p^2 = 0.983$) (**Figura 8b; Apéndice 11.7**). Los valores oscilaron entre 219.15 ± 2.24 y 494.88 ± 0.53 µmol ET/g PS. Considerando las medias globales, las muestras procesadas presentaron un incremento aproximado de 8.3 % respecto de las harinas crudas, de 297.71 a 322.50 µmol ET/g PS. No obstante, la elevada interacción formulación × tratamiento evidencia que el efecto del procesamiento estuvo fuertemente condicionado por la composición de la matriz. El frijol ayocote presentó una disminución, el maíz azul permaneció prácticamente sin cambios y las mezclas maíz–frijol mostraron incrementos de distinta magnitud, particularmente en las formulaciones con 40 y 45 % de frijol.

En contraste, la capacidad antioxidante determinada mediante ABTS disminuyó después del procesamiento en todas las formulaciones (**Figura 8c**). Los valores oscilaron entre 637.05 ± 15.03 y 789.37 ± 12.54 µmol TE/g PS. El ANOVA de dos vías (**Apéndice 11.8**) mostró efectos significativos de la formulación ($F(6,28) = 29.66$, $p < 0.001$, $\eta p^2 = 0.864$), del tratamiento ($F(1,28) = 1026.21$, $p < 0.001$, $\eta p^2 = 0.973$) y de la interacción formulación × tratamiento ($F(6,28) = 33.67$, $p < 0.001$, $\eta p^2 = 0.878$). Las medias globales disminuyeron de 765.56 a 682.33 µmol TE/g PS, equivalente a una reducción aproximada de 10.9 %. Aunque la disminución ocurrió en todas las formulaciones, la interacción significativa demuestra que su magnitud dependió de la composición de la muestra.

El contenido de antocianinas monoméricas totales presentó una respuesta marcadamente diferente debido a su elevada sensibilidad al procesamiento (**Figura 8d**). El ANOVA de dos vías (**Apéndice 11.9**) mostró efectos significativos de la formulación ($F(6,42) = 1554.26$, $p < 0.001$, $\eta p^2 = 0.996$), del tratamiento ($F(2,42) = 5795.24$, $p < 0.001$, $\eta p^2 = 0.996$) y de la interacción formulación × tratamiento ($F(12,42) = 705.72$, $p < 0.001$, $\eta p^2 = 0.995$). En las harinas crudas, los valores oscilaron entre 66.25 ± 2.28 y 1102.29 ± 45.26 mg/100 g PS, correspondiendo el mayor contenido al maíz azul. La extrusión produjo una marcada disminución en todas las formulaciones, con valores entre 4.40 y 104.60 mg/100 g PS, mientras que después de la expansión por microondas se determinaron valores entre 49.09 y 285.22 mg/100 g PS. Considerando las medias globales, el contenido disminuyó de aproximadamente 401.06 mg/100 g PS en las harinas crudas a 42.61 mg/100 g PS después de la extrusión, equivalente a una reducción de aproximadamente 89.4 %. Después de la expansión se obtuvo una media de 89.59

mg/100 g PS, evidenciando una recuperación parcial del contenido determinado analíticamente, aunque los valores permanecieron aproximadamente 77.7 % por debajo de los correspondientes a las harinas crudas.

El mayor contenido de compuestos fenólicos determinado en la fase intestinal de la mayoría de las muestras procesadas sugiere que la extrusión y expansión modificó la matriz alimentaria de manera que pudo favorecer la liberación y/o extractabilidad de determinados compuestos durante la posterior digestión gastrointestinal simulada. Esta interpretación es particularmente importante debido a que las determinaciones no se realizaron directamente sobre los productos antes y después del procesamiento, sino sobre la fase intestinal recuperada después de INFOGEST. Por tanto, el incremento observado no debe interpretarse necesariamente como una formación neta de compuestos fenólicos durante el procesamiento, sino como el resultado conjunto de las transformaciones inducidas por la extrusión y expansión y de su posterior liberación y recuperación durante la digestión (Herrera-Cazares et al., 2021).

Una tendencia dependiente de la matriz y de las condiciones de procesamiento ha sido descrita en diferentes sistemas extruidos. Neder-Suárez et al. (2024) observaron modificaciones en el contenido fenólico de botanas elaboradas con maíz azul, frijol negro y espinaca después de la extrusión y expansión por microondas, mientras Roye et al. (2020), Altan et al. (2009a) y Alam et al. (2016) han señalado que el procesamiento termomecánico puede producir efectos contrapuestos sobre estos compuestos. La ruptura de estructuras celulares y de asociaciones entre los compuestos fenólicos y otros componentes de la matriz puede incrementar su extractabilidad, mientras que simultáneamente pueden ocurrir reacciones de degradación, oxidación o transformación química. En consecuencia, el balance entre ambos fenómenos depende de la composición de la matriz y de la severidad del procesamiento.

La posterior digestión gastrointestinal añade un nivel adicional de complejidad, debido a que la cantidad recuperada en la fase intestinal depende no solo de la concentración originalmente presente, sino también de la liberación de los compuestos desde la matriz durante las etapas oral, gástrica e intestinal. Las modificaciones estructurales inducidas por la extrusión pueden alterar las interacciones entre proteínas, almidón y compuestos fenólicos y, consecuentemente, modificar su solubilización y recuperación durante la digestión (Herrera-Cazares et al., 2021). En matrices que contienen leguminosas, las interacciones proteína y fenoles adquieren especial relevancia debido a que los

cambios conformacionales y la agregación proteica inducidos por el procesamiento pueden modificar los sitios de interacción y la accesibilidad de los compuestos fenólicos (Salazar-López et al., 2018; S. Singh et al., 2007; Yin et al., 2011). Por otra parte, debe considerarse que el reactivo de Folin–Ciocalteu no es específico para compuestos fenólicos y puede responder frente a otras sustancias reductoras presentes en la fase intestinal, incluidos determinados péptidos y otros productos generados o liberados durante la digestión (Korus *et al.,* 2006). Por ello, las diferencias observadas deben interpretarse como cambios en el contenido fenólico determinado analíticamente y no exclusivamente como modificaciones cuantitativas de compuestos fenólicos individuales.

La capacidad antioxidante presentó respuestas contrastantes según el método de evaluación. Mientras que DPPH mostró un incremento global aproximado de 8.3 %, ABTS disminuyó aproximadamente 10.9 %. Particularmente en DPPH, la elevada interacción formulación × tratamiento ($\eta p^2 = 0.983$) demuestra que el efecto del procesamiento estuvo estrechamente condicionado por la composición de la matriz. Esta respuesta diferencial coincide con estudios previos que han mostrado que la capacidad antioxidante de productos extruidos depende tanto de la formulación como de las condiciones de procesamiento (Altan et al., 2009a; Blandino et al., 2023; Delgado-Nieblas et al., 2019; Neder-Suárez et al., 2024; Pedrosa et al., 2021; Roye et al., 2020; Zeng et al., 2016).

La discrepancia entre DPPH y ABTS puede explicarse, al menos parcialmente, por las diferencias en los principios analíticos y condiciones de reacción de ambos ensayos. Aunque ambos evalúan la capacidad de los componentes de una muestra para neutralizar radicales modelo, difieren en su sensibilidad frente a los distintos antioxidantes y en las características del medio de reacción. Por esta razón, una misma matriz puede producir respuestas diferentes dependiendo del ensayo empleado . Esta diferencia adquiere particular relevancia en las muestras postdigestivas, cuya fracción soluble contiene una mezcla compleja de compuestos liberados o transformados durante la digestión (Floegel et al., 2011; Munteanu y Apetrei, 2021). De manera consistente, Chen et al., (2014) observaron que las asociaciones entre el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante determinadas mediante distintos métodos fueron menores después de la digestión gastrointestinal *in vitro*, evidenciando que la respuesta postdigestiva depende tanto de las transformaciones de la matriz como del método analítico utilizado. En consecuencia, las modificaciones en el contenido determinado mediante Folin–Ciocalteu no necesariamente deben reflejarse proporcionalmente en DPPH y ABTS,

y los resultados obtenidos mediante estos ensayos deben considerarse complementarios más que equivalentes (Chen et al., 2014).

En el caso de las antocianinas, la marcada reducción después de la extrusión confirma su elevada susceptibilidad a las condiciones termomecánicas del procesamiento. Una tendencia similar fue reportada por Neder-Suárez *et al.* (2024), quienes observaron disminuciones importantes después de la extrusión y una recuperación parcial después de la expansión por microondas. Asimismo, diferentes estudios han señalado que la estabilidad de las antocianinas durante la extrusión depende de la interacción entre temperatura, humedad, esfuerzo mecánico y tiempo de residencia, por lo que su degradación no puede atribuirse exclusivamente a un único parámetro del proceso (Hirth et al., 2014; Patras et al., 2010).

Hirth et al. (2014) demostraron específicamente que el incremento de la temperatura del barril de 100 a 160 °C redujo la retención de antocianinas de 0.82 a 0.64, mientras que un aumento de la humedad de alimentación de 18.6 a 28.4 % favoreció su retención de 0.67 a 0.90. Asimismo, el incremento de la velocidad del tornillo de 180 a 720 rpm redujo la retención de 0.75 a 0.49, asociado con cambios en la temperatura y en la energía mecánica específica. Por otra parte, un mayor flujo de alimentación favoreció la retención al disminuir el tiempo de residencia. Estos resultados respaldan que la estabilidad de las antocianinas durante la extrusión depende de la carga termomecánica global experimentada por la matriz y no únicamente de la temperatura nominal del proceso.

Desde el punto de vista fisicoquímico, la pérdida de antocianinas puede involucrar diferentes mecanismos de degradación, entre ellos la apertura del anillo pirilio y formación de chalconas, hidrólisis del enlace glucosídico, oxidación y posterior formación de productos de degradación. La magnitud de estas transformaciones depende de la estructura química de las antocianinas y de factores como temperatura, pH, presencia de oxígeno y características de la matriz alimentaria (Patras et al., 2010). Estos mecanismos son consistentes con la pronunciada disminución observada inmediatamente después de la extrusión.

En contraste, el incremento del contenido determinado después de la expansión por microondas debe interpretarse con cautela. Debido a que las transformaciones químicas responsables de la degradación de las antocianinas no son simplemente reversibles mediante un tratamiento térmico posterior, el incremento desde 42.61 hasta 89.59 mg/100 g PS no implica la regeneración de los pigmentos destruidos durante la extrusión. Una explicación más plausible es que la expansión modificó la

estructura física de la matriz y favoreció la liberación y extracción de fracciones de antocianinas que permanecían menos accesibles después de la extrusión. En concordancia, Neder-Suárez *et al.* (2024) relacionaron la recuperación parcial observada después de la expansión por microondas con cambios en la extractabilidad de los pigmentos. Por tanto, los valores obtenidos representan la fracción de antocianinas recuperable mediante las condiciones analíticas utilizadas y no necesariamente la totalidad de las moléculas estructuralmente conservadas en la matriz.

En conjunto, los resultados muestran que la formulación y el procesamiento modificaron diferencialmente el contenido de compuestos con potencial bioactivo y la capacidad antioxidante *in vitro*. En las determinaciones realizadas después de la digestión gastrointestinal simulada, las diferencias entre las harinas crudas y las muestras extruidas y expandidas reflejan el efecto combinado de las transformaciones inducidas por el procesamiento y de los cambios en la liberación y recuperación de componentes en la fase intestinal. Los compuestos fenólicos presentaron una mayor recuperación global después del procesamiento, mientras que DPPH y ABTS mostraron respuestas discordantes, evidenciando la influencia del método analítico y de la composición de la matriz. Por su parte, las antocianinas mostraron una elevada sensibilidad a la extrusión y una recuperación analítica parcial después de la expansión por microondas, comportamiento consistente con su limitada estabilidad fisicoquímica y con las modificaciones estructurales de la matriz inducidas durante el procesamiento.

7.5.2 Ácido fítico

Los resultados del contenido de ácido fítico de las harinas crudas y extruidas-expandidas elaboradas con maíz azul y diferentes proporciones de frijol ayocote se presentan en la **Figura 9**. En las harinas crudas, los valores oscilaron entre 2.53 ± 0.01 y 3.43 ± 0.04 mg/g MS, correspondiendo el menor contenido al maíz azul y el mayor al frijol ayocote. Conforme aumentó la proporción de *Phaseolus coccineus*, el contenido de ácido fítico incrementó gradualmente, registrándose valores intermedios entre 2.62 y 2.93 mg/g MS en las mezclas. Después de la extrusión-expansión, el contenido de ácido fítico disminuyó significativamente en todas las formulaciones (2.35 ± 0.10–3.21 ± 0.18 mg/g MS), manteniéndose el mismo patrón observado en las harinas crudas, con los menores valores en el maíz azul y los mayores en el frijol ayocote.

El ANOVA de dos vías (**Apéndice 11.10**) mostró efectos significativos de la formulación ($F(6,28) = 127.76$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.965$) y del tratamiento ($F(1,28) = 96.10$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.774$), mientras

que la interacción formulación × tratamiento no fue significativa ($F(6,28) = 0.051$, $p = 0.999$, $\eta^2 = 0.011$), indicando que no hubo evidencia de que la magnitud del efecto del procesamiento dependiera de la formulación. En conjunto, la incorporación de frijol ayocote incrementó progresivamente el contenido de ácido fítico, mientras que la extrusión y expansión redujo su concentración en aproximadamente 6.7 %, conservando las diferencias relativas entre formulaciones.

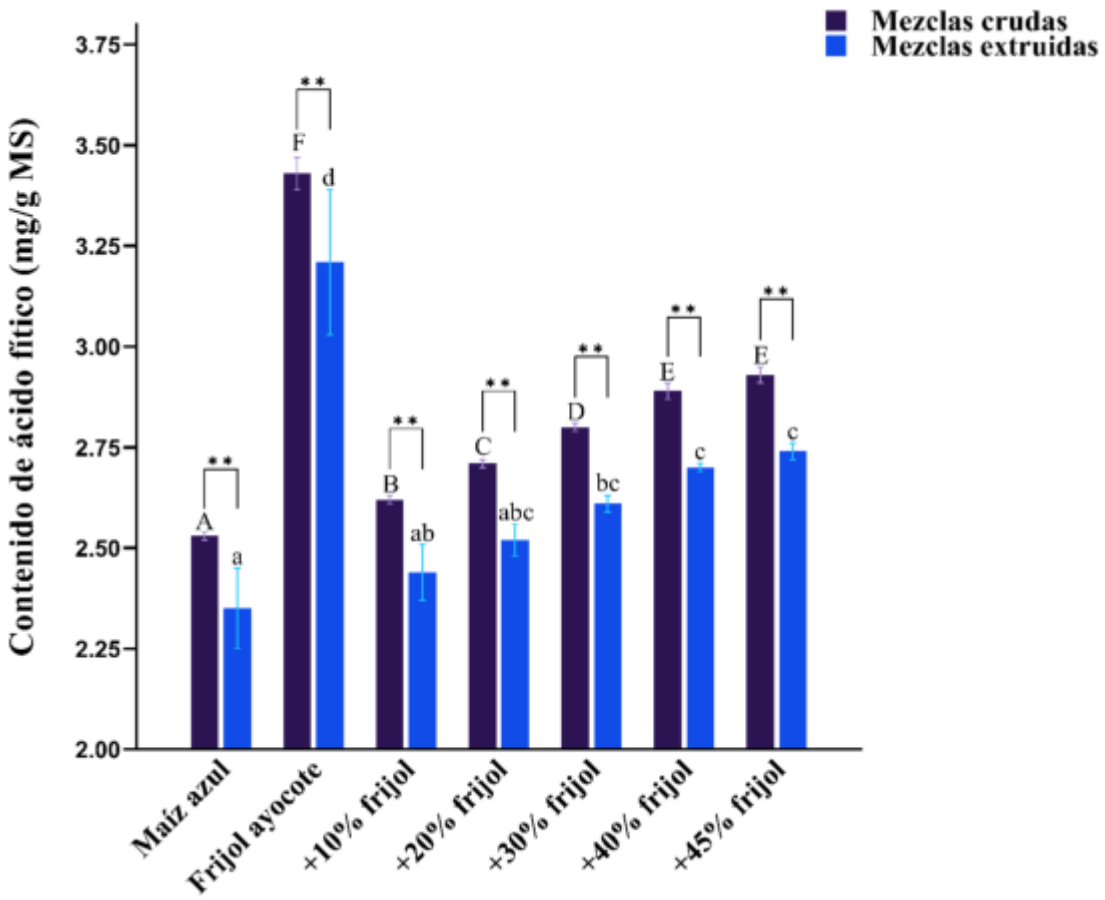


Figura 9. Contenido de ácido fítico (mg/g MS) de harinas crudas y extruidas y expandidas elaboradas con maíz azul (*Zea mays*) y diferentes proporciones de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*). Las barras representan la media ± desviación estándar (n = 3). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre formulaciones de harinas crudas y letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre formulaciones extruidas y expandidas (Tukey, $p < 0.05$). Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada formulación (Šídák, **$p < 0.01$). El ANOVA de dos vías mostró efectos significativos de la formulación y del tratamiento ($p < 0.001$), pero no de la interacción formulación × tratamiento ($p = 0.999$).

El incremento del contenido de ácido fítico conforme aumentó la proporción de *P. coccineus* confirma que la formulación fue el principal determinante de este compuesto ($\eta^2 = 0.965$), mientras que la extrusión y expansión redujo su concentración de manera consistente entre las formulaciones (≈6.7 %; $\eta^2 = 0.774$), sin efecto significativo de la interacción formulación × tratamiento ($p = 0.999$). Este

comportamiento coincide con Alonso, Aguirre, et al. (2000) y Alam *et al.* (2016), quienes señalan que la disminución del ácido fítico durante la extrusión depende principalmente de las condiciones de procesamiento. Aunque el ácido fítico presenta una elevada estabilidad térmica y su descomposición inicia alrededor de 150 °C (Daneluti y Matos, 2013), la extrusión favorece principalmente la hidrólisis parcial del *myo*-inositol hexakisfosfato (IP6) hacia fosfatos de menor grado de fosforilación (IP5–IP3), más que su degradación completa (Alonso, Aguirre, et al., 2000).

La estabilidad térmica del ácido fítico resulta particularmente relevante para interpretar la magnitud de la reducción observada en el presente estudio. Durante la extrusión, las temperaturas establecidas en las zonas de alimentación, cocción y cercana a la matriz fueron de 58, 120–118 y 65 °C, respectivamente, por lo que la temperatura máxima nominal del proceso se mantuvo por debajo de los aproximadamente 150 °C reportados para el inicio de su descomposición térmica (Daneluti y Matos, 2013). A ello se suma que la extrusión constituye un tratamiento de alta temperatura y corto tiempo, de modo que la exposición de la matriz a las temperaturas máximas ocurre durante un periodo limitado. En este contexto, la reducción estadísticamente significativa pero cuantitativamente moderada de aproximadamente 6.7 % es compatible con una modificación parcial del fitato durante el procesamiento, más que con una degradación térmica extensa. Esta interpretación debe considerarse en función de las temperaturas establecidas en el extrusor, ya que la temperatura real de la masa y su tiempo de residencia no fueron determinados directamente.

La magnitud relativamente baja de la reducción también puede contextualizarse frente a otros sistemas de leguminosas extruidas. Se han reportado disminuciones de aproximadamente 13.5, 20.8 y 26.7 % en chícharo, frijol y haba, respectivamente, bajo condiciones de extrusión cercanas a 145–150 °C, acompañadas por una disminución de IP6 y un incremento relativo de formas menos fosforiladas como IP5 e IP4 (Alonso, Aguirre, et al., 2000; Sarkhel y Roy, 2022). Aunque los sistemas exclusivamente a base de cereales no son directamente comparables con las formulaciones cereal y leguminosa evaluadas en este estudio, también aportan evidencia sobre la influencia de las variables de extrusión. Kaur et al. (2015), al evaluar salvados de trigo, arroz, cebada y avena, observaron reducciones sustanciales del ácido fítico bajo condiciones de 115–165 °C y 14–20 % de humedad. A 20 % de humedad, las reducciones promedio fueron de 54.51, 50.47 y 48.47 % a 115, 140 y 165 °C, respectivamente, evidenciando que el incremento de la temperatura no produjo una disminución

proporcional del ácido fítico y que la humedad y la naturaleza de la matriz también condicionaron su respuesta durante la extrusión.

La reducción del contenido cuantificable de ácido fítico tampoco debe interpretarse exclusivamente como consecuencia de su degradación térmica. La estructura altamente fosforilada del IP6 favorece interacciones con proteínas y cationes minerales, dando lugar a complejos binarios y ternarios cuya estabilidad depende del pH, la fuerza iónica, las concentraciones relativas de los componentes y la conformación de las proteínas (Amat et al., 2023). En especies de *Phaseolus*, Alli y Baker, (1981) observaron que la asociación entre ácido fítico y proteínas dependió de la disponibilidad de grupos básicos positivamente cargados, y que dicha asociación se modificó con el pH. Por lo tanto, las modificaciones conformacionales, la desnaturalización y la agregación proteica inducidas durante la extrusión podrían modificar las interacciones fitato, proteína y mineral y, consecuentemente, la solubilidad o extractabilidad analítica del fitato. Esta posibilidad resulta relevante en matrices cereal y leguminosa, donde el procesamiento modifica simultáneamente almidón, proteínas y sus interacciones con otros constituyentes.

En este sentido, la hidrólisis parcial de IP6 y las modificaciones en sus interacciones con la matriz constituyen mecanismos complementarios, y no necesariamente excluyentes, para interpretar los cambios observados después del procesamiento. La literatura indica que el contenido determinado de ácido fítico puede responder no solo a su transformación química, sino también al estado de asociación del fitato con proteínas y minerales y a cambios en su accesibilidad dentro de la matriz. Por ello, la disminución observada en el presente estudio no permite establecer por sí sola el mecanismo responsable ni confirmar la formación de IP5 y IP3, ya que estos fosfatos de inositol no fueron determinados individualmente; sin embargo, su formación constituye un mecanismo previamente descrito durante la extrusión de leguminosas (Alonso, Aguirre, et al., 2000; Sarkhel y Roy, 2022).

En contraste con la reducción observada en este estudio, Osuna-Gallardo et al. (2023) reportaron un incremento de 21.9 % en el contenido de ácido fítico de harina extruida de *P. coccineus* procesada a 137 °C, atribuido a una mayor liberación y detectabilidad del compuesto después del procesamiento. Esta respuesta resulta particularmente relevante por tratarse de la misma especie utilizada en el presente trabajo y demuestra que una mayor temperatura de extrusión no necesariamente se traduce en una mayor reducción del contenido analíticamente determinado. Las diferencias entre ambos

estudios podrían estar relacionadas con las condiciones específicas de extrusión, la composición inicial de la materia prima, la humedad, el tiempo de residencia y las modificaciones estructurales de la matriz que afectan la liberación o extractabilidad del fitato. En consecuencia, la respuesta del ácido fítico durante la extrusión parece estar determinada por el balance entre su hidrólisis parcial y los cambios fisicoquímicos de la matriz que pueden modificar su disponibilidad para la determinación analítica.

Finalmente, debe considerarse que las muestras evaluadas en el presente estudio correspondieron a productos extruidos y posteriormente expandidos por microondas. Este segundo tratamiento representa una fuente adicional de energía térmica capaz de modificar la matriz y potencialmente contribuir a los cambios observados en el contenido de fitato. Se han descrito modificaciones del ácido fítico después del tratamiento con microondas en leguminosas, aunque la magnitud y dirección de la respuesta dependen de las condiciones aplicadas y de las características de la materia prima (Sarkhel y Roy, 2022). Por lo tanto, la reducción global de aproximadamente 6.7 % debe atribuirse al efecto conjunto de la extrusión y la expansión por microondas, sin asignar de manera independiente la contribución de cada etapa. En conjunto, estos resultados y su contraste con la literatura indican que la respuesta del ácido fítico al procesamiento no depende exclusivamente de la temperatura, sino de la interacción entre las condiciones de extrusión y expansión y las características de la matriz cereal y leguminosa. La reducción moderada observada podría estar relacionada tanto con la estabilidad térmica del ácido fítico y la hidrólisis parcial del IP6 como con modificaciones en sus interacciones y extractabilidad dentro de la matriz maíz azul y frijol ayocote.

7.6 Objetivo particular 5: Análisis microestructural

7.6.1 Evaluación de cambios en el perfil proteico mediante electroforesis SDS-PAGE

El perfil electroforético de las proteínas presentes en las muestras de maíz azul y frijol ayocote fue evaluado mediante SDS-PAGE con el propósito de identificar modificaciones cualitativas en la distribución de las bandas proteicas asociadas con el procesamiento y la digestión gastrointestinal *in vitro*. Para diferenciar los cambios relacionados con las condiciones fisicoquímicas del protocolo de aquellos producidos por la acción de las enzimas digestivas, se incluyeron controles de digestión sin enzimas tanto para las harinas crudas como para los productos extruidos y expandidos por microondas, posteriormente molidos.

7.6.1.1 Maiz azul

La **Figura 10** muestra el perfil electroforético de las proteínas presentes en la harina de maíz azul y en las muestras sometidas al protocolo de digestión *in vitro*, mientras que la **Tabla 13** resume los pesos moleculares aparentes estimados para las bandas detectadas en la harina cruda. El perfil electroforético de la harina cruda de maíz azul (**Figura 11**) presentó la mayor complejidad, con ocho bandas proteicas de 176.73, 94.20, 46.24, 36.05, 29.55, 28.68, 27.74 y 26.37 kDa. Se observaron dos bandas de alto peso molecular aparente (176.73 y 94.20 kDa), dos bandas intermedias (46.24 y 36.05 kDa) y cuatro bandas concentradas entre 26.37 y 29.55 kDa. El análisis densitométrico confirmó una mayor intensidad relativa en esta última región, además de señales bien definidas alrededor de 46 y 94 kDa.

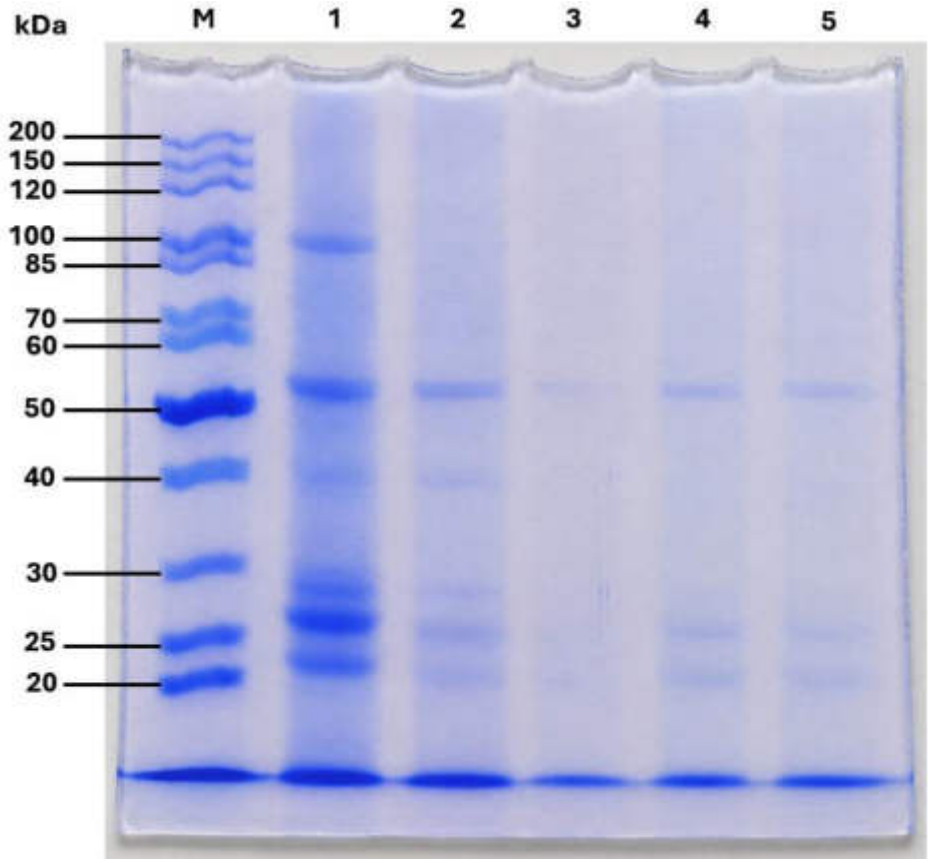


Figura 10. Perfil electroforético SDS-PAGE de las proteínas presentes en muestras de maíz azul sometidas a diferentes tratamientos. **M**: marcador de peso molecular (20–200 kDa); **carril 1**: harina cruda; **carril 2**: control de digestión de harina cruda (sin enzimas digestivas); **carril 3**: control de digestión del producto extruido y expandido por microondas, posteriormente molido (sin enzimas digestivas); **carril 4**: harina cruda digerida *in vitro*; **carril 5**: producto extruido y expandido por microondas, posteriormente molido y digerido *in vitro*.

La exposición de la harina cruda al protocolo de digestión en ausencia de enzimas digestivas redujo el número de bandas detectadas de ocho a cinco, permaneciendo señales entre 27.56 y 45.66 kDa y desapareciendo las de mayor peso molecular. En el control correspondiente al producto extruido y expandido por microondas, posteriormente molido y sometido al mismo protocolo sin enzimas, se detectó predominantemente una banda de aproximadamente 47.44 kDa, evidenciando una reducción adicional de la complejidad del perfil proteico. Después de la digestión *in vitro* completa, tanto la harina cruda como la muestra procesada presentaron perfiles electroforéticos similares, caracterizados por tres bandas localizadas entre 27.43 y 46.24 kDa. En ambas muestras desaparecieron las señales de mayor peso molecular, permaneciendo principalmente bandas en la región de 27–46 kDa.

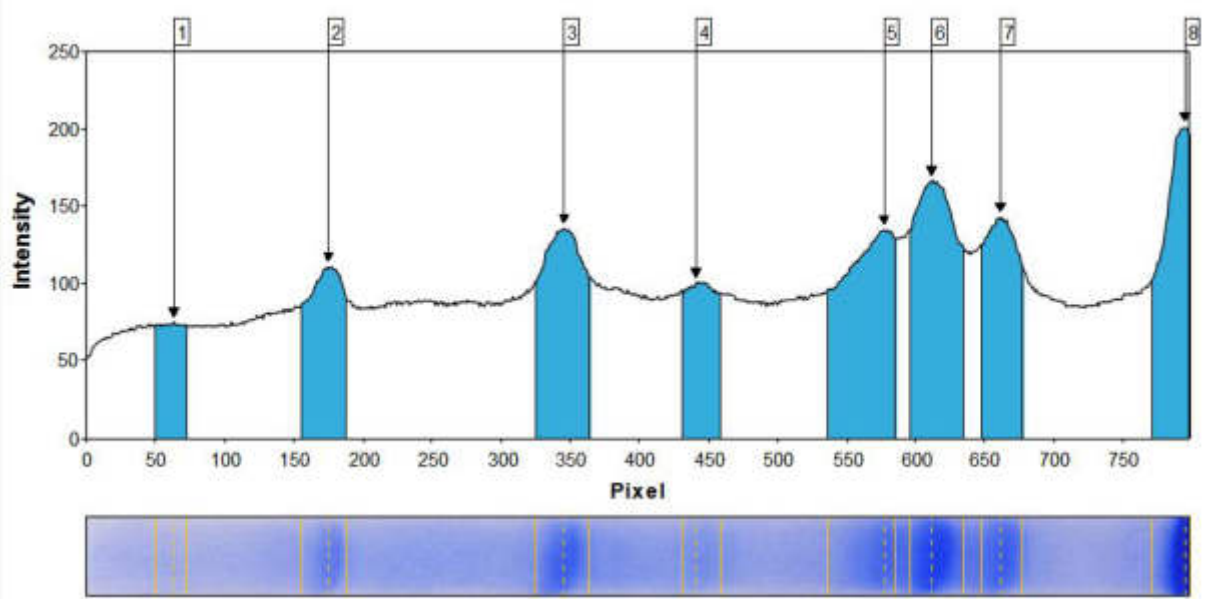


Figura 11. Proteínas identificadas mediante el software GelAnalyzer 26.1 en la harina cruda de maíz (Carril 1).

Tabla 13. Peso molecular aparente (kDa) de las bandas proteicas detectadas mediante SDS-PAGE en la harina cruda de maíz azul (Carril 1).

Banda	Rf[a]	Peso molecular (kDa)
1	0.127	176.73
2	0.246	94.20
3	0.426	46.24
4	0.528	36.05
5	0.672	29.55
6	0.708	28.68
7	0.761	27.74
8	0.903	26.37

[a]Movilidad relativa (Rf), calculada como el cociente entre la distancia recorrida por cada banda proteica y la distancia recorrida por el frente del colorante durante la electroforesis, medidas desde el inicio del gel de resolución.

Las proteínas de almacenamiento del endospermo del maíz están constituidas principalmente por zeínas, además de otras fracciones proteicas con diferente solubilidad y peso molecular. Dentro de las zeínas, las α-zeínas representan la fracción predominante y se han descrito clásicamente mediante SDS-PAGE alrededor de 19 y 22 kDa (Nunes et al., 2004; Wilson, 1986; Zheng et al., 2014). En el presente estudio, las bandas de menor peso molecular de la harina cruda se localizaron entre 26.37 y 29.55 kDa, por encima del intervalo característico reportado para las α-zeínas; por ello, su correspondencia directa con esta fracción proteica no puede establecerse únicamente a partir de la movilidad electroforética. No obstante, la persistencia de señales de bajo peso molecular después de la digestión es consistente con la mayor resistencia relativa descrita para determinadas proteínas de reserva del maíz frente a la hidrólisis enzimática (Nunes et al., 2004). La presencia adicional de bandas de 36.05, 46.24, 94.20 y 176.73 kDa evidencia la complejidad del perfil proteico recuperado y sugiere la presencia de otras fracciones proteicas o de estados de asociación de mayor peso molecular aparente.

El peso molecular aparente observado mediante SDS-PAGE no necesariamente corresponde a una proteína monomérica individual, ya que las proteínas pueden establecer asociaciones intermoleculares y formar agregados u oligómeros de mayor peso molecular aparente. Por tanto, algunas señales localizadas en regiones superiores podrían reflejar estados de asociación de las proteínas y no exclusivamente polipéptidos individuales. Esta consideración resulta particularmente relevante después de tratamientos termomecánicos capaces de modificar la conformación y las interacciones intermoleculares de las proteínas. En consecuencia, la asignación de identidad basada exclusivamente en el peso molecular debe considerarse tentativa y requeriría técnicas complementarias para su confirmación (Alonso, Aguirre, et al., 2000; Duque-Estrada et al., 2023).

La marcada simplificación observada en el control de la harina del producto extruido y expandido por microondas, y sometido al protocolo gastrointestinal sin enzimas digestivas, demuestra que una parte importante de las modificaciones del perfil ocurrió independientemente de la proteólisis. Los tratamientos termomecánicos pueden modificar la conformación, agregación, solubilidad y extractabilidad de las proteínas, alterando consecuentemente su recuperación y migración mediante SDS-PAGE. Alonso, Orúe, et al. (2000), al estudiar proteínas de chícharo y *Phaseolus vulgaris* sometidas a extrusión, observaron una disminución considerable de la solubilidad proteica y modificaciones en los patrones electroforéticos de albúminas y globulinas; además, la recuperación

de su extractabilidad mediante SDS y 2-mercaptoetanol indicó la participación de interacciones intermoleculares y enlaces disulfuro. Aunque estos autores evaluaron matrices de leguminosas, el mecanismo resulta comparable para interpretar el comportamiento observado, ya que la pérdida de una señal electroforética después del procesamiento no necesariamente representa la degradación del polipéptido, sino que puede reflejar modificaciones en su asociación, solubilidad o recuperación bajo las condiciones de extracción. Cambios de esta naturaleza en la agregación y solubilidad de proteínas vegetales después de tratamientos térmicos y termomecánicos también han sido descritos por Flory et al. (2023).

Además del procesamiento previo, las condiciones fisicoquímicas del protocolo gastrointestinal pueden contribuir a modificar el comportamiento de las proteínas. Los cambios de pH, fuerza iónica y composición del medio pueden alterar las interacciones intermoleculares de proteínas cuya conformación ya fue modificada por el procesamiento, afectando su solubilidad y recuperación posterior (Duque-Estrada et al., 2023). De esta manera, la reducción de ocho a cinco bandas observada en el control de harina cruda y la marcada simplificación del perfil del producto procesado en ausencia de enzimas indican que las modificaciones electroforéticas ocurrieron en diferentes etapas del procedimiento y no pueden atribuirse exclusivamente a la hidrólisis enzimática.

La digestión gastrointestinal completa produjo una simplificación adicional del perfil, compatible con la acción de las proteasas sobre las fracciones susceptibles. Sin embargo, la similitud entre los perfiles finales de las muestras cruda y procesada no implica necesariamente un comportamiento equivalente de la fracción proteica durante la digestión. En el maíz azul, la IVPD disminuyó de 63.20 ± 1.09 % en la harina cruda a 52.86 ± 0.79 % después del procesamiento, indicando que la disminución del número de bandas detectables mediante SDS-PAGE no estuvo acompañada por una mayor recuperación de proteína soluble. SDS-PAGE e IVPD proporcionan información complementaria, pero no equivalente: mientras que el perfil electroforético permite visualizar las fracciones proteicas recuperables y detectables bajo las condiciones de extracción y separación empleadas, la IVPD determinada en este estudio depende de la cantidad de proteína recuperada en la fase soluble después de la digestión y centrifugación. Por ello, los cambios en agregación, solubilidad y extractabilidad inducidos por el procesamiento pueden modificar simultáneamente el patrón electroforético y la recuperación de proteína soluble, sin que la disminución o desaparición de una banda implique

necesariamente un incremento de la digestibilidad proteica (Alonso, Aguirre, et al., 2000; Duque-Estrada et al., 2023; Flory et al., 2023).

En conjunto, el comportamiento del maíz azul indica que el procesamiento modificó sustancialmente el estado estructural y la recuperación electroforética de sus proteínas antes de la acción enzimática, mientras que la digestión gastrointestinal produjo modificaciones adicionales sobre las fracciones remanentes. La persistencia de bandas entre aproximadamente 27 y 46 kDa después de la digestión evidencia la presencia de fracciones comparativamente más resistentes o recuperables, aunque su identidad específica y grado individual de hidrólisis no pueden establecerse únicamente mediante SDS-PAGE. La disminución concurrente de la IVPD indica, además, que los cambios inducidos por el procesamiento no necesariamente favorecieron la recuperación de proteína soluble después de la digestión, por lo que la interpretación del comportamiento proteico requiere considerar conjuntamente estructura, agregación, solubilidad, extractabilidad y susceptibilidad a la proteólisis.

7.6.1.2 Frijol ayocote

La **Figura 12** muestra el perfil electroforético de las proteínas presentes en la harina de frijol ayocote y en las muestras sometidas al protocolo de digestión *in vitro*, mientras que la **Tabla 14** resume los pesos moleculares aparentes estimados para las bandas detectadas en la harina cruda. El perfil electroforético de la harina cruda (**Figura 13**) presentó nueve señales de >200, 133.79, 105.50, 70.86, 49.50, 30.36, 27.05, 24.69 y 22.16 kDa, evidenciando una mayor complejidad que la observada para el maíz azul. La señal originalmente estimada mediante extrapolación como 313.97 kDa se localizó por encima del intervalo del marcador utilizado (20–200 kDa), por lo que debe considerarse únicamente como una fracción de peso molecular aparente >200 kDa.

La exposición de la harina cruda al protocolo de digestión en ausencia de enzimas digestivas produjo cambios limitados en el perfil electroforético, conservándose las nueve bandas originales con ligeras variaciones en los pesos moleculares estimados. En contraste, el control correspondiente a la muestra procesada sometida al mismo protocolo presentó únicamente cinco bandas comprendidas entre 25.1 y 99.7 kDa, evidenciando una reducción importante en la complejidad del perfil proteico. Después de la digestión *in vitro* completa, la harina cruda presentó tres bandas localizadas entre 25.18 y 51.84 kDa, mientras que la muestra procesada mostró únicamente dos señales de aproximadamente 28.68 y 49.80 kDa. En ambas desaparecieron prácticamente todas las fracciones de mayor peso molecular.

El perfil electroforético de la harina cruda fue consistente con el descrito para especies del género *Phaseolus*, caracterizadas por una elevada proporción de proteínas de reserva, entre ellas globulinas 7S como la phaseolina y diferentes lectinas. La banda observada a 49.50 kDa se encuentra dentro del intervalo de aproximadamente 43–53 kDa reportado para las subunidades de phaseolina de *P. vulgaris* (Carbonaro, 2006), reforzando la asignación tentativa que ya se había realizado con base en Makri y Doxastakis, (2006) y Montoya et al. (2010). Carbonaro reportó además que estas globulinas 7S presentan propiedades estructurales relacionadas con agregación y que el tratamiento térmico puede modificar su solubilidad y digestibilidad.

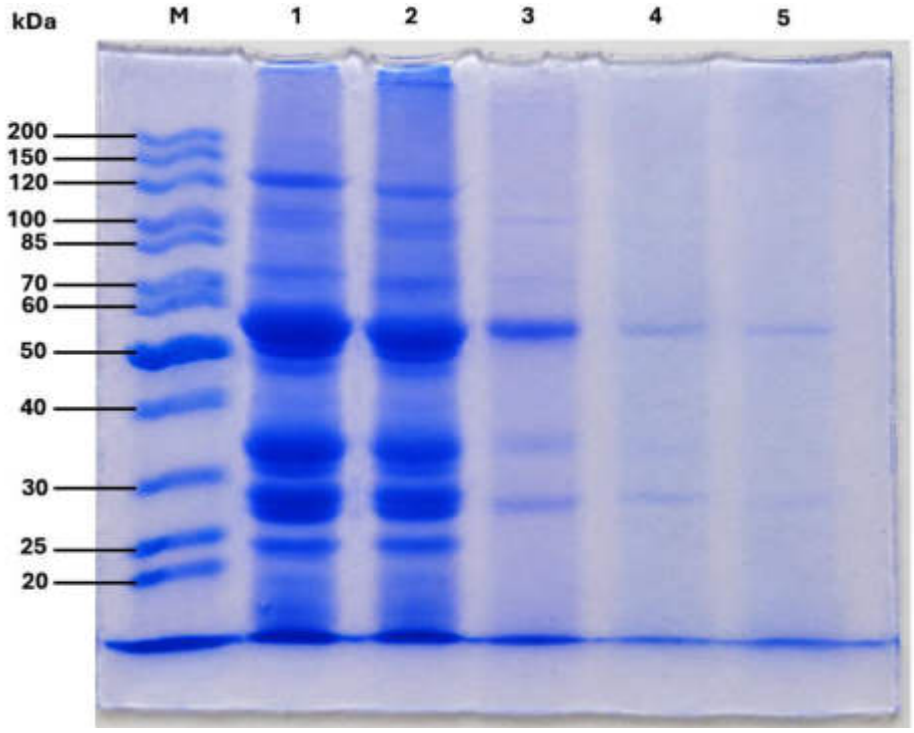


Figura 12. Perfil electroforético SDS-PAGE de las proteínas presentes en muestras de frijol ayocote sometidas a diferentes tratamientos. **M**: marcador de peso molecular (20–200 kDa); **carril 1**: harina cruda; **carril 2**: control de digestión de harina cruda (sin enzimas digestivas); **carril 3**: control de digestión del producto extruido y expandido por microondas, posteriormente molido (sin enzimas digestivas); **carril 4**: harina cruda digerida *in vitro*; **carril 5**: producto extruido y expandido por microondas, posteriormente molido y digerido *in vitro*.

La correspondencia resulta aún más estrecha para la señal de 30.36 kDa. González-Cruz et al., (2022) caracterizaron lectinas purificadas directamente de dos variedades de *Phaseolus coccineus* y determinaron pesos moleculares aparentes de 28.5 y 30.6 kDa mediante SDS-PAGE. Por tanto, la banda de 30.36 kDa observada en el presente estudio se encuentra dentro del intervalo descrito para lectinas de la misma especie. Esta coincidencia constituye un respaldo bibliográfico particularmente

pertinente, aunque no representa una identificación inequívoca de la banda, ya que no se realizó caracterización proteómica específica. Las bandas de 27.05, 24.69 y 22.16 kDa se encuentran asimismo dentro de regiones donde se han descrito polipéptidos de menor peso molecular y productos derivados de proteínas de reserva de *Phaseolus*. Montoya et al. (2010) reportaron que la hidrólisis de phaseolina puede producir fragmentos en el intervalo de 22–33 kDa, por lo que las señales remanentes observadas después de la digestión son compatibles, de manera tentativa, con fracciones proteicas resistentes o productos intermedios de proteólisis.

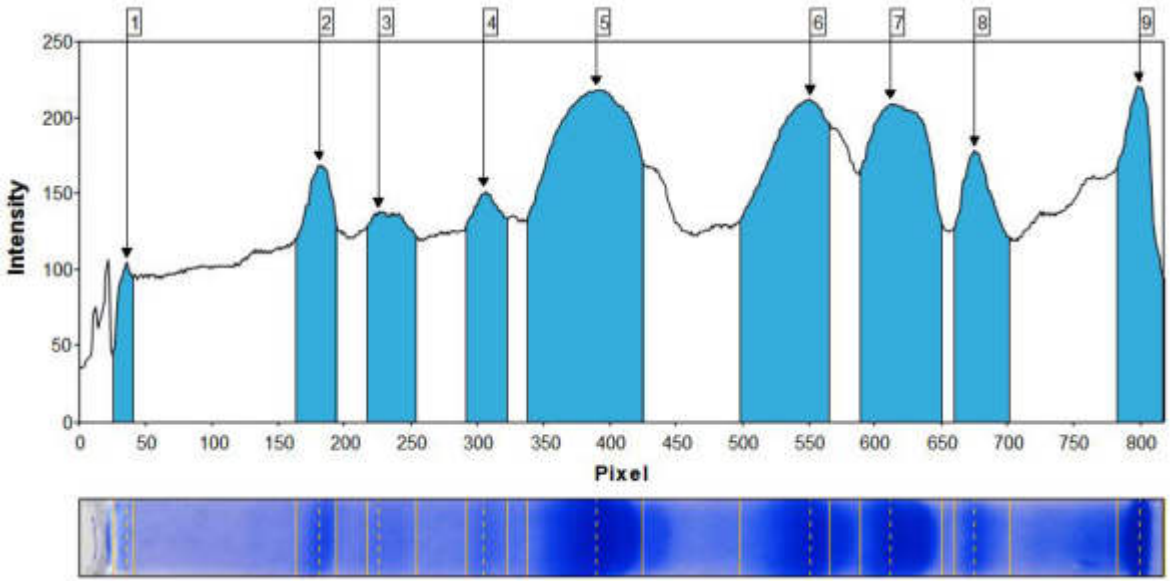


Figura 13. Proteínas identificadas mediante el software GelAnalyzer 26.1 en la harina cruda de frijol ayocote (Carril 2)

Tabla 14. Peso molecular aparente (kDa) de las bandas proteicas detectadas mediante SDS-PAGE en la harina cruda de frijol ayocote (Carril 1)

Banda	Rf[a]	Peso molecular (kDa)
1	0.043	313.97
2	0.221	133.79
3	0.275	105.50
4	0.372	70.86
5	0.475	49.50
6	0.673	30.36
7	0.746	27.05
8	0.824	24.69
9	0.976	22.16

[a]Movilidad relativa (Rf), calculada como el cociente entre la distancia recorrida por cada banda proteica y la distancia recorrida por el frente del colorante durante la electroforesis, medidas desde el inicio del gel de resolución.

La reducción del número de bandas observada en el control procesado sin enzimas demuestra nuevamente que una parte importante de la modificación electroforética ocurrió antes de la proteólisis gastrointestinal. Este comportamiento concuerda de forma particularmente estrecha con Alonso, Orúe, et al. (2000), quienes estudiaron directamente *P. vulgaris* y observaron que la extrusión produjo una fuerte disminución de la solubilidad proteica y cambios significativos en los patrones SDS-PAGE de albúminas y globulinas. La recuperación de la extractabilidad al emplear SDS y 2-mercaptoetanol indicó que las interacciones no covalentes y los enlaces disulfuro participaron en las modificaciones producidas durante el procesamiento.

A este efecto del procesamiento debe añadirse el de las condiciones fisicoquímicas del protocolo gastrointestinal. Venkatachalam y Sathe, (2003) demostraron en phaseolina de *P. vulgaris* que el medio ácido por sí mismo puede producir hidrólisis parcial incluso en ausencia de pepsina y modificar posteriormente la susceptibilidad de la proteína al ataque enzimático. Este antecedente resulta especialmente útil para interpretar los controles sin enzimas: éstos permiten distinguir la acción de las proteasas, pero no representan necesariamente una matriz estructuralmente inalterada durante las diferentes condiciones de pH del protocolo.

Además de las interacciones proteína con proteína inducidas por el procesamiento, el comportamiento de las proteínas del ayocote debe interpretarse dentro de una matriz alimentaria que contiene fitato, minerales, carbohidratos y compuestos fenólicos. El ácido fítico posee múltiples grupos fosfato ionizables y puede establecer asociaciones electrostáticas con grupos cargados de las proteínas; estas interacciones pueden modificar sus perfiles de solubilidad y favorecer la formación de complejos proteína y fitato dependiendo del pH y de la composición del medio (Cheryan y Rackis, 1980).

La evidencia más reciente muestra que estas asociaciones pueden incluir no solamente complejos binarios proteína y fitato, sino también sistemas ternarios proteína, fitato y calcio, cuya estabilidad depende del pH, la fuerza iónica, la concentración relativa de los componentes y el estado conformacional de las proteínas. Estas interacciones son relevantes para el procesamiento porque pueden modificar la estructura, funcionalidad y solubilidad proteica (Amat et al., 2023). Además, la extrusión y expansión puede modificar simultáneamente la conformación de las proteínas y sus interacciones con otros constituyentes de la matriz; por ello, las variaciones observadas en el perfil SDS-PAGE pueden reflejar no solo proteólisis o agregación proteína con proteína, sino también cambios en la solubilidad y recuperación de proteínas asociadas con otros componentes. Revisiones

sobre las interacciones del ácido fítico destacan precisamente que sus efectos sobre las proteínas y el procesamiento se explican por la interacción entre IP6, cationes y biopolímeros, con consecuencias sobre funcionalidad y solubilidad proteica (Wang y Guo, 2021).

En el caso de las proteínas de *Phaseolus*, también se ha demostrado que compuestos fenólicos pueden modificar el comportamiento de phaseolina. Estudios de interacción phaseolina y polifenoles han observado reducción de la hidrólisis y modificaciones del patrón electroforético, asociadas con la formación de complejos o precipitación de proteínas (De Toledo et al., 2013). Este mecanismo resulta particularmente pertinente para una matriz pigmentada como el frijol ayocote; sin embargo, tanto las asociaciones proteína y fitato como proteína y fenoles deben considerarse en el presente estudio mecanismos plausibles respaldados por la literatura y no interacciones demostradas directamente en las muestras.

La digestión completa produjo posteriormente una disminución adicional del número de bandas, compatible con hidrólisis de las fracciones susceptibles. La phaseolina presenta una estructura globular cuya susceptibilidad a la digestión depende de su estado conformacional; el tratamiento térmico puede facilitar la exposición de sitios susceptibles, pero simultáneamente favorecer agregación y pérdida de solubilidad (Carbonaro, 2006; Venkatachalam y Sathe, 2003). Por ello, la respuesta final de una matriz procesada no necesariamente sigue una relación sencilla equivalente de mayor desnaturalización corresponde a mayor digestibilidad.

La disminución del número de bandas observada después del procesamiento no estuvo acompañada por un incremento de la digestibilidad proteica *in vitro*. En el frijol ayocote, la IVPD disminuyó de 67.51 ± 0.36 % en la harina cruda a 47.66 ± 1.55 % en la muestra procesada, indicando que la simplificación del perfil electroforético no puede interpretarse directamente como evidencia de una mayor digestibilidad. Este comportamiento puede relacionarse con las modificaciones estructurales y de solubilidad inducidas por el procesamiento. Alonso, Orúe, et al., (2000) observaron en chícharo y *Phaseolus vulgaris* que la extrusión disminuyó significativamente la solubilidad proteica y modificó los patrones electroforéticos de las fracciones de albúminas y globulinas; asimismo, la incorporación de SDS y 2-mercaptoetanol incrementó la extractabilidad de las proteínas procesadas, evidenciando la participación de interacciones intermoleculares en los cambios inducidos por la extrusión.

En este contexto, determinadas fracciones proteicas pueden adquirir una mayor susceptibilidad a la proteólisis después de la desnaturalización, mientras que otras pueden experimentar agregación,

disminución de solubilidad o modificaciones en sus interacciones con otros componentes de la matriz. En proteínas de *Phaseolus*, la conformación de la phaseolina influye directamente en su susceptibilidad frente a las enzimas digestivas, mientras que el tratamiento térmico también puede promover estados estructurales con diferente comportamiento de solubilidad y digestibilidad (Carbonaro, 2006; Montoya et al., 2010; Venkatachalam y Sathe, 2003). Por tanto, el efecto global observado después del procesamiento puede reflejar el balance entre desnaturalización y exposición de sitios susceptibles a proteólisis, por una parte, y agregación o reducción de la fracción proteica soluble, por otra.

Esta respuesta puede estar condicionada adicionalmente por las interacciones de las proteínas con otros constituyentes de la matriz. El ácido fítico puede formar complejos con proteínas y minerales cuya estabilidad depende del pH, la fuerza iónica y el estado conformacional de las proteínas, modificando potencialmente su solubilidad y comportamiento dentro de la matriz alimentaria (Amat et al., 2023; Cheryan y Rackis, 1980). De manera similar, las interacciones entre proteínas y compuestos fenólicos pueden modificar la conformación, agregación y susceptibilidad proteolítica de las proteínas. Estas asociaciones no fueron determinadas directamente en el presente estudio, por lo que constituyen mecanismos probables para interpretar el comportamiento de la fracción proteica y no efectos demostrados experimentalmente.

En consecuencia, SDS-PAGE e IVPD proporcionan información complementaria sobre diferentes aspectos del comportamiento proteico. El perfil electroforético permite observar cualitativamente las fracciones recuperables y detectables después de cada tratamiento, mientras que la IVPD empleada en el presente estudio depende de la cantidad de proteína recuperada en la fase soluble después de la digestión y centrifugación. La interpretación conjunta de ambas determinaciones indica que el procesamiento modificó sustancialmente el estado estructural y la recuperación de las proteínas del frijol ayocote, afectando simultáneamente su asociación, solubilidad y comportamiento durante la posterior digestión gastrointestinal (Alonso, Aguirre, et al., 2000; Carbonaro, 2006; Duque-Estrada et al., 2023).

En conjunto, los perfiles electroforéticos evidenciaron que las modificaciones de las proteínas ocurrieron en diferentes etapas del tratamiento experimental. Los cambios observados en los controles sin enzimas muestran que parte de la simplificación del perfil estuvo asociada con el procesamiento previo y con las condiciones fisicoquímicas del protocolo, mientras que la incorporación posterior de

las enzimas produjo modificaciones adicionales compatibles con la proteólisis de las fracciones susceptibles. La respuesta diferencial entre SDS-PAGE e IVPD sugiere que el procesamiento modificó simultáneamente la conformación, asociación, solubilidad y susceptibilidad proteolítica de las proteínas, por lo que el comportamiento final de la fracción proteica resulta de la interacción entre estos fenómenos y las características particulares de cada matriz (Alonso, Orúe, et al., 2000; Carbonaro, 2006; Duque-Estrada et al., 2023; Venkatachalam y Sathe, 2003) .

7.6.2 Microscopía Electrónica de Barrido

Las micrografías de las materias primas mostraron diferencias en su morfología (**Figura 14**). En el maíz azul crudo se observaron numerosos gránulos de forma predominantemente redondeada, distribuidos individualmente o agrupados sobre fragmentos de mayor tamaño (**Figura 14a**). En el frijol ayocote molido también se identificaron partículas redondeadas y ovaladas, pero dispuestas principalmente en agregados compactos y asociadas con fragmentos irregulares de la matriz (**Figura 14b**). Después de la extrusión, la formulación con 30% de frijol presentó una pérdida evidente de la definición granular observada en las materias primas. A menor aumento se distinguieron partículas irregulares, angulares y de tamaños heterogéneos (**Figura 14c**), mientras que a mayor aumento se observó una matriz compacta y rugosa, con zonas plegadas, fisuras y cavidades superficiales (**Figura 14d**). La expansión por microondas conservó la fragmentación y heterogeneidad morfológica del material, pero produjo superficies más deformadas, con pliegues, irregularidades y zonas fracturadas (**Figura 14e-f**). En conjunto, las micrografías evidenciaron la transformación de las estructuras granulares presentes en las materias primas hacia una matriz continua y morfológicamente heterogénea después de la extrusión y la expansión por microondas.

El análisis permitió observar transformaciones microestructurales características, como la disrupción de gránulos de almidón, gelatinización, formación de poros y fracturas en la matriz, así como variaciones en la compactación y la continuidad estructural. Estas evidencias se utilizaron para complementar la interpretación de las propiedades de expansión, retención de compuestos bioactivos y comportamiento durante la *digestión in vitro* de las formulaciones estudiadas.

Las transformaciones microestructurales observadas después de la extrusión evidenciaron la pérdida progresiva de la morfología granular característica de las materias primas y la formación de una matriz continua, irregular y heterogénea. Durante la extrusión, la combinación de temperatura, presión y esfuerzo cortante modifica la organización de los principales componentes de la matriz,

particularmente almidón y proteínas, favoreciendo la pérdida de integridad de los gránulos y la reorganización del material. En el presente estudio, estos cambios se manifestaron mediante la disminución de estructuras granulares claramente definidas y la aparición de superficies compactas y rugosas, acompañadas de pliegues, fisuras y cavidades en la formulación con 30% de frijol ayocote.

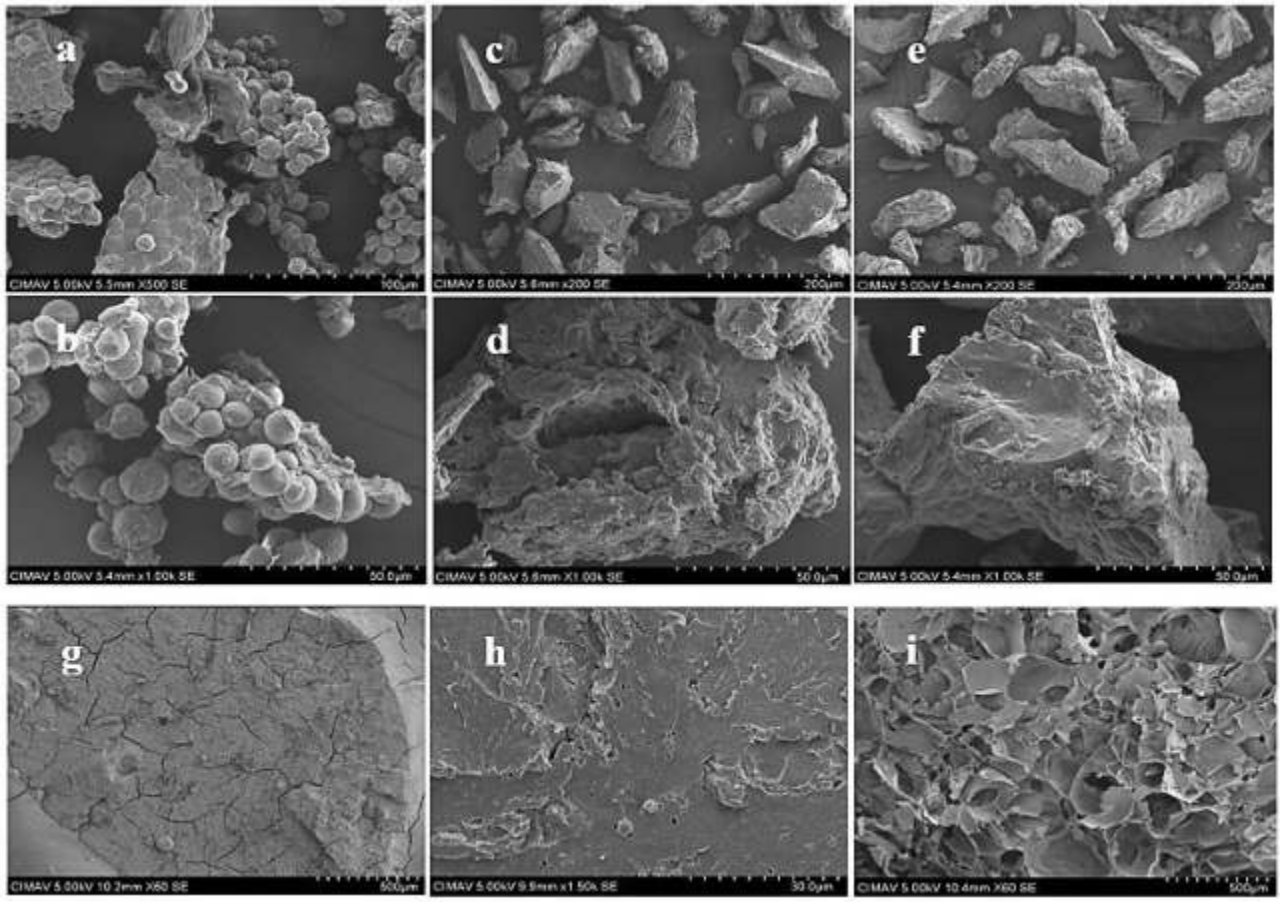


Figura 14. Micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de maíz azul (*Zea mays*) crudo a un aumento de 500× (a) y de frijol ayocote morado (*Phaseolus coccineus*) crudo a 1.00k× (b). Los paneles (c) y (d) muestran el extruido no expandido de maíz azul enriquecido con 30% de *P. coccineus* a 200× y 1.00k×, respectivamente. Los paneles (e) y (f) representan el extruido expandido por microondas de la misma formulación con 30% de frijol, a 200× y 1.00k×, respectivamente. Los paneles (g) y (h) muestran la sección transversal y la superficie del producto extruido no expandido a 60× y 1,500×, respectivamente; el panel (i) muestra la sección transversal del producto extruido y expandido por microondas a 60×.

Una transformación similar ha sido descrita en sistemas extruidos de tercera generación. Tovar-Jímenez et al. (2016) observaron en pellets extruidos la pérdida de la organización granular y la formación de superficies continuas con canales y cavidades, mientras que Neder-Suárez et al. (2021), en una matriz constituida por maíz azul, frijol negro y acelga, reportaron la desaparición de la estructura granular del almidón después de la extrusión, atribuida a la acción combinada de temperatura, presión y esfuerzo cortante. Estos cambios fueron acompañados por modificaciones en

las propiedades de expansión, absorción de agua, solubilidad y textura, lo que respalda la estrecha relación entre la reorganización microestructural inducida durante la extrusión y el comportamiento tecnofuncional del producto final.

La pérdida de definición granular observada mediante SEM es consistente con procesos de desestructuración y gelatinización parcial del almidón inducidos durante la extrusión; sin embargo, estas transformaciones no pueden establecerse exclusivamente a partir de la morfología microscópica. Estudios en almidón de maíz extruido han mostrado que el incremento de la severidad del procesamiento puede provocar pérdida de la organización granular, lixiviación de amilosa y formación de estructuras menos ordenadas, mientras que las modificaciones de la cristalinidad dependen de la temperatura, humedad y esfuerzo mecánico aplicados durante la extrusión (Neder-Suárez et al., 2016). De manera similar, Aguilar-Palazuelos et al. (2006) observaron que la extrusión modificó la estructura cristalina de pellets elaborados con almidón de papa, maíz de alta calidad proteica y harina de soya, generando desde pérdida de cristalinidad hasta la formación de nuevas estructuras dependiendo de la severidad del tratamiento. Por ello, las modificaciones morfológicas observadas mediante SEM deben interpretarse conjuntamente con los resultados obtenidos mediante difracción de rayos X y ATR-FTIR, técnicas que proporcionan información complementaria sobre los cambios en la organización estructural y molecular de la matriz.

La incorporación de las micrografías correspondientes a las secciones transversales de los pellets permitió además distinguir con mayor claridad el efecto específico de la expansión por microondas. El pellet extruido no expandido presentó una estructura interna predominantemente compacta (**Figura 14g y h**), mientras que después de la expansión se observó una arquitectura celular heterogénea, caracterizada por cavidades de diferentes tamaños distribuidas en el interior de la matriz (**Figura 14i**). Esta transición confirma que la expansión por microondas produjo una modificación estructural adicional respecto de la generada previamente durante la extrusión.

El desarrollo de esta arquitectura celular puede explicarse por el comportamiento físico del agua durante el calentamiento por microondas. La energía electromagnética es absorbida principalmente por las moléculas de agua presentes en la matriz, generando calentamiento y formación de vapor sobrecalentado; simultáneamente, el aumento de temperatura favorece el ablandamiento de la matriz, permitiendo su deformación y la expansión de los núcleos internos. Gimeno et al. (2004) describieron este proceso en pellets de harina de maíz, señalando que la expansión ocurre cuando la generación de

vapor coincide con la transición de la matriz desde un estado vítreo hacia un estado de mayor movilidad molecular, permitiendo que la presión interna produzca la expansión y formación de una estructura porosa.

La humedad del pellet constituye, por tanto, una variable relevante para este mecanismo. La formulación con 30% de frijol utilizada para el análisis microestructural presentó un contenido de humedad de **14.60 ± 0.10%** después de la extrusión. Lee et al. (2000) demostraron que el contenido de humedad de pellets de almidón de maíz modificó significativamente su comportamiento durante la expansión por microondas y observaron los mayores valores de expansión dentro de un intervalo aproximado de 10–13%; contenidos excesivamente altos limitaron la acumulación y liberación rápida de presión, mientras que contenidos demasiado bajos proporcionaron una cantidad insuficiente de agua para generar el vapor requerido para una expansión completa. Aunque estos valores no pueden extrapolarse directamente a una matriz compleja de maíz azul y frijol ayocote, la humedad observada en la formulación analizada se encuentra próxima al intervalo reportado para pellets de cereales expandidos por microondas.

El estado estructural desarrollado durante la extrusión también condiciona la capacidad posterior del pellet para expandirse. Lee et al. (2000) observaron que la morfología y distribución de las celdas dependieron del grado de gelatinización previo del almidón. Una gelatinización insuficiente produjo pequeños espacios internos y baja expansión, mientras que grados superiores permitieron la formación de celdas más desarrolladas; sin embargo, la mayor expansión no siguió una relación lineal con el grado de gelatinización, sino que se obtuvo alrededor de un estado intermedio de transformación del almidón. Este comportamiento indica que la expansión requiere un equilibrio entre movilidad y resistencia mecánica de la matriz: ésta debe ser suficientemente flexible para deformarse bajo la presión del vapor, pero conservar la resistencia necesaria para estabilizar las celdas formadas.

En una matriz cereal y leguminosa, dicho comportamiento no depende exclusivamente del almidón. Las proteínas pueden modificar la distribución de agua, la rigidez de la matriz y las interacciones intermoleculares, mientras que la fibra y otros componentes también pueden alterar sus propiedades reológicas y, consecuentemente, su capacidad de expansión (Gimeno et al., 2004). Esta consideración resulta importante en la formulación evaluada, donde la incorporación de 30% de *Phaseolus coccineus* incrementa la proporción relativa de proteína y fibra respecto del maíz azul, generando una matriz más compleja que los sistemas constituidos únicamente por almidón.

La influencia de la composición sobre las propiedades físicas de pellets expandidos también ha sido demostrada en matrices enriquecidas con ingredientes proteicos. Aguilar-Palazuelos et al. (2006), utilizando una mezcla de almidón de papa, maíz de alta calidad proteica y harina de soya, observaron que el incremento de la temperatura de extrusión favoreció el índice de expansión y redujo la densidad aparente de los pellets posteriormente expandidos por microondas. Asimismo, Gimeno et al. (2004) demostraron que modificaciones en las propiedades reológicas de la matriz alteraron el tamaño y distribución de las celdas y la uniformidad estructural del producto expandido; las matrices menos homogéneas presentaron una distribución más amplia de tamaños celulares y paredes de diferente espesor.

En este sentido, la arquitectura celular observada en el producto expandido resulta consistente con los cambios tecnofuncionales registrados previamente después de la expansión por microondas. La formación de cavidades internas incrementa el volumen ocupado por la matriz y contribuye a disminuir su densidad aparente, mientras que la geometría, tamaño y distribución de las celdas influyen sobre la resistencia mecánica y el comportamiento textural del producto. Lee et al. (2000) observaron que los tratamientos que generaron mayor volumen de expansión presentaron menores valores de densidad, mientras que Aguilar-Palazuelos et al. (2006) reportaron igualmente una relación inversa entre índice de expansión y densidad en pellets de tercera generación expandidos por microondas. Por tanto, aunque SEM no permite establecer por sí sola una relación causal con las propiedades tecnofuncionales, las modificaciones observadas son congruentes con el aumento del índice de expansión y la disminución de la densidad registrados después de la expansión por microondas en las formulaciones estudiadas.

La comparación entre los productos no expandidos y expandidos también evidencia que la extrusión y el calentamiento por microondas desempeñaron funciones estructurales diferentes pero complementarias. La extrusión produjo la desestructuración inicial de los componentes y la formación de una matriz continua capaz de actuar como precursor del pellet, mientras que el tratamiento posterior por microondas promovió la expansión de esta matriz y el desarrollo de una arquitectura celular. En consecuencia, la microestructura final del snack resulta del efecto secuencial del procesamiento termomecánico y de la posterior generación y expansión de vapor dentro del pellet, proceso condicionado por la humedad, el estado previo del almidón y la composición global de la matriz (Aguilar-Palazuelos et al., 2006; Gimeno et al., 2004; Lee et al., 2000).

En conjunto, las micrografías muestran una transición desde estructuras granulares claramente reconocibles en las materias primas hacia una matriz continua después de la extrusión y, posteriormente, hacia una arquitectura celular heterogénea después de la expansión por microondas. Estas modificaciones concuerdan con las transformaciones descritas previamente en sistemas de tercera generación y proporcionan evidencia morfológica del efecto secuencial del procesamiento sobre la matriz maíz azul y frijol ayocote.

7.6.3 Difracción de rayos X

Los difractogramas de rayos X mostraron diferencias en la organización estructural de las materias primas y de las formulaciones extruidas (**Figura 15**). El maíz azul crudo presentó reflexiones bien definidas aproximadamente a 15.4°, 17.3°, 18.1° y ~23° (2θ), consistentes con el patrón cristalino tipo A característico de los almidones de cereales. En contraste, el frijol ayocote presentó reflexiones menos definidas y un perfil de difracción más amplio, evidenciando diferencias en la organización estructural de ambas materias primas.

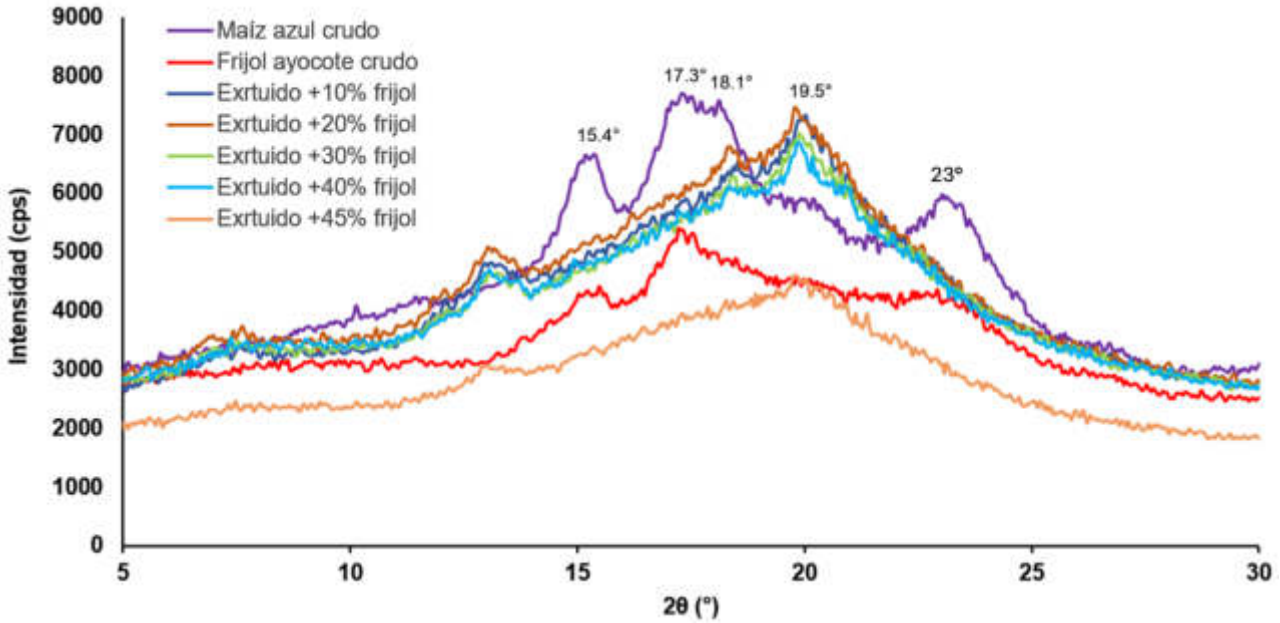


Figura 15. Perfiles de difracción de rayos X (XRD) de maíz azul (*Zea mays* L.) y frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.) crudos y de formulaciones extruidas de maíz azul enriquecidas con 10, 20, 30, 40 y 45% de *P. coccineus*. Los difractogramas se obtuvieron en un intervalo de 2θ de 5° a 30° utilizando radiación Cu-Kα (λ = 0.154056 nm). En el maíz azul crudo se observan reflexiones aproximadamente a 15.4°, 17.3°, 18.1° y ~23° (2θ), mientras que en las formulaciones extruidas se aprecia una menor definición de estas señales y una reflexión prominente en la región cercana a 19.5° (2θ).

Después de la extrusión, las formulaciones conservaron parcialmente algunas de las reflexiones características del almidón nativo; sin embargo, éstas presentaron menor definición y mayor

ensanchamiento respecto al maíz azul crudo. Asimismo, la región cercana a 19.5° adquirió mayor prominencia relativa en los productos procesados. Conforme aumentó la proporción de *Phaseolus coccineus*, las reflexiones asociadas con la matriz rica en almidón tendieron a presentar menor intensidad y definición, particularmente en la formulación con 45% de frijol. En conjunto, los perfiles obtenidos evidenciaron modificaciones en el orden estructural de la matriz asociadas tanto con el procesamiento por extrusión como con las diferencias en la composición de las formulaciones.

Las reflexiones observadas en el maíz azul crudo son consistentes con el patrón cristalino tipo A característico de los almidones de cereales, cuya organización se relaciona con el empaquetamiento de las dobles hélices de amilopectina en los dominios cristalinos (Hong et al., 2021). Un patrón comparable ha sido descrito en matrices de maíz azul y frijol destinadas a la elaboración de botanas de tercera generación, así como en productos de maíz sometidos a extrusión (Navarro Cortez et al., 2016; Neder-Suárez et al., 2021). Después del procesamiento, el ensanchamiento y la menor definición de las reflexiones observados en las formulaciones son consistentes con una reducción parcial del orden estructural. Durante la extrusión, la acción combinada de temperatura, humedad, presión y esfuerzo cortante puede alterar la organización semicristalina del almidón mediante gelatinización, destrucción granular y reorganización de sus cadenas, favoreciendo la transformación de regiones ordenadas hacia estructuras con mayor carácter amorfo (Cueto et al., 2018; Navarro Cortez et al., 2016; Neder-Suárez et al., 2021).

Sin embargo, la reducción del orden cristalino nativo no implica necesariamente una transformación completa de la matriz hacia un estado amorfo, ya que durante y después del procesamiento pueden coexistir la desestructuración de arreglos preexistentes y la formación de nuevas asociaciones moleculares. Cueto et al. (2018) determinaron una pérdida promedio cercana al 50% de la cristalinidad inicial después de la extrusión y atribuyeron el orden remanente tanto a fracciones de almidón nativo no completamente transformadas como a la formación de nuevos arreglos, incluidos complejos amilosa y lípido. De manera complementaria, C. Liu et al. (2025) demostraron mediante XRD, FTIR y RMN de ^{13}C CP/MAS que el procesamiento térmico puede producir inicialmente una disminución del orden cristalino y de las estructuras helicoidales, seguida, bajo determinadas condiciones, por una reorganización de las cadenas y la formación de nuevos arreglos ordenados. Aunque las condiciones experimentales y la matriz evaluada por estos autores difieren de las empleadas en el presente estudio, estos antecedentes respaldan una interpretación dinámica de las

transformaciones estructurales, en la que pérdida de orden y reorganización molecular pueden coexistir.

Esta consideración resulta relevante para interpretar la señal cercana a 19.5° (2θ) observada en los productos extruidos. En sistemas de maíz azul y frijol procesados por extrusión se ha reportado la aparición o intensificación de señales próximas a 12.8° y 19.8°, relacionadas con un patrón tipo V y con la reorganización de cadenas de amilosa en presencia de lípidos (Neder-Suárez et al., 2021). La formación de estructuras tipo V después de la gelatinización y durante tratamientos termomecánicos se encuentra ampliamente asociada con complejos de inclusión entre amilosa y lípidos (Oyeyinka et al., 2021). En consecuencia, la señal alrededor de 19.5° observada en las formulaciones del presente estudio podría ser compatible con la presencia de este tipo de estructuras. No obstante, esta asignación debe considerarse tentativa, debido a que no se realizó una cuantificación específica de las fases cristalinas ni una caracterización dirigida de complejos amilosa y lípido.

La incorporación progresiva de frijol ayocote produjo modificaciones adicionales en los perfiles de difracción, con una menor intensidad y definición de las reflexiones asociadas con la matriz rica en almidón conforme aumentó la proporción de *P. coccineus*, particularmente en la formulación con 45%. Esta tendencia no debe atribuirse exclusivamente a una mayor desestructuración del almidón ocasionada por la extrusión, ya que el incremento de la leguminosa modificó simultáneamente la composición del sistema. Los resultados de composición proximal mostraron un incremento progresivo de proteína y fibra dietética conforme aumentó la incorporación de ayocote, mientras que disminuyó proporcionalmente la participación del maíz y, por tanto, de la fase rica en almidón responsable de las principales reflexiones cristalinas. En productos extruidos, el almidón puede constituir una fase continua importante, mientras que proteínas, fibra y otros componentes modifican su continuidad, hidratación e interacciones durante el procesamiento (Cueto et al., 2018; Mironeasa et al., 2023). En matrices de maíz azul con diferentes proporciones de frijol negro también se ha observado que la composición condiciona las modificaciones estructurales desarrolladas durante el procesamiento (Neder-Suárez et al., 2024). Por tanto, la menor definición de las reflexiones a mayores niveles de ayocote probablemente refleja el efecto conjunto de la transformación termomecánica del almidón, la disminución relativa de la fase amilácea y la creciente participación de proteínas, fibra y otros constituyentes de la leguminosa.

Las modificaciones detectadas mediante XRD mostraron concordancia con los cambios morfológicos observados previamente mediante SEM. Mientras que las materias primas conservaron estructuras granulares claramente reconocibles, la formulación extruida presentó pérdida de la definición granular y formación de una matriz continua e irregular; paralelamente, XRD evidenció una menor definición del orden cristalino nativo. Esta correspondencia ha sido observada también en botanas de maíz azul y frijol negro, donde las modificaciones de la estructura granular después de la extrusión estuvieron acompañadas por cambios en el patrón de difracción (Neder-Suárez et al., 2021). Ambas técnicas proporcionan así información complementaria a diferentes escalas: SEM permite visualizar las modificaciones morfológicas de la matriz, mientras que XRD proporciona información sobre su orden cristalino de largo alcance. Este nivel de organización debe distinguirse de las interacciones y arreglos moleculares de corto alcance que pueden evaluarse mediante técnicas espectroscópicas como FTIR (Hong et al., 2021).

Las diferencias estructurales desarrolladas durante la extrusión también resultan relevantes para el comportamiento posterior del pellet durante la expansión por microondas. En pellets de tercera generación, las condiciones de extrusión pueden modificar la organización cristalina y establecer una estructura inicial que posteriormente condiciona la capacidad de la matriz para deformarse y expandirse durante el calentamiento (Aguilar-Palazuelos et al., 2006). En el presente estudio, las formulaciones con niveles intermedios de ayocote conservaron reflexiones relativamente más definidas en comparación con la formulación con 45% y presentaron índices de expansión cercanos a 2.0 y densidades aparentes intermedias después de la expansión. Esta correspondencia no demuestra una relación causal directa entre el perfil de difracción y la expansión, pero permite considerar el estado estructural desarrollado durante la extrusión como uno de los factores que contribuyen al comportamiento tecnológico posterior del pellet. Cueto et al. (2018) reportaron asociaciones entre indicadores estructurales y propiedades macroscópicas como expansión, densidad y porosidad, respaldando la conveniencia de interpretar conjuntamente la organización de la matriz y sus propiedades físicas.

En conjunto, los resultados de XRD evidenciaron que la extrusión modificó el orden estructural característico de las materias primas, mientras que la incorporación progresiva de *P. coccineus* introdujo modificaciones adicionales asociadas con la composición de la matriz. La disminución y el ensanchamiento de las reflexiones características del patrón tipo A indican una pérdida parcial del

orden cristalino nativo, mientras que la señal cercana a 19.5° es compatible con una posible reorganización hacia estructuras de tipo V, aunque esta asignación requiere cautela al no haberse cuantificado las fases cristalinas. La concordancia entre XRD y SEM respalda que el procesamiento produjo modificaciones estructurales a diferentes escalas y que el estado desarrollado durante la extrusión constituyó la matriz precursora sobre la cual ocurrió posteriormente la expansión por microondas.

7.6.4 Análisis por Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier con reflectancia total atenuada

Los espectros ATR-FTIR de las materias primas y de las formulaciones extruidas y expandidas por microondas mostraron las bandas características asociadas con los principales componentes de la matriz (**Figura 16**). En la región de 3600–3000 cm^{-1} se observó una banda ancha atribuida principalmente al estiramiento de grupos O–H y N–H, mientras que alrededor de 2920 cm^{-1} se identificó una señal correspondiente al estiramiento C–H. Asimismo, se observaron bandas en la región de 1700–1500 cm^{-1}, asociada principalmente con Amida I y Amida II, y una región de absorción intensa entre 1200 y 900 cm^{-1}, característica de vibraciones C–O–C y C–O de polisacáridos.

Las principales diferencias entre las materias primas y las formulaciones procesadas se localizaron en las regiones asociadas con proteínas y polisacáridos, particularmente alrededor de 1650–1540 cm^{-1} y en la región de 1200–900 cm^{-1}. Las formulaciones con diferentes proporciones de *Phaseolus coccineus* presentaron variaciones en el perfil de estas bandas, incluyendo la región cercana a 1045 cm^{-1}. Debido a que los espectros se analizaron de manera comparativa sin aplicar un procedimiento de normalización o deconvolución dirigido a la cuantificación de bandas individuales, las diferencias de absorbancia se interpretaron cualitativamente como modificaciones del perfil espectral y no como cambios cuantitativos en la concentración de grupos funcionales específicos.

Los perfiles ATR-FTIR evidenciaron que la incorporación de *P. coccineus* y el procesamiento modificaron el entorno molecular de los principales biopolímeros de la matriz sin observarse la aparición evidente de nuevas regiones de absorción respecto de las materias primas. La banda ancha localizada entre 3600 y 3000 cm^{-1} corresponde principalmente a vibraciones de estiramiento O–H, con posible contribución de grupos N–H, y se relaciona con la extensa red de enlaces de hidrógeno presente en carbohidratos, proteínas y agua asociada. Esta región es particularmente sensible a las

interacciones intermoleculares de los polisacáridos, debido a la abundancia de grupos hidroxilo capaces de participar en enlaces de hidrógeno (Hong et al., 2021). Las diferencias observadas entre las formulaciones pueden, por tanto, reflejar cambios en el entorno de estos grupos como consecuencia tanto de la composición cereal y leguminosa como de las modificaciones estructurales desarrolladas durante el procesamiento. De manera similar, la señal próxima a 2920 cm^{-1} corresponde principalmente al estiramiento de enlaces C–H presentes en los componentes orgánicos de la matriz.

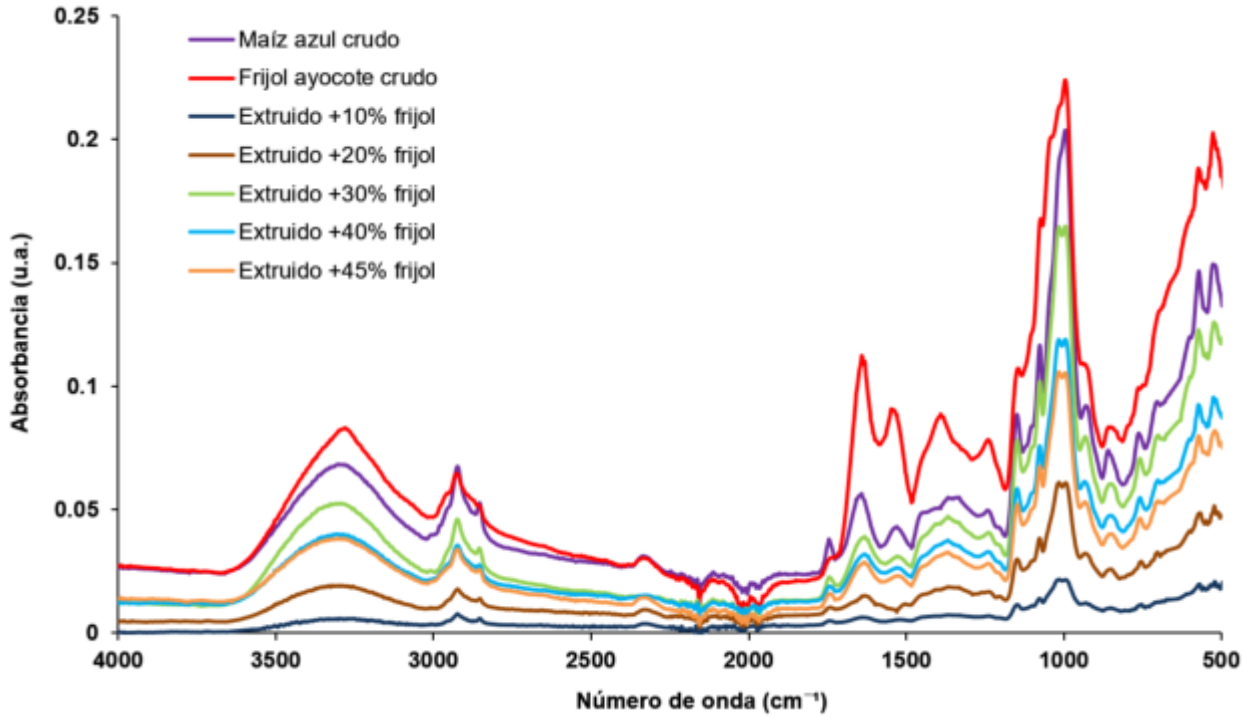


Figura 16. Espectros ATR-FTIR de las materias primas y de las formulaciones extruidas y expandidas por microondas de maíz azul (*Zea mays* L.) enriquecidas con *Phaseolus coccineus* L. Se identifican las principales bandas de absorción correspondientes al estiramiento O–H/N–H (3600–3000 cm^{-1}), estiramiento C–H (~2920 cm^{-1}), bandas Amida I y Amida II (1700–1500 cm^{-1}) y vibraciones C–O–C y C–O asociadas con polisacáridos (1200–900 cm^{-1}), incluyendo la región alrededor de 1045 cm^{-1}.

La región comprendida entre aproximadamente 1700 y 1500 cm^{-1} proporciona información relevante sobre el componente proteico. La banda Amida I, localizada principalmente entre 1700 y 1600 cm^{-1}, se origina predominantemente por el estiramiento C=O del enlace peptídico y es particularmente sensible al entorno conformacional y a la estructura secundaria de las proteínas; por su parte, Amida II presenta una contribución importante de la flexión N–H y del estiramiento C–N (Usoltsev et al., 2019). La presencia y modificación de estas regiones en las formulaciones es congruente con la creciente participación del componente proteico derivado de la incorporación de ayocote y con las

transformaciones que las proteínas pueden experimentar durante el procesamiento térmico. Garcia-Valle et al. (2021), en una matriz cereal y leguminosa, observaron modificaciones en las características estructurales de las proteínas y en sus interacciones dentro de la matriz al incorporar harina de garbanzo, evidenciando que la adición de una leguminosa puede alterar la organización del sistema proteína y almidón.

No obstante, las modificaciones observadas en la región de Amida I no permiten establecer por sí solas una transición específica entre α-hélices, hojas β, giros β u otras estructuras secundarias. La asignación de estos componentes requiere procedimientos espectrales específicos, como segunda derivada y deconvolución de la región de Amida I, que permiten resolver bandas superpuestas (Usoltsev et al., 2019). Además, en matrices ricas en almidón debe considerarse que alrededor de 1640–1650 cm^{-1} puede existir contribución de la vibración de flexión H–O–H del agua asociada, por lo que esta región no puede atribuirse exclusivamente a las proteínas. En consecuencia, los cambios observados en 1700–1500 cm^{-1} se interpretan de manera general como modificaciones del entorno molecular de la fracción proteica y de sus interacciones con otros componentes de la matriz, sin asignar cambios conformacionales específicos.

La región de 1200–900 cm^{-1} constituye uno de los segmentos más informativos de los espectros para evaluar la fracción polisacarídica. En esta región predominan vibraciones relacionadas con enlaces C–O, C–O–C y C–O–H de los carbohidratos y, particularmente en almidones, las bandas próximas a 1047, 1022 y 995 cm^{-1} son sensibles a su organización molecular de corto alcance. La señal alrededor de 1047 cm^{-1} se ha relacionado con estructuras relativamente ordenadas, mientras que la región próxima a 1022 cm^{-1} presenta una mayor contribución de dominios desordenados o amorfos; la banda cercana a 995 cm^{-1} se ha asociado con la organización de las hélices hidratadas del almidón (Hong et al., 2021; Sofi et al., 2023). Estas características espectrales han permitido utilizar relaciones como 1047/1022 y 995/1022 cm^{-1} como indicadores de organización molecular de corto alcance.

En una matriz particularmente cercana a la del presente estudio, Neder-Suárez et al. (2021) utilizaron las señales de esta región para evaluar modificaciones estructurales en botanas de tercera generación elaboradas con maíz azul y frijol negro, observando cambios después del procesamiento compatibles con una reorganización de la fracción amilácea. De manera similar, (Navarro Cortez et al. (2016) relacionaron las modificaciones observadas mediante FTIR con cambios estructurales producidos durante el procesamiento de matrices elaboradas con maíz azul. Estos antecedentes respaldan que las

variaciones observadas alrededor de 1045 cm^{-1} en las formulaciones del presente estudio sean compatibles con modificaciones en el entorno y organización molecular de los polisacáridos como consecuencia de la transformación de la matriz. No obstante, dado que en el presente estudio no se calcularon las relaciones entre las bandas de 1047, 1022 y 995 cm^{-1}, los espectros no permiten cuantificar el grado de orden molecular ni establecer directamente una disminución o incremento de éste.

Esta distinción resulta importante al comparar ATR-FTIR con los resultados obtenidos mediante XRD. Mientras que XRD permitió identificar modificaciones en el orden cristalino de largo alcance, ATR-FTIR aporta información complementaria sobre el entorno molecular y la organización de corto alcance de los componentes de la matriz (Hong et al., 2021). En este sentido, la menor definición de las reflexiones características del patrón cristalino tipo A observada mediante XRD y las modificaciones de la región 1200–900 cm^{-1} mediante ATR-FTIR representan fenómenos relacionados, pero no equivalentes. La conservación de bandas características de los polisacáridos después del procesamiento tampoco implica que el almidón haya mantenido intacta su organización original, ya que pueden ocurrir modificaciones importantes en el orden molecular sin que necesariamente aparezcan nuevos grupos funcionales. Estudios de matrices sometidas a extrusión han mostrado precisamente que los perfiles FTIR pueden conservar las principales bandas características mientras cambian los indicadores de organización de corto alcance del almidón (Ren et al., 2023).

El procesamiento aplicado en el presente estudio comprendió tanto la extrusión como la posterior expansión por microondas, por lo que las modificaciones observadas mediante ATR-FTIR corresponden al estado estructural resultante de ambas etapas y no pueden atribuirse experimentalmente a una de ellas de manera aislada. Durante la extrusión, la combinación de temperatura, humedad y esfuerzo de corte favorece la pérdida de la organización granular del almidón, la modificación de interacciones intermoleculares y cambios conformacionales y de agregación de las proteínas; posteriormente, el calentamiento por microondas puede promover nuevas modificaciones mediante el rápido calentamiento del agua y la movilidad de las cadenas poliméricas (Hong et al., 2021; Ren et al., 2023). En este sentido, C. Liu et al. (2025) demostró que el tratamiento con microondas puede modificar simultáneamente la organización de corto y largo alcance del almidón, involucrando tanto desestructuración como reorganización molecular bajo diferentes condiciones de tratamiento. Aunque dicho estudio se realizó con almidón de castaña y no con una

matriz cereal y leguminosa extruida, proporciona una posible explicacion para considerar que la expansión por microondas también puede contribuir al estado estructural finalmente detectado mediante ATR-FTIR.

La proporción de *P. coccineus* constituye además un factor relevante para interpretar las diferencias espectrales entre las formulaciones. El incremento de ayocote modificó simultáneamente las proporciones relativas de almidón, proteína, fibra y otros constituyentes, generando matrices con diferente composición y posibilidades de interacción intermolecular. Por ello, las variaciones observadas en las regiones de amidas y polisacáridos no deben interpretarse únicamente como diferentes grados de transformación ocasionados por el procesamiento, sino también como consecuencia de la contribución relativa de cada componente y de las interacciones desarrolladas entre ellos. En sistemas cereal y leguminosa, las proteínas pueden interactuar con el almidón mediante enlaces de hidrógeno, asociaciones hidrofóbicas y otras interacciones no covalentes, modificando la organización de la matriz y la accesibilidad de los grupos funcionales detectados espectroscópicamente (Garcia-Valle et al., 2021; Neder-Suárez et al., 2024). En consecuencia, el perfil ATR-FTIR final representa la respuesta integrada de una matriz multicomponente y no la transformación independiente de almidón o proteína.

En conjunto, los resultados obtenidos mediante ATR-FTIR complementaron la información estructural proporcionada por SEM y XRD. La pérdida de la organización granular y la formación de una matriz continua observadas mediante SEM evidenciaron modificaciones a escala morfológica; los cambios en las reflexiones cristalinas detectados mediante XRD mostraron alteraciones en el orden de largo alcance; mientras que las variaciones observadas mediante ATR-FTIR en las regiones asociadas con proteínas y polisacáridos evidenciaron modificaciones en el entorno molecular de estos biopolímeros. En conjunto, estas técnicas muestran que la incorporación de *P. coccineus* y el procesamiento mediante extrusión seguido de expansión por microondas produjeron modificaciones estructurales a diferentes niveles de organización de la matriz. Este comportamiento es consistente con lo descrito previamente en sistemas extruidos de maíz azul y mezclas cereal y leguminosa (Navarro Cortez et al., 2016; Neder-Suárez et al., 2021, 2024).

7.7 Objetivo particular 6: Evaluación sensorial

7.7.1 Aceptabilidad sensorial

Los resultados de la evaluación sensorial de las botanas elaboradas con maíz azul y diferentes niveles de sustitución con frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*) se presentan en la **Figura 17.** Debido a que los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad, el efecto de la formulación sobre los atributos sensoriales se evaluó mediante la prueba no paramétrica de Friedman.

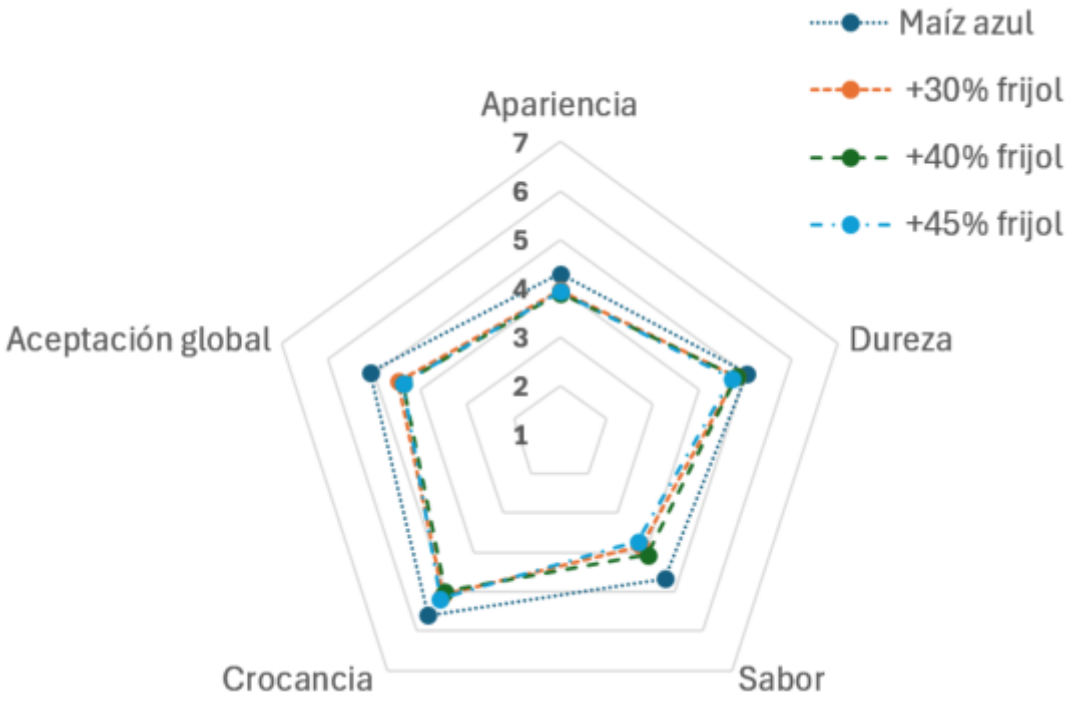


Figura 17. Perfil sensorial de botanas de tercera generación expandidas por microondas, elaboradas con maíz azul y diferentes niveles de sustitución con *Phaseolus coccineus* (30, 40 y 45%).

Se detectaron diferencias significativas entre formulaciones para apariencia ($\chi^2(3) = 9.341$, $p = 0.025$), sabor ($\chi^2(3) = 30.224$, $p < 0.001$), crujencia ($\chi^2(3) = 18.079$, $p < 0.001$) y aceptabilidad global ($\chi^2(3) = 27.150$, $p < 0.001$), mientras que la dureza percibida no presentó diferencias significativas ($\chi^2(3) = 3.475$, $p = 0.324$). Las comparaciones múltiples mediante la prueba de rangos con signo de Wilcoxon con corrección de Bonferroni mostraron que las formulaciones con frijol obtuvieron puntuaciones significativamente menores que el control para sabor y aceptabilidad global ($p < 0.0083$). Para la crujencia, únicamente las formulaciones con 30 y 40% de frijol difirieron del control, mientras que la formulación con 45% no mantuvo diferencias significativas tras la corrección ($p = 0.011$). En contraste, la apariencia no mostró diferencias en las comparaciones pareadas después de la corrección

de Bonferroni ($p > 0.0083$). Asimismo, no se detectaron diferencias significativas entre las formulaciones con 30, 40 y 45% de frijol para ninguno de los atributos evaluados.

La incorporación de *Phaseolus coccineus* redujo las puntuaciones de sabor y aceptabilidad global respecto al control de maíz azul. De manera similar, se ha documentado que la incorporación de ingredientes funcionales puede modificar la respuesta sensorial al alterar el perfil de sabor y aroma del producto, aun cuando mejora su calidad nutricional (Neder-Suárez et al., 2024). En contraste, otros ingredientes vegetales, como la calabaza deshidratada o el bagazo de naranja, han mantenido o incluso incrementado la aceptabilidad al aportar atributos sensoriales favorables, lo que evidencia que la respuesta del consumidor depende de la naturaleza del ingrediente incorporado y no únicamente del proceso de extrusión (Delgado-Nieblas, et al., 2018; Navarro-Cortez et al., 2018). En este estudio, la ausencia de diferencias entre las formulaciones con 30, 40 y 45% de frijol sugiere que incrementos adicionales de sustitución dentro de este intervalo no modifican de forma apreciable la percepción del consumidor.

La menor puntuación de crujencia fue consistente con las modificaciones físicas previamente observadas, particularmente en el índice de expansión, la densidad aparente y las propiedades texturales. La percepción de crujencia depende de la formación de una estructura porosa y del comportamiento mecánico del producto durante la fractura, ambos estrechamente relacionados con el grado de expansión alcanzado durante el procesamiento (Delgado-Nieblas, et al., 2018; Moraru y Kokini, 2003). Sin embargo, la respuesta sensorial no siempre refleja la magnitud de las diferencias instrumentales. Liu et al. (2017) señalaron que algunos atributos texturales instrumentales y sensoriales presentan asociaciones consistentes, mientras que otros responden de manera independiente debido a la interacción del alimento durante la masticación. Esto permite interpretar que las modificaciones físicas inducidas por la formulación contribuyeron a la menor percepción de crujencia, mientras que las diferencias instrumentales de dureza no fueron percibidas por los consumidores.

En conjunto, los resultados indican que la incorporación de *Phaseolus coccineus* permitió mejorar el perfil nutrimental de las botanas sin comprometer completamente su aceptación. Aunque el control obtuvo las puntuaciones más altas de sabor y aceptabilidad, las formulaciones con 30–45% de frijol mostraron respuestas sensoriales similares entre sí, lo que identifica este intervalo como una alternativa viable para incrementar el valor nutricional manteniendo una aceptabilidad adecuada.

7.7.2 Preferencia del consumidor e intención de consumo y compra

La formulación elaborada exclusivamente con maíz azul fue seleccionada como la muestra preferida por 55.6% de los consumidores, seguida de la formulación con 40% de frijol, elegida por 22.2%. Las formulaciones con 30 y 45% de *Phaseolus coccineus* fueron preferidas por 12.3 y 9.9% de los participantes, respectivamente (**Apéndice 11.11**). La distribución de las preferencias difirió significativamente de una distribución uniforme $\chi^2(3) = 43.10$, $p < 0.001$, lo que indica que las muestras no fueron seleccionadas con la misma frecuencia. No obstante, al considerar conjuntamente las tres formulaciones adicionadas con frijol, estas concentraron 44.4% de las preferencias, proporción que no difirió significativamente de la obtenida por el control de maíz azul en una comparación binomial ($p = 0.374$).

Después de recibir información sobre la composición nutrimental de las botanas, los consumidores reportaron una respuesta moderadamente favorable. El cambio de percepción presentó una media de 3.98 ± 1.50, mientras que las intenciones de consumo y compra alcanzaron valores de 4.09 ± 1.40 y 3.88 ± 1.47, respectivamente. En las tres variables, la mediana fue de 5 y el rango intercuartílico de 4–6. Las respuestas positivas, definidas como puntuaciones de 5 a 7, representaron 67.9% para el cambio de percepción, 71.6% para la intención de consumo y 66.7% para la intención de compra. La distribución completa de frecuencias se presenta en el **Apéndice 11.11.**

La prueba de Friedman no mostró diferencias significativas entre el cambio de percepción y las intenciones de consumo y compra $\chi^2(2) = 2.63,\ p = 0.268$. Sin embargo, se observó una correlación positiva fuerte entre la intención de consumo y la intención de compra ($\rho = 0.886$, $p < 0.001$). Asimismo, el cambio de percepción se correlacionó positivamente con la intención de consumo ($\rho = 0.330$, $p = 0.003$) y con la intención de compra ($\rho = 0.368$, $p < 0.001$).

A pesar de que la formulación elaborada exclusivamente con maíz azul fue la más seleccionada por los consumidores, las formulaciones enriquecidas con *Phaseolus coccineus* concentraron conjuntamente el 44.4% de las preferencias, lo que sugiere que la incorporación de hasta 45% de frijol no comprometió sustancialmente su aceptación. Este resultado adquiere relevancia, ya que la incorporación de leguminosas suele modificar atributos sensoriales que limitan la aceptabilidad de este tipo de productos. En este sentido, Escobedo y Mojica (2021) señalan que el éxito de las botanas elaboradas con leguminosas depende del equilibrio entre el valor nutrimental y la aceptación sensorial, mientras que Han et al. (2010) identificaron al sabor como el principal determinante de la

aceptabilidad global. Asimismo, Neder-Suárez et al. (2021) demostraron que la incorporación de leguminosas en botanas extruidas mejora su perfil nutrimental, aunque mantener una adecuada aceptación sensorial continúa siendo uno de los principales desafíos tecnológicos. En términos generales, estos antecedentes respaldan que las formulaciones desarrolladas mantuvieron una aceptación competitiva, indicando que la mejora del perfil nutrimental pudo alcanzarse sin comprometer proporcionalmente la aceptación del consumidor. Asimismo, la fuerte correlación positiva entre la intención de consumo y la intención de compra ($\rho = 0.886$; $p < 0.001$) sugiere que la aceptación trascendió la evaluación hedónica inmediata. Aunque el diseño del estudio no permite atribuir un efecto causal a la información nutrimental proporcionada, los resultados coinciden con la evidencia reciente de que la aceptación de alimentos elaborados con leguminosas también está influenciada por la percepción de sus beneficios para la salud y la sostenibilidad (Arvisenet et al., 2026), respaldando el potencial de *Phaseolus coccineus* para el desarrollo de botanas con mayor valor nutricional y buena aceptación.

En conjunto, los resultados de la evaluación sensorial mostraron que la incorporación de hasta 45% de *Phaseolus coccineus* permitió obtener botanas con una aceptabilidad comparable a la del control en varios atributos sensoriales. Aunque la formulación de maíz azul fue la preferida por la mayoría de los consumidores, las formulaciones enriquecidas con frijol concentraron cerca de la mitad de las preferencias y mostraron una respuesta favorable en términos de percepción, intención de consumo e intención de compra, respaldando el potencial de aceptación del producto.

VIII. CONCLUSIONES

1. Se establecieron formulaciones de botanas de tercera generación con hasta 45% de frijol ayocote, manteniendo condiciones adecuadas para su extrusión y expansión por microondas.
2. La incorporación de frijol ayocote incrementó el contenido de proteína, fibra dietética y lisina, mejorando el perfil nutrimental de las formulaciones; sin embargo, una mayor proporción de leguminosa no se tradujo necesariamente en una mejora proporcional de todas las propiedades evaluadas.
3. La extrusión incrementó la digestibilidad aparente *in vitro* de la materia seca, pero disminuyó la digestibilidad proteica y el IV-PDCAAS, evidenciando respuestas diferenciadas de la matriz al procesamiento.
4. La formulación y el procesamiento condicionaron el contenido de compuestos fenólicos, antocianinas y ácido fítico, así como la capacidad antioxidante *in vitro*. Las antocianinas fueron particularmente sensibles a la extrusión, mientras que DPPH y ABTS presentaron respuestas diferenciadas después de la digestión *in vitro*.
5. Los análisis mediante SEM, XRD, ATR-FTIR y SDS-PAGE evidenciaron que la extrusión produjo pérdida de la organización granular y del orden cristalino característico de las materias primas, acompañada de modificaciones moleculares y proteicas como consecuencia de la formulación y el procesamiento
6. Las formulaciones con 30, 40 y 45% de frijol ayocote presentaron aceptación sensorial favorable, demostrando la viabilidad de incorporar proporciones elevadas de la leguminosa en el producto final.
7. Considerando conjuntamente el perfil nutrimental, desempeño tecnofuncional y aceptación sensorial, la formulación con 30% de frijol ayocote presentó el mejor balance integral, mientras que mayores incorporaciones permitieron incrementar el enriquecimiento nutrimental con modificaciones más pronunciadas en las propiedades del producto.
8. En conjunto, el uso combinado de maíz azul y frijol ayocote permitió desarrollar una botana de tercera generación nutricionalmente enriquecida, tecnológicamente viable y sensorialmente aceptable.

IX. PERSPECTIVAS

1. Caracterizar el perfil de antocianinas y compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD o LC-MS, para identificar y cuantificar compuestos individuales y evaluar su estabilidad durante el procesamiento y la digestión *in vitro*.
2. Ampliar la evaluación de la calidad proteica mediante metodologías que consideren las fracciones proteicas insolubles y agregadas durante el procesamiento, para estimar con mayor precisión la digestibilidad y los indicadores de calidad proteica.
3. Profundizar en la relación entre las modificaciones estructurales y la digestibilidad proteica, mediante técnicas complementarias que permitan evaluar desnaturalización, agregación e interacción de las proteínas con otros componentes de la matriz.
4. Optimizar la formulación y las condiciones de procesamiento, considerando el balance entre enriquecimiento nutrimental, propiedades tecnofuncionales y aceptación sensorial.
5. Ampliar la evaluación sensorial mediante segmentación de consumidores y modelos de preferencia, con el fin de identificar formulaciones con mayor potencial de transferencia tecnológica.
6. Evaluar el potencial funcional de las formulaciones seleccionadas mediante modelos biológicos *in vitro* y, posteriormente, estudios *in vivo* que permitan determinar efectos fisiológicos específicos.
7. Evaluar la factibilidad de escalamiento y la estabilidad durante el almacenamiento de las formulaciones seleccionadas, considerando sus propiedades fisicoquímicas, tecnofuncionales y sensoriales.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

1. La estimación de la calidad proteica estuvo condicionada por la recuperación de las fracciones proteicas solubles, por lo que los resultados de digestibilidad e IV-PDCAAS deben interpretarse considerando las posibles modificaciones de solubilidad inducidas por el procesamiento.
2. La caracterización de antocianinas y compuestos fenólicos se realizó mediante determinaciones globales, sin identificación y cuantificación individual por técnicas cromatográficas.
3. Los ensayos DPPH y ABTS representan capacidad antioxidante *in vitro* y no permiten inferir directamente bioactividad, biodisponibilidad o efectos fisiológicos.
4. La ausencia de modelos biológicos limita la interpretación de los resultados a las características químicas, nutrimentales, tecnofuncionales, estructurales y sensoriales evaluadas.
5. Las asociaciones entre las modificaciones estructurales y las propiedades tecnofuncionales o de digestibilidad son principalmente interpretativas y no establecen relaciones causales directas.

X. BIBLIOGRAFÍA

Acurio, L., Salazar, D., García-Segovia, P., Martínez-Monzó, J., y Igual, M. (2023). Third-Generation Snacks Manufactured from Andean Tubers and Tuberous Root Flours: Microwave Expansion Kinetics and Characterization. *Foods*, *12*(11). https://doi.org/10.3390/foods12112168

Adepeju, A. B., Aluko, D. M., Olugbuyi, A. O., Oyinloye, A. M., y Adeniran, O. O. (2024). Assessment of mineral content, techno-functional properties and colour of an extruded breakfast cereals using yellow maize, sorghum and date palm. *Heliyon*, *10*(6), e27650. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e27650

Aguilar, A. (2021, agosto 23). Pandemia y etiquetado no hicieron ni cosquillas a las botanas en México. *Goula*. https://goula.lat/pandemia-y-etiquetado-no-hicieron-ni-cosquillas-a-las-botanas-en-mexico/

Aguilar-Palazuelos, E., De J. Zazueta-Morales, J., y Martínez-Bustos, F. (2006). Preparation of High-Quality Protein-Based Extruded Pellets Expanded by Microwave Oven. *Cereal Chemistry*, *83*(4), 363–369. https://doi.org/10.1094/CC-83-0363

Al Faruq, A., Farahnaky, A., Torley, P. J., Buckow, R., Eri, R., y Majzoobi, M. (2025). Sustainable approaches to boost soluble dietary fibre in foods: A path to healthier foods. *Food Hydrocolloids*, *162*, 110880. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.110880

Alam, M. S., Kaur, J., Khaira, H., y Gupta, K. (2016). Extrusion and Extruded Products: Changes in Quality Attributes as Affected by Extrusion Process Parameters: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *56*(3), 445–473. https://doi.org/10.1080/10408398.2013.779568

Alcázar-Valle, M., García-Morales, S., Mojica, L., Morales-Hernández, N., Sánchez-Osorio, E., Flores-López, L., Enríquez-Vara, J. N., y Lugo-Cervantes, E. (2021). Nutritional, Antinutritional Compounds and Nutraceutical Significance of Native Bean Species (*Phaseolus* spp.) of Mexican Cultivars. *Agriculture*, *11*(11), 1031. https://doi.org/10.3390/agriculture11111031

Alcázar-Valle, M., Lugo-Cervantes, E., Mojica, L., Morales-Hernández, N., Reyes-Ramírez, H., Enríquez-Vara, J. N., y García-Morales, S. (2020). Bioactive Compounds, Antioxidant Activity, and Antinutritional Content of Legumes: A Comparison between Four *Phaseolus* Species. *Molecules*, *25*(15), 3528. https://doi.org/10.3390/molecules25153528

Allan, J. L., Johnston, M., y Campbell, N. (2015). Snack purchasing is healthier when the cognitive demands of choice are reduced: A randomized controlled trial. *Health Psychology*, *34*(7), 750–755. https://doi.org/10.1037/hea0000173

Alli, I., y Baker, B. E. (1981). Constitution of leguminous seeds. A note on protein-phytic acid interactions during isolation of acid-soluble protein from *Phaseolus* beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *32*(6), 588–592. https://doi.org/10.1002/jsfa.2740320610

Alonso, R., Aguirre, A., y Marzo, F. (2000). Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chemistry*, *68*(2), 159–165. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00169-7

Alonso, R., Orúe, E., Zabalza, M. J., Grant, G., y Marzo, F. (2000). Effect of extrusion cooking on structure and functional properties of pea and kidney bean proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(3), 397–403. https://doi.org/10.1002/1097-0010(200002)80:3%3C397::AID-JSFA542%3E3.0.CO;2-3

Alsmeyer, R. H., Cunningham, A. E., y Happich, M. L. (1974). Equations predict PER from amino acid analysis. *Food Technology*. https://www.semanticscholar.org/paper/Equations-predict-PER-from-amino-acid-analysis-Alsmeyer-

Cunningham/2eaac3e44cac29249254d7ff7a5ba918a7be1960
Altan, A., McCarthy, K. L., y Maskan, M. (2009a). Effect of extrusion process on antioxidant activity, total phenolics and β-glucan content of extrudates developed from barley-fruit and vegetable by-products. *International Journal of Food Science y Technology*, *44*(6), 1263–1271. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.01956.x
Altan, A., McCarthy, K. L., y Maskan, M. (2009b). Effect of screw configuration and raw material on some properties of barley extrudates. *Journal of Food Engineering*, *92*(4), 377–382. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.12.010
Alvarado-López, A. N., Gómez-Oliván, L. M., Heredia, J. B., Baeza-Jiménez, R., Garcia-Galindo, H. S., y Lopez-Martinez, L. X. (2019). Nutritional and bioactive characteristics of Ayocote bean (*Phaseolus* coccienus L.): An underutilized legume harvested in Mexico. *CyTA - Journal of Food*, *17*(1), 199–206. https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1571530
Alvarez-Jubete, L., Arendt, E. K., y Gallagher, E. (2010). Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. *Trends in Food Science y Technology*, *21*(2), 106–113. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.10.014
Alvarez-Martinez, L., Kondury, K. p., y Harper, J. m. (1988). A General Model for Expansion of Extruded Products. *Journal of Food Science*, *53*(2), 609–615. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb07768.x
Amat, T., Assifaoui, A., Schmitt, C., y Saurel, R. (2023). Importance of binary and ternary complex formation on the functional and nutritional properties of legume proteins in presence of phytic acid and calcium. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *63*(33), 12036–12058. https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2098247
Anderson, R. A., Conway, H. F., y Peplinski, A. J. (1970). Gelatinization of Corn Grits by Roll Cooking, Extrusion Cooking and Steaming. *Starch - Stärke*, *22*(4), 130–135. https://doi.org/10.1002/star.19700220408
AOAC INTERNATIONAL. (2023). Official Methods of Analysis, 22nd Edition (2023). *AOAC International*. https://www.aoac.org/official-methods-of-analysis/
Aquino-Bolaños, E. N., Garzón-García, A. K., Alba-Jiménez, J. E., Chávez-Servia, J. L., Vera-Guzmán, A. M., Carrillo-Rodríguez, J. C., y Santos-Basurto, M. A. (2021). Physicochemical Characterization and Functional Potential of *Phaseolus* vulgaris L. and *Phaseolus* coccineus L. Landrace Green Beans. *Agronomy*, *11*(4), 803. https://doi.org/10.3390/agronomy11040803
Arvisenet, G., Chambaron, S., Hernandez-Casiano, Z., Gerard-Simonin, H., Tanguy, C., Hugol-Gential, C., Saint-Eve, A., y Salles, C. (2026). ‘ PULSE FICTION ’: Development of Slightly Processed Pulse-Based Foods and Recipes to Meet the Needs of Consumers and the Agricultural Sector and Improve Food Sustainability. *Nutrition Bulletin*, *51*(1), 104–119. https://doi.org/10.1111/nbu.70041
Ayala-Rodríguez, V. A., López-Hernández, A. A., López-Cabanillas Lomelí, M., González-Martínez, B. E., y Vázquez-Rodríguez, J. A. (2022). Nutritional quality of protein flours of fava bean (*Vicia faba* L.) and *in vitro* digestibility and bioaccesibility. *Food Chemistry: X*, *14*, 100303. https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100303
Bastami, F., Zamani-Alavijeh, F., y Mostafavi, F. (2019). Factors behind healthy snack consumption at school among high-school students: A qualitative study. *BMC Public Health*, *19*(1), 1342. https://doi.org/10.1186/s12889-019-7656-6
Bio-Rad Laboratories. (2014). *Mini-PROTEAN® 3 Cell Instruction Manual*. Life Science Group.
Blandino, M., Bresciani, A., Locatelli, M., Loscalzo, M., Travaglia, F., Vanara, F., y Marti, A. (2023). Pulse type and extrusion conditions affect phenolic profile and physical properties of extruded products. *Food Chemistry*, *403*, 134369. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134369

Bondet, V., Brand-Williams, W., y Berset, C. (1997). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH.Free Radical Method. *LWT - Food Science and Technology*, *30*(6), 609–615. https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0240

Bosch, G. (2022). 129 Protein and Amino Acid Modifications During Extrusion. *Journal of Animal Science*, *100*(Suppl 3), 61–62. https://doi.org/10.1093/jas/skac247.121

Bouvier, J.-M., y Campanella, O. H. (2014). *Extrusion Processing Technology: Food and Non-Food Biomaterials | Wiley*. Wiley.Com. https://www.wiley.com/en-us/Extrusion+Processing+Technology%3A+Food+and+Non+Food+Biomaterials-p-9781118541685

Boye, J., Zare, F., y Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, *43*(2), 414–431. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.003

Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., … Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, *14*(4), 991–1014. https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1

Capistrán-Carabarin, A., Aquino-Bolaños, E. N., García-Díaz, Y. D., Chávez-Servia, J. L., Vera-Guzmán, A. M., y Carrillo-Rodríguez, J. C. (2019). Complementarity in Phenolic Compounds and the Antioxidant Activities of *Phaseolus* coccineus L. and P. vulgaris L. Landraces. *Foods*, *8*(8), 295. https://doi.org/10.3390/foods8080295

Carbonaro, M. (2006). 7S globulins from *Phaseolus* vulgaris L.: Impact of structural aspects on the nutritional quality. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *70*(11), 2620–2626. https://doi.org/10.1271/bbb.60203

Cazarin, C. B. B., Bicas, J. L., Pastore, G. M., y Marostica Junior, M. R. (2022). Chapter 1—Introduction. En C. B. B. Cazarin, J. L. Bicas, G. M. Pastore, y M. R. Marostica Junior (Eds.), *Bioactive Food Components Activity in Mechanistic Approach* (pp. 1–3). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823569-0.00004-7

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD). (2025, febrero 27). El frijol: Una tradición saludable que está de regreso. *Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD)*. https://www.ciad.mx/el-frijol-una-tradicion-saludable-que-esta-de-regreso/

Chen, G.-L., Chen, S.-G., Chen, F., Xie, Y.-Q., y Han, M.-D. (2016). Nutraceutical potential and antioxidant benefits of selected fruit seeds subjected to an in vitro digestion. *Journal of Functional Foods*, 15. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.003

Chen, G.-L., Chen, S.-G., Zhao, Y.-Y., Luo, C.-X., Li, J., y Gao, Y.-Q. (2014). Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after *in vitro* digestion. *Industrial Crops and Products*, *57*, 150–157. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.03.018

Cheryan, M., y Rackis, J. J. (1980). Phytic acid interactions in food systems. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *13*(4), 297–335. https://doi.org/10.1080/10408398009527293

Corzo-Ríos, L. J., Sánchez-Chino, X. M., Cardador-Martínez, A., Martínez-Herrera, J., y Jiménez-Martínez, C. (2020). Effect of cooking on nutritional and non-nutritional compounds in two species of *Phaseolus* (*P. vulgaris* and *P. coccineus*) cultivated in Mexico. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, *20*, 100206. https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100206

Cotacallapa-Sucapuca, M., Vega, E. N., Maieves, H. A., Berrios, J. D. J., Morales, P., Fernández-Ruiz, V., y Cámara, M. (2021). Extrusion Process as an Alternative to Improve Pulses Products Consumption. A Review. *Foods*, *10*(5), 1096.

https://doi.org/10.3390/foods10051096
Cueto, M., Farroni, A., Rodríguez, S. D., Schoenlechner, R., Schleining, G., y Del Pilar Buera, M. (2018). Assessing Changes in Enriched Maize Flour Formulations After Extrusion by Means of FTIR, XRD, and Chemometric Analysis. *Food and Bioprocess Technology*, *11*(8), 1586–1595. https://doi.org/10.1007/s11947-018-2113-6
Daneluti, A. L. M., y Matos, J. D. R. (2013). Study of thermal behavior of phytic acid. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *49*(2), 275–283. https://doi.org/10.1590/S1984-82502013000200009
Dashti, H. S., Scheer, F. A. J. L., Saxena, R., y Garaulet, M. (2019). Timing of Food Intake: Identifying Contributing Factors to Design Effective Interventions. *Advances in Nutrition*, *10*(4), 606–620. https://doi.org/10.1093/advances/nmy131
De Toledo, N. M. V., Rocha, L. C., Da Silva, A. G., y Canniatti Brazaca, S. G. (2013). Interaction and digestibility of phaseolin/polyphenol in the common bean. *Food Chemistry*, *138*(2–3), 776–780. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.079
Delgado-Andrade, C., Rufián-Henares, J. A., y Morales, F. J. (2007). Lysine availability is diminished in commercial fibre-enriched breakfast cereals. *Food Chemistry*, *100*(2), 725–731. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.031
Delgado-Nieblas, C., Aguilar-Palazuelos, E., Gallegos-Infante, A., Rocha-Guzmán, N., Zazueta-Morales, J., y Caro-Corrales, J. (2012). Characterization and Optimization of Extrusion Cooking for the Manufacture of Third-Generation Snacks with Winter Squash (Cucurbita moschata D.) Flour. *Cereal Chemistry*, *89*(1), 65–72. https://doi.org/10.1094/CCHEM-02-11-0016
Delgado-Nieblas, C. I., Zazueta-Morales, J. J., Aguilar-Palazuelos, E., Jacobo-Valenzuela, N., Aguirre-Tostado, F. S., Carrillo-López, A., Ruiz-Armenta, X. A., Telis-Romero, J., y Universidad Autónoma de Sinaloa. (2018). Physical, microstructural and sensory characteristics of extruded and microwave-expanded snacks added with dehydrated squash. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, *17*(3), 805–821. https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2018v17n3/Delgado
Delgado-Nieblas, C., Ruiz-Beltrán, K., Sánchez-Lizárraga, J., Zazueta-Morales, J. de J., Aguilar-Palazuelos, E., Carrillo-López, A., Camacho-Hernández, I. L., y Quintero-Ramos, A. (2019). Effect of extrusion on physicochemical, nutritional and antioxidant properties of breakfast cereals produced from bran and dehydrated naranjita pomace. *CyTA - Journal of Food*, *17*(1), 240–250. https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1566276
Di Domenico, M., Pinto, F., Quagliuolo, L., Contaldo, M., Settembre, G., Romano, A., Coppola, M., Ferati, K., Bexheti-Ferati, A., Sciarra, A., Nicoletti, G. F., Ferraro, G. A., y Boccellino, M. (2019). The Role of Oxidative Stress and Hormones in Controlling Obesity. *Frontiers in Endocrinology*, *10*, 540. https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00540
Ding, Q.-B., Ainsworth, P., Tucker, G., y Marson, H. (2005). The effect of extrusion conditions on the physicochemical properties and sensory characteristics of rice-based expanded snacks. *Journal of Food Engineering*, *66*(3), 283–289. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.03.019
Dueñas, M., Martínez-Villaluenga, C., Limón, R. I., Peñas, E., y Frias, J. (2015). Effect of germination and elicitation on phenolic composition and bioactivity of kidney beans. *Food Research International*, *70*, 55–63. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.018
Duque-Estrada, P., Hardiman, K., Dam, A. B., Dodge, N., Dall Aaslyng, M., y Lykke Petersen, I. (2023). Protein blends and extrusion processing to improve the nutritional quality of plant proteins. *Food y Function*, *14*(16), 7361–7374. https://doi.org/10.1039/D2FO03912E

Escobedo, A., y Mojica, L. (2021). Pulse-based snacks as functional foods: Processing challenges and biological potential. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *20*(5), 4678–4702. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12809

Espinosa-Ramírez, J., Mariscal-Moreno, R. M., Chuck-Hernández, C., Serna-Saldivar, S. O., y Espiricueta-Candelaria, R. S. (2022). Effects of the substitution of wheat flour with raw or germinated ayocote bean (*Phaseolus coccineus*) flour on the nutritional properties and quality of bread. *Journal of Food Science*, *87*(9), 3766–3780. https://doi.org/10.1111/1750-3841.16263

FAO. (2013). *Dietary protein quality evaluation in human nutrition: Report of an FAO Expert Consultation [on Protein Quality Evaluation in Human Nutrition], 31 March - 2 April, 2011, Auckland, New Zealand*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Expert Consultation on Protein Quality Evaluation in Human Nutrition.

FAO. (2025). *Agricultural production statistics. 2010–2024*. FAO. https://doi.org/10.4060/cd8035en

FAOSTAT statistical database. (2023). *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*. https://www.fao.org/faostat/en/#home

Félix-Medina, J. V., Gutiérrez-Dorado, R., López-Valenzuela, J. A., López-Ángulo, G., Quintero-Soto, M. F., Perales-Sánchez, J. X. K., y Montes-Ávila, J. (2021). Nutritional, antioxidant and phytochemical characterization of healthy ready-to-eat expanded snack produced from maize/common bean mixture by extrusion. *LWT*, *142*, 111053. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111053

Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura [FIRA]. (2024). *Panorama agroalimentario 2024: Maíz*. Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial. https://www.fira.gob.mx

Fileppi, M., Galasso, I., Tagliabue, G., Daminati, M. G., Campion, B., Doria, E., y Sparvoli, F. (2010). Characterisation of structural genes involved in phytic acid biosynthesis in common bean (*Phaseolus* vulgaris L.). *Molecular Breeding*, *25*(3), 453–470. https://doi.org/10.1007/s11032-009-9344-1

Floegel, A., Kim, D.-O., Chung, S.-J., Koo, S. I., y Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, *24*(7), 1043–1048. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008

Flores-Calderón, A. M. D., Luna, H., Escalona-Buendía, H. B., y Verde-Calvo, J. R. (2017). Chemical characterization and antioxidant capacity in blue corn (*Zea mays* L.) malt beers: Chemical characterization and antioxidant capacity in blue corn (*Zea mays* L.) malt beers. *Journal of the Institute of Brewing*, *123*(4), 506–518. https://doi.org/10.1002/jib.444

Flory, J., Xiao, R., Li, Y., Dogan, H., Talavera, M. J., y Alavi, S. (2023). Understanding Protein Functionality and Its Impact on Quality of Plant-Based Meat Analogues. *Foods*, *12*(17), 3232. https://doi.org/10.3390/foods12173232

Fu, X., Li, W., Zhang, T., Li, H., Zang, M., y Liu, X. (2024). Effect of extrusion on the protein structure and digestibility of extruded soybean protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *104*(4), 2225–2232. https://doi.org/10.1002/jsfa.13109

Gálvez Ranilla, L. (2020). The Application of Metabolomics for the Study of Cereal Corn (Zea mays L.). *Metabolites*, *10*(8), 300. https://doi.org/10.3390/metabo10080300

Gao, Y., Shang, C., Maroof, M. A. S., Biyashev, R. M., Grabau, E. A., Kwanyuen, P., Burton, J. W., y Buss, G. R. (2007). A Modified Colorimetric Method for Phytic Acid Analysis in Soybean. *Crop Science*, *47*(5), 1797–1803. https://doi.org/10.2135/cropsci2007.03.0122

Garcia-Valle, D. E., Bello-Pérez, L. A., Agama-Acevedo, E., y Alvarez-Ramirez, J. (2021). Structural characteristics and *in vitro* starch digestibility of pasta made with durum wheat semolina and

chickpea flour. *LWT*, *145*, 111347. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111347
Gimeno, E., Moraru, C. I., y Kokini, J. L. (2004). Effect of Xanthan Gum and CMC on the Structure and Texture of Corn Flour Pellets Expanded by Microwave Heating. *Cereal Chemistry*, *81*(1), 100–107. https://doi.org/10.1094/CCHEM.2004.81.1.100
Giusti, M. M., y Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, *00*(1), F1.2.1-F1.2.13. https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00
González-Cruz, L., Valadez-Vega, C., Juárez-Goiz, J. M. S., Flores-Martínez, N. L., Montañez-Soto, J. L., y Bernardino-Nicanor, A. (2022). Partial Purification and Characterization of the Lectins of Two Varieties of *Phaseolus coccineus* (Ayocote Bean). *Agronomy*, *12*(3), 716. https://doi.org/10.3390/agronomy12030716
Grasso, S. (2020). Extruded snacks from industrial by-products: A review. *Trends in Food Science y Technology*, *99*, 284–294. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.012
Gu, B.-J., Kowalski, R. J., y Ganjyal, G. M. (2017). *Food extrusion processing: An overview*. *Fact Sheet (Washington State University. Extension); 264E*, 8. https://doi.org/99900502967701842
Guy, R. C. E. (2016). Extrusion Technologies. En *Encyclopedia of Food Grains* (pp. 268–273). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394437-5.00144-3
Han, J. (Jay), Janz, J. A. M., y Gerlat, M. (2010). Development of gluten-free cracker snacks using pulse flours and fractions. *Food Research International*, *43*(2), 627–633. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.015
Harakotr, B., Suriharn, B., Tangwongchai, R., Scott, M. P., y Lertrat, K. (2014). Anthocyanin, phenolics and antioxidant activity changes in purple waxy corn as affected by traditional cooking. *Food Chemistry*, *164*, 510–517. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.069
Herrera-Cazares, L. A., Luzardo-Ocampo, I., Ramírez-Jiménez, A. K., Gutiérrez-Uribe, J. A., Campos-Vega, R., y Gaytán-Martínez, M. (2021). Influence of extrusion process on the release of phenolic compounds from mango (Mangifera indica L.) bagasse-added confections and evaluation of their bioaccessibility, intestinal permeability, and antioxidant capacity. *Food Research International*, *148*, 110591. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110591
Hirth, M., Leiter, A., Beck, S. M., y Schuchmann, H. P. (2014). Effect of extrusion cooking process parameters on the retention of bilberry anthocyanins in starch based food. *Journal of Food Engineering*, *125*, 139–146. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.10.034
Hong, T., Yin, J.-Y., Nie, S.-P., y Xie, M.-Y. (2021). Applications of infrared spectroscopy in polysaccharide structural analysis: Progress, challenge and perspective. *Food Chemistry: X*, *12*, 100168. https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100168
Hossain, Md. S., Wazed, M. A., Shuvo, S. D., Sultana, Z., Akhter Preya, Mst. S., Khanom, H., Asha, S., Kamal, Md. M., Mondal, B. K., y Ahmad, T. (2025). Fortified and functional foods: Trends, innovations, and their public health impact for future nutrient enrichment. *Journal of Agriculture and Food Research*, *23*, 102275. https://doi.org/10.1016/j.jafr.2025.102275
Hoy, M. K., Sebastian, R. S., Goldman, J. D., y Moshfegh, A. J. (2024). Snack Consumption by U.S. Adults What We Eat in America, NHANES 2017—March 2020. Dietary Data Brief No. 53. En *FSRG Dietary Data Briefs*. United States Department of Agriculture (USDA). http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK603800/
Hülsebusch, L., Heyn, T. R., Amft, J., y Schwarz, K. (2025). Extrusion of plant proteins: A review of lipid and protein oxidation and their impact on functional properties. *Food Chemistry*, *470*, 142607. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.142607
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. (2020). *Maíz azul: Coloreando nuestras tradiciones*. gob.mx. http://www.gob.mx/inifap/articulos/maiz-azul-

coloreando-nuestras-tradiciones?idiom=es
Instituto Nacional de Salud Pública, y Secretaría de Salud. (2022). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2021 sobre Covid-19*.
Istvan, L. (2026). *GelAnalyzer.com*. GelAnalyzer 26.1. http://www.gelanalyzer.com/?i=1
Jacquet, N., Plompteux, A., Brostaux, Y., Malumba, P., Danthine, S., y Blecker, C. (2025). Study of the Impact of Operating Parameters and the Addition of Fat on the Physicochemical and Texture Properties of Extruded Snacks. *Foods*, *14*(8), 1307. https://doi.org/10.3390/foods14081307
Jozinović, A., Šubarić, D., Ačkar, Đ., Babić, J., Orkić, V., Guberac, S., y Miličević, B. (2021). Food Industry By-Products as Raw Materials in the Production of Value-Added Corn Snack Products. *Foods*, *10*(5), 946. https://doi.org/10.3390/foods10050946
Kan, L., Nie, S., Hu, J., Liu, Z., y Xie, M. (2016). Antioxidant activities and anthocyanins composition of seed coats from twenty-six kidney bean cultivars. *Journal of Functional Foods*, *26*, 622–631. https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.030
Kantanen, K., Chamlagain, B., Succi, V., Seppänen, S., Edelmann, M., Siitonen, A., Kemppinen, L., Kemppinen, A., Kangas, M., Varmanen, P., Piironen, V., y Jouppila, K. (2024). Fermentation of faba bean flour as a pre-treatment in high-moisture extrusion for simultaneous fortification of vitamin B12 and reduction of raffinose oligosaccharides in meat analogues. *Future Foods*, *10*, 100518. https://doi.org/10.1016/j.fufo.2024.100518
Kantrong, H., Klongdee, S., Jantapirak, S., Limsangouan, N., y Pengpinit, W. (2022). Effects of extrusion temperature and puffing technique on physical and functional properties of purpled third-generation snack after heat treatment. *Journal of Food Science and Technology*, *59*(6), 2209–2219. https://doi.org/10.1007/s13197-021-05234-x
Kaur, S., Sharma, S., Singh, B., y Dar, B. N. (2015). Effect of extrusion variables (temperature, moisture) on the antinutrient components of cereal brans. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(3), 1670–1676. https://doi.org/10.1007/s13197-013-1118-4
Khanal, R. c., Howard, L. r., y Prior, R. l. (2009). Procyanidin Content of Grape Seed and Pomace, and Total Anthocyanin Content of Grape Pomace as Affected by Extrusion Processing. *Journal of Food Science*, *74*(6), H174–H182. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01221.x
Kim, J.-T., Yi, G., Chung, I.-M., Son, B.-Y., Bae, H.-H., Go, Y. S., Ha, J. Y., Baek, S.-B., y Kim, S.-L. (2020). Timing and Pattern of Anthocyanin Accumulation during Grain Filling in Purple Waxy Corn (*Zea mays* L.) Suggest Optimal Harvest Dates. *ACS Omega*, *5*(25), 15702–15708. https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02099
Korus, J. K., Gumul, D., y Czechowska, K. (2006). *Effect of Extrusion on the Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Dry Beans of Phaseolus vulgaris L. 45*((2)), 139–146.
Kosović, I., Jukić, M., Jozinović, A., Ačkar, Đ., y Koceva Komlenić, D. (2016). Influence of chestnut flour addition on quality characteristics of pasta made on extruder and minipress. *Czech Journal of Food Sciences*, *34*(No. 2), 166–172. https://doi.org/10.17221/451/2015-CJFS
Kuhnen, S., Menel Lemos, P. M., Campestrini, L. H., Ogliari, J. B., Dias, P. F., y Maraschin, M. (2011). Carotenoid and anthocyanin contents of grains of Brazilian maize landraces: Carotenoids and anthocyanins of Brazilian maize landraces. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *91*(9), 1548–1553. https://doi.org/10.1002/jsfa.4346
Lacaille-Dubois, M.-A., y Melzig, M. (2016). Saponins: Current Progress and Perspectives. *Planta Medica*, *82*(18), 1495–1495. https://doi.org/10.1055/s-0042-119776
Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680–685. https://doi.org/10.1038/227680a0

Le Roux, L., Ménard, O., Chacon, R., Dupont, D., Jeantet, R., Deglaire, A., y Nau, F. (2020). Are Faba Bean and Pea Proteins Potential Whey Protein Substitutes in Infant Formulas? An In Vitro Dynamic Digestion Approach. *Foods*, *9*(3), 362. https://doi.org/10.3390/foods9030362

Le, T. N., Chiu, C.-H., y Hsieh, P.-C. (2020). Bioactive Compounds and Bioactivities of Brassica oleracea L. var. Italica Sprouts and Microgreens: An Updated Overview from a Nutraceutical Perspective. *Plants*, *9*(8), 946. https://doi.org/10.3390/plants9080946

Lee, E. Y., Lim, K. I., Lim, J., y Lim, S. (2000). Effects of Gelatinization and Moisture Content of Extruded Starch Pellets on Morphology and Physical Properties of Microwave-Expanded Products. *Cereal Chemistry*, *77*(6), 769–773. https://doi.org/10.1094/CCHEM.2000.77.6.769

Li, L., Liu, Y., Zou, X., He, J., Xu, X., Zhou, G., y Li, C. (2017). In vitro protein digestibility of pork products is affected by the method of processing. *Food Research International*, *92*, 88–94. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.024

Lin, L.-Z., Harnly, J. M., Pastor-Corrales, M. S., y Luthria, D. L. (2008). The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus* vulgaris L.). *Food Chemistry*, *107*(1), 399–410. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.038

Liu, C., Wen, X., Zhang, X., Wang, Z., Song, L., y Chang, X. (2025). Microwave treatment alters the multi-scale structure and digestibility of chestnut starch. *LWT*, *230*, 118244. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2025.118244

Liu, L., Li, S., Zhong, Y., Li, Y., Qu, J., Feng, J., Xu, S., Zhang, R., Xue, J., y Guo, D. (2017). Nutritional, physical and sensory properties of extruded products from high-amylose corn grits. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 846. https://doi.org/10.9755/ejfa.2017.v29.i11.1494

Lopez-Martinez, L. X., Oliart-Ros, R. M., Valerio-Alfaro, G., Lee, C.-H., Parkin, K. L., y Garcia, H. S. (2009). Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *LWT - Food Science and Technology*, *42*(6), 1187–1192. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.10.010

Makri, E. A., y Doxastakis, G. I. (2006). Emulsifying and foaming properties of *Phaseolus* vulgaris and *coccineus* proteins. *Food Chemistry*, *98*(3), 558–568. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.027

Mariscal-Moreno, R. M., Chuck-Hernández, C., Figueroa-Cárdenas, J. de D., y Serna-Saldivar, S. O. (2021). Physicochemical and Nutritional Evaluation of Bread Incorporated with Ayocote Bean (*Phaseolus coccineus*) and Black Bean (*Phaseolus* vulgaris). *Processes*, *9*(10), Article 10. https://doi.org/10.3390/pr9101782

Menchaca-Armenta, M., Ramírez-Wong, B., Torres-Chávez, P. I., Quintero-Ramos, A., Ledesma-Osuna, A. I., Frutos, M. J., Gutiérrez-Dorado, R., Campas-Baypoli, O. N., y Morales-Rosas, I. (2020). Effect of extrusion conditions on the anthocyanin content, functionality, and pasting properties of obtained nixtamalized blue corn flour (Zea mays L.) and process optimization. *Journal of Food Science*, *85*(7), 2143–2152. https://doi.org/10.1111/1750-3841.15312

Mielmann, A., y Brunner, T. A. (2019). Consumers' snack choices: Current factors contributing to obesity. *British Food Journal*, *121*(2), 347–358. https://doi.org/10.1108/BFJ-05-2018-0309

Mironeasa, S., Coţovanu, I., Mironeasa, C., y Ungureanu-Iuga, M. (2023). A Review of the Changes Produced by Extrusion Cooking on the Bioactive Compounds from Vegetal Sources. *Antioxidants*, *12*(7), 1453. https://doi.org/10.3390/antiox12071453

Mojica, L., Gonzalez de Mejia, E., Granados-Silvestre, M. Á., y Menjivar, M. (2017). Evaluation of the hypoglycemic potential of a black bean hydrolyzed protein isolate and its pure peptides using in silico, in vitro and in vivo approaches. *Journal of Functional Foods*, *31*, 274–286. https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.02.006

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

Moraru, C. i., y Kokini, J. l. (2003). Nucleation and Expansion During Extrusion and Microwave Heating of Cereal Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *2*(4), 147–165. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00020.x

Moreira, R., Chenlo, F., Arufe, S., y Rubinos, S. N. (2015). Physicochemical characterization of white, yellow and purple maize flours and rheological characterization of their doughs. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(12), 7954–7963. https://doi.org/10.1007/s13197-015-1953-6

Moscicki, L. (2016). Extrusion Cooking: Principles and Practice. En *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 576–580). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00265-8

Munteanu, I. G., y Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(7), 3380. https://doi.org/10.3390/ijms22073380

Naumann, S., Schweiggert-Weisz, U., Martin, A., Schuster, M., y Eisner, P. (2021). Effects of extrusion processing on the physiochemical and functional properties of lupin kernel fibre. *Food Hydrocolloids*, *111*, 106222. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106222

Navarro Cortez, R. O., Gómez-Aldapa, C. A., Aguilar-Palazuelos, E., Delgado-Licon, E., Castro Rosas, J., Hernández-Ávila, J., Solís-Soto, A., Ochoa-Martínez, L. A., y Medrano-Roldán, H. (2016). Blue corn (*Zea mays* L.) with added orange (*Citrus sinensis*) fruit bagasse: Novel ingredients for extruded snacks. *CyTA - Journal of Food*, *14*(2), 349–358. https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1114026

Navarro-Cortez, R. O., Aguilar-Palazuelos, E., Castro-Rosas, J., Falfán Cortés, R. N., Cadena Ramírez, A., Delgado-Licon, E., y Gómez-Aldapa, C. A. (2018). Physicochemical and sensory characterization of an extruded product from blue maize meal and orange bagasse using the response surface methodology. *CyTA - Journal of Food*, *16*(1), 498–505. https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1416674

Neder-Suárez, D., Amaya-Guerra, C., Quintero-Ramos, A., Pérez-Carrillo, E., Alanís-Guzmán, M., Báez-González, J., García-Díaz, C., Núñez-González, M., Lardizábal-Gutiérrez, D., y Jiménez-Castro, J. (2016). Physicochemical Changes and Resistant-Starch Content of Extruded Cornstarch with and without Storage at Refrigerator Temperatures. *Molecules*, *21*(8), 1064. https://doi.org/10.3390/molecules21081064

Neder-Suárez, D., Quintero-Ramos, A., Meléndez-Pizarro, C. O., de Jesús Zazueta-Morales, J., Paraguay-Delgado, F., y Ruiz-Gutiérrez, M. G. (2021). Evaluation of the physicochemical properties of third-generation snacks made from blue corn, black beans, and sweet chard produced by extrusion. *LWT*, *146*, 111414. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111414

Neder-Suárez, D., Vázquez-Rodríguez, J. A., González-Martínez, B. E., Meléndez-Pizarro, C. O., Hernández-Ochoa, L. R., Murowaniecki-Otero, D., Rodríguez-Roque, M. J., y Quintero-Ramos, A. (2024). Effect of using alternative flours on the development and characteristics of a third-generation snacks. *Food Chemistry Advances*, *4*, 100571. https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100571

Nicolescu, A., Babotă, M., Barros, L., Rocchetti, G., Lucini, L., Tanase, C., Mocan, A., Bunea, C. I., y Crișan, G. (2023). Bioaccessibility and bioactive potential of different phytochemical classes from nutraceuticals and functional foods. *Frontiers in Nutrition*, *10*, 1184535. https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1184535

Njoumi, S., Josephe Amiot, M., Rochette, I., Bellagha, S., y Mouquet-Rivier, C. (2019). Soaking and

cooking modify the alpha-galacto-oligosaccharide and dietary fibre content in five Mediterranean legumes. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *70*(5), 551–561. https://doi.org/10.1080/09637486.2018.1544229

Nouri, F., Sarrafzadegan, N., Mohammadifard, N., Sadeghi, M., y Mansourian, M. (2016). Intake of legumes and the risk of cardiovascular disease: Frailty modeling of a prospective cohort study in the Iranian middle-aged and older population. *European Journal of Clinical Nutrition*, *70*(2), Article 2. https://doi.org/10.1038/ejcn.2015.153

Nunes, A., Correia, I., Barros, A., y Delgadillo, I. (2004). Sequential in Vitro Pepsin Digestion of Uncooked and Cooked Sorghum and Maize Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(7), 2052–2058. https://doi.org/10.1021/jf0348830

Omosebi, M. O., Osundahunsi, O. F., y Fagbemi, T. N. (2018). Effect of extrusion on protein quality, antinutritional factors, and digestibility of complementary diet from quality protein maize and soybean protein concentrate. *Journal of Food Biochemistry*, *42*(4), e12508. https://doi.org/10.1111/jfbc.12508

Osuna-Gallardo, E. I., Cuevas-Rodríguez, E. O., Sepúlveda-García, C. I., Reyes-Moreno, C., León-López, L., Han, R., y Hernández-Álvarez, A. J. (2023). Impact of Cooking and Extrusion Processing on Nutritional, Antinutritional, and Techno-Functional Characteristics of Indigenous Bean (*Phaseolus coccineus*). *ACS Food Science y Technology*, *3*(11), 1835–1853. https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.2c00416

Oyeyinka, S. A., Singh, S., y Amonsou, E. O. (2021). A review on structural, digestibility and physicochemical properties of legume starch-lipid complexes. *Food Chemistry*, *349*, 129165. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129165

Panak Balentic, J., Babic, J., Jozinovic, A., Ackar, D., Milicevic, B., Muhamedbegovic, B., y Subaric, D. (2018). Production of third-generation snacks. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, *10*(1), 98–105. https://doi.org/10.17508/CJFST.2018.10.1.04

Panak-Balentic, J., Ackar, D., Jozinovic, A., Babic, J., Milicevic, B., Jokic, S., Pajin, B., y Subaric, D. (2017). Application of supercritical carbon dioxide extrusion in food processing technology. *Hemijska Industrija*, *71*(2), 127–134. https://doi.org/10.2298/HEMIND150629024P

Pasqualone, A., Costantini, M., Coldea, T. E., y Summo, C. (2020). Use of Legumes in Extrusion Cooking: A Review. *Foods*, *9*(7), 958. https://doi.org/10.3390/foods9070958

Patras, A., Brunton, Nigel. P., O'Donnell, C., y Tiwari, B. K. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science y Technology*, *21*(1), 3–11. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.07.004

Pedrosa, M. M., Guillamón, E., y Arribas, C. (2021). Autoclaved and Extruded Legumes as a Source of Bioactive Phytochemicals: A Review. *Foods*, *10*(2), 379. https://doi.org/10.3390/foods10020379

Pérez-Burillo, S., Molino, S., Navajas-Porras, B., Valverde-Moya, Á. J., Hinojosa-Nogueira, D., López-Maldonado, A., Pastoriza, S., y Rufián-Henares, J. Á. (2021). An in vitro batch fermentation protocol for studying the contribution of food to gut microbiota composition and functionality. *Nature Protocols*, *16*(7), 3186–3209. https://doi.org/10.1038/s41596-021-00537-x

Petersen, J. M., Prichard, I., Kemps, E., y Tiggemann, M. (2019). The effect of snack consumption on physical activity: A test of the Compensatory Health Beliefs Model. *Appetite*, *141*, 104342. https://doi.org/10.1016/j.appet.2019.104342

Pismag, R. Y., Polo, M. P., Hoyos, J. L., Bravo, J. E., y Roa, D. F. (2024). Effect of extrusion cooking on the chemical and nutritional properties of instant flours: A review. *F1000Research*, *12*,

1356. https://doi.org/10.12688/f1000research.140748.2
Pojer, E., Mattivi, F., Johnson, D., y Stockley, C. S. (2013). The Case for Anthocyanin Consumption to Promote Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *12*(5), 483–508. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12024
Procuraduría Federal del Consumidor. (2013). *Las botanas dicen presente en los eventos deportivos*. gob.mx. http://www.gob.mx/profeco/documentos/las-botanas-dicen-presente-en-los-eventos-deportivos?state=published
PROY-NOM-216-SSA1-2002,. (2002). *PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-216-SSA1-2002, Productos y servicios. Botanas. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.*
R. T., J. De J. Berrios, J. Tang, y B. G. Swanson. (2007). Evaluation of Methods for Expansion Properties of Legume Extrudates. *Applied Engineering in Agriculture*, *23*(6), 777–783. https://doi.org/10.13031/2013.24044
Ren, X., Yang, Y., Liu, Q., Wang, Y., Jin, Z., y Jiao, A. (2023). Effects of enzymatic extrusion on the structure and physicochemical properties of oat flour and its application in oat milk production. *International Journal of Food Science and Technology*, *58*(9), 4638–4651. https://doi.org/10.1111/ijfs.16568
Riaz, M. N. (2019). Food Extruders. En *Handbook of Farm, Dairy and Food Machinery Engineering* (pp. 483–497). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814803-7.00019-1
Rodriguez, M., Rau, D., Angioi, S. A., Bellucci, E., Bitocchi, E., Nanni, L., Knüpffer, H., Negri, V., Papa, R., y Attene, G. (2013). European *Phaseolus coccineus* L. landraces: Population Structure and Adaptation, as Revealed by cpSSRs and Phenotypic Analyses. *PLoS ONE*, *8*(2), e57337. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057337
Rodríguez-Salinas, P. A., Zavala-García, F., Urías-Orona, V., Muy-Rangel, D., Heredia, J. B., y Niño-Medina, G. (2020). Chromatic, Nutritional and Nutraceutical Properties of Pigmented Native Maize (Zea mays L.) Genotypes from the Northeast of Mexico. *Arabian Journal for Science and Engineering*, *45*(1), 95–112. https://doi.org/10.1007/s13369-019-04086-0
Roye, C., Henrion, M., Chanvrier, H., De Roeck, K., De Bondt, Y., Liberloo, I., King, R., y Courtin, C. M. (2020). Extrusion-Cooking Modifies Physicochemical and Nutrition-Related Properties of Wheat Bran. *Foods*, *9*(6), 738. https://doi.org/10.3390/foods9060738
Salazar-López, N. J., González-Aguilar, G. A., Rouzaud-Sández, O., y Robles-Sánchez, M. (2018). Bioaccessibility of hydroxycinnamic acids and antioxidant capacity from sorghum bran thermally processed during simulated in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of Food Science and Technology*, *55*(6), 2021–2030. https://doi.org/10.1007/s13197-018-3116-z
Salazar-Villanea, S., Hendriks, W. H., Bruininx, E. M. A. M., Gruppen, H., y Van Der Poel, A. F. B. (2016). Protein structural changes during processing of vegetable feed ingredients used in swine diets: Implications for nutritional value. *Nutrition Research Reviews*, *29*(1), 126–141. https://doi.org/10.1017/S0954422416000056
Saldivar, S. O. S. (2016). Snack Foods: Types and Composition. En *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 13–18). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00633-4
Samtiya, M., Aluko, R. E., y Dhewa, T. (2020). Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: An overview. *Food Production, Processing and Nutrition*, *2*(1), 6. https://doi.org/10.1186/s43014-020-0020-5
Sánchez-Arteaga, H. M., Urías-Silvas, J. E., Espinosa-Andrews, H., y García-Márquez, E. (2015). Effect of chemical composition and thermal properties on the cooking quality of common beans (*Phaseolus vulgaris*). *CyTA - Journal of Food*, *13*(3), 385–391. https://doi.org/10.1080/19476337.2014.988182
Sánchez-Madrigal, M. Á., Meléndez-Pizarro, C. O., Martínez-Bustos, F., Ruiz-Gutiérrez, M. G.,

Quintero-Ramos, A., Márquez-Meléndez, R., Lardizábal-Gutiérrez, D., y Campos-Venegas, K. (2014). Structural, functional, thermal and rheological properties of nixtamalised and extruded blue maize (*Z ea mays* L .) flour with different calcium sources. *International Journal of Food Science y Technology*, *49*(2), 578–586. https://doi.org/10.1111/ijfs.12340

Sánchez-Villa, C. E., Zepeda-Bautista, R., Ramírez-Ortiz, M. E., y Corzo-Ríos, L. J. (2020). Nixtamalized tortillas supplemented with proteins isolated from *Phaseolus coccineus* and huauzontle (Chenopodium berlandieri subsp. Nuttalliae) flour: Rheological, textural, and sensorial properties. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, *22*, 100274. https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100274

Sarkhel, S., y Roy, A. (2022). Phytic acid and its reduction in pulse matrix: Structure–function relationship owing to bioavailability enhancement of micronutrients. *Journal of Food Process Engineering*, *45*(5), e14030. https://doi.org/10.1111/jfpe.14030

Schmidt, H. de O., y Oliveira, V. R. de. (2023). Overview of the Incorporation of Legumes into New Food Options: An Approach on Versatility, Nutritional, Technological, and Sensory Quality. *Foods*, *12*(13). https://doi.org/10.3390/foods12132586

Schwember, A. R., Carrasco, B., y Gepts, P. (2017). Unraveling agronomic and genetic aspects of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.). *Field Crops Research*, *206*, 86–94. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2017.02.020

Shah, F.-H., Sharif, M. K., Ahmad, Z., Amjad, A., Javed, M. S., Suleman, R., Sattar, D.-S., Amir, M., y Anwar, M. J. (2022). Nutritional characterization of the extrusion-processed micronutrient-fortified corn snacks enriched with protein and dietary fiber. *Frontiers in Nutrition*, *9*. https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1062616

Shamah-Levy, T., Lazcano-Ponce, E., Cuevas-Nasu, L., Romero-Martínez, M., Gaona-Pineda, E., Gómez-Acosta, L., Mendoza-Alvarado, L., y Méndez-Gómez-Humarán, I. (2024). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición Continua 2023. Resultados Nacionales—Portal INSP*. Instituto Nacional de Salud Pública. https://insp.mx/novedades-editoriales/encuesta-nacional-de-salud-y-nutricion-continua-2023-resultados-nacionales

Shere, Dr. P., y Agrawal, Dr. R. (2024). *Extrusion Technology: Transforming Food Processing*. B P International. https://doi.org/10.9734/bpi/mono/978-81-972831-8-5

Shevkani, K., Singh, N., Chen, Y., Kaur, A., y Yu, L. (2019). Pulse proteins: Secondary structure, functionality and applications. *Journal of Food Science and Technology*, *56*(6), 2787–2798. https://doi.org/10.1007/s13197-019-03723-8

Singh, B., Singh, J. P., Shevkani, K., Singh, N., y Kaur, A. (2017). Bioactive constituents in pulses and their health benefits. *Journal of Food Science and Technology*, *54*(4), 858–870. https://doi.org/10.1007/s13197-016-2391-9

Singh, S., Gamlath, S., y Wakeling, L. (2007). Nutritional aspects of food extrusion: A review. *International Journal of Food Science y Technology*, *42*(8), 916–929. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01309.x

Singla, R. K., Dubey, A. K., Garg, A., Sharma, R. K., Fiorino, M., Ameen, S. M., Haddad, M. A., y Al-Hiary, M. (2019). Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, *102*(5), 1397–1400. https://doi.org/10.1093/jaoac/102.5.1397

Singleton, V. L., y Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144–158. https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144

Sinkovič, L., Pipan, B., Sinkovič, E., y Meglič, V. (2019). Morphological Seed Characterization of Common (*Phaseolus vulgaris* L.) and Runner (*Phaseolus coccineus* L.) Bean Germplasm:

A Slovenian Gene Bank Example. *BioMed Research International*, *2019*, 1–13. https://doi.org/10.1155/2019/6376948

Snack Food—Mexico | Statista Market Forecast. (2025). Statista. https://www.statista.com/outlook/cmo/food/confectionery-snacks/snack-food/mexico

Sofi, S. A., Muzaffar, K., Farooq, A., Rafiq, S., Majid, D., Makroo, H. A., Mir, S. A., Mousavi Khaneghah, A., Barba, F. J., y Dar, B. N. (2023). Spectroscopic techniques for elucidation of structural changes in temperate cowpea cultivars under germination: A useful tool for quality determination and industrial application. *Applied Food Research*, *3*(1), 100246. https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100246

Tan, X., Wu, F., Guo, Z., Xie, F., Song, C., Xia, X., Guo, L., Feng, Y., y He, Z. (2025). Amylose content controls the structures and digestibility of starch-lipid complexes during microwave postprocessing. *Carbohydrate Polymers*, *358*, 123530. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2025.123530

Teniente-Martínez, G., Bernardino-Nicanor, A., Valadez-Vega, M. D. C., Montañez-Soto, J. L., Juárez-Goiz, J. M. S., y González-Cruz, L. (2022). *In vitro* study of the antihypertensive, antioxidant and antiproliferative activities of peptides obtained from two varieties of *Phaseolus coccineus* L. *CyTA - Journal of Food*, *20*(1), 102–110. https://doi.org/10.1080/19476337.2022.2090611

Thakur, A., Sharma, V., y Thakur, A. (2019). An overview of anti-nutritional factors in food. *International Journal of Chemical Studies*, *7*(1), 2472–2479.

Tovar-Jímenez, X., Aguilar-Palazuelos, E., Gómez-Aldapa, CA., y Caro-Corrales, J. (2016). Microstructure of a Third Generation Snack Manufactured by Extrusion from Potato Starch and Orange Vesicle Flour. *Journal of Food Processing y Technology*, *07*(03). https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000563

United Nations. (2015). *Transforming our world: The 2030 Agenda for Sustainable Development | Department of Economic and Social Affairs*. https://sdgs.un.org/2030agenda

Usoltsev, D., Sitnikova, V., Kajava, A., y Uspenskaya, M. (2019). Systematic FTIR Spectroscopy Study of the Secondary Structure Changes in Human Serum Albumin under Various Denaturation Conditions. *Biomolecules*, *9*(8), 359. https://doi.org/10.3390/biom9080359

van den Berg, R., Haenen, G. R. M. M., van den Berg, H., y Bast, A. (1999). Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, *66*(4), 511–517. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00089-8

Vatanparast, H., Islam, N., Patil, R. P., Shafiee, M., Smith, J., y Whiting, S. (2019). Snack Consumption Patterns among Canadians. *Nutrients*, *11*(5), Article 5. https://doi.org/10.3390/nu11051152

Vázquez-Ortiz, F. A., Caire, G., Higuera-Ciapara, I., y Hernández, G. (1995). High Performance Liquid Chromatographic Determination of Free Amino Acids in Shrimp. *Journal of Liquid Chromatography*, *18*(10), 2059–2068. https://doi.org/10.1080/10826079508013960

Venkatachalam, M., y Sathe, S. K. (2003). Phaseolin In Vitro Pepsin Digestibility: Role of Acids and Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(11), 3466–3472. https://doi.org/10.1021/jf026105y

Vicente-Jurado, D., Gutiérrez-Cano, J. D., García-Segovia, P., Catalá-Civera, J. M., Martínez-Monzó, J., y Igual, M. (2024). Evaluating microwave energy impact on 3G snacks: A study on dielectric properties and expansion. *Food Research International*, *197*, 115156. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.115156

Wang, R., y Guo, S. (2021). Phytic acid and its interactions: Contributions to protein functionality,

food processing, and safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *20*(2), 2081–2105. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12714

Wilson, C. M. (1986). Serial Analysis of Zein by Isoelectric Focusing and Sodium Dodecyl Sulfate Gel Electrophoresis. *Plant Physiology*, *82*(1), 196–202. https://doi.org/10.1104/pp.82.1.196

Xing, G., Rui, X., Wang, D., Liu, M., Chen, X., y Dong, M. (2017). Effect of Fermentation pH on Protein Bioaccessibility of Soymilk Curd with Added Tea Polyphenols As Assessed by in Vitro Gastrointestinal Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(50), 11125–11132. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04456

Yin, S.-W., Tang, C.-H., Wen, Q.-B., y Yang, X.-Q. (2011). Conformational and thermal properties of phaseolin, the major storage protein of red kidney bean (*Phaseolus* vulgaris L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *91*(1), 94–99. https://doi.org/10.1002/jsfa.4155

Zeng, Z., Liu, C., Luo, S., Chen, J., y Gong, E. (2016). The Profile and Bioaccessibility of Phenolic Compounds in Cereals Influenced by Improved Extrusion Cooking Treatment. *PloS One*, *11*(8), e0161086. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161086

Zheng, X., Liu, X., Yu, S., Wang, X., Ma, Y., Yang, S., y Jing, S. (2014). Effects of Extrusion and Starch Removal Pretreatment on Zein Proteins Extracted from Corn Gluten Meal. *Cereal Chemistry*, *91*(5), 496–501. https://doi.org/10.1094/CCHEM-07-13-0141-R

Zhou, H., Tan, Y., y McClements, D. J. (2023). Applications of the INFOGEST In Vitro Digestion Model to Foods: A Review. *Annual Review of Food Science and Technology*, *14*(1), 135–156. https://doi.org/10.1146/annurev-food-060721-012235

Zhou, Y., Li, H., y Xia, N. (2021). The Interplay Between Adipose Tissue and Vasculature: Role of Oxidative Stress in Obesity. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, *8*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2021.650214

Zhuang, Y., Dong, J., He, X., Wang, J., Li, C., Dong, L., Zhang, Y., Zhou, X., Wang, H., Yi, Y., y Wang, S. (2022). Impact of Heating Temperature and Fatty Acid Type on the Formation of Lipid Oxidation Products During Thermal Processing. *Frontiers in Nutrition*, *9*. https://doi.org/10.3389/fnut.2022.913297

XI. APÉNDICE

Apéndice 11.1 Formato de consentimiento informado.

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título de studio	Desarrollo de botana funcional de tercera generación elaborada con ingredientes autóctonos: maíz azul (*Zea mays* L.) y frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.)
Nombre de investigador principal	Dr. Carlos Abel Amaya Guerra
Departamento	Laboratorio de Alimentos
Persona de contacto	MC Víctor Andrés Ayala Rodríguez
Correo de contacto	victor.ayalard@uanl.edu.mx

Usted ha sido invitado(a) a participar en un estudio de investigación. Este documento contiene información importante sobre el propósito del estudio, lo que usted hará si decide participar y la forma en que será utilizada la información proporcionada. Puede contener palabras que usted no entienda, de ser así, solicite a la persona a cargo del estudio que le explique cualquier información que no le quede claro.

¿Cuál es el propósito del estudio?
El propósito de este estudio es evaluar el efecto de la adición de harina de frijol ayocote a harina de maíz azul en la aceptabilidad sensorial de snacks extruidos de tercera generación elaborados con diferentes mezclas de ambos ingredientes.

¿Cuál será la duración del estudio?
Una sesión de 10~15 minutos.

¿Cuáles serán los requisitos para mi participación?
- Hombres y mujeres entre 18 y 45 años
- Consumidores habituales de botanas
- Sin alergias conocidas a maíz o frijol
- No encontrarse bajo un plan estricto de control alimentario

¿Cuál es el procedimiento del estudio?
Se le proporcionarán 4 muestras de botanas extruidas para evaluar su apariencia, dureza, sabor, crujencia y aceptabilidad global.

¿Cuáles son los posibles riesgos?
Riesgo mínimo debido al consumo de ingredientes de uso común.

¿Mi participación tiene algún costo?
No.

¿Recibiré alguna compensación económica?
No.

¿Cuáles son mis derechos como participante?
Usted puede retirarse en cualquier momento y sus datos serán manejados de forma confidencial.

¿Cómo se protegerá la confidencialidad de sus datos personales?

Si acepta participar en esta investigación, el investigador recabará y registrará su información personal, esta información será su nombre y firma. El investigador será responsable de salvaguardar la información de acuerdo a las regulaciones locales. Toda información tiene como finalidad garantizar la integridad científica de la investigación, su nombre no será conocido fuera de la institución a menos que lo requieran. Los resultados de este estudio de investigación podrán presentarse en reuniones y/o en publicaciones. **Al firmar este documento, usted autoriza el uso y revelaciones de la información obtenida de su prueba sensorial en esta forma de consentimiento.**

Contacto en caso de dudas:

Dr. Carlos Abel Amaya Guerra
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas
e-mail: carlos.amayagr@uanl.edu.mx
Teléfono:
+52 81-83-294000 Ext. 3670

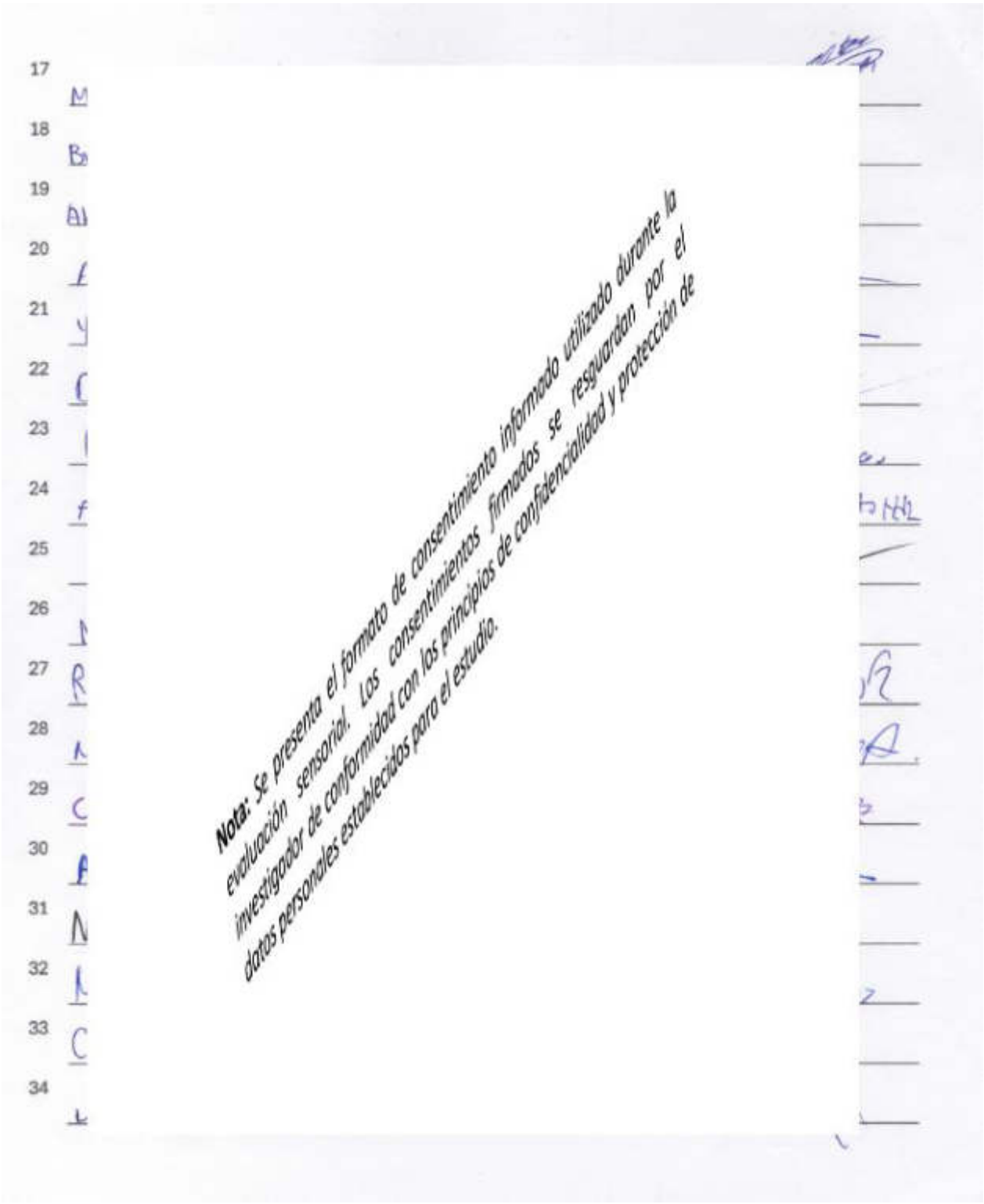
MC Víctor Andrés Ayala Rodríguez
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas
e-mail: victor.ayalard@uanl.edu.mx

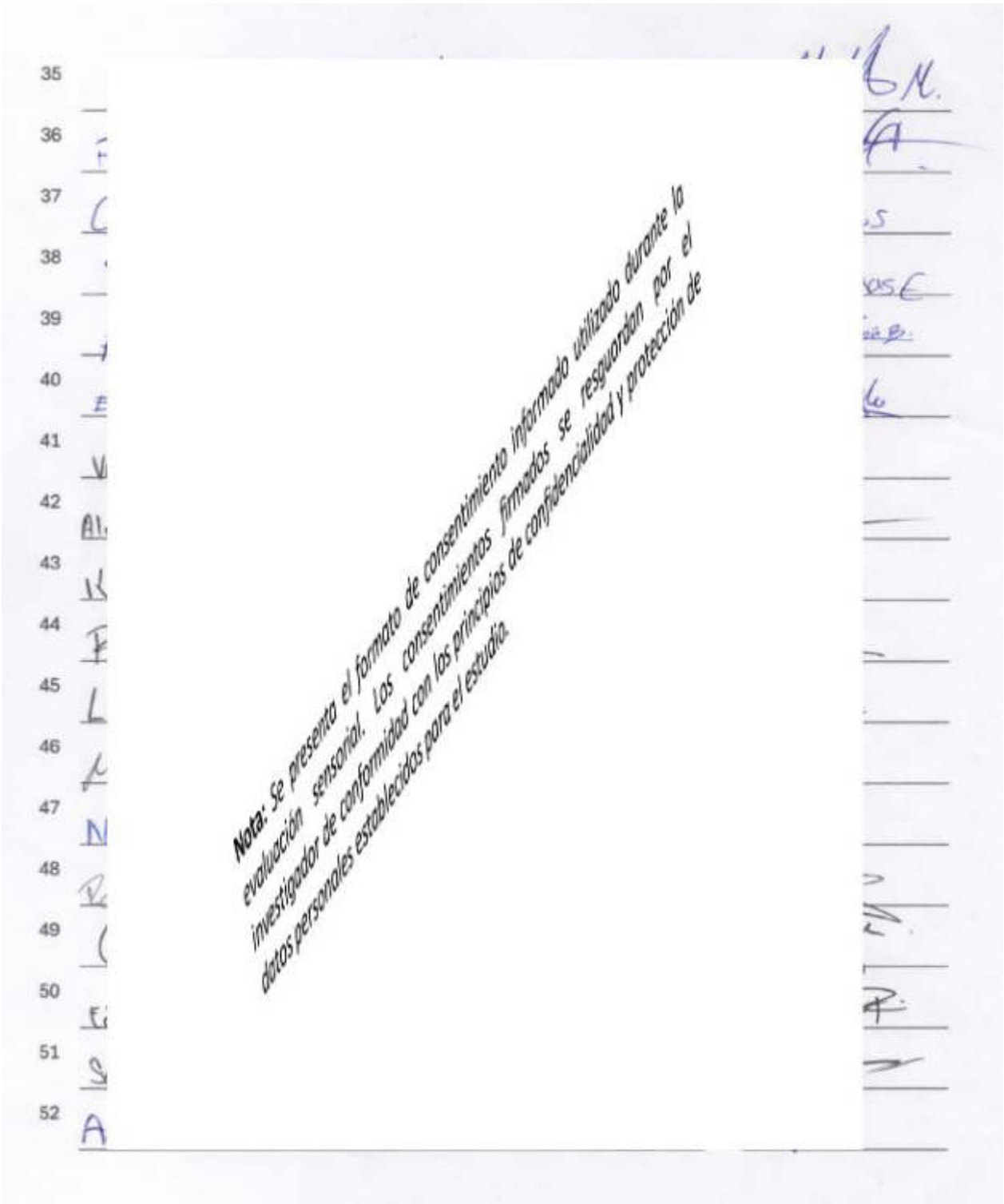
Consentimiento:

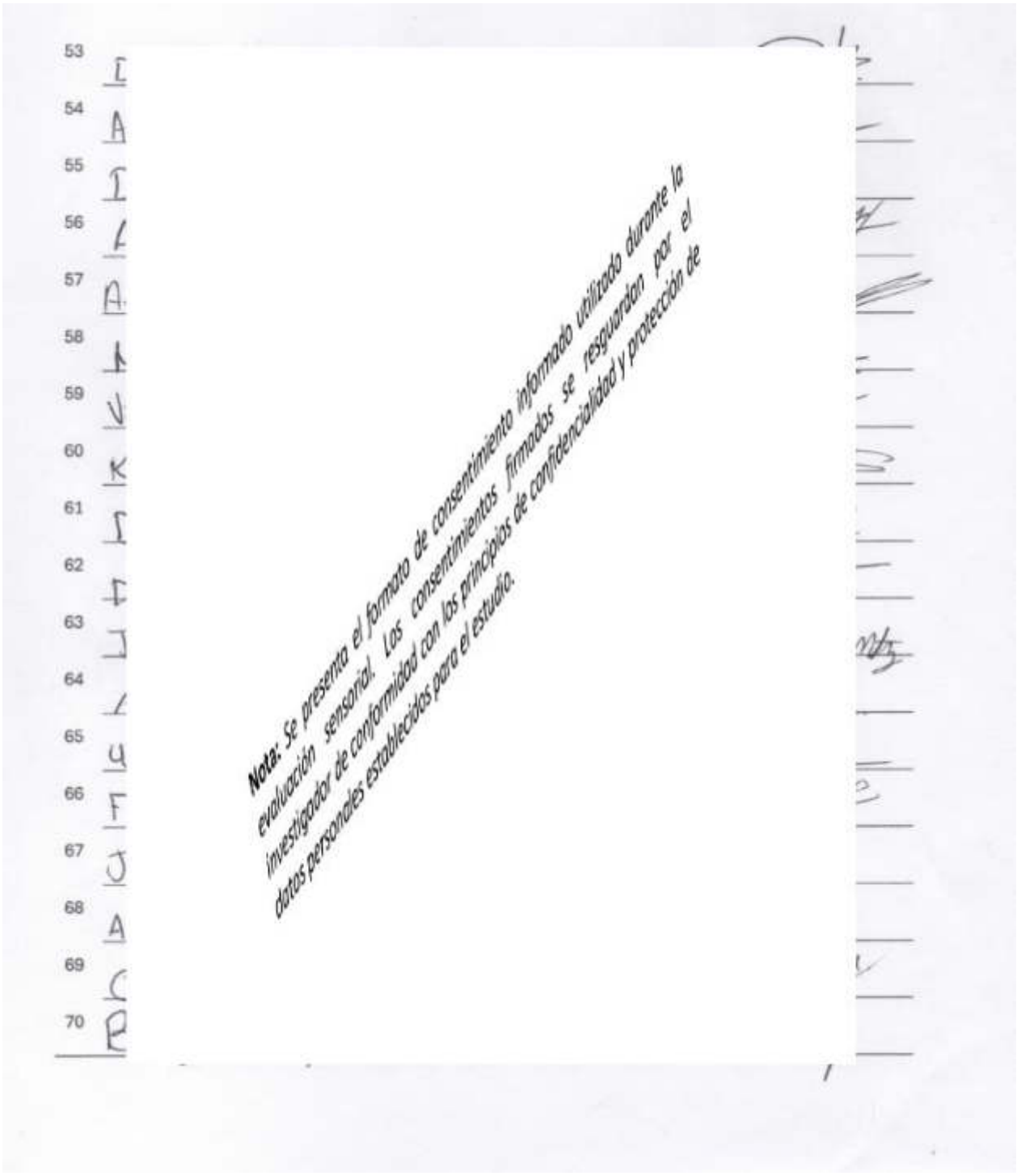
He leído la información anterior y acepto participar de manera voluntaria.

	Nombre del participante	Firma
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		

Nota: *Se presenta el formato de consentimiento informado utilizado durante la evaluación sensorial. Los consentimientos firmados se resguardan por el investigador de conformidad con los principios de confidencialidad y protección de datos personales establecidos para el estudio.*


Nota: Se presenta el formato de consentimiento informado utilizado durante la evaluación sensorial. Los consentimientos firmados se resguardan por el investigador de conformidad con los principios de confidencialidad y protección de datos personales establecidos para el estudio.


Nota: Se presenta el formato de consentimiento informado utilizado durante la evaluación sensorial. Los consentimientos firmados se resguardan por el investigador de conformidad con los principios de confidencialidad y protección de datos personales establecidos para el estudio.



Nota: *Se presenta el formato de consentimiento informado utilizado durante la evaluación sensorial. Los consentimientos firmados se resguardan por el investigador de conformidad con los principios de confidencialidad y protección de datos personales establecidos para el estudio.*



Nota: *Se presenta el formato de consentimiento informado utilizado durante la evaluación sensorial. Los consentimientos firmados se resguardan por el investigador de conformidad con los principios de confidencialidad y protección de datos personales establecidos para el estudio.*

Apéndice 11.2. Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para evaluar los efectos de la formulación y del tiempo de exposición a microondas sobre el diámetro de expansión de pellets extruidos de maíz azul y frijol ayocote.

Fuente de variación	F (gl)	Valor de *p*	η² parcial
Formulación	52.072 (6,168)	<0.001	0.650
Tiempo de exposición	124.683 (5,168)	<0.001	0.788
Formulación × Tiempo	1.757 (30,168)	0.014	0.239
Ajuste del modelo	—	R^2 = 0.855	R^2 ajustado = 0.819

Nota. El ANOVA de dos vías se realizó considerando como factores la formulación y el tiempo de exposición a microondas. Los valores corresponden al estadístico *F*, el valor de *p* y el tamaño del efecto (η² parcial) para cada fuente de variación. El ajuste global del modelo se expresa mediante el coeficiente de determinación (R^2) y el R^2 ajustado. La prueba de Tukey (HSD) se realizó con un nivel de significancia de α = 0.05.

Apéndice 11.3. Resultados del ANOVA de dos vías y prueba HSD de Tukey para la digestibilidad aparente *in vitro* de la materia seca (%) de formulaciones maíz y frijol (n = 3, media ± DE).

Formulación	Harinas crudas (Media ± DE)	Harinas extruidas (Media ± DE)	Grupo Tukey HSD*	Media marginal (%)
Maiz azul	48.21 ± 0.90	65.04 ± 0.42	5	56.62
Frijol ayocote	38.85 ± 0.64	56.73 ± 0.48	1	47.79
10% frijol	41.71 ± 1.21	64.42 ± 1.39	3	53.06
20% frijol	42.18 ± 1.21	65.81 ± 1.12	4	53.99
30% frijol	40.94 ± 1.54	63.95 ± 0.91	3	52.44
40% frijol	39.61 ± 1.58	64.11 ± 0.75	2	51.86
45% frijol	39.05 ± 0.92	63.75 ± 0.41	2	51.40

ANOVA de dos vías (variable dependiente: digestibilidad aparente *in vitro* de la materia seca):

- Formulación: F(6,28) = 40.38; $p < 0.001$; $\eta^2 = 0.896$.
- Tratamiento (crudo × extruido): F(1,28) = 4693.88; $p < 0.001$; $\eta^2 = 0.994$.
- Interacción formulación × tratamiento: F(6,28) = 14.31; $p < 0.001$; $\eta^2 = 0.754$.
- Ajuste del modelo: $R^2 = 0.994$ (R^2 ajustado = 0.992)

Apéndice 11.4. Resultados del ANOVA de dos vías y prueba HSD de Tukey para la digestibilidad proteica *in vitro* (%) de formulaciones maíz y frijol (n = 3, media ± DE).

Formulación	Harinas crudas (Media ± DE)	Harinas extruidas (Media ± DE)	Grupo Tukey HSD*	Media marginal (%)
Maiz azul	63.20 ± 1.09	52.86 ± 0.79	4	58.03
Frijol ayocote	67.51 ± 0.36	47.66 ± 1.55	4	57.59
10% frijol	54.99 ± 1.69	46.87 ± 1.37	1	50.93
20% frijol	57.47 ± 1.18	48.27 ± 1.90	2	52.87
30% frijol	56.97 ± 1.27	46.97 ± 1.75	2	51.97
40% frijol	58.21 ± 1.60	48.74 ± 1.16	3	53.48
45% frijol	58.02 ± 0.58	50.69 ± 0.65	3	54.36

ANOVA de dos vías (variable dependiente: digestibilidad proteica *in vitro*):

- Formulación: F(6,28) = 26.39; $p < 0.001$; $\eta^2 = 0.850$.
- Tratamiento (crudo × extruido): F(1,28) = 708.57; $p < 0.001$; $\eta^2 = 0.962$.
- Interacción formulación × tratamiento: F(6,28) = 15.89; $p < 0.001$; $\eta^2 = 0.773$.
- Ajuste del modelo: $R^2 = 0.972$ (R^2 ajustado = 0.959).

Apéndice 11.5. Resultados del ANOVA de dos vías y prueba HSD de Tukey para la puntuación de aminoácidos corregida por digestibilidad proteica *in vitro* (IV-PDCAAS, %) de formulaciones maíz y frijol (n = 3, media ± DE).

Formulación	Harinas crudas (Media ± DE)	Harinas extruidas (Media ± DE)	Grupo Tukey HSD*	Media marginal (%)
Maiz azul	23.38 ± 0.40	20.09 ± 0.30	1	21.73
Frijol ayocote	23.65 ± 0.73	20.15 ± 0.59	1	21.90
10% frijol	28.16 ± 0.58	23.17 ± 0.91	2	25.66
20% frijol	30.76 ± 0.68	24.42 ± 0.91	3	27.59
30% frijol	33.76 ± 0.93	27.29 ± 0.65	4	30.53
40% frijol	34.81 ± 0.35	29.40 ± 0.38	5	32.11
45% frijol	45.91 ± 0.24	34.31 ± 1.12	6	40.11

ANOVA de dos vías (variable dependiente: IV-PDCAAS):

- Formulación: $F(6,28) = 543.91$; $p < 0.001$; $\eta^2 = 0.991$.
- Tratamiento (crudo × extruido): $F(1,28) = 806.15$; $p < 0.001$; $\eta^2 = 0.966$.
- Interacción formulación × tratamiento: $F(6,28) = 25.32$; $p < 0.001$; $\eta^2 = 0.844$.
- Ajuste del modelo: $R^2 = 0.993$ (R^2 ajustado = 0.990).

*Letras o números iguales indican ausencia de diferencias significativas entre tratamientos (prueba HSD de Tukey, $\alpha = 0.05$)

Apéndice 11.6. Resultados del ANOVA de dos vías y de la prueba HSD de Tukey para el contenido de polifenoles en mezclas de maíz y frijol (mg EAG/g de peso seco, n = 3, media ± DE).

Formulación	Harinas crudas (Media ± DE)	Harinas extruidas (Media ± DE)	Grupo Tukey HSD*	Media marginal (%)
Maiz azul	4.63 ± 0.38	5.06 ± 0.20	1	4.85
Frijol ayocote	6.95 ± 0.69	11.40 ± 0.22	4	9.18
10% frijol	4.30 ± 0.84	6.52 ± 0.40	2	5.41
20% frijol	5.48 ± 0.71	4.82 ± 0.18	1	5.15
30% frijol	4.48 ± 0.77	5.50 ± 0.30	1	4.99
40% frijol	4.67 ± 0.55	5.45 ± 0.21	1	5.06
45% frijol	6.19 ± 0.51	6.09 ± 0.18	3	6.14
Blanco enzimático**	19.42 ± 1.80	12.38 ± 0.12	–	–

ANOVA de dos vías (variable dependiente: contenido de polifenoles):

- **Formulación:** $F(6,28) = 57.67$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.925$
- **Tratamiento (harinas crudas vs. extruidas):** $F(1,28) = 57.56$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.673$
- **Interacción Formulación × Tratamiento:** $F(6,28) = 17.89$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.793$
- **Ajuste del modelo:** $R^2 = 0.948$ (R^2 ajustado = 0.924)

***Prueba HSD de Tukey ($\alpha = 0.05$).** Las formulaciones que comparten el mismo número no presentan diferencias significativas.

****Nota**: Los blancos enzimáticos (enzimas digestivas sin muestra) se utilizaron para corregir la absorbancia de fondo en el ensayo de Folin–Ciocalteu. Todos los valores reportados en esta tabla fueron corregidos con respecto al blanco y corresponden a los datos analizados mediante ANOVA de dos vías y la prueba HSD de Tukey.

Apéndice 11.7. Resultados del ANOVA de dos vías y de la prueba HSD de Tukey para la actividad antioxidante (ensayo DPPH) de mezclas de maíz y frijol (µmol ET/g de peso seco, n = 3, media ± DE).

Formulación	Harinas crudas (Media ± DE)	Harinas extruidas (Media ± DE)	Grupo Tukey HSD*	Media marginal (%)
Maiz azul	266.77 ± 1.01	267.36 ± 1.81	2	267.07
Frijol ayocote	494.88 ± 0.53	448.75 ± 4.43	5	471.82
10% frijol	259.89 ± 2.03	292.43 ± 3.41	3	276.16
20% frijol	290.77 ± 3.57	296.69 ± 4.69	3	293.73
30% frijol	288.43 ± 3.68	322.08 ± 4.59	4	305.26
40% frijol	219.15 ± 2.24	307.25 ± 1.07	1	263.20
45% frijol	264.11 ± 2.93	322.93 ± 4.48	4	293.52
Blanco enzimático**	75.15 ± 5.17	64.91 ± 7.09	–	–

ANOVA de dos vías (variable dependiente: actividad antioxidante determinada mediante el ensayo DPPH):

- **Formulación:** $F(6,28) = 3099.07$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.998$
- **Tratamiento (harinas crudas vs. extruidas):** $F(1,28) = 626.13$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.957$
- **Interacción Formulación × Tratamiento:** $F(6,28) = 273.72$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.983$
- **Ajuste del modelo:** $R^2 = 0.999$ (R^2 ajustado = 0.998)

*** Prueba HSD de Tukey (α = 0.05).** Las formulaciones que comparten el mismo número no presentan diferencias significativas.

****Nota:** Los blancos enzimáticos (enzimas digestivas sin muestra) se utilizaron para corregir la actividad antioxidante intrínseca de las enzimas. Todos los valores reportados en esta tabla fueron corregidos respecto al blanco enzimático y corresponden a los datos analizados mediante ANOVA de dos vías y la prueba HSD de Tukey.

Apéndice 11.8. Resultados del ANOVA de dos vías y la prueba HSD de Tukey para la actividad antioxidante (ensayo ABTS) de las mezclas maíz y frijol (µmol TE/g PS, n = 3, media ± DE).

Formulación	Harinas crudas (Media ± DE)	Harinas extruidas (Media ± DE)	Grupo Tukey HSD*	Media marginal (%)
Maiz azul	789.37 ± 12.54	719.12 ± 11.03	7	754.25
Frijol ayocote	759.16 ± 9.49	724.15 ± 5.09	6	741.66
10% frijol	743.28 ± 2.16	715.47 ± 9.06	5	729.37
20% frijol	775.58 ± 4.11	659.50 ± 2.29	4	717.54
30% frijol	767.52 ± 2.46	637.05 ± 15.03	1	702.29
40% frijol	763.81 ± 7.20	662.99 ± 8.97	2	713.40
45% frijol	760.21 ± 9.66	658.06 ± 5.58	3	709.13
Blanco enzimático**	7.50 ± 0.01	4.84 ± 0.01	–	–

ANOVA de dos vías (variable dependiente: actividad antioxidante por ABTS):

- **Formulación:** $F(6,28) = 29.66$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.864$
- **Tratamiento (harina cruda vs. extruida):** $F(1,28) = 1026.21$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.973$
- **Interacción Formulación × Tratamiento:** $F(6,28) = 33.67$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.878$
- **Ajuste del modelo:** $R^2 = 0.980$ (R^2 ajustado = 0.971)

*Prueba HSD de Tukey (α = 0.05). Los grupos que comparten el mismo número no presentan diferencias significativas.

****Nota:** Los blancos enzimáticos (enzimas digestivas sin muestra) se utilizaron para corregir la actividad antioxidante intrínseca de las enzimas. Estos blancos se aplicaron para corregir todos los valores experimentales. Las medias presentadas en esta tabla ya representan valores corregidos por el blanco enzimático y fueron sometidas al análisis mediante ANOVA de dos vías y la prueba HSD de Tukey.

Apéndice 11.9. Resultados del ANOVA de dos vías y la prueba HSD de Tukey para el contenido de antocianinas de las mezclas maíz y frijol (mg/100 g PS, n = 3, media ± DE).

Formulación	Harinas crudas (Media ± DE)	Harinas extruidas (Media ± DE)	Grupo Tukey HSD*	Media marginal (%)	Formulación
Maiz azul	1102.29 ± 45.26	104.60 ± 4.06	285.22 ± 4.68	e	497.37
Frijol ayocote	66.25 ± 2.28	4.40 ± 0.40	50.76 ± 3.36	a	40.47
10% frijol	490.92 ± 21.36	9.69 ± 0.53	73.72 ± 5.47	d	191.44
20% frijol	132.11 ± 6.51	32.20 ± 1.81	56.90 ± 0.85	b	73.74
30% frijol	136.30 ± 0.90	42.00 ± 0.60	61.44 ± 5.22	b	79.91
40% frijol	496.62 ± 14.33	58.82 ± 1.38	50.00 ± 2.60	d	201.81
45% frijol	382.91 ± 1.84	46.59 ± 0.84	49.09 ± 2.34	c	159.53

ANOVA de dos vías (variable dependiente: antocianinas, mg/100 g PS):

- **Formulación:** $F(6,42) = 1554.26$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.996$
- **Tratamiento (harinas crudas vs. extruidas vs. expandidas):** $F(2,42) = 5795.24$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.996$
- **Interacción Formulación × Tratamiento:** $F(12,42) = 705.72$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.995$
- **Ajuste del modelo:** $R^2 = 0.999$ (R^2 ajustado = 0.998)

*** Prueba HSD de Tukey** ($\alpha = 0.05$). Los grupos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas.

Apéndice 11.10. Resultados del ANOVA de dos vías y de la prueba de Tukey HSD para el contenido de ácido fítico en mezclas de maíz y frijol (mg/g de peso seco, n = 3, media ± DE).

Formulación	Harinas crudas (Media ± DE)	Harinas extruidas-expandidas (Media ± DE)	Grupo Tukey HSD*	Media marginal (mg/g PS)
Maiz azul	2.53 ± 0.00	2.35 ± 0.10	a	2.44
Frijol ayocote	2.62 ± 0.00	2.44 ± 0.07	ab	2.53
10% frijol	2.71 ± 0.01	2.52 ± 0.04	bc	2.62
20% frijol	2.80 ± 0.01	2.61 ± 0.02	cd	2.70
30% frijol	2.89 ± 0.02	2.70 ± 0.01	de	2.79
40% frijol	2.93 ± 0.02	2.74 ± 0.02	e	2.84
45% frijol	3.43 ± 0.04	3.21 ± 0.18	f	3.32

ANOVA de dos vías (variable dependiente: contenido de ácido fítico):

- Formulación: $F(6,28) = 127.76$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.965$
- Tratamiento (harinas crudas vs. extruidas-expandidas): $F(1,28) = 96.10$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.774$
- Interacción Formulación × Tratamiento: $F(6,28) = 0.051$, $p = 0.999$, $\eta^2 = 0.011$
- Ajuste del modelo: $R^2 = 0.969$ (R^2 ajustado = 0.954)

*** Prueba HSD de Tukey (α = 0.05). Las formulaciones que comparten al menos una letra no presentan diferencias significativas**

Nota: Los valores de ácido fítico se expresan como **mg de ácido fítico/g de peso seco (PS)**. Las medias marginales corresponden a las medias estimadas obtenidas mediante el ANOVA de dos vías considerando ambos tratamientos de procesamiento. No se detectó una interacción significativa entre la formulación y el tratamiento, lo que indica que la extrusión-expansión produjo una reducción similar del contenido de ácido fítico en todas las formulaciones.

Apéndice 11.11. Preferencia del consumidor y respuestas posteriores a la información sobre la composición nutricional de las botanas elaboradas con maíz azul y *Phaseolus coccineus* (n = 81).

Variable	Categoría	n	%
Muestra preferida	Maíz azul (control)	45	55.6
	30% frijol	10	12.3
	40% frijol	18	22.2
	45% frijol	8	9.9
Cambio de percepción después de conocer la información	1	4	4.9
	2	3	3.7
	3	2	2.5
	4	17	21.0
	5	21	25.9
	6	24	29.6
	7	10	12.3
Disposición a consumir el producto	1	1	1.2
	2	4	4.9
	3	5	6.2
	4	13	16.0
	5	25	30.9
	6	20	24.7
	7	13	16.0
Disposición a comprar el producto	1	2	2.5
	2	3	3.7
	3	10	12.3
	4	12	14.8
	5	27	33.3
	6	15	18.5
	7	12	14.8

La preferencia corresponde a la muestra seleccionada por cada consumidor al finalizar la prueba sensorial. Las preguntas sobre cambio de percepción, disposición a consumir y disposición a comprar se evaluaron mediante una escala ordinal de 0 (muy negativa) a 6 (muy positiva), después de proporcionar información sobre la composición del producto.

XII. RESUMEN BIOGRÁFICO

Victor Andrés Ayala Rodríguez

Candidato para el grado de Doctor en Manejo y Aprovechamiento Integral de Recursos Bióticos

Tesis:	DESARROLLO DE BOTANA FUNCIONAL DE TERCERA GENERACIÓN ELABORADA CON INGREDIENTES AUTÓCTONOS: MAÍZ AZUL (*Zea mays* L.) Y FRIJOL AYOCOTE (*Phaseolus coccineus* L.)
Campo de estudio:	Ciencias biológicas.
Datos personales:	Nacido en Monterrey, Nuevo León, el 19 de diciembre de 1991. Hijo de Humberto Ayala Ojeda y María Guadalupe Rodríguez Caballero.
Educación:	Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Grado obtenido Licenciado en Nutrición en 2019 con Mención Honorífica y Primer Lugar de la Generación. Grado obtenido Maestro en Ciencias en Nutrición en 2022 con Mención Honorífica y Segundo Lugar de la Generación.
Experiencia profesional:	Profesor de asignatura de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 2022. Docente de licenciatura en la Facultad de Salud Pública y Nutrición y la Facultad de Ciencias Biológicas, y de posgrado en la Facultad de Agronomía. Participante en proyectos de investigación desarrollados en el Parque de Investigación e Innovación Tecnológica (PIIT).

XIII. ARTÍCULOS

RESPYN
Revista Salud Pública y Nutrición

Artículo de Revisión

UNDERUTILIZED MEXICAN CROP, RUNNER BEAN (PHASEOLUS COCCINEUS): A COMPREHENSIVE REVIEW OF NUTRITIONAL AND FUNCTIONAL IMPLICATIONS.

Cultivo mexicano subutilizado, frijol corredor (Phaseolus coccineus): una revisión integral de sus implicaciones nutricionales y funcionales.

Ayala-Rodríguez Víctor Andrés [1], Vázquez-Rodríguez Jesús Alberto[2], Urías-Orona Vania[2], Neder-Suárez David[3], Heredia-Olea Erick[4], Amaya-Guerra Carlos Abel[1].

1 Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Alimentos, México. 2 Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Salud Pública y Nutrición, Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública, México. 3 Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas, Laboratorio de Alimentos, México. 4 Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Centro de Biotecnología FEMSA, México.

ABSTRACT

Introduction: The scarlet runner bean (Phaseolus coccineus L.), also known as the runner or ayocote bean, is one of five Phaseolus species domesticated in Mesoamerica. It holds considerable economic importance, ranking third after P. vulgaris and P. lunatus. Despite its relevance, research on its bioactive compounds and potential health benefits still needs to be conducted. **Objective:** This review explores the nutritional composition, anti-nutritional factors, and bioactive compound levels of P. coccineus, emphasizing their implications for consumer health. **Material and method:** A comprehensive literature review, following PRISMA 2020 guidelines, was conducted across electronic databases, identifying 163 relevant studies. After applying inclusion and exclusion criteria, 13 studies were selected for analysis. **Results:** These studies highlighted P. coccineus as a potential source of nutraceutical properties and innovative food products aimed at enhancing nutritional quality. The bioactive compounds, including antioxidants and peptides, suggest benefits in preventing chronic diseases and promoting food security. **Conclusion:** The Ayocote bean (Phaseolus coccineus) is an underutilized legume with notable nutraceutical potential, rich in bioactive compounds that support oxidative stress reduction, immune modulation, and cardiovascular health. Promoting its use benefits food security, rural economies, and germplasm preservation, highlighting its promise for functional foods and dietary supplementation.

Key words: Phaseolus coccineus, nutraceutical properties, incorporating pulses.

RESUMEN

Introducción: El frijol ayocote (Phaseolus coccineus L.), también conocido como frijol escarlata o corredor, es una de las cinco especies de Phaseolus domesticadas en Mesoamérica. Es de importancia económica, ocupando el tercer lugar después de P. vulgaris y P. lunatus. A pesar de su relevancia, la investigación sobre sus compuestos bioactivos y beneficios para la salud es limitada. **Objetivo:** Esta revisión explora la composición nutricional, los factores antinutricionales y los compuestos bioactivos de P. coccineus, con énfasis en sus implicaciones para la salud. **Material y Método:** Se realizó una revisión exhaustiva siguiendo las directrices PRISMA 2020, identificando 163 estudios en bases de datos electrónicas, de los cuales 13 cumplieron los criterios de inclusión para el análisis. **Resultados:** Los estudios destacan a P. coccineus como fuente de propiedades nutracéuticas y productos alimentarios innovadores que mejoran la calidad nutricional. Los compuestos bioactivos, como antioxidantes y péptidos, sugieren beneficios para la prevención de enfermedades crónicas y la seguridad alimentaria. **Conclusión:** Sin embargo, se requiere más investigación para comprender plenamente la composición de compuestos fenólicos, péptidos bioactivos y factores antinutricionales en P. coccineus, promoviendo su uso como alimento funcional y novedoso ingrediente dietético.

Palabras clave: Phaseolus coccineus, propiedades nutraceúticas, incorporación de leguminosas.

Correspondencia: Carlos Abel Amaya Guerra carlos.amayagr@uanl.edu.mx

Recibido: 12 de octubre 2024, aceptado: 18 de diciembre 2024

©Autor2024



Citation: Ayala-Rodríguez V.A., Vázquez-Rodríguez J.A., Urías-Orona V., Neder-Suárez D., Heredia-Olea E., Amaya-Guerra C.A. (2024) Underutilized Mexican crop, runner bean (Phaseolus coccineus): A comprehensive review of nutritional and functional implications. *Revista Salud Pública y Nutrición, 23* (4), 1-14. https://doi.org/10.29105/respyn23.4-831

Significance

Beans are considered an important staple food in the Mexican diet. The runner bean is a significant source of nutrients and demonstrates functional potential. Additionally, it possesses characteristics suitable for large-scale cultivation, which could encourage its consumption. Despite this, it is not widely cultivated, and its commercial use remains highly limited. To address these challenges and opportunities, the development of raw materials and new food products derived from the runner bean could contribute to promoting the consumption of this legume, which possesses important functional properties.

Introduction

The genus Phaseolus is widely cultivated and consumed across Africa, India, Mexico, as well as various countries in Central and South America. Presently, it is distributed across all five continents and constitutes a crucial element of many diets. In these regions, it is ingrained in the eating habits of the population, primarily consumed in its whole grain form (Chávez-Mendoza & Sánchez, 2017). The Phaseolus seeds are an essential part of the habitual diet of most of the world's population because it presents a considerable source of protein, complex carbohydrates and fiber. Moreover, they are acknowledged as the second protein source in East and Southeast Africa and rank as the fourth in America, and it comprises various wild and cultivated species, including the common bean (P. vulgaris), lima bean (P. lunatus), tepary bean (P. acutifolius), perennial bean (P. polyanthus), and runner bean (P. coccineus) (Hernández-Delgado et al., 2015). Furthermore, its world production is 27 million tons annually, with a harvest area of more than 34 million hectares (FAOSTAT, 2020).

Different types of legumes are cultivated worldwide, exhibiting diverse shapes and sizes. Beans of the genus Phaseolus are pulse crops relevant to human and animal consumption. The common bean (Phaseolus vulgaris) is the most important species worldwide, followed by the lima bean (Phaseolus lunatus), while the runner bean or scarlet runner bean (Phaseolus coccineus), commonly known as ayocote bean, is the third most significant. The common and runner bean crops were domesticated independently within two centers of diversity. This gave rise to two gene pools, Mesoamerican and Andean, with diverse characteristics because of their reproductive and geographic isolation (Sinkovič et al., 2019). Phaseolus coccineus plants are long-day climbing vines, ideal for the summer months and typically exhibit vigorous growth, varying from indeterminate to determinate depending on the variety. While the plants may be damaged by frost at low temperatures, their underground tap roots can survive and regenerate once temperatures increase. Immature pods, green seeds, and mature dry seeds are commonly consumed. The tuberous roots can also be utilized, but caution should be exercised as they may be toxic (Kalloo, 1993).

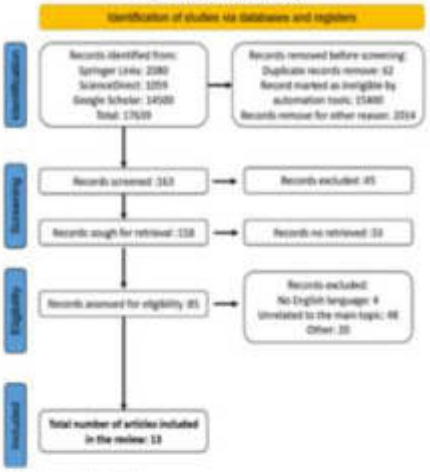
Phaseolus seeds are a fundamental part of the human diet, though only a few species are widely commercialized, leaving opportunities to explore varieties that offer health benefits beyond essential nutrition. One such species is the runner bean (Phaseolus coccineus), particularly the purple variety, which is noted for its high content of bioactive compounds, including flavonoids (Alvarado-López et al., 2019). These compounds have been associated with potential health benefits, such as lowering cholesterol and improving glucose tolerance, due to their anti-inflammatory and antioxidant activities, thereby enhancing nutritional status (Mullins & Arjmandi, 2021). Despite its promising functional profile, there is limited evidence regarding the concentration of phenolic compounds, bioactive peptides, and anti-nutritional factors in P. coccineus. Given its nutritional and social significance, further research is required to identify bioactive substances that could play a role in preventing chronic degenerative diseases through their nutraceutical properties. This review aims to summarize the current evidence regarding the nutritional composition and the content of bioactive compounds in the runner bean, evaluating its potential health benefits and supporting its use as a functional food and novel dietary ingredient.

Material and method

A comprehensive search was conducted according to the PRISMA 2020 statement (Page et al., 2021) across the electronic databases ScienceDirect, Springer Link, and Google Scholar from inception through 2025. The identification and selection of relevant studies were based on specific keywords, including "benefits," "health," "compounds," "functional," "nutrition," "novel food," and "application." The inclusion criteria consisted of: (1)

studies published in English; (2) relevance to the primary research subject; and (3) availability to digital access. Exclusion criteria encompassed: (1) irrelevance to the main topic; (2) failure to address the research subject; and (3) records such as dissertations, encyclopedias, book chapters, book reviews, mini-reviews, short communications, conference abstracts, conference papers, protocols, reference work entries, theses, or literature reviews (Figure 1). To ensure alignment with the study's focus, all titles and abstracts were reviewed, and those meeting the inclusion criteria were fully analyzed. Additionally, reference lists of retrieved articles were manually screened for further eligible studies.

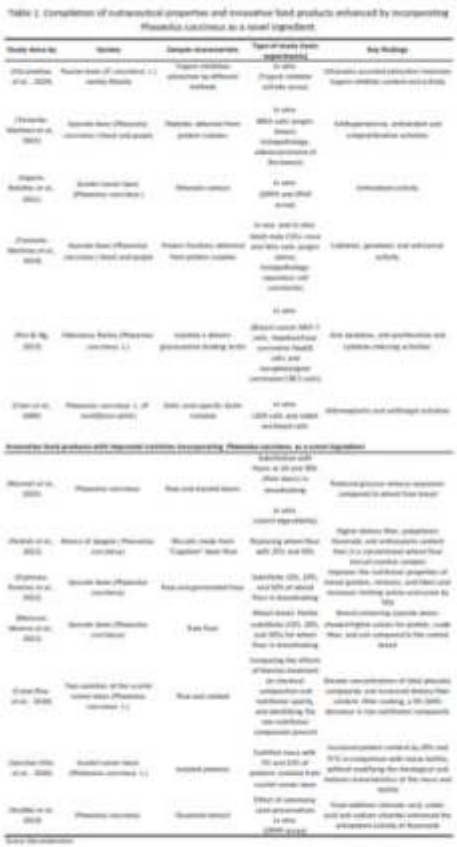
Figure 1. Flowchart on the stages of including the studies in the review (PRISMA 2020)



Source: Own elaboration

Results

A total of 163 records were initially identified as relevant to the review's objective. Of these, 45 were excluded for not fulfilling the inclusion criteria, and 33 could not be accessed for online retrieval. Furthermore, 72 records were excluded as they either needed to align with the review's primary focus, were not in English, or met the exclusion criteria. The remaining articles were carefully evaluated to ensure they met the abovementioned criteria. Ultimately, 13 articles were included for analysis (Table 1), with 6 addressing nutraceutical properties and 7 focusing on innovative food products incorporating P. coccineus as a novel ingredient to enhance nutritional quality.



Agronomic significance of Phaseolus coccineus

Pulses are a rich source of protein, complex carbohydrates, fiber, vitamins, minerals, and phytochemicals. Due to their high lysine and folate levels, many people worldwide rely on pulses alongside cereals as a primary source of protein. Combining pulses with cereals in composite flour enhances their nutritional value. Notably, pulses and cereal grains share comparable levels of total carbohydrates, fats, niacin, riboflavin, thiamine, and pyridoxine.

Globally, there are around 150 recognized bean species. In Mexico exclusively, there are roughly 65 varieties, with 52 falling under the genus Phaseolus, and 31 species are native to the region (Romero-Arenas et al., 2013). The Phaseolus genus is a significant crop because of its high protein content ranging from 20 to 50% and carbohydrate content ranging from 50 to 65%. Among legumes, Phaseolus coccineus holds particular significance because it can be grown without fertilization, thrives in low temperatures, and withstands water stress. The wild forms of the runner bean (P. coccineus) can be found across the area stretching from Chihuahua in Mexico to Panama. Limited archaeological evidence also suggests that this region served as the original center of origin for P. coccineus. Additionally, all plant parts, including flowers, seeds, pods, and foliage, are usable (González-Cruz et al., 2022). The runner bean is a perennial species that can live up to 10 years, although outside of Central America and Mexico, it is grown annually since it cannot survive frost. It is native to Mexico, Guatemala, and Honduras, and the wild forms are probably not all ancestral. In Mexico and Central America, the most remarkable diversity of P. vulgaris and P. coccineus is conserved as part of traditional cultivation, backyard, and forest systems (Rodriguez et al., 2013).

Nutritional composition

Regarding nutrition, pulses play a crucial role as a significant protein source, even though they may lack sufficient sulfur-containing amino acids and tryptophan. However, pulses contain higher lysine, arginine, glutamic acid, and aspartic acid than cereal grains. Phaseolus coccineus beans predominantly contain carbohydrates and proteins, positioning them as a well-known protein source in developing nations. Additionally, they are rich in dietary fiber, and contain modest amounts of lipids (Table 2). In addition to their well-established nutritional advantages, studies have linked the consumption of pulses to potential protective or therapeutic effects on chronic health conditions, including cardiovascular diseases, diabetes, cancer, overweight and obesity (Ansari et al., 2023; Marinangeli & Jones, 2011).

Table 2. Nutritional composition of dry and raw seeds by *Phaseolus* species

Composition (g/100g)	*Phaseolus* species		
	P. coccineus	*P. lunatus*	*P. vulgaris*
Moisture	11.2	9.62	10.16
Ashes	4.27	3.48	3.78
Lipids	1.87	1.6	2.22
Protein	17.28	19.68	20.48
Carbohydrates	65.39	65.62	62.57
Fiber	4.18	5.21	5.02

Adapted from: Alcázar-Valle *et al.* (2021).

Protein levels and amino acid composition vary due to factors such as variety, germination, environmental conditions, and fertilizer application. Pulses have protein levels nearly double those found in cereals. These pulse proteins are divided into two primary fractions: albumin and globulin. The predominant storage proteins in pulse seeds are globulins, making up 35–72% of the total protein, while albumins constitute the remaining protein fraction (Shevkani et al., 2019). Globulin proteins contain higher levels of glutamine, aspartic acid, arginine, and lysine. Conversely, albumins typically play a physiological role in smaller quantities than globulins, comprising only 15–25% of the total seed protein (Luna-Vital et al., 2015). Albumins contain elevated cystine, methionine, and lysine levels compared to the globulin fractions. Globulins possess a densely packed, rigid structure attributed to the presence of disulfide bonds and hydrophobic interactions. Among the four primary protein classes in pulses, albumins stand out for their ability to dissolve in water (Singh, 2017).

Bioactive compounds

Bioactive compounds in plants are diverse; their presence depends on environmental conditions. Most of them are generated through the secondary metabolism of plants, and their function is mainly as a reserve, defense or interaction with other plants, microorganisms and insects. The synthesis of these compounds is influenced by geographic location, climatic, genetic factors, and interaction with other species. Therefore, it is essential to maintain biodiversity in crops to ensure permanent access to them. These compounds differ in chemical nature; they have different molecular weights, polarity, solubility, bioavailability, metabolic pathways, and excretion. This will affect the distribution and

concentrations of each compound at the target sites (Yeshi et al., 2022).

Phenolic compounds of pulses play a role in the overall antioxidant effects, counteracting free radicals, binding to metal catalysts, triggering antioxidant enzyme activity, and hindering oxidases. The seed coat and cotyledons in Phaseolus seeds exhibit distinct polyphenol compositions, flavonoid levels, and antioxidant activities (Table 3). Notably, the seed coat displays a higher average content of these compounds than the cotyledons. As a result, there is growing attention on utilizing the seed coat as a valuable dietary supplement and for applications within the processed food sector (Capistrán-Carabarin et al., 2019). Currently, scientific evidence exists regarding the advantageous effects on health derived from Phaseolus bean consumption. For instance, certain organic acids act as surfactants for other molecules, while polyphenols can enhance saponin's water solubility. In turn, this augmentation facilitates the transmembrane conveyance of therapeutic molecules (Zhao et al., 2020). Flavonoids and saponins contained in black beans (Phaseolus vulgaris) may diminish cholesterol absorption by impeding the micellar solubility of cholesterol (Chávez-Santoscoy et al., 2013). Conversely, b-carotene heightens the bioavailability of lycopene within human plasma, and quercetin-3-glucoside curtails the absorption of anthocyanins. Consequently, it is advisable to combine the consumption of pulses and vegetables to support synergistic effects that could potentially amplify beneficial attributes. However, it is worth noting that antagonistic interactions could also emerge (Chávez-Santoscoy et al., 2013).

Table 3. Content of phenols, flavonoids, anthocyanins and in vitro antioxidant activity of dry and raw seeds of Phaseolus species

	Phaseolus species	
	P. coccineus	*P. vulgaris*
Seed Coat		
Total Polyphenols[1]	152.4	81.7
Flavonoids[2]	22	10.6
Anthocyanins[3]	0.15	5.12
Antioxidant activity[4]	1169.4	874.2
Cotyledons		
Total Polyphenols[1]	2.41	1.86
Flavonoids[2]	0.3	0.3
Antioxidant activity[4]	8.11	7.41

[1]mg gallic acid equivalents per gram of dry sample; [2]mg catechin equivalents per gram of dry sample; [3]mg of cyanidin-3-glucoside per gram of dry sample; [4] micromoles of Trolox equivalents per gram of dry sample. Adapted from: Capistrán-Carabarin et al. (2019).

The coloration of bean seeds arises from the presence and concentration of various compounds such as flavonols (predominantly kaempferol and quercetin), glycosides, anthocyanins, condensed tannins (proanthocyanidins), and phenolic acids (including ferulic, synaptic, chlorogenic, and hydroxycinnamic acids). Notably, the highest proportions of these constituents are observed in beans with purple, black, and brown hues (Alcázar-Valle et al., 2020). Alvarado-López et al., (2019) evaluated the total phenolic content in four runner bean seeds varieties. They significantly exhibited variations across the different cultivars, with the decreasing order being purple, followed by black, brown and finally white (Table 4). Previous comparative analyses on diverse runner bean types have generally shown that white beans tend to have lower total phenolic content compared to certain colored beans. Discrepancies in total phenolic content among studies of beans can be attributed to factors such as genetics, farming practices, harvest maturity, storage conditions, and the solvents employed during extraction (Orak et al., 2016).

Table 4. Total phenolic content, total flavonoids and total anthocyanins for four varieties of *Phaseolus coccineus*

	Variety			
	Purple	Black	Brown	White
Total phenolics[1] (mgGAE/kg)	2075.91	1732.24	1561.25	1292.24
Total flavonoids[2] (mgQE/kg)	1612.96	1501.3	1248.75	1084.51
Total anthocyanins[3] (mgCGE/kg)	1193.27	1082.21	278.92	2.2

[1]Expressed as milligram of gallic acid equivalent/kg (mg GAE/kg).
[2]expressed as milligram of quercetin equivalent/kg (mgQE/kg).
[3]expressed as mg of cyanidin-3 glucoside equivalents/kg (mg CGE/kg).
Adapted from: Alvarado-López *et al*., (2019).

The runner bean is a rich source of vegetable protein. It can be used to supplement the deficiency of different cereals, due to its content of essential amino acids (lysine, arginine, glutamic acid, and aspartic acidamides), fiber, vitamins and minerals such as iron, potassium, magnesium and zinc, among others. It is even considered as one of the primary sources of phenolic acids (hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids), flavonoids (flavonols, flavones, dihydroflavonols, flavanones, isoflavones and isoflavonones), lignans and other polar compounds with possible health benefits such as slowing the development of cancerous tumors and contribute antibacterial, antiviral, antispasmodic and anti-inflammatory properties (Aquino-Bolaños et al., 2021).

The anticancer activity of beans is mainly related to the presence of high amounts of resistant starch, soluble and insoluble dietary fiber, and phenolic compounds, which suggests that their regular consumption may reduce the risk of breast, colon, and of prostate. Likewise, it has been reported that due to its high fiber content it could help control diabetes by reducing the generation of insulin and glucose levels that enter the bloodstream. In addition, patients who have non-insulin-dependent diabetes can prevent the need for insulin by consuming beans in their regular diet (Jaiswal, 2020).

It has been shown that phenolic components have nutraceutical potential in some common bean species (P. vulgaris) and varieties of P. coccineus and P. lunatus. In addition, there is evidence that native bean species are essential because they contain critical nutritional components for food security and supplementation (e.g., predominant free amino acid content in beans, arginine, aspartic acid, asparagine, glutamic acid, and leucine). These, in addition to playing a key role in structural and physiological functions, are important metabolite precursors, and can also act as antioxidants, which could help reduce oxidative stress, such as tryptophan, phenylalanine, isoleucine or proline (Alcázar-Valle et al., 2021).

Anti-nutritional factors

Anti-nutritional factors refer to compounds commonly found in food items that can harm to humans or interfere with nutrient absorption in the body. These factors exist in various foods in different quantities, depending on the type of food. Many plants and vegetables contain anti-nutrients such as oxalate and phytate and toxic substances like cyanide, nitrate and phenols (Figure 2). These anti-nutrients can negatively impact the absorption of essential nutrients and micronutrients in the body. Nevertheless, some anti-nutrients may have beneficial health effects when present in small amounts (Thakur et al., 2019).

Figure 2. The anti-nutritional factors can be categorized into two primary groups.



Source: Own elaboration

While pulses have a valuable nutritional content, specific individuals decline their consumption due to anti-nutritional elements. Major anti-nutritional factors include phytic acid, lectins, enzyme inhibitors (trypsin, chymotrypsin and amylase), saponins, oligosaccharides, and tannins. For an extended period, these substances have been recognized for their negative physiological impacts on nutrition and health. At certain levels of concentration, they have the potential to impair the digestibility of proteins and carbohydrates and can even turn toxic at significantly elevated concentration. The effects of consuming these substances can be either beneficial or detrimental, contingent upon the quantity ingested. Some of these compounds have exhibited pharmacological effects in studies involving both cell cultures and animal experiments (Boye et al.,

2010; Lacaille-Dubois & Melzig, 2016). Several advantageous attributes associated with anti-nutritional substances include properties like chemoprevention, inhibition of cell growth, prevention of mutations, antioxidation, cholesterol reduction, blood sugar regulation, blood pressure control, and prevention of blood clotting. These substances are collectively referred to as bioactive compounds and are known to mitigate the risk of various diseases, including chronic conditions like cardiovascular disorders (Sánchez-Arteaga et al., 2015; Singh et al., 2017).

Trypsin inhibitors, phytates, and α-galacto-oligosaccharides can reduce nutrient bioavailability and cause digestive issues. Trypsin inhibitors block the enzyme trypsin, preventing protein breakdown and amino acid absorption, while phytates chelate essential minerals like zinc, iron, calcium, and magnesium, reducing their absorption. α-Galacto-oligosaccharides are not broken down in the human gut due to the absence of the enzyme α-galactosidase, leading to gut microbiota ferment, which produces gases and causes bloating and flatulence. Removing these components improves the nutritional quality of beans (Njoumi et al., 2019). However, earlier research has revealed a positive correlation between lectins originating from the genus Phaseolus and antioxidant activity, as demonstrated by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay (Alcázar-Valle et al., 2020). Hence, inferring a link between lectins and antioxidant functionality is plausible, which might contribute to mitigating certain inflammation-associated disorders. This suggests a high potential to be used for these lectins to serve as valuable constituents for nutraceutical preparations, given their chemical composition and the potential they hold for fostering biological activities that could be harnessed in product development.

From an anti-nutritional perspective, the insufficient protein digestibility in Phaseolus beans poses a significant nutritional challenge. This fact is frequently linked to trypsin inhibitors, which lower protein effectiveness, decrease food assimilation, and may trigger occupational allergies (Alcázar-Valle et al., 2020). Studies have shown that Phaseolus proteins are not easily broken down (hydrolyzed), which may contribute to their allergenic potential. Processing techniques can alter or denature certain proteins responsible for causing allergic reactions. Additionally, when heat and enzymatic hydrolysis are combined to produce protein hydrolysates, the allergenic potential of the protein is reduced. Nevertheless, the safety of these hydrolysates depends on the extent of hydrolysis and the presence of allergenic fragments within the protein hydrolysate (Mojica et al., 2017).

Lectins

Initial research on lectins derived from different types of runner beans revealed that the lectin found in Phaseolus coccineus specifically binds to N-acetyl-D-galactosamine (Nowaková & Kocourek, 1974). Subsequent investigations in 1978 uncovered that the lectin extracted from runner beans is structured as a tetramer consisting of four similar subunits, each with a weight of around 30 kDa. This lectin contains 20% glucosamine and 8% sugar, and its biological function depends on the presence of Ca+2 and Mg+2 ions. N-acetylgalactosamine, conalbumin, and ovalbumin block it. Moreover, it induces the agglutination of erythrocytes without showing any specific binding to antigens and does not stimulate the proliferation of human peripheral lymphocytes (Ochoa & Kristiansen, 1978).

Numerous studies have indicated that lectins' structural and biological attributes are influenced by the variety of the plant and its cultivation location. Hemagglutination activity appears to be affected by the metallic ions found in the lectin and other factors such as species, variety, and cultivation locations. For instance, in lectins extracted from Phaseolus coccineus grown in China, the presence or absence of metallic ions does not affect hemagglutination activity, whereas in lectins extracted from Phaseolus coccineus originating from Oaxaca, there is a correlation between the presence of metallic ions and hemagglutination activity (Chen et al., 2009; Feria et al., 1996).

Strategies for reduction anti-nutritional compounds

Anti-nutritional factors are chemical compounds produced in natural food and/or feedstuffs through the normal metabolism of species and various mechanisms that have effects that oppose optimal nutrition. Eliminating or minimizing anti-nutritional factors is crucial to enhancing the nutritional value and efficient utilization of legume grains by the population. Therefore, it is imperative to develop

processing techniques to ensure their optimal utilization.

The anti-nutritional compounds found in pulses typically diminish their palatability and hinder protein digestibility and mineral bioavailability, consequently limiting their biological value and acceptance in the diet. Therefore, it is essential to process pulses adequately before consumption. Most of these compounds are concentrated in the seed coat and heat-sensitive. Various methods can significantly reduce their levels, including milling, cooking, germination, fermentation and heat processing (Salim et al., 2023). These techniques not only enhance nutrient bioavailability by deactivating anti-nutritional compounds but also improve pulses flavor and overall acceptability. Selecting the appropriate methods for removing or reducing these compounds necessitates understanding their chemical structure, distribution within seed fractions, biological effects, heat sensitivity, and water solubility. Typical methods employed to reduce or eliminate anti-nutritional compounds in pulses include heating, extrusion cooking, milling, dehulling, soaking, sprouting, fermentation, and cooking (Kumar et al., 2022).

While the effects of conventional processing methods on the levels of anti-nutritional factors (like phytate, protein inhibitors, phenolics, tannins, lectins, saponins, among others) have been extensively studied (Patterson et al., 2017), there is a need for novel methods to eliminate these factors. Despite pulses being used in various indigenous products, their functional attributes and potential health benefits have not been fully explored (N. Singh, 2017).

Phaseolus coccineus a source of biologically active peptides

New scientific findings propose that food proteins not only function as essential nutrients but also have the ability to regulate the body's physiological processes. Since the initial publication of the definition of bioactive peptides, there has been ongoing progress in enhancing understanding of these molecules. Research on peptides derived from food has continuously advanced since 1995 when defined bioactive peptides as inactive fragments within protein sequences that exhibit their bioactivity after enzymatic release and interaction with the appropriate receptors in the body. The bioactivity of these peptides encompasses the regulation of various bodily functions, such as antioxidative, antibacterial, immunomodulating, and antithrombotic properties, the reduction of blood pressure, the reduction of blood glucose levels, and cholesterol and displaying, mineral binding functions among others (S. Li et al., 2019). The main control of these physiological functions is carried out by certain peptides that are encoded within the original protein sequences.

Multiple studies suggest that the protein and peptides found in P. coccineus possess significant nutraceutical potential due to their antioxidant, anticancer, antifungal, and antibacterial properties. Phaseolus plants are known to synthesize a variety of antifungal proteins and peptides, making them a focal point of research due to the abundance of biologically active compounds they produce (González-Cruz et al., 2022). These antifungal proteins and peptides have been isolated from various leguminous species. Ngai & Ng, (2005), isolated and purified an antifungal protein with an N-terminal sequence from small scarlet runner beans (P. coccineus) seeds, appoint as phaseococcin. This protein exhibited a molecular mass of 5422 Da determined by mass spectrometry, displays a wide range of functions, including antimicrobial, antiproliferative, and inhibition activities, which resembles a defensin. It inhibits the growth of mycelium in various fungi, as well as the proliferation of several Bacillus species and leukemia cell lines HL60 and L1210. Additionally, it suppresses the activity of HIV-1 reverse transcriptase.

The Phaseolus genus contains significant amounts of lectins, which are carbohydrate-binding proteins of non-immune origin commonly found in legumes. Moreover, they exhibit various significant biological activities, including antineoplastic, immunomodulatory, and antifungal properties. A sialic acid-specific lectin obtained from Phaseolus coccineus seeds was isolated and analyzed by Chen et al., (2009). This lectin, a 56 kDa dimer (comprising subunits weighing 29831 Da each), is a non-metalloprotein. Its N-terminal sequence, consisting of 23 amino acids, exhibited notable antifungal activity against certain plant pathogenic fungi (C. albicans, P. italicum), and inhibited the growth of H. maydis, Rhizoctonia solani, G.

sanbinetti, and S. sclerotiorum. Additionally, experiments assessing cytotoxicity showed that the lectin exhibited significant toxicity towards L929 cells, inducing apoptosis in a dose-dependent manner.

The runner bean (Phaseolus coccineus) shows potential for nutraceutical applications due to its high protein content (around 30%). Teniente-Martinez et al., (2019) investigated the genotoxic and cytotoxic effects of protein isolates and peptides from black and purple runner bean varieties. Using a simulated gastrointestinal digestion process with pancreatin and trypsin, they evaluated the anticancer activity of protein fractions. Results indicated that molecular mass influences their effects on cancer cells, with a synergistic increase in cytotoxicity when combined with daunorubicin. Protein isolates from both varieties also showed moderate genotoxic effects and inhibitory effects against SiHa cancer cells.

On the other hand, Teniente-Martínez et al., (2022) were investigated to establish a potential correlation between the antihypertensive, antioxidant, and anticancer activities against MDA breast cancer cells of peptides extracted from two different runner bean types: black and purple varieties. They aimed to identify potentially beneficial peptides derived from the protein isolate of runner beans. They have subjected the isolate to a simulated gastrointestinal digestion process, mimicking the natural breakdown during digestion. This simulated process utilized proteinases sourced from animal tissues, namely pancreatin and trypsin obtaining peptides similar to those generated through physiological digestion. It was observed that all peptides demonstrated antihypertensive effects. There was a notable increase in antioxidant activity, with the peptides sourced from the purple bean hydrolysate showing an average 1.7 times higher activity compared to those from the black bean hydrolysate. Moreover, peptides obtained from both purple and black bean hydrolysates exhibited a certain degree of inhibition on MDA cell proliferation. These peptides from both types of bean hydrolysates display suitable antihypertensive, antioxidant, and antiproliferative capabilities. However, functional attributes and biological effects of bioactive peptides are influenced by factors such as the type of amino acids, their sequence, and the molecular weight of the peptides (Peighambardoust et al., 2021).

Innovative food products

Pulses contain various polyphenolic compounds, including flavonoids, tannins, anthocyanins, and phenolic acids like p-coumaric, ferulic, and cinnamic acid. While typically consumed as dry seeds, pulses can also be eaten as green pods or used as flour. Pulses flour enhances the nutritional value of food by increasing protein and fiber content and offering functional properties like solubility, gelling, and emulsification, which improve food texture (Schmidt & Oliveira, 2023). Studies show that incorporating pulses flour and bran into snacks enhances sensory qualities such as flavor and texture. Additionally, pulses can partially or fully replace cereals in extruded snack production, a growing market for healthy, minimally processed foods (King et al., 2024).

Previous research has investigated the incorporation of runner bean flour (10-20%) into bread formulations. Findings revealed that bread made with this substitution showed increased mineral, fiber, and nutrient content without negatively impacting digestibility or sensory properties when the addition remained below 20% (Mariscal-Moreno et al., 2021). Similarly, adding isolated proteins from runner beans enhanced the nutritional quality of nixtamalized corn tortillas without compromising rheological, textural, or sensory attributes (Sánchez-Villa et al., 2020). Additionally, α-galactosidase, isolated from runner beans, demonstrated high activity and potential industrial applications, such as improving sucrose crystallization in beet sugar syrups and enhancing the nutritional value of soy beverages by hydrolyzing raffinose and other oligosaccharides (Du et al., 2013).

The runner bean can be utilized to enhance the nutritional profile of baked products. Espinosa-Ramírez et al., (2022) demonstrated that incorporating runner bean flour into wheat flour bread at concentrations of 10%, 20%, and 30% increased fiber, minerals, and protein content compared to bread made solely with wheat flour. Protein quality, measured by the limiting amino acid score, improved by up to 70%, thanks to the essential amino acids present in the bean flour. However, lower substitution levels are recommended to maintain dough stability and sensory attributes such as color, flavor, and texture.

Pedrali et al., (2022), have explored the nutritional and phytochemical attributes of other widely available and commercially popular bean varieties such as Borlotto and Cannellino (P. vulgaris) and Bianco di Spagna (P. coccineus). Moreover, in order to determine the potential of "Copafam" for creating innovative and distinctive products, the effects of incorporating bean flour into a prototype food product (biscuits) on sensory attributes and consumer satisfaction were examined. They found that "Copafam" bean flour biscuits had elevated levels of dietary fiber, secondary metabolites like polyphenols and anthocyanins, and displayed substantial flavonoid content, leading to notable antioxidant properties. These biscuits were characterized by a darker hue and a crispy texture and were well-received by consumers. This study shows an initial exploration, paving the way for further research into alternative applications of bean flour with the goal of establishing it as a valuable resource in the innovative food industry (Rațu et al., 2023).

Phaseolus coccineus bean flour is regarded as a substitute ingredient suitable for specific dietary needs due to its elevated protein content (Corzo-Ríos et al., 2020). Göksel Saraç et al., (2022), evaluated the utilization of scarlet runner bean (Phaseolus coccineus) flour with high protein content to produce a protein-rich cake suitable for vegan consumers. They aimed to determine the properties of the resulting product and analyze consumer preferences. Five different vegan cakes were prepared by incorporating various concentrations of scarlet runner bean flour into wheat flour without any animal products. Analyses were conducted on the baking properties, physicochemical characteristics, biochemical composition, texture, and sensory attributes of the vegan cakes. Increasing the proportion of scarlet runner bean flour resulted in higher levels of protein content, total phenolic compounds, and antioxidant properties observed in the cakes. Furthermore, including scarlet runner bean flour led to improvements in the cake formulation's technological, textural and sensory aspects.

The incorporation of legumes into new food options and the development of formulations, such as extruded snack products containing pulse flour, are appealing food options and are well accepted (Schmidt & Oliveira, 2023). The evaluation of numerous extruded snack formulations made from various pulses (green pea and chickpea) has been conducted (Proserpio et al., 2020). These products, incorporating legume seeds, offer a rich source of fiber and serve as a valuable alternative to meet the increasing global demand for high-fiber and gluten-free products. From a sustainability perspective, using legumes can help reduce the environmental impact of this food category. Furthermore, they could serve as a sustainable source of fiber and high-quality proteins, providing a valuable alternative to products available in the market (Proserpio et al., 2020; Saint-Eve et al., 2019).

Conclusions

The Ayocote bean (Phaseolus coccineus) emerges as a valuable yet underexploited legume with considerable nutraceutical potential. This legume is a rich source of bioactive compounds, including phenolic components and antioxidant peptides, which play critical roles in mitigating oxidative stress, modulating immune responses, and promoting cardiovascular and metabolic health. Considering its robust phytochemical composition and functional attributes, the Ayocote bean holds significant promise in addressing food security, dietary supplementation, and the development of functional foods with health-promoting benefits. This would help encourage both the cultivation and consumption of Ayocote beans, providing direct benefits to the food and economic security of rural communities, while also safeguarding unexplored germplasm with potential health advantages and preserving the local gene pool.

Pulses provide substantial nutritional, environmental, and health benefits, yet further research is required to optimize their application in innovative food products. One of the main obstacles to their broader adoption is the limited awareness of their diverse properties, particularly in local varieties such as the runner bean (Phaseolus coccineus). Challenges such as low protein digestibility and the presence of anti-nutritional factors emphasize the need for advanced processing methods to enhance their utility. Although local varieties like Phaseolus coccineus possess notable nutritional advantages, more extensive research is essential to investigate and confirm their nutraceutical potential. This includes integrating them into novel food products, exploring their mechanisms of action, elucidating the relationship between their bioactive compounds and

molecular properties, and assessing their overall effects on human health. Given their minimal environmental impact, pulses are uniquely positioned to contribute significantly to sustainable food systems, aligning with global recommendations advocating for their increased utilization.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

Alcázar-Valle, M., García-Morales, S., Mojica, L., Morales-Hernández, N., Sánchez-Osorio, E., Flores-López, L., Enríquez-Vara, J. N., & Lugo-Cervantes, E. (2021). Nutritional, Antinutritional Compounds and Nutraceutical Significance of Native Bean Species (*Phaseolus* spp.) of Mexican Cultivars. *Agriculture*, *11*(11), 1031. https://doi.org/10.3390/agriculture11111031

Alcázar-Valle, M., Lugo-Cervantes, E., Mojica, L., Morales-Hernández, N., Reyes-Ramírez, H., Enríquez-Vara, J. N., & García-Morales, S. (2020). Bioactive Compounds, Antioxidant Activity, and Antinutritional Content of Legumes: A Comparison between Four *Phaseolus* Species. *Molecules*, *25*(15), 3528. https://doi.org/10.3390/molecules25153528

Alvarado-López, A. N., Gómez-Oliván, L. M., Heredia, J. B., Baeza-Jiménez, R., García-Galindo, H. S., & Lopez-Martinez, L. X. (2019). Nutritional and bioactive characteristics of Ayocote bean (*Phaseolus coccienus* L.): An underutilized legume harvested in Mexico. *CyTA - Journal of Food*, *17*(1), Art. 1. https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1571530

Ansari, P., Samia, J. F., Khan, J. T., Rafi, M. R., Rahman, Md. S., Rahman, A. B., Abdel-Wahab, Y. H. A., & Seidel, V. (2023). Protective Effects of Medicinal Plant-Based Foods against Diabetes: A Review on Pharmacology, Phytochemistry, and Molecular Mechanisms. *Nutrients*, *15*(14), 3266. https://doi.org/10.3390/nu15143266

Aquino-Bolaños, E. N., Garzón-García, A. K., Alba-Jiménez, J. E., Chávez-Servia, J. L., Vera-Guzmán, A. M., Carrillo-Rodríguez, J. C., & Santos-Basurto, M. A. (2021). Physicochemical Characterization and Functional Potential of *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus coccineus* L. Landrace Green Beans. *Agronomy*, *11*(4), 803. https://doi.org/10.3390/agronomy11040803

Bosmali, I., Kotsiou, K., Matsakidou, A., Irakli, M., Madesis, P., & Biliaderis, C. G. (2025). Fortification of wheat bread with an alternative source of bean proteins using raw and roasted *Phaseolus coccineus* flours: Impact on physicochemical, nutritional and quality attributes. *Food Hydrocolloids*, *158*, 110527. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.110527

Boye, J., Zare, F., & Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, *43*(2), 414-431. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.003

Capistrán-Carabarin, A., Aquino-Bolaños, E. N., García-Díaz, Y. D., Chávez-Servia, J. L., Vera-Guzmán, A. M., & Carrillo-Rodríguez, J. C. (2019). Complementarity in Phenolic Compounds and the Antioxidant Activities of *Phaseolus coccineus* L. and *P. vulgaris* L. Landraces. *Foods*, *8*(8), 295. https://doi.org/10.3390/foods8080295

Chávez-Mendoza, C., & Sánchez, E. (2017). Bioactive Compounds from Mexican Varieties of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Implications for Health. *Molecules*, *22*(8), 1360. https://doi.org/10.3390/molecules22081360

Chávez-Santoscoy, R. A., Gutiérrez-Uribe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2013). Effect of Flavonoids and Saponins Extracted from Black Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Seed Coats as Cholesterol Micelle Disruptors. *Plant Foods for Human Nutrition*, *68*(4), 416-423. https://doi.org/10.1007/s11130-013-0384-7

Chen, J., Liu, B., Ji, N., Zhou, J., Bian, H., Li, C., Chen, F., & Bao, J. (2009). A novel sialic acid-specific lectin from *Phaseolus coccineus* seeds with potent antineoplastic and antifungal activities. *Phytomedicine*, *16*(4), 352-360. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.07.003

Corzo-Ríos, L. J., Sánchez-Chino, X. M., Cardador-Martínez, A., Martínez-Herrera, J., & Jiménez-Martínez, C. (2020). Effect of cooking on nutritional and non-nutritional compounds in two species of *Phaseolus* (*P. vulgaris* and *P. coccineus*) cultivated in Mexico. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, *20*, 100206. https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100206

Du, F., Zhu, M., Wang, H., & Ng, T. (2013). Purification and characterization of an a-galactosidase from *Phaseolus coccineus* seeds showing degrading capability on raffinose family oligosaccharides. *Plant Physiology and Biochemistry*, 5.

Espinosa-Ramírez, J., Mariscal-Moreno, R. M., Chuck-Hernández, C., Serna-Saldivar, S. O., & Espiricueta-Candelaria, R. S. (2022). Effects of the substitution of wheat flour with raw or germinated ayocote bean (*Phaseolus coccineus*) flour on the nutritional properties and quality of bread. *Journal of Food Science*, *87*(9), 3766-3780. https://doi.org/10.1111/1750-3841.16263

FAOSTAT. (2020). *FAO Statistical Yearbook. Food and Agriculture Organization of the United Nations*. https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL

Feria, M., Pérez-Santiago, A., Cuevas, D., Martínez, M., & Córdoba, F. (1996). Purification and partial characterization of a new anti-A1 lectin of *Phaseolus coccineus* collected in Oaxaca, Mexico. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, *26*(1), 31-46. https://doi.org/10.1080/10826069608000048

Göksel Saraç, M., Dedebaş, T., Hastaoğlu, E., & Arslan, E. (2022). Influence of using scarlet runner bean flour on the production and physicochemical, textural, and sensorial properties of vegan cakes: WASPAS-SWARA techniques. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, *27*, 100489. https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2022.100489

González-Cruz, L., Valadez-Vega, C., Juárez-Goiz, J. M. S., Flores-Martínez, N. L., Montañez-Soto, J. L., & Bernardino-Nicanor, A. (2022). Partial Purification and Characterization of the Lectins of Two Varieties of *Phaseolus coccineus* (Ayocote Bean). *Agronomy*, *12*(3), 716. https://doi.org/10.3390/agronomy12030716

Hasanaklou, H. T., Pipan, B., Meglič, V., Nagl, N., & Sinkovič, L. (2024). Trypsin inhibitors in seeds and pods of *Phaseolus vulgaris/coccineus*: A comparative study of shaking and ultrasonic extraction methods. *Electronic Journal of Biotechnology*, *71*, 47-56. https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2024.05.003

Hernández-Delgado, S., Muruaga-Martínez, J. S., Vargas-Vázquez, M. L. P., Martínez-Mondragón, J., Chávez-Servia, J. L., Gill-Langarica, H. R., Mayek-Pérez, N., Hernández-Delgado, S., Muruaga-Martínez, J. S., Vargas-Vázquez, M. L. P., Martínez-Mondragón, J., Chávez-Servia, J. L., Gill-Langarica, H. R., & Mayek-Pérez, N. (2015). Advances in Genetic Diversity Analysis of *Phaseolus* in Mexico. En *Molecular Approaches to Genetic Diversity*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/60029

Jaiswal, A. (2020). *Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables—1st Edition*. https://www.elsevier.com/books/nutritional-composition-and-antioxidant-properties-of-fruits-and-vegetables/jaiswal/978-0-12-812780-3

Kalloo, G. (1993). Runner bean: *Phaseolus coccineus* L. En G. Kalloo & B. O. Bergh (Eds.), *Genetic Improvement of Vegetable Crops* (pp. 405-407). Pergamon. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-040826-2.50032-1

King, J., Leong, S. Y., Alpos, M., Johnson, C., McLeod, S., Peng, M., Sutton, K., & Oey, I. (2024). Role of food processing and incorporating legumes in food products to increase protein intake and enhance satiety. *Trends in Food Science & Technology*, 104466. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104466

Kumar, Y., Basu, S., Goswami, D., Devi, M., Shivhare, U. S., & Vishwakarma, R. K. (2022). Anti-nutritional compounds in pulses: Implications and alleviation methods. *Legume Science*, *4*(2), e111. https://doi.org/10.1002/leg3.111

Lacaille-Dubois, M.-A., & Melzig, M. (2016). Saponins: Current Progress and Perspectives. *Planta Medica*, *82*(18), 1495-1495. https://doi.org/10.1055/s-0042-119776

Li, S., Bu, T., Zheng, J., Liu, L., He, G., & Wu, J. (2019). Preparation, Bioavailability, and Mechanism of Emerging Activities of Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 18(4), 1097-1110. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12457

Luna-Vital, D. A., Mojica, L., González de Mejía, E., Mendoza, S., & Loarca-Piña, G. (2015). Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. *Food Research International*, *76*, 39-50. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.024

Marinangeli, C. P. F., & Jones, P. J. H. (2011). Whole and fractionated yellow pea flours reduce fasting insulin and insulin resistance in hypercholesterolaemic and overweight human subjects. *British Journal of Nutrition*, *105*(1), 110-117. https://doi.org/10.1017/S0007114510003156

Mariscal-Moreno, R. M., Chuck-Hernández, C., Figueroa-Cárdenas, J. de D., & Serna-Saldivar, S. O. (2021). Physicochemical and Nutritional Evaluation of Bread Incorporated with Ayocote Bean (*Phaseolus coccineus*) and Black Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Processes*, *9*(10), Art. 10. https://doi.org/10.3390/pr9101782

Mojica, L., Gonzalez de Mejia, E., Granados-Silvestre, M. Á., & Menjivar, M. (2017). Evaluation of the hypoglycemic potential of a black bean hydrolyzed protein isolate and its pure peptides using *in silico*, *in vitro* and *in vivo* approaches. *Journal of Functional Foods*, *31*, 274-286. https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.02.006

Mullins, A. P., & Arjmandi, B. H. (2021). Health Benefits of Plant-Based Nutrition: Focus on Beans in Cardiometabolic Diseases. *Nutrients*, *13*(2), 519. https://doi.org/10.3390/nu13020519

Ngai, P. H. K., & Ng, T. B. (2005). Phaseococcin, an antifungal protein with antiproliferative and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities from small scarlet runner beans. *Biochemistry and Cell Biology*, *83*(2), 212-220. https://doi.org/10.1139/o05-037

Njoumi, S., Josephe Amiot, M., Rochette, I., Bellagha, S., & Mouquet-Rivier, C. (2019). Soaking and cooking modify the alpha-galacto-oligosaccharide and dietary fibre content in five Mediterranean legumes. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *70*(5), 551-561. https://doi.org/10.1080/09637486.2018.1544229

Nowaková, N., & Kocourek, J. (1974). Studies on phytohemagglutinins: XX. Isolation and characterization of hemagglutinins from scarlet runner seeds (*Phaseolus coccineus* L.). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, *359*(2), 320-333. https://doi.org/10.1016/0005-2795(74)90231-1

Ochoa, J.-L., & Kristiansen, T. (1978). Stroma: As an affinity adsorbent for non-inhibitable lectins. *FEBS Letters*, *90*(1), 145-148. https://doi.org/10.1016/0014-5793(78)80317-2

Orak, H., Karamać, M., Orak, A., & Amarowicz, R. (2016). Antioxidant Potential and Phenolic Compounds of Some Widely Consumed Turkish White Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Varieties. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, *66*(4), 253-260. https://doi.org/10.1515/pjfns-2016-0022

Page, M. J., McKenzie, J. E., Bossuyt, P. M., Boutron, I., Hoffmann, T. C., Mulrow, C. D., Shamseer, L., Tetzlaff, J. M., Akl, E. A., Brennan, S. E., Chou, R., Glanville, J., Grimshaw, J. M., Hróbjartsson, A., Lalu, M. M., Li, T., Loder, E. W., Mayo-Wilson, E., McDonald, S., … Moher, D. (2021). The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*, *372*, n71. https://doi.org/10.1136/bmj.n71

Pan, W. L., & Ng, T. B. (2015). A dimeric Phaseolus coccineus lectin with anti-oxidative, anti-proliferative and cytokine-inducing activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, *81*, 960-966. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.034

Patterson, C. A., Curran, J., & Der, T. (2017). Effect of Processing on Antinutrient Compounds in Pulses. *Cereal Chemistry*, *94*(1), 2-10. https://doi.org/10.1094/CCHEM-05-16-0144-FI

Pedrali, D., Proserpio, C., Borgonovi, S. M., Zuccolo, M., Leoni, V., Borgonovo, G., Bernardi, A. M., Scarafoni, A., Pagliarini, E., Giorgi, A., & Giupponi, L. (2022). Nutritional Characterization and Novel Use of "Copafam" Bean (*Phaseolus coccineus* L.) for the Sustainable Development of Mountains Areas. *Sustainability*, *14*(20), 13409. https://doi.org/10.3390/su142013409

Peighambardoust, S. H., Karami, Z., Pateiro, M., & Lorenzo, J. M. (2021). A Review on Health-Promoting, Biological, and Functional Aspects of Bioactive Peptides in Food Applications. *Biomolecules*, *11*(5), 631. https://doi.org/10.3390/biom11050631

Proserpio, C., Bresciani, A., Marti, A., & Pagliarini, E. (2020). Legume Flour or Bran: Sustainable, Fiber-Rich Ingredients for Extruded Snacks? *Foods*, *9*(11), 1680. https://doi.org/10.3390/foods9111680

Rațu, R. N., Veleșcu, I. D., Stoica, F., Usturoi, A., Arsenoaia, V. N., Crivei, I. C., Postolache, A. N., Lipșa, F. D., Filipov, F., Florea, A. M., Chițea, M. A., & Brumă, I. S. (2023). Application of Agri-Food By-Products in the Food Industry. *Agriculture*, *13*(8), Art. 8. https://doi.org/10.3390/agriculture13081559

Rodriguez, M., Rau, D., Angioi, S. A., Bellucci, E., Bitocchi, E., Nanni, L., Knüpffer, H., Negri, V., Papa, R., & Attene, G. (2013). European *Phaseolus coccineus* L. landraces: Population Structure and Adaptation, as Revealed by cpSSRs and Phenotypic Analyses. *PLoS ONE*, *8*(2), e57337. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057337

Romero-Arenas, O., Damián Huato, M. A., Rivera Tapia, J. A., Báez Simón, A., Huerta Lara, M., & Cabrera Huerta, E. (2013). *The Nutritional value of Beans (Phaseolus vulgaris L.) and its importance for Feeding of Rural communities in Puebla-Mexico. Vol. 2(8), 59-65.*

Saint-Eve, A., Granda, P., Legay, G., Cuvelier, G., & Delarue, J. (2019). Consumer acceptance and sensory drivers of liking for high plant protein snacks. *Journal*

of the Science of Food and Agriculture, *99*(8), 3983-3991. https://doi.org/10.1002/jsfa.9624

Salim, R., Nehvi, I. B., Mir, R. A., Tyagi, A., Ali, S., & Bhat, O. M. (2023). A review on anti-nutritional factors: Unraveling the natural gateways to human health. *Frontiers in Nutrition*, *10*, 1215873. https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1215873

Sánchez-Arteaga, H. M., Urías-Silvas, J. E., Espinosa-Andrews, H., & García-Márquez, E. (2015). Effect of chemical composition and thermal properties on the cooking quality of common beans (*Phaseolus vulgaris*). *CyTA - Journal of Food*, *13*(3), 385-391. https://doi.org/10.1080/19476337.2014.988182

Sánchez-Villa, C. E., Zepeda-Bautista, R., Ramírez-Ortiz, M. E., & Corzo-Ríos, L. J. (2020). Nixtamalized tortillas supplemented with proteins isolated from *Phaseolus coccineus* and huauzontle (*Chenopodium berlandieri* subsp. *Nuttalliae*) flour: Rheological, textural, and sensorial properties. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, *22*, 100274. https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100274

Schmidt, H. de O., & Oliveira, V. R. de. (2023). Overview of the Incorporation of Legumes into New Food Options: An Approach on Versatility, Nutritional, Technological, and Sensory Quality. *Foods (Basel, Switzerland)*, *12*(13), 2586. https://doi.org/10.3390/foods12132586

Shevkani, K., Singh, N., Chen, Y., Kaur, A., & Yu, L. (2019). Pulse proteins: Secondary structure, functionality and applications. *Journal of Food Science and Technology*, *56*(6), 2787-2798. https://doi.org/10.1007/s13197-019-03723-8

ShuMei, L., LiRong, W., MengXuan, S., & XianLiang, S. (2019). Effect of food additives on antioxidant activity of flavonoids from *Phaseolus coccineus*. *China Condiment*, *44*(5), 9-16.

Singh, B., Singh, J. P., Shevkani, K., Singh, N., & Kaur, A. (2017). Bioactive constituents in pulses and their health benefits. *Journal of Food Science and Technology*, *54*(4), 858-870. https://doi.org/10.1007/s13197-016-2391-9

Singh, N. (2017). Pulses: An overview. *Journal of Food Science and Technology*, *54*(4), 853-857. https://doi.org/10.1007/s13197-017-2537-4

Sinkovič, L., Pipan, B., Sinkovič, E., & Meglič, V. (2019). Morphological Seed Characterization of Common (*Phaseolus vulgaris* L.) and Runner (*Phaseolus coccineus* L.) Bean Germplasm: A Slovenian Gene Bank Example. *BioMed Research International*, *2019*, 1-13. https://doi.org/10.1155/2019/6376948

Teniente-Martínez, G., Bernardino-Nicanor, A., Cariño-Cortés, R., Valadez-Vega, M. del C., Montañez-Soto, J. L., Acosta-García, G., & González-Cruz, L. (2019). Cytotoxic and genotoxic activity of protein isolate of ayocote beans and anticancer activity of their protein fractions. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *13*(2), 1040-1048. https://doi.org/10.1007/s11694-018-0019-7

Teniente-Martínez, G., Bernardino-Nicanor, A., Valadez-Vega, M. D. C., Montañez-Soto, J. L., Juárez-Goiz, J. M. S., & González-Cruz, L. (2022). *In vitro* study of the antihypertensive, antioxidant and antiproliferative activities of peptides obtained from two varieties of *Phaseolus coccineus* L. *CyTA - Journal of Food*, *20*(1), 102-110. https://doi.org/10.1080/19476337.2022.2090611

Thakur, A., Sharma, V., & Thakur, A. (2019). An overview of anti-nutritional factors in food. *International Journal of Chemical Studies*, *7*(1), 2472-2479.

Venkatachalam, K., & Nagarajan, M. (2017). Physicochemical and sensory properties of savory crackers incorporating green gram flour to partially or wholly replace wheat flour. *Italian Journal of Food Science*, *29*(4). https://doi.org/10.14674/1120-1770-IJFS808

Yeshi, K., Crayn, D., Ritmejerytė, E., & Wangchuk, P. (2022). Plant Secondary Metabolites Produced in Response to Abiotic Stresses Has Potential Application in Pharmaceutical Product Development. *Molecules*, *27*(1), 313. https://doi.org/10.3390/molecules27010313

Zhao, Q., Luan, X., Zheng, M., Tian, X.-H., Zhao, J., Zhang, W.-D., & Ma, B.-L. (2020). Synergistic Mechanisms of Constituents in Herbal Extracts during Intestinal Absorption: Focus on Natural Occurring Nanoparticles. *Pharmaceutics*, *12*(2), 128. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020128

Journal Metrics

UNDERSTAND JOURNAL METRICS

6.4	3.5	26%	25 days
CiteScore	Journal Impact Factor	Acceptance Rate	Submission To First Decision (median)

Journal of Food Process Engineering

WILEY

Journal of Food Process Engineering

ORIGINAL ARTICLE

Technofunctional and Structural Characterization of Third-Generation Extruded Snacks From Blue Maize (*Zea mays*) Enriched With Ayocote Bean (*Phaseolus coccineus*)

Victor Andrés Ayala Rodriguez[1] | Jesús Alberto Vázquez Rodriguez[2] | Abad Arturo López Hernández[2] | David Neder Suarez[3] | Erick Heredia Olea[4] | Carlos Abel Amaya Guerra[1]

[1]Laboratorio de Alimentos, Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológica, Unidad B, San Nicolás de los Garza, México | [2]Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública, Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Salud Pública y Nutrición, San Nicolás de los Garza, México | [3]Laboratorio de Alimentos, Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas, Chihuahua, México | [4]Centro de Biotecnología FEMSA, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Monterrey, México

Correspondence: Carlos Abel Amaya Guerra (carlos.amayagr@uanl.edu.mx)

Received: 2 May 2025 | **Revised:** 13 November 2025 | **Accepted:** 26 December 2025

Keywords: extrusion processing | microwave puffing | native ingredient utilization | snack formulation | structural characterization | thermal-mechanical transformation

ABSTRACT

This study aimed to characterize the technofunctional and structural properties of third-generation extruded snacks developed from blue maize (*Zea mays*) enriched with varying levels (10%–45%) of ayocote bean (*Phaseolus coccineus*). Extrusion cooking was followed by microwave expansion at different exposure times (9–21 s), and the resulting products were evaluated for expansion behavior, texture, bulk density, color, water absorption index (WAI), water solubility index (WSI), and proximate composition. Structural and morphological changes were assessed through scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR). Data were analyzed using one-way and two-way ANOVA with Tukey's post hoc test ($\alpha = 0.05$). Microwave exposure time and bean incorporation significantly affected the expansion index, texture, and bulk density. Maximum expansion was observed at 20 s, with the 10% bean formulation showing the highest expansion. Increasing bean content improved protein and dietary fiber content while reducing fat and starch crystallinity. SEM revealed microstructural transformation from compact to porous matrices after expansion. XRD showed decreasing A-type starch crystallinity with higher bean inclusion, while FTIR confirmed compositional shifts in starch and protein bands. Overall, enrichment with *P. coccineus* positively influenced the nutritional and technofunctional profile of the extrudates, enhancing protein and fiber content while enabling desirable expansion and texture properties. These findings support the development of functional snacks using native ingredients through combined extrusion–microwave technology.

1 | Introduction

The extrusion process is widely used in the food industry to produce extruded snacks. Snacks are small portions of food, including beverages, consumed between main meals. They are characterized by being less structured and vary in nutritional profile, as their ingredients can range from fresh to highly processed. In recent years, their consumption has increased in both portion size and frequency worldwide, contributing up to 22% of daily calories consumed globally (Enriquez and Gollub 2023; Gaeini et al. 2023). To improve taste and attract consumers, manufacturers commonly add sugars, fats, and sodium, which, unfortunately, reduce the overall nutritional quality (Kumar et al. 2019). Frequent consumption of these types of snacks, characterized by low nutritional value and high caloric density, combined with an inactive lifestyle, has

been strongly associated with metabolic diseases (Clemente-Suárez et al. 2023). To address this challenge, the food industry and the scientific community have focused on developing functional snacks as new alternatives to current market products (Michel et al. 2024).

To enhance the nutritional profile and technological quality and sustainability of these products, extrusion has become one of the most versatile and sustainable processing technologies for snack manufacturing. This thermo-mechanical process combines high temperature, short residence time, and mechanical shear, promoting starch gelatinization, protein denaturation (enhancing digestibility), enzyme inactivation, and reduction of antinutritional factors (Sahu et al. 2022; Shere and Agrawal 2024). Depending on processing conditions and structural development, extruded snacks are classified as first, second, or third-generation (3G) products. First-generation snacks include conventionally processed items such as chips or roasted nuts; second-generation snacks are directly expanded during extrusion, forming puffed products such as collets; whereas third-generation (3G) snacks, also known as pellets or half-products, are extruded under low pressure and subsequently expanded by microwave heating, hot-air puffing, or frying (Acurio et al. 2024; Lisiecka et al. 2023).

Recent studies have increasingly focused on the microwave expansion stage, which plays a decisive role in determining pore formation, wall stability, and final density in third-generation snacks. Key variables such as pellet moisture, microwave power–time profiles, and matrix composition (notably protein and fiber content) have been identified as critical factors governing true expansion, bulk density, and texture (Lisiecka et al. 2021, 2023; Vicente-Jurado et al. 2024). Compared with frying, microwave expansion offers significant advantages by reducing oil uptake and energy demand, while improving water absorption index, water solubility index, and overall product crispness. Nevertheless, cereal–legume matrices often exhibit non-linear expansion behavior, as elevated protein and fiber levels reinforce cell walls and restrict bubble growth, whereas higher moisture content and plasticization promote vapor-driven puffing (Acurio et al. 2024; Lisiecka et al. 2023). These competing mechanisms highlight the importance of optimizing formulation and pre-expansion conditioning to achieve uniform and stable structural development in 3G snacks.

Corn, potato, and wheat flours remain the primary raw materials for snack production, but the use of pulses and legumes has attracted attention due to their protein, fiber, and bioactive compounds (King et al. 2024). Combining cereals with legumes improves the amino-acid profile and overall protein quality (Jafarzadeh et al. 2024). Incorporating ayocote bean (*Phaseolus coccineus*) into blue maize (*Zea mays* L.) based snacks provide additional functional value through bioactive components such as anthocyanins, phenolic acids, and dietary fiber. Blue maize anthocyanins contribute antioxidant and anti-inflammatory activities and have shown protective effects against metabolic disorders (Guzmán-Gerónimo et al. 2017; Herrera-Sotero et al. 2017; Villarreal-Rodriguez et al. 2022). Likewise, ayocote bean polyphenols display antioxidant and antihypercholesterolemic properties, while their fiber contributes to glycemic control (Espinosa-Ramírez et al. 2022; Teniente-Martínez et al. 2022).

Despite growing interest in third-generation (3G) snacks, limited research has addressed how cereal–legume formulations influence the structural and techno-functional behavior of extruded pellets and their expanded counterparts. Most previous works have focused on physical expansion metrics or on single-matrix systems (e.g., maize or rice), without linking formulation-dependent microstructural changes to macroscopic properties such as density, texture, and hydration behavior. In this context, combining blue maize (*Zea mays* L.) and ayocote bean (*Phaseolus coccineus* L.) provides a suitable model to explore how legume enrichment affects starch–protein interactions during extrusion and subsequent microwave expansion. Therefore, this study aims to characterize the proximate composition, expansion kinetics, and key techno-functional properties, as well as color and microstructural features of blue maize–ayocote bean extruded snacks, providing insights into the formulation-dependent structural mechanisms governing 3G snack performance and quality.

2 | Material and Methods

2.1 | Raw Materials and Processing Conditions

2.1.1 | Raw Material Procurement

Purple ayocote bean (*Phaseolus coccineus* L.) seeds were purchased from a local farmers' market in the rural area of Puebla, Mexico, while the native blue maize (*Zea mays* L.) variety was obtained from local communities in the Sierra Tarahumara region, in the state of Chihuahua, Mexico. Both raw materials corresponded to crops harvested during the 2023 agricultural cycle and were stored under controlled dry conditions (20°C ± 2°C, relative humidity < 50%) in sealed containers until further conditioning for extrusion.

2.1.2 | Conditioning of Raw Materials for Extrusion

The ayocote bean and blue maize were individually processed using a hammer mill (Pulvex model 200, Mexico City, Mexico) equipped with a 2 mm sieve, followed by further sieving with a 400 μm mesh to obtain fine, homogeneous flours. Five different blends of blue maize enriched with purple ayocote bean were prepared at varying proportions (10%, 20%, 30%, 40%, and 45% ayocote bean, on a dry weight basis). Additionally, two control treatments were used for comparison: (1) 100% blue maize and (2) 100% purple ayocote bean.

2.1.3 | Cooking by Extrusion Process

The extrusion process was carried out on 5 kg batches of the prepared blends and control samples, following the methodology of Neder-Suárez et al. (2016) with modifications. A twin-screw extruder (BTSK-20/40, Bühler AG, Uzwil, Switzerland) with a 600 mm barrel length and a length-to-diameter (L/D) ratio of 20 was used. The processing conditions included a solid feed rate of 2.8 kg/h, with a water flow rate of approximately 3.26 L/h introduced into the feeding zone (feed moisture of ~30%–40% (wet basis)), and a screw speed of 200 rpm. The extruder barrel

was divided into four independently controlled heating zones, where temperatures were set at 58°C in the feeding zone, 120°C and 118°C in the cooking zones, and 65°C in the final exit zone. A circular die with a 2 mm orifice diameter was employed, operating at a cutting speed of 303 rpm. The extrudates were subsequently dried in a Zucchelli Alpha oven (Zucchelli, Italy; distributed in Mexico) at 85°C for 60 min to reduce moisture content and enhance stability. Finally, the dried products were vacuum-sealed in polyethylene bags and stored in darkness at room temperature for further analysis.

2.2 | Proximate Composition Analysis

The proximate composition of raw blue maize and purple ayocote bean, as well as their extruded counterparts and the various extruded formulations, was determined for moisture, protein, fat, ash, and total dietary fiber contents, according to the official methods of AOAC International (2019): 934.06, 992.15, 920.39, 942.05, and 985.29, respectively. Total dietary fiber was quantified using the Total Dietary Fiber Assay Kit (TDF-100A, Sigma Aldrich, USA).

2.3 | Expansion and Functional Properties

Functional and physical measurements were conducted on extruded pellets both before and after microwave expansion in order to evaluate the structural and techno-functional effects of the expansion process.

2.3.1 | Microwave Expansion Kinetics and Maximum Expansion

The microwave expansion kinetics and maximum expansion were determined following the methodology of Delgado-Nieblas et al. (2012), with slight modifications. Five extrudates per formulation were expanded in a microwave oven (Emerson MW8107WA SUFFIX A; 1300 W, 2450 Hz) at different exposure times (9, 12, 15, 18, 20, and 21 s). Diameter measurements were taken at three points (center and both ends) using a digital vernier caliper (DOGOTULS MA2011; ±0.01 mm), and the mean was recorded. Based on these results, the time point showing the highest mean expansion was identified, and all subsequent analyses were performed using extrudates expanded under this optimal condition.

2.3.2 | Expansion Index

To analyze the expansion index (EI) kinetics and identify the optimal time for maximum expansion, the expansion index of five extrudates was evaluated following the methodology described by Alvarez-Martinez et al. (1988), with slight modifications. The expansion index was determined by calculating the ratio between the extrudate diameter (D_e) and the die diameter (D_d, 2 mm). The expansion index was obtained using the following equation:

$$IES = \frac{D_e}{D_d} \tag{1}$$

2.3.3 | Bulk Density

Bulk density (D) was determined according to the method described by Delgado-Nieblas et al. (2019) for both non-expanded (extruded) and microwave-expanded samples from all formulations, using five replicates per treatment. Each replicate consisted of individual extrudates approximately 20 mm in length. The mass (wx), diameter (d), and length (l) of each sample were recorded. The diameter was obtained as the average of three equidistant points measured along the extrudate using a digital vernier caliper. D values were expressed in kg/m^3 and calculated using the following equation:

$$D = \frac{wx}{\left[(\pi)\left(\frac{d}{2}\right)^2(l)\right]} \tag{2}$$

where (wx) is the sample weight in kg, (d) is the diameter in m, and (l) is the length in m of the extrudate.

2.3.4 | Texture of Extrudates

The hardness (N) and fracturability (N) of the extrudates, both expanded and non-expanded, were evaluated using a CT3 Brookfield texture analyzer equipped with a TA-RT Probe Kit and a TA7 knife edge probe (60 mm width). Samples of approximately 25 mm in length were placed horizontally on a three-point bend rig and compressed with an activation load of 1 N until reaching a target distance of 2 mm, at a test speed of 2.00 mm/s. A total of 25 replicates per treatment were analyzed to minimize variability, following the approach described by Patil et al. (2007). The average value and standard deviation were reported.

2.3.5 | Water Absorption Index (WAI) and Water Solubility Index (WSI)

WAI and WSI were determined in triplicate following the method of Anderson et al. (1970), with slight modifications. Expanded extrudates and raw flours (non-extruded) were processed using a blender (Oster BEST02-E01), followed by fine milling (IKA A 11 basic). One gram of each sample was mixed with 12 mL of distilled water in pre-weighed 50 mL plastic tubes and vortexed (VX-200—LABNET) for 30 min at room temperature. After settling for 5 min, samples were centrifuged at 3000 × g for 15 min (Hermle Z 216 MK). The supernatant was transferred to pre-weighed aluminum trays and dried in an oven (Felisa FE-292D) to determine the dry soluble fraction. The hydrated sediment was weighed to calculate WAI.

The WAI was expressed as the amount of water retained per gram of dry sample after centrifugation and was calculated using the following equation:

$$WAI\ (g/g) = \left(\frac{\text{Weight of hydrated sediment (g)}}{\text{Initial dry sample weight (g)}}\right) \tag{3}$$

The *WSI* is expressed as the percentage of soluble solids released into the supernatant after centrifugation. It was calculated using the following equation:

$$WSI\,(\%) = \left(\frac{\text{Weight of residue from the supernatant (g)}}{\text{Initial dry sample weight (g)}}\right) \times 100 \quad (4)$$

2.4 | Color Parameters

Color parameters (L*, a*, b*) were measured using a ColorFlex EZ spectrophotometer (HunterLab, USA) with 45°/0° geometry, D65 illumination, and 10° observation angle. Expanded and non-expanded samples were placed in transparent glass cells and gently compacted to avoid air gaps. Measurements were recorded in the CIELAB color space, with three replicates per treatment. Mean values and standard deviations were calculated.

2.5 | Microstructural and Morphological Characterization

2.5.1 | Scanning Electron Microscopy

The different extruded formulations enriched with purple ayocote bean, as well as the control samples of 100% blue maize and 100% ayocote bean (both in their non-expanded and microwave-expanded forms), were ground to a particle size smaller than 170 mesh (88 μm) and adjusted to a moisture content of approximately 5%. For scanning electron microscopy (SEM) analysis, the samples were mounted onto stubs and coated with a gold layer under high vacuum using a Denton vacuum evaporator (Desk II) operating at 7.031×10^{-2} kg/cm^2. Micrographs were obtained using a scanning electron microscope (JSM-5800LV, JEOL, Akishima, Japan) equipped with a secondary electron detector and operated at an acceleration voltage of 10 kV.

2.5.2 | X-Ray Analysis

X-ray analysis was conducted on raw blue maize and purple ayocote bean samples and extruded formulations to evaluate changes in starch crystallinity induced by extrusion. The analysis was performed using a Malvern Panalytical X'Pert Pro-MRD diffractometer (Malvern, UK), operated at 40 kV and 35 mA, employing Cu-Kα radiation with a wavelength of 0.154056 nm. Diffraction data were collected over a 2θ range of 5° to 30°, using a step size of 0.5° s^{-1}. The diffraction patterns were analyzed by comparing the peak positions with reference data from the Xpowder software database (version 2004.04.70).

2.5.3 | Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) Analysis

FT-IR analysis was conducted on raw blue maize and purple ayocote bean samples and extruded and microwave-expanded formulations to assess molecular-level changes in starch and protein structures. The spectra were recorded using a PerkinElmer ATR-FTIR spectrometer (PerkinElmer, Norwalk, USA) equipped with an attenuated total reflectance (ATR) accessory. Measurements were performed in the wavenumber range of 4000 to 650 cm^{-1}, with a resolution of 4 cm^{-1} and an average of 10 scans per sample.

2.6 | Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics v26.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Data normality was assessed with the Shapiro–Wilk test, and homogeneity of variances with Levene's test. Although some variables did not fully meet these assumptions, parametric tests were applied given the robustness of ANOVA in balanced designs. A two-way ANOVA was conducted to evaluate the effects of formulation and microwave time—and their interaction—on expansion index. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test was used for individual variable comparisons. Results are expressed as mean ± standard deviation, and significance was set at $p < 0.05$.

3 | Results

3.1 | Proximate Composition Analysis

Table 1 includes proximate composition data for raw controls (blue maize and ayocote bean) analyzed before extrusion, as well as for their extruded counterparts and the composite formulations (10%–45% bean) evaluated after the post-extrusion drying step (85°C, 60 min; Section 2.1.3). All values are expressed on a dry-weight basis. Significant differences were found among treatments for all proximate parameters ($p < 0.001$), including moisture, protein, fat, ash, and dietary fiber. These variations reflect both the inherent composition of *Phaseolus coccineus* and *Zea mays*, as well as the effects of thermal–mechanical processing during extrusion. Moisture content showed slight variations among formulations, with marginally higher values observed in bean-enriched blends. This minor increase may be associated with the higher water-binding capacity of legume proteins and dietary fiber, although the effect was limited and not consistent across all treatments. Protein and dietary fiber contents also rose proportionally with bean incorporation, confirming the nutritional contribution of *P. coccineus* as anticipated. In contrast, fat and ash values varied more irregularly, influenced by formulation and potential nutrient losses or transformations during processing. Overall, the results underscore the importance of both ingredient selection and processing conditions in determining the nutritional profile of extruded legume–cereal snacks.

Regarding moisture, extruded samples exhibited slight increases relative to their raw counterparts, reflecting the combined effect of water addition during extrusion and the subsequent stabilization drying step. This pattern was more evident in the maize and bean controls. While extrusion is commonly associated with moisture loss, studies have shown that legume-enriched extrudates often exhibit distinct water retention behavior due to their higher protein and fiber contents, which modulate expansion and post-processing equilibrium moisture (Pasqualone et al. 2020). Additionally, research on legume-based extrusion systems has demonstrated that protein-rich matrices interact differently with water during thermal–mechanical processing, influencing the redistribution and retention of moisture (Kantanen

TABLE 1 | Effect of *Phaseolus coccineus* enrichment on the proximate composition of extruded blue maize (*Zea mays*) snacks (mean ± standard deviation).

Formulation	Moisture (%)	Ash (%)	Protein (%)	Fat (%)	Dietary fiber (%)
Raw blue maize	10.02 ± 0.01^{b}	2.48 ± 0.06^{f}	12.27 ± 0.16^{f}	3.23 ± 0.07^{e}	10.21 ± 0.66^{a}
Extruded blue maize	16.00 ± 0.16^{g}	1.53 ± 0.01^{a}	12.6 ± 0.03^{c}	1.43 ± 0.08^{bc}	10.58 ± 0.86^{a}
Raw ayocote bean	9.67 ± 0.11^{a}	5.46 ± 0.07^{g}	21.78 ± 0.56^{g}	1.73 ± 0.17^{d}	21.84 ± 1.37^{g}
Extruded ayocote bean	16.35 ± 0.21^{g}	5.07 ± 0.02^{e}	22.1 ± 0.69^{g}	0.59 ± 0.07^{a}	22.87 ± 0.33^{g}
Extruded 10% bean	14.36 ± 0.01^{e}	1.75 ± 0.14^{a}	10.32 ± 0.04^{a}	1.91 ± 0.05^{d}	11.81 ± 0.76^{ab}
Extruded 20% bean	14.34 ± 0.11^{e}	2.08 ± 0.22^{b}	11.37 ± 0.05^{b}	1.51 ± 0.09^{c}	13.04 ± 0.65^{bc}
Extruded 30% bean	14.75 ± 0.12^{d}	2.55 ± 0.05^{c}	12.59 ± 0.03^{c}	1.28 ± 0.06^{b}	14.27 ± 0.55^{cd}
Extruded 40% bean	14.24 ± 0.25^{c}	3.00 ± 0.07^{d}	13.77 ± 0.06^{d}	1.37 ± 0.03^{bc}	15.49 ± 0.45^{de}
Extruded 45% bean	14.79 ± 0.11^{d}	3.21 ± 0.18^{d}	14.79 ± 0.01^{e}	1.25 ± 0.08^{b}	16.11 ± 0.40^{e}

Note: Different superscript letters within the same column indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$) according to Tukey's HSD test. Moisture, ash, protein, fat, and dietary fiber are expressed as percentages on a dry weight basis. Each value represents the mean of three replicates ($n = 3$).

et al. 2024). In our study, the small variations observed across formulations likely reflect differences in water-binding capacity rather than changes in porosity or hygroscopicity, which were not measured.

Processing-induced differences were most evident for fat. Extractable fat decreased after extrusion—most notably in the extruded bean sample (~0.59%)—a change not attributable solely to legume composition. High shear/temperature during extrusion can promote amylose–lipid complexation and protein–lipid associations, which reduce solvent extractability and yield apparently lower fat values without true lipid loss. This mechanism is well documented for starch-rich matrices subjected to thermal processing and explains the marked reduction observed here (Tan et al. 2025).

Ash content remained largely unaffected by extrusion across all formulations, indicating that the moderate thermal and shear conditions (≤120°C–118°C in cooking zones) preserved mineral integrity. This outcome contrasts with reports of mineral losses or reduced extractability under harsher heat/shear regimes (Altan et al. 2009). The incremental ash increases observed with higher *P. coccineus* inclusion are attributed to the legume's inherently higher mineral density rather than to processing-induced enrichment.

Dietary fiber increased with bean enrichment, reflecting the higher native fiber content of *P. coccineus*. However, extrusion induces well-documented structural modifications that can alter fiber quality even when quantitative values rise. Thermal–mechanical shear can depolymerize insoluble fractions, increase soluble fiber, and generate lower-molecular-weight oligosaccharides, changing hydration properties and potentially modulating physiological effects (Al Faruq et al. 2025; Naumann et al. 2021). Thus, the higher analytical fiber measured in bean-rich formulations does not necessarily imply preserved structural integrity, and additional analysis would be required to confirm functional performance.

Protein values across formulations followed the expected dilution pattern determined by the maize–bean ratio, but extrusion itself did not markedly reduce total protein. This behavior is consistent with prior evidence showing that legume proteins retain most of their quantitative content under moderate extrusion conditions, even though structural transitions (aggregation, unfolding, and disulfide interchange) may occur (Salazar-Villanea et al. 2016; Singh et al. 2006). Notably, the nearly identical protein values between raw and extruded *P. coccineus* indicate that the thermal profile used here (≤120°C in cooking zones) was insufficient to induce extensive proteolysis or measurable amino-acid degradation. Studies using similar severity levels also report minimal loss of total nitrogen, with processing effects reflected more in protein conformation and digestibility rather than in the absolute content (Fu et al. 2024; Salazar-Villanea et al. 2016). Thus, the primary processing-related outcome in our system was preservation of protein content rather than the reductions typically observed under higher thermal or shear intensities.

3.2 | Expansion and Functional Properties

3.2.1 | Microwave Expansion Kinetics and Maximum Expansion

Microwave expansion behavior was significantly affected by both the formulation and the exposure time (Table S1). The two-way ANOVA showed that microwave time had a strong effect on expansion [$F(5, 168) = 124.683$, $p < 0.001$], as did formulation [$F(6, 168) = 52.072$, $p < 0.001$]. A significant interaction was also detected [$F(30, 168) = 1.757$, $p = 0.014$], indicating that the effect of time on expansion differed across formulations and that changes in formulation composition did not produce a uniform response across exposure times. The model demonstrated a solid fit with an adjusted R^2 of 0.819. These effects are illustrated in Figure 1, which displays the expansion kinetics for each formulation across all microwave exposure intervals (Figure S1).

The expansion behavior of the extruded snacks was influenced by both microwave exposure time and formulation. The plateau observed between 18 and 21 s indicates a saturation point

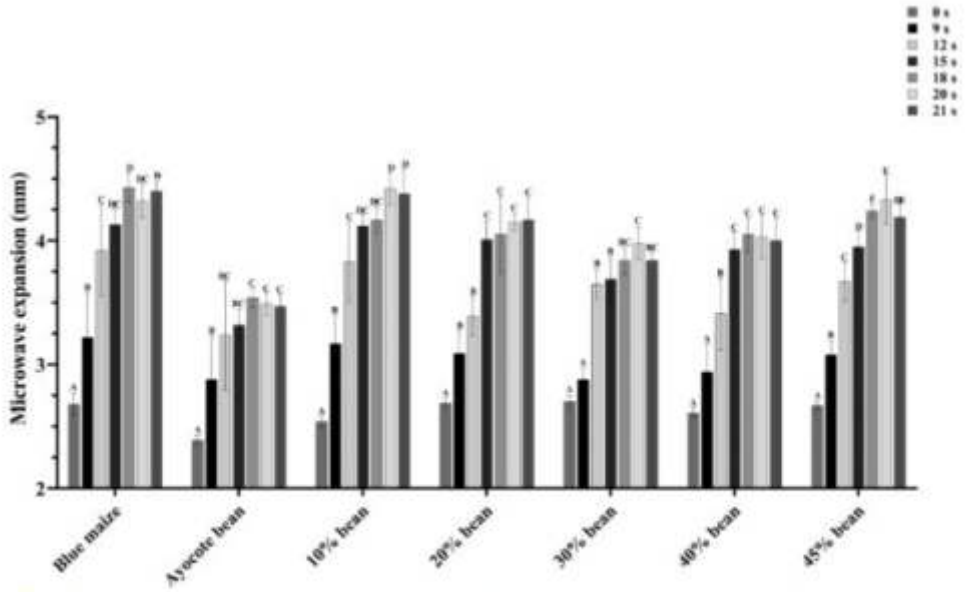


FIGURE 1 | Expansion kinetics of extruded pellets from blue maize and *Phaseolus coccineus*–enriched formulations. Bars show mean extrudate diameter (mm) measured at 0, 9, 12, 15, 18, 20, and 21 s of microwave exposure ($n = 5$; mean ± SD). The 0-s bars correspond to the pellet without microwave expansion. The *y*-axis is truncated at 2 mm, which equals the die diameter; thus, values above this baseline represent the pellet diameter relative to the die, and increases from 0 s to later times represent microwave-induced expansion. Superscript letters denote significant differences (one-way ANOVA, Tukey's HSD, $p < 0.05$): Uppercase = across time within each formulation; lowercase = among formulations at a given time. Full statistical results are provided in Table S1.

beyond which additional puffing does not occur, consistent with the moisture-driven expansion ceiling reported by Moraru and Kokini (2003), and also described for starch-based matrices by Alam et al. (2016). Notably, the 45% *Phaseolus coccineus* formulation achieved expansion values comparable to the 100% maize control, despite its higher protein and fiber contents—components typically associated with reduced puffing (Altan et al. 2009). This result suggests that, under the thermal–mechanical and microwave conditions applied in this study, legume enrichment did not prevent full expansion, indicating that matrix composition alone does not determine expansion limits. Rather, the observed plateau corresponds to the point at which vapor pressure and matrix softening can no longer support additional structural transformation, as previously described by Cai et al. (2024).

Following the initial characterization of expansion kinetics, a closer examination of the formulation–time interaction reveals that expansion did not decrease monotonically with increasing *Phaseolus coccineus* content. Instead, the response exhibited a non-linear behavior, with low-to-moderate inclusions (10%–20%) achieving expansions similar to maize at intermediate exposure times, while the 45% blend reached maize-like values only at longer intervals. This pattern suggests that multiple compositional and structural factors acted simultaneously during microwave heating, generating local optima rather than a single directional trend.

Such non-linearities have been documented in cereal–pulse systems where starch dilution, protein-induced melt strength, and fiber-driven viscosity interact to define a narrow window of deformability that enables effective cell expansion (Alam et al. 2016; Neder-Suárez et al. 2021). In the present study, formulations with intermediate protein–fiber levels (20%–40%) exhibited reduced expansion at 15–18 s, likely due to a less favorable balance between vapor pressure buildup and matrix softening. Conversely, the 45% formulation reached adequate plasticity only at longer exposure times, allowing bubble growth despite its lower starch fraction. Similar delayed or shifted expansion peaks have been reported for pulse-enriched extrudates subjected to differential heating profiles (Alonso et al. 2000; Altan et al. 2009).

At shorter exposure times (9–12 s), the energy input was insufficient to differentiate among formulations, but from 15 s onward maize-rich systems consistently outperformed legume-dominant ones. This is consistent with the higher puffing efficiency of starch-rich matrices, which gelatinize and vaporize rapidly under microwave heating (Alam et al. 2016). The ability of the 45% bean formulation to match maize at 20–21 s contrasts with the commonly reported inhibitory effect of pulse proteins and fibers on puffing (Altan et al. 2009), suggesting that extrusion-induced plasticization or specific starch–protein interactions may partially mitigate these restrictions (Alonso et al. 2000).

The consistently low expansion of the 100% bean sample aligns with the limited gelatinizable starch and greater structural rigidity reported for legume-only matrices. In contrast, starch-rich systems such as maize and the 10%–20% blends maintained sufficient matrix continuity to support rapid puffing across the microwave intervals evaluated. These results underscore that expansion capacity emerges from the combined effects of composition, moisture redistribution, melt rheology, and thermal–mechanical history, rather than from legume concentration alone.

These findings underscore the importance of the formulation–time interaction in developing third-generation extruded snacks. Selecting appropriate levels of legume enrichment and exposure time can optimize texture, visual appeal, and structural quality while retaining functional nutritional attributes.

3.2.2 | Expansion Index, Bulk Density, Texture, and Hydration Properties

The expansion index (EI) was significantly affected by the formulation, both before and after microwave treatment. One-way ANOVA confirmed statistically significant differences among extrudates in their EI before expansion ($p < 0.001$) and after expansion ($p < 0.001$), indicating that the level of *Phaseolus coccineus* incorporation influenced radial expansion of the extrudates at both stages (Table 2).

Before microwave exposure, EI values of the maize control and the 20%–45% bean formulations were comparable, suggesting that these blends maintained sufficient starch continuity to support initial puffing. In contrast, the 100% bean sample exhibited the lowest EI (1.20 ± 0.02), consistent with its limited gelatinizable starch and greater structural rigidity (Neder-Suárez et al. 2021). These baseline EI differences align with the structural constraints previously reported for legume-only matrices, where reduced starch availability limits the capacity for radial expansion.

Following microwave expansion, EI increased in all formulations, reflecting the transition from the unexpanded pellet to the fully puffed structure. The highest post-expansion EI was observed in the 10% bean formulation (2.21 ± 0.07), which mirrors the superior expansion behavior detected in the time-resolved profiles (Figure 1). This suggests that low-to-moderate legume inclusion may preserve matrix plasticity and moisture distribution, enabling efficient vapor-driven expansion (Vicente-Jurado et al. 2024). The limited post-expansion EI of the 100% bean formulation reinforces the requirement for starch-rich matrices to achieve desirable puffing performance (Alonso et al. 2000). Overall, EI results complement the microwave expansion kinetics by quantifying pellet-to-snack dimensional changes at the optimal expansion time and further highlighting the compositional balance needed to achieve functional expansion in legume-enriched extrudates.

At baseline, EI values were comparable for maize and the 20%–45% bean blends, whereas the bean-only formulation showed the lowest EI, in line with the restricted puffing capacity of legume-dominant matrices due to lower gelatinizable starch and higher antinutrient burdens that limit plasticization and gas cell growth (Alonso et al. 2000). Bulk density of pellets was correspondingly higher in legume-rich systems, reflecting a tighter, less aerated structure prior to microwave expansion. Similar behavior—where composition (starch dilution, protein/fiber increase) constrains pre-expansion structure—has been described in cereal–pulse extrudates and related 3G systems (Neder-Suárez et al. 2021).

After microwave exposure, EI increased in all formulations, with low-to-moderate bean inclusion (≈10%–20%) yielding the highest EI among blends, while the bean-only product remained the least expanded. This pattern is consistent with extrusion/microwave literature showing that starch-dominant matrices achieve greater cell growth and porosity than protein/fiber-rich ones (Altan et al. 2009). The observed drop in bulk density after expansion confirms the expected inverse relation between density and radial growth in expanded snacks; severe screw/thermal–mechanical histories and suitable moisture profiles typically promote higher specific expansion and lower density, trends widely reported in extrudate engineering studies (Altan et al. 2009; Ding et al. 2005; Fu et al. 2024).

Across formulations and stages, bulk density was inversely related to EI: pellets with higher density expanded less, and, post-microwave, samples with greater EI exhibited the lowest densities. Such inverse coupling between structural aeration (expansion) and mass/volume compaction (density) is a canonical outcome of starch melt expansion under thermo-mechanical processing (Alam et al. 2016). Mechanical properties tracked structural metrics. Higher pellet density coincided with greater hardness; upon expansion, hardness and fracturability decreased as EI increased and density fell, indicating a more open cell network. These relationships—hardness decreasing with increasing expansion and decreasing density—are well documented for extruded snacks and arise from the thinning of cell walls and increased void fraction during puffing (Jacquet et al. 2025).

Hydration indices reflected matrix composition and expansion state. In pellets, increasing bean content raised WAI/WSI ($p < 0.001$), consistent with the water-binding/solubilizing capacity of pulse components and fiber. After microwave expansion, blends showing greater EI tended to maintain higher WAI/WSI than legume-only products, suggesting that an adequately expanded, starch-supported network facilitates water uptake/solubility, whereas protein–fiber dominance without sufficient starch continuity limits both expansion and hydration performance (Du et al. 2014). These trends align with prior observations in 3G maize–legume systems and broader extrusion reviews connecting process-induced porosity and macromolecular rearrangements to WAI/WSI behavior (Alam et al. 2016; Gallo et al. 2022).

Taken together, these patterns demonstrate that low-to-moderate *P. coccineus* enrichment (10%–30%) offers the most favorable balance between expansion capacity, mechanical integrity, and hydration performance—aligning with prior findings in mixed cereal–pulse extrusion systems. This formulation range therefore represents the optimal compromise for achieving desirable techno-functional characteristics in third-generation microwave-expanded snacks.

TABLE 2 | Effect of *Phaseolus coccineus* enrichment on the expansion index, bulk density, texture, and hydration properties of extruded blue maize (*Zea mays*) snacks, before and after microwave expansion (mean ± standard deviation).

	Extruded samples						Extruded samples with microwave expansion					
Formulation	EI	Bulk density ($kg\,m^{-3}$)	Hardness (*N*)	Fracturability (*N*)	WAI ($g\,g^{-1}$)	WSI (%)	EI	Bulk density ($kg\,m^{-3}$)	Hardness (*N*)	Fracturability (*N*)	WAI ($g\,g^{-1}$)	WSI (%)
Extruded blue maize	1.34 ± 0.04^{c}	1249.33 ± 53.47^{a}	14.41 ± 2.24^{a}	11.26 ± 4.26^{j}	2.56 ± 0.04^{a}	9.45 ± 0.33^{a}	2.16 ± 0.07^{b}	436.58 ± 29.06^{cde}	9.76 ± 3.39^{c}	6.59 ± 3.01^{i}	4.78 ± 0.04^{b}	4.78 ± 0.04^{b}
Extruded ayocote bean	1.20 ± 0.02^{e}	1350.35 ± 74.45^{a}	2.88 ± 0.56^{g}	2.33 ± 0.89^{n}	3.04 ± 0.10^{g}	21.08 ± 0.21^{f}	1.64 ± 0.23^{e}	804.42 ± 63.63^{b}	3.87 ± 0.79^{g}	2.85 ± 1.54^{n}	4.17 ± 0.12^{e}	4.17 ± 0.12^{e}
Extruded 10% bean	1.27 ± 0.03^{d}	1683.83 ± 69.23^{c}	7.89 ± 1.04^{d}	6.69 ± 2.36^{k}	2.67 ± 0.05^{cde}	10.52 ± 0.18^{d}	2.21 ± 0.07^{a}	380.91 ± 24.41^{e}	6.56 ± 1.21^{h}	5.16 ± 2.14^{kl}	5.13 ± 0.06^{c}	5.13 ± 0.06^{c}
Extruded 20% bean	1.34 ± 0.02^{c}	1309.26 ± 84.86^{a}	7.83 ± 0.81^{d}	6.82 ± 2.46^{k}	2.74 ± 0.04^{bc}	11.45 ± 0.23^{c}	2.08 ± 0.04^{b}	480.18 ± 20.16^{cde}	4.74 ± 0.58^{e}	3.90 ± 1.55^{efg}	4.74 ± 0.02^{b}	4.74 ± 0.03^{b}
Extruded 30% bean	1.35 ± 0.02^{c}	1263.62 ± 78.93^{a}	6.78 ± 0.74^{e}	5.73 ± 2.27^{k}	2.79 ± 0.05^{bcd}	12.37 ± 0.27^{b}	1.99 ± 0.07^{b}	495.77 ± 44.03^{cde}	4.53 ± 0.67^{e}	3.33 ± 1.84^{ij}	4.80 ± 0.04^{b}	4.80 ± 0.04^{b}
Extruded 40% bean	1.31 ± 0.02^{cde}	1529.42 ± 112.82^{ab}	5.69 ± 1.16^{g}	5.52 ± 1.57^{k}	2.85 ± 0.03^{b}	13.45 ± 0.33^{a}	2.02 ± 0.09^{b}	552.37 ± 62.15^{cde}	4.32 ± 0.80^{e}	2.99 ± 1.68^{n}	4.87 ± 0.11^{b}	4.87 ± 0.11^{b}
Extruded 45% bean	1.34 ± 0.02^{c}	1283.05 ± 34.09^{a}	6.17 ± 1.17^{fg}	5.77 ± 1.58^{k}	2.85 ± 0.02^{b}	13.99 ± 0.17^{a}	2.16 ± 0.10^{b}	395.40 ± 69.18^{e}	4.33 ± 0.84^{e}	3.63 ± 1.31^{efg}	4.77 ± 0.16^{b}	4.77 ± 0.16^{b}

Note: Each value represents the mean ± standard deviation of replicate measurements. Expansion index (EI), bulk density, and microwave expansion kinetics were determined with five replicates per treatment ($n = 5$); texture parameters (hardness and fracturability) with 25 replicates ($n = 25$); and hydration indices (WAI and WSI) in triplicate ($n = 3$). Evaluations were conducted on extruded samples before and after microwave expansion. Superscript letters indicate significant differences within each column ($p < 0.05$) according to Tukey's HSD test.

3.3 | Color Parameters

Significant differences were observed among all formulations in the CIELAB color parameters (L^*, a^*, b^*) for both non-expanded and expanded samples ($p < 0.001$), indicating that the incorporation of *Phaseolus coccineus* influenced the visual properties of the extrudates during both processing stages, as shown in Table 3.

Color parameters were significantly influenced by both formulation and microwave expansion. In non-expanded extrudates, the unexpectedly high lightness (L^*) in the 45% bean formulation suggests a pigment dilution effect, possibly due to starch encapsulation or matrix scattering, which contrasts with prior reports where higher legume content generally darkens extrudates. The red–green axis (a^*) peaked in the 10% and 45% blends, while intermediate formulations showed reduced redness, indicating non-linear pigment behavior, likely tied to anthocyanin–protein or fiber interactions (Alvarez-Jubete et al. 2010).

Post-expansion, the blue maize control exhibited the highest L^* and a^* values, suggesting increased brightness and red tonalities. This behavior may be associated with matrix restructuring and enhanced pigment dispersion, which alters light absorption and reflection. A similar phenomenon has been reported in anthocyanin-rich systems, where thermal processing modifies chromatic properties by influencing pigment stability and their interaction with the food matrix (Khanal et al. 2009). However, higher bean content lowered both values, suggesting pigment degradation or thermal masking by legume constituents. The shift in b^* values—from negative in blue maize to strongly positive in the 45% bean formulation—demonstrates a clear chromatic transition toward yellowness, reflecting the absence of blue anthocyanins and the dominance of non-pigmented legume components.

Overall, these results highlight how both ingredient composition and expansion conditions modulate visual attributes. Optimizing bean inclusion is thus essential to maintain the visual identity of blue maize while improving nutritional value.

3.4 | Microstructural and Morphological Characterization

3.4.1 | Scanning Electron Microscopy

The SEM analysis confirmed substantial morphological transformations induced by extrusion and microwave expansion (Figure 2). In the raw samples, the well-preserved granules of *Zea mays* (Figure 2a) and the compact matrix of *Phaseolus coccineus* (Figure 2b) are indicative of native starch and protein organization. These structures reflect their unprocessed state, with clear starch granules in maize and dense, protein-rich regions in the bean—typical of cereal and legume matrices, respectively (Singh et al. 2006).

After extrusion (Figure 2c,d), the microstructure of the 30% bean formulation revealed extensive loss of granular definition and the appearance of fragmented, fused material. These features are characteristic of complete starch gelatinization and protein denaturation under high thermal and mechanical energy (Ding et al. 2005). The collapse of laminar zones and the absence of discrete granules support the occurrence of matrix melting and reassociation, particularly relevant in starch–protein systems where interactions influence viscoelastic behavior and expansion potential (Alam et al. 2016).

Microwave expansion further intensified the structural changes (Figure 2e,f). The appearance of porous, sponge-like textures and ruptured surfaces suggest violent water vapor release and cell wall disruption during rapid heating. Such morphological alterations are consistent with the mechanism of microwave-induced puffing, in which moisture vaporizes internally and expands the softened matrix (Moraru and Kokini 2003). Interestingly, although the 30% blend contains substantial legume content—often associated with reduced puffing due to

TABLE 3 | Effect of *Phaseolus coccineus* enrichment on CIELAB color parameters (L^*, a^*, b^*) of extruded blue maize (*Zea mays*) snacks, before and after microwave expansion (mean ± standard deviation).

	Extruded samples			Extruded samples with microwave expansion		
Formulation	**L^***	**a^***	**b^***	**L^***	**a^***	**b^***
Extruded blue maize	18.01 ± 0.46^{b}	5.05 ± 0.19^{e}	0.02 ± 0.01^{a}	34.86 ± 0.38^{c}	10.05 ± 0.55^{f}	-0.48 ± 0.11^{a}
Extruded ayocote bean	16.30 ± 0.21^{a}	2.36 ± 0.03^{a}	1.34 ± 0.11^{b}	30.73 ± 0.62^{bc}	7.41 ± 0.12^{bc}	8.52 ± 0.39^{f}
Extruded 10% bean	21.00 ± 0.02^{c}	5.95 ± 0.02^{f}	1.29 ± 0.02^{b}	30.53 ± 0.33^{b}	8.48 ± 0.01^{e}	1.67 ± 0.16^{b}
Extruded 20% bean	19.84 ± 0.56^{bc}	4.75 ± 0.14^{d}	1.50 ± 0.11^{bc}	34.29 ± 0.50^{de}	8.04 ± 0.11^{d}	2.91 ± 0.03^{c}
Extruded 30% bean	18.38 ± 0.34^{a}	3.73 ± 0.01^{c}	1.38 ± 0.07^{b}	32.68 ± 0.76^{cd}	7.61 ± 0.72^{c}	3.56 ± 0.04^{d}
Extruded 40% bean	18.66 ± 0.40^{ab}	3.36 ± 0.01^{b}	1.68 ± 0.09^{c}	32.25 ± 1.49^{bc}	7.18 ± 0.14^{b}	4.16 ± 0.10^{e}
Extruded 45% bean	31.82 ± 0.78^{d}	6.86 ± 0.11^{g}	4.95 ± 0.19^{d}	17.37 ± 0.01^{a}	2.99 ± 0.01^{a}	1.50 ± 0.02^{b}

Note: Color measurements were performed in triplicate ($n = 3$) using a tristimulus reflectance spectrophotometer under D65 illumination and 10° standard observer conditions. L^* indicates lightness (0 = black, 100 = white), a^* represents the red–green axis (positive = red, negative = green), and b^* represents the yellow–blue axis (positive = yellow, negative = blue). Superscript letters within each column indicate significant differences between formulations ($p < 0.05$) according to Tukey's HSD test.

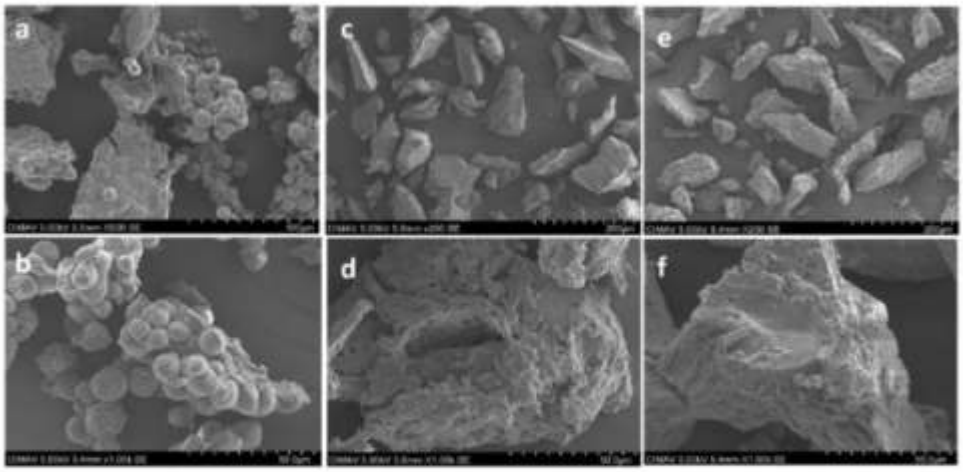


FIGURE 2 | Scanning electron micrographs (SEM) of raw blue maize (*Zea mays*) at 1.00 kx magnification (a) and raw purple ayocote bean (*Phaseolus coccineus*) at 1.00 kx (b). Images (c) and (d) correspond to the non-expanded extrudate of blue maize enriched with 30% *P. coccineus* at 200x and 1.00 kx magnification, respectively. Images (e) and (f) show the microwave-expanded extrudate of the same 30% bean formulation at 200x and 1.00 kx, respectively.

protein rigidity—the observed porosity implies that the starch–protein matrix remained sufficiently plasticized to allow expansion. Similar results were reported by Camire et al. (1990), who observed that moderate legume inclusion could preserve puffing quality while enhancing nutritional value.

These observations reinforce the functional balance achieved in the 30% blend: extrusion-induced matrix reorganization facilitates expansion, while moderate legume inclusion preserves enough starch integrity for effective puffing. The SEM evidence corroborates instrumental measurements of bulk density and expansion index, providing a microstructural rationale for the macroscopic textural and functional trends.

3.4.2 | X-Ray Analysis

The X-ray diffraction (XRD) patterns of raw flours and extruded blends (Figure 3) revealed marked transformations in starch crystalline organization induced by extrusion. The diffractogram of raw blue maize displayed an A-type pattern with prominent peaks at 2θ≈15.4°, 17.3°, 18.1°, and 19.5°, typical of native cereal starches (Cabrera-Ramírez et al. 2021). In contrast, the raw *Phaseolus coccineus* flour exhibited lower intensity reflections consistent with the C-type polymorphism characteristic of legume starches (Liu et al. 2025).

Following extrusion, all samples exhibited broadening and intensity loss of the characteristic peaks, evidencing partial destruction of native crystallites and gelatinization of starch. This disruption was more pronounced as bean inclusion increased, with the 40% and 45% formulations showing a diffuse amorphous halo, indicative of reduced long-range order (Mironeasa et al. 2023). The attenuation of A-type peaks suggests that the combined thermal–mechanical and shear forces during extrusion induced a transition toward amorphous regions, where the native double helices of amylopectin were largely disrupted (Huang et al. 2022).

Interestingly, the intermediate 20%–30% bean formulations retained moderate diffraction intensity between 17° and 19°, suggesting limited structural reorganization or partial recrystallization of short-range order. This may reflect the formation of amylose–protein or amylose–lipid complexes (V-type crystallinity), stabilized through hydrophobic or hydrogen interactions (Castro-Campos et al. 2024; Islam et al. 2022). These complexes, while distinct from native crystalline lamellae, contribute to mechanical stability and modulated expansion behavior.

Overall, XRD analysis confirms that extrusion drastically altered the crystalline profile of blue maize–bean matrices, with increasing legume content promoting amorphization. Moderate bean inclusion (20%–30%) allowed partial crystalline retention, possibly contributing to improved expansion and texture balance, whereas higher inclusions favored amorphous structures that enhance digestibility but may compromise mechanical integrity.

3.4.3 | Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) Analysis

The FT-IR spectra of extruded blue maize–*Phaseolus coccineus* snacks (Figure 4) exhibited consistent molecular fingerprints across formulations, with intensity variations reflecting compositional and structural changes caused by extrusion. The broad absorption band between 3600 and 3000 cm^{-1}, corresponding to O–H and N–H stretching vibrations, increased

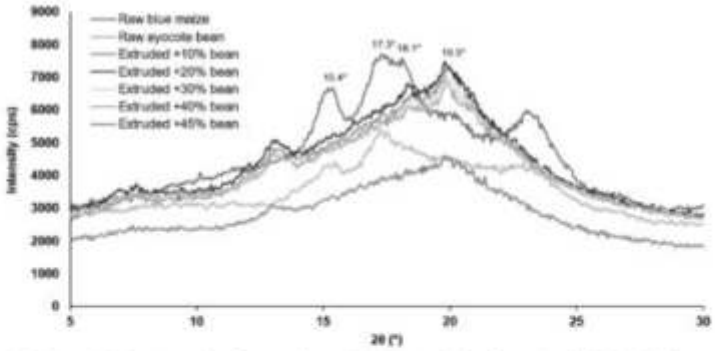


FIGURE 3 | X-ray diffraction (XRD) patterns of raw flours and extruded blue maize–*Phaseolus coccineus* blends. Raw blue maize shows typical A-type crystalline peaks near 15.4°, 17.3°, 18.1°, and 19.5° (2θ), while raw ayocote bean displays weaker reflections characteristic of C-type starch. After extrusion, peak intensity and sharpness decreased, particularly at high bean levels, indicating progressive amorphization and loss of long-range crystalline order. Intermediate formulations (20%–30%) retained partial intensity, suggesting limited recrystallization or V-type complex formation associated with starch–protein–lipid interactions.

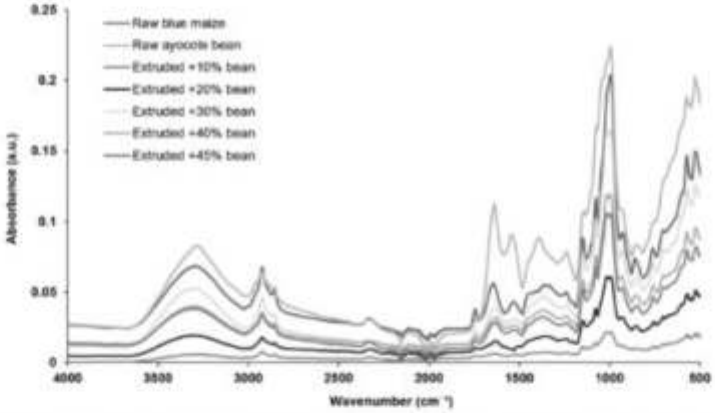


FIGURE 4 | ATR-FTIR spectra of raw flours and extruded blue maize–*Phaseolus coccineus* blends showing the effect of legume inclusion on molecular structure. Major absorption regions correspond to O—H/N—H stretching (3600–3000 cm^{-1}), C—H stretching (≈2920 cm^{-1}), amide I and II vibrations (≈1650 and 1540 cm^{-1}), and C—O stretching of polysaccharides (≈1045 cm^{-1}). Increasing bean proportion caused attenuation of starch-related bands (≈1045 cm^{-1}) and amplification of protein-related amide bands, indicating reduced starch order and enhanced protein contribution after extrusion.

slightly with bean inclusion, indicating higher content of protein and hydroxyl-rich polysaccharides from *P. coccineus* (Hong et al. 2021; Garcia-Valle et al. 2021).

Characteristic amide I (≈1650 cm^{-1}) and amide II (≈1540 cm^{-1}) peaks became progressively more defined in bean-enriched samples, confirming enhanced protein contribution to the matrix. This agrees with previous reports that the addition of legume proteins strengthens amide absorptions through the C=O (amide I) and N—H bending/C—N stretching (amide II) vibrations (Liu et al. 2025; Usoltsev et al. 2019).

Conversely, the C—H stretching band near 2920 cm^{-1}—mainly related to lipid alkyl chains—showed higher intensity in maize-dominant formulations and diminished as bean proportion increased, suggesting partial lipid dilution or association with protein and fiber components. The strong band around 1045 cm^{-1}, assigned to C—O stretching in polysaccharides and indicative of starch order, decreased progressively with legume addition, confirming starch dilution and reduced structural order due to protein–starch interactions and gelatinization during extrusion (Bisharat et al. 2013; Rathod and Annapure 2016; Neder-Suárez et al. 2021; Sevenou et al. 2002).

Collectively, these spectral modifications demonstrate that increasing *P. coccineus* levels modify the chemical environment of starch and protein within the extruded matrix. The attenuation of the 1047/1022 cm^{-1} region reflects decreased short-range crystalline order and increased amorphous character, consistent with extrusion-induced molecular reorganization. The strengthened amide bands corroborate the biochemical integration of legume proteins, supporting the notion that formulation strongly governs matrix interactions and functional behavior in third-generation extruded snacks.

4 | Conclusions

Through this work, we were able to explore how the incorporation of *Phaseolus coccineus* into blue maize-based formulations affects the physical, functional, and structural behavior of third-generation extruded snacks. By evaluating a wide range of properties, including expansion kinetics, texture, color, water interactions, and microstructural changes, we gained a clearer understanding of how legume enrichment modifies both the nutritional value and the processing performance of the product. We observed that even moderate levels of bean inclusion enhanced protein and fiber content without compromising expansion or texture. The combination of extrusion and microwave puffing proved to be an effective approach to produce snacks with appealing structure and improved functionality.

These findings reflect a practical effort to use native ingredients in innovative ways. While there is still more to explore, especially in terms of sensory and shelf-life performance, this work lays a solid foundation for developing healthier and more sustainable snack options through food engineering.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support provided by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Mexico) through a postgraduate scholarship awarded to the first author. We also thank Tecnológico de Monterrey and the Cereal Laboratory at Centro FEMSA de Biotecnología for providing the facilities and technical support required for the extrusion processing.

Funding

The authors have nothing to report.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

Acurio, L., D. Salazar, B. Castillo, C. Santiana, J. Martínez-Monzó, and M. Igual. 2024. "Characterization of Second-Generation Snacks Manufactured From Andean Tubers and Tuberous Root Flours." *Foods* 13, no. 1: 1. https://doi.org/10.3390/foods13010051.

Al Faruq, A., A. Farahnaky, P. J. Torley, R. Buckow, R. Ezzi, and M. Majzoobi. 2025. "Sustainable Approaches to Boost Soluble Dietary Fibre in Foods: A Path to Healthier Foods." *Food Hydrocolloids* 162: 110880. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.110880.

Alam, M. S., J. Kaur, H. Khaira, and K. Gupta. 2016. "Extrusion and Extruded Products: Changes in Quality Attributes as Affected by Extrusion Process Parameters: A Review." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56, no. 3: 445–475. https://doi.org/10.1080/10408398.2013.779568.

Alonso, R., A. Aguirre, and F. Marzo. 2000. "Effects of Extrusion and Traditional Processing Methods on Antinutrients and In Vitro Digestibility of Protein and Starch in Faba and Kidney Beans." *Food Chemistry* 68, no. 2: 159–165. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00169-7.

Altan, A., K. L. McCarthy, and M. Maskan. 2009. "Effect of Screw Configuration and Raw Material on Some Properties of Barley Extrudates." *Journal of Food Engineering* 92, no. 4: 377–382. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.12.010.

Alvarez-Jubete, L., E. K. Arendt, and E. Gallagher. 2010. "Nutritive Value of Pseudocereals and Their Increasing Use as Functional Gluten-Free Ingredients." *Trends in Food Science & Technology* 21, no. 2: 106–113. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.10.014.

Alvarez-Martinez, L., K. p. Kondury, and J. m. Harper. 1988. "A General Model for Expansion of Extruded Products." *Journal of Food Science* 53, no. 2: 609–615. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb07768.x.

Anderson, R. A., H. F. Conway, and A. J. Pepliński. 1970. "Gelatinization of Corn Grits by Roll Cooking, Extrusion Cooking and Steaming." *Starch—Stärke* 22, no. 4: 130–135. https://doi.org/10.1002/star.19700220408.

Bisharat, G. I., V. P. Oikonomopoulou, N. M. Panagiotou, M. K. Krokida, and Z. B. Maroulis. 2013. "Effect of Extrusion Conditions on the Structural Properties of Corn Extrudates Enriched With Dehydrated Vegetables." *Food Research International* 53, no. 1: 1–14. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.043.

Cabrera-Ramírez, A. H., E. Morales-Sánchez, G. Méndez-Montealvo, et al. 2021. "Structural Changes in Popped Sorghum Starch and Their Impact on the Rheological Behavior." *International Journal of Biological Macromolecules* 186: 686–694. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.018.

Cai, M., Y. Zhang, H. Cao, et al. 2024. "Exploring the Remarkable Effects of Microwave Treatment on Starch Modification: From Structural Evolution to Changed Physicochemical and Digestive Properties." *Carbohydrate Polymers* 343: 122412. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122412.

Camire, M. E., A. Camire, and K. Krumhar. 1990. "Chemical and Nutritional Changes in Foods During Extrusion." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 29, no. 1: 35–57. https://doi.org/10.1080/10408399009527513.

Castro-Campos, F. G., E. A. Esquivel-Fajardo, E. Morales-Sánchez, et al. 2024. "Resistant Starch Type 5 Formation by High Amylopectin Starch–Lipid Interaction." *Foods* 13, no. 23: 3888. https://doi.org/10.3390/foods13233888.

Clemente-Suárez, V. J., A. I. Beltrán-Velasco, L. Redondo-Flórez, A. Martín-Rodríguez, and J. F. Tornero-Aguilera. 2023. "Global Impacts of Western Diet and Its Effects on Metabolism and Health: A Narrative Review." *Nutrients* 15, no. 12: 2749. https://doi.org/10.3390/nu15122749.

Delgado-Nieblas, C., E. Aguilar-Palazuelos, A. Gallegos-Infante, N. Rocha-Guzmán, J. Zazueta-Morales, and J. Caro-Corrales. 2012. "Characterization and Optimization of Extrusion Cooking for the Manufacture of Third-Generation Snacks With Winter Squash (*Cucurbita moschata* D.) Flour." *Cereal Chemistry* 89, no. 1: 65–72. https://doi.org/10.1094/CCHEM-02-11-0016.

Delgado-Nieblas, C., K. Ruiz-Beltrán, J. Sánchez-Lizárraga, et al. 2019. "Effect of Extrusion on Physicochemical, Nutritional and Antioxidant Properties of Breakfast Cereals Produced From Bran and Dehydrated Naranjita Pomace." *CyTA Journal of Food* 17, no. 1: 240–250. https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1566276.

Ding, Q.-B., P. Ainsworth, G. Tucker, and H. Marson. 2005. "The Effect of Extrusion Conditions on the Physicochemical Properties and Sensory Characteristics of Rice-Based Expanded Snacks." *Journal of Food Engineering* 66, no. 3: 283–289. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.03.019.

Du, S., H. Jiang, X. Yu, and J. Jane. 2014. "Physicochemical and Functional Properties of Whole Legume Flour." *LWT- Food Science and Technology* 55, no. 1: 308–313. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.06.001.

Enriquez, J. P., and E. Gollub. 2023. "Snacking Consumption Among Adults in the United States: A Scoping Review." *Nutrients* 15, no. 7: 1596. https://doi.org/10.3390/nu15071596.

Espinosa-Ramírez, J., R. M. Mariscal-Moreno, C. Chuck-Hernández, S. O. Serna-Saldívar, and R. S. Espiricueta-Candelaria. 2022. "Effects of the Substitution of Wheat Flour With Raw or Germinated Ayocote Bean (*Phaseolus Coccineus*) Flour on the Nutritional Properties and Quality of Bread." *Journal of Food Science* 87, no. 9: 3766–3780. https://doi.org/10.1111/1750-3841.16263.

Fu, X., W. Li, T. Zhang, H. Li, M. Zang, and X. Liu. 2024. "Effect of Extrusion on the Protein Structure and Digestibility of Extruded Soybean Protein." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 104, no. 4: 2225–2232. https://doi.org/10.1002/jsfa.13109.

Gasini, Z., H. Malmir, P. Mirmiran, Z. Peiry, and F. Azizi. 2023. "Snack Consumption Patterns and Their Associations With Risk of Incident Metabolic Syndrome: Tehran Lipid and Glucose Study." *Nutrition & Metabolism* 20, no. 1: 25. https://doi.org/10.1186/s12986-023-00745-0.

Gallo, V., A. Romano, B. Miralles, et al. 2022. "Physicochemical Properties, Structure and Digestibility in Simulated Gastrointestinal Environment of Bread Added With Green Lentil Flour." *LWT* 154: 112713. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112713.

García-Valle, D. E., L. A. Bello-Pérez, E. Agama-Acevedo, and J. Alvarez-Ramirez. 2021. "Structural Characteristics and *In Vitro* Starch Digestibility of Pasta Made With Durum Wheat Semolina and Chickpea Flour." *LWT* 145: 111347. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111347.

Guzmán-Geronimo, R. I., T. M. Alarcón-Zavaleta, R. M. Oliart-Ros, J. E. Meza-Alvarado, S. Herrera-Meza, and J. L. Chávez-Servia. 2017. "Blue Maize Extract Improves Blood Pressure, Lipid Profiles, and Adipose Tissue in High-Sucrose Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rats." *Journal of Medicinal Food* 20, no. 2: 110–115. https://doi.org/10.1089/jmf.2016.0087.

Herrera-Sotero, M. Y., C. D. Cruz-Hernández, C. Trujillo-Carretero, et al. 2017. "Antioxidant and Antiproliferative Activity of Blue Corn and Tortilla From Native Maize." *Chemistry Central Journal* 11, no. 1: 110. https://doi.org/10.1186/s13065-017-0341-x.

Hong, T., J.-Y. Yin, S.-P. Nie, and M.-Y. Xie. 2021. "Applications of Infrared Spectroscopy in Polysaccharide Structural Analysis: Progress, Challenge and Perspective." *Food Chemistry: X* 12: 100168. https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100168.

Huang, X., H. Liu, Y. Ma, S. Mai, and C. Li. 2022. "Effects of Extrusion on Starch Molecular Degradation, Order–Disorder Structural Transition and Digestibility—A Review." *Food* 11, no. 16: 2538. https://doi.org/10.3390/foods11162538.

Islam, M., Y. Huang, M. S. Islam, et al. 2022. "Effect of High-Moisture Extrusion on Soy Meat Analog: Study on Its Morphological and Physiochemical Properties." *Italian Journal of Food Science* 34, no. 2: 9–20. https://doi.org/10.15586/ijfs.v3412.2141.

Jacquet, N., A. Plompteux, Y. Brostaux, P. Malumba, S. Danthine, and C. Blecker. 2023. "Study of the Impact of Operating Parameters and the Addition of Fat on the Physicochemical and Texture Properties of Extruded Snacks." *Food* 14, no. 8: 1307. https://doi.org/10.3390/foods14081307.

Jafarzadeh, S., Z. Qazanfarzadeh, M. Majzoobi, et al. 2024. "Alternative Proteins; A Path to Sustainable Diets and Environment." *Current Research in Food Science* 9: 100882. https://doi.org/10.1016/j.crfs.2024.100882.

Kantanen, K., B. Chamlagain, V. Succi, et al. 2024. "Fermentation of Faba Bean Flour as a Pre-Treatment in High-Moisture Extrusion for Simultaneous Fortification of Vitamin B12 and Reduction of Raffinose Oligosaccharides in Meat Analogues." *Future Foods* 10: 100518. https://doi.org/10.1016/j.fufo.2024.100518.

Khanal, R. C., L. R. Howard, and R. L. Prior. 2009. "Procyanidin Content of Grape Seed and Pomace, and Total Anthocyanin Content of Grape Pomace as Affected by Extrusion Processing." *Journal of Food Science* 74, no. 6: H174–H182. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01221.x.

King, J., S. Y. Leong, M. Alpos, et al. 2024. "Role of Food Processing and Incorporating Legumes in Food Products to Increase Protein Intake and Enhance Satiety." *Trends in Food Science & Technology* 147: 104466. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104466.

Kumar, P., A. K. Verma, D. Kumar, P. Umaraw, N. Mehta, and O. P. Malav. 2019. "Meat Snacks: A Novel Technological Perspective." In *Innovations in Traditional Foods*, edited by C. M. Galanakis, 293–321. Woodhead Publishing. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814887-7.00011-3.

Lisiecka, K., A. Wójtowicz, and M. Gancarz. 2021. "Characteristics of Newly Developed Extruded Products Supplemented With Plants in a Form of Microwave-Expanded Snacks." *Materials* 14, no. 11: 2791. https://doi.org/10.3390/ma14112791.

Lisiecka, K., A. Wójtowicz, K. Samborska, et al. 2023. "Structure and Texture Characteristics of Novel Snacks Expanded by Various Methods." *Materials* 16, no. 4: 1541. https://doi.org/10.3390/ma16041541.

Liu, C., X. Wen, X. Zhang, Z. Wang, L. Song, and X. Chang. 2025. "Microwave Treatment Alters the Multi-Scale Structure and Digestibility of Chestnut Starch." *LWT* 230: 118244. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2025.118244.

Michel, M., A. L. Eldridge, C. Hartmann, P. Klassen, J. Ingram, and G. W. Meijer. 2024. "Benefits and Challenges of Food Processing in the Context of Food Systems, Value Chains and Sustainable Development Goals." *Trends in Food Science & Technology* 153: 104703. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104703.

Mirmoeasa, S., I. Cotovanu, C. Mironeasa, and M. Ungureanu-Iuga. 2023. "A Review of the Changes Produced by Extrusion Cooking on the Bioactive Compounds From Vegetal Sources." *Antioxidants* 12, no. 7: 7. https://doi.org/10.3390/antiox12071453.

Moraru, C. I., and J. Kokini. 2003. "Nucleation and Expansion During Extrusion and Microwave Heating of Cereal Foods." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2, no. 4: 147–165. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00020.x.

Naumann, S., U. Schweiggert-Weisz, A. Martin, M. Schuster, and P. Eisner. 2021. "Effects of Extrusion Processing on the Physiochemical and Functional Properties of Lupin Kernel Fibre." *Food Hydrocolloids* 111: 106222. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106222.

Neder-Suárez, D., C. A. Amaya-Guerra, A. Quintero-Ramos, et al. 2016. "Physicochemical Changes and Resistant-Starch Content of Extruded Cornstarch With and Without Storage at Refrigerator Temperatures." *Molecules* 21, no. 8: 8. https://doi.org/10.3390/molecules21081064.

Neder-Suárez, D., A. Quintero-Ramos, C. O. Meléndez-Pizarro, J. de Jesús Zazueta-Morales, F. Paraguay-Delgado, and M. G. Ruiz-Gutiérrez. 2021. "Evaluation of the Physicochemical Properties of Third-Generation Snacks Made From Blue Corn, Black Beans, and

Sweet Chard Produced by Extrusion." *LWT* 146: 111414. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111414.

Pasqualone, A., M. Costantini, T. E. Coldea, and C. Summo. 2020. "Use of Legumes in Extrusion Cooking: A Review." *Food* 9, no. 7: 958. https://doi.org/10.3390/foods9070958.

Patil, R. T., J. D. J. Berrios, J. Tang, and B. G. Swanson. 2007. "Evaluation of Methods for Expansion Properties of Legume Extrudates." *Applied Engineering in Agriculture* 23, no. 6: 777–783. https://doi.org/10.13031/2013.24044.

Rathod, R. P., and U. S. Annapure. 2016. "Effect of Extrusion Process on Antinutritional Factors and Protein and Starch Digestibility of Lentil Splits." *LWT- Food Science and Technology* 66: 114–123. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.028.

Sahu, C., S. Patel, and A. K. Tripathi. 2022. "Effect of Extrusion Parameters on Physical and Functional Quality of Soy Protein Enriched Maize Based Extruded Snack." *Applied Food Research* 2, no. 1: 100072. https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100072.

Salazar-Villanea, S., W. H. Hendriks, E. M. A. M. Bruininx, H. Gruppen, and A. F. B. Van Der Poel. 2016. "Protein Structural Changes During Processing of Vegetable Feed Ingredients Used in Swine Diets: Implications for Nutritional Value." *Nutrition Research Reviews* 29, no. 1: 126–141. https://doi.org/10.1017/S0954422416000056.

Sevenou, O., S. F. Hill, I. A. Farhat, and J. R. Mitchell. 2002. "Organisation of the External Region of the Starch Granule as Determined by Infrared Spectroscopy." *International Journal of Biological Macromolecules* 31, no. 1: 79–85. https://doi.org/10.1016/S0141-8130(02)00067-3.

Shere, P., and R. Agrawal. 2024. *Extrusion Technology: Transforming Food Processing*. B P International. https://doi.org/10.9734/bpi/mono/978-81-972831-8-5.

Singh, N., L. Kaur, K. S. Sandhu, J. Kaur, and K. Nishinari. 2006. "Relationships Between Physicochemical, Morphological, Thermal, Rheological Properties of Rice Starches." *Food Hydrocolloids* 20, no. 4: 532–542. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.05.003.

Tan, X., F. Wu, Z. Guo, et al. 2025. "Amylose Content Controls the Structures and Digestibility of Starch-Lipid Complexes During Microwave Postprocessing." *Carbohydrate Polymers* 358: 123530. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2025.123530.

Teniente-Martínez, G., A. Bernardino-Nicanor, M. D. C. Valadez-Vega, J. L. Montañez-Soto, J. M. S. Juárez-Goiz, and L. González-Cruz. 2022. "*In Vitro* Study of the Antihypertensive, Antioxidant and Antiproliferative Activities of Peptides Obtained From Two Varieties of *Phaseolus coccineus* L." *CyTA Journal of Food* 20, no. 1: 102–110. https://doi.org/10.1080/19476337.2022.2090611.

Usoltsev, D., V. Sitnikova, A. Kajava, and M. Uspenskaya. 2019. "Systematic FTIR Spectroscopy Study of the Secondary Structure Changes in Human Serum Albumin Under Various Denaturation Conditions." *Biomolecules* 9, no. 8: 359. https://doi.org/10.3390/biom9080359.

Vicente-Jurado, D., J. D. Gutiérrez-Cano, P. García-Segovia, J. M. Catalá-Civera, J. Martínez-Monzó, and M. Igual. 2024. "Evaluating Microwave Energy Impact on 3G Snacks: A Study on Dielectric Properties and Expansion." *Food Research International* 197: 115156. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.115156.

Villarreal-Rodríguez, G., J. Escajeda-García, N. Amaya-Olivas, et al. 2022. "Determination of Phenolic Compounds in Blue Corn Flour (*Zea mays* L.) Produced and/or Metabolized by Colletotrichum Gloeosporioides in a Fermentation Process." *Fermentation* 8, no. 6: 6. https://doi.org/10.3390/fermentation8060243.

Supporting Information

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section. **Table S1:** Effect of *Phaseolus coccineus* enrichment on the microwave expansion of extruded blue maize (*Zea mays*) snacks at different exposure times (mean ± standard deviation). **Figure S1:** Photographic comparison of microwave-expanded extruded snacks from blue maize (*Zea mays*) enriched with different levels of *Phaseolus coccineus* (10%–45%). Samples were expanded at 20 s, the optimal time identified for maximum expansion.

SCOPUS 2025 - Cite Score- 4.2

(Food Science Rank - 171/420)





